

Untersuchungen zum molekularen Mechanismus des neuronalen Glutamattransporters EAAC1

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt im Fachbereich

Chemische und pharmazeutische Wissenschaften

der Johann Wolfgang Goethe-Universität

in Frankfurt am Main

von

Natalie Watzke

aus Ulm

Frankfurt am Main

2001

(DF1)

vom Fachbereich Chemische und pharmazeutische Wissenschaften der Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Joachim Engels

Gutachter: Prof. Dr. Ernst Bamberg, Prof. Dr. Heinz Wässle

Datum der Disputation: 1. Juni 2001

"Bei meinem Streben
und Streiten und Bemühen
bitt ich euch, nicht zu lachen,
zuschauende Götter ..."

Johann Wolfgang von Goethe

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	5
ABKÜRZUNGEN	9
1. EINLEITUNG	11
1.1. Glutamattransporter-Familie	11
1.1.1. Eukaryotische Glutamattransporter und ihre Lokalisation	12
1.1.2. Struktur der Glutamattransporter	13
1.2. Funktionsweisen von Glutamattransportern	15
1.2.1. Stöchiometrie des Glutamattransportes	15
1.2.2. Glutamat-induzierte Anionenleitfähigkeit	16
1.2.3. Glutamat-unabhängige Leckleitfähigkeit	17
1.2.4. <i>Homoexchange</i> -Modus bei Glutamattransportern	18
1.2.5. Glutamat-Auswärtstransport.....	18
1.3. Struktur-Funktions-Beziehungen bei Glutamattransportern	18
1.3.1. Substratbindungsstellen	19
1.3.2. Inhibitoren für Glutamattransporter.....	19
1.4. Physiologische Bedeutung der Glutamattransporter	20
1.4.1. Physiologische Glutamatkonzentration im synaptischen Spalt	21
1.4.2. Pathologische Glutamatkonzentrationen im synaptischen Spalt.....	21
1.5. Charakterisierung von elektrogenen Transportern durch Strommessungen	22
1.5.1. Vorstationäre Kinetik von Transportern	23
1.5.2. Laserpuls-Photolyse.....	24
1.6. Problemstellung und Ziel der Arbeit	25
2. MATERIALIEN UND METHODEN	27
2.1. Heterologe Expression von EAAC1 in HEK293 Zellen	27
2.1.1. Zellkultur	27
2.1.2. Transfektion.....	28
2.2. Strommessungen	28
2.2.1. Geräte und Software zur <i>patch clamp</i> -Messung.....	29
2.2.2. Theoretische Grundlagen der <i>patch clamp</i> -Messung.....	29
2.2.3. Praktische Durchführung von Ganzzelleableitungen	30
2.2.4. Praktische Durchführung von <i>inside-out patch clamp</i> -Messungen	32

2.2.5. Messprotokolle	32
2.2.6. Photolyse-Experimente.....	33
2.2.7. Lösungen	34
2.2.8. Auswertung der Daten	36
3. ERGEBNISSE	37
3.1. Funktionelle Charakterisierung von EAAC1	37
3.1.1. Spannungsabhängigkeit der Affinität von EAAC1 für Glutamat	37
3.1.2. Spannungsabhängigkeit der Glutamat-induzierten Ströme von EAAC1 bei unterschiedlicher Verteilung des permeierenden Anions SCN^-	39
3.1.3. Vorstationäre Ströme in Abhängigkeit von der Glutamatkonzentration.....	42
3.1.4. Vorstationäre Messungen an EAAC1 in Ab- und Anwesenheit von SCN^-	44
3.1.5. Vorstationäre Messungen an EAAC1 in Abhängigkeit von der Haltespannung	45
3.1.6. Inhibition durch TBOA	46
3.1.7. Stationäre Messungen an EAAC1 im <i>inside-out patch</i>	48
3.1.8. Vorstationäre Messungen an EAAC1 im <i>inside-out patch</i>	50
3.1.9. Verhältnis zwischen Anionenleitfähigkeit und Glutamattransport bei EAAC1	50
3.2. pH-Abhängigkeit des Glutamattransportes bei EAAC1.....	51
3.2.1. pH-Abhängigkeit der Affinität von EAAC1 für Glutamat im Einwärts- bzw. Auswärtstransport-Modus	52
3.2.2. pH-Abhängigkeit des Glutamat-induzierten Stroms bzw. Maximalstroms	54
3.2.3. Einfluss des pH-Wertes auf das transiente Stromsignal von EAAC1.....	54
3.2.4. Einfluss des pH-Wertes auf die Strom-Spannungs-Kennlinie von EAAC1	55
3.2.5. Kinetischer Isotopen-Effekt.....	56
3.3. Einfluss der Na^+-Konzentration auf EAAC1-assoziierte Ströme	58
3.3.1. Na^+ -Konzentrationsabhängigkeit der Affinität von EAAC1 für Glutamat.....	58
3.3.2. Abhängigkeit des Glutamat-unabhängigen Leckstroms bei EAAC1 von der Natriumkonzentration.....	60
3.3.3. Na^+ -Konzentrationsabhängigkeit des Maximalstroms von EAAC1	60
3.3.4. Einfluss der extrazellulären Natriumkonzentration auf den vorstationären Strom von EAAC1	60
3.3.5. Einfluss der intrazellulären Natriumkonzentration auf den vorstationären Strom von EAAC1	62
3.3.6. Transiente Ströme bei EAAC1 nach Spannungssprüngen.....	63
3.4. Andere Substrate von EAAC1 und Funktion von mutanten EAAC1	64
3.4.1. Serinsulfat und Phosphoserin als Substrate von EAAC1.....	64
3.4.2. D-Aspartat als Substrat von EAAC1	65
3.4.3. Funktion von mutanten EAAC1	66
4. DISKUSSION	69
4.1. Charakterisierung der drei Funktionen von EAAC1.....	69
4.1.1. Glutamattransport	70

4.1.2. Trennung zwischen Anionenleitfähigkeit und Glutamattransport	70
4.1.3. Glutamat-unabhängige Leckleitfähigkeit	72
4.1.4. Transportmodell für EAAC1	72
4.1.5. Glutamat-Auswärtstransport von EAAC1	73
4.2. Einzelne Schritte im Transportzyklus und ihre Elektrogenität	74
4.2.1. Glutamatbindung und Übergang zum anionenleitfähigen Zustand \overline{TS}	75
4.2.2. Glutamattranslokation	75
4.2.3. Geschwindigkeits-bestimmender Schritt im Transportzyklus	77
4.2.4. Physiologische Situation an der Synapse.....	79
4.3. Protonentransport bei EAAC1.....	80
4.3.1. Modelle zur Bindungsreihenfolge von Glutamat und Proton	80
4.3.2. Protonenbindung an EAAC1	81
4.3.3. Protonen-Bindungsstelle bei EAAC1	82
4.3.4. Modell zum Protonentransport bei EAAC1.....	83
4.3.5. pH-Abhängigkeit der Glutamat-induzierten Anionenleitfähigkeit	85
4.3.6. Proton-Kotransport versus OH ⁻ -Gegentransport	86
4.3.7. Physiologische Relevanz der pK-Verschiebung des Protonakzeptors.....	87
4.3.8. Mutanten R444K und H295K.....	87
4.4. Bindung und Transport von Natriumionen bei EAAC1.....	88
4.4.1. Glutamat-unabhängige Na ⁺ -Bindung(en)	88
4.4.2. Modelle zur Bindungsreihenfolge von Na ⁺ und Glutamat an EAAC1	89
4.4.3. Glutamat-abhängige Na ⁺ -Bindung(en)	90
4.4.4. Weitere elektrogene Natriumbindungsreaktionen an EAAC1	91
4.4.5. Elektrogene Schritte und Glutamat-induzierte Konformationsänderung im Transportzyklus von EAAC1	93
4.4.6. Abhängigkeit der Glutamat-induzierten Anionenleitfähigkeit von der Natriumkonzentration	94
4.5. Untersuchungen an EAAC1 und Vergleich mit einem anderen Na⁺-getriebenen Transporter	96
4.5.1. Gesamtmodell für EAAC1	96
4.5.2. Vergleich der Ergebnisse von EAAC1 mit dem Na ⁺ -getriebenen Glucosetransporter SGLT1	98
5. ZUSAMMENFASSUNG DER ARBEIT	101
6. ANHANG.....	103
6.1. Glutamatkonzentrations- und Spannungsabhängigkeit	103
6.2. pH-Abhängigkeit	106
6.3. Na⁺-Konzentrationsabhängigkeit.....	107

7. LITERATURVERZEICHNIS	109
DANKSAGUNG	119
LEBENS LAUF	120

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BES	N,N-bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethansulfonsäure
CAPS	2-Cyclohexylamin-1-propansulfonsäure
CMV	Cytomegalie-Virus
DTT	Dithiothreitol
EAAC1	Excitatory Amino Acid Carrier 1
EAAT	Excitatory Amino Acid Transporter
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylen-bis-(oxyethylenitrilo)-tetraessigsäure
GFP	Green Fluorescent Protein
HEK	Human Embryonic Kidney
HEK _{EAAC1}	EAAC1-exprimierende HEK-Zelle
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazine-N'-(2-ethansulfonsäure)
MES	2-(N-Morpholin)-ethansulfonsäure
n	Anzahl der unterschiedlichen Zellen / <i>patches</i>
NMG	N-Methyl-D-glucamin
SD	Standardabweichung der Einzelmessung
Tris	Tri-(hydroxymethyl)-aminomethan
TBOA	DL- <i>threo</i> - β -Benzyloxyaspartat
TEA	Tetraethylammonium

in der Regel entgegen des elektrochemischen Gradienten, d. h. durch aktiven Transport. Die Energiequellen für den jeweiligen Substrattransport können dabei sehr unterschiedlich sein und sind teilweise noch nicht bekannt. So erfolgt der Glutamattransport bei Eukaryoten entweder durch einen Protonen-Gegentransport wie im Fall der vesikulären Glutamattransporter (Bellocchio et al., 2000; Takamori et al., 2000) oder der Glutamattransport wird durch einen Natriumionen- und Protonen-Kotransport sowie Kaliumionen-Gegentransport energetisiert (siehe 1.2.1.). Damit gehören die Glutamattransporter der Plasmamembran zur großen Klasse der sekundär-aktiven Transporter, die die elektrochemischen Gradienten von Na^+ und K^+ über die Membran zur Substrataufnahme nutzen. Die Na^+/K^+ -ATPase gewährleistet hingegen unter Nutzung der ATP-Hydrolyse (primär-aktiver Transport) die Aufrechterhaltung der Na^+ - und K^+ -Konzentrationsgradienten. Darüber hinaus kann bei einem elektrischen Transport das Membranpotenzial eine weitere Energiequelle darstellen (Voet und Voet, 1992).

Im Folgenden wird nur auf die eukaryotischen Na^+ -abhängigen Glutamattransporter und deren Funktion im Nervensystem eingegangen.

1.1.1. Eukaryotische Glutamattransporter und ihre Lokalisation

Bisher wurden fünf verschiedene Na^+ -getriebene Glutamattransporter kloniert, die untereinander eine Homologie von ca. 50 % aufweisen (Kanai et al., 1994a). Dazu gehören zum einen der Glutamat-Aspartat Transporter GLAST (Storck et al., 1992) und der Glutamattransporter GLT-1 (Pines et al., 1992) aus der Ratte, die beide in Gliazellen vorkommen (Torp et al., 1992). Zum anderen wurden zwei neuronale Glutamattransporter identifiziert: EAAC1 aus Kaninchen (Excitatory Amino Acid Carrier) (Kanai und Hediger, 1992), der neben Nervenzellen auch in Epithelzellen von Niere und Leber eine Rolle spielt (Arriza et al., 1994; Shayakul et al., 1997; Torp et al., 1997) und EAAT4 aus Mensch (Excitatory Amino Acid Transporter) (Fairman et al., 1995; Yamada et al., 1996). Die klonierten humanen Homologe zu GLAST, GLT-1 und EAAC1 werden EAAT1 bis 3 genannt (Arriza et al., 1994) und zeigen ein vergleichbares Expressionsmuster. EAAT5 (Arriza et al., 1997) ist ein Glutamattransporter aus der Retina, der sowohl in Glia- als auch in Nervenzellen vorkommt. Abgesehen von Retina und Kleinhirn, wo hauptsächlich gewebespezifische Transporter (EAAT5 bzw. GLAST und EAAT4) zu finden sind, ist im übrigen Gehirn GLT-1 der häufigste gliale und EAAC1 der häufigste neuronale Glutamattransporter (Attwell, 2000).

Der in dieser Arbeit untersuchte Glutamattransporter EAAC1, entsprechend dem humanen EAAT3, ist sowohl in exzitatorischen als auch in inhibitorischen Neuronen exprimiert (Rothstein et al., 1994). Ein positiver immunhistologischer Nachweis wurde vor allem im

Zellkörper und in dendritischen Endigungen der Nervenzellen gefunden, jedoch nicht in axonalen Endigungen. D. h. EAAC1 tritt in den meisten Hirnregionen postsynaptisch auf, wobei fast alle in der Synapse lokalisierten EAAC1-Proteine am äusseren Rand der synaptisch aktiven Zone nachgewiesen wurden (Conti et al., 1998). Im Gegensatz dazu ist in Purkinjezellen EAAC1 auch präsynaptisch lokalisiert (Furuta et al., 1997) und in manchen Hirnabschnitten zusätzlich in Gliazellen exprimiert (Conti et al., 1998). Bei den durchgeführten Nachweisen muss jedoch beachtet werden, dass sich das Expressionsmuster von Glutamattransportern unter pathologischen Bedingungen (wie z. B. Sauerstoffmangel) ändern kann (Mennerick et al., 1998) und vom Alter der Versuchstiere abhängt (Bar-Peled et al., 1997).

1.1.2. Struktur der Glutamattransporter

Bei den eukaryotischen Glutamattransportern handelt es sich um glykosylierte Proteine mit einem Molekulargewicht von ca. 65 kDa (ca. 570 Aminosäuren) (Kanai und Hediger, 1992; Pines et al., 1992; Storck et al., 1992), die beim Transportprozess eine durch Proteolyseversuche nachweisbare Konformationsumwandlung durchlaufen (Grunewald und Kanner, 1995). Allen Topologiemodellen gemeinsam ist die intrazelluläre Lokalisation des N-Terminus, die anschließenden ersten 6 hydrophoben Transmembrandomänen mit vermutlich α -helikaler Struktur und eine große extrazelluläre Schleife zwischen der dritten und vierten Transmembrandomäne. Im Gegensatz dazu ist der Hydropathieplot sowie Versuche mit Markierung bestimmter Aminosäuren des C-terminalen Endes nicht eindeutig, sodass verschiedene Strukturen mit unterschiedlicher Anzahl an weiteren Transmembrandomänen postuliert wurden (Kanai und Hediger, 1992; Pines et al., 1992; Seal und Amara, 1998; Seal et al., 2000; Storck et al., 1992). Allerdings ist die Sequenz der ca. 150 C-terminalen Aminosäuren in allen Subtypen streng konserviert, und die Analyse von Punktmutanten (Zhang und Kanner, 1999) sowie von EAAT1-EAAT2-Chimären (Mitrovic et al., 1998) ergab, dass dieser Bereich eine wichtige Rolle spielt sowohl für die Funktion als auch die subtypischen Eigenschaften der Glutamattransporter gegenüber Inhibitoren.

In Abb. 1.2 ist das Topologiemodell von GLT-1 dargestellt, welcher über 8 Transmembranhelices verfügt und zwei in die Membran ragende Schleifen (sogenannte *pore-loop* Strukturen) besitzt (Grunewald et al., 1998; Grunewald und Kanner, 2000). Ähnlich in der Membran liegende Schleifen wurden unter anderem in Kationenkanälen nachgewiesen, wo sie für die Kationen-Selektivität der Kanäle verantwortlich sind (Doyle et al., 1998; Yellen et al., 1991). Alanin 364 in der Schleife zwischen Helix 6 und 7 sowie Alanin 431 in der Schleife zwischen Helix 7 und dem *linker* (extrazellulär an die Membran angelagerte α -Helix) können

in dem Modell von Grunewald und Kanner alternierend von der einen oder anderen Seite der Membran für wasserlösliche Reagenzien zugänglich sein, wobei sich die Zugänglichkeit abhängig von der Transporterkonformation ändert. Für den bakteriellen Glutamattransporter GltT aus *Bacillus stearothermophilus* wurde ein analoges Modell vorgeschlagen (Slotboom et al., 1999a; Slotboom et al., 1999b). Im Gegensatz dazu stehen die Arbeiten von Seal und Mitarbeitern (Seal und Amara, 1998; Seal et al., 2000) für EAAT1. Dort wurde die erste von der intrazellulären Seite in die Membran ragende Schleife (siehe Abb. 1.2) als Transmembranhelix 7 interpretiert während Helix 7 als eine von extrazellulär in die Membran ragende Schleife nachgewiesen wurde. An diese Schleife schließen sich zwei extrazellulär an die Membran angelagerte α -Helices an, wobei die letzte Transmembrandomäne wieder mit dem dargestellten Modell in Abb. 1.2 übereinstimmt. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass der für die Funktion des Proteins wichtigste Teil topologisch noch nicht voll aufgeklärt ist.

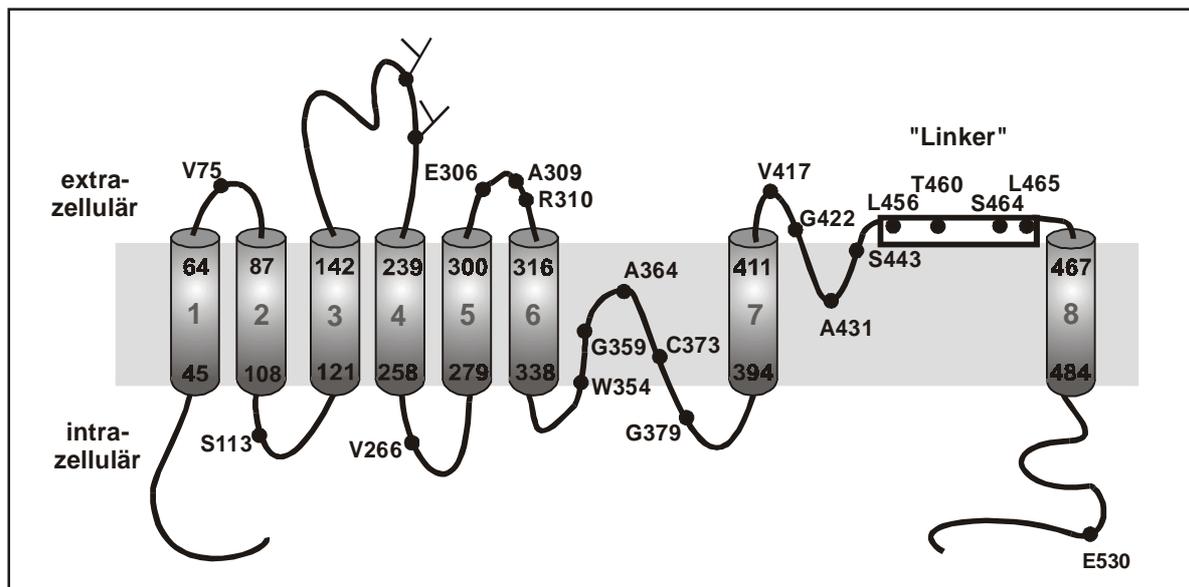


Abb. 1.2: Topologiemodell von GLT-1 nach Grunewald und Kanner (Grunewald und Kanner, 2000).

Als Quartärstruktur von Glutamattransportern wurde für EAAC1 mit Hilfe von Elektronenmikroskopie an Gefrierbruchflächen von *Xenopus* Oozyten Membranen ein Homopentamer nachgewiesen, das eine pyramidenartige Struktur mit einer zentralen Kanal-artigen Aushöhlung zeigte (Eskandari et al., 2000). Dabei wird vermutet, dass die einzelnen Untereinheiten für den Glutamattransport verantwortlich sind, während in der Interpretation von Eskandari und Mitarbeitern der zentrale Kanal mit der Anionenleitfähigkeit assoziiert ist (siehe 1.2.2.). Im Gegensatz dazu postulieren Haugeto und Mitarbeiter aufgrund von *Crosslink*-Versuchen, dass GLT-1 und GLAST hauptsächlich Trimere bzw. ein Gemisch aus Dimeren und Trimeren bilden und, dass das Monomer keine Glutamataufnahme katalysieren kann (Haugeto et al., 1996). Der immunhistologische Nachweis ergab zudem, dass die Assoziation

in vivo nur als Homomultimer erfolgen kann (Haugeto et al., 1996). Darüber hinaus wurde jedoch für die Retina auch die Bildung von heteromeren Glutamattransportern (aufgebaut aus Monomeren verschiedener Subtypen) vorgeschlagen (Eliasof et al., 1998).

1.2. Funktionsweisen von Glutamattransportern

Glutamattransporter verfügen über drei verschiedene Funktionen, den Glutamattransport, die Glutamat-induzierte Anionenleitfähigkeit und die Glutamat-unabhängige Leckleitfähigkeit. Im Folgenden werden diese Funktionen und Varianten davon im Detail diskutiert.

1.2.1. Stöchiometrie des Glutamattransportes

Die Glutamattransporter arbeiten als sekundär-aktive Transporter, die die Konzentrationsgradienten von Na^+ und K^+ über die Membran für den Transport von Glutamat ausnützen. Mit verschiedenen Methoden, wie der Messung des Glutamat-induzierten Stromsignals oder des Glutamatfluxes, sowie Detektion der intra- und extrazellulären Natrium- und Kaliumkonzentration mit ionenselektiven Elektroden, erfolgte der Nachweis eines Na^+ -Kotransportes und K^+ -Gegentransportes (Amato et al., 1994; Barbour et al., 1988; Erecinska et al., 1986; Kanner und Bendahan, 1982; Kanner und Sharon, 1978). Damit unterscheidet sich der Glutamattransporter deutlich von anderer Neurotransmitter-Transportern wie Glycin- oder γ -Aminobuttersäure-Transporter, die K^+ -unabhängig sind und ein Chloridion kotransportieren (Kanner und Sharon, 1978; Kavanaugh et al., 1992). Zusätzlich zeigte die Transportaktivität für Glutamat eine Abhängigkeit von der Protonenkonzentration (Nelson et al., 1983) und mit Hilfe pH-sensitiver Farbstoffe bzw. Elektroden wurde eine intrazelluläre Ansäuerung bzw. extrazelluläre Alkalisierung beim Glutamattransport nachgewiesen (Bouvier et al., 1992; Erecinska et al., 1983).

Während die Substrate, wie L-Glutamat, D- und L-Aspartat (Schwartz und Tachibana, 1990), und die weiter am Transport beteiligten Ionen, wie Na^+ , K^+ , H^+ oder OH^- , bereits früh bekannt waren, blieb die Stöchiometrie des Glutamattransportes lange Zeit kontrovers. Nach Klonierung der Glutamattransporter und heterologer Expression wurde anfangs der Kotransport von zwei Natriumionen (Kanai et al., 1995; Klockner et al., 1993) postuliert. Durch Messung des Umkehrpotenzials in Abhängigkeit von der Natriumkonzentration konnte jedoch später gezeigt werden, dass pro Glutamatmolekül drei Natriumionen und ein Proton transportiert werden während bei der Relokation des Transporters ein einzelnes Kaliumion transloziert wird (Levy et al., 1998; Zerangue und Kavanaugh, 1996a). Damit werden pro Trans-

portzyklus zwei positive Ladungen in die Zelle verschoben. Die Unterscheidung zwischen Protonen-Kotransport oder OH^- -Gegentransport beruhte auf Strom- und parallelen Fluoreszenzmessungen des intrazellulären pH-Wertes mit Hilfe von fluoreszierenden Indikatoren (Zerangue und Kavanaugh, 1996a; Zerangue und Kavanaugh, 1996b). Cystein ist ein weiteres Substrat für Glutamattransporter, das bei physiologischem pH hauptsächlich protoniert vorliegt (pK 8,3). Im Gegensatz zu Messungen mit Glutamat, wurde beim Transport von Cystein keine Ansäuerung des intrazellulären Milieus beobachtet, was jedoch bei einem OH^- -Gegentransport der Fall sein müsste.

1.2.2. Glutamat-induzierte Anionenleitfähigkeit

Die Anionenleitfähigkeit bei Glutamattransportern ist nicht thermodynamisch an den Transportprozess gekoppelt sondern wird allein vom elektrochemischen Gradienten des permeierenden Anions bestimmt. Diese Beobachtung wurde zuerst beim Glutamattransport an nativen Photorezeptoren gemacht (Eliasof und Werblin, 1993) und konnte nach heterologer Expression der verschiedenen Glutamattransporter für alle Subtypen nachgewiesen werden (Fairman et al., 1995; Otis und Jahr, 1998; Wadiche et al., 1995a). Dabei ist das Verhältnis zwischen Glutamattransport und Anionenleitfähigkeit bei den einzelnen Subtypen sehr unterschiedlich und fällt in der Reihenfolge EAAT2 (GLT-1) > EAAT3 (EAAC1) > EAAT1 (GLAST) > EAAT4 \approx EAAT5 (Wadiche und Kavanaugh, 1998). Für den Glutamattransport gilt parallel, dass die Geschwindigkeit des Glutamattransportes unabhängig ist von der Art und der Konzentration des permeierenden Anions (Wadiche et al., 1995a).

Aufgrund der geringen Leitfähigkeit der Glutamattransporter konnten bisher keine Einzelkanalmessungen durchgeführt werden. Mit Hilfe von Rauschanalysen am retinalen EAAT5 ergaben sich Leitfähigkeiten mit Chlorid von 0,70–0,73 pS und mittlere Offenzeiten von 2,4–3,0 ms (Larsson et al., 1996; Picaud et al., 1995), wobei die Permeabilität verschiedener Anionen mit ihrem chaotropen Charakter abnahm ($\text{SCN}^- > \text{ClO}_4^- > \text{NO}_3^- > \Gamma^- > \text{Br}^- > \text{Cl}^- \gg \text{Gluconat}^-$) (Eliasof und Jahr, 1996; Wadiche und Kavanaugh, 1998).

Eine physiologische Funktion für die mit dem Glutamattransport assoziierte Anionenleitfähigkeit wurde bisher nur für EAAT5 nachgewiesen. In "ON" Bipolarzellen der Retina beruht die inhibierende Erregung bei Belichtung auf einem Fluss von Chloridionen durch den Glutamattransporter in die Zelle (Grant und Dowling, 1996). Darüber hinaus wurde vorgeschlagen, dass die Anionenleitfähigkeit zur Repolarisierung der Membran beiträgt und damit die Glutamataufnahme unterstützt (Eliasof und Jahr, 1996).

Die Tatsache, dass die Anionenleitfähigkeit bei EAAT1 und EAAT4 im Fall von D-Aspartat als Substrat im Vergleich zu L-Glutamat größer war (Fairman et al., 1995; Wadiche et al., 1995a; Wadiche und Kavanaugh, 1998) führte anfangs zu einer Modellvorstellung, in der Glutamat und das permeierende Anion den gleichen Pfad durch den Transporter nehmen (Wadiche et al., 1995a). Daneben wurden auch andere Modelle mit getrennten Wegen für Glutamattransport und Anionenfluss im Protein vorgeschlagen, oder es wird ein zusätzliches akzessorisches Protein für die beobachtete Anionenleitfähigkeit angenommen (Sonders und Amara, 1996). Bis jetzt kann zwischen diesen Fällen nicht endgültig unterschieden werden. Chimären-Versuche zwischen EAAC1 und dem Transporter für Alanin, Serin, Cystein (ASC) ergaben zudem, dass für die Aktivierung der Anionenleitfähigkeit der N- und C-Terminus von EAAC1 essentiell ist (Li et al., 2000). Der Nachweis einer homopentameren Struktur mit zentralem Kanal für EAAC1 führte zu der Annahme, dass die Anionenleitfähigkeit als eine Eigenschaft des Multimers zu erklären ist (Eskandari et al., 2000), analog zu multimeren Liganden-gesteuerten Ionenkanälen.

Die Anwesenheit von intrazellulärer Arachidonsäure führte bei EAAT4 zu einer zusätzlichen Glutamat-induzierten Protonenleitfähigkeit (Fairman und Amara, 1999; Fairman et al., 1998; Tzingounis et al., 1998), die bisher nur für EAAT4 nachgewiesen wurde. Im Gegensatz dazu inhibiert Arachidonsäure die Glutamataufnahme von EAAT1 bzw. verstärkt sie bei EAAT2 (Zerangue et al., 1995).

1.2.3. Glutamat-unabhängige Leckleitfähigkeit

Viele Na^+ -getriebene Transporter wie zum Beispiel der Na^+ -abhängige Glucosetransporter SGLT1 oder der Phosphattransporter NaPi-2 zeigen eine Leckleitfähigkeit für Na^+ in Abwesenheit ihres Substrates (Loo et al., 1993; Forster et al., 1998). Ebenso konnte bei Glutamattransportern ein zusätzlicher Leckstrom beobachtet werden. Für Gliazellen der Retina (enthalten hauptsächlich EAAT1) sowie EAAC1 exprimiert in Froschoozyten wurde dieses Leck auf eine Na^+ -getragene Leitfähigkeit zurückgeführt, da kein Leckstrom in Abwesenheit von Na^+ auftrat (Schwartz und Tachibana, 1990) bzw. eine geringe Natriumionenaufnahme ($^{22}\text{Na}^+$) in Abwesenheit von Substrat detektiert wurde (Kanai et al., 1995). Im Gegensatz dazu schlugen Otis und Jahr für den Leckstrom bei Purkinjezellen (enthalten hauptsächlich EAAT4) vor, dass dieser auf einen Anionenfluss zurückzuführen ist (Otis und Jahr, 1998).

Da sich die Leckleitfähigkeit durch Inhibitoren und Substrate hemmen ließ (Otis und Jahr, 1998), wurde vermutet, dass die Leckleitfähigkeit ein Fluss von Anionen durch den gleichen Pfad wie Glutamat darstellt (Sonders und Amara, 1996).

1.2.4. *Homoexchange*-Modus bei Glutamattransportern

In Abwesenheit von intrazellulären Kaliumionen kann der Glutamattransporter nur den Na^+ -abhängigen Teil des Transportzyklus durchlaufen, was bei Anwesenheit von intrazellulären Natriumionen und Glutamat zu einem elektroneutralen Austausch von intra- und extrazellulärem Glutamat führt. Dieser Transport-Modus wird als *Homoexchange* bezeichnet und konnte bei Punktmutanten von GLT-1 und EAAC1 beobachtet werden, die keinen Netto-Glutamattransport zeigten (Kavanaugh et al., 1997; Zhang et al., 1998).

Unter *Homoexchange*-Bedingungen trat auch die oben beschriebene Glutamat-induzierte Anionenleitfähigkeit auf (Billups et al., 1996; Otis und Jahr, 1998). Dies führte zu der Annahme, dass die Aktivierung der Anionenleitfähigkeit allein durch die Glutamatbindung verursacht wird und kein Nettotransport von Glutamat dafür nötig ist (Billups et al., 1996).

1.2.5. Glutamat-Auswärtstransport

Unter physiologischen Bedingungen enthält die Zelle hohe Konzentrationen an K^+ , während extrazellulär Na^+ in hoher Konzentration vorliegt. Damit ermöglichen die den Glutamattransport treibenden elektrochemischen Gradienten eine Glutamataufnahme in die Zelle. Diese wird im Folgenden auch als Glutamat-Einwärtstransport bezeichnet. Werden die Konzentrationsgradienten für Natrium- und Kaliumionen umgedreht, katalysieren die Transporter den Glutamat-Auswärtstransport. Der Transporter ist damit vollständig reversibel. Für den Glutamattransport in glialen Zellen der Retina wurde anfangs postuliert, dass der Glutamat-Auswärtstransport elektroneutral verläuft (Schwartz und Tachibana, 1990). Messungen von Szatkowski und Mitarbeitern zeigten jedoch, dass dieser Glutamat-Auswärtstransport tatsächlich dem umgekehrten Prozess der Glutamataufnahme in die Zelle entspricht (Szatkowski et al., 1990) und damit ebenfalls elektrogen ist. Darüber hinaus wurde beim Glutamat-Auswärtstransport ebenso eine Glutamat-induzierte Anionenleitfähigkeit beobachtet wie beim Einwärtstransport (Billups et al., 1996).

1.3. Struktur-Funktions-Beziehungen bei Glutamattransportern

Zur Struktur-Funktions-Aufklärung wurde bei Glutamattransportern zum einen der Ansatz gewählt, Punktmutanten mit veränderten Funktionseigenschaften zu isolieren. Zum anderen erfolgte die Entwicklung von Inhibitoren und Aktivatoren, die sich in die Bindungsstelle für Glutamat einpassen.

1.3.1. Substratbindungsstellen

Durch Punktmutationen konservierter Aminosäuren wurde für GLT-1 versucht, die Bindungsstellen für Glutamat, für die kotransportierten Ionen Na^+ und H^+ sowie für das gegentransportierte K^+ zu identifizieren.

Alle konservativen Mutationen von Histidin 326 in Helix 6 (Modell Abb. 1.2) verhinderten den Glutamattransport von GLT-1, was zu der Annahme führte, dass dieses Histidin an der Bindung des kotransportierten Protons beteiligt ist (Zhang et al., 1994). Der Austausch der negativ geladenen Aminosäure Glutamat 404 zu Aspartat auf Helix 7 verhinderte den K^+ -Gegentransport (Kavanaugh et al., 1997). Ebenso schien Tyrosin 403 an der Kaliumionenbindung beteiligt zu sein (Zhang et al., 1998). Allerdings konnte bei dieser Mutante zusätzlich eine geringere Affinität und Spezifität für Na^+ beobachtet werden, während die Affinität für Glutamat sich nicht änderte. Daraus schlossen Zhang und Mitarbeiter zum einen, dass sich die Natrium- und Kaliumbindungsstelle überlappen und zum anderen, dass möglicherweise nur eine der drei Natriumbindungsstellen hoch spezifisch für Na^+ sei. Generell zeigte die Bindungsstelle für K^+ eine geringere Ionenspezifität als die für Na^+ (Barbour et al., 1991). Bei den funktionsuntüchtigen Mutanten von Aspartat 398 auf Helix 7 war bereits die Bindung des ersten Natriumions verhindert (Pines et al., 1995). Durch Mutationen von Serin 440 in der zweiten Schleife von GLT-1 wurde zwar die Glutamatbindung beeinflusst, dennoch nahmen Zhang und Kanner an, dass Serin 440 nicht die Glutamatbindungsstelle dargestellt, sondern ihr benachbart ist (Zhang und Kanner, 1999).

Bei EAAC1 wurde vermutet, dass Arginin 447 (entspricht R479 in GLT-1) an der Glutamatbindung beteiligt ist, vermutlich in Form einer Ionenpaar-Bildung mit dem γ -Carboxylat von Glutamat (Bendahan et al., 2000). Bei GLAST wurde vorgeschlagen, dass die Aminosäurereste Tyr405 und Arg479 (entspricht 403 und 477 in GLT-1) für die Glutamatbindung von Bedeutung sind (Conradt und Stoffel, 1995). In anderen Glutamat-bindenden Proteinen wie Glutamatrezeptor und Glutaminsynthetase wurde auf Ebene der Kristallstrukturanalyse bereits eine Beteiligung von Arginin an der Bindung des negativ geladenen Glutamats nachgewiesen (Armstrong et al., 1998; Liaw et al., 1994).

1.3.2. Inhibitoren für Glutamattransporter

Mit Hilfe von *Molecular Modeling* wurden verschiedenen Substanzen entwickelt, die strukturell homolog zu einzelnen Glutamat-Konformationen sind (Chamberlin et al., 1998). Dabei entstanden Inhibitoren und Aktivatoren, die kompetitiv mit Glutamat sind. Die Stärke der aktivierenden oder inhibierenden Wirkung einer Substanz hängt vom Glutamattransporter-

Subtyp ab. So zeigte zum Beispiel Methano-pyrrolidin-2,4-dicarboxylat in sättigenden Konzentrationen eine ca. halbmaximale Aktivierung im Vergleich zu Glutamat bei EAAT1 und EAAT3, während bei EAAT2 kein Unterschied in der Aktivierung festzustellen war (Koch et al., 1999). Im Gegensatz dazu war eine inhibierende Wirkung von Kainat nur für EAAT2 zu beobachten (Arriza et al., 1994). Der bisher potenteste Inhibitor für EAAT1 und EAAT2 ist DL-*threo*- β -Benzyloxyaspartat (TBOA) mit K_i -Werten (halbmaximale Inhibierung) kleiner 100 μ M (Lebrun et al., 1997).

1.4. Physiologische Bedeutung der Glutamattransporter

Die Glutamatkonzentration im synaptischen Spalt (siehe Abb. 1.1) ist im Bereich von 1–3 μ M (Shaw et al., 1995) und steigt bei der Reizweiterleitung auf 1–3 mM (Clements et al., 1992) an. Solch eine hohe Glutamatkonzentration würden auf Dauer zu einer Schädigung der Nervenzellen und ihrem Tod führen, da die ständige Erregung einen Einstrom von Kalziumionen in die Nervenzelle zur Folge hat (Choi, 1988; Nicholls und Ward, 2000; Trotti et al., 1998; Tymianski et al., 1993). Durch die aktive Aufnahme von Glutamat durch Glutamattransporter in die Nerven- und Gliazellen (Barbour et al., 1994; Jabaudon et al., 1999; Takahashi et al., 1996) sowie in die Epithelzellen der Blut-Hirn-Schranke (O'Kane et al., 1999) wird die Glutamatkonzentration im Liquor gering gehalten. Da hohe Konzentrationen an Glutamat in der präsynaptischen Nervenendigung dennoch benötigt werden, wird die nicht exzitatorische Aminosäure Glutamin als Transportform von Glutamat zwischen Glia- und Nervenzelle verwendet (Daikhin und Yudkoff, 2000; Palmada und Centelles, 1998). Generell kann der Glutamattransporter mit der Kopplung der Glutamataufnahme an den Kotransport von drei Natriumionen, einem Proton und dem Gegentransport von einem Kaliumion einen Konzentrationsgradienten für Glutamat entsprechend der Nernst-Gleichung von 10^6 über die Membran aufrecht erhalten (Zerangue und Kavanaugh, 1996a).

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

Bei der dargestellten Nernst-Gleichung entspricht V dem Membranpotenzial, F der Faradaykonstanten, R der Gaskonstanten und T der absoluten Temperatur. Die Indices "ex" und "in" stehen für extrazellulär und intrazellulär.

1.4.1. Physiologische Glutamatkonzentration im synaptischen Spalt

In verschiedenen Studien wurde bewiesen, dass die Glutamatkonzentration im synaptischen Spalt bei der Signalübertragung von der Aktivität der Glutamattransporter beeinflusst wird (Bergles und Jahr, 1998; Diamond und Jahr, 2000; Jonas, 2000; Otis et al., 1997). Dies ist von besonderem Interesse, da Glutamattransporter eine Zykluszeit im Millisekundenbereich haben (Diamond und Jahr, 1997) und daher ebenso die Diffusion des Glutamats aus dem Spalt von Bedeutung ist für das Abklingen der postsynaptischen Erregung (Bergles et al., 1997; Bergles und Jahr, 1997). In diesem Zusammenhang wird kontrovers diskutiert, ob die beobachteten Effekte auf den postsynaptischen Strom bei Inhibition der neuronalen Glutamattransporter durch die Hemmung der Glutamataufnahme (Mennerick et al., 1999; Mennerick und Zorumski, 1994) oder die Hemmung der Glutamatbindung (Tong und Jahr, 1994) an den Transporter, der damit als Puffer wirkt, verursacht werden.

Ebenso wird bisher nur vermutet, dass eine Erhöhung der Glutamatkonzentration im synaptischen Spalt einen möglichen Mechanismus zur Vermittlung von Reizstärke darstellt (Turecek und Trussell, 2000) oder bei Lernprozessen auf eine reduzierte Zahl an Glutamattransportern zurückzuführen ist (Diamond et al., 1998).

1.4.2. Pathologische Glutamatkonzentrationen im synaptischen Spalt

Bei Sauerstoff- bzw. Energiemangel erhöht sich die extrazelluläre Glutamatkonzentration, wobei Werte von $> 60 \mu\text{M}$ abgeschätzt wurden (Levy et al., 1998). Diese Zunahme ist teilweise auf den Auswärtstransport von Glutamat aus Nerven- und Gliazellen, katalysiert durch die Glutamattransporter (siehe 1.2.5.), zurückzuführen (Jabaudon et al., 2000; Rossi et al., 2000; Zeevalk et al., 1998), da bei ATP-Mangel der Na^+ - und K^+ -Konzentrationsgradient über die Membran nicht aufrecht gehalten werden kann.

Dass Glutamattransporter für den Erhalt geringer extrazellulärer Glutamatkonzentrationen verantwortlich sind, wird deutlich beim Gendefekt der glialen Transporter GLAST und GLT-1 (EAAT1 & 2) in der Maus (*knock-out*). Die erhöhte Glutamatkonzentration im Liquor des Gehirns führte zur starken Neurodegeneration (Rothstein et al., 1996). Hingegen zeigten Mäuse mit einem Mangel an EAAC1 (EAAT3) nur geringe Nervenschädigungen, dafür aber erhöhte Konzentrationen von Glutamat und Aspartat im Urin (Peghini et al., 1997).

In der Natur gibt es nur ein eindeutiges Krankheitsbild, die Amyotrophe laterale Sklerose (ALS), wo die Verringerung der EAAT2-Expression im Motorcortex und Rückenmark ursächlich zu einer Degeneration der Motoneuronen führt (Lin et al., 1998). Darüber hinaus werden Dysfunktionen von Glutamattransportern in Zusammenhang mit Morbus Alzheimer

(Noda et al., 1999), Epilepsie (Chapman, 2000) und Schizophrenie (Shashidharan et al., 1997) diskutiert.

1.5. Charakterisierung von elektrogenen Transportern durch Strommessungen

Die Modellvorstellung von einem Transporterprotein (Widdas, 1952) enthält im einfachsten Fall vier Zustände, wobei jeweils zwei von der extrazellulären Seite und zwei von der intrazellulären Seite zugänglich sind (siehe Abb. 1.3).

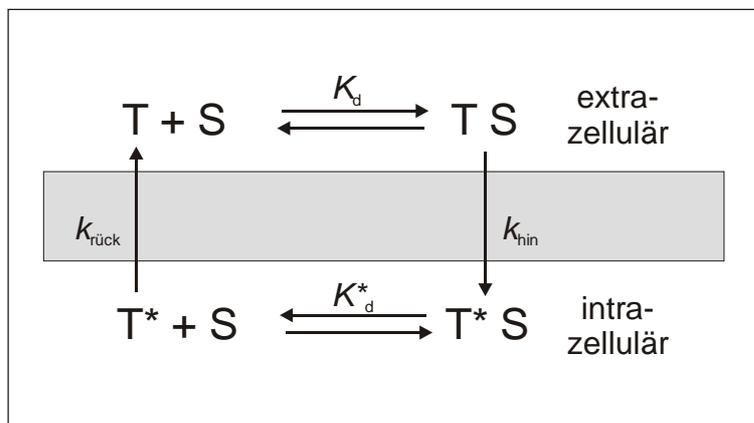


Abb. 1.3: Vereinfachtes Transportmodell. Der unbeladene Transporter T bindet an der extrazellulären Seite sein Substrat unter Bildung von TS. Nach Translokation mit der Geschwindigkeitskonstante k_{hin} zur intrazellulären Seite T^*S wird das Substrat abgegeben und es findet die Relokation des unbeladene Transporters T^* mit der Geschwindigkeitskonstante $k_{\text{rück}}$ statt.

Ist, wie im Fall von EAAC1, der Transport des Substrates energetisiert durch den Ko- und den Gegentransport von Ionen entlang derer elektrochemischer Gradienten, muss das Modell um entsprechend mehr Zustände erweitert werden. Gegeben durch die ionalen und elektrischen (Membranpotenzial) Bedingungen kann der Transporter entweder den Einwärts- oder den Auswärtstransport des Substrates katalysieren (siehe 1.2.1. und 1.2.5.). Unter der Annahme, dass die Bindungs- und Dissoziationsschritte immer im Gleichgewicht und daher schnell sind im Vergleich zu den Translokationsschritten über die Membran (Turner, 1981), können die Transporterzustände wie folgt zusammen gefasst werden: T und TS entsprechen einem Transporterzustand A, bei dem die Substrat-Bindungsstelle von der extrazellulären Seite zugänglich ist; im Gegensatz dazu entsprechen T^* und T^*S dem Transporterzustand B, bei dem die Substrat-Bindungsstelle von der intrazellulären Seite zugänglich ist. Damit ergibt sich für den stationären Strom $I_{\text{stationär}}$ beim Einwärtstransport des Substrates folgender mathematischer Zusammenhang (Läuger, 1991):

$$I_{\text{stationär}} = [T_0] \cdot e \cdot \left(z_{\text{hin}} \cdot \frac{[A]}{[A]+[B]} \cdot k_{\text{hin}} - z_{\text{rück}} \cdot \frac{[B]}{[A]+[B]} \cdot k_{\text{rück}} \right)$$

In diesem vereinfachten Zwei-Zustand-Modell entspricht T_0 der Anzahl der Transporter unter Beobachtung, e der Elementarladung, z_{hin} und $z_{\text{rück}}$ sind die verschobenen Ladungen bei der Hin- und Rückreaktion und k_{hin} und $k_{\text{rück}}$ sind die Geschwindigkeitskonstanten für die Substrattranslokation und die Relokation des Transporters. Der stationäre Strom ist somit allein durch die Wahrscheinlichkeit des Transporters im vollständig beladenen Zustand TS bestimmt.

Befindet sich das Substrat und die kotransportierten Ionen auf beiden Seiten der Membran, ist der Transporter in der Lage, nur den Substrat-abhängigen Halbzyklus zu durchlaufen. Dies führt in der Summe zu einem elektroneutralen Austausch von intra- und extrazellulärem Substrat (siehe *Homoexchange* 1.2.4.).

1.5.1. Vorstationäre Kinetik von Transportern

Die Wahrscheinlichkeit des Transporters im vollständig beladenen Zustand ist abhängig von der Konzentration an Substrat und an kotransportierten Ionen. Aus diesem Grund kann mit Hilfe von stationären Messungen z. B. die Bindungsreihenfolge von Substrat und Kosubstrat an den Transporter ermittelt werden (Sanders et al., 1984). Allerdings ist es nicht möglich, mit stationären Messungen die Geschwindigkeitskonstanten für individuelle Schritte im Transportzyklus abzuschätzen. Demnach kann auch keine Zuordnung erfolgen, welche Reaktion im Zyklus geschwindigkeits-bestimmend für den Transportprozess ist (Wierzbicki et al., 1990).

Aus diesem Grund müssen Relaxations-Experimente oder vorstationäre Messungen durchgeführt werden, wie z. B. Spannungs- oder Substratkonzentrations sprünge bei der Beobachtung eines elektrogenen Transportprozesses. Vor dem Spannungssprung befindet sich das System zunächst in Anwesenheit der Substrate und Kosubstrate im Fließgleichgewicht, so dass mehrere Zustände (siehe Abb. 1.3) in unbekanntem Maße bevölkert sind. Durch den Sprung auf das neue Haltepotenzial werden die Geschwindigkeitskonstanten der spannungs-abhängigen Reaktionen verändert. Die Einstellung zum neuen stationären Zustand enthält somit Informationen über die individuellen Schritte im Transportzyklus. Dieser Ansatz bietet sich an, wenn das Transportmodell nur wenige Zustände besitzt (siehe Ergebnisse 3.3.6.), da die anfängliche Verteilung der Transporter auf die verschiedenen Zustände nicht bekannt ist. Im Vergleich dazu kann beim Substratkonzentrationsprung-Experiment durch entsprechende Wahl der ko- und gegentransportierten Ionen der Transporter in einem Zustand "fixiert" werden und alle Transporterproteine beginnen nach dem Konzentrationsprung synchronisiert den Transportzyklus ausgehend vom gleichen Zustand. Damit vereinfacht sich die Analyse

der vorstationären Messungen bei Modellen, die durch mehrere Zustände beschrieben werden müssen.

1.5.2. Laserpuls-Photolyse

Beim Substratkonzentrationsprung mit Hilfe eines Lösungswechsels ist die Zeitauflösung hauptsächlich limitiert durch die Flussgeschwindigkeit, die Ausdehnung der zu umspülenden Membranfläche und die ungerührte Schicht über der Membran, durch die das Substrat diffundieren muss. Aus diesem Grund wurden photolabil-geschützte (*caged*) Substrate entwickelt (Grewer et al., 2000a; Milburn et al., 1989; Wieboldt et al., 1994), bei denen der Substratkonzentrationsprung durch einen Lichtblitz und der damit einhergehenden photolytischen Freisetzung des Substrates ausgelöst werden kann. Die Laserpuls-Photolyse hat den Vorteil, dass ein Substrat direkt am Ort der Bindungsstelle freigesetzt wird und damit auch schnelle Reaktionen im Protein, wie z. B. Substratbindung oder Konformationsumwandlungen beobachtet werden können (Grewer, 1999; Hess, 1993). Der Nachteil der Methode liegt in den relative hohen Energiedichten, die für die Freisetzung des Substrates nötig sind, parallel aber die (Zell-) Membran schädigen können.

Zur Untersuchung von Glutamatrezeptoren entwickelten Wieboldt und Mitarbeiter (Wieboldt et al., 1994) die Schutzgruppe (2-Nitrobenzyl) und koppelten diese an die γ -Carboxyl-Gruppe des Glutamats (siehe Abb. 1.4). Mit einer Freisetzungshalbwertszeit von 21 μs für α -Carboxy-*o*-nitrobenzyl (αCNB)-*caged* Glutamat liegt die Zeitauflösung der Messung im Bereich von 100 μs . Darüber hinaus ermöglicht die relativ hohe Quantenausbeute dieser *caged* Glutamatverbindung von 0,14 eine hohe Freisetzungseffizienz schon bei geringen Laserenergien.

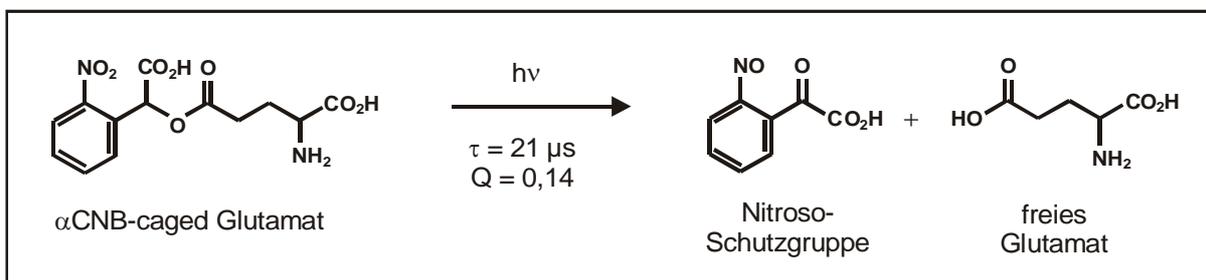


Abb. 1.4: Photolytische Freisetzung von Glutamat aus α -Carboxy-*o*-nitrobenzyl (αCNB)-*caged* Glutamat. Nach Anregung durch einen Laserpuls (340 nm) wird Glutamat aus αCNB -*caged* Glutamat mit einer Halbwertszeit von 21 μs und einer Quantenausbeute von 0,14 freigesetzt.

1.6. Problemstellung und Ziel der Arbeit

Die mechanistische Charakterisierung von Glutamattransportern in der Literatur erfolgte sowohl im nativen Gewebe als auch im heterologen Expressionssystem. Dabei kamen neben Fluxmessungen vor allem elektrische Messungen zum Einsatz, um zum Beispiel die Stöchiometrie des Transportes oder den Anteil der Glutamat-induzierten Anionenleitfähigkeit am Stromsignal zu bestimmen. Da die Versuche häufig unter stationären Bedingungen durchgeführt wurden, die nur Informationen über den langsamsten Schritt im Transportzyklus enthalten, ist wenig bekannt über die schnellen Reaktionsschritte beim Transportprozess. Ausserdem kann, wie oben erwähnt (siehe 1.5.2.), mit stationären Messungen nicht der geschwindigkeits-bestimmende Schritt im Transportzyklus ermittelt werden. Weitere offenen Fragen zum Mechanismus des Transportzyklus sind die Identifikation der spannungsabhängigen Schritte, die Bindungsreihenfolge von Glutamat und seinen kotransportierten Ionen an den Transporter sowie die Eigenschaften des Transporters beim Glutamat-Auswärtstransport. Darüber hinaus ist für die Glutamat-induzierte Anionenleitfähigkeit und Glutamat-unabhängige Leckleitfähigkeit nicht bekannt, ob neben Glutamat auch die Bindung der kotransportierten Ionen nötig ist. Im Fall der Leckleitfähigkeit wird zudem kontrovers diskutiert, in wie weit der beobachtete Leckstrom auf einen Fluss von Natriumionen oder Anionen zurückzuführen ist.

In dieser Arbeit wurde der neuronale Glutamattransporter EAAC1 (Excitatory Amino Acid Carrier 1) in humanen embryonalen Nierenzellen (HEK) heterolog exprimiert und mit Hilfe der *patch clamp*-Technik untersucht. Dabei konnte je nach Messkonfiguration der Transporter von der extra- als auch von der intrazellulären Seite betrachtet werden. Mit dem Einsatz der Laserpuls-Photolyse von photolabil-geschütztem Glutamat waren zusätzlich Informationen über die vorstationäre Kinetik des Glutamattransportes zugänglich.

Bei der Charakterisierung der drei Funktionsweisen des Transporters – Glutamattransport, Glutamat-induzierte Anionenleitfähigkeit und Glutamat-unabhängige Leckleitfähigkeit – stand vor allem die Spannungsabhängigkeit und Abhängigkeit von den kotransportierten Ionen im Vordergrund. Mit diesem Ansatz sollten die spannungsabhängigen und geschwindigkeits-bestimmenden Schritte im Transportzyklus, die Bindungsreihenfolge von Substrat und kotransportierten Ionen an den Transporter und die ionalen Abhängigkeiten der unterschiedlichen Leitfähigkeiten ermittelt werden. Dafür wurden stationäre mit vorstationären Messungen kombiniert, wobei eine Charakterisierung von der extra- als auch von der intrazellulären Seite angestrebt wurde.

Das Ziel der Arbeit war es, ein detailliertes kinetisches Modell für den Glutamattransport durch EAAC1 zu entwickeln, das die verschiedenen Funktionsweisen des Transporters und die beobachteten Substrat- und Spannungsabhängigkeiten beschreibt.

2. Materialien und Methoden

Die elektrophysiologische Charakterisierung von EAAC1 erfolgte durch *patch clamp*-Messungen an humanen embryonalen Nierenzellen (HEK), in denen EAAC1 heterolog exprimiert wurde. Die cDNA des untersuchten Transporters EAAC1 wurde von Michael Wiessner als Teil seiner Doktorarbeit in Zusammenarbeit mit Thomas Rauen (MPI für Hirnforschung, Frankfurt) aus der Retina von Ratten kloniert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Das Gen von EAAC1 war in ein pBK-CMV-Plasmid inkloniert, das einen CMV-Promoter (Cytomegalie-Virus) zur Initiation der eukaryotischen Transkription besitzt und über eine SV40-Polyadenylierungsstelle als auch einen SV40-Replikationsursprung verfügt.

2.1. Heterologe Expression von EAAC1 in HEK293 Zellen

2.1.1. Zellkultur

Die eingesetzte humane embryonale Nierenzelllinie 293 (HEK293, ATCC Nr. CRL 1573) ist infiziert mit einem nicht-virulenten Affenvirus SV40. HEK-Zellen wachsen adherent und können in Plastik Kulturschalen (Fa. Greiner, Frickenhausen oder Fa. Nunc, Wiesbaden) kultiviert werden, wobei folgende Medien und Zusätze der Firma Life Technologies (Karlsruhe) eingesetzt wurden:

Vollmedium, Dulbecco's Modified Eagle Medium (4500 mg/l Glucose, mit L-Glutamin, ohne Natriumpyruvat) mit 10 % fötalem Kälberserum und 50 U/ml Penicillin-Streptomycin;

PBS, Dulbecco's Phosphate Puffered Saline und

Trypsin-EDTA-Lösung, 0,25 % Trypsin, 0,04 % Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) in PBS.

Die Passage der Zellen erfolgte, wenn der Zellrasen zu fast 100 % konfluent war, etwa alle drei bis vier Tage. Dafür wurde das Vollmedium entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen, da das Serum Trypsin-Inhibitoren enthält und anschließend mit der Trypsin-EDTA-Lösung überschichtet. Nach ca. einer Minute entfernte man die Trypsin-Lösung, löste die Zellen durch Erschütterung vom Untergrund ab und nahm sie in frischem Vollmedium auf. Die entstandene Einzelzellsuspension wurde ca. 1:10 verdünnt und erneut ausplattiert. Die Zellen werden bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert.

2.1.2. Transfektion

Die Expression von EAAC1 in HEK-Zellen war transient und erfolgte nach Ko-Transfektion des EAAC1-pBK-CMV-Plasmids mit der cDNA für das grün-fluoreszierende Protein (GFP) mit Hilfe der Kalzium-Phosphat Methode (Chen und Okayama, 1987). Dafür wurden folgende Lösungen benötigt:

Mangelmedium, Dulbecco's Modified Eagle Medium (4500 mg/l Glucose, mit L-Glutamin, ohne Natriumpyruvat) mit 50 U/ml Penicillin-Streptomycin;

2xBBS, 50 mM N,N-bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethansulfonsäure (BES), 280 mM NaCl, 1,5 mM Na₂HPO₄, pH 6,95;

Kalziumchlorid-Lösung, 1,8 M CaCl₂ und

Glycerollösung, 10 % Glycerol in PBS.

Die Transfektion wurde in Plastikschälchen von 35 mm Durchmesser durchgeführt. 30 bis 50 % konfluente Zellen (am Vortag ausplattiert) wurden eine Stunde in 2 ml Mangelmedium inkubiert. Anschließend wurden 1,5 µl DNA_{EAAC1} (1,0 µg/µl), 2,0 µl DNA_{GFP} (0,5 µg/µl), 25 µl Kalziumchlorid-Lösung und 75 µl Wasser zusammen mit 100 µl 2xBBS gemischt, eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend dem Mangelmedium zugesetzt. Während der 3- bis 4-stündigen Inkubation bei 37 °C und 3 % CO₂ bilden sich DNA-Hydroxyapatit-Kopräzipitate aus, die von den Zellen inkorporiert werden. Dieser Vorgang wird durch basisches Milieu (3 % CO₂) unterstützt. Dabei ist es sehr wahrscheinlich, dass die Zellen die DNA beider Proteine (Transporter und GFP) aufnehmen. Diese Aufnahme kann durch einen osmotischen Schock von 45 Sekunden mit einer Glycerollösung gesteigert werden. Die Präzipitate wurden durch 3-maliges Waschen mit PBS entfernt. Die elektrischen Messungen wurden ein bis drei Tage nach der Transfektion durchgeführt, wobei die Identifikation der EAAC1-exprimierenden Zellen durch Detektion der grünen Fluoreszenz des koexprimierten GFPs nach Anregung mit blauem Licht (450–490 nm) unter dem Fluoreszenzmikroskop erfolgte.

2.2. Strommessungen

Die durchgeführten elektrischen Messungen erfolgten mit Hilfe der *patch clamp*-Technik, wobei die zwei Konfigurationen *whole-cell* (Ganzzelleableitung, extrazelluläre Membranseite ist der Badlösung zugewandt) und *inside-out* (zytosolische Membranseite ist der Badlösung zugewandt, siehe 2.2.4.) eingesetzt wurden.

2.2.1. Geräte und Software zur *patch clamp*-Messung

Inverses Fluoreszenzmikroskop	Axiovert 25 von Zeiss (Jena)
<i>patch clamp</i> -Verstärker	EPC-7 von List-Medical-Electronic (Darmstadt)
Datendigitalisierung	DigiData 1200 Interface von Axon Instruments (Foster City, USA)
Steuer- und Aufzeichnungseinheit	pClamp 6.0 Softwarepaket von Axon Instruments
Elektrischer Filter	Modell 3200 von Krohn-Hite (Avon, USA)
Ventile	Quetschventile von General Valve Corporation (Fairfield, USA)
Ventilsteuerung	Anfertigung der Werkstatt (MPI für Biophysik)
Mikromanipulator	Modell MN0-203 von Narashige (London, UK)
Schwingungsgedämpfter Tisch	Modell VH3036W-OPT von Newport (Darmstadt)
Pipettenzieher	DMZ Universal Puller von Zeitz Instrumente (Augsburg)
Pipettenglas	Borosilikatkapillaren GC150TF der Fa. Harvard Apparatus (Kent, UK)
Laser	MINex (XeCl-Excimerlaser) von Lambda Physik (Göttingen), Pulsdauer ≈ 10 ns
Farbstoff	2,5 bis 5 mM p-Terphenyl (PTP) in Dioxan von Lambda Physik (Göttingen)
Filter	UV-durchlässige Graufilter der Fa. Andover Corporation (Salem, USA)

2.2.2. Theoretische Grundlagen der *patch clamp*-Messung

Die *patch clamp*-Technik wurde in den 70er- und 80er-Jahren von Erwin Neher und Bert Sakmann entwickelt (Hamill et al., 1981). Sie bietet die Möglichkeit, Transmembranströme an intakten Zellmembranen zu messen. Dabei beruht das Messprinzip darauf, das Membranpotenzial der Zelle konstant zu halten (*voltage clamp*) und den dazu nötigen Kompensationsstrom zu messen. In Abb. 2.1 ist ein vereinfachtes Ersatzschaltbild eines *patch clamp*-Verstärkers dargestellt bei dem die Spannungsmessung und die Strominjektion über eine einzige Elektrode erfolgen muss. Dies wird durch die Kombination eines Operationsverstärkers in Parallelschaltung mit einem Rückkopplungswiderstands (R_f) ermöglicht. Der Operationsverstärker misst ständig die Differenz zwischen der Pipettenspannung U_{pip} (+Eingang) und der Kommandospannung U_{sol} (-Eingang). Liegt ein Unterschied vor, zum Beispiel auf-

grund von Leitfähigkeitsänderungen in der Zelle, gibt der Operationsverstärker ein verstärktes Signal aus. Damit liegen am Rückkopplungswiderstand R_f zwei unterschiedliche Spannungen an, die der Differenzmessung des Operationsverstärkers und die der Pipette, sodass ein Strom durch R_f fließt. Dieser Strom kann nur in die Pipette fließen, da der Operationsverstärker einen sehr hohen Eingangswiderstand ($10^{12} \Omega$) besitzt. Dort verändert er die Pipettenspannung U_{pip} bis der Unterschied zwischen ihr und der Kommandospannung U_{soll} ausgeglichen ist. Damit ist die Ausgangsspannung U_{aus} , die an die Steuereinheit weitergeleitet wird, immer proportional dem injizierten Kompensationsstrom.

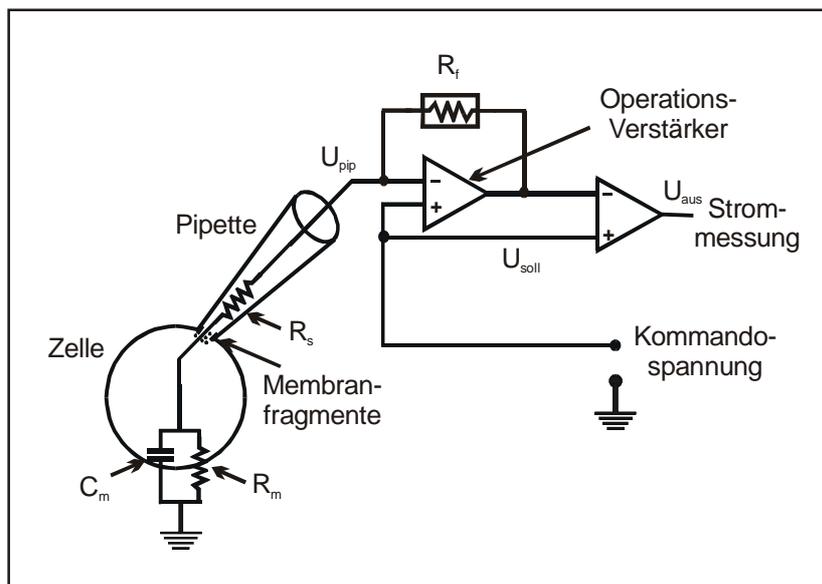


Abb. 2.1: Schematische Darstellung eines patch clamp-Verstärkers. Rückkopplungswiderstand (R_f), Serienwiderstand (R_s), Membranwiderstand (R_m), Membrankapazität (C_m), Pipettenpotenzial (U_{pip}), Kommandospannung (U_{soll}) und Ausgangsspannung (U_{aus}).

Bei Ganzzelleableitungen ist beim *voltage clamp* zu beachten, dass der Serienwiderstand R_s klein sein muss im Vergleich zum Zellwiderstand R_m (Marty und Neher, 1995). Ist dies nicht der Fall, fällt ein Großteil der Spannung bereits am Serienwiderstand ab und das Haltepotenzial der Zelle entspricht nicht dem eingegebenen Sollwert. Da bei den durchgeführten Messungen relativ große Pipetten verwendet wurden (siehe 2.2.3.) lag der Serienwiderstand R_s im Bereich von 5–10 $M\Omega$, wobei die Kapazität C_m von HEK-Zellen ≈ 10 –20 pF beträgt. Im Vergleich dazu führte die Überexpression des Glutamattransporters in der Zellmembran zu einer Verringerung des basalen Membranwiderstandes R_m von $\approx 500 M\Omega$ auf $\approx 200 M\Omega$. Daher wurde auf eine Kompensation des Serienwiderstandes verzichtet.

2.2.3. Praktische Durchführung von Ganzzelleableitungen

Für Ganzzelleableitungen wurden Pipetten mit einem Öffnungswiderstand von 2–4 $M\Omega$ verwendet (Durchmesser $\approx 2 \mu m$). Um unnötige Übergangspotenziale zu vermeiden (Barry und Lynch, 1991) wurde zum einen die Referenzelektrode (Ag/AgCl) separat in 1 M KCl-

Lösung getaucht und mit der Badlösung über eine Agarbrücke (3 % Agar, 1 M KCl) leitend verbunden, zum andern mit einer internen Salzbrücke (1 M KCl, Elektrode Ag/AgCl) gearbeitet (siehe Abb. 2.2). Mit dieser Anordnung ist es zudem möglich, Chlorid-freie Lösungen bei den Messungen einzusetzen. Beim Eintauchen der Pipette in das Bad wird Überdruck angelegt, damit die Pipettenspitze nicht verunreinigt wird. Nach dem Nullabgleich des Pipettenpotenzials wird die Pipette an die Zelle angenähert und leichter Unterdruck angelegt. Die Ausbildung eines Abdichtungswiderstandes zwischen Glaspipette und Membran (*Seal-Bildung*) kann durch Rechtecks-Spannungspulse (2–8 mV, ≈ 5 ms) verfolgt werden. Aufgrund der kapazitiven Eigenschaften von Pipette und Pipettenhalter ergeben sich transiente Stromsignale beim Spannungssprung, die der Umladung dieser beiden Bauteile entsprechenden. Da Membranen physikalisch einer Parallelschaltung aus Widerstand und Kondensator darstellen (siehe Abb. 2.1), trägt die Umladung des angesaugten Membranstücks ebenso zum transienten Stromsignal bei. Erreicht der Abdichtungswiderstand Werte von $> 1 \text{ G}\Omega$ wird durch Spannungspulse (500 mV) und Unterdruck die Membran unter der Pipette durchbrochen und so der Ganzzellmodus erreicht. Beim Spannungssprung wird nun die gesamte Zellmembran umgeladen, wofür mehr Ladung benötigt wird und das transiente Stromsignal nimmt zu. Dies ist vor allem bei der Zeitkonstanten des Abfalls des transienten Stromsignals zu sehen, die nun bestimmt ist durch Widerstand und Kapazität der gesamten Zelle ($\tau = 1/R_S C$). Daher kann durch den Spannungssprung überprüft werden, ob sich die Zelle im Ganzzellmodus befindet. Die Zelle wird nun vom Boden gelöst und vor die Lösungszufuhr platziert (siehe Abb. 2.2). Während der Messung wird der Widerstand und die Kapazität ständig überprüft, um sicher zu stellen, dass der anfängliche hohe Abdichtwiderstand erhalten bleibt und dass sich die Pipettenöffnung nicht wieder verschließt.

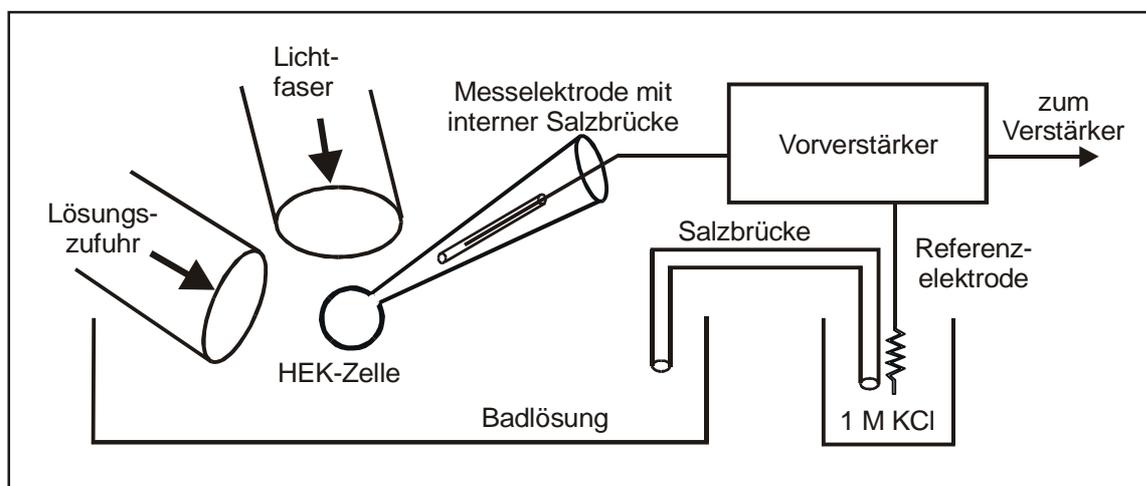


Abb. 2.2: Schematische Darstellung der Messapparatur.

2.2.4. Praktische Durchführung von *inside-out patch clamp*-Messungen

Bei Messungen am *excised patch* wurden Pipetten mit einem Öffnungswiderstand von 400–800 k Ω eingesetzt (Durchmesser \approx 10 μ m). Die Vorgehensweise entspricht bis zur Bildung des Abdichtungswiderstandes der bei Ganzzelleableitungen mit dem Unterschied, dass der angelegte Über- und Unterdruck geringer ist, da sonst die Zelle weggespült bzw. in die Pipette eingesaugt wird. Bei einem Widerstand von $>$ 1G Ω wird nun der Unterdruck entfernt und das Stück Membran, welches in der Pipette festgehalten ist (*patch*), aus der Zelle gerissen. Ist statt dessen ein Vesikel entstanden, kann durch starken Lösungsfluss oder durch die Applikation von Luftblasen in vielen Fällen die Aussenseite des Vesikels zerstört werden, damit die *inside-out patch*-Konfiguration erreicht wird.

2.2.5. Messprotokolle

Lösungswechsel-Experimente

Die Applikation der aktivierenden und nicht-aktivierenden Lösung wurde durch die Verbindung der verschiedenen Lösungs-führenden Schläuche (Innendurchmesser 0,28 mm) in eine Sammelleitung erreicht, vor der die Zelle positioniert war (siehe Abb. 2.2). Mit einem Überdruck von \approx 0,06 bar konnten somit durchschnittliche lineare Flussraten von 5 cm/s erreicht werden, sodass die Zeitauflösung \approx 50–200 ms betrug. Die aktivierende/inhibierende Lösung wurde in der Regel für 3–5 Sekunden der Zelle appliziert. Die Aufzeichnung erfolgte mit einer Rate von 1 kHz bei einer Tiefpass-Filterfrequenz von 250 Hz. Das Haltepotenzial war 0 mV.

Spannungssprung-Experimente für Glutamatkonzentrationsabhängigkeit

Ausgehend von einem Haltepotenzial von 0 mV wurden Spannungssprünge zu -90 mV bis $+60$ mV in 30 mV-Intervallen für 150 ms durchgeführt. Um den Anteil des EAAC1-assoziierten Stroms zu bestimmen, wurde die Differenz zwischen den Messungen in An- und Abwesenheit von Glutamat gebildet. Um Veränderungen in der Leitfähigkeit der HEK-Zelle zu erkennen, erfolgte zusätzlich die Differenzbildung zwischen den Messungen mit nicht-aktivierender Lösung vor und nach der Glutamat-Applikation. Die Aufzeichnung erfolgte mit einer Rate von 4 kHz bei einer Tiefpass-Filterfrequenz von 1 kHz.

Spannungssprung-Experimente für TBOA-sensitive Ströme

Ausgehend von einer Haltespannung von 0 mV wurden Spannungssprünge zu -100 mV bis $+100$ mV in 50 mV-Intervallen für 10 ms durchgeführt. Die Pipetten- und Membrankapazität wurde so gut wie möglich mit den Verstärker-eigenen Kompensationsfunktio-

nen kompensiert. Die Aufzeichnung erfolgte mit einer Rate von 25 kHz bei einer Tiefpass-Filterfrequenz von 3–10 kHz.

Spannungsrampen

Da HEK-Zellen häufig Veränderungen in der Leitfähigkeit während Spannungssprüngen zeigten, wurde meist mit einer Spannungsrampe gearbeitet. Dabei wurde die Zelle innerhalb von 3 s ausgehend von 0 mV auf das neue Haltepotenzial (–90 mV bis +60 mV) geklemmt, das für 9,5 s anlag, während der Lösungswechsel (3 s) durchgeführt werden konnte. Anschließend wurde die Zelle in 3 s wieder auf das Ausgangspotenzial geklemmt. Die Aufzeichnung erfolgte mit einer Rate von 1 kHz bei einer Tiefpass-Filterfrequenz von 250 Hz.

2.2.6. Photolyse-Experimente

Für vorstationäre Messungen an EAAC1 war der Lösungswechsel zu langsam, sodass Glutamat mit Hilfe der photolytischen Freisetzung (Laserpuls-Photolyse) aus photolabil-geschütztem Glutamat (*caged* Glutamat) appliziert wurde (siehe 1.5.2.). Das eingesetzte *caged* Glutamat war α -Carboxy-*o*-nitrobenzyl (α CNB)-*caged* Glutamat, das eine Freisetzungshalbwertszeit von 21 μ s besitzt. Die Zeitauflösung der Messung lag damit im Bereich von 100 μ s und war somit ausreichend schnell für die Untersuchung des Glutamattransporters (siehe Ergebnisse). α CNB-*caged* Glutamat wurde von Molecular Probes (Eugene, USA) bezogen, in Methanol gelöst und nach Aliquotierung und Abdampfen des Methanols bei –20 °C gelagert. Da α CNB-*caged* Glutamat leicht hydrolysiert, wurde es erst kurz vor der Messung in Konzentrationen von 1–6 mM in Pufferlösung aufgenommen. Vor dem Lichtblitz erfolgte die Äquilibration der Zelle mit dem photolabil-geschützten Glutamat für \approx 5 s bei geringster Flussrate (kein Überdruck), damit kein schnelles Auswaschen von Glutamat nach dessen photolytischer Freisetzung auftrat. Das eingesetzte *caged* Glutamat zeigte keine Wechselwirkung mit dem Transporter (Grewer et al., 2000b) und seine Quantenausbeute sowie die Freisetzungshalbwertszeit sind in einem pH-Bereich von 6,0 bis 10,0 ausreichend zur Freisetzung von sättigenden Konzentrationen an Glutamat (Watzke et al., 2000). Enthielt die *caged* Glutamatlösung hohe Konzentrationen an freiem Glutamat, wurde während der Äquilibration bereits eine Aktivierung des Transporters beobachtet. Betrug diese Voraktivierung bereits 1/4tel des maximalen Stromsignals wurde die *caged* Glutamat-Lösung frisch angesetzt. Für das Photolyse-Experiment wurde der Fluoreszenzfarbstoff p-Terphenyl (Emissionswellenlänge 340 nm) mit einem XeCl-Excimerlaser (308 nm, Pulsdauer \approx 10 ns) angeregt und das Fluoreszenzlicht in eine Lichtleiterfaser (Quarzglas, Durchmesser 365 μ m, Laser Components, Olching) eingekoppelt. Die Energie am Ende der Faser betrug 100–800 mJ/cm², ab-

hängig von der Abschwächung durch Graufilter (vor der Farbstoffküvette). Die Lichtleiterfaser wurde neben die Öffnung für die Lösungszufuhr platziert (siehe Abb. 2.2), sodass die Zelle sowohl gut im Lösungsfluss als auch im Lichtstrahl positioniert werden konnte. Die Abschätzung der freigesetzten Glutamatkonzentration konnte durch Vergleich der Amplitude des stationären Stroms mit dem Glutamat-induziertem Strom beim Lösungswechsel-Experiment (siehe 2.2.5.) an der gleichen Zelle vor oder nach dem Photolyse-Experiment durchgeführt werden.

Die Aufzeichnung der zeitaufgelösten Messungen erfolgte mit einer Rate von 25 kHz bei einer Tiefpass-Filterfrequenz von 3–10 kHz. Das Haltepotenzial betrug 0 mV oder wurde mit Spannungsrampen (siehe 2.2.5.) zwischen –90 und +60 mV variiert.

2.2.7. Lösungen

Die verwendeten Chemikalien stammten von den Firmen Merck (Darmstadt) oder Sigma (Deisenhofen) und hatten die Qualitätsstufe „zur Analyse“.

KSCN-haltige Pipettenlösung

130 mM KSCN, 10 mM TEA-Cl (Tetraethylammoniumchlorid), 1 mM MgCl₂, 10 mM EGTA (Ethylen-bis-(oxyethylennitrilo)-tetraessigsäure), 10 mM HEPES (N-(2-Hydroxyethyl)-piperazine-N'-(2-ethansulfonsäure)), pH 7,4/KOH. In manchen Fällen enthielt diese Pipettenlösung zusätzlich 2,5 mM CaCl₂ (< 0,1 µM freies Kalzium), was die *Seal*-Bildung förderte.

KCl-haltige Pipettenlösung

130 mM KCl, 10 mM TEA-Cl, 1 mM MgCl₂, 10 mM EGTA, 10 mM HEPES, pH 7,4/KOH.

Homoexchange-Mode Pipettenlösung

130 mM NaSCN / NaCl, 10 mM TEA-Cl, 1 mM MgCl₂, 10 mM EGTA, 10 mM HEPES, 5 mM Na-Glutamat pH 7,4/NaOH.

NaCl-haltige Badlösung

140 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, entweder 10 mM HEPES und 10 mM Glucose oder 30 mM HEPES pH 7,4/NaOH.

Der Zusatz von Glucose hatte keinen Einfluß auf die Integrität der HEK-Zellen oder auf den Glutamat-induzierten Strom.

NaSCN-haltige Badlösung

140 mM NaSCN, 2 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, entweder 10 mM HEPES und 10 mM Glucose oder 30 mM HEPES pH 7,4/NaOH.

NaCl-haltige Badlösung /Na

140 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 15 mM Tris (Tri-(hydroxymethyl)-aminomethan), 15 mM MES (2-(N-Morpholin)-ethansulfonsäure), pH 7,4 (enthält genau 140 mM Na⁺ bei pH 7,4).

Na⁺-freie Badlösung

140 mM Cholin-Cl, 2 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 30 mM HEPES, pH 7,4/NMG (N-Methyl-D-glucamin).

Durch Mischung der Lösungen NaCl-haltige Badlösung /Na und Na⁺-freie Badlösung wurden Lösungen mit 85,6 mM, 49,3 mM, 31,1 mM, 22,0 mM, 17,5 mM, 15,2 mM, 10,0 mM und 5,0 mM Na⁺ eingestellt.

NaCl-haltige Badlösung /pH

140 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 15 mM Tris und entweder 15 mM MES, pH 6, 7, 8 und 9 (eingestellt mit HCl oder NaOH), oder 15 mM CAPS (3-Cyclohexylamin-1-propansulfonsäure), pH 10/NaOH, oder 15 mM Na-Succinat, pH 4.8/HCl.

NaCl-haltige Badlösung /D₂O

140 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 15 mM Tris und 15 mM MES in D₂O, pD 7,7.

Entgegen Beobachtungen von Trotti und Mitarbeitern (Trotti et al., 1998; Trotti et al., 1997), konnte bei EAAC1 in HEK-Zellen kein Einfluss von oxidativen (H₂O₂) und reduktiven (Dithiothreitol (DTT)) Zusätzen in der Badlösung auf das Glutamat-induzierte Stromsignal nachgewiesen werden. Aus diesem Grund wurde auf den Zusatz von DTT verzichtet.

Glutamat

Stammlösung: 100 mM L-Glutamat pH 7,4/NMG.

Bei Einsatz hoher Konzentrationen wurde Glutamat oder seinem Natriumsalz (nicht bei Na⁺-Konzentrationsabhängigkeit) direkt der Badlösung zugesetzt und der pH-Wert entsprechend korrigiert. Um osmotische Unterschiede auszugleichen, enthielt die nicht-aktivierende Lösung in diesen Fällen entsprechende Mengen an Tris (< 8 mM).

Andere Substrate und Inhibitoren

Aspartat-Stammlösung: 10 mM D-Aspartat pH 7,4/NMG.

L-Serin-O-sulfat: wurde der Badlösung als Salz in einer Konzentration von 1 mM zugesetzt. Der pH-Wert wurde mit NaOH auf pH 7,4 eingestellt.

O-Phospho-L-serin: Bei der oben aufgeführten NaCl-haltigen Badlösung wurde der Puffer durch Phosphoserin als Puffer ($pK = 5,9$) ersetzt und auf pH 7,4 eingestellt. Die verschiedenen Phosphoserin-Konzentrationen ergaben sich durch Mischung mit NaCl-haltiger Badlösung.

Der eingesetzte kompetitive Inhibitor DL-*threo*- β -Benzyloxyaspartat (TBOA) wurde freundlicherweise von K. Shimamoto aus Osaka (Japan) zur Verfügung gestellt. Er lag in einer Konzentration von 10 mM in Wasser vor.

2.2.8. Auswertung der Daten

Alle Experimente wurden bei Raumtemperatur durchgeführt und ≥ 5 mal an ≥ 3 verschiedenen Zellen bzw. *patches* (= n) wiederholt. Die gemittelten Daten sind als Mittelwert \pm Fehler der Einzelmessung (= SD) dargestellt.

Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Analyseprogramm Clampfit (pClamp8) der Firma Axon Instruments (Foster City, USA) und mit Origin (Microcal software). Die Stromkurven der zeitaufgelösten Messungen beim Photolyse-Experiment konnten als Summe aus zwei oder drei Exponentialfunktionen und einem stationären Stromanteil angepasst werden ($I = I_1 \cdot \exp(-t/\tau_1) + I_2 \cdot \exp(-t/\tau_2) + I_3 \cdot \exp(-t/\tau_3) + I_{\text{stationär}}$). Die Abhängigkeit des EAAC1-getragenen Stromes von der Glutamatkonzentration und den kotransportierten Protonen und Natriumionen ließ sich durch eine Michaelis-Menten-Gleichung wiedergeben mit $I = (I_{\text{max}} \cdot [\text{Glutamat}]) / (K_M + [\text{Glutamat}])$. Für die Na^+ -Konzentrationsabhängigkeit des EAAC1-getragenen Leckstroms wurde eine Hillgleichung mit einem Hillkoeffizienten h von eins oder zwei eingesetzt ($I = (I_{\text{max}} \cdot [\text{Glutamat}]) / (K_M + [\text{Glutamat}])^h$). Die sonst in der Arbeit verwendeten mathematischen Beschreibungen der experimentellen Daten sind im Anhang (Kapitel 6) aufgelistet.

3. Ergebnisse

Bei der Untersuchung des Glutamattransporters EAAC1, transient exprimiert in humanen embryonalen Nierenzellen (HEK), wurde bei Verwendung einer SCN^- -haltigen Lösung zusätzlich zum Glutamat-Transportstrom der Glutamat-induzierte Anionenstrom beobachtet (Eliasof und Jahr, 1996; Otis et al., 1997). Da EAAC1 für Thiocyanationen im Vergleich zu Chloridionen gut permeabel ist, führte dies zu einer Verstärkung des Glutamat-induzierten Stromsignals und wurde daher häufig eingesetzt, wenn nicht eine explizite Trennung zwischen Glutamattransport und Anionenleitfähigkeit erforderlich war.

3.1. Funktionelle Charakterisierung von EAAC1

Für die Untersuchung der verschiedenen Funktionsweisen der Glutamattransporter wurden zunächst die Konzentrationen der ko- und gegentransportierten Ionen (Na^+ , H^+ und K^+) konstant gehalten und nur auf die Spannungsabhängigkeit und die Abhängigkeit von der Glutamatkonzentration des EAAC1-getragenen Stromsignals eingegangen.

Da EAAC1 in seiner physiologischen Rollen die Glutamataufnahme katalysiert (wird im Folgenden immer als Glutamat-Einwärtstransport bezeichnet), erfolgten Ganzzelleableitungen von $\text{HEK}_{\text{EAAC1}}$ -Zellen, wobei die extrazelluläre Lösung (Badlösung) keine Kaliumionen und dafür eine hohe Konzentration an Natriumionen enthielt, während die intrazelluläre Lösung (Pipettenlösung) reich an K^+ und Na^+ -frei war. Zudem enthielt die intrazelluläre Lösung kein Glutamat (sog. *zero-trans* Bedingungen). Im Lösungswechsel-Experiment konnte nun Glutamat extrazellulär appliziert werden, wobei die Glutamataufnahme in die Zelle aufgrund der oben erwähnten ionalen Bedingungen quasi irreversibel war.

3.1.1. Spannungsabhängigkeit der Affinität von EAAC1 für Glutamat

In Abb. 3.1A ist ein solches Lösungswechsel-Experiment bei einer Haltespannung von 0 mV und unterschiedlichen Glutamatkonzentrationen gezeigt. Da der Einwärtstransport von Glutamat mit der Aufnahme von zwei positiven Ladungen pro Transportzyklus verbunden ist, wurde ein negativer Strom (Einwärtsstrom) detektiert (siehe 2.2.2.). In den Messungen aus Abb. 3.1 enthielt die Pipettenlösung (intrazellulär) SCN^- , sodass zusätzlich zum Glutamat-Transportstrom der Glutamat-induzierte Anionenstrom zum negativen Stromsignal beitrug. Bei nicht-transfizierten Zellen wurde keine Veränderung der Leitfähigkeit bei Applikation

von Glutamat beobachtet. Für eine halbmaximale Stromaktivierung bei 0 mV Haltespannung war eine Glutamatkonzentration von ca. 6 μM nötig (Abb. 3.1C).

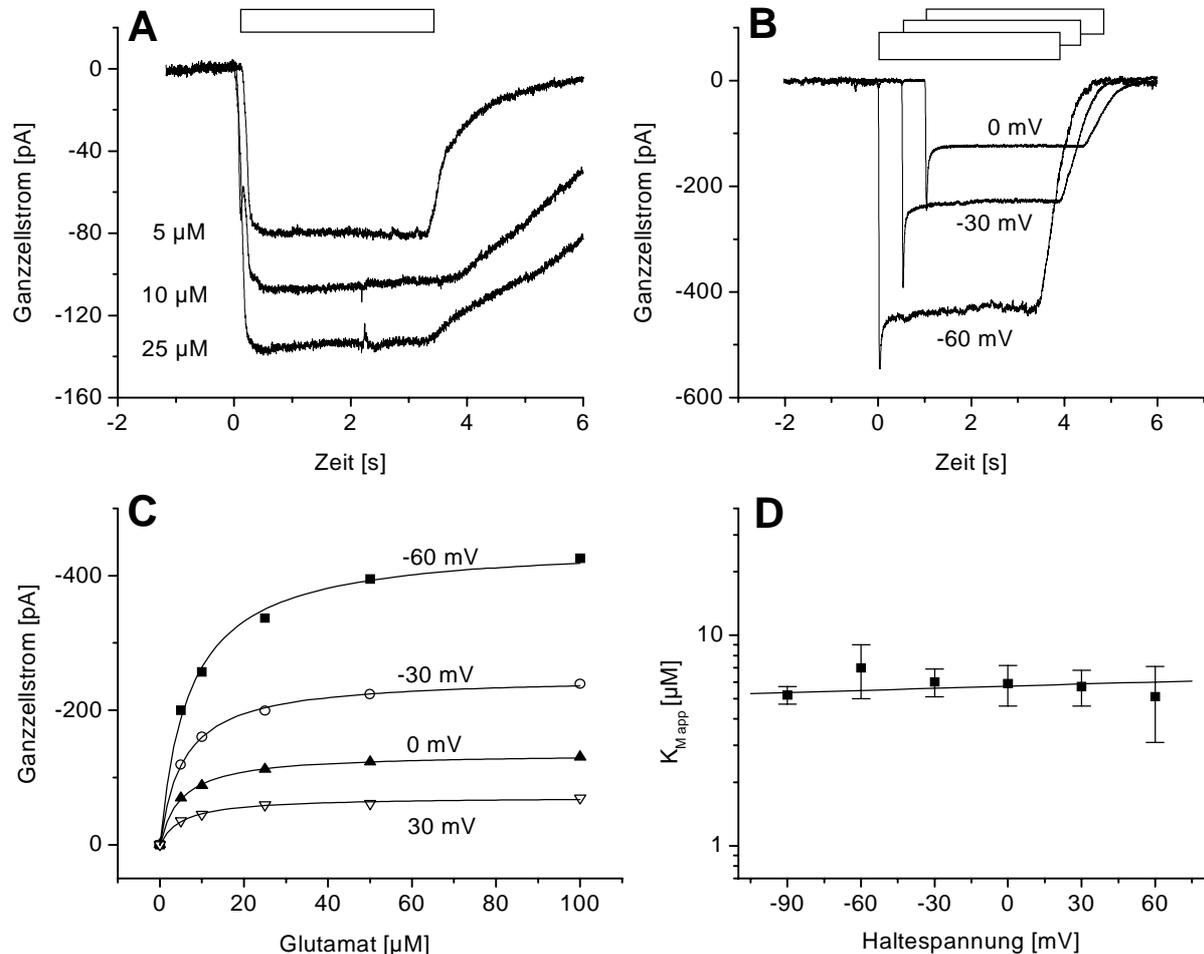


Abb. 3.1: Spannungsabhängigkeit der Affinität (K_M) von EAAC1 für Glutamat. Versuchsbedingungen A-D: KSCN-haltige Pipettenlösung, NaCl-haltige Badlösung. (A) Ganzzelleableitung einer EAAC1-exprimierenden HEK-Zelle bei 0 mV Haltespannung und unterschiedlichen Glutamatkonzentrationen (5, 10 und 25 μM , Glutamat-Applikation zur Zeit $t = 0$, siehe Balken). (B) Ganzzelleableitung einer HEK_{EAAC1}-Zelle bei Applikation von 125 μM Glutamat (Balken) und Haltespannungen von -60, -30 und 0 mV (Spannungsrampen, siehe 2.2.5.). Die Leckströme wurden subtrahiert. (C) Ganzzellstrom einer HEK_{EAAC1}-Zelle in Abhängigkeit von der Haltespannung und der eingesetzten Glutamatkonzentration. Die experimentellen Daten wurden mit einer Michaelis-Menten-Gleichung angepasst. Parameter: -60 mV (gefüllte Quadrate) $I_{max} = -450 \pm 10$ pA, $K_M = 7,0 \pm 0,7$ μM ; -30 mV (offene Kreise) $I_{max} = -250 \pm 2$ pA, $K_M = 5,6 \pm 0,4$ μM ; 0 mV (gefüllte Dreiecke) $I_{max} = -135 \pm 1$ pA, $K_M = 5,1 \pm 0,2$ μM ; 30 mV (offene Dreiecke) $I_{max} = -70 \pm 2$ pA, $K_M = 5,4 \pm 0,6$ μM . (D) Apparente K_M -Werte von EAAC1 für Glutamat in Abhängigkeit von der angelegten Haltespannung (Mittelwert \pm SD, siehe Tabelle 3.1).

Neben der Abhängigkeit des EAAC1-Stromsignals von der Glutamatkonzentration wurde dessen Verhalten bei unterschiedlichen Spannungen untersucht. Mit Verringerung der Haltespannung, wie in Abb. 3.1B von 0 mV auf -30 bzw. -60 mV, nahm der Glutamat-induzierte Einwärtsstrom deutlich zu, da 1) der elektrochemische Gradient für SCN^- erhöht wurde

und 2) der Glutamattransport beschleunigt wurde (siehe 3.1.2.). In Abhängigkeit von der Geschwindigkeit des Wechsels von Glutamat-freier zu Glutamat-haltiger Lösung konnte ein transienter nicht-zeitaufgelöster Strom beobachtet werden, der in einen stationären Strom überging (Abb. 3.1B). Die Ursachen sowie zeitaufgelöste Messungen dieses transienten Stromsignals sind im Kapitel 3.1.3. beschrieben.

Durch Applikation unterschiedlicher Glutamatkonzentrationen bei verschiedenen Haltespannungen wurde die Spannungsabhängigkeit der Affinität von EAAC1 für Glutamat ermittelt. Wie in Abb. 3.1C dargestellt, zeigte die Glutamat-Konzentrationsabhängigkeit von EAAC1 im gesamten untersuchten Spannungsbereich ein Michaelis-Menten-ähnliches Verhalten, d. h. pro Transportzyklus wurde ein Glutamatmolekül transportiert. Die ermittelten apparenten K_M -Werte bei den verschiedenen Haltespannungen waren im Rahmen der Messgenauigkeit identisch (siehe Abb. 3.1D und Tabelle 3.1).

Haltespannung [mV]	-90	-60	-30	0	30	60
K_M -Wert [μ M]	$5,2 \pm 0,5$	$7,0 \pm 2,0$	$6,0 \pm 0,9$	$5,9 \pm 1,3$	$5,7 \pm 1,1$	$5,1 \pm 2,0$
n	5	9	9	9	7	7

Tabelle 3.1:

Apparente K_M -Werte von EAAC1 für Glutamat bei verschiedenen Haltespannungen (Mittelwert \pm SD).

3.1.2. Spannungsabhängigkeit der Glutamat-induzierten Ströme von EAAC1 bei unterschiedlicher Verteilung des permeierenden Anions SCN^-

Wie oben erwähnt, resultierte der Glutamat-induzierte Strom bei EAAC1 aus zwei unterschiedlichen Funktionen des Glutamattransporters – Anionenleitfähigkeit und Glutamattransport. In der Abwesenheit von permeierenden bzw. in der Anwesenheit von wenig permeierenden Anionen wie Gluconat und Chlorid entsprach der detektierte Strom dem Glutamat-Transportstrom. Im Gegensatz dazu ergab sich bei Verwendung von Thiocyanat, einem gut permeierenden Anion, ein zusätzlicher Strom aufgrund der Anionenleitfähigkeit von EAAC1. Im Folgenden wurde die Spannungsabhängigkeit der unterschiedlichen Stromkomponenten untersucht.

In Abb. 3.2A und C (*offene Kreise*) wurde zunächst die Anordnung gewählt, in der Glutamattransport und Anionenleitfähigkeit Ströme in die gleiche (negative) Richtung erzeugen (hohe $[SCN^-]$ auf der intrazellulären Seite). Aufgrund der Abwesenheit von Glutamat auf der intrazellulären Seite, konnte der Glutamattransport bei allen Haltespannungen nur einwärts-gerichtet sein. Zusätzlich führte die Abwesenheit von extrazellulären Thiocyanationen

dazu, dass nur ein Ausstrom der Anionen beobachtet werden konnte. Daher fand im gesamten untersuchten Spannungsbereich keine Umkehr des Stromsignals statt, sondern die Strom-Spannungs-Kennlinie zeigte einen exponentiellen Verlauf und bei depolarisierenden Haltespannungen tendierten Anionenstrom und Glutamat-Transportstrom gegen Null.

In Abb. 3.2B wurde bei der selben Zelle wie in A von einer SCN^- -freien zu einer SCN^- -haltigen extrazellulären Lösung gewechselt (Mittelwerte siehe 3.2D, *offene Kreise*). Damit können Anionen sowohl aus als auch in die Zelle fließen und nur beim theoretischen Umkehrpotenzial von -2 mV für SCN^- bestand keine treibende Kraft mehr für den Anionenstrom. Die Verschiebung des tatsächlichen Umkehrpotenzials vom berechneten Wert (-2 mV) resultierte aus der Überlagerung des Anionenstroms mit dem negativen Glutamat-Transportstrom. Da der Anionenstrom größer ist als der Glutamat-Transportstrom (siehe 3.5.), war die ermittelte Strom-Spannungs-Kennlinie annähernd linear mit einem Umkehrpotenzial von ca. $+8$ mV.

Enthält nur die extrazelluläre Lösung SCN^- , generieren der Einstrom der Anionen und der Glutamat-Einwärtstransport Ströme in entgegengesetzte Richtungen. Die entsprechende Strom-Spannungs-Kennlinie (siehe Abb. 3.2C, *geschlossene Quadrate*) hatte ein Umkehrpotenzial von -52 mV. Bei positiven Spannungen reduzierte sich das Stromsignal des Anionenstroms um das Stromsignal des Glutamat-Einwärtstransportes. Bei stark negativen Spannungen hingegen, bei denen der Einstrom der Anionen aufgrund des elektrochemischen Gradienten stark inhibiert war, wurde hauptsächlich der Glutamat-Transportstrom detektiert.

In Abwesenheit von SCN^- konnte der reine Glutamat-Transportstrom gemessen werden (siehe Abb. 3.2D, *geschlossene Quadrate*). Dieser kehrte sich aufgrund der Abwesenheit von intrazellulärem Glutamat und Na^+ , sowie extrazellulärem K^+ (*zero-trans* Bedingungen) im untersuchten Spannungsbereich nicht um. Der Glutamat-Transportstrom zeigte eine schwach exponentiellen Strom-Spannungs-Kennlinie mit einer e-fachen Zunahme pro ≈ -70 mV.

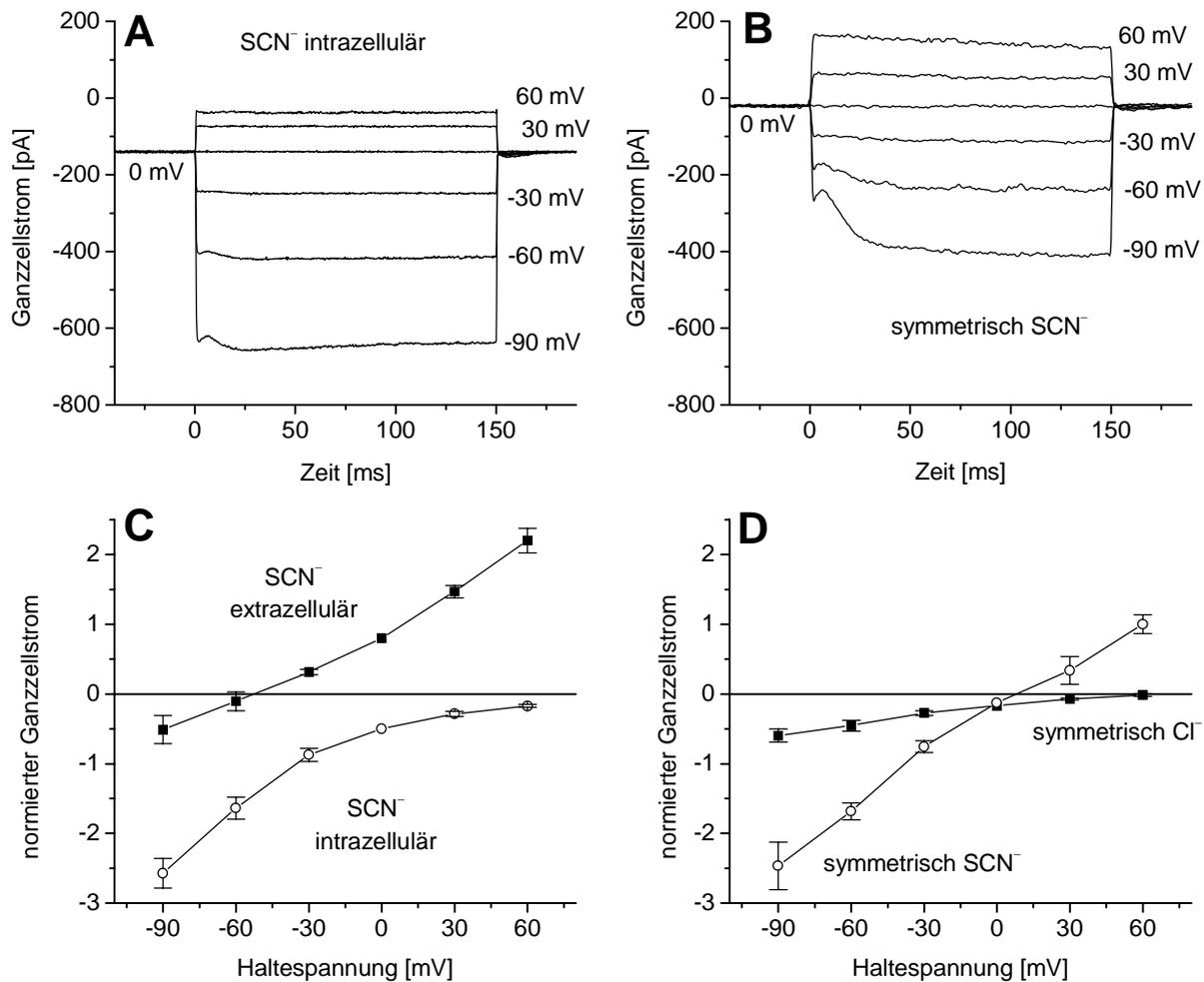


Abb. 3.2: Spannungsabhängigkeit der Glutamat-induzierten Ströme von EAAC1 bei unterschiedlicher Verteilung von SCN^- . (A) Differenzmessung von Spannungssprüngen einer $\text{HEK}_{\text{EAAC1}}$ -Ganzellableitung in An- und Abwesenheit von $125 \mu\text{M}$ Glutamat (NaCl -haltige Badlösung, KSCN -haltige Pipettenlösung). (B) Differenzmessung wie in A an der gleichen Zelle, wobei nun die intra- sowie die extrazelluläre Lösung fast identische Konzentrationen an SCN^- (140 mM NaSCN extra- und 130 mM KSCN intrazellulär) enthielten. (C) Strom-Spannungs-Kennlinien (Mittelwert \pm SD) mit extra- oder intrazellulärem SCN^- von Messungen dargestellt wie in A oder in Abb. 3.1A (Spannungsrampen und Lösungswechsel). Bei SCN^- intrazellulär wurde eine KSCN -haltige Pipettenlösung und NaCl -haltige Badlösung verwendet (*offene Kreise*, $n = 6$). Bei SCN^- extrazellulär enthielt die Badlösung NaSCN , während die Pipettenlösung KCl -haltig war (*geschlossene Quadrate*, $n = 5$). Das beobachtete Umkehrpotenzial betrug -52 mV . Die Normierung erfolgte auf den Glutamat-induzierten Strom bei 0 mV . (D) Strom-Spannungs-Kennlinien (Mittelwert \pm SD) des elektrogeneren Glutamat-Transportstroms (NaCl -haltige Badlösung, KCl -haltige Pipettenlösung, *geschlossene Quadrate*, $n = 4$) und bei symmetrischer Anwesenheit des permeierenden Anions SCN^- (NaSCN -haltige Badlösung, KSCN -haltige Pipettenlösung, *offene Kreise*, $n = 4$). Das Umkehrpotenzial bei symmetrisch SCN^- lag bei $+8 \text{ mV}$. Die Normierung erfolgte auf den Glutamat-induzierten Strom bei 0 mV .

Zur Untersuchung des Glutamat-Einwärtstransportes durch EAAC1 erfolgten bei ausschließlich extrazellulärer Anwesenheit von Na^+ und ausschließlich intrazellulärer Anwesenheit von K^+ Ganzzelleableitung von EAAC1-exprimierenden HEK-Zellen. Unter diesen Bedingungen wurde der Glutamattransporter in Abwesenheit von Glutamat in einem bestimmten Zustand fixiert, bei dem die Glutamat-Bindungsstelle von der extrazellulären Seite zugänglich war, da die Kalium-induzierte Relokation des Transporters unter den gewählten Bedingungen (Abwesenheit von extrazellulärem K^+) nahezu irreversibel war. Ausgehend von diesem einen Transporter-Zustand konnte nun das Verhalten von EAAC1 bei Applikation von Glutamat beobachtet werden, wobei anfangs alle Transporterproteine die Glutamat-induzierten Reaktionen synchron durchlaufen. Da im Lösungswechsel-Experiment die Zeitauflösung mit 50–200 ms zu gering war, wurden Photolyse-Experimente durchgeführt. Dabei erfolgt die Substrat-Applikation durch photolytische Freisetzung (Laserpuls) von Glutamat aus $\alpha\text{CNB-caged}$ Glutamat ($\tau_{1/2} = 21 \mu\text{s}$, ausführliche Beschreibung siehe 2.2.6.), welches selber nicht an den Transporter bindet (Greuer et al., 2000a).

3.1.3. Vorstationäre Ströme in Abhängigkeit von der Glutamatkonzentration

In Abb. 3.3A ist ein solches Photolyse-Experiment mit zwei unterschiedlichen Laserenergien dargestellt, bei denen sich der Anteil des freigesetzten Glutamats unterschied (Konzentrationsangabe, siehe Legende). In beiden Fällen konnte ein transienter Strom beobachtet werden, welcher nach $\approx 40\text{--}60$ ms in einen stationären Strom überging. Generell erfolgte die Abschätzung der freigesetzten Glutamatkonzentration durch Vergleich mit Lösungswechsel-Experimenten an der gleichen Zelle (Abb. 3.3B). Bei 0 mV Haltespannung und der Freisetzung von sättigenden Glutamatkonzentrationen (*untere Kurve* in Abb. 3.3A) wurde eine mittlere Zeitkonstante ($n = 10$) von $0,8 \pm 0,1$ ms für den Signalanstieg und $9,4 \pm 0,9$ ms für den Signalabfall des transienten Stroms gefunden. Beide Zeitkonstanten nahmen mit abnehmender Glutamatkonzentration zu. So ergab sich im abgebildeten Beispiel für τ_{Anstieg} 2,0 ms und für τ_{Abfall} 12,5 ms (*obere Kurve*). Zudem verschob sich das Verhältnis zwischen Spitzenstrom und stationärem Strom bei Abnahme der Glutamatkonzentration zugunsten des stationären Anteils, wobei τ_{Abfall} letztlich unabhängig von der Glutamatkonzentration wurde und einen konstanten Wert von $\approx 20 \pm 8$ ms erreichte (siehe Abb. 3.3D).

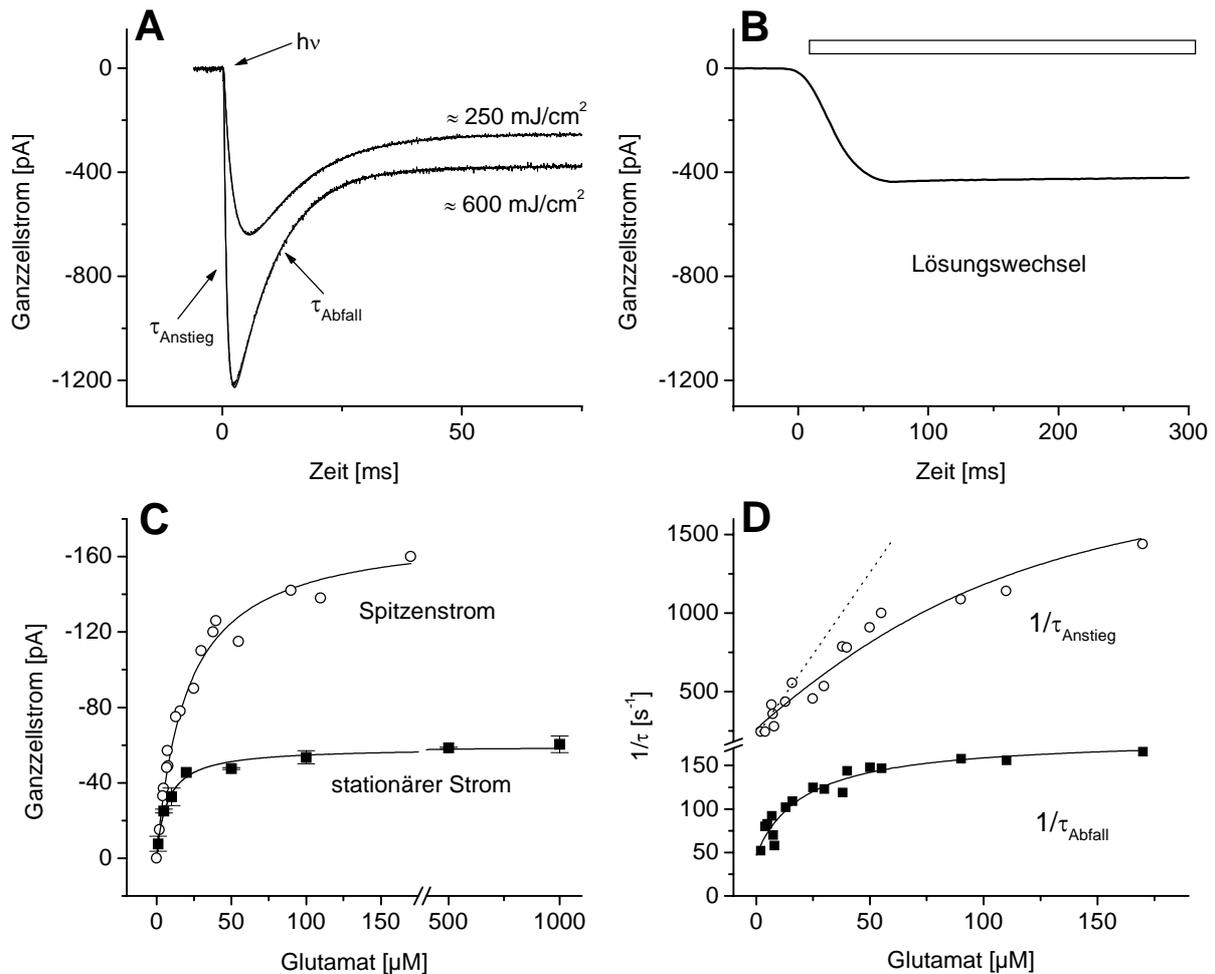


Abb. 3.3: Vorstationäre Ströme von EAAC1 in Abhängigkeit von der Glutamatkonzentration. Versuchsbedingungen A-D: KSCN-haltige Pipettenlösung, NaCl-haltige Badlösung. (A) Typische Ganzzellableitung einer EAAC1-exprimierenden HEK-Zelle (Haltespannung 0 mV) nach Freisetzung von Glutamat durch Laserpuls-Photolyse von α CNB-caged Glutamat. Durch den Einsatz von Graufiltern wurde die Laserenergie und damit die freigesetzte Glutamatkonzentration variiert. Parameter: 250 mJ/cm², τ_{Anstieg} 2,1 \pm 0,1 ms; τ_{Abfall} 12,5 \pm 0,1 ms; $I_{\text{stationär}} / I_{\text{Spitze}}$ 1 : 2,3; 500 μ M caged Glutamat \approx 15 μ M freies Glutamat; 600 mJ/cm², τ_{Anstieg} 0,8 \pm 0,1 ms; τ_{Abfall} 8,8 \pm 0,1 ms; $I_{\text{stationär}} / I_{\text{Spitze}}$ 1 : 3,3; 500 μ M caged Glutamat \approx 70 μ M. Die Leckströme wurden subtrahiert. (B) Lösungswechselexperiment an der gleichen Zelle wie in A. Bei 100 μ M Glutamat (Balken) betrug der stationäre Strom \approx 400 pA. (C) Abhängigkeit des Spitzenstroms von der Glutamatkonzentration im Vergleich zum stationären Strom. Parameter: Spitzenstrom (*offene Kreise*) $K_M = 20 \pm 2 \mu$ M (n = 4), stationärer Strom (*gefüllte Quadrate*) $K_M = 5,6 \pm 0,4 \mu$ M (siehe 3.1.1.). (D) Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten für den Anstieg (*offene Kreise*) und den Abfall (*gefüllte Quadrate*) des transienten Stromsignals von der Glutamatkonzentration. Die Anpassungen (*durchgezogene Linien*) der experimentellen Daten erfolgte mit Formeln dargestellt im Anhang 6.1. [6A und B]. Die eingesetzten Parameter waren $\Phi_1 = 20$, $\Phi_2 = 0,5$, $k_d = 2 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $k_{-d} = 1200 \text{ s}^{-1}$, $k_{\text{hin}} = 300 \text{ s}^{-1}$, $k_{\text{rück}} = 30 \text{ s}^{-1}$, $k_p = 1400 \text{ s}^{-1}$ und $k_{\text{np}} = 630 \text{ s}^{-1}$. Der Verlauf der gestrichelte Linie entspricht einer bimolekularen Reaktionskonstanten der Glutamatbindung an den Transporter mit $k_d = 2 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ und $k_{-d} = 250 \text{ s}^{-1}$.

In Abb. 3.3C und D sind die Abhängigkeiten der verschiedenen Parameter des transienten Stroms von der Glutamatkonzentration dargestellt. Während der stationäre Strom be-

reits bei Glutamatkonzentrationen von $\approx 6 \mu\text{M}$ halbmaximal aktiviert wurde, lag der K_M -Wert für den Spitzenstrom bei $20 \pm 2 \mu\text{M}$ (Abb. 3.3C). Ebenso konnte die Geschwindigkeitskonstante für den Abfall des transienten Stromsignals ($1/\tau_{\text{Abfall}}$) mit einer Gleichung ähnlich der von Michaelis und Menten angepasst werden (siehe Anhang 6.1. [6A]), wobei der apparente K_M -Wert $21 \pm 8 \mu\text{M}$ betrug (Abb. 3.3D, *geschlossene Quadrate*). Daraus konnten die Geschwindigkeitskonstanten für die Glutamattranslokation (k_{hin}) und die Kalium-induzierte Relokation ($k_{\text{rück}}$) des Transporters zu 300 s^{-1} bzw. 30 s^{-1} abgeschätzt werden (siehe auch 3.3.4.). Die reziproke Anstiegszeit ($1/\tau_{\text{Anstieg}}$) des transienten Stromsignals ist ebenfalls eine nicht-lineare Funktion von der Glutamatkonzentration, sättigt aber bei noch höheren Konzentrationen als bei $1/\tau_{\text{Abfall}}$ (siehe 3.3D, *offene Kreise*). Würde die Anstiegszeit des transienten Stroms durch die Bindung von Glutamat an den Transporter bestimmt, müsste sich eine lineare Abhängigkeit zwischen $1/\tau_{\text{Anstieg}}$ und der Glutamatkonzentration ergeben (*gestrichelte Linie*). Da dies nicht beobachtet wurde, muss τ_{Anstieg} durch mehr als eine Reaktion bestimmt werden (siehe Diskussion 4.2.1.). Die Anpassung erfolgte daher mit der in Anhang 6.1. dargestellten Formel [6B], die eine Abschätzung der Geschwindigkeitskonstanten für die Glutamatassoziation- und dissoziation (k_d und k_{-d}) von $2 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ und 1200 s^{-1} sowie der Geschwindigkeitskonstanten für den Übergang zum permeablen Zustand und zurück (k_p und k_{np}) mit 1400 s^{-1} und 630 s^{-1} ermöglichte.

3.1.4. Vorstationäre Messungen an EAAC1 in Ab- und Anwesenheit von SCN^-

Die oben beschriebenen Messungen wurden in der Anwesenheit von intrazellulärem Thiocyanat durchgeführt, sodass eine Summe aus Transportstrom und Glutamat-induziertem Anionenstrom detektiert wurde, die beide ein Stromsignal in die gleiche Richtung verursachten. In Abwesenheit von SCN^- trat in vorstationären Messungen an EAAC1 (Abb. 3.4A) jedoch ebenso ein transientes Stromsignal auf, welches in einen stationären Strom überging. Beim Vergleich mit Messungen mit intrazellulärem SCN^- ergab sich, dass die Zeitkonstante für den Anstieg deutlich schneller war mit $\tau_{\text{Anstieg}} 0,4 \pm 0,1 \text{ ms}$ und der Abfall des transienten Stroms aus zwei Komponenten besteht mit $\tau_{\text{Abfall1}} 1,6 \pm 0,2 \text{ ms}$ und $\tau_{\text{Abfall2}} 8,1 \pm 0,6 \text{ ms}$. Bei extrazellulärer Anwesenheit von SCN^- erzeugen der Glutamattransport und die Anionenleitfähigkeit Ströme in entgegengesetzte Richtungen (siehe 3.1.2.). Unter solchen Bedingungen wurde, wie in Abb. 3.4B dargestellt, dennoch ein kleiner transienter Einwärtsstrom beobachtet, der in einen langsamer-aktivierenden Auswärtsstrom überging.

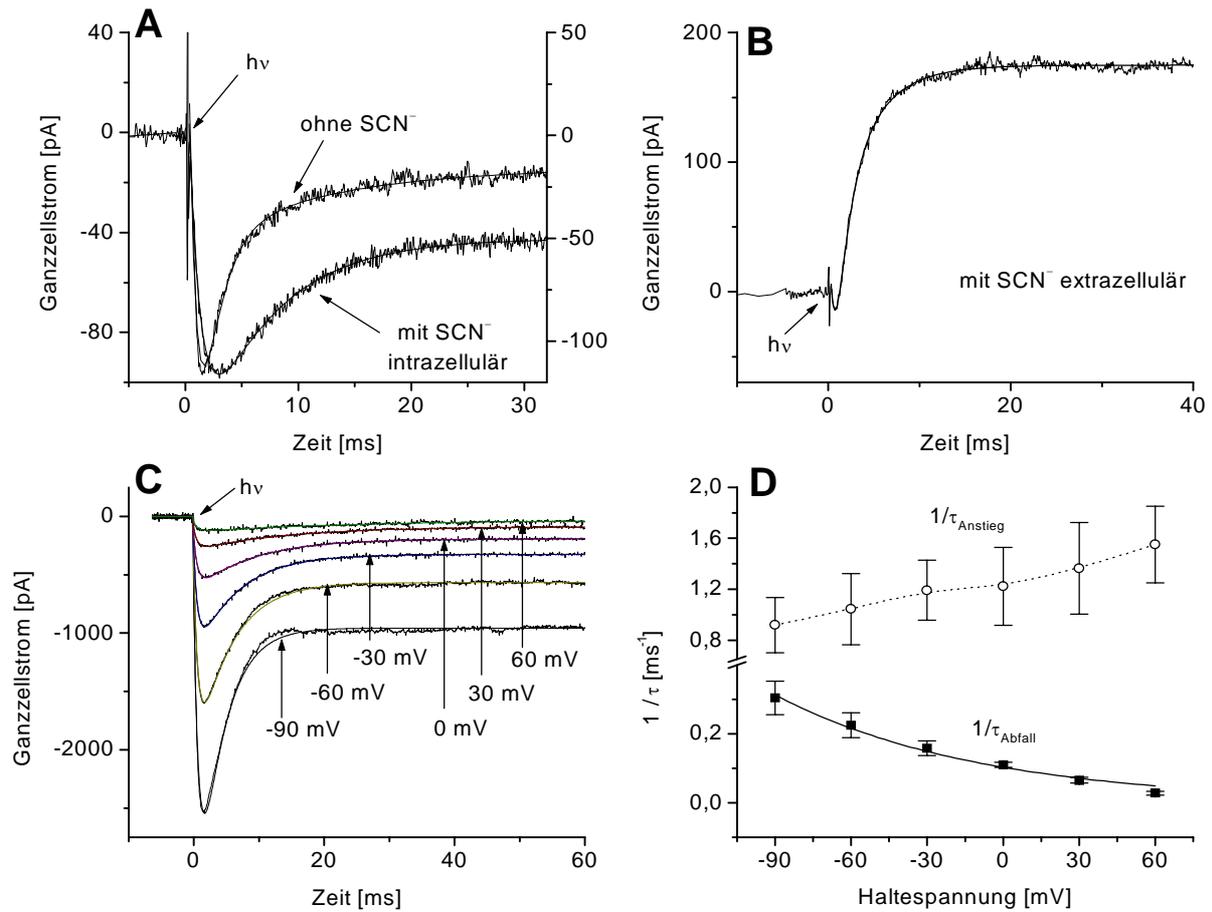


Abb. 3.4: Vorstationäre Messungen an EAAC1 in Abhängigkeit von SCN^- und der Haltespannung. (A) Ganzzelleableitungen zweier $\text{HEK}_{\text{EAAC1}}$ -Zelle in Ab- und Anwesenheit (linke und rechte Achse) von intrazellulärem SCN^- (KCl- oder KSCN-haltigen Pipettenlösung, NaCl-haltigen Badlösung, 0 mV Haltespannung, Leckströme wurden subtrahiert). Parameter: ohne SCN^- τ_{Anstieg} $0,4 \pm 0,1$ ms; τ_{Abfall1} $1,6 \pm 0,2$ ms; τ_{Abfall2} $8,1 \pm 0,6$ ms; 1 mM *caged* Glutamat $\approx 150 \mu\text{M}$ freies Glutamat; mit SCN^- τ_{Anstieg} $0,7 \pm 0,1$ ms; τ_{Abfall} $7,8 \pm 0,1$ ms; 500 μM *caged* Glutamat $\approx 80 \mu\text{M}$ freies Glutamat. (B) Bei einer KCl-haltigen Pipettenlösung und einer NaSCN-haltigen Badlösung (Haltespannung 0 mV, Leckströme wurden subtrahiert) wurde bei der photolytischen Freisetzung von $\approx 40 \mu\text{M}$ Glutamat (500 μM *caged* Glutamat) ein kleiner, einwärts-gerichteter transienter Strom beobachtet ($\tau = 0,3 \pm 0,1$ ms), der in einen Auswärtsstrom überging ($\tau = 2,7 \pm 0,6$ ms). (C) Typische Ganzzelleableitung einer $\text{HEK}_{\text{EAAC1}}$ -Zelle in Anwesenheit von intrazellulärem SCN^- bei unterschiedlichen Haltespannungen und Freisetzung sättigender Glutamatkonzentrationen (1 mM *caged* Glutamat $\approx 200 \mu\text{M}$ freies Glutamat). Parameter: -90 mV τ_{Anstieg} $0,9 \pm 0,1$ ms, τ_{Abfall} $3,3 \pm 0,1$ ms; -60 mV τ_{Anstieg} $0,7 \pm 0,1$ ms, τ_{Abfall} $5,1 \pm 0,1$ ms; -30 mV τ_{Anstieg} $0,6 \pm 0,1$ ms, τ_{Abfall} $6,4 \pm 0,1$ ms; 0 mV τ_{Anstieg} $0,6 \pm 0,1$ ms, τ_{Abfall} $9,0 \pm 0,1$ ms; 30 mV τ_{Anstieg} $0,6 \pm 0,1$ ms, τ_{Abfall} $14,3 \pm 0,2$ ms; 60 mV τ_{Anstieg} $0,5 \pm 0,3$ ms, τ_{Abfall} $27,8 \pm 1,1$ ms. Die Leckströme wurden subtrahiert. (D) Spannungsabhängigkeit der mittleren Geschwindigkeitskonstanten (Mittelwert \pm SD, $n = 5$) für den Anstieg (*offene Kreise*) und den Abfall (*gefüllte Quadrate*) des transienten Stroms. Die durchgezogene Linie bei $1/\tau_{\text{Abfall}}$ entspricht der Anpassung mit den Gleichungen [6A], [10A und B] in Anhang 6.1. mit $\Phi_1 = 20$, $\Phi_2 = 0,5$, $k_d = 2 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $k_{-d} = 1200 \text{ s}^{-1}$, $k_{\text{hin}}^0 = 210 \text{ s}^{-1}$, $k_{\text{rück}}^0 = 40 \text{ s}^{-1}$ und $z \cdot \delta = 0,8$.

3.1.5. Vorstationäre Messungen an EAAC1 in Abhängigkeit von der Haltespannung

Für die oben beschriebenen Messungen betrug die Haltespannung immer 0 mV. Im Folgenden wurde nun der Einfluss des Potentials auf den transienten Glutamat-induzierten Strom untersucht (Abb. 3.4C). Dies geschah in Anwesenheit von intrazellulärem SCN^- , da sonst das Stromsignal bei positiven Haltespannungen aufgrund der geringen Ströme kaum auswertbar war. Bei Freisetzung sättigender Glutamatkonzentrationen führten dabei Haltespannungen von über 0 mV zu einer Verringerung des Spitzenstroms und einer Zunahme der Zeitkonstante für den Signalabfall. Umgekehrte Effekte zeigten sich bei einer Verringerung der Haltespannung. In Abb. 3.4D sind die Geschwindigkeitskonstanten für den Signalanstieg und Signalabfall als Funktion der Haltespannung dargestellt. Während $1/\tau_{\text{Abfall}}$ stark durch die angelegte Haltespannung beeinflusst war und bei negativen Haltespannungen größer wurde (e-fache Zunahme pro ≈ -80 mV), ergab sich für $1/\tau_{\text{Anstieg}}$ nur eine schwache Spannungsabhängigkeit und mit umgekehrtem Vorzeichen. Generell trat jedoch für beide Konstanten im untersuchten Spannungsbereich keine Sättigung auf, noch wurde ein Minimum oder Maximum durchlaufen.

3.1.6. Inhibition durch TBOA

DL-*threo*- β -Benzyloxyaspartat (TBOA) ist ein Substratanalogon von Glutamat, das nicht transportiert wird und daher als kompetitiver Inhibitor von EAAC1 eingesetzt werden konnte. Bei den durchgeführten Experimenten wurde die Wirkung des Inhibitors auf den Glutamat-Einwärtstransport von EAAC1 untersucht.

Neben den bereits erwähnten Funktionsweisen – Anionenleitfähigkeit und Glutamattransport – besitzt EAAC1 eine zusätzliche Leckleitfähigkeit, die Glutamat-unabhängig ist. Dabei ist zu beachten, dass der gesamte Leckstrom der untersuchten HEK-Zellen aus zwei Anteilen besteht. Der eine Anteil resultiert aus der basalen Leitfähigkeit der Zellmembran, während der zweite Anteil durch die Expression von EAAC1 und die damit einhergehende Glutamat-unabhängige Leckleitfähigkeit verursacht wird. Diese EAAC1-getragene Leckleitfähigkeit konnte nur in Anwesenheit von Thiocyanationen und nicht bei Chlorid-haltiger Bad- oder Pipettenlösung detektiert werden. In wie weit unter SCN^- -freien Bedingungen ein elektroneutraler Na^+ - K^+ -Austausch stattfand, kann nicht beurteilt werden. Die Applikation von TBOA führte bei intrazellulärer Anwesenheit von SCN^- zu einem Auswärtsstrom (siehe Abb. 3.5A), der einer Inhibition des stetigen Einwärtsstroms aufgrund der Leckleitfähigkeit (SCN^- -Ausstrom) entspricht. Abhängig von der Konzentration an TBOA führte die zusätz-

liche Applikation von Glutamat zu einem geringeren Stromsignal im Vergleich zu Messungen ohne Inhibitor. Die halbmaximale Inhibition bei 25 μM Glutamat lag bei ca. 5 μM TBOA (Abb. 3.5A und C). Für die Inhibition des Leckstroms ergab sich ein K_i -Wert von 0,6 μM TBOA. Der daraus berechnete Wert für K_i in Anwesenheit von 25 μM Glutamat bei kompetitiver Bindung von TBOA und Glutamat liegt mit dem oben bestimmten K_M -Wert von 6 μM für Glutamat bei 2 μM TBOA .

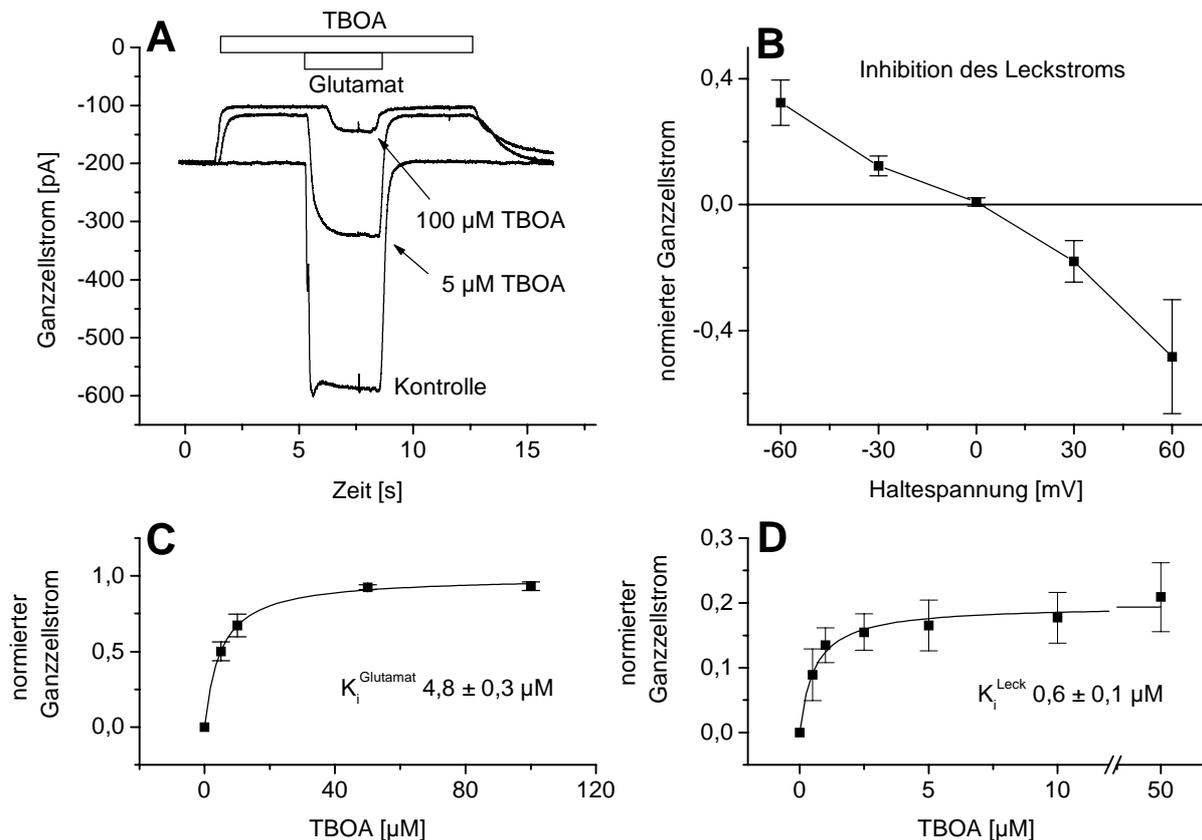


Abb. 3.5: Inhibition durch TBOA. Versuchsbedingungen A-D: KSCN-haltige Pipettenlösung. **(A)** Ganzzellableitung einer HEK_{EAAAC1}-Zelle bei Applikation von 25 μM Glutamat in Abwesenheit (Kontrolle) und Anwesenheit von 5 bzw. 100 μM TBOA (0 mV Haltespannung). **(B)** Strom-Spannungs-Kennlinie des TBOA-induzierten Stroms (5 μM TBOA) aus Ganzzellableitungen bei symmetrischen SCN⁻-Konzentrationen und extrazellulärem Na⁺ (NaSCN-haltige Badlösung, KSCN-haltige Pipettenlösung, Mittelwert \pm SD, n = 3-4). Die Normierung erfolgte auf das Signal bei 125 μM Glutamat. **(C)** Aus Experimenten (Mittelwert \pm SD, n = 3-5) wie in A dargestellt, wurde die apparente Inhibitionskonstante von TBOA in Anwesenheit von 25 μM Glutamat bestimmt. Eine halbmaximale Inhibition des Glutamat-induzierten Stroms wurde mit einer TBOA-Konzentration von $4,8 \pm 0,3 \mu\text{M}$ erreicht. **(D)** Aus Experimenten (Mittelwert \pm SD, n = 4-8) wie in A dargestellt, wurde die apparente Inhibitionskonstante von TBOA für die Inhibition des Leckstroms (in Abwesenheit von Glutamat) bestimmt. Dafür wurde das TBOA-induzierte Stromsignal auf den Glutamat-induzierten Strom bei 125 μM bezogen. Der ermittelte K_i -Wert betrug $0,6 \pm 0,1 \mu\text{M}$ und die maximale Inhibition entsprach ca. 20 % des Glutamat-induzierten Stroms.

Da viele Na^+ -getriebene Transporter über einen Na^+ -getragenen Leckstrom verfügen, stellte sich die Frage, ob der beobachtete Leckstrom von einem Natriumeinstrom oder, wie oben beschrieben, durch einen SCN^- -Ausstrom verursacht wurde. Daher wurden folgende Bedingungen für den in Abb. 3.5B dargestellten Versuch gewählt. Natriumionen waren nur extrazellulär vorhanden, während SCN^- in symmetrischen Konzentrationen vorlag. Die Applikation von TBOA bei einer Haltespannung von 0 mV ergab keine Stromantwort. Bei negativen Spannungen wurde hingegen ein positiver Strom (Inhibition des SCN^- -Ausstrom) beobachtet, während es bei positiven Spannungen ein negativer Strom (Inhibition des SCN^- -Einstrom) war. Zudem ergab sich eine fast linear Strom-Spannungs-Kennlinie, was nur zu erklären ist, wenn für den Leckstrom ein Fluss von SCN^- verantwortlich war.

Unter pathophysiologischen Bedingungen wie Energiemangel oder Sauerstoffunterversorgung kann EAAC1 den Auswärtstransport von Glutamat aus der postsynaptischen Zelle in den synaptischen Spalt katalysieren. Dieser Glutamat-Auswärtstransport wurde an *inside-out patches* von EAAC1-exprimierenden HEK-Zellen untersucht, bei denen die Glutamat-Applikation von der intrazellulären Seite erfolgen konnte. Mit hoher intrazellulärer Natriumkonzentration, ohne extrazelluläres Na^+ , hoher extrazellulärer Kaliumkonzentration und einer K^+ -freien intrazellulären Lösung war der Auswärtstransport von Glutamat quasi irreversibel.

3.1.7. Stationäre Messungen an EAAC1 im *inside-out patch*

In Abb. 3.6A ist ein typisches *inside-out patch*-Experiment dargestellt, bei dem Glutamat in verschiedenen Konzentrationen appliziert wurde. Da ein positives Stromsignal beobachtet wurde, ist der Auswärtstransport ebenfalls elektrogen. Ausserdem enthielt die extrazelluläre Lösung Thiocyanationen, sodass die Glutamat-induzierte Anionenleitfähigkeit einen Strom in die gleiche Richtung generierte. Während beim Glutamat-Einwärtstransport der apparente K_M -Wert ca. 6 μM betrug, wurde eine halbmaximale Aktivierung des Glutamat-Auswärtstransportes erst bei 280 μM Glutamat erreicht (Abb. 3.6C).

Da Anionenleitfähigkeit und Glutamattransport Ströme in die gleiche Richtung erzeugten, ergab sich für die Spannungsabhängigkeit von EAAC1 im Auswärtstransport-Modus (Abb. 3.6B und D) ein positiver Glutamat-induzierter Strom im gesamten Spannungsbereich, der bei negativen Spannungen gegen Null tendierte. In Abb. 3.6D wurde die Strom-Spannungs-Kennlinien des Glutamat-Auswärtstransportes (*geschlossen Quadrate*) mit der entsprechenden Spannungsabhängigkeit des Einwärtstransportes (*offene Kreise*, bzw. *invertiert als*

gepunktete Linie) verglichen, wobei deutlich wurde, dass der Auswärtstransport von Glutamat eine schwächere Abhängigkeit von der Spannung zeigte.

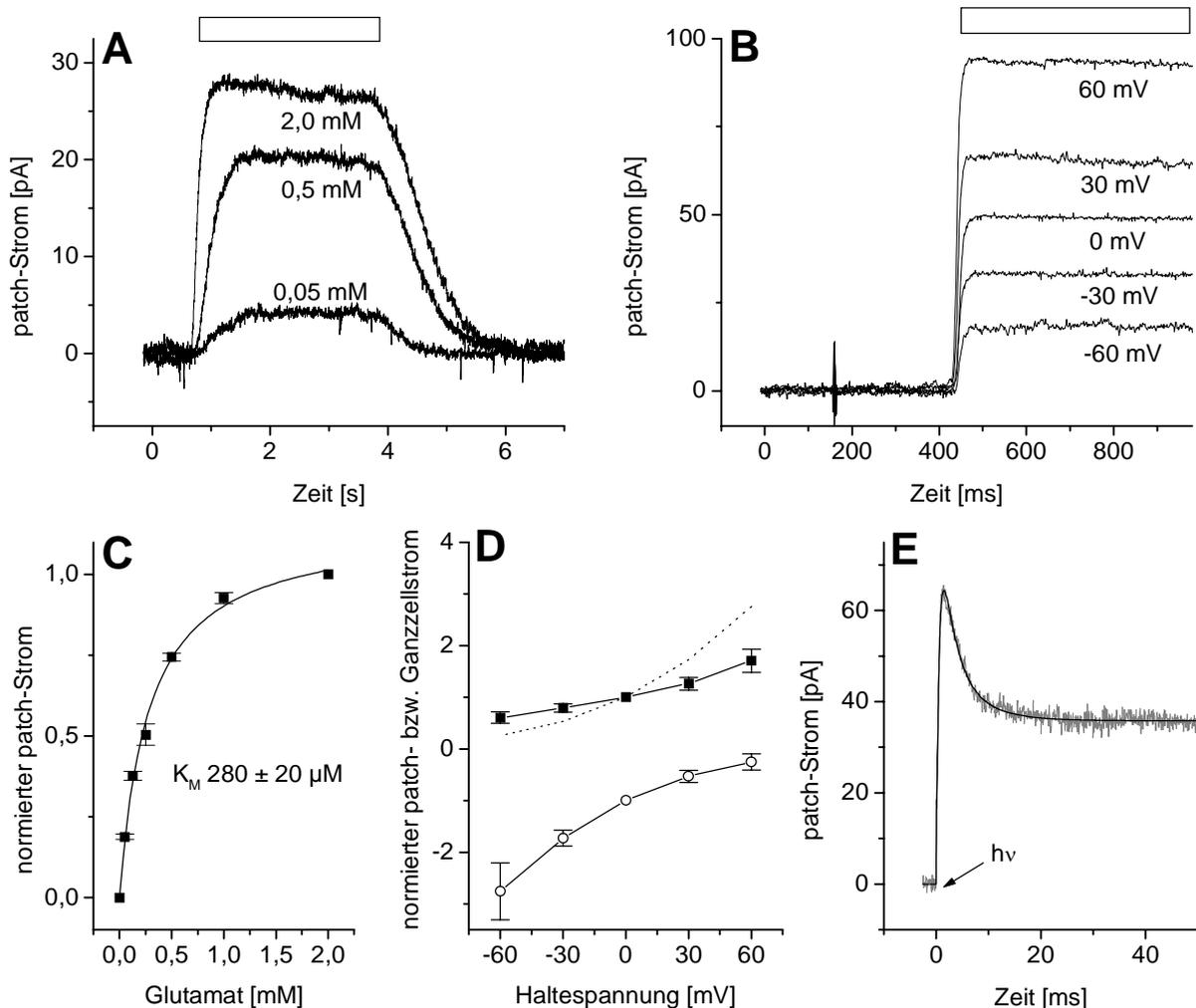


Abb. 3.6: Stationäre und vorstationäre Messungen an EAAC1 im *inside-out patch*. Versuchsbedingungen A-D: KSCN-haltige Pipettenlösung, NaCl-haltige Badlösung. (A) Typische *patch clamp*-Messung eines HEK_{EAAC1}-patches bei 0 mV Haltespannung und unterschiedlichen Glutamatkonzentrationen (0,05, 0,5 und 2,0 mM, Balken). Die Leckströme wurden subtrahiert. (B) Glutamat-induzierter HEK_{EAAC1}-patch-Strom bei Haltespannungen von -60 bis +60 mV. Es wurden Spannungsrampen angelegt und 4 mM Glutamat (Balken) mit Lösungswechsel appliziert. Die Leckströme wurden subtrahiert. (C) Bestimmung der apparenten Affinität für Glutamat von EAAC1 im Auswärtstransport-Modus aus Messungen wie in A dargestellt (Mittelwert \pm SD, $n = 8$). Der ermittelte K_M -Wert betrug $280 \pm 20 \mu\text{M}$. (D) Gemittelte Strom-Spannungs-Kennlinie (Mittelwert \pm SD, $n = 10$) von EAAC1 im Auswärtstransport-Modus aus Messungen wie in B dargestellt (*geschlossene Quadrate*). Zum Vergleich ist die Strom-Spannungs-Kennlinie von EAAC1 im Einwärtstransport-Modus abgebildet (*offene Kreise* und *invertiert als gepunktete Linie*). Die Normierung erfolgte auf den Strom bei 0 mV. (E) Laser-Photolyse-Experimente an einem HEK_{EAAC1}-*inside-out-patch*. Bedingungen und Parameter: 6 mM $\alpha\text{CNB-caged}$ Glutamat \approx 1,8 mM freies Glutamat, KSCN-haltige Pipettenlösung, NaCl-haltige Badlösung, $\tau_{\text{Anstieg}} 0,4 \pm 0,1$ ms, $\tau_{\text{Abfall}} 4,8 \pm 0,1$ ms. Der Leckstrom wurde subtrahiert.

3.1.8. Vorstationäre Messungen an EAAC1 im *inside-out patch*

Mit unendlichen Konzentrationsgradienten für Natrium- und Kaliumionen (Na^+ in hohen Konzentrationen intrazellulär und K^+ in hohen Konzentrationen extrazellulär) konnten alle Transporterproteine in einem Zustand festgehalten werden, in dem die Glutamat-Bindungsstelle der intrazellulären Seite zugewandt war. Bei photolytischer Freisetzung von Glutamat aus *caged* Glutamat war, wie beim Einwärtstransport, ein transientes Stromsignal zu beobachten, das in einen stationären Strom überging (siehe Abb. 3.6E). Die ermittelten Zeitkonstanten für den Signalanstieg lagen bei $\approx 0,5 \pm 0,1$ ms und für den Signalabfall bei $4,4 \pm 1,0$ ms ($n = 2$) und zeigten einen eher biexponentiellen Abfall, der aufgrund der kleinen Amplitude der langsamen Komponente jedoch nicht ausgewertet werden konnte.

3.1.9. Verhältnis zwischen Anionenleitfähigkeit und Glutamattransport bei EAAC1

Der lineare Verlauf der Strom-Spannungs-Kennlinie von EAAC1 beim Glutamat-Einwärtstransport bei symmetrischen SCN^- -Konzentrationen (siehe Abb. 3.2D) deutete darauf hin, dass der Anionenstrom im Vergleich zum Glutamat-Transportstrom sehr viel stärker zum Gesamtstrom beiträgt. Um das Verhältnis beider Komponenten am Stromsignal zu bestimmen, wurde an einer Zelle der Anionenstrom als Differenzstrom zwischen Gesamtstrom und Glutamat-Transportstrom bestimmt. In Abb. 3.7A enthielt die intrazelluläre Lösung keine Thiocyanationen, sodass bei zusätzlicher Abwesenheit von extrazellulärem SCN^- nur der Glutamat-Transportstrom detektiert wurde (*untere Kurve*). Bei Applikation von Glutamat in Anwesenheit von extrazellulärem SCN^- ist das Signal des Glutamattransportes überlagert von dem positiven Stromsignal der einströmenden Anionen. Das ermittelte Verhältnis zwischen Glutamattransport und Glutamat-induzierter Anionenleitfähigkeit lag bei ≈ 1 zu $3,7 \pm 0,7$ (Abb. 3.7B).

Im Gegensatz dazu war bei EAAC1 im Einwärtstransport-Modus (*inside-out patch*) das Verhältnis zwischen Glutamat-Transportstrom und Anionenstrom 1 zu $1,45 \pm 0,1$ und somit zugunsten des Transportstroms verschoben (Abb. 3.7B).

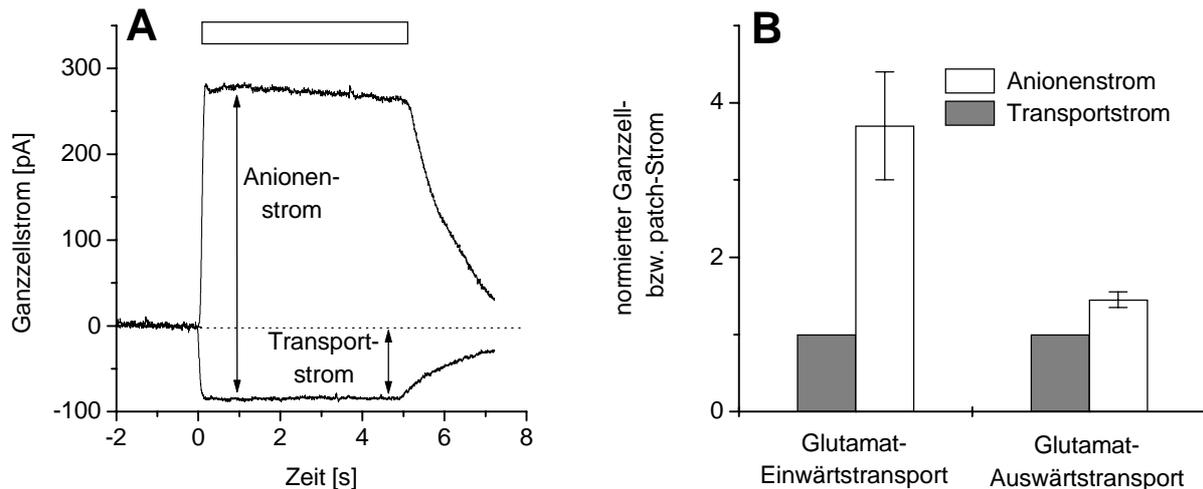


Abb. 3.7: Verhältnis zwischen Anionenleitfähigkeit und Glutamattransport bei EAAC1. Versuchsbedingungen: KCl-haltige Pipettenlösung, NaCl- bzw. NaSCN-haltige Badlösung. **(A)** Ganzzelleitung einer HEK_{EAAC1}-Zelle in An- (*obere Messung*) und Abwesenheit (*untere Messung*) von extrazellulärem SCN⁻ bei Applikation von 125 μ M Glutamat (Balken) und einer Haltespannung von 0 mV. Die Leckströme wurden subtrahiert. **(B)** *linkes Bild*, Mittleres Verhältnis zwischen Anionenstrom und Glutamat-Transportstrom (Mittelwert \pm SD, n = 6) aus Messungen dargestellt in A. *rechtes Bild*, Vergleich zwischen Glutamat-induziertem Anionenstrom und Glutamat-Transportstrom bei EAAC1 im Auswärtstransport-Modus aus Messungen an *inside-out patches* (Versuchsbedingungen wie in A und Applikation von 5 mM Glutamat, Mittelwert \pm SD, n = 4).

3.2. pH-Abhängigkeit des Glutamattransportes bei EAAC1

Der Glutamattransport durch EAAC1 ist gekoppelt an den Kotransport von einem Proton (Zerangue und Kavanaugh, 1996a), womit sich die Frage ergab, ob Glutamat in seiner protonierten Form transportiert wird (Zerangue und Kavanaugh, 1996b). In einem solchen Modell bindet Glutamat zunächst an den Transporter und wird nach einer pK-Änderung protoniert. Dies entspricht einer streng sequentiellen Bindungsreihenfolge von Glutamat und H⁺. Die verschiedenen möglichen Modelle zur Bindungsreihenfolge sind in Punkt 4.3. und im Anhang 6.2. beschrieben und diskutiert. Im Folgenden wird nur auf dasjenige Modell eingegangen, welches alle experimentellen Daten erklärt.

Die Messungen zur pH-Abhängigkeit erfolgten an der intra- sowie extrazellulären Membranseite, d. h. EAAC1 katalysierte den Glutamat-Einwärts- oder Auswärtstransport.

3.2.1. pH-Abhängigkeit der Affinität von EAAC1 für Glutamat im Einwärts- bzw. Auswärtstransport-Modus

Bei einer Haltespannung von 0 mV wurde bei unterschiedlichen pH-Werten Glutamat in verschiedenen Konzentrationen appliziert und so die apparenten K_M -Werte von EAAC1 für Glutamat bestimmt. Mit Hilfe von Ganzzelleitungen an HEK_{EAAC1}-Zellen erfolgte dies für den Glutamat-Einwärtstransport (Abb. 3.8A). Dabei wurde beobachtet, dass sich die Affinität von EAAC1 für Glutamat im pH-Bereich zwischen 6,0 und 8,0 nicht signifikant änderte (siehe Abb. 3.8A, C und Tabelle 3.2). Im Gegensatz dazu stieg der K_M -Wert bei höheren pH-Werten deutlich an, sodass bei pH 10,0 nur noch eine 100fach geringere Affinität von EAAC1 für Glutamat nachzuweisen war.

EAAC1 im Auswärtstransport-Modus zeigte zwischen pH 6,0 und 8,0 qualitativ das gleiche Verhalten und der K_M -Wert stieg von 34 μM (pH 6,0) auf 580 μM (pH 8,0) an. Wurde die Protonenkonzentration auf der intrazellulären Seite jedoch auf pH 4,8 erhöht, nahm die Glutamataffinität wieder dramatisch ab, auf einen K_M -Wert von 820 μM . Bei diesem pH-Wert ist Glutamat (pK 4,4) bereits zu ca. 30 % protoniert, was jedoch nicht diesen starken Affinitätsabfall erklären kann. Um auszuschließen, dass diese Beobachtung auf eine Zunahme der Ionenstärke aufgrund des Succinat-Tris-Puffers zurückzuführen war, wurde bei dem gleichen Puffer der K_M -Wert für Glutamat bei pH 7,4 im Einwärtstransport-Modus bestimmt. Dabei ergab sich kein Unterschied zu dem Wert bestimmt in Anwesenheit eines Tris-MES-Puffers.

Da bei den durchgeführten Messungen neben dem Glutamat-Transportstrom auch die Glutamat-induzierte Anionenleitfähigkeit detektiert wurde, erfolgte bei pH 10,0 eine zusätzliche K_M -Wert-Bestimmung bei symmetrischen Chloridkonzentrationen. Der ermittelte Wert von 580 μM stimmte gut mit dem Wert von 610 μM in der Anwesenheit von SCN^- überein (siehe Tabelle 3.2). Damit ist der Einfluss der Protonenkonzentration auf den K_M -Wert auf eine pH-Abhängigkeit des Glutamattransporters und nicht auf eine Veränderung der Anionenleitfähigkeit zurückzuführen.

In Abb. 3.8C sind die apparenten K_M -Werte als Funktion der Protonenkonzentration dargestellt. Aus der Anpassung der experimentellen Daten mit einem Modell, bei dem die Protonenbindung der Glutamatbindung vorausgeht (siehe Anhang 6.2.) konnte der pK-Wert des Protonenakzeptors abgeschätzt werden. Dieser lag beim Glutamat-Einwärtstransport von EAAC1 bei $\approx 8,0$, während er beim Glutamat-Auswärtstransport zu etwa pK 6,5 verschoben war.

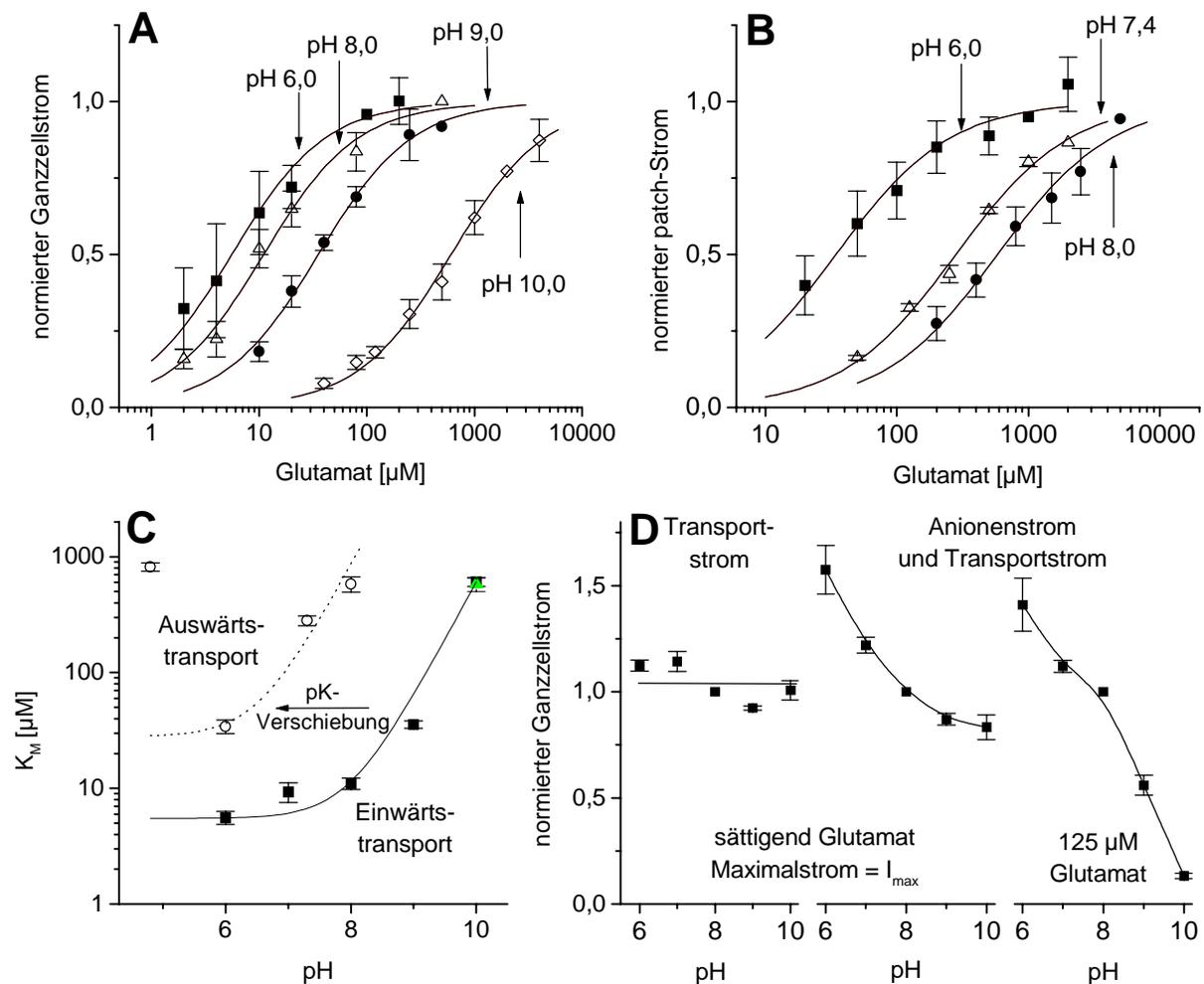


Abb. 3.8: pH-Abhängigkeit der Affinität (K_M) von EAAC1 für Glutamat und des Maximalstroms (I_{\max}). Versuchsbedingungen A-B: KSCN-haltige Pipettenlösung pH 7,4, NaCl-haltige Badlösung /pH (siehe 2.2.7.), 0 mV Haltespannung. (A) Bestimmung der apparenten K_M -Werte für Glutamat von EAAC1 im Einwärtstransport-Modus (HEK_{EAAC1}-Ganzzelleableitung, n = 4-10) bei unterschiedlichen extrazellulären pH-Werten. Parameter: pH 6,0 (geschlossene Quadrate) K_M $5,6 \pm 0,7 \mu\text{M}$, pH 8,0 (offene Dreiecke) K_M $11,0 \pm 1,2 \mu\text{M}$, pH 9,0 (geschlossene Kreise) K_M $35 \pm 3 \mu\text{M}$, pH 10,0 (offene Raute) K_M $610 \pm 50 \mu\text{M}$. Normierung erfolgte auf I_{\max} bei sättigender Glutamatkonzentration. (B) Bestimmung der apparenten K_M -Werte für Glutamat von EAAC1 im Auswärtstransport-Modus (HEK_{EAAC1}-inside-out-patch, n = 4-10) bei verschiedenen intrazellulären pH-Werten. Parameter: pH 6,0 (geschlossene Quadrate) K_M $34 \pm 5 \mu\text{M}$, pH 7,4 (offene Dreiecke) K_M $280 \pm 30 \mu\text{M}$, pH 8,0 (geschlossene Kreise) K_M $580 \pm 90 \mu\text{M}$. Normierung wie in A. (C) Halblogarithmische Darstellung der extrazellulären (geschlossene Quadrate) und intrazellulären (offene Kreise) apparenten K_M -Werte von EAAC1 für Glutamat (siehe Tabelle 3.2). Die Anpassung erfolgte entsprechend dem Modell THS (siehe 6.2.) für den Einwärts- (durchgezogene Linie) und den Auswärtstransport (gepunktete Linie). Parameter: $K^S = 5,5$ bzw. $28 \mu\text{M}$ und $K^H = 1,1 \cdot 10^{-8}$ bzw. $3,0 \cdot 10^{-7} \text{ M}$. (D) Einfluss des pH-Wertes auf den Glutamat-induzierten Strom von EAAC1 im Einwärtstransport-Modus bei 0 mV Haltespannung (Mittelwert \pm SD). (linkes Bild) Chlorid-haltige Pipetten- und Badlösung und sättigende Glutamatkonzentration (10facher K_M , n = 4), (mittleres Bild) KSCN-haltige Pipettenlösung, NaCl-haltige Badlösung und sättigende Glutamatkonzentrationen (10facher K_M , n = 10), (rechtes Bild) Bedingungen wie für mittleres Bild mit Applikation von 125 μM Glutamat bei allen pH-Werten (n = 7-10).

pH	extrazellulärer K_M [μM]	n	intrazellulärer K_M [μM]	n
4,8			820 ± 70	4
6,0	$5,8 \pm 0,7$	6	34 ± 5	10
7,0	$9,4 \pm 1,8$	4		
7,4	$5,9 \pm 1,3$	10	270 ± 30	8
8,0	11 ± 1	9	580 ± 90	8
9,0	36 ± 3	8		
10,0	610 ± 50 580 ± 80 (Transportstrom)	10 5		

Tabelle 3.2:

Apparente K_M -Werte von EAAC1 für Glutamat bei unterschiedlichen pH-Werten (Mittelwert \pm SD).

3.2.2. pH-Abhängigkeit des Glutamat-induzierten Stroms bzw. Maximalstroms

Für den Glutamat-Einwärtstransport bei EAAC1 wurde zunächst in Anwesenheit von Thiocyanationen die pH-Abhängigkeit des Glutamat-induzierten Stroms bei einer konstanten Glutamatkonzentrationen von $125 \mu\text{M}$ ermittelt (siehe Abb. 3.8D *rechtes Bild, Anionenstrom und Transportstrom*). Dabei nahm das Stromsignal mit abnehmender Protonenkonzentration stetig ab und bei pH 10,0 wurde nur noch 1/10tel des Signals im Vergleich zu pH 8,0 detektiert. Sättigende Glutamatkonzentrationen ergaben hingegen bei Anwesenheit von SCN^- einen leichten Anstieg von I_{max} mit Erhöhung der Protonenkonzentration (Abb. 3.8D *mittleres Bild, Summe aus Anionen- und Transportstrom*) (siehe 4.3.5.). Ein qualitativ ähnliches Bild wurde für den Glutamat-Auswärtstransport von EAAC1 gefunden. Im Vergleich zu dem Signal bei pH 8,0 betrug der Glutamat-induzierte Strom bei pH 6,0 $1,27 \pm 0,03$ und bei pH 7,4 $1,13 \pm 0,04$ ($n = 3$). Unter Bedingungen, bei denen nur der Glutamat-Transportstrom detektiert wurde (symmetrische Chloridkonzentrationen, 0 mV Haltespannung), führten sättigende Glutamatkonzentrationen zu einer pH-Unabhängigkeit des Stromsignals (Abb. 3.8D *linkes Bild*). Dieses Ergebnis spricht für eine vorgelagerte Protonenbindung, der die Glutamatbindung folgt (siehe 4.3.).

3.2.3. Einfluss des pH-Wertes auf das transiente Stromsignal von EAAC1

Die stationären Messungen zur pH-Abhängigkeit von EAAC1 ließen sich mit einem sequentiellen Bindungsmodell erklären, bei dem die Protonenbindung vor der Glutamatbindung stattfindet. Mit Hilfe vorstationärer Messungen wurde dieses Modell für EAAC1 im Glutamat-Vorwärtstransport-Modus überprüft.

Ausgehend von einer Konformation, bei der die Glutamat-Bindungsstelle aller Transportermoleküle von der extrazellulären Seite zugänglich ist (hoch Na^+ und K^+ -frei extrazellulär, hoch K^+ und Na^+ -frei intrazellulär), erfolgte die photolytische Freisetzung von sättigenden Glutamatkonzentrationen bei pH-Werten zwischen 6,0 und 9,0. In Abb. 3.9A ist dies beispielhaft an einer $\text{HEK}_{\text{EAAC1}}$ -Zelle dargestellt, bei der durch Anwesenheit von intrazellulären Thiocyanationen zusätzlich zum Glutamat-Transportstrom die Glutamat-induzierte Anionenleitfähigkeit detektiert wurde. Dem entsprechend unterschied sich der stationäre Strom bei den unterschiedlichen pH-Werten (siehe Abb. 3.8D, *mittleres Bild*). Die Zeitkonstanten für den Anstieg und den Abfall des transienten Stromsignals zeigten jedoch keine pH-Abhängigkeit (Mittelwerte siehe Abb. 3.9B), was mit einer vorgelagerten schnellen Protonenbindung übereinstimmt (siehe 4.3.).

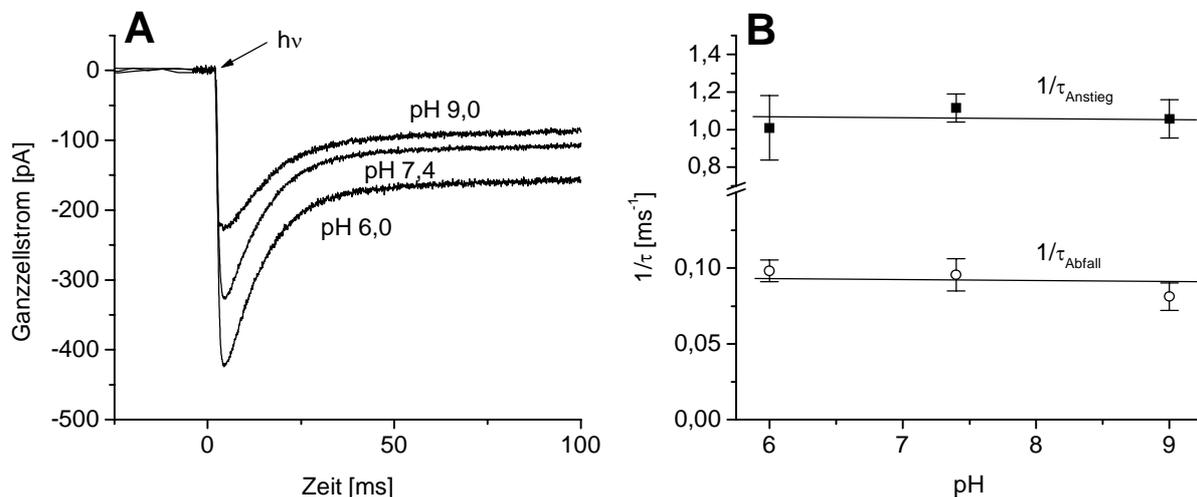


Abb. 3.9: Einfluss des pH-Wertes auf das transiente Stromsignal von EAAC1. Versuchsbedingungen: KSCN-haltige Pipettenlösung pH 7,4, NaCl-haltige Badlösung /pH (siehe 2.2.7.). Haltespannung 0 mV. (A) Laserpuls-Photolyse-Experimente von $\alpha\text{CNB-caged}$ Glutamat an einer EAAC1-exprimierenden HEK-Zelle bei unterschiedlichen extrazellulären Protonenkonzentrationen. Parameter: pH 6,0 und pH 7,4, 1 mM *caged* Glutamat $\approx 125 \mu\text{M}$ freies Glutamat, $\tau_{\text{Anstieg}} 0,8 \pm 0,1$ ms bzw. $0,8 \pm 0,1$ ms, und $\tau_{\text{Abfall}} 10,7 \pm 0,1$ ms bzw. $10,8 \pm 0,1$ ms, pH 9,0, 4 mM *caged* Glutamat $\approx 500 \mu\text{M}$ freies Glutamat, $\tau_{\text{Anstieg}} 0,9 \pm 0,1$ ms, $\tau_{\text{Abfall}} 12,9 \pm 0,1$ ms. Die Leckströme wurden subtrahiert. (B) Mittelwerte (\pm SD, $n = 3$) für $1/\tau_{\text{Anstieg}}$ und $1/\tau_{\text{Abfall}}$ aus Messungen dargestellt in A.

3.2.4. Einfluss des pH-Wertes auf die Strom-Spannungs-Kennlinie von EAAC1

Aus den vorstationären Messungen an EAAC1 ließ sich schließen, dass die Protonbindung schnell erfolgt und nicht geschwindigkeits-bestimmend für den Transportzyklus von EAAC1 ist (siehe 4.3.2.). Im Folgenden wurde daher getestet, in welchem Spannungsbereich diese Aussage gültig ist und ob die H^+ -Bindung spannungsabhängig ist. Bei pH-Werten zwi-

schen 6,0 und 9,0 wurden die Strom-Spannungs-Kennlinien bei jeweils sättigenden Glutamatkonzentrationen für den Glutamat-Transportstrom allein (Abb. 3.10A) bzw. zusammen mit dem Glutamat-induzierten Anionenstrom (Abb. 3.10B) unter stationären Bedingungen bestimmt. Dabei ergab sich kein Einfluss des pH-Wertes auf die Spannungsabhängigkeit der EAAC1-getragenen Ströme beim Glutamat-Einwärtstransport. Für den Glutamat-Auswärtstransport wurde bei pH 6,0 im Vergleich zu pH 7,4 ebenso keine signifikante Beeinflussung der Strom-Spannungs-Kennlinie durch die Protonenkonzentration gefunden ($n = 10-12$).

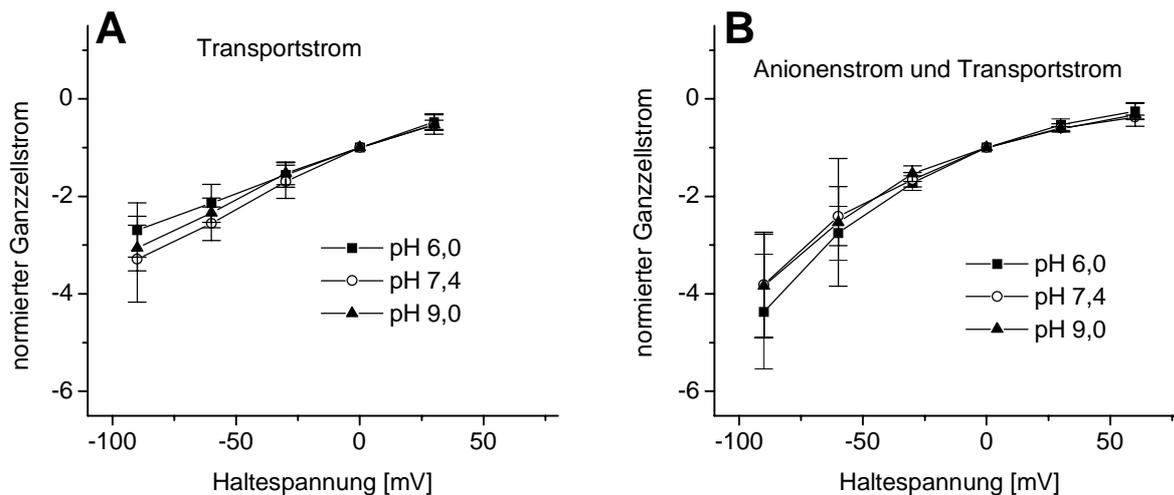


Abb. 3.10: Einfluss des pH-Wertes auf die Strom-Spannungs-Kennlinie von EAAC1. (A) Strom-Spannungs-Kennlinien für EAAC1 im Einwärtstransport-Modus (Mittelwert \pm SD, $n = 3-7$) bei Verwendung einer KCl-haltigen Pipettenlösung pH 7,4 und einer NaCl-haltigen Badlösung mit pH 6,0 (*geschlossene Quadrate*), pH 7,4 (*offene Kreise*) und pH 9,0 (*geschlossene Dreiecke*). Die Versuchsdurchführung erfolgte mit Spannungsrampen und schnellem Lösungswechsel mit jeweils sättigenden Glutamatkonzentrationen (12facher K_M). (B) Bedingungen wie in A nur mit Austausch der Pipettenlösung zu einer Lösung mit SCN^- (Mittelwert \pm SD, $n = 5-7$).

3.2.5. Kinetischer Isotopen-Effekt

Ein Proton-Kotransport ist im Stromsignal äquivalent zu einem Hydroxid-Gegentransport. Daher kann die beobachtete intrazelluläre pH-Verschiebung beim Glutamattransport durch einen H^+ -Kotransport oder einen OH^- -Gegentransport ausgelöst werden. Diese Fragestellung kann durch das Auftreten eines Isotopeneffektes beim Austausch von 1H durch 2D überprüft werden.

Unter stationären Bedingungen reduzierte der Austausch von Protonen gegen Deuterium-Ionen den Glutamat-induzierten Strom um ca. 20 %, wie in Abb. 3.11A dargestellt. In vorstationären zeitaufgelösten Messungen, bei denen Informationen über schnelle Schritte des Transporters nach Glutamat-Applikation zugänglich sind, führte der Isotopen-Austausch zu

einem langsameren Abfall ($\approx 60\%$) des transienten Stromsignals (siehe Abb. 3.11B und C). Der Anstieg des Stroms zeigte jedoch keinen Isotopeneffekt (siehe Abb. 3.11D).

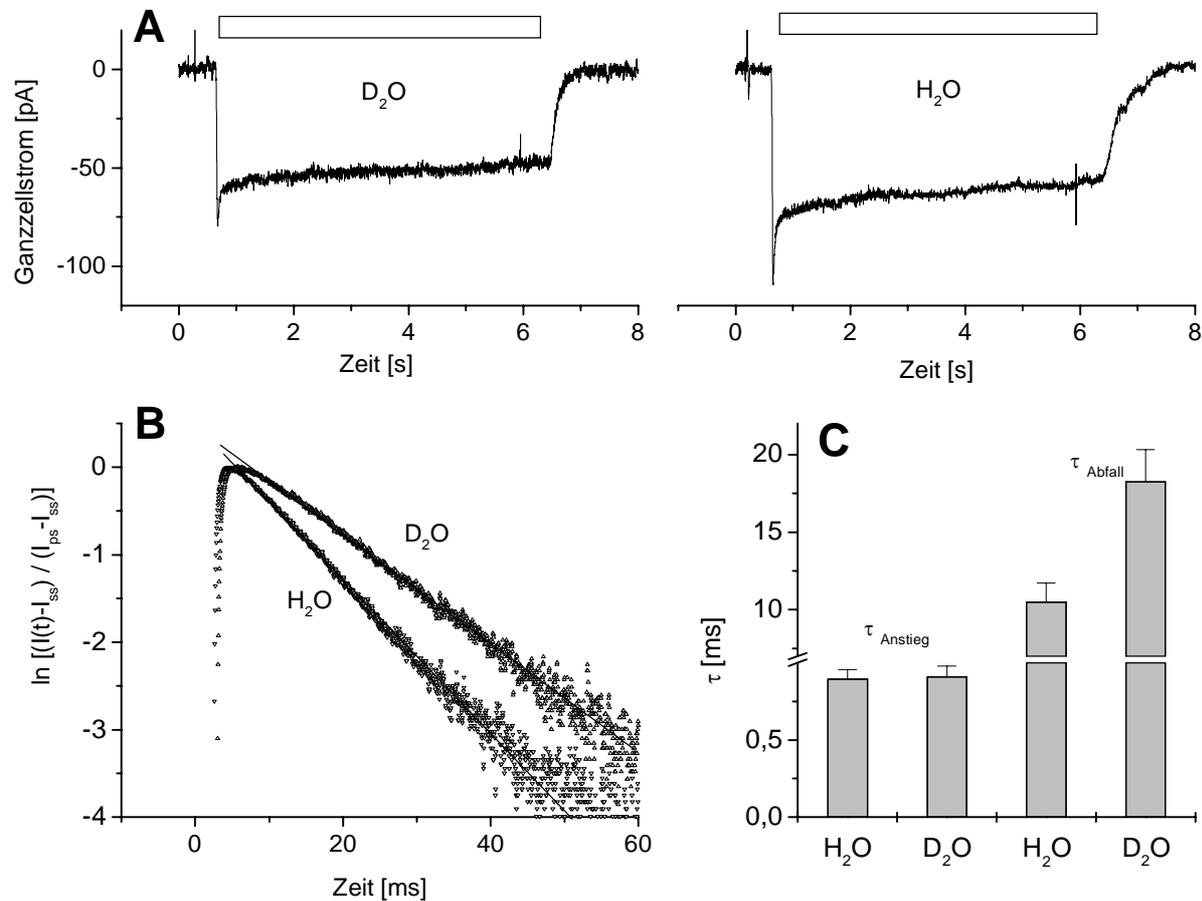


Abb. 3.11: Kinetischer Isotopen-Effekt. Versuchsbedingungen A-C: KSCN-haltige Pipettenlösung, NaCl-haltige Badlösung (H₂O, pH 7,4 oder D₂O, pD 7,7), Haltespannung 0 mV, EAAC1 im Einwärtstransport-Modus. (A) Ganzzelleableitung einer HEK_{EAAC1}-Zelle bei Applikation von 1 mM Glutamat (Balken) in einer D₂O-Badlösung (*linkes Bild*) und zum Vergleich in einer H₂O-Badlösung (*rechtes Bild*). Die Leckströme wurden subtrahiert. (B) Laserpuls-Photolyse-Experimente von *caged* Glutamat an zwei unterschiedlichen HEK_{EAAC1}-Zellen in einer D₂O- oder H₂O-Badlösung. Die Leckströme wurden subtrahiert, der Strom invertiert und der Abfall des Signals durch folgende Formel $\left\{ \ln \left[\frac{(I(t) - I_{\text{stationär}})}{(I_{\text{Spitze}} - I_{\text{stationär}})} \right] \right\}$ linearisiert. Die Zeitkonstante für den Abfall des transienten Stromsignals ergab sich damit aus der Steigung der Kurve. Parameter: H₂O-Badlösung (pH 7,4) 1 mM *caged* Glutamat $\approx 125 \mu\text{M}$ freies Glutamat, $\tau_{\text{Anstieg}} 0,8 \pm 0,1$ ms und $\tau_{\text{Abfall}} 10,8 \pm 0,1$ ms; D₂O-Badlösung (pD 7,7), 1 mM *caged* Glutamat $\approx 125 \mu\text{M}$ freies Glutamat, $\tau_{\text{Anstieg}} 1,0 \pm 0,1$ ms und $\tau_{\text{Abfall}} 16,5 \pm 0,1$ ms. (C) Mittelwerte (\pm SD) für τ_{Anstieg} und τ_{Abfall} von 3 unterschiedlichen Zellen für H₂O zu D₂O $\tau_{\text{Anstieg}} 0,9 \pm 0,06$ ms bzw. $0,9 \pm 0,07$ ms, $\tau_{\text{Abfall}} 10,5 \pm 1,2$ ms bzw. $18,3 \pm 2,0$ ms.

3.3. Einfluss der Na⁺-Konzentration auf EAAC1-assoziierte Ströme

Die Glutamattranslokation durch EAAC1 ist an den Kotransport von drei Natriumionen gekoppelt. Im folgenden Abschnitt wurde die Frage gestellt, in wie weit zum einen die Bindung der Natriumionen und Glutamat an den Transporter geordnet verläuft und zum anderen wie intrazelluläres Na⁺ (und Glutamat) die vorstationäre Kinetik des Transporters beeinflusst. Dafür wurden verschiedene Modelle mit unterschiedlichen Bindungsreihenfolgen in Erwägung gezogen und mit den experimentellen Daten verglichen. Die Entwicklung eines Modells zur Erklärung der Daten wird in der Diskussion (siehe 4.4. und Anhang 6.3.) ausführlich diskutiert, sodass im Folgenden nur die Ergebnisse zur Na⁺-Konzentrationsabhängigkeit von EAAC1 versehen mit den entsprechenden Kurvenanpassungen dargestellt sind.

Die Bestimmung der Bindungsreihenfolge von Na⁺ und Glutamat erfolgte für ihre Bindungsstellen auf der extrazellulären Seite von EAAC1 und wurde mit Hilfe von Ganzzellableitungen durchgeführt. Die intrazelluläre Lösung war frei von Natriumionen und enthielt hohe Konzentrationen an K⁺. Damit war sowohl die Kalium-induzierte Relokation des Transporters als auch die Na⁺-induzierte Translokation quasi irreversibel und EAAC1 katalysierte die Glutamataufnahme in die Zelle. Auf der extrazellulären Seite wurde Na⁺ in verschiedenen Konzentrationen angeboten, wobei ein Teil der Natriumionen durch das nicht-bindende Kation Cholin⁺ ersetzt wurde.

3.3.1. Na⁺-Konzentrationsabhängigkeit der Affinität von EAAC1 für Glutamat

Bei verschiedenen extrazellulären Natriumkonzentrationen wurde Glutamat in unterschiedlichen Konzentrationen appliziert und der apparente K_M -Wert für Glutamat bestimmt (siehe Abb. 3.12A und Tabelle 3.3). Dabei ging eine Verringerung der Na⁺-Konzentration mit einer Abnahme der Affinität von EAAC1 für Glutamat einher. Die gefundene Na⁺-Konzentrationsabhängigkeit der ermittelten K_M -Werte (Abb. 3.12C) stimmt mit Modellen überein, bei denen Natriumbindungsreaktionen sowohl vor als auch nach der Glutamatbindung erfolgen.

Na ⁺ [mM]	140,0	85,5	49,3	31,1	22,0	17,5	15,3	10,0	5,0
K_M [μM]	7,2 ± 1,3	9,8 ± 0,4	19 ± 1	30 ± 3	51 ± 4	69 ± 8	109 ± 9	120 ± 4	375 ± 50
n	9	4	4	3	6	7	4	5	3

Tabelle 3.3:

Apparente K_M -Werte von EAAC1 für Glutamat in Abhängigkeit von der extrazellulären Na⁺-Konzentration (Mittelwert ± SD).

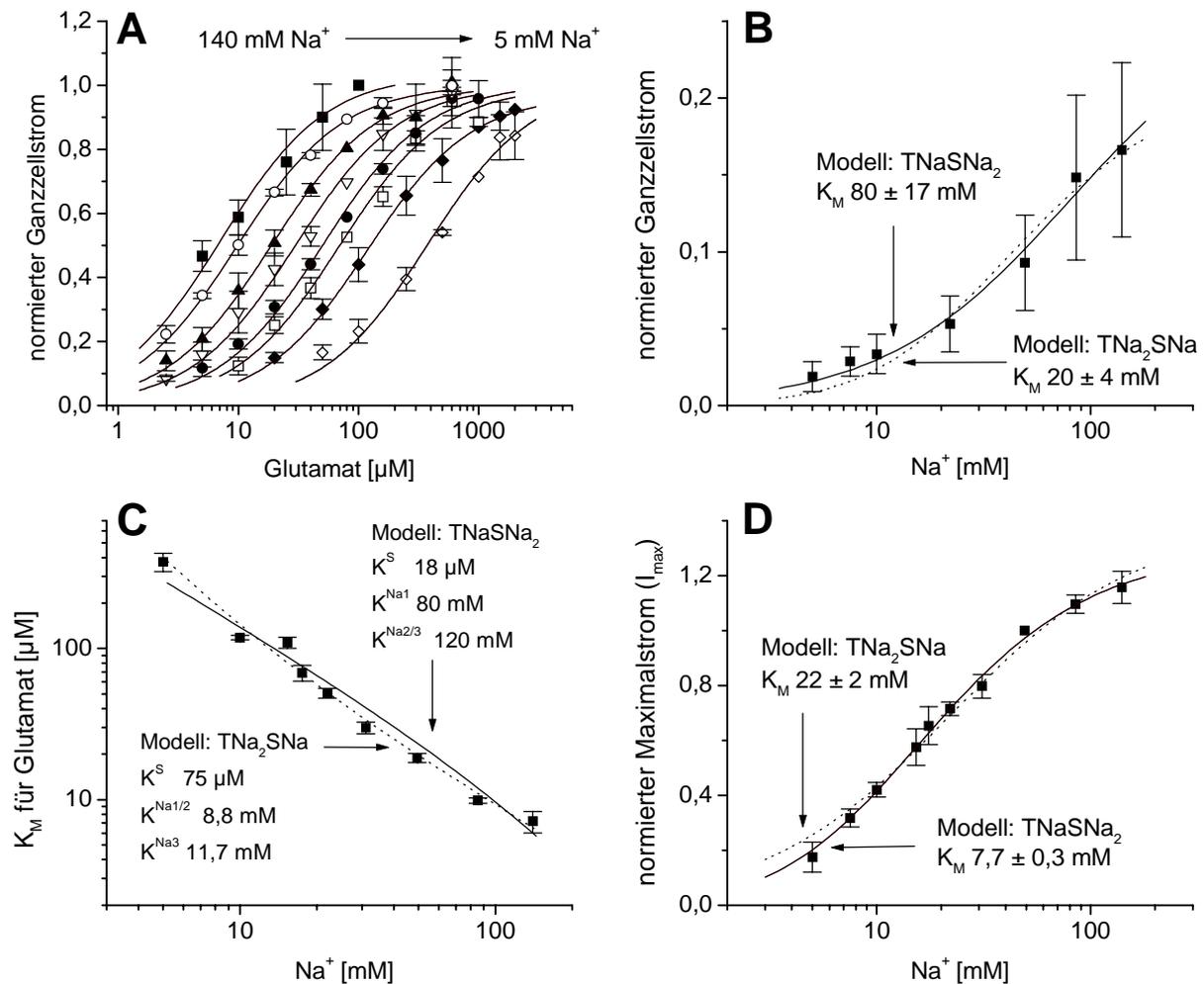


Abb. 3.12: Na⁺-Konzentrationsabhängigkeit der Affinität (K_M) für Glutamat, der Leckleitfähigkeit und des Maximalstroms (I_{max}) von EAAC1. Versuchsbedingungen A-D: KSCN-haltige Pipettenlösung und NaCl-haltige Badlösung /Na (siehe 2.2.7.), Haltespannung 0 mV. (A) Bestimmung der apparenten K_M -Werte für Glutamat bei unterschiedlichen Natriumkonzentrationen (n = 3-9). Die Normierung erfolgte auf den Maximalstrom. Parameter: 140 mM Na⁺ (geschlossene Quadrate) $K_M 7,2 \pm 1,2$ μM; 85,5 mM Na⁺ (offene Kreise) $K_M 9,8 \pm 0,4$ μM; 49,3 mM Na⁺ (geschlossene Dreiecke) $K_M 18,8 \pm 1,3$ μM; 31,1 mM Na⁺ (offene Dreiecke) $K_M 30 \pm 3$ μM; 22,0 mM Na⁺ (geschlossene Kreise) $K_M 50 \pm 4$ μM; 17,5 mM Na⁺ (offene Quadrate) $K_M 70 \pm 8$ μM; 10,0 mM Na⁺ (geschlossene Raute) $K_M 120 \pm 4$ μM und 5,0 mM Na⁺ (offene Raute) $K_M 375 \pm 50$ μM. (B) Bestimmung des apparenten K_M -Wertes für Na⁺ in Abwesenheit von Glutamat durch Inhibition der Na⁺-abhängigen Leckleitfähigkeit mit TBOA in Konzentrationen von 6 μM (140 mM Na⁺) bis 280 μM (5 mM Na⁺) (Mittelwert ± SD, n = 3). Die Normierung erfolgt auf das Signal bei 1 mM Glutamat. Die durchgehende Linie entspricht dem Modell TNaSNa₂ (Hillgleichung, Hillkoeffizienten = 1), während die gepunktete Linie das Modell TNa₂SNa (Hillgleichung, Hillkoeffizienten = 2) darstellt. (C) Doppeltlogarithmische Darstellung der ermittelten K_M -Werte für Glutamat in Abhängigkeit von der Na⁺-Konzentration (siehe Tabelle 3.3). Symbolik wie in B (Formeln siehe 6.3.). (D) Na⁺-Konzentrationsabhängigkeit des Maximalstroms bei sättigenden Glutamatkonzentrationen (10facher K_M) normiert auf das Signal bei 85,6 mM Na⁺ (Mittelwert ± SD, n = 4). Die Symbolik entspricht der in B (Formeln siehe 6.3.).

3.3.2. Abhängigkeit des Glutamat-unabhängigen Leckstroms bei EAAC1 von der Natriumkonzentration

EAAC1 verfügt über einen Glutamat-unabhängigen Leckstrom, der von Anionen getragen wird und nicht von Natriumionen (siehe 3.1.6.). Dieser Leckstrom von EAAC1 konnte durch die Applikation des Inhibitors TBOA bestimmt werden und nahm, wie in Abb. 3.12B dargestellt, mit Verringerung der extrazellulären Na^+ -Konzentration ab. Daher konnte der K_M -Wert für diese Natriumbindungsreaktion(en) in der Abwesenheit von Glutamat bestimmt werden, wobei immer sättigende Konzentrationen an TBOA eingesetzt wurden. Der apparente K_M -Wert lag (unter der Annahme, dass zwei Na^+ binden) bei 20 mM (Modell TNaSNa_2 , siehe Diskussion 4.4.). Wenn die Leckleitfähigkeit durch die Bindung von nur einem Natriumion induziert würde (Modell TNa_2SNa), ergäbe sich ein K_M -Wert von 80 mM.

3.3.3. Na^+ -Konzentrationsabhängigkeit des Maximalstroms von EAAC1

Der Maximalstrom von EAAC1 bei den verschiedenen Natriumkonzentrationen wurde durch Einsatz jeweils sättigender Glutamatkonzentrationen erreicht. Wie jedoch in Abb. 3.12D zu sehen ist, nahm der Glutamat-induzierte Maximalstrom mit Verringerung der Na^+ -Konzentration ab. Dieses Verhalten lässt sich mit der Bindung von ein oder zwei Na^+ nach der Glutamatbindung erklären. Für die Affinität von EAAC1 ergaben sich damit apparente K_M -Werte von ca. 22 mM im Falle einer Natriumbindung und ca. 8 mM wenn zwei Natriumbindungsreaktionen nach der Glutamatbindung auftreten. Wenn alle Natriumionen vor Glutamat binden, wäre der Maximalstrom unabhängig von der Na^+ -Konzentration (siehe 4.4.).

3.3.4. Einfluss der extrazellulären Natriumkonzentration auf den vorstationären Strom von EAAC1

Ähnlich wie bei der pH-Abhängigkeit von EAAC1 (siehe 3.2.3) wurden durch Laserpuls-Photolyse versucht, sättigende Konzentrationen an Glutamat freizusetzen und der Einfluss der Na^+ -Konzentration auf den transienten Strom zu bestimmen (siehe Abb. 3.13A). Dabei verschob die Verringerung der extrazellulären Natriumkonzentration das Verhältnis zwischen Spitzenstrom und stationärem Strom zugunsten des stationären Anteils (Abb. 3.13C) und die Zeitkonstante für den Abfall des transienten Signals nahm mit niedrigen Na^+ -Konzentrationen zu (Abb. 3.13B). Im Gegensatz dazu ist die Anstiegszeit Na^+ -unabhängig (Abb. 3.13B *oben*). Aus der Na^+ -Konzentrationsabhängigkeit von $1/\tau_{\text{Abfall}}$ konnten nach den Formeln dargestellt in Anhang 6.3. die Geschwindigkeitskonstanten für die Glutamattranslokation (k_{hin}) und die Kalium-induzierte Relokation ($k_{\text{rück}}$) des Transporters abgeschätzt werden. Sie lagen im Be-

reich von $\approx 145 \text{ s}^{-1}$ für k_{hin} und $\approx 20 \text{ ms}^{-1}$ für $k_{\text{rück}}$ und stimmen damit qualitativ mit den Werten aus der Glutamat-Konzentrationsabhängigkeit (siehe 3.1.3.) überein.

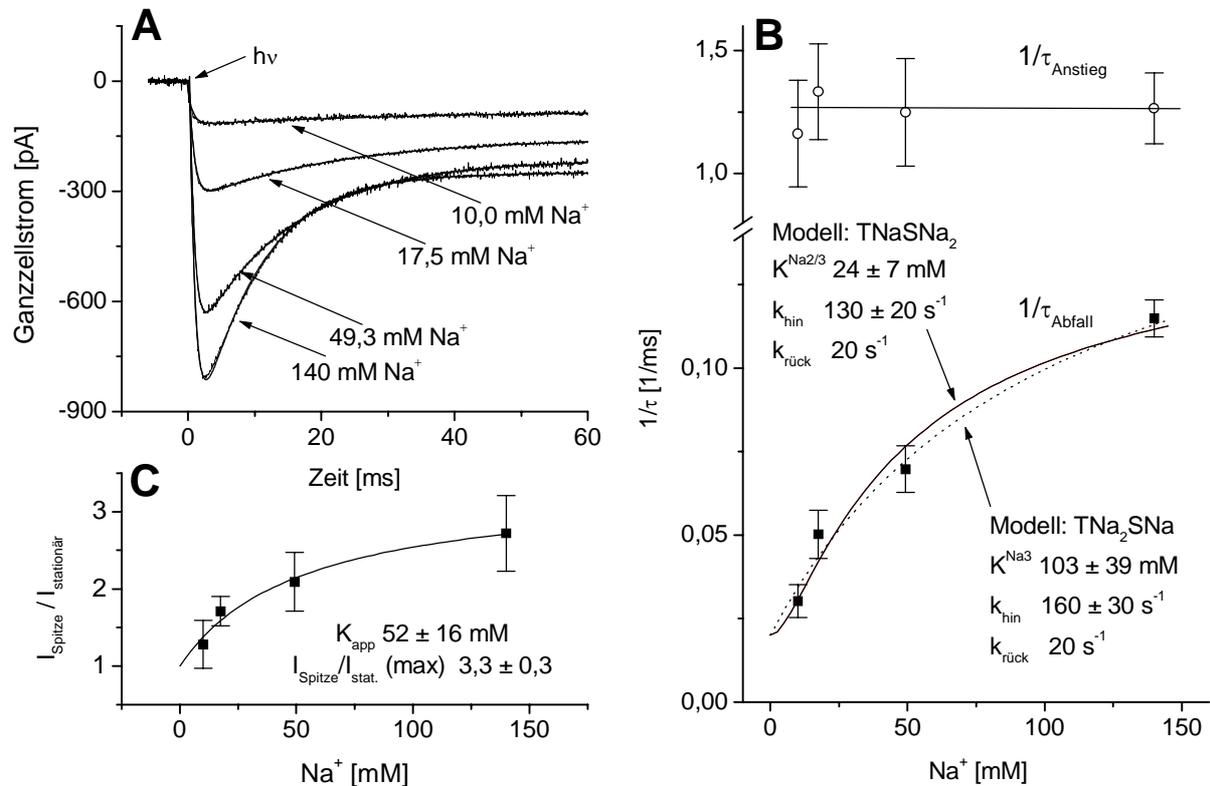


Abb. 3.13: Einfluss der extrazellulären Natriumkonzentration auf den vorstationären Strom von EAAC1.

Versuchsbedingungen A-C: KSCN-haltige Pipettenlösung, NaCl-haltige Badlösung /Na (siehe 2.2.7.), 0 mV Haltespannung. (A) Ganzzelleitungen von zwei HEK_{EAAC1}-Zellen bei unterschiedlichen Na⁺-Konzentrationen (140, 49,3, 17,5 und 10,0 mM) nach photolytischer Freisetzung von Glutamat aus α CNB-caged Glutamat. Parameter: 140 mM Na⁺ \approx 150 μ M freies Glutamat (1 mM caged Glutamat) $\tau_{\text{Anstieg}} 0,9 \pm 0,1 \text{ ms}$ und $\tau_{\text{Abfall}} 9,5 \pm 0,1 \text{ ms}$; 49,3 mM Na⁺ \approx 400 μ M freies Glutamat (2 mM caged Glutamat) $\tau_{\text{Anstieg}} 0,7 \pm 0,1 \text{ ms}$ und $\tau_{\text{Abfall}} 14,4 \pm 0,1 \text{ ms}$; 17,5 mM Na⁺ \approx 800 μ M freies Glutamat (4 mM caged Glutamat) $\tau_{\text{Anstieg}} 0,8 \pm 0,1 \text{ ms}$ und $\tau_{\text{Abfall}} 21,1 \pm 0,1 \text{ ms}$; 10,0 mM Na⁺ \approx 1 mM freies Glutamat (4 mM caged Glutamat) $\tau_{\text{Abfall}} 0,9 \pm 0,1 \text{ ms}$ und $\tau_{\text{Anstieg}} 34,6 \pm 0,9 \text{ ms}$. Der stationäre Strom wurde normiert entsprechend der Na⁺-Konzentrationsabhängigkeit des Maximalstroms (Abb. 3.12D). Die Leckströme wurden subtrahiert. (B) Mittelwerte (\pm SD, n = 3-4) der Geschwindigkeitskonstanten $1/\tau_{\text{Anstieg}}$ (offene Kreise) und $1/\tau_{\text{Abfall}}$ (geschlossenen Quadrate) aus Messungen dargestellt in A. Die durchgezogene Linie entspricht einem Bindungsordnungsmodell, bei dem der Glutamatbindung eine Na⁺-Bindung vorausgeht, während es bei der gepunkteten Linie zwei vorgelagerte Natriumbindungsschritte sind (siehe Anhang 6.3.). (C) Das Verhältnis zwischen Spitzenstrom und stationärem Strom (Mittelwert \pm SD, n = 3-4) vergößerte sich mit zunehmender extrazellulärer Natriumkonzentration von $1,4 \pm 0,1$ bei 10,0 mM Na⁺ zu $2,7 \pm 0,5$ bei 140 mM Na⁺. Die Anpassung der Daten erfolgte mit einer modifizierten Hillgleichung ($I = (I_{\text{max}} - 1) \cdot [\text{Glutamat}] / (K_M + [\text{Glutamat}])$, Hillkoeffizient = 1).

Des weiteren ließen sich aus der Na⁺-Konzentrationsabhängigkeit von $1/\tau_{\text{Abfall}}$ die Dissoziationskonstanten für Natriumbindungsreaktionen abschätzen. Die Affinität des Transporters für Natriumionen, die nach Glutamat binden, lag bei einem apparenten K_D -Werten von

≈ 25 mM für den Fall, das es zwei Natriumbindungsreaktionen sind und bei ≈ 100 mM, wenn ein Natriumion nach Glutamat bindet.

3.3.5. Einfluss der intrazellulären Natriumkonzentration auf den vorstationären Strom von EAAC1

In Abwesenheit von intrazellulären Kaliumionen und statt dessen Anwesenheit von Na^+ und Glutamat katalysiert EAAC1 den Austausch von intra- und extrazellulärem Glutamat (sog. *Homoexchange*). Aufgrund der Glutamat-induzierten Anionenleitfähigkeit wird dabei in Anwesenheit von SCN^- ein stationäres Stromsignal beobachtet (siehe 1.2.4.). Daher stellte sich die Frage, in wie weit die Abwesenheit von intrazellulären Kaliumionen die beobachteten Zeitkonstanten des transienten Stromsignals beeinflusst.

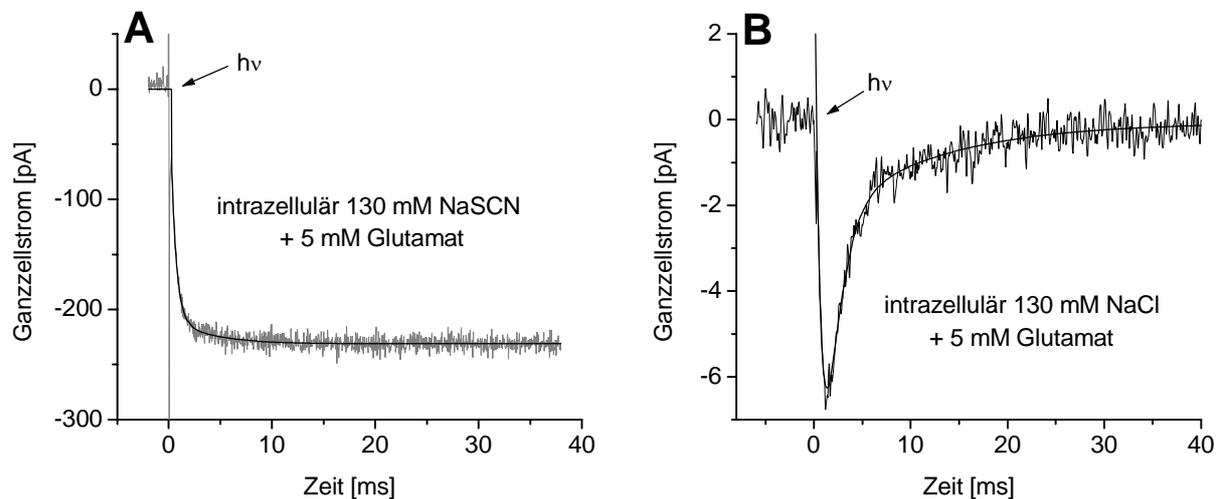


Abb. 3.14: Einfluss der intrazellulären Na^+ -Konzentration auf den vorstationären Strom von EAAC1. (A) Laserpuls-Photolyse-Experiment an einer $\text{HEK}_{\text{EAAC1}}$ -Zelle mit einer NaSCN -haltigen Pipettenlösung, die zusätzlich 5 mM Glutamat und kein K^+ enthielt und einer NaCl -haltigen Badlösung (140 mM Na^+). Parameter: ≈ 150 μM freies Glutamat (1 mM *caged* Glutamat) τ_{Anstieg1} $0,8 \pm 0,1$ ms und τ_{Anstieg2} $7,5 \pm 0,0$ ms. Die Haltespannung betrug 0 mV. Die Leckströme wurden subtrahiert. Der anfängliche schnelle Spitzenstrom in positive und negative Richtung ist ein Artefakt des Lichtpulses und wurde auch ohne *caged* Glutamat beobachtet. (B) Experiment wie in A nach Austausch des intrazellulären SCN^- zu Cl^- . Parameter: ≈ 100 μM freies Glutamat (1 mM *caged* Glutamat) τ_{Anstieg} $0,7 \pm 0,1$ ms, τ_{Abfall1} $1,2 \pm 0,2$ ms und τ_{Abfall2} $12,0 \pm 0,5$ ms.

Die photolytische Freisetzung von extrazellulärem Glutamat in sättigender Konzentration dargestellt in Abb. 3.14A führte zu einem Stromsignal, das sich nicht in den Zeitkonstanten aber dem Vorzeichen seiner Amplituden von dem Signal beim Glutamat-Einwärts-transport (siehe 3.1.3. und 3.2.3.) unterschied. Findet der vollständige Glutamat-Transportzyklus statt fällt das transiente Stromsignal auf seinen stationären Anteil ab, da andere, nicht-anionenleitfähige Zustände bevölkert werden. Im *Homoexchange*-Modus hingegen kann nach

der Glutamattranslokation die Aktivierung der Anionenleitfähigkeit von der intrazellulären Seite erfolgen, sodass eine weitere Stromzunahme beobachtet wird.

Im Gegensatz dazu wird in Abwesenheit von Thiocyanationen nur ein transientes Stromsignal beobachtet, das wie beim normalen Glutamat-Transportstrom (siehe 3.1.4.) biexponentiell abfällt (siehe Abb. 3.14B). Die Zeitkonstanten τ_{Abfall1} mit $1,2 \pm 0,2$ ms und τ_{Abfall2} mit $12,0 \pm 0,5$ ms liegen damit im ähnlichen Zeitbereich, wie die beiden Anstiegszeiten in Anwesenheit von SCN^- . Ein stationärer Strom kann aufgrund des elektroneutralen *Homoexchanges* von intra- und extrazellulärem Glutamat nicht beobachtet werden.

3.3.6. Transiente Ströme bei EAAC1 nach Spannungssprüngen

Bei EAAC1 gehen der Glutamatbindung ein oder zwei Natriumbindungsreaktionen voraus. Befinden sich diese Natriumbindungsstellen im elektrischen Feld der Membran, ist die Bindung elektrogen und durch Veränderung der Haltespannung kann das Gleichgewicht zwischen Na^+ -beladenen und Na^+ -freien Transporter verschoben werden (Loo et al., 1993; Wadiche et al., 1995b). Bei Spannungssprüngen ergeben sich dann transiente Ströme aufgrund solcher Natriumionenbewegungen. Solche kapazitiven Ströme werden allerdings auch durch das Umladen der Membran bei Änderungen der Haltespannung verursacht. Daher muss der Anteil der Membrankapazität am transienten Stromsignal ermittelt und subtrahiert werden. Dies kann nicht durch Differenzbildung nach Entfernen des extrazellulären Na^+ erfolgen, da sich dabei EAAC1-unspezifische Na^+ -Leitfähigkeiten der Zellmembran stark ändern.

In Abb. 3.15A wurden daher Spannungssprung-Experimente in der An- und Abwesenheit von TBOA durchgeführt. TBOA bindet und stabilisiert damit den Na^+ -beladenen Zustand des Transporters, was zu einer Inhibition der transienten Ladungsbewegung bei der Natriumbindungsreaktion führt. Damit kann die Eigenkapazität der Zelle bestimmt werden. Nach Differenzbildung zeigte sich immer noch ein transientes Stromsignal, was eine elektrogene Na^+ -Bindung anzeigt. Die Differenz der Messungen vor und nach der TBOA-Applikation ergaben keinen Unterschied, d. h. die Leitfähigkeit der Zelle hat sich während dem Experiment nicht geändert. Die ermittelten Zeitkonstanten für den Abfall des transienten Stroms war spannungsunabhängig und mit ca. 0,2 ms sehr schnell bzw. im Rahmen der Zeitauflösung des Spannungsklemme-Experimentes. Die Ladungsverschiebung beim Sprung auf die neue Haltespannung und wieder zurück war im Rahmen der Messgenauigkeit identisch, was ein typisches Kriterium für kapazitive Ströme ist (Abb. 3.15B).

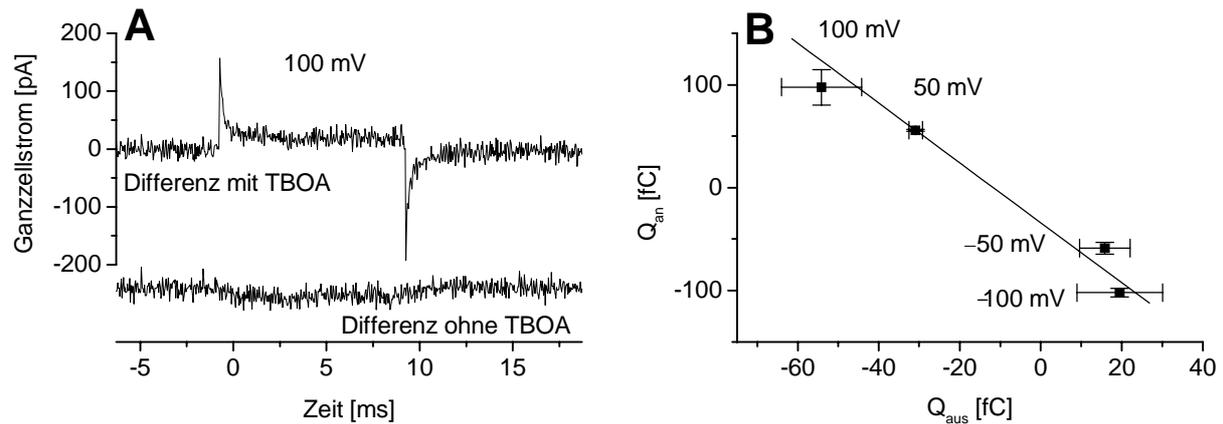


Abb. 3.15: Transiente Ströme bei EAAC1 nach Spannungssprüngen. Versuchsbedingungen: KCl-haltige Pipettenlösung, NaCl-haltige Badlösung /Na (siehe 2.2.7.). (A) TBOA-inhibierbare vorstationäre Ströme in der Anwesenheit von 140 mM extrazellulärem Na^+ . (*obere Messung*) Differenzmessung zwischen 100 mV Spannungssprüngen von Ganzzelleitungen einer $\text{HEK}_{\text{EAAC1}}$ -Zelle in Ab- und Anwesenheit von TBOA (6 μM). Die Zeitkonstante für den Stromsignalabfall beim Sprung von 0 auf 100 mV betrug $0,15 \pm 0,02$ ms und beim Rücksprung $0,17 \pm 0,02$ ms. (*untere Messung*) Kontrollmessung, Differenz zwischen dem Spannungssprung vor und nach der TBOA-Applikation. (B) Gemittelte Werte (\pm SD aus drei Messungen) der verschobenen Ladung (Integration des Stromsignals über 2 ms) während des Spannungssprungs von 0 mV nach 100, 50, -50 oder -100 mV. Ein ähnliches Ergebnis wurde bei einer weiteren Zelle beobachtet.

3.4. Andere Substrate von EAAC1 und Funktion von mutanten EAAC1

3.4.1. Serinsulfat und Phosphoserin als Substrate von EAAC1

Aus der Literatur ist bekannt, dass Glutamattransporter neben L-Glutamat auch andere Substrate wie zum Beispiel DL-Aspartat transportieren. Daher wurden für EAAC1 im Einwärts-transport-Modus andere Substrate getestet, die sich im pK-Wert stark von Glutamat unterscheiden.

In Abb. 3.16A wurden vergleichende Messungen mit 1 mM Glutamat bzw. Serinsulfat durchgeführt. Trotz des niedrigen pK-Wertes von L-Serin-O-sulfat (< 0), trat ein Einwärtsstrom auf. Der beobachtete Unterschied in der Signalamplitude könnte entweder auf nicht-sättigende Konzentrationen an Serinsulfat hindeuten, oder auf eine Verringerung der Transportrate oder auf eine geringere Anionenleitfähigkeit. Ebenso wie bei Serinsulfat konnte auch mit O-Phospho-L-serin ein stationäres Stromsignal bei EAAC1 beobachtet werden. Phosphoserin hat einen pK-Wert von 5,9 und kann damit in dem für HEK-Zellen experimentell zugänglichen pH-Bereich (pH 6 bis 10) titriert werden. Die Affinität von EAAC1 für Phospho-

serin war jedoch mit einem apparenten K_M -Wert von 5,8 mM sehr gering (Abb. 3.16B), so dass keine weiteren Versuche zum Verhalten des Transporters gegenüber protonierten und deprotonierten Substraten unternommen wurden.

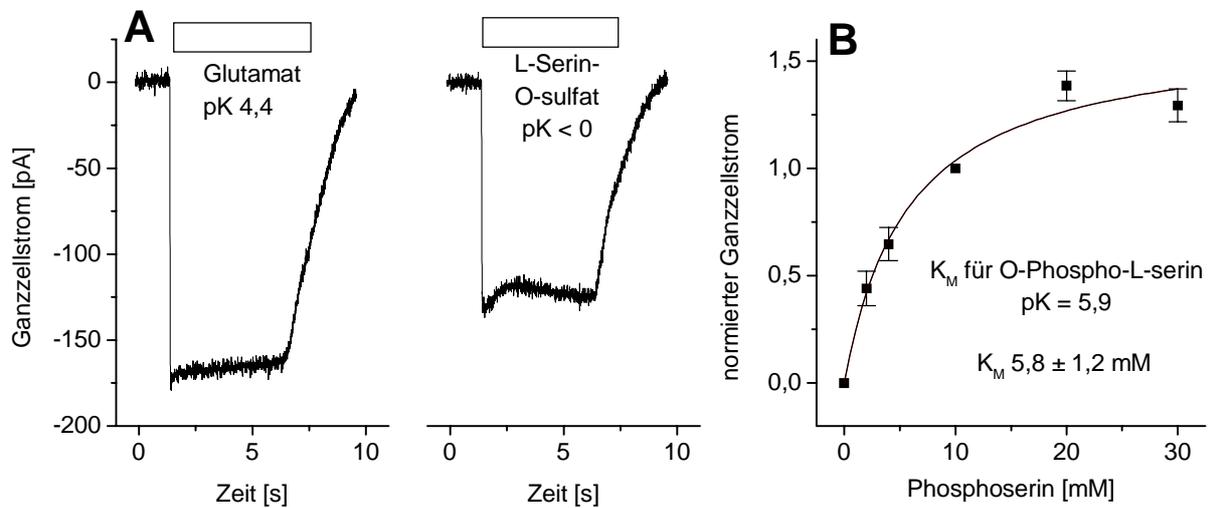


Abb. 3.16: Serinsulfat und Phosphoserin als Substrate von EAAC1. Versuchsbedingungen A und B: KSCN-haltige Pipettenlösung, NaCl-haltige Badlösung, Haltespannung 0 mV. (A) Lösungswechselexperimente mit 1 mM Glutamat (*linkes Bild*, Balken) oder 1 mM L-Serin-O-sulfat (*rechtes Bild*, Balken) an einer HEK_{EAAC1}-Zelle. Die Leckströme wurden subtrahiert. (B) Die Bestimmung des K_M -Wertes (Mittelwert \pm SD, $n = 4$) von EAAC1 für O-Phospho-L-serin ergab $5,8 \pm 1,2$ mM. Die experimentellen Daten normiert auf das Signal bei 10 mM Phosphoserin wurden mit einer Michaelis-Menten-Gleichung angepasst.

3.4.2. D-Aspartat als Substrat von EAAC1

Wie bereits oben erwähnt, wird D-Aspartat von EAAC1 transportiert. Im Folgenden wurden die Eigenschaften von D-Aspartat als Substrat von EAAC1 unter stationären Bedingungen genauer bestimmt.

Dabei ergab sich bei jeweils sättigenden Substratkonzentrationen (siehe Abb. 3.17A), dass der Strom bei Aspartat um 46 ± 4 % verringert war im Vergleich zu dem Strom bei Glutamat. Dieses Ergebnis war unabhängig davon, ob nur der Glutamat-Transportstrom oder auch der Substrat-induzierte Anionenstrom (Abb. 3.17D) beobachtet wurde. Damit entspricht das Verhältnis zwischen Anionenleitfähigkeit und Substrattransport bei Aspartat dem bei Glutamat. Im Gegensatz dazu unterscheiden sich die apparenten K_M -Werte für Aspartat und Glutamat recht deutlich, mit $1,2 \mu\text{M}$ für Aspartat im Vergleich zu ca. $6,0 \mu\text{M}$ für Glutamat (siehe Abb. 3.17B).

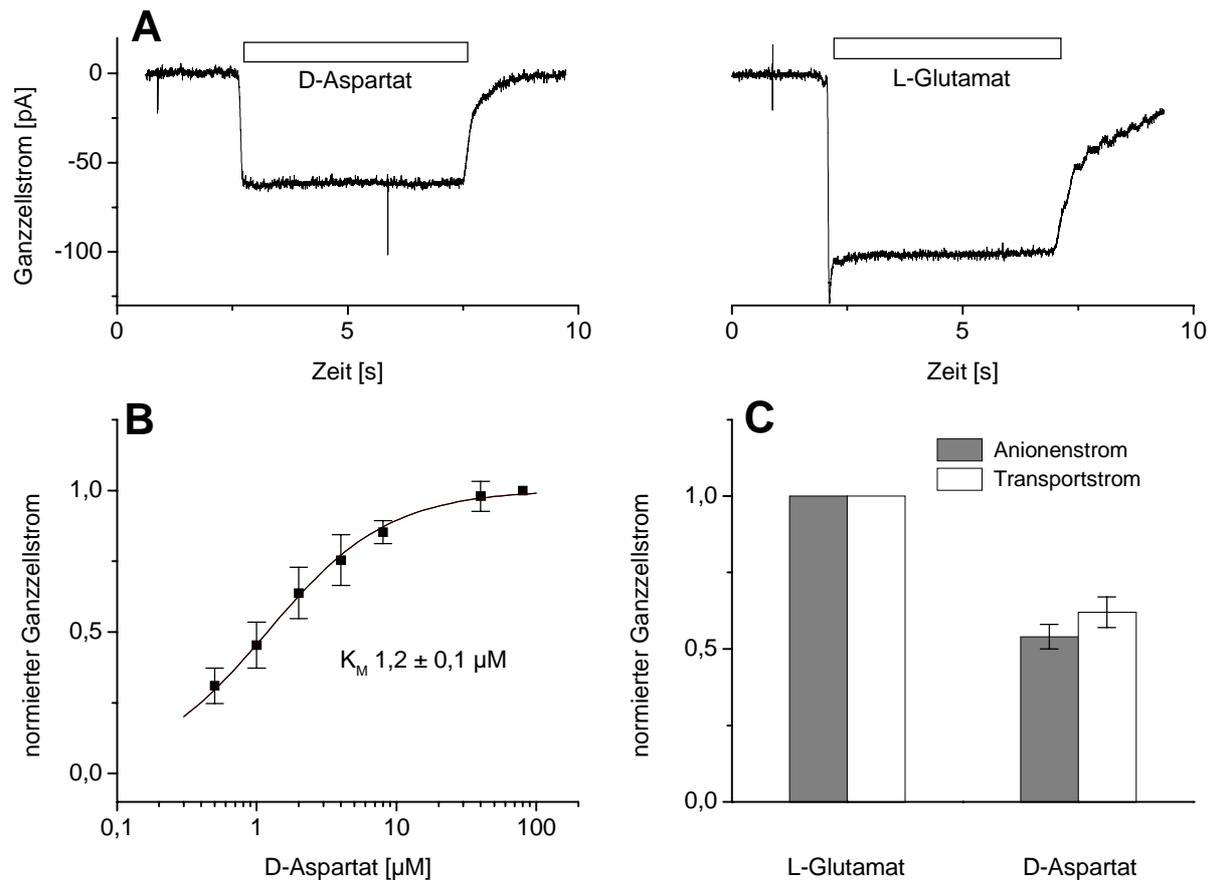


Abb. 3.17: D-Aspartat als Substrat von EAAC1. Versuchsbedingungen A-C: KSCN-haltige Pipettenlösung, NaCl-haltige Badlösung, Haltespannung 0 mV. (A) Ganzzelleableitung einer HEK_{EAAC1}-Zelle bei Applikation von 80 μM D-Aspartat (*linkes Bild*, Balken) und zum Vergleich von 1 mM L-Glutamat (*rechtes Bild*, Balken). Die Leckströme wurden subtrahiert. (B) Bestimmung der Affinität von EAAC1 für D-Aspartat (Mittelwert \pm SD, $n = 5$). Die experimentellen Daten normiert auf das Signal bei 100 μM Aspartat wurden mit einer Michaelis-Menten-Gleichung angepasst. Der K_M -Wert betrug $1,2 \pm 0,1 \mu\text{M}$. (C) Vergleich der Maximalströme induziert durch L-Glutamat (1 mM) und D-Aspartat (100 μM) bei Verwendung einer KSCN-haltigen (Anionenstrom, $n = 2$) oder einer KCl-haltigen Pipettenlösung (Transportstrom, $n = 3$).

3.4.3. Funktion von mutanten EAAC1

Aus der pH-Abhängigkeit des Glutamattransportes bei EAAC1 geht hervor, dass der Transporter selbst protoniert wird. Im Folgenden wurde durch Punktmutationen versucht, den Protonakzeptor von EAAC1 zu finden. Bei gezielter Mutagenese mit konservativem Aminosäureaustausch entstanden die Mutanten R444K und H295K, die sich beide gut in HEK-Zellen exprimieren ließen (siehe unten). In GLT-1 sind die entsprechend homologen Aminosäuren Arginin 479 und Histidin 326 und liegen auf Helix 8 bzw. Helix 6 (siehe Abb. 1.2 (Grunewald und Kanner, 2000)).

Unter Einwärtstransport-Bedingungen (hoch Na^+ extrazellulär, hoch K^+ intrazellulär) und symmetrischem pH von 7,4 konnte trotz Expression kein Glutamat-induziertes Stromsignal nachgewiesen werden. Da der pK-Wert von Lysin in Wasser bei 10,8 liegt, wurde der intrazelluläre pH-Wert auf 10,5 erhöht, um so die Deprotonierung auf der intrazellulären Seite zu erleichtern. Auch unter diesen Bedingungen zeigten beide Mutanten kein Signal.

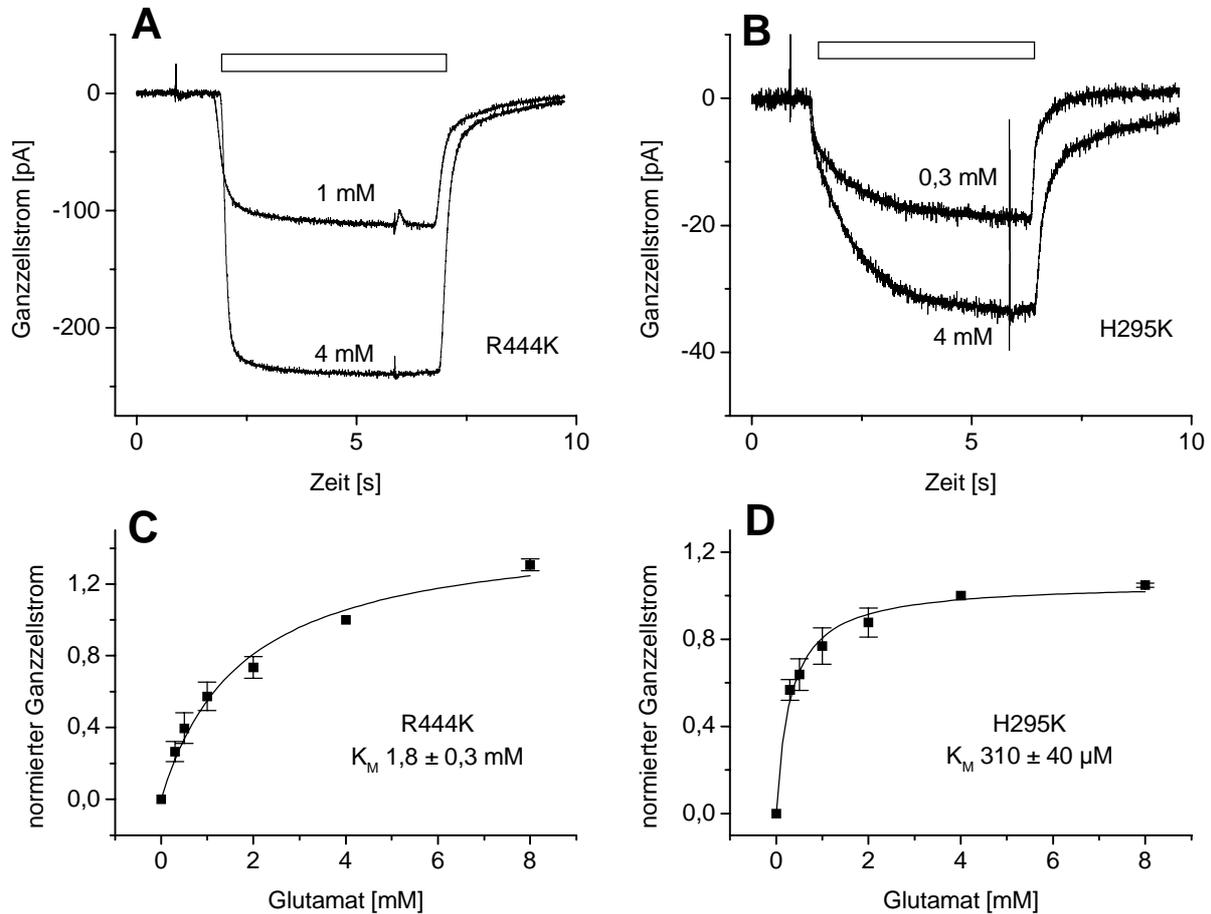


Abb. 3.18: Stationäre Messungen an den EAAC1-Mutanten R444K und H295K im Homoexchange-Modus. Versuchsbedingungen A-D: NaSCN-haltige Pipettenlösung mit 5 mM Glutamat (*Homoexchange*-Lösung siehe 2.2.7.), NaCl-haltige Badlösung, Haltespannung 0 mV. (A) Ganzzelleableitung einer R444K-exprimierenden HEK-Zelle bei Applikation von 1 und 4 mM Glutamat (Balken). Die Leckströme wurden subtrahiert. (B) Ganzzelleableitung einer H295K-exprimierenden HEK-Zelle bei Applikation von 0,3 und 4 mM Glutamat (Balken). Trotz schnellen Lösungswechsels erfolgte die Aktivierung von H295K sehr langsam. Die Leckströme wurden subtrahiert. (C) Die Bestimmung der Affinität von R444K für Glutamat (Mittelwert \pm SD, $n = 3$) ergab einen K_M -Wert von $1,8 \pm 0,3$ mM. Die Normierung erfolgte auf das Signal bei 4 mM. (D) Die Bestimmung der Affinität von H326K für Glutamat (Mittelwert \pm SD, $n = 3$) ergab einen K_M -Wert von 310 ± 40 μM . Die Normierung erfolgte auf das Signal bei 4 mM.

Mit intrazellulärem Na^+ und Glutamat, wenn EAAC1 im sogenannten *Homoexchange*-Modus arbeitet, konnte für beide Mutanten in Anwesenheit von Thiocyanationen ein Glutamat-induziertes Stromsignal gemessen werden (siehe Abb. 3.18A und B). Dieses Signal resul-

tiert aus der mit EAAC1-assoziierten Anionenleitfähigkeit, die im *Homoexchange*-Modus permanent aktiviert werden kann (siehe 1.2.4.). Die Bestimmung der apparenten K_M -Werte für Glutamat unter diesen Bedingungen ist in Abb. 3.18C und D dargestellt. Die Affinitäten für Glutamat waren bei beiden Mutanten herabgesetzt, mit 1,8 mM im Fall von R444K und 310 μ M im Fall von H295K. Beim Wildtyp unterscheidet sich der K_M -Wert für Glutamat im *Homoexchange*-Modus nicht wesentlich von dem im Einwärtstransport-Modus (C. Grewer unveröffentlichte Daten).

4. Diskussion

Die im vorangegangenen Kapitel dargestellten Experimente zeigen, dass sich die Expression von EAAC1 kloniert aus Rattenretina in HEK-Zellen gut für die elektrophysiologische Charakterisierung des Transporters eignete. HEK-Zellen besitzen keine endogenen Glutamat-abhängigen Systeme, sodass alle beobachteten Glutamat-induzierten Prozesse auf EAAC1 zurückzuführen sind. Mit Ganzzelleableitungen unter definierten ionalen extra- und intrazellulären Bedingungen und bestimmtem Haltepotenzial konnte somit der Glutamatttransporter von der extrazellulären Seite charakterisiert werden. Eine hohe Überexpression von EAAC1 erlaubte zudem die Beschreibung des Transporters von der intrazellulären Seite, indem *inside-out patches* von transfizierten HEK-Zellen gezogen wurden. Die durchschnittliche Anzahl an exprimierten Transporterproteinen pro Zelle lag bei etwa $5 \cdot 10^6$, entsprechend einem stationären Glutamat-Transportstrom von ≈ -50 pA bei 0 mV und einer Wechselzahl von 30 s^{-1} (siehe 4.2.3.). Daraus ergibt sich eine abgeschätzte Dichte von $\approx 4 \cdot 10^3$ Transporter pro μm^2 HEK-Zellmembran, vergleichbar mit der Überexpression von EAAT2 in Oozyten (Wadiche et al., 1995b). Mit Hilfe der Laserpuls-Photolyse von $\alpha\text{CNB-caged}$ Glutamat, bei der eine Zeitauflösung von $\approx 100 \mu\text{s}$ erzielt wird (Greuer et al., 2000b; Wieboldt et al., 1994), war es darüber hinaus möglich, einzelne Schritte im Transportzyklus aufzulösen.

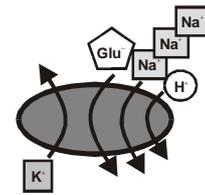
4.1. Charakterisierung der drei Funktionen von EAAC1

Mit Hilfe von stationären und vorstationären Messungen erfolgte die Analyse der drei Funktionsweisen – Glutamatttransport, Glutamat-induzierte Anionenleitfähigkeit und Glutamat-unabhängige Leckleitfähigkeit – von EAAC1 im Einwärtstransport-Modus. Dabei wurde zunächst von Bedingungen ausgegangen, in denen die ko- und gegentransportierten Ionen (Na^+ , H^+ und K^+) in hohen Konzentrationen vorlagen und nur die Glutamatkonzentration oder die Spannung variiert wurde. Damit konnte ein vorläufiges Transportmodell (siehe Abb. 4.1) erstellt werden, das durch Messungen von EAAC1 im Auswärtstransport-Modus ergänzt wurde.

Um zu verdeutlichen, welche Funktion bzw. welcher Transport-Modus von EAAC1 in dem jeweiligen Kapitel (hauptsächlich) diskutiert wird, wurden Piktogramme eingefügt, die das Transportprotein in dem entsprechenden Transport-Modus darstellen. Die extrazelluläre Seite von EAAC1 zeigt im Piktogramm nach oben.

4.1.1. Glutamattransport

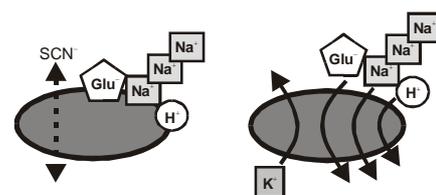
Sind Kaliumionen nur intrazellulär und Natriumionen nur extrazellulär vorhanden, läuft der Glutamat-Einwärtstransport quasi irreversibel ab. Unter diesen Bedingungen konnte bei Anwesenheit von Chlorid, einem Anion für das der Transporter nahezu impermeabel ist, der Transportstrom von EAAC1 beobachtet werden. Dieser war einwärts-gerichtet (negativ), da pro Transportzyklus zwei positive Ladungen in die Zelle verschoben wurden (Levy et al., 1998; Zerangue und Kavanaugh, 1996a) und nahm mit hyperpolarisierendem Membranpotenzial leicht exponentiell zu ($\approx e$ -fache Zunahme pro -70 mV, siehe 3.1.2.). Darüber hinaus wurde keine Sättigung bei negativen Haltespannungen beobachtet und es ergab sich keine Stromumkehr, was für die nur extrazelluläre Anwesenheit von Na^+ und Glutamat (sog. *zero-trans* Bedingungen (Läuger, 1991)) charakteristisch ist. Diese Ergebnisse stehen in guter Übereinstimmung mit Messungen von Kanai und Mitarbeitern (Kanai et al., 1994b), die humanen EAAC1 in Oozyten exprimierten.



Im Laserpuls-Photolyse-Experiment trat neben dem stationären Stromsignal zusätzlich ein anfänglicher transientser Strom auf, der auf einen schnellen elektrogenen Schritt zu Beginn des Transportzyklus schließen lässt (siehe 3.1.4. und 4.4.3.). Dieser Schritt ist nicht geschwindigkeitsbestimmend für den Transportzyklus, da sich sonst kein transientes Signal sondern ein kontinuierlicher Anstieg zum Plateau des stationären Stroms ergeben müsste.

4.1.2. Trennung zwischen Anionenleitfähigkeit und Glutamattransport

Enthält die Versuchslösung Thiocyanat, ein Anion für das EAAC1 hoch permeabel ist (Eliasof und Jahr, 1996; Wadiche und Kavanaugh, 1998), wird neben dem Glutamattransport auch die Glutamat-induzierte Anionenleitfähigkeit detektiert. Dabei wurde beobachtet, dass die Anwesenheit von Thiocyanationen die Affinität von EAAC1 für Glutamat (K_M -Wert $\approx 6 \mu\text{M}$) nicht beeinflusst (siehe 3.2.1.), was Beobachtungen anderer Gruppen bestätigt (Billups et al., 1996; Mennerick et al., 1999). Ebenso wird die Zykluszeit nicht durch den Anionenstrom verändert (Wadiche et al., 1995a). Mit Hilfe verschiedener Experimente konnten die beiden Komponenten – Transportstrom und Anionenstrom – des Glutamat-induzierten Stromsignal getrennt untersucht werden.



Bei symmetrischen SCN^- -Konzentrationen auf beiden Seiten der Membran war die Strom-Spannungs-Kennlinie nahezu linear und es ergab sich ein Umkehrpotenzial von $+8$ mV

und nicht ein Wert von -2 mV, der für einen reinen Anionenstrom zu erwarten wäre (siehe 3.1.2.). Die Verschiebung der Stromumkehr zu positiver Spannung resultiert aus dem Glutamat-Transportstrom, der beim berechneten Umkehrpotenzial von -2 mV (keine treibende Kraft für Anionen) weiterhin zu einem negativen Stromsignal führte. Darüber hinaus deutet der lineare Verlauf der Strom-Spannungs-Kennlinie auf den größeren Beitrag der Anionenleitfähigkeit zur detektierten Spannungsabhängigkeit hin.

Generieren Anionenleitfähigkeit und Glutamattransport Ströme in unterschiedliche Richtungen (SCN^- extrazellulär) würde sich für den reinen Anionenfluss permanent ein positiver Strom ergeben, der keine Stromumkehr zeigte. Dies wurde bei Haltespannungen > -52 mV beobachtet, während bei Haltespannungen < -52 mV hauptsächlich der Glutamat-Transportstrom zum Signal beitrug (siehe 3.1.2.).

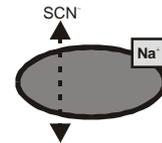
Bei einem Haltepotenzial von 0 mV wurde das Verhältnis zwischen den Glutamat-induzierten Strömen des Anionenflusses und des Glutamattransportes zu ≈ 4 zu 1 bestimmt (siehe 3.1.9.), was darauf hindeutet, dass die Einzelkanalleitfähigkeit sehr klein ist und sich daher nicht durch Einzelkanalmessungen bestimmen lässt. Das Verhältnis zwischen Anionen- und Transportstrom ist unabhängig von der Art des Substrates, wie Versuche mit Aspartat (siehe 3.4.2.) und Serin (Li et al., 2000) zeigten. Dies steht im Widerspruch zu Messungen von Wadiche und Mitarbeitern (Wadiche et al., 1995a) am glialen EAAT1, die eine gesteigerte Anionenleitfähigkeit bei Aspartat im Vergleich zu Glutamat beobachteten (siehe 4.5.).

Wie oben bereits beschrieben, trat bei der Untersuchung des reinen Glutamat-Transportstromes im Photolyse-Experiment ein transientes Stromsignal auf, welches sich durch einen schnellen Anstieg und biexponentiellen Abfall auszeichnete. Bei Anwesenheit von intrazellulärem SCN^- , wenn zusätzlich zum Glutamattransport die Anionenleitfähigkeit detektiert wurde, zeigte sich eine langsamere Kinetik und ein monophasischer Abfall für das transiente Stromsignal. Im Vergleich dazu wurde mit extrazellulären Thiocyanationen ein kontinuierlich ansteigender Auswärtsstrom beobachtet, dem ein kleines transientes negatives Stromsignal voraus ging (siehe 3.1.4.). Dieser anfängliche transiente Strom wurde aufgrund der schnelleren Kinetik dem Einsetzen des Glutamattransportes zugeordnet (Einwärtsstrom), während der langsam-aktivierende Auswärtsstrom die Anionenleitfähigkeit, d. h. den Einstrom von SCN^- in die Zelle widerspiegelte (Grewer et al., 2000b). Die schnellere Aktivierung des Glutamat-Transportstromes wurde auch von Bergles und Jahr (Bergles und Jahr, 1997) vorgeschlagen und von Otis und Kavanaugh ebenso nachgewiesen (Otis und Kavanaugh, 2000).

Diese Beobachtungen zeigen somit, dass 1) Thiocyanat die Funktion von EAAC1 als Glutamattransporter nicht beeinflusst, 2) Anionen- und Glutamat-Transportstrom kinetisch aber nicht thermodynamisch miteinander gekoppelt sind und 3) der Glutamat-Transportstrom bzw. die Glutamat-induzierte Ladungsverschiebung schneller aktiviert als der Anionenstrom (siehe 4.4.3.).

4.1.3. Glutamat-unabhängige Leckleitfähigkeit

Wie bei den glialen Glutamattransportern EAAT1 und EAAT2 (Lebrun et al., 1997) konnte der Glutamat-Einwärtstransport bei EAAC1 durch den kompetitiven Inhibitor *DL-threo-β*-Benzyloxyaspartat (TBOA) geblockt werden ($K_i = 5 \mu\text{M}$ bei $25 \mu\text{M}$ Glutamat, siehe 3.1.6.), in Einklang mit Messungen von Shimamoto und Mitarbeitern (Shimamoto et al., 2000). In Abwesenheit von Glutamat und in Anwesenheit von intrazellulärem Thiocyanat löste TBOA zusätzlich einen Auswärtsstrom ($K_i = 0,6 \mu\text{M}$) aus, der auf einer Inhibition der Leckleitfähigkeit beruhte. Dieser Glutamat-unabhängige Leckstrom wird von Anionen getragen, da bei symmetrischen Konzentrationen von SCN^- sich beim Umkehrpotenzial kein TBOA-induzierter Strom ergab, während ansonsten die Strom-Spannungs-Kennlinie linear verlief (siehe 3.1.6.). Würde die Leckleitfähigkeit durch einen Na^+ -Fluss verursacht (Kanai et al., 1995; Schwartz und Tachibana, 1990), dürfte sich aufgrund der asymmetrischen Na^+ -Verteilung keine Stromumkehr ergeben. Für EAAT2 wurde von Otis und Jahr bereits eine Glutamat-unabhängige Leckleitfähigkeit für Anionen vorgeschlagen (Otis und Jahr, 1998), allerdings fehlte der explizite Nachweis für einen Anionen- statt einem Na^+ -Fluss. Da keine Leckleitfähigkeit bei der Abwesenheit von Na^+ beobachtet wurde (Schwartz und Tachibana, 1990), wird vermutet, dass der Glutamat-unabhängige Anionenstrom von der extrazellulären Natriumkonzentration abhängt (siehe 4.4.1.).



4.1.4. Transportmodell für EAAC1

Aufgrund der oben beschriebenen Ergebnisse lässt sich, analog zu früher vorgeschlagenen Modellen (Otis und Jahr, 1998; Wadiche und Kavanaugh, 1998), ein vereinfachtes Transportmodell für EAAC1 aufstellen (siehe Abb. 4.1). Dabei wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit die kotransportierten Kationen zunächst vernachlässigt. In Abb. 4.1 ist der Transportzyklus von EAAC1 beschrieben als die Bindung des Substrates S auf der extrazellulären Seite an den unbeladenen Transporter T unter Bildung von TS. Nach Translokation über die Membran mit der Geschwindigkeitskonstanten k_{hin} (T^*S), gibt der Transporter das Sub-

strat intrazellulär ab und der unbeladene Transporter T^* pendelt mit der Geschwindigkeitskonstanten $k_{\text{rück}}$ wieder zur extrazellulären Seite (T). Zusätzlich verfügt der unbeladene Transporter über eine Glutamat-unabhängige Leckleitfähigkeit, die als \bar{T} bezeichnet wurde. Die Glutamat-induzierte Anionenleitfähigkeit \bar{TS} , die im Vergleich zum Glutamattransport verzögert einsetzt, wurde zunächst in Analogie zu Liganden-gesteuerten Ionenkanälen als diskreter Zustand angenommen.

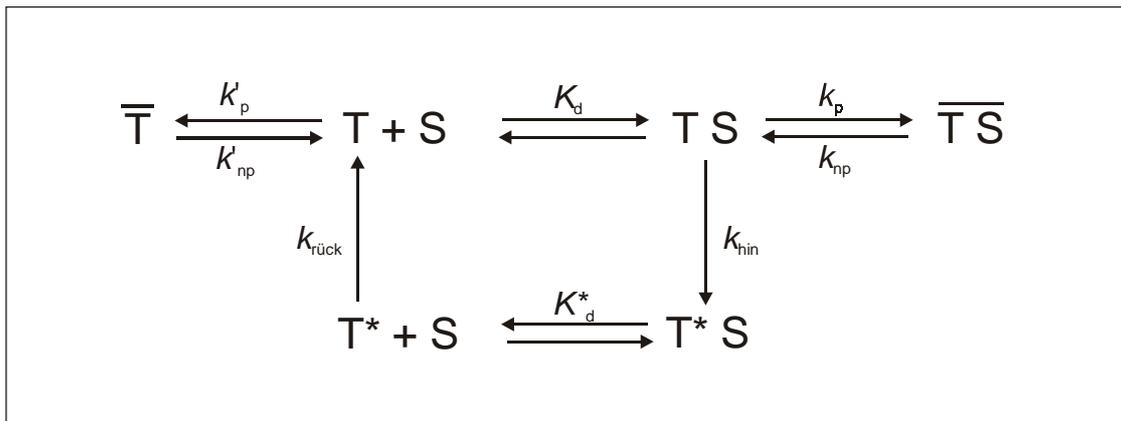
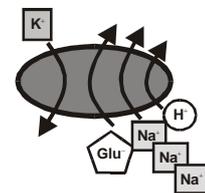


Abb. 4.1: Modell zum Glutamattransport und zur Anionenleitfähigkeit bei EAAC1. Der Transportzyklus von EAAC1 kann beschrieben werden als die Bindung des Substrates S an den unbeladenen Transporter T auf der extrazellulären Seite der Membran unter Bildung von TS. Die entsprechenden Zustände mit der Bindungsstelle zur intrazellulären Seite zugewandt sind mit dem Index * versehen. Die Geschwindigkeitskonstanten für die Substrattranslokation und die Relokation des unbeladenen Transporters wurde als k_{hin} und $k_{\text{rück}}$ bezeichnet. Zusätzlich zum Transportzyklus verfügt EAAC1 über eine Glutamat-unabhängige Leckleitfähigkeit (\bar{T}) und eine Glutamat-induzierte Anionenleitfähigkeit (\bar{TS}). Die entsprechenden Geschwindigkeitskonstanten wurden als k'_p , k'_{np} bzw. k_p und k_{np} bezeichnet.

4.1.5. Glutamat-Auswärtstransport von EAAC1

EAAC1 ist reversibel. Dreht man den Na^+ - und K^+ -Konzentrationsgradienten über die Membran um, führte die intrazelluläre Applikation von Glutamat zum Glutamat-Auswärtstransport, wobei die Affinität für Glutamat auf der intrazellulären Seite ≈ 45 fach geringer war als auf der extrazellulären Seite (siehe 3.1.7.). Der Glutamat-Auswärtstransport war ebenso mit einer Ladungsverschiebung über die Membran assoziiert, zeigte jedoch im Vergleich zum Einwärtstransport eine schwächere Spannungsabhängigkeit (siehe 3.1.7.), was in Einklang zu Arbeiten anderer Gruppen steht (Noda et al., 1999; Szatkowski et al., 1990). Die Bestimmung der Strom-Spannungs-Kennlinien im Einwärts- und Auswärtstransport-Modus wurde mit SCN^- durchgeführt, welches das Glutamat-induzierte Stromsignal verstärkte. Allerdings lag



das Verhältnis zwischen Glutamattransport und Anionenleitfähigkeit beim Glutamat-Auswärtstransport bei ≈ 1 zu 1,5 und nicht bei 1 zu 4 wie beim Glutamat-Einwärtstransport (siehe 3.1.9.). Daher könnte die geringere Spannungsabhängigkeit auch auf den geringeren Anteil der Anionenleitfähigkeit beim Glutamat-induziertem Auswärtsstrom zurückgeführt werden, da der Transportstrom eine schwächere Spannungsabhängigkeit zeigt als der Anionenstrom. Für das oben beschriebene Modell ergibt sich somit, dass nach der Bindung von Glutamat auf der intrazellulären Seite auch ein anionenleitfähiger Zustand $\overline{T^*S}$ gebildet werden kann, der jedoch in geringerem Ausmaß besetzt wird als der entsprechende Zustand für die extrazelluläre Seite (\overline{TS}). Ob ein direkter Übergang zwischen \overline{TS} und $\overline{T^*S}$ stattfindet, lässt sich aus den durchgeführten Experimenten nicht bestimmen.

Wie bei EAAC1 im Einwärtstransport-Modus wurde am *inside-out patch* im Photolyse-Experiment ein transientes Stromsignal beobachtet. Der transiente Anteil zeigte jedoch trotz SCN^- -Anwesenheit eine schnellere Kinetik als bei EAAC1 im Einwärtstransport-Modus (siehe 3.1.8.) und war in seinem zeitlichen Signalverlauf eher mit dem Glutamat-Transportstrom von EAAC1 im Einwärtstransport-Modus zu vergleichen. Dies ist konsistent mit dem geringeren Beitrag der Anionenleitfähigkeit beim Glutamat-induzierten Stromsignal von EAAC1 im Auswärtstransport-Modus.

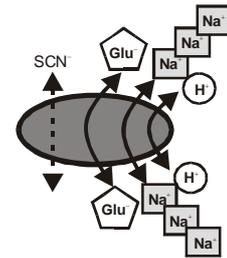
Diese Ergebnisse zeigen, dass EAAC1 prinzipiell reversibel, seine Funktionen bzw. Eigenschaften jedoch asymmetrisch sind. Dies hat z. B. im Fall der geringen Affinität von EAAC1 für Glutamat auf der intrazellulären Seite den Vorteil, dass der Auswärtstransport von Glutamat unter physiologischen Bedingungen stark inhibiert ist.

4.2. Einzelne Schritte im Transportzyklus und ihre Elektrogenität

Der transiente Strom von EAAC1, der nach ≈ 50 ms in einen stationären Strom überging, ließ sich in Anwesenheit von Thiocyanationen mit zwei Exponentialfunktionen (τ_{Anstieg} und τ_{Abfall}) anpassen und wurde durch verschiedene Parameter beeinflusst. Während eine Erniedrigung der extrazellulären Natrium- und Glutamatkonzentration sowie eine Erhöhung der Haltespannung zu einem Verschwinden des transienten Stromsignals führten (siehe 3.3.4., 3.1.3. und 3.1.5.) konnten beide Phasen des transienten Stromsignals in Abwesenheit von intrazellulärem K^+ bei EAAC1 im *Homoexchange*-Modus nachgewiesen werden (siehe 3.3.5.). Aufgrund dieser unterschiedlichen Effekte auf die beobachteten Zeitkonstanten wurden τ_{Anstieg} und τ_{Abfall} bestimmten K^+ -unabhängigen Schritten im Transportzyklus zugeordnet.

4.2.1. Glutamatbindung und Übergang zum anionenleitfähigen Zustand \overline{TS}

Die schnelle Anstiegszeit des transienten Stroms in Anwesenheit von SCN^- mit $\approx 1,0$ ms war nur gering spannungsabhängig (siehe 3.1.5.) und konnte bei EAAC1 im Glutamattransport-Modus wie auch im *Homoexchange*-Modus in Abwesenheit von intrazellulärem K^+ nachgewiesen werden (siehe 3.3.5.). Daraus ergibt sich, dass die beobachtete Reaktion K^+ -unabhängig sein muss. Im Gegensatz dazu zeigte die Anstiegszeit eine hyperbolische Abhängigkeit von der Glutamatkonzentration (siehe 3.1.3.). Würde $\tau_{Anstieg}$ allein mit der Bindung von Glutamat an den Transporter assoziiert sein, müsste sich eine lineare Abhängigkeit von der Glutamatkonzentration ergeben, da die Geschwindigkeitskonstante der Glutamatbindung direkt proportional zur Glutamatkonzentration ist. Dies wurde jedoch nicht beobachtet, sodass $\tau_{Anstieg}$ durch mehr als eine Reaktion bestimmt werden muss. In dem oben angeführten Modell Abb. 4.1 schließt sich nach der Glutamatbindung entweder der Übergang zum anionenleitfähigen Zustand \overline{TS} oder die Glutamattranslokation an. Die letztere Reaktion ist mit der Verschiebung von positiver Ladungen in der Zelle verbunden. Daher müsste $\tau_{Anstieg}$ bei negativen Haltespannungen geringer sein, und nicht, wie in 3.1.5. für die reziproke Anstiegszeit dargestellt, bei positiven Potenzialen leicht zunehmen. Aus diesem Grund wird angenommen, dass $\tau_{Anstieg}$ die Glutamatbindung sowie die Bildung des anionenleitfähigen Zustands \overline{TS} widerspiegelt. Mit dieser Annahme lässt sich aus der beobachteten Glutamat-Konzentrationsabhängigkeit die Reaktionskonstante für die Bindung von Glutamat an den Transporter berechnen (siehe Anhang 6.1. [6B] und 3.1.3.). Sie lag bei $2 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ und entsprach damit den Geschwindigkeitskonstanten ionotroper Glutamatrezeptoren (Clements et al., 1992), die jedoch eine andere Struktur der Glutamat-Bindungsstelle aufweisen als die Glutamattransporter. Für die Dissoziation wurde eine Geschwindigkeitskonstante von 1200 s^{-1} abgeschätzt.



4.2.2. Glutamattranslokation

Die Zeitkonstante für den langsamen Abfall des transienten Stromsignals bei EAAC1 im Glutamattransport-Modus in Anwesenheit von intrazellulärem SCN^- und einer Haltespannung von 0 mV lag bei $\approx 8,0$ ms und zeigte neben einer Na^+ -Konzentrationsabhängigkeit eine starke Spannungsabhängigkeit (siehe 3.3.4. und 3.1.5.). Diese durchlief im gesamten untersuchten Spannungsbereich von -90 bis $+60$ mV weder Minimum oder Maximum noch ergab sich eine Sättigung. Unter K^+ -freien Bedingung bei EAAC1 im *Homoexchange*-Modus trat in

Anwesenheit von Thiocyanationen nach schnellem Anstieg des Stromsignals eine Zeitkonstante im gleichen Zeitbereich wie τ_{Abfall} jedoch mit negativer Amplitude auf (siehe 3.3.5.). Ebenso wurde für den reinen Glutamat-Transportstrom unter *Homoexchange*-Bedingungen als auch unter Transportbedingungen eine langsame Phase mit ähnlicher Zeitkonstante im biexponentiellen Abfall des transienten Stroms beobachtet (siehe 3.3.5.). Der gleiche Zeitbereich der detektierten Zeitkonstanten spricht dafür, dass jeweils die gleichen Zyklusschritte beobachtet werden, die damit eindeutig unabhängig von der intrazellulären Kaliumkonzentration sind.

Aufgrund der Spannungsabhängigkeit von τ_{Abfall} wurden drei mögliche Reaktionen in Betracht gezogen: 1) Eine spannungsabhängige extrazelluläre Na^+ -Bindungsreaktion müsste bei niedrigen Haltepotenzialen eine Sättigung der Geschwindigkeitskonstanten zeigen. Dies wurde jedoch nicht beobachtet (siehe 3.1.5.). 2) Eine schnelle spannungsabhängige intrazelluläre Na^+ -Dissoziation würde mit einer Spannungsunabhängigkeit von τ_{Abfall} einhergehen. Dies steht ebenso im Widerspruch zum experimentellen Befund (siehe 3.1.5.). Ausserdem dürfte bei einer intrazellulären Dissoziation die langsame Zeitkonstante nicht unter *Homoexchange*-Bedingungen bei hohen intrazellulären Natriumkonzentrationen auftreten. Als dritte Möglichkeit 3) wird daher vorgeschlagen, dass der Abfall des transienten Stromsignals durch die spannungsabhängige Na^+ -getriebene Glutamattranslokation bestimmt ist. Bei Messungen von EAAC1 im Glutamat-Einwärtstransport-Modus mit SCN^- fällt das transiente Stromsignal auf einen stationären Wert ab, da mit der Glutamattranslokation weitere nicht-anionenleitfähige Zustände bevölkert werden (siehe 3.1.3. und Abb. 4.1). Im Gegensatz dazu ist bei EAAC1 im *Homoexchange*-Modus nach der Glutamattranslokation die Aktivierung der Glutamat-induzierten Anionenleitfähigkeit von der intrazellulären Seite möglich (siehe 4.1.5.), sodass das Stromsignal weiter zunimmt (siehe 3.3.5.).

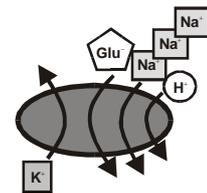
Bei Abwesenheit von Thiocyanationen (Messung des Transportstroms) wurde ebenso diese langsame Zeitkonstante beim Abfall des transienten Stroms auf das stationäre Stromsignal nachgewiesen (siehe 3.1.4. und 3.3.5.). Die Zuordnung dieser Zeitkonstanten zur Glutamattranslokation hat zur Konsequenz, dass diese Reaktion nicht den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt für den Transportzyklus darstellen kann, da sich sonst unter reinen Transportbedingungen kein transienter Strom ergeben würde. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu stationären Messungen von Kanai und Mitarbeitern, die als geschwindigkeitsbestimmenden Schritt die Glutamattranslokation vorschlugen (Kanai et al., 1995).

Für das in Abb. 4.1 dargestellte Modell wurde bei der Berechnung angenommen, dass die Glutamatbindung (siehe 4.2.1.) und die Übergänge in die anionenleitfähigen Zustände \bar{T}

und \overline{TS} im schnellen Vorgleichgewicht sind (siehe Anhang 6.1. [6A]). Damit konnten aus der Glutamatabhängigkeit von $1/\tau_{\text{Abfall}}$ die Geschwindigkeitskonstanten der Translokation und Relokation des Transporters von 300 s^{-1} für k_{hin} und 30 s^{-1} für $k_{\text{rück}}$ bei 0 mV Haltepotenzial abgeschätzt werden (siehe 3.1.3.), wobei k_{hin} um das e-fache pro $\approx -80 \text{ mV}$ zunahm (siehe 3.1.5.). Die Annahme des schnellen Vorgleichgewichtes für die Bindung und die Dissoziation von Glutamat an EAAC1 ist bei den oben abgeschätzten Geschwindigkeitskonstanten (siehe 4.2.1.) ab Konzentrationen von 10–15 μM möglich.

4.2.3. Geschwindigkeits-bestimmender Schritt im Transportzyklus

Da bei sättigenden Glutamatkonzentrationen Glutamatbindung und Glutamattranslokation nicht geschwindigkeits-bestimmenden sind, stellt sich die Frage, welcher Schritt im Transportzyklus die Zyklusdauer bestimmt und damit hauptsächlich für die Eigenschaften des Transporters unter stationären Bedingungen verantwortlich ist.



Die Strom-Spannungs-Kennlinie des Glutamat-Transportstroms (siehe 3.1.2.) wurde unter stationären Bedingungen aufgezeichnet. Da sich hier eine Zunahme des Stromsignals bei niedrigen Haltespannungen zeigte, muss der geschwindigkeits-bestimmende Schritt im Transportzyklus entweder mit der Verschiebung von positiver Ladung nach innen oder negativer Ladung nach aussen gekoppelt sein. Dies könnte eine spannungsabhängige Na^+ -Dissoziation sein, die jedoch bei anderen Transportern meist schnell abläuft (siehe $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (Lauger, 1987)). Daher sind eine spannungsabhängige Konformationsänderung bzw. die Kalium-induzierte Relokation als langsamer Schritt im Transportzyklus wahrscheinlicher. Im letzteren Falle müsste der unbeladene Transporter über eine Eigenladung von < -1 verfügen, sodass bei der Relokation netto negative Ladung aus der Zelle verschoben wird.

Die Affinität des Transporters für Glutamat unter stationären Bedingungen ist bei der Annahme eines schnellen Vorgleichgewichtes (für die Bindung von Glutamat und die Übergänge in die anionenleitfähigen Zustände) bestimmt durch die Geschwindigkeitskonstanten für die Glutamattranslokation (k_{hin}) und die Kalium-induzierte Relokation ($k_{\text{rück}}$) des Transporters von der intra- zur extrazellulären Seite (siehe Anhang 6.1. [5A]). Wären beide Schritte elektrogen und zeigten eine gleich große entgegengesetzte Polarität, würde sich für den K_M -Wert unter stationären Bedingungen keine Spannungsabhängigkeit ergeben. Dies stimmt mit den experimentellen Beobachtungen überein (siehe 3.1.1.) und deutet damit darauf hin, dass die Kalium-induzierte Relokation des Transporters elektrogen und geschwindigkeits-bestimmend für den gesamten Transportzyklus ist. Aus der Spannungsunabhängigkeit der Affinität

von EAAC1 für Glutamat kann daher nicht auf eine spannungsunabhängige Glutamatbindungsreaktion geschlossen werden (siehe 4.4.4.). Für die entsprechende Geschwindigkeitskonstante $k_{\text{rück}}$ wurde bei einer Haltespannung von 0 mV ein Wert von $\approx 30 \text{ s}^{-1}$ abgeschätzt, wobei alle -70 mV die Rate um das e-fache zunahm.

Transportiert EAAC1 Aspartat anstelle von Glutamat, wurde ein um ca. 40–50 % verringerter stationärer Maximalstrom gemessen (siehe 3.4.2.), was bei gleicher Ladung der Substrate nur durch eine Verringerung der Wechselzahl erklärt werden kann. In Anwesenheit von Glutamat ist die Kalium-induzierte Relokation des Transporters der geschwindigkeitsbestimmende Schritt (siehe oben). Die entsprechende Zeitkonstante sollte sich aber in Anwesenheit von Aspartat nicht ändern. Daher ist vermutlich die Aspartattranslokation sehr viel langsamer als die Glutamattranslokation und führt zu der beobachteten Zunahme der Zykluszeit, die sich aus der Summe von $1/k_{\text{hin}}$ und $1/k_{\text{rück}}$ ergibt. Ist die Substratbindung an den Transporter geschwindigkeitsbestimmend für den Transportzyklus, lässt sich damit auch der Unterschied der apparenten K_{M} -Werte unter stationären Bedingungen für Aspartat mit $\approx 1,2 \mu\text{M}$ im Vergleich zu Glutamat mit $\approx 6 \mu\text{M}$ erklären.

In Abb. 4.2 ist mit Hilfe der ermittelten Parameter für das entwickelte Transportmodell aus Abb. 4.1 die Spannungsabhängigkeit der stationäre und vorstationäre Ströme von EAAC1 als Simulation dargestellt. Sie stimmen gut mit den gemessenen Daten überein, was für dieses einfache Transportmodell spricht.

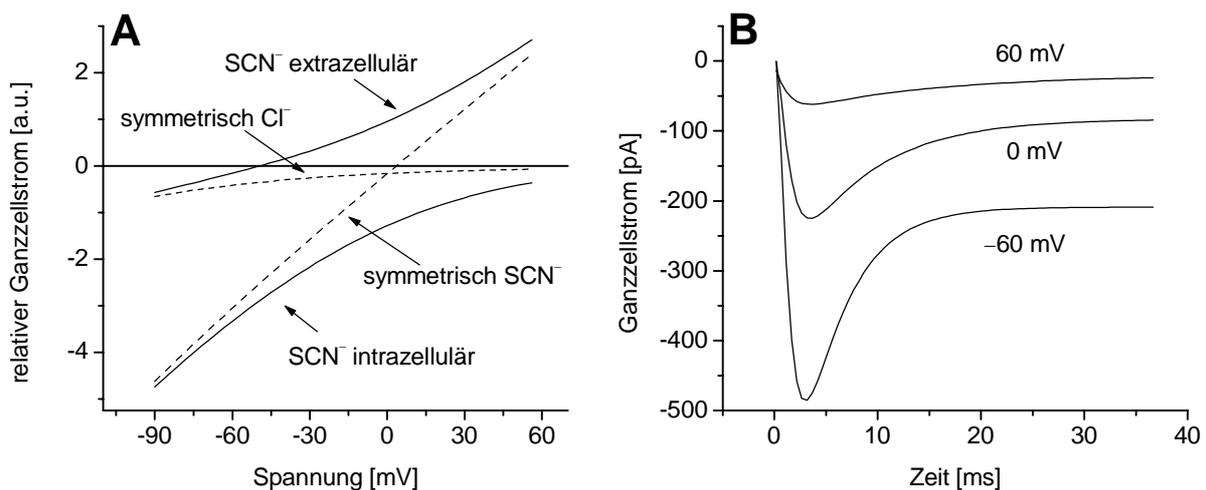


Abb. 4.2: Simulationen zur Spannungsabhängigkeit von EAAC1. (A) Simulation des stationären Glutamat-Transportstroms und des Glutamat-induzierten Anionenstroms der Experimente in 3.1.2. entsprechend den Gleichungen Anhang 6.1. [4], [7A, B] und [10A, B]. Parameter: $K_{\text{D}} = 50 \mu\text{M}$, $k_{\text{hin}}^0 = 300 \text{ s}^{-1}$, $k_{\text{rück}}^0 = 40 \text{ s}^{-1}$, $\Phi_1 = 20$, $\Phi_2 = 0,5$, $\gamma = 4 \text{ fS}$, $z = -2$ und $\delta = 0,8$. (B) Simulation der vorstationären Messungen aus 3.1.5. mit numerischer Integration der Differentialgleichungen, die das Reaktionsschema in Abb. 4.1 beschreiben. Parameter: wie in A und $k_{\text{d}} = 2 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $k_{\text{-d}} = 1000 \text{ s}^{-1}$, $k_{\text{p}} = 1400 \text{ s}^{-1}$ und $k_{\text{np}} = 700 \text{ s}^{-1}$.

4.2.4. Physiologische Situation an der Synapse

Das in Abb. 4.1 dargestellte Modell war Grundlage für die Berechnung verschiedener Parameter im Transportzyklus von EAAC1 in Hinblick auf die Expression dieses Glutamattransporters in der Membran der postsynaptischen Nervenzelle. Zu Beginn des synaptischen Übertragungsprozesses liegt das Membranpotenzial der postsynaptischen Nervenzelle bei seinem physiologischen Ruhepotenzial von ≈ -80 mV. Die Wechselzahl liegt in diesem Fall für EAAC1 bei ≈ 100 s⁻¹, während zum Beispiel der gliale Glutamattransporter EAAT2 nur eine Wechselzahl von 15 s⁻¹ aufweist (Wadiche et al., 1995b). Wie bereits in Kapitel 1.4. erwähnt, ist diese Wechselzahl nicht ausreichend für eine schnelle Entfernung des Glutamats aus dem synaptischen Spalt beim Übertragungsprozess. Daher wurde angenommen, dass die anfängliche hohe Glutamatkonzentration allein durch die Bindung an eine große Zahl von Transportern in der postsynaptischen Membran verringert wird (Diamond und Jahr, 1997; Wadiche et al., 1995b).

Mit Hilfe der hier durchgeführten vorstationären Messungen, konnte die "intrinsische" Affinität von EAAC1 für Glutamat abgeschätzt werden. Sie lag 1/4tel niedriger als bei stationären Messungen, bei denen der gesamte Transportzyklus in die Messung mit eingeht (siehe Anhang 6.1. [5A]). Für die Glutamatbindung ergab sich dabei eine Dissoziationskonstante von $K_D \approx 50$ μ M, wobei die Gleichgewichtseinstellung der Glutamatbindung bei physiologischen Glutamatkonzentrationen (3 mM während synaptischer Aktivität) in weniger als 200 μ s abläuft. Damit kann während dem Zeitraum des gesamten synaptischen Übertragungsprozesses von ≥ 1 ms eine Dissoziation des Glutamats vom Transporter erfolgen und so zu einer weiteren Stimulation der postsynaptischen Membran führen. Erst die Translokation von Glutamat in die postsynaptische Zelle ermöglicht also die Beendigung der glutamatergen Erregung der Postsynapse.

Der Glutamatbindung schließt sich die elektrogene Translokation von Glutamat über die Membran an mit einer Geschwindigkeitskonstanten k_{hin} von ≈ 800 s⁻¹ bei einer Haltespannung von -80 mV. Während der synaptischen Aktivität ist die postsynaptische Membran jedoch depolarisiert, was zu einer Verringerung der Translokationsrate führt. Entsprechend dem oben entwickelten Modell, in dem EAAC1 über eine Eigenladung von < -1 verfügt, geht nicht nur die Glutamattranslokation sondern auch die Kalium-induzierte Relokation des Transporters mit einer Ladungverschiebung über die Membran einher. Dies hat den Vorteil, dass die zu verschiebenden zwei positiven Nettoladungen pro Transportzyklus auf zwei Reaktionsschritte verteilt sind und so eine starke Inhibierung der Glutamattranslokation unter depolarisierten Bedingungen verhindert werden kann.

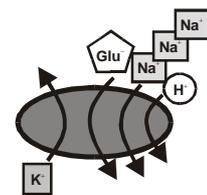
4.3. Protonentransport bei EAAC1

Für den glialen Glutamatransport in der Retina wurde gefunden, dass bei konstanter Glutamatkonzentration der induzierte Strom bei einem pH von $\approx 7,0$ ein Maximum aufweist (Billups und Attwell, 1996). Im Gegensatz dazu, zeigte der neuronale Glutamattransporter EAAC1 bei niedrigen pH-Werten in Anwesenheit von SCN^- keine Abnahme sondern eine leichte Zunahme im Glutamat-induzierten Strom, während bei hohen pH-Werten ebenso eine Verringerung der Stromantwort beobachtet wurde (siehe 3.2.2.). Aufgrund dieser ungeklärten pH-Abhängigkeit wurde der Protonentransport von EAAC1 genauer untersucht. Dafür wurden zunächst verschiedene Modelle in Betracht gezogen.

4.3.1. Modelle zur Bindungsreihenfolge von Glutamat und Proton

6 verschiedene Modelle sind für die Bindung von Proton und Glutamat an EAAC1 möglich: **1)** Die Protonenbindung erfolgt schnell vor der Glutamatbindung (THS), **2)** die Protonenbindung erfolgt langsam vor der Glutamatbindung (THS langs. Bdg.), **3)** die Protonenbindung erfolgt nach der Glutamatbindung (TSH), **4)** das Proton bindet zuerst an Glutamat und anschließend an den Transporter (SHT), **5)** Proton und Glutamat binden gleichzeitig an den Transporter (SHT-sim.) und **6)** die Protonenbindung findet entweder vor oder nach der Glutamatbindung statt (THS / TSH). Die entsprechenden Gleichungen für die Konstanten K_M -Wert für Glutamat, Glutamat-induzierter Maximalstrom (I_{max}) und Geschwindigkeitskonstante $1/\tau_{\text{Abfall}}$ für das transiente Stromsignal sind im Anhang Kapitel 6.2. aufgelistet und graphisch in Abb. 4.3 dargestellt.

Bei Einsatz sättigender Glutamatkonzentrationen wurde für den Transportstrom keine pH-Abhängigkeit gefunden (siehe 3.2.2.). Dies bedeutet, dass die Modelle bei denen die Protonenbindung langsam oder ungeordnet oder nach der Glutamatbindung erfolgt (THS langs. Bdg., THS / TSH, TSH) ausgeschlossen werden können. Wird das protonierte Glutamat vom Transporter gebunden oder Proton und Glutamat binden gleichzeitig (SHT und SHT-sim.), ergibt sich für $\log(K_M)$ eine lineare Abhängigkeit von der Protonenkonzentration. Diese wurde, wie in Punkt 3.2.1. dargestellt, nicht nachgewiesen, sodass nur das Modell THS, bei dem das Proton schnell und vor dem Glutamat gebunden wird, mit den experimentellen Daten von EAAC1 übereinstimmt.



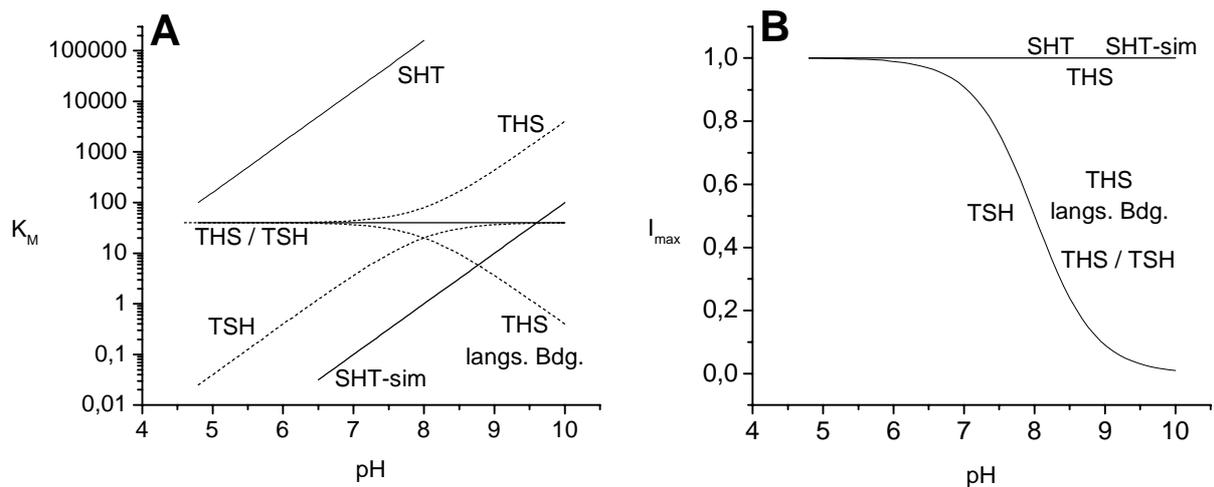


Abb. 4.3: Simulation zur pH-Abhängigkeit von EAAC1 für die verschiedenen Modelle. (A) Simulation zur pH-Abhängigkeit von K_M . Parameter für die Modelle THS, THS langs. Bdg., THS / TSH, TSH: $K^S = 40 \mu\text{M}$, $K^H = 1 \cdot 10^{-8} \text{ M}$; für das Modell SHT und SHT-sim: $K^S \cdot K^H = 4 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ bzw. $K^{HS} = 1 \cdot 10^{-8} \text{ M}^2$. (B) Simulation zur pH-Abhängigkeit von I_{max} . Parameter: $K^H = 1 \cdot 10^{-8} \text{ M}$. Gleichungen siehe Anhang 6.2 dargestellt. Abgesehen von dem Modell THS langs. Bdg., bei dem von einer langsamen Protonenbindungsreaktion ausgegangen wird, wurde für die anderen Modelle angenommen, dass die Bindungen von Proton und Glutamat an EAAC1 im schnellen Vorgleichgewicht sind und der Strom durch die nachfolgende Glutamattranslokation bestimmt ist.

Im Modell THS ist es möglich, eine niedrige Protonenkonzentration durch eine hohe Glutamatkonzentration auszugleichen, da durch die nachfolgende Glutamatbindung die protonierte Form des Transporters stabilisiert wird. Daraus ergibt sich die beobachtete pH-Unabhängigkeit des Transportstroms bei sättigenden Glutamatkonzentrationen (siehe 3.2.2.). Dieses Ergebnis wurde überprüft durch vorstationäre Messungen an EAAC1.

4.3.2. Protonenbindung an EAAC1

Mit Hilfe der Laserpuls-Photolyse wurde die vorstationäre Kinetik von EAAC1 zwischen pH 6,0 und 9,0 untersucht. Die Freisetzung sättigender Glutamatkonzentrationen führte dabei im untersuchten pH-Bereich weder bei der Anstiegszeit noch bei der Geschwindigkeitskonstanten für den Abfall des transienten Stromsignals zu einer Änderung (siehe 3.2.3.). Die pH-Unabhängigkeit von $1/\tau_{\text{Abfall}}$ (bzw. der Geschwindigkeit der Glutamattranslokation, siehe 4.2.2.), kann nur damit erklärt werden, dass der Besetzungsgrad der Transporter im Proton- und Glutamat-gebundenen Zustand (THS) bei den verschiedenen pH-Werten gleich war. Diese Beobachtung beruht wie oben bei den stationären Messungen auf der Tatsache, dass eine niedrige Protonenkonzentration durch eine entsprechend hohe Glutamatkonzentration ausgeglichen werden kann. Darüber hinaus zeigt die pH-Unabhängigkeit von $1/\tau_{\text{Anstieg}}$ (bzw. der Geschwindigkeit für die Glutamatbindung und den Übergang zum anionenleitfähigen Zu-

stand, siehe 4.2.1.), dass sogar bei Protonenkonzentrationen von 1 nM die Protonenbindung schnell erfolgte und nicht geschwindigkeits-bestimmend war. Damit muss die Geschwindigkeit für den Protonenaustausch zwischen EAAC1 und der Lösung oder dem Puffer relativ hoch sein, wobei eine Geschwindigkeitskonstante (pseudo-erster Ordnung) von 1000 s^{-1} abgeschätzt wurde. In wässriger Lösung beträgt die Geschwindigkeitskonstante für einen Protonenaustausch 10^7 bis $10^{11} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Eigen und Hammes, 1963), sodass der beobachtete Wert bei pH 9,0 durchaus realistisch ist.

Nachdem für die Protonenbindung bei einer Haltespannung von 0 mV nachgewiesen wurde, dass sie sehr schnell abläuft, wurde die Spannungsabhängigkeit des Glutamat-induzierten Stroms bei unterschiedlichen pH-Werten untersucht. Im pH-Bereich zwischen 6,0 und 9,0 wurde bei sättigender Glutamatkonzentration keine Veränderung nachgewiesen (siehe 3.2.4.). Damit ergibt sich für die Protonenbindung, dass sie bei keiner Spannung geschwindigkeits-bestimmend für den Transportzyklus wurde.

4.3.3. Protonen-Bindungsstelle bei EAAC1

Die Bestimmung der Affinität von EAAC1 für Glutamat führte wie oben erwähnt zu dem Ausschluss der Modelle SHT und SHT-sim., die eine lineare Abhängigkeit von $\log(K_M)$ und der Protonenkonzentration vorhersagen. Für EAAC1 im Einwärtstransport-Modus wurde hingegen beobachtet, dass die K_M -Werte bei Protonenkonzentrationen unter 10 nM drastisch anstiegen, während im pH-Bereich zwischen 6,0 und 8,0 die Affinität für Glutamat nahezu pH-unabhängig war (siehe 3.2.1.). Aus der Anpassung der K_M -Werte an das Modell THS konnte damit ein apparenter pK-Wert des Protonakzeptors in EAAC1 auf der extrazellulären Seite von $\approx 8,0$ abgeschätzt werden. Zhang und Mitarbeiter schlugen vor, dass Histidin 326 im Transmembransegment (siehe 1.3.1.), das auch in EAAC1 konserviert ist (His295, siehe 4.3.8.), den Protonakzeptor in GLT-1 darstellt (Zhang et al., 1994). Da jedoch der ermittelte pK 8,0 nur einem apparentem Wert entspricht, kommen auch andere Aminosäurereste als Akzeptor in Frage. Der apparente pK ist, neben der Dissoziationskonstante für das Proton, bestimmt von andere Geschwindigkeits- und Gleichgewichtskonstanten für die kotransportierten Ionen und zudem beeinflusst von lokalen pH-Unterschieden, die sich aufgrund der Oberflächenladung ergeben. Aus diesem Grund kann die Frage nach der H^+ -Bindungsstelle in EAAC1 mit diesem Experiment nicht endgültig beantwortet werden.

Bei EAAC1 im Auswärtstransport-Modus wurde bereits im pH-Bereich zwischen 6,0 und 8,0 ein starker Anstieg im K_M -Wert beobachtet. Die Affinität für Glutamat auf der intrazellulären Seite bei physiologischem pH 7,4 war etwa ≈ 45 fach erniedrigt im Vergleich zur

extrazellulären Seite (siehe 4.1.5.), konnte jedoch durch Erhöhung der Protonenkonzentration gesteigert werden. Da die entsprechenden Maximalströme bei sättigender Glutamatkonzentration auch im Auswärtstransport-Modus unabhängig vom pH waren, kann man davon ausgehen, dass die Bindungsreihenfolge von Proton und Glutamat an den Transporter auf der intrazellulären Seite die gleiche ist wie auf der extrazellulären Seite. Aus der Abhängigkeit der Glutamataffinität von der Protonenkonzentration ließ sich der pK-Wert für den Protonakzeptor auf der intrazellulären Seite abschätzen. Dieser lag bei $\leq 6,5$ und war damit mindestens um 1,5 pK-Einheiten im Vergleich zur extrazellulären Seite verschoben. Die Änderung in der Zugänglichkeit der H^+ -Bindungsstelle von der extra- oder der intrazellulären Seite geht demnach mit einer Verschiebung des pK-Wertes des Protonakzeptors in EAAC1 einher.

Entgegen dem bisher in allen Punkten zutreffenden Modell THS, bei dem das Glutamat in seiner anionischen Form an die protonierte Form des Transporters bindet, führte eine sehr hohe intrazelluläre Protonenkonzentration zu einem erneuten Abfall in der Affinität von EAAC1 für Glutamat auf der intrazellulären Seite. Diese Beobachtung kann nicht auf einen erhöhten Anteil an Glutamat (pK 4,4) in seiner protonierten Form als Glutaminsäure ($\approx 30\%$) zurückgeführt werden, da der K_M -Wert bei pH 4,8 um das ≈ 20 fache anstieg. Für gliale Transporter der Retina wurde für die Natriumbindungsstelle auf der extrazellulären Seite vorgeschlagen, dass Proton und Na^+ kompetitiv binden können, was zu einer Abnahme des Glutamat-induzierten Stroms bei niedrigen pH-Werten führt (Billups und Attwell, 1996). Für den neuronalen Glutamattransporter EAAC1 konnte im pH-Bereich zwischen 6,0 und 10,0 kein derartiger Effekt beobachtet werden. Dies schließt aber nicht aus, dass sich ein solcher kompetitiver Mechanismus zwischen Proton und Natriumion bei einem sehr geringen pH-Wert von 4,8 für die Natriumbindungsstelle auf der intrazellulären Seite ergibt. Darüber hinaus muss in Betracht gezogen werden, dass ein pH-Wert < 5 nicht nur die Struktur des Transporters beeinflussen kann sondern auch die Oberflächenladung der Membran, was in beiden Fällen zu einer veränderten Kinetik von EAAC1 führen kann. Die Veränderungen der Membraneigenschaften bei geringen pH-Werten (pH 5-5,5) zeigte sich auch darin, dass sich nur Messungen an kleinen Membranflächen wie dem *inside-out patch* aber nicht im Ganzzell-Modus realisieren ließen.

4.3.4. Modell zum Protonentransport bei EAAC1

Aus den oben beschriebenen Messungen geht hervor, dass der Protonakzeptor das Transporterprotein selber ist. Die entsprechende Aminosäure weist einen apparenten pK-Wert von $\approx 8,0$ auf, wenn sie zur extrazellulären Seite gewandt ist. Der Wechsel der Bindungsstelle

auf die intrazellulären Seite geht mit einer pK-Verschiebung von $\geq 1,5$ pK-Einheiten einher. Bei physiologischem pH (7,3) ist damit die H^+ -Bindungsstelle von EAAC1 bei extrazellulärer Zugänglichkeit hauptsächlich protoniert, während sie auf der intrazellulären Seite überwiegend deprotoniert vorliegt (siehe Abb. 4.4). Die Glutamatdissoziation auf der zytosolischen Seite wird somit durch die Verschiebung des pK-Wertes des Protonakzeptors kontrolliert.

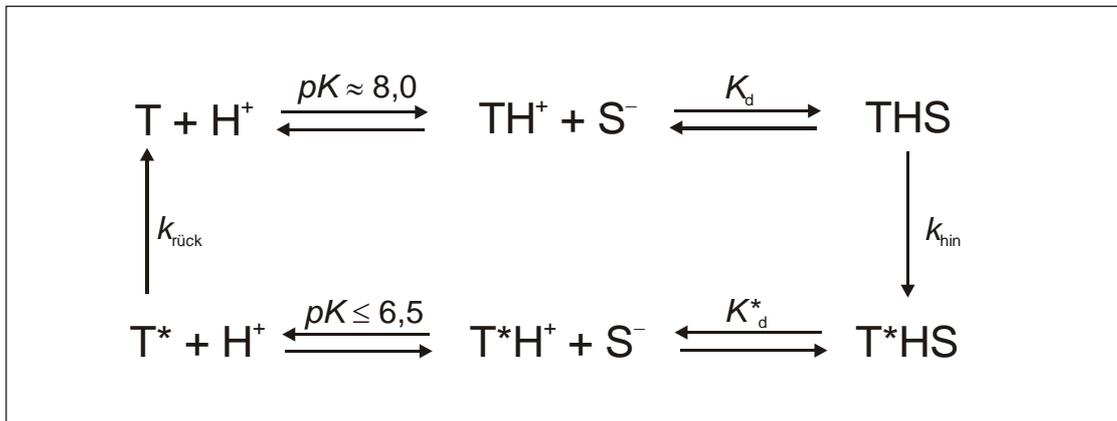


Abb. 4.4: Modell zur Protonen- und Glutamatbindung bei EAAC1. Der unbeladene Transporter T bindet zuerst das Proton unter Bildung von TH^+ . Danach wird Glutamat in seiner anionischen Form S^- gebunden (THS) und es findet die Translokation über die Membran mit der Geschwindigkeitskonstanten k_{hin} zum Zustand T^*HS statt. Auf der intrazellulären Seite wird zunächst Glutamat und anschließend das Proton abgegeben. k_{hin} und $k_{\text{rück}}$ sind die entsprechenden Geschwindigkeitskonstanten für die Glutamattranslokation oder die Relokation des unbeladenen Transporters, K_d und K^*_d entsprechen den Dissoziationskonstanten für Glutamat auf der extra- und intrazellulären Seite. Mit dem Zustand THS ist die Glutamat-induzierte Anionenleitfähigkeit des Transporters assoziiert (siehe Abb. 4.1).

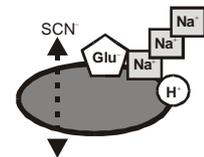
Das hier vorgestellte Modell (siehe Abb. 4.4) kann neben den in Kapitel 3.2. dargestellten Daten auch eine Reihe von nicht vollständig verstandenen Beobachtungen in der Literatur erklären. Im Modell THS stellt die anionische Form von Glutamat die aktive Substratform für EAAC1 dar, wie bereits von Nelson und Mitarbeitern für den Glutamattransport im Nierenepithel vorgeschlagen wurde (Nelson et al., 1983). Für Cystein, einem weiteren Substrat von EAATs, ergab sich bei der Bestimmung der K_M -Werte bei pH 7,5 und 8,5 kein Unterschied, während die Konzentration der deprotonierten Form von Cystein (pK 8,3) um das 4,5fache anstieg (Zerangue und Kavanaugh, 1996b). Daraus folgerten die Autoren, dass Cystein und analog dazu auch Glutamat sowohl in seiner deprotonierten als auch in seiner protonierten Form gebunden werden kann. Damit würde sich folgende Reaktionsfolge ergeben: erst bindet Glutamat an den Transporter, durch die Bindung wird der pK-Wert der γ -Carboxylgruppe des gebundenen Glutamats (pK 4,4) erhöht was letztlich zur Protonierung des Glutamats führt. Diese Schlussfolgerung wurde bereits von Slotboom und Mitarbeitern angezweifelt (Slotboom et al., 1999a), da L-Serin-O-sulfat mit einem pK < 0 ein Substrat für

EAAT1 und EAAT2 (Mitrovic et al., 1998) und auch für den neuronalen Glutamattransporter EAAC1 (siehe 3.4.1.) darstellt. Entsprechend müsste die pK-Verschiebung von Serinsulfat nach der Bindung an den Transporter ≈ 7 pK-Einheiten betragen, was als sehr unwahrscheinlich einzustufen ist. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass sich die Stöchiometrie beim Transport von Serinsulfat ändert und womöglich gar kein Proton kotransportiert wird.

Ebenso im Widerspruch zu einer Protonierung des Substrates nach Bindung an den Transporter steht die beschriebene Erhöhung des K_M -Wertes für Cystein bei niedrigen pH-Werten (Zerangue und Kavanaugh, 1996b). Wenn sowohl die protonierte als auch die deprotonierte Form von Cystein binden kann, dürfte sich die Affinität des Transporters bei sinkendem pH nicht ändern. Mit einem Modell bei dem das Substrat in seiner anionischen Form nach dem Proton bindet, wie es oben und in Abb. 4.4 für EAAC1 beschrieben wurde, ist die pH-Abhängigkeit des K_M -Wertes für Cystein wie folgt zu erklären. Bei niedrigen als auch bei hohen Protonenkonzentrationen nimmt jeweils die Affinität des Transporters für Cystein ab, da im ersten Fall der Anteil an deprotoniertem Cystein und damit an Substrat abnimmt, und im zweiten Fall die Protonenbindungsstelle des Transporters nicht mehr abgesättigt ist. Es ergibt sich damit ein Minimum für den K_M -Wert für Cystein, was experimentell bei einem pH-Wert von $\approx 8,0$ gefunden wurde (Zerangue und Kavanaugh, 1996b).

4.3.5. pH-Abhängigkeit der Glutamat-induzierten Anionenleitfähigkeit

Während bei der Detektion des Glutamat-Transportstroms bei sättigenden Glutamatkonzentrationen der Maximalstrom nicht pH-abhängig war, wurde in Anwesenheit von SCN^- eine leichte Zunahme des Stroms bei abnehmenden pH-Werten nachgewiesen (siehe 3.2.2.).



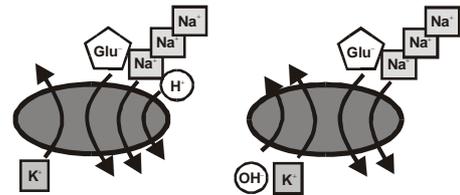
Wäre diese Beobachtung auf einen pH-abhängigen Übergang zum anionenleitfähigen Zustand $\overline{\text{TS}}$ (siehe Abb. 4.1.) zurückzuführen, müsste die Anstiegszeit des transienten Stromsignals, die Informationen für den Übergang zu $\overline{\text{TS}}$ enthält (siehe 4.2.1.), eine pH-Abhängigkeit zeigen. Dies war jedoch nicht der Fall (siehe 3.2.3.). Wie in der Einleitung beschrieben, kann bei dem neuronalen Glutamattransporter EAAT4 eine zusätzliche Glutamat-induzierte Protonenleitfähigkeit in Anwesenheit von Arachidonsäure auftreten (Fairman und Amara, 1999). Wäre SCN^- in der Lage einen solchen Protonenfluss auszulösen, müsste sich die Spannungsabhängigkeit für die verschiedenen pH-Gradienten unterscheiden, was jedoch, wie in Kapitel 3.2.4. dargestellt, nicht beobachtet wurde.

Aus diesen Gründen erscheint es wahrscheinlich, dass die pH-Abhängigkeit der Glutamat-induzierten Anionenleitfähigkeit auf eine pH-sensitive Geschwindigkeitskonstante

für den Translokationsprozess von SCN^- über die Membran zurückzuführen ist. Da die beobachtete pH-Abhängigkeit sehr schwach war und zudem keinen deutlichen Wendepunkt zeigte, d. h. nicht auf eine einzelne titrierbare Gruppe zurückgeht, könnte der Einfluss der Protonenkonzentration auf einer Änderung der Oberflächenladung des Proteins beruhen (Fersht, 1999).

4.3.6. Proton-Kotransport versus OH^- -Gegentransport

Die oben geschilderten Messungen ließen sich ebenso mit einem OH^- -Gegentransport wie mit einem Proton-Kotransport erklären, da beide elektrisch äquivalent sind. Aus diesem Grund wurde der Effekt des H^+ -Isotops Deuterium auf die Kinetik der



EAAC1-assoziierten Ströme untersucht. Der Austausch einer H_2O -haltigen zu einer D_2O -haltigen Lösung führte bei vorstationären Messungen zu einer Zunahme der Zeitkonstanten für den Abfall des transienten Stromsignals, während die Zeitkonstante für den Anstieg unverändert blieb. Wie oben beschrieben ist die Anstiegszeit mit der Glutamatbindung und dem Auftreten des anionenleitfähigen Zustands assoziiert (siehe 4.2.1.). Da die Glutamatbindung nach der Protonenbindung oder der OH^- -Dissoziation erfolgt, kann die Freisetzung von sättigenden Glutamatkonzentrationen mögliche Isotopen-Effekte ausgleichen. Die Zeitkonstante für den Abfall des transienten Stromsignals reflektiert die Glutamattranslokation über die Membran (siehe 4.2.2.). Daher dürfte sich im Falle eines OH^- -Gegentransportes keine Veränderung durch den Isotopenaustausch ergeben. Hingegen ist die beobachtete Abnahme der Geschwindigkeitskonstante um $\approx 60\%$ vergleichbar mit Isotopeneffekten anderer Protonen-transportierender Systeme wie Lactose Permease (Viitanen et al., 1983), Bakteriorhodopsin (le Coultre und Gerwert, 1996) und Cytochrom C Oxidase (Hallen et al., 1994; Ruitenberget al., 2000). Die stationären Eigenschaften des Transporters sind hauptsächlich durch den langsamsten Schritt im Transportzyklus bestimmt, der bei EAAC1 die Kalium-induzierte Relokation des Transporters darstellt (siehe 4.2.3.). Aus diesem Grund sollte sich weder bei einem Proton-Kotransport noch einem OH^- -Gegentransport, aufgrund des geringen Massenunterschiedes zwischen OH^- und OD^- , ein Isotopen-Effekt im stationären Signal zeigen. Experimentell ließ sich nur eine geringfügige Reduktion des stationären Stromes nachweisen.

Der beobachtete kinetische Deuterium-Effekt auf die Glutamattranslokation spricht für einen Proton-Kotransport bei EAAC1, wie er auch von Zerangue und Kavanaugh (Zerangue und Kavanaugh, 1996a) vorgeschlagen wurde. Allerdings läßt sich nicht ausschließen, dass

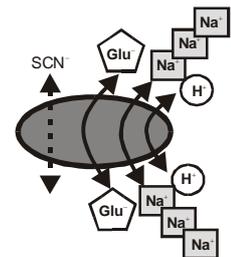
sekundäre Isotopen-Effekte für die Verlängerung der Zeitkonstanten für den Abfall des transienten Stroms verantwortlich sind.

4.3.7. Physiologische Relevanz der pK-Verschiebung des Protonakzeptors

Obwohl die synaptischen Vesikel, in denen Glutamat gespeichert ist, einen pH von 5,0 bis 5,5 aufweisen (Südhof, 1995), ändert sich der pH-Wert im synaptischen Spalt bei der Glutamatausschüttung nur geringfügig, sogar bei ständiger Reizung (Gottfried und Chesler, 1996). Da die Affinität von EAAC1 im pH-Bereich zwischen 6,0 und 8,0 nahezu konstant ist, kann unter physiologischen Bedingungen der Glutamattransport als quasi pH-unabhängig betrachtet werden. Im Gegensatz dazu können unter pathophysiologischen Bedingungen wie Ischämie die extra- und intrazelluläre Protonenkonzentration auf Werte von $\approx 6 \mu\text{M}$ ansteigen (Mutch und Hansen, 1984; Silver und Erecinska, 1992). Damit nimmt die Wahrscheinlichkeit zu, dass die Protonenbindungsstelle auf der zytosolischen Seite von EAAC1, die einen pK-Wert von $\leq 6,5$ aufweist, protoniert ist und EAAC1 den Auswärtstransport von Glutamat katalysiert. Bei einer künstlich induzierten Energieunterversorgung konnte bereits nachgewiesen werden, dass ein großer Teil des extrazellulären Glutamats im synaptischen Spalt aus dem Auswärtstransport von Glutamattransportern stammt (Jabaudon et al., 2000; Rossi et al., 2000). Die intrazelluläre Ansäuerung unter pathophysiologischen Bedingungen könnte daher wesentlich als Auslöser zu diesem Prozess beitragen.

4.3.8. Mutanten R444K und H295K

Durch konservativen Aminosäure-Austausch wurde versucht, den Protonakzeptor von EAAC1 zu identifizieren. Die dabei entstandene Mutanten R444K und H295K zeigten bei Anwesenheit von intrazellulärem Na^+ , Glutamat und SCN^- (*Homoexchange-Modus*) Glutamat-induzierte Ströme aufgrund der Glutamat-induzierten Anionenleitfähigkeit. Im Gegensatz dazu konnten keine Transportströme für R444K und H295K detektiert werden, was darauf hindeutet, dass entweder die Dissoziationsschritte auf der intrazellulären Seite gestört sind oder die Kalium-induzierte Relokation des Transporters, wie bei den GLT-1-Mutanten E404 und Y403 (Kavanaugh et al., 1997; Zhang et al., 1998), nicht mehr stattfindet. Durch eine Erhöhung des intrazellulären pH-Wertes sollte eine mögliche Inhibierung der Protonendissoziation auf der zytosolischen Seite ausgeglichen werden, was in beiden Fällen jedoch nicht möglich war.



Unter *Homoexchange*-Bedingungen war die Affinität des Wildtyp-Transporters nicht wesentlich verändert gegenüber Transportbedingungen (C. Grewer, unveröffentlichte Daten), wobei der apparente K_M -Wert bei $\approx 6 \mu\text{M}$ Glutamat lag. Im Gegensatz dazu führten die eingebauten Mutationen zu einer drastischen Abnahme der Affinität für Glutamat mit einem K_M -Wert von 1,8 mM im Fall von R444K und $310 \mu\text{M}$ im Fall von H295K. In wie weit dieser Verlust der Affinität auf eine reduzierte Protonierung, die vor der Glutamatbindung erfolgen muss, zurückzuführen ist, kann nicht beurteilt werden.

4.4. Bindung und Transport von Natriumionen bei EAAC1

Beim Glutamattransport durch EAAC1 werden pro Transportzyklus zwei positive Ladungen in die Zelle verschoben. Aus den Ergebnissen diskutiert in Kapitel 4.2.2. und 4.2.3. ergeben sich zwei spannungsabhängige Schritte im Transportzyklus von EAAC1 – die Glutamattranslokation und die Kalium-induzierte Relokation des unbeladenen Transporters. Für beide Reaktionen wurde der Anteil des elektrischen Feldes über der Membran, der von einer Ladung durchquert wird (δ), bestimmt (siehe Anhang 6.1. [10A, B] mit $z = 1$ bzw. -1 , (Läuger, 1991)). Da der Abfall des transienten Stroms mit der Glutamattranslokation assoziiert ist, konnte aus der Spannungsabhängigkeit der Zeitkonstanten (e-fache Zunahme pro -80 mV) der Anteil δ zu $\approx 60\text{--}65 \%$ abgeschätzt werden. Für die Kalium-induzierte Relokation lag δ bei $\approx 70\text{--}75 \%$, entsprechend einer e-fachen Zunahme des stationären Glutamat-Transportstroms pro -70 mV . Wadiche und Mitarbeiter ermittelten für den glialen Glutamattransporter EAAT2 mit Hilfe von Spannungssprüngen eine spannungsabhängige Na^+ -Bindung, die vor der Glutamatbindung stattfindet (Wadiche et al., 1995b). Für EAAC1 in Oocyten konnte bisher keine solche Natriumbindungsstelle innerhalb des elektrischen Feldes nachgewiesen werden (Kanai et al., 1995; Kanai et al., 1994b).

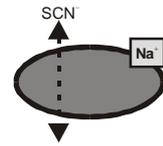
Im Folgenden wurde für EAAC1 versucht, weitere spannungsabhängige Schritte im Transportzyklus zu isolieren. In diesem Zusammenhang wurde auch die Bindungsreihenfolge von Na^+ und Glutamat an den Transporter untersucht.

4.4.1. Glutamat-unabhängige Na^+ -Bindung(en)

Beim Spannungssprung-Experiment wurden für EAAC1 in HEK-Zellen Na^+ -abhängige TBOA-sensitive Ströme beobachtet (siehe 3.3.6.), die aus der elektrogenen Bindung von einem und mehreren Natriumionen vor der Glutamatbindung resultieren (Glutamat-unabhängige Na^+ -Bindung). Dies ist analog zu den Ergebnissen von Wadiche und Mitarbeitern für

EAAT2 (Wadiche et al., 1995b). Allerdings liegt der Anteil des elektrischen Feldes (δ), der von der verschobene Ladung passiert wird, bei 25–30 % und nicht bei 41 % wie für EAAT2 (Wadiche et al., 1995b). Des weiteren ist die Ladungsbewegung bei EAAC1 20mal schneller als bei EAAT2, was darauf hindeutet, dass sie nicht für die detektierten transienten Ströme bei photolytischer Freisetzung von Glutamat verantwortlich ist.

In Kapitel 4.1.3. wurde für die Glutamat-unabhängige Leckleitfähigkeit von EAAC1 vorgeschlagen, dass sie von der extrazellulären Natriumkonzentration abhängt. Stationäre Messungen der Glutamat-unabhängigen



Leckleitfähigkeit mit sättigenden TBOA-Konzentrationen und unterschiedlichen Natriumkonzentrationen zeigten, dass eine Verringerung der Natriumionen zu einer Abnahme des TBOA-induzierten Stromes führte (siehe 3.3.2.). Daraus ergeben sich drei Schlussfolgerungen. 1) Die Glutamat-unabhängige Leckleitfähigkeit ist Na^+ -abhängig. 2) Nach der TBOA-Bindung an EAAC1 erfolgt keine weitere Natriumbindungsreaktion, da sonst eine Abnahme im TBOA-induzierten Strom bei niedrigen und hohen Natriumkonzentrationen zu beobachten sein müsste. 3) Der apparente K_M -Wert für die Na^+ -Bindung(en) liegt in der Abwesenheit von Glutamat bei 80 mM (ein Natriumion) bzw. bei 20 mM (zwei Na^+).

4.4.2. Modelle zur Bindungsreihenfolge von Na^+ und Glutamat an EAAC1

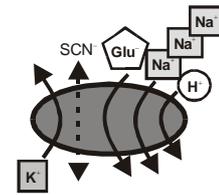
Für die Bindungsreihenfolge von Na^+ und Glutamat an den Transporter wurden fünf verschiedene Möglichkeiten in Betracht gezogen: **1)** alle drei Natriumionen binden vor Glutamat (TNa_3S), **2)** das dritte Natriumion bindet nach Glutamat (TNa_2SNa), **3)** zwei Natriumionen binden nach Glutamat (TNaSNa_2), **4)** alle drei Natriumbindungsreaktionen finden nach der Glutamatbindung statt (TSNa_3) und **5)** die Bindungsreihenfolge von Glutamat und Na^+ ist beliebig ($\text{TNa}_3\text{S} / \text{TSNa}_3$). Die entsprechenden Gleichungen für die Konstanten K_M -Wert für Glutamat, Glutamat-induzierter Maximalstrom (I_{\max}) und Geschwindigkeitskonstante $1/\tau_{\text{Abfall}}$ des transiente Stroms sind im Anhang in Kapitel 6.3. aufgelistet. Dabei wurde in allen Modellen von einer Natriumbindungsreaktion im schnellen Vorgleichgewicht ausgegangen (Lauger, 1987).

Aufgrund der oben beschriebenen Na^+ -abhängigen TBOA-sensitiven transienten Ströme konnte Modell 4, bei dem alle Natriumionen nach Glutamat binden, ausgeschlossen werden. Finden dagegen alle Natriumbindungsschritte vor der Glutamatbindung statt, müsste der Maximalstrom bei sättigender Glutamatkonzentration unabhängig von der Natriumkonzentration sein, da eine niedrige Natriumkonzentration durch eine hohe Glutamatkonzentration kompensiert werden kann. Wie jedoch in Kapitel 3.3.3. dargestellt, zeigte der Maximalstrom

eine deutliche Abhängigkeit von der Natriumkonzentration. Ein beliebige Bindungsreihenfolge für Natriumionen und Glutamat bedingt eine Unabhängigkeit des K_M -Wertes für Glutamat von der Na^+ -Konzentration. Dies steht im Widerspruch zu der beobachteten Abnahme der Affinität von EAAC1 für Glutamat bei Verringerung der Zahl der Natriumionen (siehe 3.3.1.). Daher kommen nur die beiden Modelle 2 und 3 in Frage, bei denen die Bindung sequenziell stattfindet und der Glutamatbindung Natriumbindungsschritte sowohl vor- als auch nachgelagert sind. Die experimentellen Daten lassen allerdings zwischen den beiden Möglichkeiten – TNaSNa_2 oder TNa_2SNa – keine sichere Unterscheidung zu (siehe 3.3.1. und 3.3.3.). Im Gegensatz dazu wurden in der Literatur bisher nur Modelle vorgeschlagen, bei denen entweder alle Natriumionen vor (Otis und Jahr, 1998) oder nach Glutamat binden (Kanner und Bendahan, 1982). Mit Hilfe von vorstationären Messungen wurden die Ergebnisse aus den stationären Messungen überprüft. Der Einfachheit halber wird im Folgenden immer nur auf das Modell TNaSNa_2 eingegangen, die Überlegungen gelten aber genauso für das Modell TNa_2SNa .

4.4.3. Glutamat-abhängige Na^+ -Bindung(en)

Die photolytische Freisetzung von Glutamat führt zu einem transienten Strom, aufgrund des synchronen Übergangs zum anionenleitfähigen Zustand und aufgrund der nicht geschwindigkeitsbestimmenden elektrogenen Glutamattranslokation über die Membran (siehe 4.1.2. und Abb. 4.1). Bei Reduktion der extrazellulären Natriumkonzentration nahm bei sättigender Glutamatkonzentration die Zeitkonstante für den Abfall des transienten Signalanteils (τ_{Abfall}) zu und die Amplitude des transienten im Vergleich zum stationären Strom verringerte sich, während die Anstiegszeit (τ_{Anstieg}) unabhängig von der Natriumkonzentration war (siehe 3.3.4.).



Die Geschwindigkeit der Glutamattranslokation, die durch τ_{Abfall} bestimmt wird (siehe 4.2.2.), ist abhängig von der Anzahl der Transporter im vollständig beladenen Zustand (drei Na^+ , Glutamat und H^+) und damit beeinflusst durch die extrazellulären Natriumkonzentration. Das Gleichgewicht der nach der Glutamatbindung erfolgenden Natriumbindungsreaktionen kann nicht durch eine Erhöhung der Glutamatkonzentration zum Zustand des vollständig beladenen Transporters verschoben werden. Dadurch nimmt bei einer geringen Natriumkonzentration die Anzahl an Transportern in diesem Zustand ab, sodass sich die Zeitkonstante τ_{Abfall} entsprechend vergrößert, was experimentell nachgewiesen wurde. Damit stimmen die vorstationären Messungen von τ_{Abfall} gut überein mit den stationären Messungen für den Maximal-

strom bei sättigenden Glutamatkonzentrationen und beweisen, dass der Glutamatbindung mindestens eine Natriumbindungsreaktion folgt.

Aufgrund der Abhängigkeit der Zeitkonstanten für den Anstieg des transienten Stroms von der Glutamatkonzentration, wurde τ_{Anstieg} der Bindung von Glutamat und dem Übergang zum anionenleitfähigen Zustand $\overline{\text{TS}}$ zugeordnet (siehe 4.2.1.). Die Natriumbindungsreaktionen, die nach der Bindung von Glutamat an EAAC1 erfolgen, beeinflussen die Bildungsgeschwindigkeit des anionenleitfähigen Zustandes. Aus diesem Grunde müsste τ_{Anstieg} abhängig sein von der Natriumkonzentration, wenn diese Zeitkonstante auch den Übergang zu $\overline{\text{TS}}$ reflektiert (wie in Modell Abb. 4.1). Da τ_{Anstieg} jedoch Na^+ -unabhängig ist, wurde in das Modell ein weiterer Reaktionsschritt aufgenommen. Sehr wahrscheinlich handelt es sich bei dieser Reaktion um eine Glutamat-induzierte Konformationsänderung (siehe Abb. 4.5). Diese Konformationsänderung ermöglicht die Bindung weiterer Natriumionen an EAAC1 (Glutamat-abhängige Na^+ -Bindung) und ist langsam im Vergleich zu den anschließenden Natriumbindungsreaktionen und dem Übergang zum anionenleitfähigen Zustand in einem Zeitbereich von 0,5–1 Millisekunde. Ein weiterer wichtiger Grund für die Annahme eines zusätzlichen Reaktionsschrittes ist, dass $1/\tau_{\text{Anstieg}}$ nicht linear mit der Glutamatkonzentration zunimmt (siehe 3.1.3.) und daher durch mindestens eine zwei-stufige Reaktion bestimmt sein muss.

4.4.4. Weitere elektrogene Natriumbindungsreaktionen an EAAC1

Der Vergleich der Zeitkonstanten des transienten Stroms bei Glutamattransport und Glutamat-induzierter Anionenleitfähigkeit zeigt, dass 1) der Glutamat-Transportstrom bzw. die Glutamat-induzierte Ladungsverschiebung früher aktiviert als der Anionenstrom (siehe 3.1.4. und 4.1.2.) und 2) die Zeitkonstanten des biexponentiellen Abfalls des transienten Signals beim Glutamat-Transportstrom mit $\approx 1,0$ ms und $\approx 8,0$ ms im gleichen Zeitbereich liegen, wie die Zeitkonstanten für die oben postulierte Konformationsänderung und die Glutamattranslokation im An- und Abstieg des transienten Signals beim Anionenstrom. Die Verschiebung der für die Konformationsänderung bestimmenden Geschwindigkeitskonstante in die abfallende Phase des transienten Stromsignals fordert eine weitere Einwärtsbewegung von positiver Ladung zusätzlich zur Glutamattranslokation oder eine Auswärtsbewegung von negativer Ladung aus der Zelle. Damit kann die Glutamatbindung, bei der negative Ladung in die Zelle verschoben wird, nicht für den Einwärtsstrom verantwortlich sein, sondern muss, wie von Wadiche und Mitarbeitern vorgeschlagen wurde (Mennerick et al., 1999; Wadiche et al., 1995b), elektroneutral verlaufen.

Für die beobachtete Ladungsverschiebung beim transienten Einwärtsstroms in Abwesenheit von SCN^- gibt es mehrere mögliche Ursachen: 1) Die Konformationsänderung geht mit einer Verschiebung von positiver Ladung in die Zelle einher. 2) Die der Glutamatbindung vorgelagerte elektrogene Na^+ -Bindung ist nicht gesättigt, d. h. der Großteil der Transporter liegt in der Na^+ -freien Form vor. 3) Die Kalium-induzierte Relokation, die mit der Verschiebung von negativer Ladung nach aussen verbunden ist (siehe 4.2.3.), ist nicht gesättigt, d. h. der Großteil der Transporter liegt in einer Form vor, in der die Bindungsstelle zur intrazellulären Seite gewandt ist. 4) Die Natriumdissoziation auf der intrazellulären Seite ist elektrogen. 5) Die der Konformationsänderung nachgelagerte Na^+ -Bindung ist elektrogen. Im ersten Fall müsste die Geschwindigkeitskonstante für die Deaktivierung der schnellen Stromkomponente mit abnehmenden Haltepotenzial schneller werden. Dies steht im Widerspruch zu den experimentellen Daten, die nur eine geringe Spannungsabhängigkeit zeigen und eine leichte Zunahme bei positiven Haltespannungen ergaben (siehe 3.1.5.). Im Falle 2) und 3) würde die Freisetzung einer sättigenden Glutamatkonzentration das Gleichgewicht der anfänglichen elektrogenen Na^+ -Bindung bzw. der Kalium-induzierten Relokation verschieben, was vergleichbar mit einem Spannungssprung-Experiment (siehe 3.3.6.) zu einem zusätzlichen negativen Strom führen würde. Dies kann mit niedrigen extrazellulären Natriumkonzentrationen überprüft werden, bei denen das Gleichgewicht mehr auf der Seite des Na^+ -freien bzw. des K^+ -beladenen Transporters liegt. Mit der Applikation von Glutamat müsste nun ein größerer transienter Strom detektiert werden, was jedoch nicht der Fall war (C. Grewer unveröffentlichte Daten). Darüber hinaus zeigt sich bei EAAC1 im *Homoexchange*-Modus in Abwesenheit von intrazellulären Kalium- und Thiocyanationen ebenso ein transientes Stromsignal mit gleichem zeitlichen Verlauf (siehe 3.3.5.), sodass die beobachtete Ladungsverschiebung nicht K^+ -abhängig sein kann. Die *Homoexchange*-Experimente (siehe 3.3.5.) schließen auch eine elektrogene Natriumdissoziation auf der intrazellulären Seite aus (Fall 4), da mit hohen intrazellulären Natriumkonzentrationen die Natriumdissoziation gehemmt werden müsste. Daher lassen sich die experimentellen Daten am besten mit einer elektrogenen Na^+ -Bindung nach der Konformationsänderung erklären. Ist diese Natriumbindungsreaktion im Vergleich zur Konformationsänderung schnell, führt die elektrogene Bindung zu der beobachteten Verschiebung der positiven Ladung, während die Geschwindigkeitskonstante und ihre Spannungsabhängigkeit durch die langsamere elektroneutrale Konformationsumwandlung bestimmt wird.

4.4.5. Elektrogene Schritte und Glutamat-induzierte Konformationsänderung im Transportzyklus von EAAC1

In Abb. 4.5 ist ein Modell zum Na^+ -abhängigen Glutamattransport von EAAC1 dargestellt, das mit allen experimentellen Daten im Einklang steht. Der ersten schnellen und elektrogenen Natriumbindungsreaktion an EAAC1 folgt die Glutamatbindung. Diese ruft eine Konformationsänderung hervor, die weitere schnelle und elektrogene Bindungen von Na^+ ermöglicht. Erst wenn alle drei Natriumionen, Glutamat und das Proton (nicht dargestellt) an den Transporter gebunden sind, findet die elektrogene Glutamattranslokation statt.

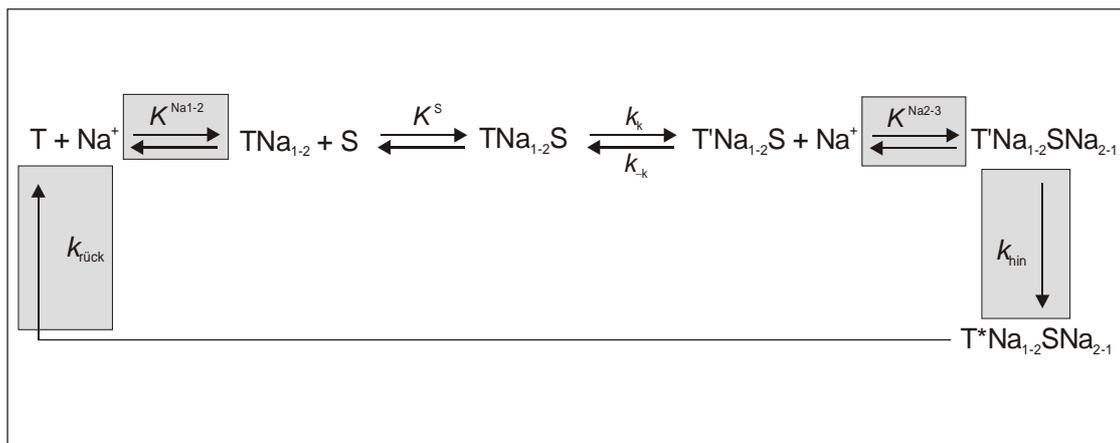


Abb. 4.5: Bindung und Transport von Natriumionen bei EAAC1. Der unbeladene Glutamattransporter T bindet zunächst ein oder zwei Natriumion (TNa_{1-2}), wobei die Bindungsstelle des Natriumions im elektrischen Feld der Membran liegt. Danach erfolgt eine spannungsunabhängige Glutamatbindung zu TNa_{1-2}S , die eine elektroneutrale Konformationsänderung auslöst unter Bildung von $\text{T}'\text{Na}_{1-2}\text{S}$. Dadurch ist EAAC1 in der Lage weitere Natriumionen zu binden, wobei diese Bindungen wieder elektrogen sind ($\text{T}'\text{Na}_{1-2}\text{SNa}_{2-1}$). Anschließend erfolgt die elektrogene Glutamattranslokation zur zytosolischen Seite ($\text{T}^*\text{Na}_{1-2}\text{SNa}_{2-1}$). Die grau unterlegten Reaktionen sind elektrogen.

Bei niedrigen extrazellulären Natriumkonzentrationen nimmt der Glutamat-induzierte Maximalstrom aufgrund der geringeren Besetzung des Zustandes TNaSNa_2 ab. Dies geht mit einer Zunahme der Zeitkonstanten der Glutamattranslokation einher, die in Kapitel 3.3.4. experimentell (τ_{Abfall}) nachgewiesen wurde. Die Zeitkonstante der Glutamat-induzierten Konformationsänderung kann durch zwei Na^+ -abhängige Reaktionen, die Bildung von TNaS und die Folgereaktionen von $\text{T}'\text{NaS}$, beeinflusst werden. Die Zahl der Transporter im Zustand TNaS bleibt konstant, wenn niedrige Natriumkonzentrationen durch sättigende Glutamatkonzentrationen ausgeglichen werden. Hingegen nimmt bei geringer Natriumkonzentration die Zahl der Transporter im Zustand $\text{T}'\text{NaS}$ zu, da die nachfolgenden Natriumbindungsreaktionen verlangsamt sind. Dies hat zur Folge, dass die beobachtete Zeitkonstante zunehmen muss. Wie in 3.3.4. jedoch dargestellt, wurde experimentell für die Zeitkonstante der Konformati-

onsänderung (τ_{Anstieg}) keine Abhängigkeit von der Na^+ -Konzentration nachgewiesen. Diese Diskrepanz ist wahrscheinlich auf eine doch nicht sättigende photolytische Freisetzung von Glutamat aus *caged* Glutamat bei niedrigen Na^+ -Konzentrationen zurückzuführen, da dort der K_M -Wert für den stationären Strom bereits sehr hoch lag und noch dazu der transiente Spitzenstrom einen 4mal höheren K_M -Wert als der stationäre Strom aufweist (siehe 3.1.3.).

Das Modell in Abb. 4.5 sagt voraus, dass mit Verringerung der Glutamatkonzentration sowohl die Geschwindigkeitskonstante für die Glutamattranslokation als auch für die Konformationsänderung abnimmt. Dies wurde experimentell in Kapitel 3.1.3. nachgewiesen.

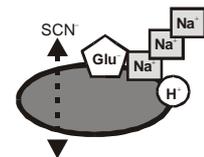
Wie oben beschrieben, kann die Zeitkonstante der Glutamat-induzierten Konformationsänderung durch die Na^+ -abhängigen Folgereaktionen von T'NaS beeinflusst werden. Diese Folgereaktionen sind im Gegensatz zur Konformationsänderung selbst elektrogen, sodass die Spannungsabhängigkeit der nachfolgenden Natriumbindungsreaktionen die beobachtete Zeitkonstante beeinflusst. Da hohe Haltepotenziale das Verhältnis zwischen T'NaS und T'NaSN₂ (siehe Abb. 4.5) zugunsten von T'NaS verschieben, nimmt somit die beobachtete Zeitkonstante für die Konformationsänderung ab, was experimentell in Kapitel 3.1.5. nachgewiesen wurde.

Zhang und Kanner schlugen aufgrund von Versuchen an GLT-1 zur Zugänglichkeit verschiedener Aminosäuren (ausgetauscht durch Cystein) für Sulfhydrylreagenzien vor, dass die Glutamatbindung eine Konformationsänderung auslöst. Dies betrifft Aminosäurereste, welche selbst nicht an der Glutamatbindung beteiligt sind (Zhang und Kanner, 1999). Da diese Konformationsänderung auch durch die Bindung des Inhibitors Kainat induziert wurde, der nachweislich nicht transportiert wird, kann es sich nicht um Substrattranslokation an sich handeln (Zhang und Kanner, 1999). Die hier für EAAC1 nachgewiesene elektroneutrale Glutamat-induzierte Konformationsänderung ist ein Beweis für solche strukturellen Veränderungen des Transporters vor der eigentlichen Glutamattranslokation.

4.4.6. Abhängigkeit der Glutamat-induzierten Anionenleitfähigkeit von der Natriumkonzentration

Aus der Na^+ -Abhängigkeit des Glutamat-induzierten Anionenstroms (siehe 3.3.3.) bei sättigenden Glutamatkonzentrationen geht hervor, dass die Glutamat-induzierte Anionenleitfähigkeit nur von einem

Zustand des Transporters ausgehen kann, bei dem alle drei Natriumionen gebunden sind. Würde die Glutamat-induzierte Anionenleitfähigkeit mit allen Glutamat-gebundenen Zuständen assoziiert sein, dürfte bei sättigenden Glutamatkonzentrationen der Glutamat-induzierte



Strom nicht bei niedrigen Natriumkonzentrationen abnehmen, wie es in 3.3.3. experimentell nachgewiesen wurde. Wäre der Übergang zum anionenleitfähigen Zustand nur vom Zustand TNaS möglich, müsste eine Erhöhung der Natriumkonzentration zu einer Abnahme des Glutamat-induzierten Anionenstroms führen, was nicht gefunden wurde (siehe 3.3.3.). Folgen der Glutamatbindung zwei weitere Natriumbindungsreaktionen, ist die experimentell gefundene Abnahme des Glutamat-induzierten Anionenstroms auch mit einem Modell vereinbar, bei dem vom vollbeladenen Transporter (TNaSNa₂) und dem Transporter, der Glutamat, Proton und zwei Natriumionen gebunden hat (TNaSNa), der Übergang zur Anionenleitfähigkeit möglich ist. Dieses Modell steht jedoch im Widerspruch zu den Experimenten mit Aspartat, die im Folgenden beschrieben werden.

Bei Messungen mit Aspartat (siehe 3.4.2.) wurde die beobachtete Verringerung der Wechselzahl auf eine langsamere Aspartattranslokation im Vergleich zur Glutamattranslokation zurückgeführt (siehe 4.2.3.). Damit müsste sich der Zustand des Transporters, in dem Aspartat, Proton und drei Natriumionen gebunden sind, anreichern und der Übergang zum anionenleitfähigen Zustand vermehrt stattfindet. Damit ergäbe sich ein erhöhter Anteil des Anionenstroms am Gesamtstrom, entsprechend den Beobachtungen von Wadiche und Mitarbeitern für den glialen Transporter EAAT1 (Wadiche et al., 1995a). Für den neuronalen Glutamattransporter EAAC1 konnte jedoch keine solche Verschiebung zugunsten des Anionenstroms nachgewiesen werden (siehe 3.4.2.). Daher scheinen die Substrattranslokation und die Anionenleitfähigkeit eng miteinander gekoppelt zu sein. Aus diesem Grund wird angenommen, dass nur der voll beladenen Transporter anionenleitfähig ist und nicht zusätzlich ein Zustand bei dem der Transporter Substrat und Proton aber nur zwei Natriumionen gebunden hat.

Die elektrogenen Natriumbindungsreaktionen nach der Glutamat-induzierten Konformationsänderung als auch vor der Glutamatbindung erfüllen die Funktion einer Schaltladung beim Übergang zu den anionenleitfähigen Zuständen (Bezanilla, 1985). Im Gegensatz zu den klassischen Torströmen beim Öffnen von Kanälen, die aufgrund von elektrogenen Konformationsänderungen entstehen, sind im Fall von EAAC1 die Natriumionen die Schaltladungen, die reversibel und spannungsabhängig an den Transporter binden. Ein ähnliches Modell wurde für den spannungsabhängigen Chloridkanal ClC-0 vorgeschlagen, bei dem das permeierende Anion selbst die Schaltladung des Kanals darstellt (Pusch et al., 1995).

4.5. Untersuchungen an EAAC1 und Vergleich mit einem anderen Na⁺-getriebenen Transporter

Im folgenden Abschnitt wird ein Gesamtmodell mit den drei Funktionen von EAAC1 entwickelt, in welchem auf die geordnete Bindungsreihenfolge der Substrate sowie auf die spannungsabhängigen und die geschwindigkeits-bestimmenden Reaktionen im Transportzyklus eingegangen wird. Ebenso erfolgt eine vergleichende Betrachtung der in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse mit dem Na⁺-getriebenen Glucosetransporter SGLT1.

4.5.1. Gesamtmodell für EAAC1

In Abb. 4.6 wurde versucht, alle oben beschriebenen Ergebnisse in einem Gesamtmodell für die EAAC1-Funktionen zu vereinen. Der unbeladene Transporter T besitzt eine Eigenladung von < -1 (siehe 4.2.3.) und bindet zunächst ein Natriumion. Die entsprechende Bindungsstelle liegt im elektrischen Feld der Membran und somit ist die Bindung spannungsabhängig (siehe 4.4.1.). Der Na⁺-gebundene Transporter TNa verfügt über eine Glutamat-unabhängige Leckleitfähigkeit, die von Anionen getragen ist (siehe 4.1.3.). Für die Glutamat-unabhängige Leckleitfähigkeit wird, analog zur Glutamat-induzierten Anionenleitfähigkeit (siehe 4.4.6.), eine enge Kopplung zwischen Translokation des Substrates und Anionenfluss angenommen. Demnach würde EAAC1 über einen elektroneutralen Leerlaufzyklus verfügen, bei dem extrazelluläres Na⁺ gegen intrazelluläres K⁺ ausgetauscht wird. Dies könnte die von Kanai und Mitarbeitern beobachtete Natriumionenaufnahme (²²Na) in Abwesenheit von Glutamat erklären (Kanai et al., 1995). Findet vor der ersten Natriumbindungsreaktion bereits die Protonenbindung an EAAC1 statt, wäre der Na⁺-K⁺-Austausch elektrogen und mit einer intrazellulären Ansäuerung verbunden. Da in Abwesenheit von Thiocyanationen kein Glutamat-unabhängiger Leckstrom beobachtet wurde (siehe 3.1.6.), und eine intrazelluläre Ansäuerung nur beim Glutamattransport beschrieben ist (Bouvier et al., 1992) wird davon ausgegangen, dass die Bindung des Protons nach der ersten Na⁺-Bindung erfolgt. Die Messungen zur Na⁺-Konzentrationsabhängigkeit der EAAC1-Funktionen ließen keine Unterscheidung zwischen den Modellen zu, ob vor Glutamat ein oder zwei Natriumionen binden. Ist der vorgeschlagenen Leerlaufzyklus elektroneutral, kann nur der Zustand TNa mit der Leckleitfähigkeit assoziiert sein. Würden zwei Natriumionen vor Glutamat an EAAC1 binden, müsste die Glutamat-unabhängige Leckleitfähigkeit durch hohe Natriumkonzentrationen abnehmen. Wie jedoch in Kapitel 3.1.6. dargestellt, findet nur bei niedrigen Natriumkonzentrationen ein Abnahme des Leckstromes statt, was darauf hindeutet, dass erst ein Natrium an EAAC1 bindet und anschließend ein Proton, Glutamat und zwei weitere Natriumionen binden.

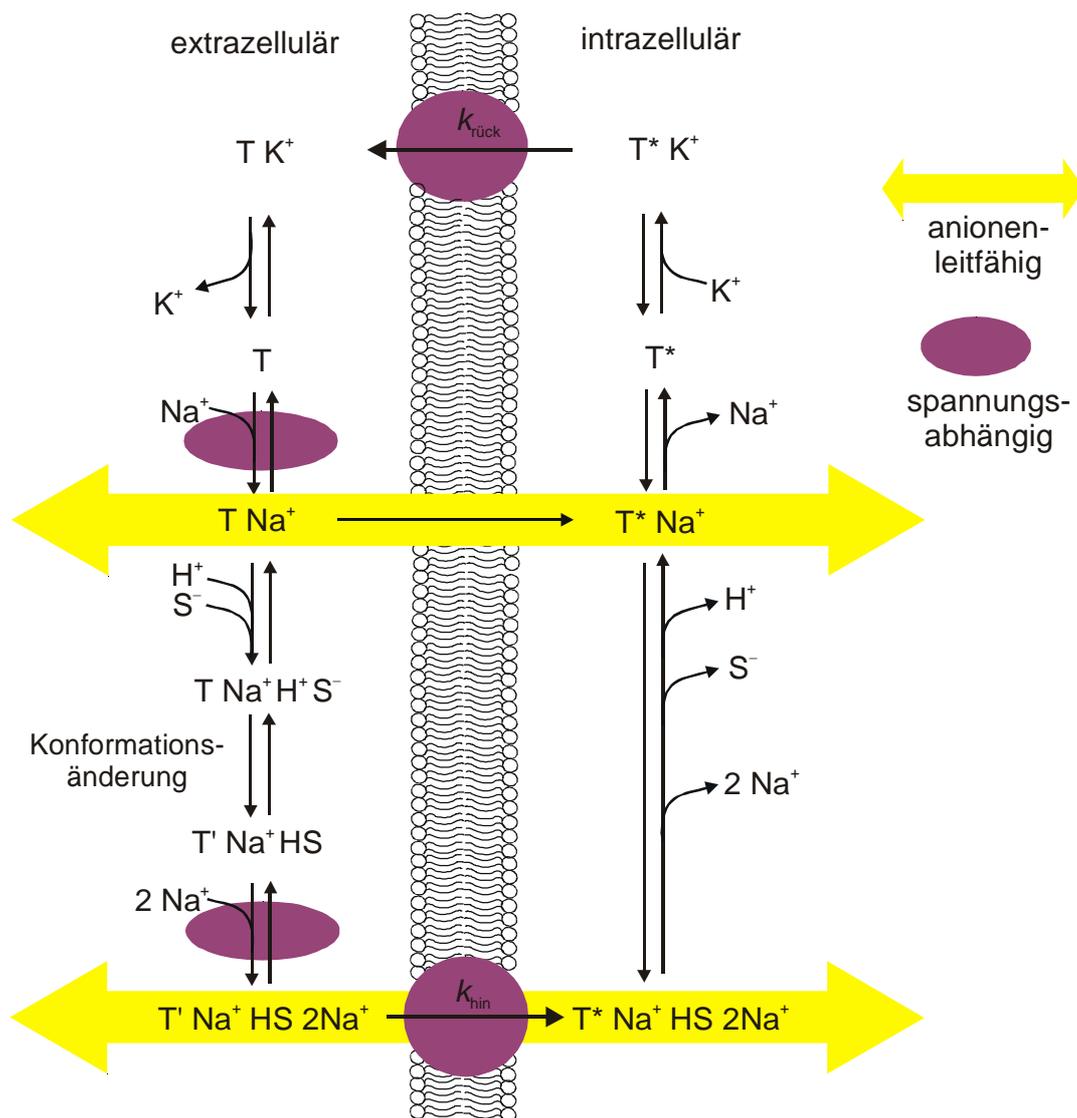


Abb. 4.6: Gesamtmodell für EAAC1. Der mit einem Natriumion, dem Proton und Glutamat beladenen Transporter T durchläuft eine Konformationsänderung, wobei die neue Konformation mit dem Index ' gekennzeichnet wurde. Ist die Bindungsstelle von EAAC1 zur intrazellulären Seite gewandt, wurden die entsprechenden Zustände mit dem Index * versehen. Spannungsabhängige Reaktionen sind dunkel unterlegt. Zustände bzw. Reaktionen, die mit einer Anionenleitfähigkeit assoziiert sind, wurden hell unterlegt. Aufgrund der Übersichtlichkeit wurden bei den abgebildeten Bindungsreaktionen nur die Reaktanten für EAAC1 im Glutamat-Einwärtstransport-Modus dargestellt.

Die Bindung des Protons auf der extrazellulären Seite ist bei physiologischem pH-Wert aufgrund des pK-Wertes des Protonakzeptors in EAAC1 von $\approx 8,0$ begünstigt (siehe 4.3.4.). Ihr schließt sich die elektroneutrale Bindung von Glutamat in seiner anionischen Form an (siehe 4.4.4. und 4.3.4.). Während die bisher besprochenen Bindungsreaktionen auf der extrazellulären Seite schnell abliefen, stellt die Glutamat-induzierte Konformationsänderung eine vergleichsweise langsame Reaktion mit < 1 ms dar (siehe 4.4.3.). Die folgenden elektro-

genen Natriumbindungsreaktionen hingegen sind wieder im schnellen Vorgleichgewicht und führen zum vollständig beladenen Transporter. Mit diesem Zustand ist die Glutamat-induzierte Anionenleitfähigkeit assoziiert, wobei angenommen wird, dass der Anionenfluss an die Substrattranslokation gekoppelt ist. Diese Überlegung beruht auf der Tatsache, dass unabhängig vom Substrat bzw. der Wechselzahl das gleiche Verhältnis zwischen Anionenstrom und Glutamat-Transportstrom bestimmt wurde, wie im Falle von Glutamat und Aspartat (siehe 4.4.6.) bzw. Serin (Li et al., 2000). Die Substrattranslokation ist für Glutamat mit einer Geschwindigkeitskonstanten von $k_{\text{hin}} \approx 300 \text{ s}^{-1}$ für den Transportzyklus nicht geschwindigkeitsbestimmend (siehe 4.2.2.).

Auf der intrazellulären Seite ist die Reihenfolge der Substratdissoziation nur in Bezug auf Protonen und Glutamat untersucht worden. Kanner und Bendahan als auch Otis und Jahr schlugen vor, dass vor der Glutamatdissoziation alle bzw. mindestens ein Natriumion an die intrazelluläre Seite abgegeben werden muss (Kanner und Bendahan, 1982; Otis und Jahr, 1998). Wie oben beschrieben, findet die Glutamatdissoziation vor der Protonendissoziation statt (siehe 4.3.4.) und wird durch diese aufgrund der pK-Verschiebung des Protonakzeptors um $\approx 1,5$ pK-Einheiten stark begünstigt (siehe 4.3.4.). Die Affinität von EAAC1 für Glutamat auf der intrazellulären Seite ist daher im Vergleich zur extrazellulären Seite 45fach reduziert. Der Transportzyklus wird durch die Kalium-induzierte Relokation des Transporters vervollständigt, wobei diese Reaktion elektrogen ist und beim Glutamattransport mit einer Geschwindigkeitskonstante von 30 s^{-1} den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt darstellt (siehe 4.2.3.).

4.5.2. Vergleich der Ergebnisse von EAAC1 mit dem Na⁺-getriebenen Glucosetransporter SGLT1

Der Na⁺-getriebene Glucosetransporter ist ein sekundär-aktiver Transporter, der den elektrochemischen Gradienten von Na⁺ für die Glucoseaufnahme in die Epithelzellen des Darms nutzt. Im Gegensatz zum EAAC1, dessen Glutamattransport durch den Kotransport von drei Natriumionen, einem Proton und dem Gegentransport von einem Kaliumion energetisiert ist, werden beim SGLT1 pro Glucosemolekül nur zwei Natriumionen kotransportiert (Kaunitz et al., 1982). Ebenso unterschiedlich sind die vorgeschlagenen Topologiemodelle für SGLT1 mit 14 Transmembrandomänen (Turk und Wright, 1997) im Vergleich zu EAAC1 mit 8 Transmembrandomänen (siehe 1.1.2.), und während EAAC1 eine Anionenleitfähigkeit aufweist (siehe 4.1.2. und 4.1.3.), findet bei SGLT1 ein gerichteter Wassertransport statt (Loo

et al., 1996). Dennoch besitzen beide Transportersysteme gemeinsame Eigenschaften, auf die im Folgenden eingegangen wird.

Beide Transportproteine verfügen über eine Eigenladung < -1 ((Kessler und Semenza, 1983), siehe 4.2.3.) und die Relokation des Transporters ist elektrogen und stellt den geschwindigkeits-bestimmenden Schritt im Transportzyklus dar ((Parent et al., 1992), siehe 4.2.3.). Die Substrat-abhängige Translokation hingegen findet in beiden Systemen nicht geschwindigkeits-bestimmend statt (siehe 4.2.2.), ist aber im Falle von SGLT1 elektroneutral während bei EAAC1 positive Ladung in die Zelle verschoben wird (siehe 4.2.2.). Darüber hinaus kann bei beiden Transportern eine Na^+ -abhängige Leckleitfähigkeit beobachten werden ((Chen et al., 1997; Parent et al., 1992), siehe 4.4.1. und 4.5.1.), die im Falle von EAAC1 allerdings noch mit einer zusätzlichen Anionenleitfähigkeit assoziiert ist (siehe 4.1.3.). Weitere Gemeinsamkeiten sind die elektrogene(n) extrazelluläre(n) Natriumbindungsreaktion(en) ((Hazama et al., 1997; Loo et al., 1993), siehe 4.4.1.) und die geordnete Bindung von Substrat und Kosubstrat an den Transporter ((Chen et al., 1997; Parent et al., 1992), siehe 4.3.1., 4.4.2. und 4.5.1.).

Na^+ -getriebene Transporter teilen damit viele gemeinsame Eigenschaften, die ein vergleichendes Arbeiten ermöglichen und damit die funktionelle Untersuchung von Transportern erleichtern.

5. Zusammenfassung der Arbeit

In dieser Arbeit wurde der neuronale Glutamattransporter EAAC1 (Excitatory Amino Acid Carrier 1), kloniert aus Rattenretina, in HEK- (Human Embryonic Kidney-) Zellen transient exprimiert und mit Hilfe der *patch clamp*-Technik elektrophysiologisch untersucht. Der Glutamattransport ist gekoppelt an den Kotransport von drei Natriumionen und einem Proton und den Gegentransport von einem Kaliumion. Damit werden pro Transportzyklus zwei positive Nettoladungen in die Zelle verschoben. Zusätzlich zum Glutamattransport verfügt der EAAC1 über eine Glutamat-induzierte Anionenleitfähigkeit, die nicht thermodynamisch an den Glutamattransport gekoppelt ist und besonders deutlich bei chaotropen Anionen (wie SCN^-) in Erscheinung tritt. Eine weitere Funktion des Transporters ist seine Glutamat-unabhängige Leckleitfähigkeit. Mit Hilfe von Ganzzelleableitungen unter definierten ionalen extra- und intrazellulären Bedingungen und bestimmtem Haltepotenzial erfolgte die Charakterisierung des Glutamattransporters von der extrazellulären Seite. Eine hohe Überexpression von EAAC1 in den HEK-Zellen, mit einer durchschnittlichen Dichte von $\approx 4 \cdot 10^3$ Transporter pro μm^2 Zellmembran, erlaubte zudem die Beschreibung des Transporters von der intrazellulären Seite, durch Messungen am *inside-out patch*.

Stationäre Messungen an EAAC1 unter kontrollierten Spannungs- und ionalen Bedingungen ließen verschiedene Aussagen zu über 1) die Bindungsreihenfolge von Glutamat und den kotransportierten Ionen an den Transporter, 2) den Anteil der Anionenleitfähigkeit am Glutamat-induzierten Gesamtstrom 3) die Abhängigkeit der Glutamat-unabhängigen Leckleitfähigkeit und der Glutamat-abhängigen Anionenleitfähigkeit von der Protonen- und Natriumkonzentration und 4) die Identifikation des Ladungsträgers beim EAAC1-assoziierten Leckstrom. Bei den durchgeführten vorstationären Messungen handelte es sich meist um Substratsprung-Experimente mit Hilfe der Laserpuls-Photolyse von $\alpha\text{CNB-caged}$ Glutamat. Damit konnte 1) der geschwindigkeits-bestimmende Schritt im Transportzyklus ermittelt werden, 2) Geschwindigkeitskonstanten verschiedener Teilreaktion im Transportzyklus von EAAC1 abgeschätzt werden und 3) die Spannungsabhängigkeit von Teilreaktionen identifiziert werden. Die Kombination von stationären und vorstationären Messungen mit Hilfe der Laserpuls-Photolyse sowie die Kombination von Ganzzelleableitungen und *inside-out patches* ermöglichte damit eine umfassende kinetische Untersuchung der verschiedenen Funktionen von EAAC1 und führten zu dem im folgenden beschriebenen Transportmodell.

EAAC1 bindet auf der extrazellulären Seite zunächst ein Natriumion, wobei die Natriumbindungsstelle im elektrischen Feld der Membran liegt ($\approx 25\text{--}30\%$). Dieser Na^+ -beladene

Transporterzustand ist assoziiert mit einem Glutamat-unabhängigen Leckstrom, der von Anionen getragen ist. Der Na^+ -Bindungsreaktion schließt sich eine elektroneutrale Protonenbindung an. Der apparente pK-Wert des Protonakzeptors in EAAC1 liegt bei ≈ 8 , sodass unter physiologischen Bedingungen EAAC1 hauptsächlich in seiner protonierten Form vorliegt. Die nachfolgende Glutamatbindung ($K_D \approx 50 \mu\text{M}$) ist ebenfalls spannungsunabhängig und erfolgt mit einer Geschwindigkeitskonstanten von $\approx 2 \cdot 10^7 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$. Sie löst eine elektroneutrale Konformationsänderung aus, die in einem Zeitbereich von 0,5–1 Millisekunde stattfindet und damit langsam ist im Vergleich zu den anschließenden elektrogenen Na^+ -Bindungsreaktionen. Der vollständig beladene Transporter transloziert in einem spannungsabhängigen Prozess (≈ 60 – 65 % des elektrischen Felds) Glutamat über die Membran mit einer Geschwindigkeitskonstanten von $\approx 800 \text{s}^{-1}$ bei einem physiologischen Membranpotenzial von -80mV . Der Glutamat-Transportprozess ist mit der Glutamat-induzierten Anionenleitfähigkeit assoziiert, wobei sich beim Glutamat-Einwärtstransport ein Verhältnis zwischen Transport- und Anionenstrom (von SCN^-) von 1 zu 4 ergab, während es beim Glutamat-Auswärtstransport bei 1 zu 1,5 lag. Die Dissoziationsfolge auf der intrazellulären Seite wurde nur für den Protonen-Glutamat-Kotransport bestimmt und war in umgekehrter Reihenfolge zur extrazellulären Seite. Verschiedene Mechanismen fördern auf der zytosolischen Seite die Dissoziation des Glutamates, bzw. verhindern den Glutamat-Auswärtstransport. So führt die Änderung der Zugänglichkeit des Protonakzeptors zur zytosolischen Seite zu einer Verschiebung des apparenten pK-Wertes zu $\approx 6,5$. Damit liegt EAAC1 unter physiologischen Bedingungen auf der intrazellulären Seite hauptsächlich deprotoniert vor, was die Glutamatdissoziation fördert. Ebenso ist die Affinität mit einem 45fach erhöhten K_M -Wert im Vergleich zur extrazellulären Seite stark herabgesetzt. Die Relokation des Transporters erfolgt nach der Bindung eines Kaliumions und stellt mit einer Geschwindigkeitskonstanten von $\approx 100 \text{s}^{-1}$ (bei einem Membranpotenzial von -80mV) den hauptsächlich geschwindigkeits-bestimmenden Schritt im Transportzyklus dar. Bei der Relokation handelt es sich um einen elektrogenen Prozess (≈ 70 – 75 % des elektrischen Felds), wobei negative Ladungsträger über die Membran verschoben werden. Daher muss der Transporter über eine Eigenladung von < -1 verfügen. Daraus ergibt sich, dass die zu transportierende Nettoladung von zwei positiven Ladungen pro Transportzyklus auf zwei Reaktionsschritte verteilt ist.

Der neuronale Glutamattransporter EAAC1 verfügt damit über verschiedene Mechanismen, den Transportprozess in Richtung Glutamataufnahme in die postsynaptische Nervenzelle zu fördern, entsprechend seiner physiologischen Aufgabe, die Glutamatkonzentration im synaptischen Spalt gering zu halten.

6. Anhang

6.1. Glutamatkonzentrations- und Spannungsabhängigkeit

Nach dem in Abb. 4.1 dargestellten Modell erfolgten Herleitungen zu den im Ergebnisteil bestimmten Konstanten wie K_M -Werte und Geschwindigkeitskonstanten. Dabei wurden die Gleichgewichtskonstanten für den Übergang zwischen Anionen-permeablen und nicht-permeablen Zustand in der Ab- oder Anwesenheit von Glutamat als Φ_1 und Φ_2 bezeichnet. Die Dissoziationskonstante K_D für Glutamat an den Transporter ist der Quotient aus k_{-d} und k_d und die Konzentration der Transporter unter Beobachtung wurde als $[T_0]$ dargestellt.

Unter der Annahme, dass die Bindungs- und Dissoziationsschritte im Transportzyklus sowie die Übergänge zwischen permeablen und nicht-permeablen Zuständen schnell sind, kann das Modell in Abb. 4.1 als ein zwei-Zustands-Modell aufgefasst werden. Dabei wurden die Zustände bei denen die Glutamat-Bindungsstelle von der extrazellulären Seite zugänglich sind zu einem Zustand A zusammen gefasst, während die Zustände bei denen die Glutamat-Bindungsstelle von der intrazellulären Seite zugänglich ist (mit * gekennzeichnet) zu einem Zustand B zusammen gefasst wurden. Der Übergang zwischen A und B ist durch die Geschwindigkeitskonstanten k_{hin} und $k_{\text{rück}}$ gegeben. Für die Bestimmung des stationären Stroms ist damit nur noch die relative Besetzung des Glutamat-gebundenen Transporterzustands (P_{TS}) im angenommenen Vorgleichgewicht entscheidend. Dieser Anteil ist gegeben durch:

$$P_{\text{TS}} = \frac{[\text{S}]}{K_D(1 + 1/\Phi_1) + [\text{S}](1 + 1/\Phi_2)} \quad [1]$$

Für den Transportstrom gilt (siehe 1.5.):

$$I_{\text{stationär}} = [T_0] e \left(z_{\text{hin}} \frac{[\text{A}]}{[\text{A}] + [\text{B}]} P_{\text{TS}} k_{\text{hin}} - z_{\text{rück}} \frac{[\text{B}]}{[\text{A}] + [\text{B}]} k_{\text{rück}} \right) \quad [2]$$

wobei der zeitliche Verlauf der Konzentrationen an $[\text{A}]$ und $[\text{B}]$ gegeben ist durch

$$[\text{A}](t) = \frac{[\text{T}_0]}{(k_{\text{hin}} P_{\text{TS}} + k_{\text{rück}})} (k_{\text{rück}} + k_{\text{hin}} P_{\text{TS}} \exp(-(k_{\text{hin}} P_{\text{TS}} + k_{\text{rück}})t)) \quad [3A]$$

$$[B](t) = \frac{[T_0]}{(k_{\text{hin}} P_{\text{TS}} + k_{\text{rück}})} (k_{\text{hin}} P_{\text{TS}} - k_{\text{hin}} P_{\text{TS}} \exp(-(k_{\text{hin}} P_{\text{TS}} + k_{\text{rück}})t)) \quad [3B]$$

und z_{hin} die verschobene Ladung bei der Hinreaktion (3 positive Ladungen) und $z_{\text{rück}}$ die verschobene Ladung bei der Rückreaktion (eine positive Ladung) darstellt. e ist die Elementarladung.

Der Transportstrom im Fließgleichgewicht ist damit gegeben durch:

$$I_{\text{stationär}} = 2 e [T_0] 1/k_{\text{hin}} \frac{[S]}{K_D (1 + 1/\Phi_1) + [S] (1 + 1/\Phi_2 + k_{\text{hin}}/k_{\text{rück}})} \quad [4]$$

womit sich für den K_M -Wert unter stationären Bedingungen folgende Formel ergibt:

$$K_M^{\text{stationär}} = \frac{K_D (1 + 1/\Phi_1)}{1 + 1/\Phi_2 + k_{\text{hin}}/k_{\text{rück}}} \quad [5A]$$

Im Gegensatz dazu ist der K_M -Wert für den transienten Spitzenstrom, der sich vor der Einstellung des Fließgleichgewichtes ergibt, wiederum allein abhängig von der Konzentration des vollständig beladenen Transporters im Vorgleichgewicht (siehe Formel [1]):

$$K_M^{\text{Spitze}} = \frac{K_D (1 + 1/\Phi_1)}{1 + 1/\Phi_2} \quad [5B]$$

Dies gilt ebenso für die Geschwindigkeitskonstante des Abfalls des transienten Stroms $1/\tau_{\text{Abfall}}$, die der Summe der Geschwindigkeitskonstanten für die Hin- und Rückreaktion entspricht:

$$1/\tau_{\text{Abfall}} = \frac{[S]}{K_D (1 + 1/\Phi_1) + [S] (1 + 1/\Phi_2)} k_{\text{hin}} + k_{\text{rück}} \quad [6A]$$

Während für den Transportprozess vereinfacht von einem zwei-Zustands-Modell ausgegangen werden kann, ist dies für die Bildung des Glutamat-abhängigen permeablen Zustands $\overline{\text{TS}}$ (siehe Abb. 4.1) nicht möglich, da die Glutamatbindung und die Übergänge zu den anionenleitfähigen Zuständen $\overline{\text{TS}}$ und $\overline{\text{T}}$ ungefähr gleich schnell erfolgen. Um nun den Anteil der Transporter im Glutamat-abhängigen anionenleitfähigen Zustand $\overline{\text{TS}}$ im schnellen Vorgleichgewicht zu bestimmen, wurde zur Vereinfachung angenommen, dass die Leckleitfähigkeit und die Glutamattranslokation (k_{hin}) während der Bildung von $\overline{\text{TS}}$ vernachlässigt werden können. Damit gibt es nur noch drei Zustände für den Transporter, die sequentiell durchlaufen werden, freier Transporter (T), Transporter mit Glutamat gebunden (TS) und anionenleitfähiger Zustand $\overline{\text{TS}}$. Die analytische Lösung dieses Systems von Differentialgleichungen ergibt mit $M = [\text{S}]k_{\text{d}} + k_{-\text{d}} + k_{\text{p}} + k_{\text{np}}$:

$$1/\tau_{\text{Anstieg}} = \frac{1}{2} \cdot \left[M \pm \sqrt{(M - 2k_{\text{np}})^2 + 4k_{\text{p}}(k_{\text{np}} - k_{\text{d}})} \right] \quad [6B]$$

Enthält die Versuchslösung Thiocyanationen ergibt sich nach der Besetzung der anionenleitfähigen Zustände $\overline{\text{TS}}$ und $\overline{\text{T}}$ ein Ionenfluss durch den Transporter. Dieser ist bestimmt durch die Wahrscheinlichkeit, dass der Transporter sich in den entsprechenden Zuständen befindet ($P_{\overline{\text{TS}}}$ und $P_{\overline{\text{T}}}$) und durch den Anionenfluss durch einen einzelnen Transporter (I_{einzel}). Damit ergibt sich für den Strom der Glutamat-induzierten Anionenleitfähigkeit I^{Anion} und der Glutamat-unabhängigen Leckleitfähigkeit I^{Leck} unter der Annahme eines Quasi-Kanal-Modells im stationären Zustand:

$$I^{\text{Anion}} = [\text{T}_0] \cdot P_{\overline{\text{TS}}} \cdot I_{\text{einzel}} \quad \text{und} \quad I^{\text{Leck}} = [\text{T}_0] \cdot P_{\overline{\text{T}}} \cdot I_{\text{einzel}} \quad [7A,B]$$

$$\text{mit} \quad P_{\overline{\text{TS}}} = \frac{[\text{S}]}{\Phi_2(K_{\text{D}}(1 + 1/\Phi_1) + [\text{S}](1 + 1/\Phi_2 + k_{\text{hin}}/k_{\text{rück}}))} \quad \text{und} \quad [8A]$$

$$P_{\overline{\text{T}}} = \frac{K_{\text{D}}}{\Phi_1(K_{\text{D}}(1 + 1/\Phi_1) + [\text{S}](1 + 1/\Phi_2 + k_{\text{hin}}/k_{\text{rück}}))} \quad [8B]$$

sowie I_{einzel} für SCN^-

$$I_{\text{einzel}} = P_{\text{SCN}^-} \cdot FV' \cdot \frac{[\text{SCN}^-]_{\text{in}} - [\text{SCN}^-]_{\text{ex}} \cdot \exp(V')}{1 - \exp(V')} \quad [9]$$

wobei P_{SCN^-} die Permeabilität des Thiocyanations darstellt mit $P_{\text{SCN}^-} = \gamma \cdot RT \cdot N_A / F^2 [\text{SCN}^-]$ und V' das reduzierte Potenzial $V' = FV/RT$. F ist die Faradaykonstante, V das Haltepotenzial, R die Gaskonstante, T die Temperatur, N_A die Avogadrokonstante und γ die Einzelkanalleitfähigkeit.

Aus der Formel für I^{Anion} ergibt sich, dass die K_M -Werte für den Transportprozess und die Glutamat-induzierte Anionenleitfähigkeit identisch sind.

Die Spannungsabhängigkeit der EAAC1-assoziierten Ströme resultiert aus der Spannungsabhängigkeit von k_{hin} und $k_{\text{rück}}$. Diese ist gegeben durch:

$$k_{\text{hin}} = k_{\text{hin}}^0 \exp(-z\delta V'/2) \quad [10A]$$

$$k_{\text{rück}} = k_{\text{rück}}^0 \exp(z\delta V'/2) \quad [10B]$$

wobei k_{hin}^0 und $k_{\text{rück}}^0$ die Geschwindigkeitskonstanten bei einer Haltespannung von 0 mV sind, z ist die Zahl der verschobenen Ladung durch das elektrische Feld und δ der Teil des elektrischen Feldes, der den Translokationsprozess beeinflusst.

6.2. pH-Abhängigkeit

Für die Bindungssequenz des Protons an den Transporter im Vergleich zum Glutamat wurden verschiedene Modelle in Betracht gezogen: Die Protonenbindung erfolgt schnell oder langsam vor der Glutamatbindung (THS, THS langsame Bindung), die Protonenbindung ist nach der Glutamatbindung (TSH), das Proton bindet zuerst an Glutamat und anschließend an den Transporter (SHT), Proton und Glutamat binden gleichzeitig an den Transporter (SHT-sim.) und die Protonenbindung findet entweder vor oder nach der Glutamatbindung statt (THS / TSH).

Für die Herleitung der Konstanten K_M -Wert für Glutamat unter stationären Bedingungen, I_{\max} und $1/\tau_{\text{Abfall}}$ wurde angenommen, dass bei sättigenden Konzentrationen an Na^+ und K^+ die Wechselzahl des Transporters allein durch die Konzentration des vollständig beladenen Transporters (drei Na^+ , ein Proton und ein Glutamat) bestimmt ist und die Protonenbindung, wenn nichts anderes vermerkt ist, im Vergleich zur Wechselzahl von EAAC1 schnell stattfindet (schnelles Vorgleichgewicht).

Modell	K_M	I_{\max}	$1/\tau_{\text{Abfall}}$
THS	$\frac{K^S (K^H + [\text{H}])}{[\text{H}]}$	$\neq f([\text{H}])$	$\frac{[\text{S}]}{K_M + [\text{S}]} \cdot k_{\text{hin}} + k_{\text{rück}} \neq f([\text{H}])$
THS langs. Bdg.	$\frac{K^S [\text{H}]}{[\text{H}] + K^H}$	$\frac{[\text{H}]}{K^H + [\text{H}]}$	
TSH	$\frac{K^S K^H}{K^H + [\text{H}]}$	$\frac{[\text{H}]}{K^H + [\text{H}]}$	$\frac{[\text{H}]}{K^H + [\text{H}]} \cdot \frac{[\text{S}]}{K_M + [\text{S}]} \cdot k_{\text{hin}} + k_{\text{rück}} = f([\text{H}])$
SHT / SHT-sim	$\frac{K^S K^H}{[\text{H}]} / \frac{K^{\text{HS}}}{[\text{H}]}$	$\neq f([\text{H}])$	$\frac{[\text{S}]}{K_M + [\text{S}]} \cdot k_{\text{hin}} + k_{\text{rück}} \neq f([\text{H}])$
THS / TSH	$\frac{K^{S2} (K^H + [\text{H}])}{[\text{H}] + K^H K^{S2} / K^{S1}}$	$\frac{[\text{H}]}{[\text{H}] + K^H K^{S2} / K^{S1}}$	$\frac{[\text{H}]}{K^H \frac{K^{S2}}{K^{S1}} + [\text{H}]} \cdot \frac{[\text{S}]}{K_M + [\text{S}]} \cdot k_{\text{hin}} + k_{\text{rück}} = f([\text{H}])$

Tabelle 6.1: Kinetische Gleichungen für die verschiedenen Modelle zum Glutamat-Protonen-Kotransport. K^S und K^H sind die Dissoziationskonstanten für die Glutamat- bzw. Protonenbindung. Im Falle einer Bindung der Substrate in beliebiger Reihenfolge (THS / TSH) steht K^{S1} und K^{S2} für die Dissoziationskonstante des Glutamats vor bzw. nach der Protonenbindung. Sind K^{S1} und K^{S2} identisch, ist der K_M -Wert pH-unabhängig. Bei gleichzeitiger Bindung von Glutamat und Proton an den Transporter hat die entsprechende Dissoziationskonstante K^{HS} die Einheit M^2 .

6.3. Na^+ -Konzentrationsabhängigkeit

Für die Bindungssequenz der drei Natriumionen an den Transporter im Vergleich zum Glutamat wurden verschiedene Modelle in Betracht gezogen: Alle drei Natriumionen binden vor Glutamat (TNa_3S), der Glutamatbindung geht die Bindung von zwei oder einem Na^+ voraus (TNa_2SNa oder TNaSNa_2), die Bindung aller drei Natriumionen erfolgt nach der Bindung von Glutamat (TSNa_3) und die Bindung von Na^+ und Glutamat ist sequentiell aber in beliebiger Reihenfolge ($\text{TNa}_3\text{S} / \text{TSNa}_3$).

Für die Herleitung der Konstanten K_M -Wert für Glutamat unter stationären Bedingungen, I_{\max} und $1/\tau_{\text{Abfall}}$ wurde wie in 6.2. angenommen, dass bei sättigenden Konzentrationen an K^+ die Wechselzahl des Transporters allein durch die Konzentration des vollständig beladenen Transporters (drei Na^+ , ein Proton und ein Glutamat) bestimmt ist und die Na^+ - und Glutamatbindungsreaktionen im schnellen Vorgleichgewicht erfolgen.

Modell	K_M	I_{\max}	$1/\tau_{\text{Abfall}}$
TNa₃S	$K^S \cdot \left(\frac{K^{\text{Na}} + [\text{Na}]}{[\text{Na}]} \right)^3$	$\neq f([\text{Na}])$	$\frac{[\text{S}]}{K_M + [\text{S}]} \cdot k_{\text{hin}} + k_{\text{rück}} \neq f([\text{Na}])$
TNa₂SNa	$K^S \cdot \left(\frac{K^{\text{Na}1/2} + [\text{Na}]}{[\text{Na}]} \right)^2 \cdot \left(\frac{K^{\text{Na}3}}{K^{\text{Na}3} + [\text{Na}]} \right)$	$\frac{[\text{Na}]}{K^{\text{Na}3} + [\text{Na}]}$	$\frac{[\text{Na}]}{K^{\text{Na}3} + [\text{Na}]} \cdot \frac{[\text{S}]}{K_M + [\text{S}]} \cdot k_{\text{hin}} + k_{\text{rück}} = f([\text{Na}])$
TNaSNa₂	$K^S \cdot \left(\frac{K^{\text{Na}1} + [\text{Na}]}{[\text{Na}]} \right) \cdot \left(\frac{K^{\text{Na}2/3}}{K^{\text{Na}2/3} + [\text{Na}]} \right)^2$	$\left(\frac{[\text{Na}]}{K^{\text{Na}2/3} + [\text{Na}]} \right)^2$	$\left(\frac{[\text{Na}]}{K^{\text{Na}2/3} + [\text{Na}]} \right)^2 \cdot \frac{[\text{S}]}{K_M + [\text{S}]} \cdot k_{\text{hin}} + k_{\text{rück}} = f([\text{Na}])$
TSNa₃	$K^S \cdot \left(\frac{K^{\text{Na}}}{K^{\text{Na}} + [\text{Na}]} \right)^3$	$\left(\frac{[\text{Na}]}{K^{\text{Na}} + [\text{Na}]} \right)^3$	$\left(\frac{[\text{Na}]}{K^{\text{Na}} + [\text{Na}]} \right)^3 \cdot \frac{[\text{S}]}{K_M + [\text{S}]} \cdot k_{\text{hin}} + k_{\text{rück}} = f([\text{Na}])$
TNa₃S / TSNa₃	$\neq f([\text{Na}])$	$\left(\frac{[\text{Na}]}{K^{\text{Na}} + [\text{Na}]} \right)^3$	$\left(\frac{[\text{Na}]}{K^{\text{Na}} + [\text{Na}]} \right)^3 \cdot \frac{[\text{S}]}{K_M + [\text{S}]} \cdot k_{\text{hin}} + k_{\text{rück}} = f([\text{Na}])$

Tabelle 6.2: Kinetische Gleichungen für die verschiedenen Modelle zum Glutamat- Na^+ -Kotransport. K^S und K^{Na} , $K^{\text{Na}1}$, $K^{\text{Na}1/2}$, $K^{\text{Na}2/3}$ und $K^{\text{Na}3}$ sind die Dissoziationskonstanten für die Glutamat- bzw. Na^+ -Bindung, wobei die Zahlen die entsprechenden Bindungsstellen vor und nach der Glutamatbindung angeben. Im Falle einer Bindung der Substrate in beliebiger Reihenfolge (TNa₃S / TSNa₃) wurde angenommen, dass alle Dissoziationskonstanten für die drei Natriumionen und Glutamat gleich sind, unabhängig zu welchem Zeitpunkt sie an den Transporter binden. Damit ergibt sich, dass der K_M -Wert bei diesem Modell unabhängig ist von der Natriumkonzentration.

7. Literaturverzeichnis

- Amato, A., Barbour, B., Szatkowski, M. und Attwell, D. (1994). Counter-transport of potassium by the glutamate uptake carrier in glial cells isolated from the tiger salamander retina. *Journal of Physiology* **479**, 371-80.
- Armstrong, N., Sun, Y., Chen, G. Q. und Gouaux, E. (1998). Structure of a glutamate-receptor ligand-binding core in complex with kainate. *Nature* **395**, 913-7.
- Arriza, J. L., Eliasof, S., Kavanaugh, M. P. und Amara, S. G. (1997). Excitatory amino acid transporter 5, a retinal glutamate transporter coupled to a chloride conductance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 4155-4160.
- Arriza, J. L., Fairman, W. A., Wadiche, J. I., Murdoch, G. H., Kavanaugh, M. P. und Amara, S. G. (1994). Functional comparisons of three glutamate transporter subtypes cloned from human motor cortex. *Journal of Neuroscience* **14**, 5559-5569.
- Attwell, D. (2000). Brain Uptake of Glutamate: Food for Thought. *Journal of Nutrition* **130**, 1023S-1025S.
- Barbour, B., Brew, H. und Attwell, D. (1988). Electrogenic glutamate uptake in glial cells is activated by intracellular potassium. *Nature* **335**, 433-5.
- Barbour, B., Brew, H. und Attwell, D. (1991). Electrogenic uptake of glutamate and aspartate into glial cells isolated from the salamander (*Ambystoma*) retina. *Journal of Physiology* **436**, 169-93.
- Barbour, B., Keller, B. U., Llano, I. und Marty, A. (1994). Prolonged presence of glutamate during excitatory synaptic transmission to cerebellar Purkinje cells. *Neuron* **12**, 1331-43.
- Bar-Peled, O., Ben-Hur, H., Biegon, A., Groner, Y., Dewhurst, S., Furuta, A. und Rothstein, J. D. (1997). Distribution of glutamate transporter subtypes during human brain development. *Journal of Neurochemistry* **69**, 2571-80.
- Barry, P. H. und Lynch, J. W. (1991). Liquid junction potentials and small cell effects in patch-clamp analysis [published erratum appears in *J Membr Biol* 1992 Feb;125(3):286]. *Journal of Membrane Biology* **121**, 101-17.
- Bellocchio, E. E., Reimer, R. J., Freneau, R. T., Jr. und Edwards, R. H. (2000). Uptake of glutamate into synaptic vesicles by an inorganic phosphate transporter [see comments]. *Science* **289**, 957-60.
- Bendahan, A., Armon, A., Madani, N., Kavanaugh, M. P. und B.I., K. (2000). Arginine 447 plays a pivotal role in substrate interactions in a neuronal glutamate transporter. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 37436-42.
- Bergles, D. E., Dzubay, J. A. und Jahr, C. E. (1997). Glutamate transporter currents in bergmann glial cells follow the time course of extrasynaptic glutamate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 14821-5.
- Bergles, D. E. und Jahr, C. E. (1997). Synaptic activation of glutamate transporters in hippocampal astrocytes. *Neuron* **19**, 1297-308.
- Bergles, D. E. und Jahr, C. E. (1998). Glial contribution to glutamate uptake at Schaffer collateral-commissural synapses in the hippocampus. *Journal of Neuroscience* **18**, 7709-16.
- Bezanilla, F. (1985). Gating of sodium and potassium channels. *Journal of Membrane Biology* **88**, 97-111.
- Billups, B. und Attwell, D. (1996). Modulation of non-vesicular glutamate release by pH. *Nature* **379**, 171-4.

- Billups, B., Rossi, D. und Attwell, D. (1996).** Anion conductance behavior of the glutamate uptake carrier in salamander retinal glial cells. *Journal of Neuroscience* **16**, 6722-31.
- Bouvier, M., Szatkowski, M., Amato, A. und Attwell, D. (1992).** The glial cell glutamate uptake carrier countertransports pH-changing anions. *Nature* **360**, 471-4.
- Chamberlin, A. R., Koch, H. P. und Bridges, R. J. (1998).** Design and synthesis of conformationally constrained inhibitors of high-affinity, sodium-dependent glutamate transporters. *Methods in Enzymology* **296**, 175-89.
- Chapman, A. G. (2000).** Glutamate and epilepsy. *Journal of Nutrition* **130**, 1043S-5S.
- Chen, C. und Okayama, H. (1987).** High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Molecular & Cellular Biology* **7**, 2745-52.
- Chen, X. Z., Coady, M. J., Jalal, F., Wallendorff, B. und Lapointe, J. Y. (1997).** Sodium leak pathway and substrate binding order in the Na⁺-glucose cotransporter. *Biophysical Journal* **73**, 2503-10.
- Choi, D. W. (1988).** Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron* **1**, 623-34.
- Clements, J. D., Lester, R. A., Tong, G., Jahr, C. E. und Westbrook, G. L. (1992).** The time course of glutamate in the synaptic cleft. *Science* **258**, 1498-501.
- Conradt, M. und Stoffel, W. (1995).** Functional Analysis of the high affinity, Na⁺-dependent glutamate transporter GLAST-1 by site-directed mutagenesis. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 25207-25212.
- Conti, F., Debiassi, S., Minelli, A., Rothstein, J. D. und Melone, M. (1998).** EAAC1, a high-affinity glutamate transporter, is localized to astrocytes and gabaergic neurons besides pyramidal cells in the rat cerebral cortex. *Cerebral Cortex* **8**, 108-116.
- Daikhin, Y. und Yudkoff, M. (2000).** Compartmentation of brain glutamate metabolism in neurons and glia. *Journal of Nutrition* **130**, 1026S-31S.
- Diamond, J. S., Bergles, D. E. und Jahr, C. E. (1998).** Glutamate release monitored with astrocyte transporter currents during LTP. *Neuron* **21**, 425-33.
- Diamond, J. S. und Jahr, C. E. (1997).** Transporters buffer synaptically released glutamate on a submillisecond time scale. *Journal of Neuroscience* **17**, 4672-87.
- Diamond, J. S. und Jahr, C. E. (2000).** Synaptically released glutamate does not overwhelm transporters on hippocampal astrocytes during high-frequency stimulation. *Journal of Neurophysiology* **83**, 2835-43.
- Doyle, D. A., Morais Cabral, J., Pfuetzner, R. A., Kuo, A., Gulbis, J. M., Cohen, S. L., Chait, B. T. und MacKinnon, R. (1998).** The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity [see comments]. *Science* **280**, 69-77.
- Eigen, M. und Hammes, G. G. (1963).** *Advances in Enzymology*, .
- Eliasof, S., Arriza, J. L., Leighton, B. H., Amara, S. G. und Kavanaugh, M. P. (1998).** Localization and function of five glutamate transporters cloned from the salamander retina. *Vision Research* **38**, 1443-1454.
- Eliasof, S. und Jahr, C. E. (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**, 4153-4158.
- Eliasof, S. und Werblin, F. (1993).** Characterization of the glutamate transporter in retinal cones of the tiger salamander. *Journal of Neuroscience* **13**, 402-11.

- Erecinska, M., Troeger, M. B., Wilson, D. F. und Silver, I. A. (1986).** The role of glial cells in regulation of neurotransmitter amino acids in the external environment. II. Mechanism of aspartate transport. *Brain Research* **369**, 203-14.
- Erecinska, M., Wantorsky, D. und Wilson, D. F. (1983).** Aspartate transport in synaptosomes from rat brain. *Journal of Biological Chemistry* **258**, 9069-77.
- Eskandari, S., Kreman, M., Kavanaugh, M. P., Wright, E. M. und Zampighi, G. A. (2000).** Pentameric assembly of a neuronal glutamate transporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 8641-6.
- Fairman, W. A. und Amara, S. G. (1999).** Functional diversity of excitatory amino acid transporters: ion channel and transport modes. *American Journal of Physiology* **277**, F481-6.
- Fairman, W. A., Sonders, M. S., Murdoch, G. H. und Amara, S. G. (1998).** Arachidonic acid elicits a substrate-gated proton current associated with the glutamate transporter EAAT4. *Nature Neuroscience* **1**, 105-13.
- Fairman, W. A., Vandenberg, R. J., Arriza, J. L., Kavanaugh, M. P. und Amara, S. G. (1995).** An excitatory amino-acid transporter with properties of a ligand-gated chloride channel. *Nature* **375**, 599-603.
- Fersht, A. (1999).** *Structure and Mechanism in Protein Science*, W. H. Freeman and Company, New York.
- Forster, I., Hernando, N., Biber, J. und Murer, H. (1998).** The voltage dependence of a cloned mammalian renal type II Na⁺/Pi cotransporter (NaPi-2). *Journal of General Physiology* **112**, 1-18.
- Furuta, A., Martin, L. J., Lin, C. L. G., Dykes Hoberg, M. und Rothstein, J. D. (1997).** Cellular and synaptic localization of the neuronal glutamate transporters excitatory amino acid transporter 3 and 4. *Neuroscience* **81**, 1031-1042.
- Gottfried, J. A. und Chesler, M. (1996).** Temporal resolution of activity-dependent pH shifts in rat hippocampal slices. *Journal of Neurophysiology* **76**, 2804-7.
- Grant, G. B. und Dowling, J. E. (1996).** On bipolar cell responses in the teleost retina are generated by two distinct mechanisms. *Journal of Neurophysiology* **76**, 3842-9.
- Grewer, C. (1999).** Investigation of the alpha(1)-glycine receptor channel-opening kinetics in the submillisecond time domain. *Biophysical Journal* **77**, 727-38.
- Grewer, C., Mobarekeh, S. A. M., Watzke, N., Rauen, T. und Schaper, K. (2000a).** Substrate Translocation Kinetics of Excitatory Amino Acid Carrier 1 Probed with Laser-Pulse Photolysis of a New Photolabile Precursor of D-Aspartic Acid. *Biochemistry* .
- Grewer, C., Watzke, N., Wiessner, M. und Rauen, T. (2000b).** Glutamate translocation of the neuronal glutamate transporter EAAC1 occurs within milliseconds. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 9706-11.
- Grunewald, M., Bendahan, A. und Kanner, B. I. (1998).** Biotinylation of single cysteine mutants of the glutamate transporter GLT-1 from rat brain reveals its unusual topology. *Neuron* **21**, 623-32.
- Grunewald, M. und Kanner, B. (1995).** Conformational changes monitored on the glutamate transporter GLT-1 indicate the existence of two neurotransmitter-bound states. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 17017-17024.
- Grunewald, M. und Kanner, B. I. (2000).** The accessibility of a novel reentrant loop of the glutamate transporter GLT-1 is restricted by its substrate. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 9684-9.

- Hallen, S., Brzezinski, P. und Malmstrom, B. G. (1994).** Internal electron transfer in cytochrome c oxidase is coupled to the protonation of a group close to the bimetallic site. *Biochemistry* **33**, 1467-72.
- Hamill, O. P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B. und Sigworth, F. J. (1981).** Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* **391**, 85-100.
- Haugeto, O., Ullensvang, K., Levy, L. M., Chaudhry, F. A., Honore, T., Nielsen, M., Lehre, K. P. und Danbolt, N. C. (1996).** Brain glutamate transporter proteins form homomultimers. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 27715-22.
- Hazama, A., Loo, D. D. und Wright, E. M. (1997).** Presteady-state currents of the rabbit Na⁺/glucose cotransporter (SGLT1). *Journal of Membrane Biology* **155**, 175-86.
- Hess, G. P. (1993).** Determination of the chemical mechanism of neurotransmitter receptor-mediated reactions by rapid chemical kinetic techniques. *Biochemistry* **32**, 989-1000.
- Jabaudon, D., Scanziani, M., Gahwiler, B. H. und Gerber, U. (2000).** Acute decrease in net glutamate uptake during energy deprivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 5610-5.
- Jabaudon, D., Shimamoto, K., Yasuda-Kamatani, Y., Scanziani, M., Gahwiler, B. H. und Gerber, U. (1999).** Inhibition of uptake unmasks rapid extracellular turnover of glutamate of nonvesicular origin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 8733-8.
- Jonas, P. (2000).** The Time Course of Signaling at Central Glutamatergic Synapses. *News Physiol. Sci.* **15**, 83-89.
- Kanai, Y. und Hediger, M. A. (1992).** Primary Structure and Functional Characterization of a High-Affinity Glutamate Transporter. *Nature* **360**, 467-471.
- Kanai, Y., Nussberger, S., Romero, M. F., Boron, W. F., Hebert, S. C. und Hediger, M. A. (1995).** Electrogenic properties of the epithelial and neuronal high affinity glutamate transporter. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 16561-16568.
- Kanai, Y., Smith, C. P. und Hediger, M. A. (1994a).** A new family of neurotransmitter transporters: the high affinity glutamate transporters. *FASEB J.* **8**, 1450-1459.
- Kanai, Y., Stelzner, M., Nussberger, S., Khawaja, S., Hebert, S. C., Smith, C. P. und Hediger, M. A. (1994b).** The Neuronal and Epithelial Human High Affinity Glutamate Transporter: Insights into structure and mechanism of transport. *Journal of Biological Chemistry* **269**, 20599-20606.
- Kandel, E. R., Schwartz, J. H. und Jessell, T. M. (1995).** *Essentials of Neural Science and Behavior*, Appleton & Lange.
- Kanner, B. I. und Bendahan, A. (1982).** Binding order of substrates to the sodium and potassium ion coupled L-glutamic acid transporter from rat brain. *Biochemistry* **21**, 6327-30.
- Kanner, B. I. und Sharon, I. (1978).** Active transport of L-glutamate by membrane vesicles isolated from rat brain. *Biochemistry* **17**, 3949-53.
- Kaunitz, J. D., Gunther, R. und Wright, E. M. (1982).** Involvement of multiple sodium ions in intestinal d-glucose transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **79**, 2315-8.

- Kavanaugh, M. P., Arriza, J. L., North, R. A. und Amara, S. G. (1992).** Electrogenic uptake of gamma-aminobutyric acid by a cloned transporter expressed in *Xenopus* oocytes. *Journal of Biological Chemistry* **267**, 22007-9.
- Kavanaugh, M. P., Bendahan, A., Zerangue, N., Zhang, Y. und Kanner, B. I. (1997).** Mutation of an amino acid residue influencing potassium coupling in the glutamate transporter GLT-1 induces obligate exchange. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 1703-1708.
- Kessler, M. und Semenza, G. (1983).** The small-intestinal Na⁺, D-glucose cotransporter: an asymmetric gated channel (or pore) responsive to delta psi. *Journal of Membrane Biology* **76**, 27-56.
- Klockner, U., Storck, T., Conradt, M. und Stoffel, W. (1993).** Electrogenic L-glutamate uptake in *Xenopus laevis* oocytes expressing a cloned rat brain L-glutamate/L-aspartate transporter (GLAST-1). *Journal of Biological Chemistry* **268**, 14594-6.
- Koch, H. P., Kavanaugh, M. P., Esslinger, C. S., Zerangue, N., Humphrey, J. M., Amara, S. G., Chamberlin, A. R. und Bridges, R. J. (1999).** Differentiation of substrate and nonsubstrate inhibitors of the high-affinity, sodium-dependent glutamate transporters. *Molecular Pharmacology* **56**, 1095-104.
- Larsson, H. P., Picaud, S. A., Werblin, F. S. und Lecar, H. (1996).** Noise analysis of the glutamate-activated current in photoreceptors. *Biophysical Journal* **70**, 733-742.
- Lauger, P. (1987).** Voltage dependence of sodium-calcium exchange: predictions from kinetic models. *Journal of Membrane Biology* **99**, 1-11.
- Läuger, P. (1991).** Electrogenic Ion Pumps. In: *Electrogenic Ion Pumps* Sinauer Associates Inc., Sunderland, 61-91.
- le Coutre, J. und Gerwert, K. (1996).** Kinetic isotope effects reveal an ice-like and liquid-phase-type intramolecular proton transfer in bacteriorhodopsin. *FEBS Letters* **398**, 333-336.
- Lebrun, B., Sakaitani, M., Shimamoto, K., Yasuda-Kamatani, Y. und Nakajima, T. (1997).** New beta-hydroxyaspartate derivatives are competitive blockers for the bovine glutamate/aspartate transporter. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 20336-9.
- Levy, L. M., Warr, O. und Attwell, D. (1998).** Stoichiometry of the glial glutamate transporter GLT-1 expressed inducibly in a Chinese hamster ovary cell line selected for low endogenous Na⁺-dependent glutamate uptake. *Journal of Neuroscience* **18**, 9620-8.
- Li, J., Fei, J., Huang, F., Guo, L. H. und Schwarz, W. (2000).** Functional significance of N- and C-terminus of the amino acid transporters EAAC1 and ASCT1: characterization of chimeric transporters. *Biochimica et Biophysica Acta* **1467**, 338-46.
- Liaw, S. H., Jun, G. und Eisenberg, D. (1994).** Interactions of nucleotides with fully unadenylylated glutamine synthetase from *Salmonella typhimurium*. *Biochemistry* **33**, 11184-8.
- Lin, C. L., Bristol, L. A., Jin, L., Dykes-Hoberg, M., Crawford, T., Clawson, L. und Rothstein, J. D. (1998).** Aberrant RNA processing in a neurodegenerative disease: the cause for absent EAAT2, a glutamate transporter, in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuron* **20**, 589-602.
- Loo, D. D., Hazama, A., Supplisson, S., Turk, E. und Wright, E. M. (1993).** Relaxation kinetics of the Na⁺/glucose cotransporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**, 5767-71.

- Loo, D. D., Zeuthen, T., Chandy, G. und Wright, E. M. (1996). Cotransport of water by the Na⁺/glucose cotransporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 13367-70.
- Marty, A. und Neher, E. (1995). Tight-Seal Whole-Cell Recording. In: *Single Channel Recording* (eds. B. Sakmann and E. Neher), Plenum Press, New York and London.
- Mennerick, S., Dhond, R. P., Benz, A., Xu, W., Rothstein, J. D., Danbolt, N. C., Isenberg, K. E. und Zorumski, C. F. (1998). Neuronal expression of the glutamate transporter GLT-1 in hippocampal microcultures. *Journal of Neuroscience* **18**, 4490-4499.
- Mennerick, S., Shen, W., Xu, W., Benz, A., Tanaka, K., Shimamoto, K., Isenberg, K. E., Krause, J. E. und Zorumski, C. F. (1999). Substrate turnover by transporters curtails synaptic glutamate transients. *Journal of Neuroscience* **19**, 9242-51.
- Mennerick, S. und Zorumski, C. F. (1994). Glial contributions to excitatory neurotransmission in cultured hippocampal cells. *Nature* **368**, 59-62.
- Milburn, T., Matsubara, N., Billington, A. P., Udgaonkar, J. B., Walker, J. W., Carpenter, B. K., Webb, W. W., Marque, J., Denk, W., McCray J. A. und Hess, G. P. (1989). Synthesis Photochemistry and Biological Activity of a Caged Photolabile Acetylcholine Receptor Ligand. *Biochemistry* **28**, 49-56.
- Mitrovic, A. D., Amara, S. G., Johnston, G. A. und Vandenberg, R. J. (1998). Identification of functional domains of the human glutamate transporters EAAT1 and EAAT2. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 14698-706.
- Mutch, W. A. und Hansen, A. J. (1984). Extracellular pH changes during spreading depression and cerebral ischemia: mechanisms of brain pH regulation. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* **4**, 17-27.
- Nelson, P. J., Dean, G. E., Aronson, P. S. und Rudnick, G. (1983). Hydrogen ion cotransport by the renal brush border glutamate transporter. *Biochemistry* **22**, 5459-63.
- Nicholls, D. G. und Ward, M. W. (2000). Mitochondrial membrane potential and neuronal glutamate excitotoxicity: mortality and millivolts. *Trends in Neurosciences* **23**, 166-74.
- Noda, M., Nakanishi, H. und Akaike, N. (1999). Glutamate release from microglia via glutamate transporter is enhanced by amyloid-beta peptide. *Neuroscience* **92**, 1465-74.
- O'Kane, R. L., Martinez-Lopez, I., DeJoseph, M. R., Vina, J. R. und Hawkins, R. A. (1999). Na⁽⁺⁾-dependent glutamate transporters (EAAT1, EAAT2, and EAAT3) of the blood-brain barrier. A mechanism for glutamate removal. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 31891-5.
- Otis, T. S. und Jahr, C. E. (1998). Anion currents and predicted glutamate flux through a neuronal glutamate transporter. *Journal of Neuroscience* **18**, 7099-110.
- Otis, T. S. und Kavanaugh, M. P. (2000). Isolation of current components and partial reaction cycles in the glial glutamate transporter EAAT2. *Journal of Neuroscience* **20**, 2749-57.
- Otis, T. S., Kavanaugh, M. P. und Jahr, C. E. (1997). Postsynaptic glutamate transport at the climbing fiber-Purkinje cell synapse. *Science* **277**, 1515-8.
- Palmada, M. und Centelles, J. J. (1998). Excitatory amino acid neurotransmission. Pathways for metabolism, storage and reuptake of glutamate in brain. *Front Biosci.* **20**, D701-718.
- Parent, L., Supplisson, S., Loo, D. D. und Wright, E. M. (1992). Electrogenic properties of the cloned Na⁺/glucose cotransporter: II. A transport model under nonrapid equilibrium conditions [published erratum appears in *J Membr Biol* 1992 Nov;130(2):203]. *Journal of Membrane Biology* **125**, 63-79.

- Peghini, P., Janzen, J. und Stoffel, W. (1997).** Glutamate transporter EAAC-1-deficient mice develop dicarboxylic aminoaciduria and behavioral abnormalities but no neurodegeneration. *EMBO Journal* **16**, 3822-32.
- Picaud, S. A., Larsson, H. P., Grant, G. B., Lecar, H. und Werblin, F. S. (1995).** Glutamate-gated chloride channel with glutamate-transporter-like properties in cone photoreceptors of the tiger salamander. *Journal of Neurophysiology* **74**, 1760-1771.
- Pines, G., Danbolt, N. C., Bjoras, M., Zhang, Y., Bendahan, A., Eide, L., Koepsell, H., Storm Mathisen, J., Seeberg, E. und Kanner, B. I. (1992).** Cloning and Expression of a Rat Brain L Glutamate Transporter. *Nature* **360**, 464-467.
- Pines, G., Zhang, Y. und Kanner, B. I. (1995).** Glutamate 404 is involved in the substrate discrimination of GLT-1, a (Na⁺ + K⁺)-coupled glutamate transporter from rat brain. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 17093-17097.
- Pusch, M., Ludewig, U., Rehfeldt, A. und Jentsch, T. J. (1995).** Gating of the voltage-dependent chloride channel CIC-0 by the permeant anion. *Nature* **373**, 527-31.
- Rossi, D. J., Oshima, T. und Attwell, D. (2000).** Glutamate release in severe brain ischaemia is mainly by reversed uptake. *Nature* **403**, 316-21.
- Rothstein, J. D., Dykes-Hoberg, M., Pardo, C. A., Bristol, L. A., Jin, L., Kuncl, R. W., Kanai, Y., Hediger, M. A., Wang, Y., Schielke, J. P. und Welty, D. F. (1996).** Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron* **16**, 675-86.
- Rothstein, J. D., Martin, L., Levey, A. I., Dykes-Hoberg, M., Jin, L., Wu, D., Nash, N. und Kuncl, R. W. (1994).** Localization of neuronal and glial glutamate transporters. *Neuron* **13**, 713-25.
- Ruitenbergh, M., Kannt, A., Bamberg, E., Ludwig, B., Michel, H. und Fendler, K. (2000).** Single-electron reduction of the oxidized state is coupled to proton uptake via the K pathway in *Paracoccus denitrificans* cytochrome c oxidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**, 4632-4636.
- Sanders, D., Hansen, U. P., Gradmann, D. und Slayman, C. L. (1984).** Generalized kinetic analysis of ion-driven cotransport systems: a unified interpretation of selective ionic effects on Michaelis parameters. *Journal of Membrane Biology* **77**, 123-52.
- Schwartz, E. A. und Tachibana, M. (1990).** Electrophysiology of glutamate and sodium co-transport in a glial cell of the salamander retina. *Journal of Physiology* **426**, 43-80.
- Seal, R. P. und Amara, S. G. (1998).** A reentrant loop domain in the glutamate carrier EAAT1 participates in substrate binding and translocation. *Neuron* **21**, 1487-98.
- Seal, R. P., Leighton, B. H. und Amara, S. G. (2000).** A model for the topology of excitatory amino acid transporters determined by the extracellular accessibility of substituted cysteines. *Neuron* **25**, 695-706.
- Shashidharan, P., Huntley, G. W., Murray, J. M., Buku, A., Moran, T., Walsh, M. J., Morrison, J. H. und Plaitakis, A. (1997).** Immunohistochemical localization of the neuron-specific glutamate transporter EAAC1 (EAAT3) in rat brain and spinal cord revealed by a novel monoclonal antibody. *Brain Research* **773**, 139-48.
- Shaw, P. J., Forrest, V., Ince, P. G., Richardson, J. P. und Wastell, H. J. (1995).** CSF and plasma amino acid levels in motor neuron disease: elevation of CSF glutamate in a subset of patients. *Neurodegeneration* **4**, 209-16.

- Shayakul, C., Kanai, Y., Lee, W. S., Brown, D., Rothstein, J. D. und Hediger, M. A. (1997).** Localization of the high-affinity glutamate transporter EAAC1 in rat kidney. *American Journal of Physiology* **273**, F1023-F1029.
- Shimamoto, K., Shigeri, Y., Yasuda-Kamatani, Y., Lebrun, B., Yumoto, N. und Nakajima, T. (2000).** Syntheses of Optically Pure beta-Hydroxyaspartate Derivatives as Glutamate Transporter Blockers. *Bioorg. Med. Chem.* **10**, 2407-2410.
- Silver, I. A. und Erecinska, M. (1992).** Ion homeostasis in rat brain in vivo: intra- and extracellular [Ca²⁺] and [H⁺] in the hippocampus during recovery from short-term, transient ischemia. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* **12**, 759-72.
- Slotboom, D. J., Konings, W. N. und Lolkema, J. S. (1999a).** Structural features of the glutamate transporter family. *Microbiology & Molecular Biology Review (Washington, DC)* **63**, 293-307.
- Slotboom, D. J., Sobczak, I., Konings, W. N. und Lolkema, J. S. (1999b).** A conserved serine-rich stretch in the glutamate transporter family forms a substrate-sensitive reentrant loop. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 14282-7.
- Sonders, M. S. und Amara, S. G. (1996).** Channels in transporters. *Current Opinion in Neurobiology* **6**, 294-302.
- Storck, T., Schulte, S., Hofmann, K. und Stoffel, W. (1992).** Structure, expression, and functional analysis of a Na(+)-dependent glutamate/aspartate transporter from rat brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**, 10955-9.
- Südhof, T. C. (1995).** The synaptic vesicle cycle: a cascade of protein-protein interactions. *Nature* **375**, 645-53.
- Szatkowski, M., Barbour, B. und Attwell, D. (1990).** Non-vesicular release of glutamate from glial cells by reversed electrogenic glutamate uptake. *Nature* **348**, 443-6.
- Takahashi, M., Sarantis, M. und Attwell, D. (1996).** Postsynaptic glutamate uptake in rat cerebellar Purkinje cells. *Journal of Physiology* **497**, 523-30.
- Takamori, S., Rhee, J. S., Rosenmund, C. und Jahn, R. (2000).** Identification of a vesicular glutamate transporter that defines a glutamatergic phenotype in neurons [see comments]. *Nature* **407**, 189-94.
- Tong, G. und Jahr, C. E. (1994).** Block of glutamate transporters potentiates postsynaptic excitation. *Neuron* **13**, 1195-203.
- Torp, R., Danbolt, N. C., Babaie, E., Bjoras, M., Seeberg, E., Strom-Mathisen, J. und Ottersen, O. P. (1992).** Differential expression of the two glial glutamate transporters in the rat brain: an in situ hybridization study. *Eur J Neurosci* **6**, 936-942.
- Torp, R., Hoover, F., Danbolt, N. C., Storm Mathisen, J. und Ottersen, O. P. (1997).** Differential distribution of the glutamate transporters GLT1 and rEAAC1 in rat cerebral cortex and thalamus: An in situ hybridization analysis. *Anatomy & Embryology* **195**, 317-326.
- Trotti, D., Danbolt, N. C. und Volterra, A. (1998).** Glutamate transporters are oxidant-vulnerable: a molecular link between oxidative and excitotoxic neurodegeneration? *Trends in Pharmacological Sciences* **19**, 328-34.
- Trotti, D., Nussberger, S., Volterra, A. und Hediger, M. A. (1997).** Differential modulation of the uptake currents by redox interconversion of cysteine residues in the human neuronal glutamate transporter EAAC1. *European Journal of Neuroscience* **9**, 2207-12.

- Turecek, R. und Trussell, L. O. (2000).** Control of synaptic depression by glutamate transporters. *Journal of Neuroscience* **20**, 2054-63.
- Turk, E. und Wright, E. M. (1997).** Membrane topology motifs in the SGLT cotransporter family. *Journal of Membrane Biology* **159**, 1-20.
- Turner, R. J. (1981).** Kinetic analysis of a family of cotransport models. *Biochimica et Biophysica Acta* **649**, 269-80.
- Tymianski, M., Charlton, M. P., Carlen, P. L. und Tator, C. H. (1993).** Source specificity of early calcium neurotoxicity in cultured embryonic spinal neurons. *Journal of Neuroscience* **13**, 2085-104.
- Tzingounis, A. V., Lin, C. L., Rothstein, J. D. und Kavanaugh, M. P. (1998).** Arachidonic acid activates a proton current in the rat glutamate transporter EAAT4. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 17315-7.
- Viitanen, P., Garcia, M. L., Foster, D. L., Kaczorowski, G. J. und Kaback, H. R. (1983).** Mechanism of lactose translocation in proteoliposomes reconstituted with lac carrier protein purified from *Escherichia coli*. 2. Deuterium solvent isotope effects. *Biochemistry* **22**, 2531-6.
- Voet, D. und Voet, J. G. (1992).** *Biochemie*, VCH-Verlag, Weinheim.
- Wadiche, J. I., Amara, S. G. und Kavanaugh, M. P. (1995a).** Ion fluxes associated with excitatory amino acid transport. *Neuron* **15**, 721-728.
- Wadiche, J. I., Arriza, J. L., Amara, S. G. und Kavanaugh, M. P. (1995b).** Kinetics of a human glutamate transporter. *Neuron* **14**, 1019-1027.
- Wadiche, J. I. und Kavanaugh, M. P. (1998).** Macroscopic and microscopic properties of a cloned glutamate transporter/chloride channel. *Journal of Neuroscience* **18**, 7650-61.
- Watzke, N., Rauen, T., Bamberg, E. und Grewer, C. (2000).** On the Mechanism of Proton Transport by the Neuronal Excitatory Amino Acid Carrier 1. *J. Gen. Physiol.* **116**, 609-621.
- Widdas, W. F. (1952).** Inability of Diffusion to account for Placental Glucose Transfer in the Sheep and Consideration of the Kinetics of a Possible Carrier Transfer. *J. Physiol* **118**, 23-39.
- Wieboldt, R., Gee, K. R., Niu, L., Ramesh, D., Carpenter, B. K. und Hess, G. P. (1994).** Photolabile precursors of glutamate: Synthesis, photochemical properties, and activation of glutamate receptors on a microsecond time scale. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**, 8752-8756.
- Wierzbicki, W., Berteloot, A. und Roy, G. (1990).** Presteady-state kinetics and carrier-mediated transport: a theoretical analysis. *Journal of Membrane Biology* **117**, 11-27.
- Yamada, K., Watanabe, M., Shibata, T., Tanaka, K., Wada, K. und Inoue, Y. (1996).** EAAT4 is a post-synaptic glutamate transporter at Purkinje cell synapses. *Neuroreport* **7**, 2013-2017.
- Yellen, G., Jurman, M. E., Abramson, T. und MacKinnon, R. (1991).** Mutations affecting internal TEA blockade identify the probable pore-forming region of a K⁺ channel. *Science* **251**, 939-42.
- Zeevalk, G. D., Davis, N., Hyndman, A. G. und Nicklas, W. J. (1998).** Origins of the extracellular glutamate released during total metabolic blockade in the immature retina. *Journal of Neurochemistry* **71**, 2373-81.
- Zerangue, N., Arriza, J. L., Amara, S. G. und Kavanaugh, M. P. (1995).** Differential modulation of human glutamate transporter subtypes by arachidonic acid. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 6433-5.
- Zerangue, N. und Kavanaugh, M. P. (1996a).** Flux coupling in a neuronal glutamate transporter. *Nature* **383**, 634-637.

- Zerangue, N. und Kavanaugh, M. P. (1996b).** Interaction of L-cysteine with a human excitatory amino acid transporter. *Journal of Physiology* **493**, 419-23.
- Zhang, Y., Bendahan, A., Zarbiv, R., Kavanaugh, M. P. und Kanner, B. I. (1998).** Molecular determinant of ion selectivity of a (Na⁺ plus K⁺)-coupled rat brain glutamate transporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 751-755.
- Zhang, Y. und Kanner, B. I. (1999).** Two serine residues of the glutamate transporter GLT-1 are crucial for coupling the fluxes of sodium and the neurotransmitter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 1710-5.
- Zhang, Y., Pines, G. und Kanner, B. I. (1994).** Histidine 326 is critical for the function of GLT-1, a (Na⁺ + K⁺)-coupled glutamate transporter from rat brain. *Journal of Biological Chemistry* **269**, 19573-19577.

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Christof Grewer für die exzellente Betreuung meiner Arbeit, die Unterstützung bei allen technischen und theoretischen Fragen, die ständige Diskussionsbereitschaft und für die nötigen Kinetik-Nachhilfestunden. Ohne seinen unermüdlichen Einsatz hätte die Arbeit in diesem Umfang nicht durchgeführt werden können.

Bei Herrn Prof. Bamberg möchte ich mich für sein stetes Interesse und die bestmögliche Förderung meiner Arbeit bedanken.

Herrn Prof. Wässle danke ich für die spontane Bereitschaft zur Übernahme des Korreferates.

Herrn Dr. Thomas Rauen danke ich für die Überlassung des EAAC1-Klons.

Bei Martina Dumbsky möchte ich mich für die vielen Tipps und die Unterstützung bei der Hege und Pflege der HEK-Zellen bedanken.

Mein herzlicher Dank gilt allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Prof. Bamberg für die vielen schönen Stunden und die Hilfe bei dieser Arbeit mit Rat und Tat. Andreas Haase und Maarten Ruitenbergh danke ich für ihre Unterstützung in allen Computerfragen, Gudrun Sauer danke ich für die Diskussionen über Bindungsreihenfolgen und Na⁺-getriebene Transporter, Barbara Legrum half mir bei der Zellkultur, Helga Volk war die Designerin aller meiner schönen Poster und den Teetrinkern um 16 Uhr möchte ich für die netten Gespräche und Kekse danken.

Frank Weinreich danke ich für die vielen kritischen Anmerkungen zu meiner Arbeit und die Bereitschaft, sich auch noch nachts über Glutamattransporter zu unterhalten.

Bei der deutschen Forschungsgemeinschaft möchte ich mich für die finanzielle Förderung meiner Arbeit bedanken.

Lebenslauf

Name Natalie Watzke
Anschrift Kleyerstr. 53
60326 Frankfurt am Main
Geburtstag /-ort 14.12.1970 in Ulm

Schulbildung

1977 - 1981 Grundschule in Weißenhorn
1981 - 1990 Nikolaus-Kopernikus-Gymnasium in Weißenhorn

Berufsbildung

1990 - 1992 Ausbildung zur MTA am Schulzentrum für nicht-ärztliche medizinische Berufe der Universität Ulm

Studium

1992 - 1994 Studium der Biochemie an der Universität Regensburg (Abschluss Vordiplom)
1994 - 1997 Studium der Biochemie an der Universität Hannover (Abschluss Diplom)
Mai 1997 - November 1997 Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für Biophysik in Frankfurt am Main ("Funktionelle Expression und elektrophysiologische Charakterisierung von Halorhodopsin aus *Halobacterium salinarum* in Froschoozyten")
seit Dezember 1997 Doktorarbeit am Max-Planck-Institut für Biophysik ("Untersuchungen zum molekularen Mechanismus des neuronalen Glutamattransporters EAAC1")