

Aus dem  
CharitéCentrum für Neurologie, Neurochirurgie und Psychiatrie  
Institut für Neuropathologie  
Direktor: Prof. Dr. med. F. L. Heppner

## **Habilitationsschrift**

# **Glutamattransport im zentralen Nervensystem – Untersuchungen nach traumatischer Schädigung und transienter globaler Ischämie**

zur Erlangung der Lehrbefähigung  
für das Fach Neuropathologie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

**Dr. med. Frank van Landeghem**

**Eingereicht:**

**Januar 2009**

**Dekanin:**

**Prof. Dr. med. A. Grüters-Kieslich**

**1. Gutachter:**

**Prof. Dr. med. K. Schmieder, Mannheim**

**2. Gutachter:**

**Prof. Dr. med. T. Acker, Gießen**

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Zusammenfassung</b> .....	<b>3</b>
<b>2. Einleitung: Schädel-Hirntrauma und Glutamattransport</b> .....	<b>5</b>
2.1 Epidemiologie und Histopathologie .....	5
2.2 Pathogenese des Schädel-Hirntrauma .....	7
2.3 Glutathomöostase und Glutamattransporter .....	9
2.3.1 Natrium-gekoppelte Glutamattransporter .....	10
2.3.2 Regulation der Natrium-gekoppelten Glutamattransporter .....	11
2.3.3 Cystin/Glutamat-Antiporter .....	13
2.4 Störung der Glutathomöostase und Exzitotoxizität .....	14
2.5 Neuroprotektion durch Induktion des Glutamattransports .....	15
2.5.1 "Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide" (PACAP) .....	16
2.5.2 Noradrenalin .....	17
2.6 Fragestellungen .....	18
<b>3. Humane post-mortem Untersuchungen und tierexperimentelle Studien zur Expression von Glutamattransportern und PACAP</b> .....	<b>19</b>
3.1 Frühzeitige Expression von Glutamattransporter-Proteinen in ramifizierten Mikrogliazellen nach „Controlled Cortical Impact Injury“ in der Ratte .....	19
3.2 Verminderte Expression von Glutamattransportern in Astrozyten nach humanem Hirntrauma .....	34
3.3 Expression von PACAP und Glutamattransportern in Satelliten-Oligodendrozyten im humanen ZNS .....	47
3.4 Zelluläre Lokalisation von PACAP nach humanem SHT .....	56
3.5 Dosisabhängiger Effekt von Noradrenalin auf die Kontusionsentwicklung nach „Controlled Cortical Impact Injury“ .....	67
<b>4. Diskussion</b> .....	<b>79</b>
<b>5. Danksagung</b> .....	<b>81</b>
<b>6. Literatur</b> .....	<b>82</b>
<b>7. Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>96</b>
<b>8. Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>97</b>
<b>9. Erklärung</b> .....	<b>98</b>

# 1. Zusammenfassung

Die vorliegenden Arbeiten zur zellulären Expression von Glutamattransportern zeigen folgende Ergebnisse:

- Im normalen Gehirn exprimieren Nervenzellen, Astrozyten und Oligodendrozyten Glutamattransporter, wohingegen ruhende Mikrogliazellen keine Expression von Glutamattransportern zeigen.
- Posttraumatisch kommt es zu einer raschen und ausgeprägten, aber transienten Reduktion von Glutamattransporter exprimierenden Astrozyten.
- Nach transients globaler Ischämie ist eine rasch auftretende, ausgeprägte und länger andauernde Reduktion von Glutamattransporter exprimierenden, perineuronal gelegenen Oligodendrozyten der grauen Substanz zu beobachten.
- Posttraumatisch zeigen ramifizierte Mikrogliazellen rasch eine de novo-Expression der Glutamattransporter EAAT1 und EAAT2.
- Posttraumatisch exprimieren reaktive Astrozyten in hoher Anzahl die Glutamattransporter EAAT1 und EAAT2.

Während die Hauptlast der Glutamataufnahme im normalen Gehirn die Astrozyten tragen, können Oligodendrozyten in Satellitenstellung zu Nervenzellen im perineuronalen Mikroenvironment zur Glutamataufnahme beitragen. Posttraumatisch wird im Zuge der reaktiven astrozytären Gliose der Anstieg der Glutamatkonzentration im Liquor abgebremst und ein Plateau erreicht. Die posttraumatische de novo-Expression von Glutamattransportern der Mikrogliazellen ist jedoch nicht ausreichend, die posttraumatische Reduktion insbesondere der Astrozyten und die damit einhergehende Einschränkung der Aufnahme extrazellulären Glutamats zu kompensieren.

Die Untersuchungen der zellulären Expression der Peptide PACAP38 und PACAP27 zeigen, dass

- im normalen Gehirn Nervenzellen, Astrozyten und Oligodendrozyten beide PACAP-Formen exprimieren
- es nach Trauma bzw. nach transients globaler Ischämie zu einer raschen numerischen Abnahme PACAP27- und PACAP38-exprimierender Astrozyten und Oligodendrozyten kommt
- sich perikontusionell im Zuge der reaktiven Gliose rasch eine numerische Zunahme PACAP-exprimierender Astrozyten findet

Die posttraumatische reaktive astrozytäre Gliose ist offenbar Teil einer endogenen neuroprotektiven Reaktion nach Trauma, die mit einer vermehrten Expression von Glutamattransportern und der sie regulierenden Peptiden einhergeht.

Noradrenalin spielt auch in der Regulation des astrozytären Glutamattransports eine Rolle. Nach kontinuierlicher exogener Applikation von Noradrenalin in verschiedenen Konzentrationen findet sich nach Hirntrauma („Controlled Cortical Impact Injury“ (CCII)-Modell in der Ratte) eine konzentrationsabhängige neuroprotektive Wirkung. Eine Noradrenalin-Infusion in niedriger Dosierung resultiert 48 Stunden nach CCII in einem um 44% reduzierten Kontusionsareal. Eine weiterführende Arbeit soll untersuchen, ob eine Induktion des Glutamattransports durch Noradrenalin zu dieser neuroprotektiven Wirkung beiträgt.

## **2. Einleitung: Schädel-Hirntrauma und Glutamattransport**

### **2.1 Epidemiologie und Histopathologie**

Das Schädel-Hirntrauma (SHT) ist eine der häufigsten Krankheitsursachen in den hochentwickelten Ländern. In der Bundesrepublik Deutschland beträgt die jährliche Anzahl der SHT aller Schweregrade ungefähr 200.000 (106), durchschnittlich 800 Patienten pro 100 000 Einwohner (199). Die Mortalität ist nach wie vor hoch und liegt insgesamt bei circa 20%. Männer sind durchschnittlich dreimal so häufig wie Frauen betroffen. Der Anteil an Kindern und Jugendlichen unter den Patienten ist besonders hoch, das SHT stellt sogar die häufigste Todesursache junger Erwachsener dar (199). Auch bei Erwachsenen unter dem 45. Lebensjahr ist das SHT die häufigste Ursache für Mortalität und Morbidität. Ursächlich für diese Verletzungen sind in 72 Prozent Verkehrsunfälle, in 10 Prozent häusliche Unfälle, in 8 Prozent Arbeitsunfälle, in 6 Prozent Sportunfälle und in 4 Prozent sonstige Unfälle (199).

Von besonderer sozioökonomischer Bedeutung ist das schwere SHT, bei dem die Patienten definitionsgemäß anhaltend bewusstlos sind. Das schwere SHT ist trotz der intensivmedizinischen und verkehrssicherheitstechnischen Fortschritte der letzten Jahrzehnte nach wie vor ein mit hoher Letalität bzw. schwerer Behinderung behaftetes Krankheitsbild. Das European Brain Injury Consortium veröffentlichte 1999 die klinischen Ergebnisse von 1005 Erwachsenen mit SHT, die in 12 europäischen Neurotrauma-Zentren über einen Zeitraum von 3 Monaten erfasst wurden (141). Von allen Patienten starben 31%, 3% verblieben in einem vegetativen Status, 16% wurden schwerbehindert, und 31% erholten sich ohne klinisch nennenswerte bleibende Behinderung. Die Anzahl der behandlungsbedürftigen Patienten mit schwerem SHT liegt in der Bundesrepublik Deutschland pro Jahr bei 10.000 bis 15.000 (199). In etwa einem Drittel der Patienten mit schwerem SHT liegt eine raumfordernde und daher operationsbedürftige intrakranielle Blutung oder Impressionsfraktur vor. Die restlichen zwei Drittel dieser Patienten werden auf den Intensivstationen konservativ behandelt (106). Aufgrund der pathophysiologischen Abläufe bei der Entstehung der traumatischen Hirnschädigung kommt der konservativen Therapie eine wesentliche Bedeutung zu. Aufgrund dieser Tatsachen ist es unerlässlich, experimentell und klinisch weitere Erkenntnisse zur Pathophysiologie und Therapie des Hirntraumas zu gewinnen.

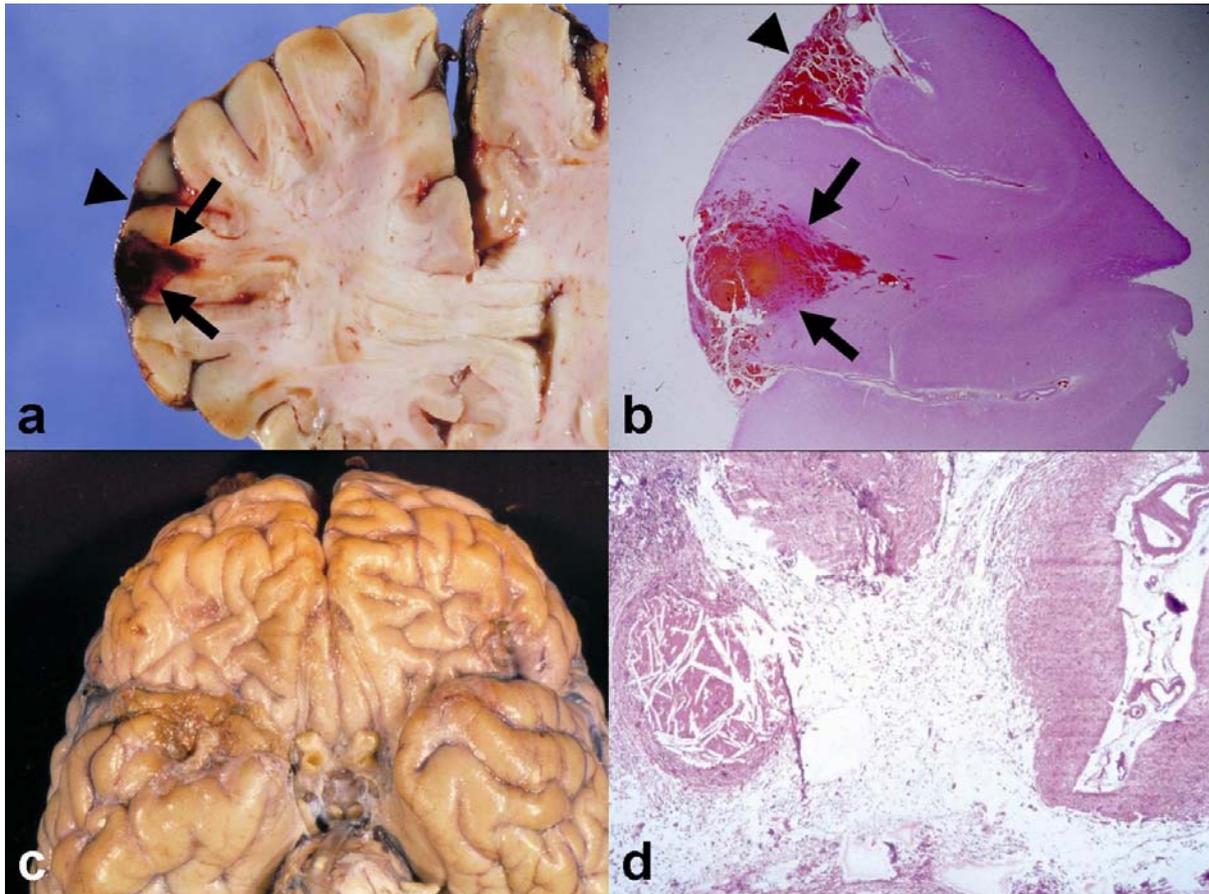
Traumatische Läsionen des zentralen Nervensystems werden nach der Verletzungsart, dem Läsionsmuster und dem Zeitverlauf eingeteilt (67, 148): man unterscheidet gedeckte und offene Verletzungen, fokale und diffuse Verletzungen, primäre und sekundäre Schädigungen sowie Verletzungen des Parenchyms und des Hüllsystems (der äußeren Weichteile, Knochen

und inneren Hüllen). Zu den fokalen Schädigungen des Gehirns zählen die Kontusion, die Laceration, die Blutung und die Infektion, zu den diffusen Schädigungen der diffuse Axonschaden (DAI), der diffuse Gefäßschaden, die hypoxisch-ischämische Schädigung und die diffuse Hirnschwellung (Ödem, Kongestion).

Verletzungsmuster und -schweregrad sind von Ort und Ausmaß der einwirkenden Energie, vom Lebensalter (z.B. Hirnatrophie, Festigkeit des Schädelknochens), von einer möglichen chemischen Beeinflussung (z.B. Alkohol), von zusätzlichen Verletzungen (z.B. Schocksituation bei Polytrauma) und von der Zeitspanne, bis erste lebenserhaltende Maßnahmen durchgeführt werden konnten, abhängig. Klinische Ausfallserscheinungen treten in Abhängigkeit von der Lokalisation der fokalen und diffusen Hirnschädigung auf.

Klinisch unterscheidet man eine *Commotio cerebri* von einer *Contusio cerebri*. Während bei der *Commotio* morphologisch ein diffuser Axonschaden vorliegen kann (16), werden bei der Kontusion (Rindenprellungsherd) drei Stadien unterschieden (63, 67, 148, 215): 1. Blutungen und Nekrosen, 2. Resorption und Organisation, sowie 3. End- und Defektstadium.

Frische Rindenprellungsherde bestehen aus punktförmigen, z.T. konfluierenden Blutungen, die subpial, kortikal oder im oberflächlichen Marklager gelegen sind (Abb. 1). Die Windungskuppen sind bevorzugt betroffen. Die Nekrosezone demarkiert sich unter Ausbildung der charakteristischen Keil- oder Napfform, wobei die Spitze Richtung Marklager und die Basis Richtung Leptomeningen zeigt (Abb. 1a und b). Im Endstadium nehmen Lipo- und Siderophagen im Inneren des Defekts langsam zahlenmäßig ab (Abb. 1c und d). Die Dauer bis zum Erreichen des Endstadiums ist abhängig von der Größe der Kontusion. So kann die Organisation kleiner Kontusionen schon nach 14 Tagen abgeschlossen sein, in großen können jedoch Reste nekrotischen Hirngewebes und von Blutungen Monate und länger nachweisbar sein.



**Abb. 1:** **a)** Keilförmige frontale Kontusion (Pfeile) mit SAB (Pfeilspitze). **b)** Frische, bis ins subkortikale Marklager reichende Kontusionsblutungen und frische SAB (aus a, HE x2,5). **c)** Ausgedehnte ältere Kontusionen des Frontal- und Temporallappenpols. **d)** Pseudozystische Umwandlung einer älteren Kontusion im Defektstadium mit ischämischer Sekundärschädigung und locker verteilten Lipo- und Siderophagen (aus c, HE x10 (aus (223))).

## 2.2 Pathogenese des Schädel-Hirntrauma

Für das Verständnis der therapeutischen Problematik ist es wichtig, dass man beim SHT zwischen primären und sekundären Hirnschäden unterscheiden kann.

Zur primären Schädigung werden die Folgen der direkten mechanischen Gewalteinwirkung wie zum Beispiel die Kontusion gezählt. Hierbei scheint es sich um eine zunächst funktionelle Störung zu handeln, die sich zu ganz frühen Überlebenszeitpunkten noch nicht morphologisch manifestiert, sondern in einer ausgeprägten Störung der Zellmembranintegrität (sogenannte „Mechanoporation“) besteht (67). Das Ausmaß der primären, mechanisch bedingten Schädigung ist von der Unfallursache mit ihren speziellen physikalischen Kräften, von dem Alter des Unfallopfers, präexistierenden Erkrankungen, dem psychosozialen Status und dem Ernährungsstatus abhängig. Die primäre Schädigung induziert Rezeptor-medierte

Mechanismen, die ihrerseits zu einem Anstieg an intrazellulärem Kalzium und zur Bildung freier Radikale führt. Lokale Entzündungsprozesse spielen hierbei eine wesentliche Rolle.

Der Begriff des sekundären Hirnschadens subsumiert verschiedene pathophysiologische Abläufe der posttraumatischen Frühphase, die eine Verschlimmerung des primären Schadens bewirken, unter anderem zählt man hierzu den Anstieg des intrakraniellen Drucks (ICP, „intracranial pressure“), die Dysregulation des zerebralen Perfusionsdrucks (CPP, „cerebral perfusion pressure“), das Auftreten sekundärer Ischämien, die Bildung eines Hirnödems, die Dysregulation der extrazellulären Glutamatkonzentration, Infektionen oder epileptische Anfälle Stunden oder Tage nach dem eigentlichen Trauma (67). Die Hauptmanifestationen dieser sekundären Schädigung wie Hirnödem, erhöhter intrazerebraler Druck und Ischämie sind häufig beschrieben und zumindest zum Teil klinisch fassbar (9).

Über zahlreiche Wechselwirkungen können sich die einzelnen pathogenetischen Mechanismen gegenseitig verstärken. Der CPP ist definiert als mittlerer arterieller Blutdruck (MABP) minus ICP und steuert über den Druckgradienten den zerebralen Blutfluss (CBF) und die metabolische Zufuhr. So trägt die Verminderung der lokalen kortikalen Perfusion zur Ausbildung der Ischämie und Zunahme des Sekundärschadens bei (20, 65, 98, 105, 211). Zahlreiche klinische und experimentelle Studien zeigen, dass der Aufrechterhaltung des CPP für die Entwicklung des Sekundärschadens bzw. das Outcome nach SHT eine wichtige Bedeutung zukommt (26, 69, 82, 85, 128, 132, 133, 177, 191, 213). Zur Einstellung des therapeutisch optimalen CPP gibt es zwei Therapie-Konzepte: das „Lund-Konzept“ und das „CPP-Management“ (nach Rosner).

Das „Lund-Konzept“ ist eine ICP-gesteuerte Therapie und basiert auf den Prinzipien der Hirnvolumen-Regulation und zerebralen Mikrozirkulation. Nach diesem Konzept sind die Entwicklung eines vasogenen Hirnödems und eine gestörte perikontusionelle Mikrozirkulation die wesentlichen Folgen eines schweren SHT (8, 48). Eine medikamentöse Absenkung des arteriellen Blutdruckes würde zu einer Abnahme des hydrostatischen kapillären Druckes führen und durch eine Verminderung der transkapillären Filtration zur Verminderung des vasogenen Hirnödems wesentlich beitragen. Umgekehrt würde eine Steigerung des Blutdruckes die Ödementstehung fördern. Das Ödem würde zu einer Zunahme des intrakraniellen Druckes und nachfolgend zu einer Kompression der Gefäße und Verminderung der Mikrozirkulation führen. Darüberhinaus könnte eine medikamentöse Anhebung des Blutdruckes mit Katecholaminen eine zerebrale Vasokonstriktion verursachen und das Risiko eines verminderten CBF trotz Anhebung des arteriellen Blutdruckes steigern.

Nach dem Lund-Konzept sollte ein relativ niedriger CPP (auch um 50 mmHg) angestrebt werden, um den ICP auf Werte unter 20 mmHg zu senken (8, 48).

Das Konzept des „CPP-Management“ basiert hingegen auf der Annahme, dass es posttraumatisch zu einer Ischämie und Hypoxie kommt, die wiederum die Entstehung eines zytotoxischen Hirnödems bedingen (177). Da die zerebrale Autoregulation nach schwerem SHT weitestgehend intakt bleiben soll, würde eine medikamentöse Anhebung des arteriellen Blutdruckes über eine Vasokonstriktion zur Reduktion des intrazerebralen Blutvolumens und zum Abfall des ICP führen. Das therapeutische Ziel des „CPP-Management“ ist ein möglichst niedriger ICP und ein möglichst hoher CPP (in einem Bereich von 70 – 100 mmHg) (177).

Zwei experimentelle Studien zeigen jedoch, dass der CPP nach SHT nicht unterhalb 70 mm Hg liegen sollte, da sonst die sekundäre Hirnschädigung nach kortikaler Kontusion zunimmt (103, 105). Eine Anhebung des CPP auf über 70 mm Hg ist nicht notwendig und könnte unter Umständen ebenfalls zu einer Verschlechterung des klinischen Outcomes führen. Wenn notwendig, kann sowohl in der Früh- als auch Spätphase nach SHT der CPP mittels intravenöser Gabe von Katecholaminen angehoben werden.

Der Zusammenhang von CPP, Ischämie und Hirnödem zeigt exemplarisch, dass zahlreiche Wechselwirkungen zwischen den einzelnen pathogenetischen Mechanismen der sekundären Hirnschädigung bestehen. Aus diesen Gründen wird das SHT auch als „The most complex injury to the most complex organ of the body“ bezeichnet.

### **2.3 Glutathomöostase und Glutamattransporter**

Die Aminosäure L-Glutamat ist der wichtigste exzitatorische Neurotransmitter im zentralen Nervensystem der Säugetiere. Glutamat ist im Gehirn wahrscheinlich an nahezu allen physiologischen Abläufen wie Kognition, Gedächtnis und Lernen beteiligt (37). Wichtige Aufgaben erfüllt es aber auch bei der Entwicklung des zentralen Nervensystems (130, 216). So beeinflusst Glutamat zum Beispiel das Aussprossen neuronaler Fortsätze (159, 170), die GABAerge Aktivität (217) oder die Migration von Neuronen (100, 179). Präsynaptisch wird die Freisetzung von vesikulärem Glutamat z. B. über Complexine und SNAP-Rezeptoren („soluble *N*-ethylmaleimide-sensitive factor-attachment protein“) gesteuert (78, 153, 154). Auch in peripheren Organen und Geweben sowie im Endokrinium ist Glutamat ein unverzichtbarer Transmitter. Es entfaltet seine Wirkung über verschiedene Subtypen ionotroper und metabotroper Glutamatrezeptoren (37, 147).

Ionotrope Glutamatrezeptoren kann man aufgrund ihrer pharmakologischen Eigenschaften in drei Subtypen einteilen: den *N*-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptor, den  $\alpha$ -Amino-3-

Hydroxy-5-Methylisoxazol-4-Propionat (AMPA)-Rezeptor und den Kainat-Rezeptor. Sie bilden Kationenkanäle, deren Aktivierung Leitfähigkeitsänderungen in der postsynaptischen Membran für eine Dauer von wenigen Millisekunden, d.h. die schnelle Komponente des postsynaptischen Stroms, hervorruft. AMPA- und Kainat-Rezeptoren besitzen eine schnelle Kinetik und sind permeabel für Natrium-, Kalium- und Calciumionen. NMDA-Rezeptoren besitzen spannungsabhängige mono- und divalente Kationenkanäle, die für Calciumionen weitaus permeabler sind.

Metabotrope Glutamatrezeptoren (mGluRs) sind G-Protein gekoppelte Rezeptoren, deren Aktivierung über Phosphoinositid-abhängige Prozesse, cAMP oder Proteinkinase C vermittelt wird. Auch mGluRs werden weiter in drei Subtypen unterteilt: Gruppe I (mGluR1 und mGluR5), Gruppe II (mGluR2 und mGluR3), und Gruppe III (mGluR4, mGluR6, mGluR7, und mGluR8) (95).

Die normale extrazelluläre Glutamatkonzentration liegt im mikromolaren Bereich (1-3  $\mu\text{M}$ ), während intrazellulär millimolare Konzentrationen (10-100 mM) vorliegen (163). Um dieses Konzentrationsgefälle aufrecht erhalten zu können, bedarf es eines energieabhängigen Transportsystems, der zur Wiederaufnahme des synaptisch freigesetzten Glutamats führt.

### *2.3.1 Natrium-gekoppelte Glutamattransporter*

Fünf Glutamattransporter mit hoher Glutamataffinität sind bislang identifiziert worden: GLAST/EAAT1 (201), GLT1/EAAT2 (163), EAAC1/EAAT3 (89), EAAT4 (51) und EAAT5 (7). Die humanen Transporter EAAT1, EAAT2 und EAAT3 weisen eine hohe Homologie zu den bei der Ratte als GLAST, GLT1 bzw. EAAC1 bezeichneten Transportern auf (163, 201). Nachfolgend wird zur Vereinfachung unabhängig von der Spezies ausschließlich die EAAT („excitatory amino acid transporter“-Nomenklatur benutzt. Der Glutamattransport ist ein energieabhängiger sowie Natrium- und Kalium-gekoppelter Prozess (10, 86, 120), der das intrazelluläre Glutamat auf das 10.000fache gegenüber dem Extrazellulärraum zu konzentrieren vermag (90, 91, 143). Der Transport eines Glutamations ist gekoppelt an den Kotransport von drei Natriumionen und einem Wasserstoffion ins Zellinnere, während ein Kaliumion ausgeschleust wird (4, 37, 91). Eine erhöhte extrazelluläre Glutamatkonzentration ist neurotoxisch und führt zum Untergang von Neuronen (sog. Exzitotoxizität, siehe 1.3) (28, 137, 150).

Eine EAAT1-Expression findet man im Cerebellum, im frontalen Kortex, im Hippokampus sowie den Basalganglien (112). Die Expression von EAAT2 ist vorwiegend auf den motorischen Kortex, den Hippocampus und die Basalganglien beschränkt. EAAT3 findet sich vor allem im Hippocampus, im Kleinhirn und in den Basalganglien (33, 108), allerdings in

einer weit niedrigeren Konzentration als die Erstgenannten (75). EAAT4 wird von den Purkinje-Zellen des Cerebellums exprimiert (51). EAAT5 wird in spezialisierten Astrozyten (sog. Müller-Glia) der Retina gefunden (7).

Die glialen Glutamattransporter EAAT1 und EAAT2 besitzen den größten Anteil an der Glutamatclearance aus dem Extrazellulärraum (2, 75, 180). Dabei sind EAAT1 und EAAT2 vorwiegend in der astrozytären Plasmamembran zu finden (23, 38, 113, 182). Astrozyten scheinen beide Proteine zu coexprimieren (112). Diese Befunde stimmen mit der Beobachtung überein, dass die effiziente Glutamataufnahme aus dem Extrazellulärraum (neben der Aufnahme anderer Neurotransmitter, von extrazellulärem Kalium und der Regulierung des Wasserhaushalts) eine der Hauptaufgaben von Astrozyten ist (94). EAAT2 wird während der Entwicklung, in Zellkulturen und in pathologisch verändertem Gewebe auch neuronal exprimiert, nicht aber im reifen, gesunden zentralen Nervensystem (37). Eine andere wichtige Rolle spielen neuronale EAATs auch bei der Aufnahme von Cystin für die Glutathionsynthese (24).

Rothstein et al. inhibierten pharmakologisch in organotypischen Slice-Kulturen des Rückenmarks den Glutamattransport und konnten eine ausgeprägte Nervenzellschädigung feststellen (181). In Mäusen, bei denen die drei Glutamattransporter EAAT1-3 selektiv inhibiert wurden, konnte man neurodegenerative Veränderungen, motorische Defizite und epileptische Anfälle beobachten (180). EAAT1- bzw. EAAT2-Defizienz in Mäusen erhöht die Vulnerabilität bezüglich des Sekundärschadens nach Hirntrauma (207, 232). Eine weitere Studie konnte zeigen, dass die funktionelle Ausschaltung durch antisense-Oligodeoxynukleotide von EAAT2 den hippokampalen Nervenzellschaden nach sog. „Controlled Cortical Impact Injury“ (CCII) vergrößert (172). Während die Ausschaltung von EAAT2 eine Verschlechterung des neurologischen Outcomes in einem experimentellen Ischämiemodell bewirkte, hatte die Ausschaltung des neuronalen Glutamattransporters EAAC1 keine Auswirkung (171). Die Ergebnisse dieser Studien unterstreichen den neuroprotektiven Stellenwert der Aufrechterhaltung eines suffizienten Glutamattransportes nach experimentellem Hirntrauma.

### *2.3.2 Regulation der Natrium-gekoppelten Glutamattransporter*

Die Expression und die funktionelle Aktivität der Glutamattransporter wird durch eine Vielzahl endogener Faktoren moduliert, darunter auch von Glutamat und Glutamat-Analoga selbst (147). Diese sind in der Lage, die Expression und Kinetik der Glutamattransporter zu modulieren. Hierbei könnte Glutamat im Sinne eines hirneigenen Feedback-Mechanismus

durch Induktion seiner eigenen Wiederaufnahme die glutamaterge Transmission selbst unterbrechen (60, 62).

Auch die Rezeptoren für Glutamat haben Einfluss auf die Exprimierung der Glutamattransporter. So konnte zum Beispiel eine erhöhte EAAT1-Expression in Astrozytenzellkulturen festgestellt werden, wenn diese mit spezifischen ionotropen oder Gruppe II-metabotropen Glutamatrezeptoragonisten behandelt wurden (61, 62). Gegenätzlich war das Ergebnis, wenn die Astrozytenkulturen mit einem Agonisten des metabotropen Glutamatrezeptors der Gruppe I behandelt wurden – hier zeigte sich eine Downregulation von EAAT1 (61).

Die sog. „glutamate transporter-associated-proteins“ (GTRAPs) regulieren ebenfalls den Glutamattransport: EAAT4 wird beispielsweise durch GTRAP41 und GTRAP48 in seiner Zelloberflächenexpression und Aktivität verstärkt (83). Die EAAT3-Expression hingegen wird durch GTRAP3-18 negativ moduliert und die Glutamataufnahmefähigkeit nimmt deutlich ab (118).

In einer Studie zur experimentellen ischämischen Präkonditionierung konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung des „peroxisome proliferator-activated receptor“ (PPAR) gamma, ein nukleärer Rezeptor, in vitro zu einer vermehrten Glutamataufnahme, zu einer gesteigerten Expression von EAAT2 mRNA und Protein sowie zu einem vermindertem Zelluntergang und einer verminderten Glutamatfreisetzung führt (176).

Eine weitere Möglichkeit der EAAT-Aktivitätsregulierung scheinen die Kinasen darzustellen: eine Aktivierung der Proteinkinase C, der Proteinkinase A und/oder der Phosphatidylinositol 3-Kinase erhöht durch Phosphorylierung die Aktivität und/oder die Zelloberflächenexpression der EAATs (40, 197, 236). Substanzen wie „platelet derived growth factor“ (PDGF), der „epidermal growth factor“ (EGF), der „insulin-like growth factor“ (IGF) oder Östrogen, die nicht direkt am Glutamatrezeptor oder am Glutamattransporter angreifen, üben ihre regulatorische Funktion über Kinasen aus (147).

Auch das „pituitary adenylate cyclase activating polypeptide“ (PACAP) ist eine dieser Substanzen und verstärkt über Proteinkinase A und Proteinkinase C die astrozytäre Expression und Aktivität von EAAT1 und EAAT2 (54).

Verschiedene Neurotransmitter beeinflussen ebenfalls die Glutamataufnahme. Dopamin inhibiert die Aktivität der Glutamattransporter (93), was möglicherweise durch die Absenkung des basalen cAMP verursacht wird. Eine Stimulation  $\alpha$ -adrenerger Rezeptoren steigert die Glutamataufnahme in Astrozytenkulturen, wohingegen Agonisten  $\beta$ -adrenerger Rezeptoren inhibitorisch wirken (73). Von freien NO- und Sauerstoffradikalen ist bekannt,

dass sie die Glutamataufnahme im Rattengehirn bzw. in Astrozytenkulturen vermindern (166, 229, 230). Diese Hemmung kann durch Arachidonsäure verstärkt werden (228, 230).

### 2.3.3 Cystin/Glutamat-Antiporter

Glutathion (GSH) ist das wichtigste zelluläre Antioxidans im Nervensystem von Säugetieren (45). Verschiedene oxidative Stresssituationen können einen schnellen Verbrauch oder Verlust von GSH verursachen, der eine de novo Synthese von GSH nach sich zieht. Die intrazelluläre Verfügbarkeit von Cystein reguliert die Produktion von GSH (152). Im ZNS wird Cystein hauptsächlich über den Transporter ASC-1 aufgenommen, der vorwiegend neuronal exprimiert wird (77).

Das Natrium-unabhängige Antiporter-System  $x_c^-$  (Cystin/Glutamat-Antiporter, CGA) wiederum ist für die Aufnahme von Cystin, dem Redox-Partner des Cysteins, in die Zelle verantwortlich (11, 12, 231). Dabei wird Cystin ins Zellinnere aufgenommen und 1:1 mit Glutamat ausgetauscht, das in den Extrazellulärraum freigesetzt wird. In vitro konnte der Transport von Cystin in Makrophagen (162), C6 Gliomzellen und primären Astrozyten der Ratte (27), PC12 Zellen (58) und primären kortikalen Neuronen der Ratte (138, 140) nachgewiesen werden. Im Zellinneren wird Cystin sehr schnell zu Cystein reduziert (34, 131). Die Transportrate von Cystin in die Zelle wird auf diese Weise limitierend für die Produktion von GSH.

System  $x_c^-$  ist ein Heterodimer, gebildet aus der bei Aminosäuretransportern weit verbreiteten schweren Kette 4F2hc und der spezifischen leichten Kette xCT. xCT konnte in vitro in Makrophagen (162), in primären neuronalen Zellkulturen (194), in immortalisierten (209) und primären (64) Astrozyten sowie in der neuronalen Zelllinie HT22 (115), aber auch im humanen Gehirn und im Maushirn nachgewiesen werden (13, 21, 185, 186). Die zwei Komponenten von System  $x_c^-$  sind vorwiegend in Neuronen, Gliazellen und in Zellen der Blut-Hirn- oder der Liquor-Hirn-Schranke wie Ependymzellen, Gefäßendothelzellen, Zellen des Plexus choroideus und der Leptomeningen nachgewiesen worden (21).

Erhöhte extrazelluläre Glutamatkonzentrationen blockieren den Cystintransport mittels System  $x_c^-$ . Der nicht-ionotrope Glutamat-induzierte Zelltod ist direkt proportional zur Fähigkeit des Glutamats, den Cystintransport in die Zelle zu inhibieren. Niedrige Cystinkonzentrationen oder erhöhte Glutamatkonzentrationen des Zellkultur-Mediums besitzen ähnliche zytotoxische Auswirkungen. Dieses Phänomen ist in primären Neuronen des Hippokampus der Ratte (139), primären embryonalen kortikalen Neuronen (138, 140), Astrozyten (25), Oligodendrozyten (149) und der neuronalen Zelllinie HT22 der Maus (187, 204) beschrieben worden. Die Glutamat-vermittelte Inhibition der Cystinaufnahme führt zu

einer Verminderung von GSH, resultiert in oxidativem Stress und Oxytosis, einer Form des programmierten Zelltods (205).

## **2.4 Störung der Glutathomöostase und Exzitotoxizität**

Die exzessive Aktivierung der Glutamatrezeptoren führt zu Nervenzellschädigungen bis hin zum irreversiblen Untergang (sog. Exzitotoxizität) (28, 137, 150). Vermittelt wird die Exzitotoxizität vorwiegend über ionotrope NMDA-Rezeptoren (76). Daneben kommt es aber auch bei der Aktivierung von metabotropen Rezeptoren der Gruppe I zu einer verstärkten Nervenzellschädigung nach Trauma oder Ischämie, während die Aktivierung der Gruppe II- und Gruppe III-Rezeptoren neuroprotektiv wirkt (1).

Die Mechanismen, die letztendlich zum exzitotoxischen Untergang von Zellen führen, sind komplex und umfassen unter anderem einen intrazellulären Calciumanstieg, eine mitochondriale Dysfunktion, die Entstehung von freien Radikalen, die Aktivierung von potenziell destruktiven biochemischen Abläufen (z. B. Aktivierung von Kinasen, Lipasen, Phospholipasen, Endonucleasen und Proteasen) sowie das Anlaufen der inflammatorischen Kaskaden und Genaktivierungen (147).

Eine weitere Erklärung für die nervenzellschädigende Wirkung des Glutamats gibt die Hypothese der sog. oxidativen Glutamattoxizität: hohe extrazelluläre Glutamatkonzentrationen inhibieren den Cystein/Glutamat-Antiporter, so dass die Aufnahme von Cystein und konsekutiv die Glutathionsynthese stark vermindert wird. In Folge des oxidativen Stresses kommt es zum Zelluntergang (193).

Dementsprechend ist eine Störung der Glutathomöostase auch an vielen pathophysiologischen Zuständen des zentralen Nervensystems wie z. B. der amyotrophen Lateralsklerose, der Epilepsie, des Morbus Alzheimer, des Morbus Parkinson, der zerebralen Ischämie und der Schizophrenie beteiligt (37).

In verschiedenen tierexperimentellen Traumamodellen wurde ein akuter und ausgeprägter posttraumatischer Anstieg der extrazellulären exzitatorischen Aminosäuren, insbesondere des Glutamats beschrieben (49, 72, 92, 99, 144, 155, 206, 224). Auch beim Menschen konnten erhöhte Konzentrationen von exzitatorischen Aminosäuren im Liquor von Patienten nach SHT nachgewiesen werden (237). Die erhöhten extrazellulären Glutamatkonzentrationen sind auf den posttraumatischen Zelluntergang, einen cytosolischen Efflux, eine vermehrte präsynaptische Freisetzung, funktionelle Änderungen der Glutamatrezeptoren und eine Störung der Wiederaufnahme des Glutamats zurückzuführen, z.B. in Folge der Inhibierung durch freie Sauerstoffradikale (62, 68, 97, 114, 116, 143, 173, 184, 192, 198, 224).

Hypothetisch könnte es in vivo auch zu einer posttraumatischen Umkehr des Glutamattransports kommen (178) - das Vorliegen einer solchen Transporterumkehr wurde nach experimentellem Hirntrauma bisher noch nicht untersucht.

Kürzlich hat eine Arbeitsgruppe im Rahmen einer Analyse des EAAT2-Promotors einen Polymorphismus identifizieren können, der zu einer verminderten Expression von EAAT2, zu erhöhten Glutamatkonzentrationen im Plasma und zu schlechteren neurologischen Frühergebnissen nach Schlaganfall führen kann (127).

## **2.5 Neuroprotektion durch Induktion des Glutamattransports**

Im Fokus dieser Arbeit steht die Frage, ob posttraumatisch eine Induktion des Glutamattransports möglich und ob eine solche Induktion neuroprotektiv ist. Aus diesem Grund wird an dieser Stelle nur auf anti-exzitotoxische Therapieansätze näher eingegangen.

Substanzen wie z.B. Vitamin E (234), Natriumkanalblocker (22),  $Mg^{2+}$  (188), aktiviertem Protein C (71), sog. „Heat shock“-Proteinen (41), „glial-derived neuronal neurotrophic factor“ (GDNF) (233), der Gruppe II mGluR-Agonist DCG IV ((2S,1'R,2'R,3'R)-2-(2,3-Dicarboxycyclopropyl)Glycin; (19, 134, 239), Östrogen (158) und dem Serum-Proteinaseinhibitor Neuroserpin (110, 235) haben tierexperimentell Nervenzellen gegen Exzitotoxizität schützen können und damit ihr neuroprotektives Potential gezeigt. Die Steigerung des Glutamatausstroms ins Blut (Oxaloacetat (238)) oder die Verstärkung des intrazerebralen Glutamattransports („Peroxisome proliferator-activated receptor“ (PPAR)-Agonisten, (123, 157, 176, 214) stellen vielversprechende therapeutische Ansätze zur Verminderung des erhöhten extrazellulären Glutamats und der Exzitotoxizität dar.

Allerdings zeigten auch NMDA-Rezeptorantagonisten in zahlreichen tierexperimentellen Studien eine anti-exzitotoxische Wirksamkeit. Im klinischen Studien konnte dieses neuroprotektive Potential jedoch nicht nachvollzogen werden (81): so weisen z.B. die Daten einer Studie, in der NMDA-Antagonisten innerhalb von 24 Stunden nach Ischämie gegeben wurden, auf ein schlechteres funktionelles Ergebnis und eine höhere Mortalität der Patienten hin (136). Zudem kann es unter regelrechter Dosierung zu starken unerwünschten Wirkungen kommen (135).

Citicolin (Cytidin-50-Diphosphocholin) vermindert die Freisetzung von Glutamat aus geschädigten Nervenzellen und verstärkt die Glutamataufnahme in Astrozyten (80). Zudem schwächt es die posttraumatische/postischämische Verminderung von ATP ab. In mehreren Studien an Schlaganfall-Patienten konnte eine neuroprotektive Wirkung von Citicolin nachgewiesen werden (39, 208). Dagegen zeigten zwei klinische Studien keinen wesentlichen

Effekt von Citicolin (31, 32). Tierexperimentell konnte der neuroprotektive Effekt in Modellen zerebraler Ischämie klar gezeigt werden (3, 6, 70, 88, 151, 189, 196).

In vitro erhöht Tacrolimus (FK506) die Aktivität von Glutamattransportern in Astrozytenkulturen und verhindert einen stressbedingten Glutamatanstieg (109). Dieser Effekt scheint über ein zytosolisches FK506-binding Protein vermittelt zu werden, welches selektiv EAAT2 induziert und in Zellkulturen zu einem Schutz vor chronischer Exzitotoxizität führte (59). Im Tierversuch konnte allerdings bisher kein wesentlicher Effekt auf die extrazelluläre Glutamatkonzentration (202) oder auf das Kontusionsvolumen (210) nachgewiesen werden.

In Zellkultur und in einem Tiermodell der amyotrophen Lateralsklerose steigerte Ceftriaxon, ein  $\beta$ -Laktam Antibiotikum, die Expression und die Aktivität des Glutamattransporters EAAT2 (119, 183). Das Überleben der Versuchstiere konnte durch die Gabe von Ceftriaxon signifikant verlängert werden (183). In einem Tiermodell der fokalen Ischämie konnte das Infarkt volumen um 50% verkleinert werden, wenn das Antibiotikum vor dem ischämischen Geschehen appliziert wird (30). Allerdings konnte dieser neuroprotektive Effekt nicht in dem CCII-Traumamodell nachvollzogen werden (Dr. Sakowitz, Klinik für Neurochirurgie Heidelberg, persönliche Mitteilung).

#### 2.5.1 *“Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide” (PACAP)*

PACAP ist ein Mitglied der Sekretin/Glucagon/VIP (vasoactive intestinal peptide)-Familie und gehört zu den regulatorischen Peptiden (5). Dieses Polypeptid wird im gesamten zentralen und peripheren Nervensystem exprimiert (84) und stimuliert unter anderem das Aussprossen von Neuriten (43), die Produktion von Neuropeptiden und Neurotransmittern (129) und die neuronale Proliferation (122, 227). Zusätzlich besitzt PACAP immunmodulatorische Eigenschaften: so wirkt es antiinflammatorisch auf aktivierte Mikroglia (42). In der Histiogenese des zentralen Nervensystem verstärkt es die Differenzierung kortikaler Neuroblasten (122) und bewahrt unreife Körnerzellen des Kleinhirns vor dem Untergang (66, 225).

Es lassen sich zwei biologisch aktive Formen unterscheiden: PACAP38, die vorherrschende Form im Nervensystem, und PACAP27, welches aus einem alternativen posttranslationalen Spleißen entsteht (54). PACAP entfaltet seine Wirkung über die PACAP-Rezeptoren. Drei verschiedene Rezeptoren wurden bisher beschrieben: der PAC1-Rezeptor hat die größte Affinität zu PACAP und bindet das verwandte VIP nur schwach, während die anderen beiden Rezeptoren VPAC1 und VPAC2 eine hohe Affinität für PACAP und VIP aufweisen (54). Mehrere Splicevarianten des PAC1-Rezeptors sind beschrieben worden, die mit der Selektivität des Rezeptors für PACAP38 und PACAP27 assoziiert werden (156, 164, 226).

In vitro schwächen PACAP38 und PACAP27 die glutamatinduzierte verzögerte Neurotoxizität in retinalen Nervenzellkulturen ab (195). Bei der Untersuchung von Rattenhirnen nach Okklusion der Arteria cerebri media konnte gezeigt werden, dass das Infarktareal nach Gabe von PACAP38 deutlich verkleinert war (174). Seine neuroprotektiven Wirkungen scheint PACAP zumindest in Teilen über das Neurotrophin „brain-derived neurotrophic factor“ (BDNF) zu vermitteln (57).

### *2.5.2 Noradrenalin*

Noradrenalin fungiert neben seiner systemischen Wirkung auf  $\alpha$ - und  $\beta$ -Rezeptoren auch als exzitatorischer Neurotransmitter im zentralen Nervensystem. Hier beeinflusst Noradrenalin dosis- und rezeptorabhängig die neuronale Erregbarkeit (74), den glialen Glutamattransport (50), die Aufnahme von Glutamat und Glutamin (50, 79), die Freisetzung von Glutamat (35, 124) sowie den zerebralen Stoffwechsel (55, 160). Auch die zerebrale Perfusion und die Integrität der Blut-Hirn-Schranke werden von Noradrenalin beeinflusst (17, 125, 126). Weiterhin inaktiviert Noradrenalin freie Radikale und reduziert oxidativen Stress (146, 212). Dadurch wird die Inaktivierung von NO durch freie Radikale verhindert und eine lokale Vasodilatation begünstigt (102).

Ebenso ist es denkbar, dass durch die exogene Zufuhr von Noradrenalin der posttraumatisch gestörte Noradrenalinstoffwechsel, der zu einer Verminderung des Noradrenalingehaltes der betroffenen Hirnregion führt, zumindest teilweise verbessert werden kann (167).

In früheren Studien ist bereits gezeigt worden, dass Noradrenalin durch die Stimulation  $\alpha$ 1-adrenerger Rezeptoren neuroprotektive Eigenschaften entfaltet. So reduziert es während der ersten 24 Stunden nach einem Schädel-Hirn-Trauma, in denen sich perikontusionell eine gestörte kortikale Perfusion entwickelt und wieder kompensiert wird (96), über eine Stabilisierung der Blut-Hirn-Schranke die Ödembildung (46). Auch verbessert Noradrenalin die posttraumatisch verminderte Glukoseutilisation des Hirngewebes (169) und bewirkt eine schnellere Rückbildung neurologischer Defizite sowie eine Verhaltensverbesserung (47, 52, 53, 200). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass es nach experimenteller traumatischer Hirnschädigung zu einer Verminderung der kortikalen  $\alpha$ 1-adrenergen Rezeptoren kommt, was zu einer verminderten Noradrenalinwirkung beitragen kann (168). Durch eine gezielte pharmakologische Inhibition  $\alpha$ 1-adrenerger Rezeptoren kommt es zu einer anhaltenden Ödembildung. Neurologische Defizite werden gesteigert oder treten verzögert erneut auf (47, 200). Allerdings konnte auch gezeigt werden, dass die posttraumatische Ödembildung multifaktoriell bedingt ist: hier ist insbesondere die posttraumatische Reduktion des astrozytär exprimierten Wasserkanals AQP4 zu nennen (96).

## 2.6 Fragestellungen

Die glialen Glutamattransporter EAAT1 und EAAT2 spielen physiologischerweise eine zentrale Rolle bei der Entfernung von Glutamat aus dem Extrazellulärraum. Gerade nach Schädelhirnverletzungen ist das extrazelluläre Glutamat massiv erhöht und trägt maßgeblich zu den sekundären Hirnschädigungen bei. Diese beeinflussen das Outcome des Patienten wesentlich und stellen gleichzeitig einen zentralen Angriffspunkt für ärztliche Bemühungen nach Schädelhirntrauma dar.

In dieser Arbeit soll die zelluläre Expression der glialen Glutamattransporter EAAT1 und EAAT2, sowie der regulierenden Peptide PACAP38 und PACAP27 nach humanem und experimentellem Schädelhirntrauma im zeitlichen Verlauf beschrieben werden. Hierzu wird die jeweilige EAAT-Expression den drei Gliazelltypen Astrozyten, Oligodendrozyten und Mikrogliazellen zugeordnet.

Experimentell wird das „Controlled Cortical Impact Injury“ (CCII)-Modell in der Ratte verwendet, ein experimentelles Traumamodell, das die reproduzierbare unilaterale Kontusion des somatosensorischen Kortex erlaubt. Nach CCII wird neben der zellulären auch die Gesamtexpression der Glutamattransporter untersucht und mit den Glutamatkonzentrationen im Liquor zu verschiedenen Überlebenszeiten verglichen. Eine weitere Studie soll klären, ob die exogene Gabe von Noradrenalin nach CCII eine neuroprotektive Wirkung zeigt.

### **3. Humane post-mortem Untersuchungen und tierexperimentelle Studien zur Expression von Glutamattransportern und PACAP**

#### **3.1 Frühzeitige Expression von Glutamattransporter-Proteinen in ramifizierten Mikrogliazellen nach „Controlled Cortical Impact Injury“ in der Ratte**

(Early expression of glutamate transporter proteins in ramified microglia after controlled cortical impact injury in the rat

van Landeghem FKH, Stover JF, Bechmann I, Brück W, Unterberg AW, Bührer C, von Deimling A

Glia 35:167–179, 2001)

##### Ergebnisse

GLAST/EAAT1- und GLT-1/EAAT2-positive Zellen waren perikontusionell bis zu 48 h nach Trauma vermindert, mit den niedrigsten Werten nach 2-4 Stunden. Die Expression von GLAST erschien stärker betroffen. Die Western Blot-Analyse zeigte die niedrigste Proteinexpression mit einer Verminderung um 40%–54% (GLAST), bzw. um 42%–49% (GLT1) zwischen 24 und 72 Stunden nach Trauma. 8 Stunden nach CCII war die Glutamatkonzentration im Liquor signifikant erhöht (10,5 µM versus 2,56 µM in Kontrollen,  $p < 0,001$ ) und erreichte nach 48 Stunden den Maximalwert. Eine signifikante numerische Zunahme an Mikrogliazellen, die de novo GLAST und GLT1 exprimieren, wurde nach 4 Stunden beobachtet. Nach 48 Stunden wurde die höchste Anzahl dieser Mikroglia detektiert, um zum Zeitpunkt 72 Stunden nach CCII auf diesem hohen Niveau zu bleiben. Darüberhinaus exprimieren ramifizierte Mikrogliazellen de novo Glutamattransporter nach CCII. GFAP-positive Astrozyten, die GLAST oder GLT1 koexprimieren, zeigen eine frühe posttraumatische Reduktion und erreichen nach 8 Stunden die niedrigste Anzahl. Die numerische Abnahme und die Expressionsverminderung könnte durch eine Herabregulierung des Proteins und/oder einen Untergang von Astrozyten verursacht worden sein. 72 Stunden nach Trauma erscheint eine signifikante Population von GFAP positiven, reaktiven Astrozyten mit Koexpression von GLAST oder GLT1.

## Diskussion

Unsere Ergebnisse stützen die Hypothese, dass posttraumatisch reduzierte astrozytäre GLAST und GLT1 Proteinkonzentrationen und die resultierende Beeinträchtigung des Glutamattransports mit konsekutiv erhöhten extrazellulären Glutamatkonzentrationen zu dem entstehenden Sekundärschaden beitragen. Mikrogliazellen sind fähig, de novo nach Kontusion Glutamattransporterproteine zu exprimieren, d.h. dass die Expression glialer und neuronaler Glutamattransporter nicht auf eine bestimmte gliale oder neuronale Zelllinie beschränkt ist. Mikrogliazellen spielen eine wichtige Rolle in der frühzeitigen Regulation des extrazellulären Glutamats nach CCII, scheinen jedoch den Anstieg der extrazellulären Glutamatkonzentration nicht vollständig bewältigen zu können. Erst mit Ausbildung der reaktiven astrozytären Gliose erreichen die Glutamatkonzentrationen im Liquor ein Plateau. Die Expression von Glutamattransportern in reaktiven Astrozyten wurde auch im Rahmen humaner neurologischer Erkrankungen beschrieben (218, 219).

### **3.2 Verminderte Expression von Glutamattransportern in Astrozyten nach humanem Hirntrauma**

(Decreased expression of glutamate transporters in astrocytes following human traumatic brain injury

van Landeghem FKH, Weiss T, Oehmichen M, von Deimling A  
J Neurotrauma 23: 1518-1528, 2006)

#### Ergebnisse

Die morphometrische Analyse der immunhistochemischen Untersuchungen zeigte eine prädominante Expression von EAAT1 und EAAT2 in Astrozyten in normalem humanem Neokortex. Nach SHT erschien die Anzahl EAAT2 positiver Zellen während aller untersuchten Überlebenszeit in der Kontusion und dem perikontusionellen Areal vermindert, während die Anzahl EAAT1-positiver Zellen in der Kontusion nach 7 Tagen vermindert erschien. GFAP positive Astrozyten waren numerisch nach 24 Stunden signifikant vermindert. Danach stieg die Anzahl GFAP positiver Astrozyten wieder an, die reaktive astrozytäre Gliose bildete sich aus.

Doppelimmunfluoreszenz-Untersuchungen ergaben eine Reduktion der absoluten Anzahl von GFAP positiven Astrozyten, die EAAT1 oder EAAT2 koexprimieren, bis zu Überlebenszeiten von 7 Tagen. Zusätzlich war der relative Anteil an Glutamattransporter-koexprimierenden Astrozyten nach SHT vermindert. Bei allen beschriebenen posttraumatischen Expressionsänderungen erschien EAAT2 stärker betroffen.

#### Diskussion

Unsere Ergebnisse zeigen, dass die posttraumatische Reduktion der zellulären EAAT1 und EAAT2 Expression vorwiegend auf den Untergang von Astrozyten und die Herabregulierung in überlebenden Astrozyten zurückzuführen ist. Unsere Ergebnisse stützen die Ansicht, dass eine reduzierte astrozytäre Glutamataufnahme zur posttraumatischen Erhöhung des extrazellulären Glutamats im Menschen beiträgt. Erst im Rahmen der Ausbildung der reaktiven Gliose exprimieren Astrozyten wieder vermehrt Glutamattransporter. Dieser Befund ist vergleichbar mit Beobachtungen bei Patienten mit Glioblastoma multiforme (218) oder mit Ergebnissen tierexperimenteller Untersuchungen (87).

### **3.3 Expression von PACAP und Glutamattransportern in Satelliten-Oligodendrozyten im humanen ZNS**

(Expression of PACAP and glutamate transporter proteins in satellite oligodendrocytes of the CNS

van Landeghem FKH, Weiss T, von Deimling A  
Regul Peptides 142: 52-59, 2007)

#### Ergebnisse

Die Mehrheit der Satelliten-Oligodendrozyten des normalen Neokortex und Hippokampus exprimieren PACAP27 und PACAP38. Die drei Glutamattransporter EAAT1, EAAT2 und EAAT3 werden in Satelliten-Oligodendrozyten dieser Lokalisationen ebenfalls exprimiert.

Nach transienter globaler Ischämie war die Gesamtanzahl von Satelliten-Oligodendrozyten, die PACAP oder Glutamattransporter exprimieren, im Neokortex und Hippokampus signifikant vermindert. Jedoch waren die Veränderungen der PACAP- und der Glutamattransporter-Expression abhängig von der anatomischen Region und der Überlebenszeit. In Satelliten-Oligodendrozyten der CA1-Region wurde eine frühzeitige starke Reduktion der PACAP- und der Glutamattransporter-Expression beobachtet, während Satelliten-Oligodendrozyten des Neokortex eine spätere Reduktion von PACAPs und EAATs aufweisen.

#### Diskussion

Auch wenn Satelliten-Oligodendrozyten nicht oder nur in geringem Maße an der synaptischen Glutathomöostase beteiligt sind, könnten sie doch an der perineuronalen Glutathomöostase beteiligt sein. Hypothetisch wäre es auch denkbar, dass Oligodendrozyten Glutamat aufnehmen, um dann im Austausch mit Glutamat Cystin über den CGA aufnehmen zu können. Nach Reduktion von Cystin zu Cystein könnte dieses von Oligodendrozyten an Nervenzellen zur Glutathion-Synthese weitergegeben werden.

Weitere Untersuchungen sind erforderlich um zu klären, ob diese Änderungen der Proteinexpression in Satelliten-Oligodendrozyten primär sind oder sekundär nach einem Nervenzelluntergang entstehen.

### **3.4 Zelluläre Lokalisation von PACAP nach humanem SHT**

(Cellular localization of pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP) following traumatic brain injury in humans

van Landeghem FKH, Weiss T, Oehmichen M, von Deimling A

Acta Neuropathol 113: 683-693, 2007)

#### Ergebnisse

In normalem humanem Neokortex exprimierten Nervenzellen und Gliazellen PACAP27 und PACAP38.

Nach SHT war die Gesamtanzahl der PACAP27 und PACAP38 positiven Zellen zu allen untersuchten Überlebenszeiten innerhalb der Kontusion signifikant vermindert. Im perikontusionellen Kortex war die Gesamtanzahl der PACAP27 und PACAP38 exprimierenden Zellen zu allen untersuchten Überlebenszeiten signifikant vermehrt.

Dreifach-Immunfluoreszenz-Untersuchungen zeigten einen signifikanten Anstieg der absoluten Zahl GFAP-positiver Astrozyten sowie eine Verminderung CNP-positiver Oligodendrozyten, die PACAP27 oder PACAP38 koexprimieren, innerhalb der Kontusion und des perikontusionellen Gewebes.

#### Diskussion

Wir hypothetisieren, dass der numerische Anstieg der PACAP27 oder PACAP38 koexprimierenden Astrozyten als Teil einer komplexen endogenen neuroprotektiven Antwort im perikontusionellen Kortex interpretiert werden kann. Allerdings muss die präzise Rolle von PACAP nach SHT, insbesondere mit Kontusionen, noch besser determiniert werden.

### **3.5 Dosisabhängiger Effekt von Noradrenalin auf die Kontusionsentwicklung nach „Controlled Cortical Impact Injury“**

(Differential concentration-dependent effects of prolonged norepinephrine infusion on intraparenchymal hemorrhage and cortical contusion in brain-injured rats

van Landeghem FKH, Schreiber S, von Deimling A, Unterberg AW, Stover JF

J Neurotrauma 20: 1327-1338, 2003)

#### Ergebnisse

Der MABP in anästhesierten Ratten war nur marginal erhöht. Der SABP war während der Infusion mit NA in mittlerer und hoher Dosierung mit Werten über 140 mmHg signifikant erhöht. NA in mittlerer und hoher Dosierung steigerten die kortikalen Blutungen um 157% bzw. um 142%, jedoch ohne das kortikale Kontusionsvolumen signifikant zu vergrößern. NA in niedriger Dosierung reduzierte die kortikale Kontusion um 44%.

#### Diskussion

NA kann dosisabhängig die sekundäre Hirnschädigung während der posttraumatischen Akutphase verstärken oder aber in niedriger Dosierung ohne Veränderung des SABPs reduzieren. Die positiven Effekte von NA, wie z.B. der NA-vermittelte Steigerung der kortikalen perikontusionellen Perfusion (104) und Gewebsoxygenierung (107), werden bei entsprechender höherer NA-Konzentration offenbar durch gleichzeitig auftretende ungünstige Veränderungen, wie z.B. eine gesteigerte neuronale Aktivität (104), eine erhöhte extrazelluläre Glutamatkonzentration (104) und vermehrten kortikalen Blutungen (220): aktuelle Untersuchung) aufgehoben. Zukünftige Studien sollten die NA-Konzentration herausarbeiten, bei der die positiven Effekte für den traumatisierten Patienten überwiegen.

## 4. Diskussion

Posttraumatisch findet sich im Rattenmodell wie im Menschen ein signifikanter Verlust an Glutamattransporter-exprimierenden Zellen, insbesondere an Astrozyten (219, 224) - der Glia-Zelltyp, der physiologischerweise hauptsächlich für die zelluläre Aufnahme extrazellulären Glutamats zuständig ist. Dieses ist einerseits einem Untergang von Astrozyten, andererseits einer Herabregulierung astrozytärer Glutamattransporter geschuldet (219, 224). Der posttraumatische transiente Verlust an Astrozyten spiegelt sich auch in der Dysregulation des Wasserhaushalts wieder, die wesentlich zur posttraumatischen Ödembildung beiträgt (96). Reaktive Astrozyten, die 48 – 72 Stunden nach Trauma in zunehmendem Maße das Kontusionsareal demarkieren, exprimieren in hoher Anzahl die Glutamattransporter EAAT1 und EAAT2 (219, 224). Eine vergleichbare Expression zeigt sich in mehreren anderen Studien (18, 36, 56, 87, 111, 117, 158, 203, 218). Eine andere Studie zeigt posttraumatisch, dass reaktive Astrozyten nur EAAT1 exprimieren (14), allerdings wurde in dieser Studie ein anderes Immunhistochemie-Protokoll verwendet.

Perineuronale Oligodendrozyten des Neokortex und der CA1-Region des Hippokampus, die in Satellitenstellung zu Nervenzellen stehen, exprimieren Glutamattransporter (222). Während es zu Oligodendrozyten der grauen Substanz bezüglich des Glutamattransports noch keine weiteren Untersuchungen gibt, exprimieren Oligodendrozyten der weißen Substanz *in vitro* EAAT1, EAAT2 und EAAT3 (44, 101). Die Glutamataufnahme in Oligodendrozyten zeigt eine höhere Affinität, aber eine geringere Effizienz als in Typ 1-Astrozyten (44, 175). EAAT3 ist der am häufigsten vorkommende Glutamattransporter in Oligodendrozyten der weißen Substanz in der Ratte (108). In unserem wie auch in einem Kollektiv von MS-Patienten (165) konnte dieser Befund nicht nachvollzogen werden. Diese Differenz könnte auf einen Unterschied in der Glutamattransporterexpression zwischen den Spezies deuten. Oligodendrozyten in Satellitenstellung gehen nach transienter globaler Hypoxie rasch unter und könnten so zu der Erhöhung des extrazellulären Glutamats im perineuronalen Mikroenvironment beitragen (222).

*In vitro* konnte gezeigt werden, dass Mikrogliazellen die Fähigkeit zum Natrium-abhängigen Glutamattransport besitzen (145). Ramifizierte Mikrogliazellen zeigen posttraumatisch im Rattenmodell eine Expression der Glutamattransporter EAAT1 und EAAT2, wohingegen ruhende Mikroglia keine solche Expression zeigen (224). Dieser Befund wird durch *in vitro* und *in vivo* Ergebnisse mehrerer anderer Studien bestätigt (29, 117, 121, 142, 161). In Kollektiven von Infarkt- als auch von Schädel-Hirntrauma-Patienten exprimieren aktivierte

Mikrogliazellen jedoch nur EAAT1 (14, 15). Dieser Unterschied in den Ergebnissen könnte mit einer Abhängigkeit der Glutamattransporterexpression von Spezies und zugrundeliegender Pathologie erklärt werden. Der Glutamatanstieg im Liquor wird posttraumatisch zeitgleich mit der raschen zahlenmäßige Zunahme der Mikroglia, der de novo-Expression von mikroglialen Glutamattransportern sowie insbesondere der Ausbildung der reaktiven astrozytären Gliose gebremst und erreicht einen Plateauwert (224).

PACAP38, das in vitro und in vivo in Astrozyten den Glutamattransport induziert (54, 190), wird wie PACAP27 im Menschen und in der Ratte von Astrozyten und von Oligodendrozyten exprimiert (219, 221). Nach SHT (221) und nach transienter globaler Hypoxie (222) kommt es zu einer numerischen Abnahme von PACAP27- und PACAP38-exprimierenden Astrozyten und Oligodendrozyten innerhalb der Kontusion bzw. des hypoxisch geschädigten Gewebes. Perikontusionell fand sich jedoch rasch eine numerische Zunahme PACAP-exprimierender Astrozyten (221). Diese Heraufregulierung von PACAP27 und PACAP38 in Astrozyten scheint Teil einer endogenen neuroprotektiven Reaktion zu sein. Vergleichbare Studien zur zellulären PACAP-Expression sind bisher nicht durchgeführt worden. Erste eigene Ergebnisse einer experimentellen Studie im Rattenmodell (CCII), bei der PACAP38 exogen zugeführt wurde, zeigen keine eindeutige neuroprotektive Wirkung. Studien in anderen Kontusionsmodellen sind bisher nicht durchgeführt worden, allerdings zeigt sich eine neuroprotektive Wirkung in Modellen des diffusen Axonschadens {Kovesdi, 2008; Farkas, 2004}.

Die kontinuierliche Infusion von NA in niedriger Dosierung ist 48 Stunden nach experimentellem Trauma neuroprotektiv: das Kontusionsvolumen zeigt eine Reduktion um 44% (220). Vergleichbare Studien sind bisher nicht publiziert worden. Unpublizierte eigene Daten einer weiterführenden Untersuchung mit einer 40%igen Reduktion des Kontusionsvolumens bestätigen dieses Ergebnis. Diese weiterführende Untersuchung zeigt auch, dass der neuroprotektive Effekt zumindest zum Teil durch eine Induktion des Glutamattransports vermittelt ist. Die zeitlich limitierte Induktion erscheint gering, resultiert aber in einer signifikanten Verminderung der extrazellulären Glutamatkonzentration, die mittels Mikrodialyse ermittelt wurde.

## **5. Danksagung**

Bedanken möchte ich mich ganz herzlich bei Professor Dr. Andreas von Deimling, der es mir ermöglichte, meine wissenschaftlichen Arbeiten in Selbstständigkeit auszuführen. Ohne seine unermüdliche Förderung und Diskussionsbereitschaft wäre die Arbeiten und diese Schrift nie entstanden.

Professor Dr. Frank L. Heppner und Professor Dr. T. Pietsch unterstützten großzügig die Fertigstellung meiner Arbeiten.

Weiterhin wäre eine große Zahl der hier vorgestellten Arbeiten ohne die Mithilfe von Frau Petra Matylewski, Kathrein Permien und Dorothea Krupke nie verwirklicht worden. Gleiches gilt für die Doktoranden Stefan Schreiber, Thorsten Weiss und Stefan Angermair sowie für Professor Dr. Andreas Unterberg und PD Dr. John Stover aus der Klinik für Neurochirurgie der Charité, die mich in jeder erdenklichen Weise unterstützten.

In Liebe und Dankbarkeit meiner Frau Stefanie und meiner Tochter Olivia gewidmet.

## 6. Literatur

- (1) Allen JW, Ivanova SA, Fan L, Espey MG, Basile AS und Faden AI (1999) Group II metabotropic glutamate receptor activation attenuates traumatic neuronal injury and improves neurological recovery after traumatic brain injury. *J Pharmacol Exp Ther* 290:112-120.
- (2) Amara SG und Fontana AC (2002) Excitatory amino acid transporters: keeping up with glutamate. *Neurochem Int* 41:313-318.
- (3) Andersen M, Overgaard K, Meden P, Boysen G und Choi SC (1999) Effects of citicoline combined with thrombolytic therapy in a rat embolic stroke model. *Stroke* 30:1464-1471.
- (4) Anderson CM und Swanson RA (2000) Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions. *Glia* 32:1-14.
- (5) Arimura A (1992) Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP): discovery and current status of research. *Regul Pept* 37:287-303.
- (6) Aronowski J, Strong R und Grotta JC (1996) Citicoline for treatment of experimental focal ischemia: histologic and behavioral outcome. *Neurol Res* 18:570-574.
- (7) Arriza JL, Eliasof S, Kavanaugh MP und Amara SG (1997) Excitatory amino acid transporter 5, a retinal glutamate transporter coupled to a chloride conductance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:4155-4160.
- (8) Asgeirsson B, Grande PO und Nordstrom CH (1994) A new therapy of post-trauma brain oedema based on haemodynamic principles for brain volume regulation. *Intensive Care Med* 20:260-267.
- (9) Baethmann A, Maier-Hauff K, Schurer L, Lange M, Guggenbichler C, Vogt W, Jacob K und Kempfski O (1989) Release of glutamate and of free fatty acids in vasogenic brain edema. *J Neurosurg* 70:578-591.
- (10) Balcar VJ und Johnston GA (1972) The structural specificity of the high affinity uptake of L-glutamate and L-aspartate by rat brain slices. *J Neurochem* 19:2657-2666.
- (11) Bannai S und Kitamura E (1980) Transport interaction of L-cystine and L-glutamate in human diploid fibroblasts in culture. *J Biol Chem* 255:2372-2376.
- (12) Bannai S und Tateishi N (1986) Role of membrane transport in metabolism and function of glutathione in mammals. *J Membr Biol* 89:1-8.
- (13) Bassi MT, Gasol E, Manzoni M, Pineda M, Riboni M, Martin R, Zorzano A, Borsani G und Palacin M (2001) Identification and characterisation of human xCT that co-expresses, with 4F2 heavy chain, the amino acid transport activity system xc-. *Pflugers Arch* 442:286-296.
- (14) Beschorner R, Dietz K, Schauer N, Mittelbronn M, Schluesener HJ, Trautmann K, Meyermann R und Simon P (2007) Expression of EAAT1 reflects a possible neuroprotective function of reactive astrocytes and activated microglia following human traumatic brain injury. *Histol Histopathol* 22:515-526.
- (15) Beschorner R, Simon P, Schauer N, Mittelbronn M, Schluesener HJ, Trautmann K, Dietz K und Meyermann R (2007) Reactive astrocytes and activated microglial cells express EAAT1, but not EAAT2, reflecting a neuroprotective potential following ischaemia. *Histopathology* 50:897-910.
- (16) Blumbergs PC, Scott G, Manavis J, Wainwright H, Simpson DA und McLean AJ (1994) Staining of amyloid precursor protein to study axonal damage in mild head injury. *Lancet* 344:1055-1056.
- (17) Borges N, Shi F, Azevedo I und Audus KL (1994) Changes in brain microvessel endothelial cell monolayer permeability induced by adrenergic drugs. *Eur J Pharmacol* 269:243-248.
- (18) Boycott HE, Wilkinson JA, Boyle JP, Pearson HA und Peers C (2008) Differential involvement of TNF alpha in hypoxic suppression of astrocyte glutamate transporters. *Glia* 56:998-1004.

- (19) Bruno V, Copani A, Battaglia G, Raffaele R, Shinozaki H und Nicoletti F (1994) Protective effect of the metabotropic glutamate receptor agonist, DCG-IV, against excitotoxic neuronal death. *Eur J Pharmacol* 256:109-112.
- (20) Bryan RM, Jr., Cherian L und Robertson C (1995) Regional cerebral blood flow after controlled cortical impact injury in rats. *Anesth Analg* 80:687-695.
- (21) Burdo J, Dargusch R und Schubert D (2006) Distribution of the cystine/glutamate antiporter system xc- in the brain, kidney, and duodenum. *J Histochem Cytochem* 54:549-557.
- (22) Callaway JK, Castillo-Melendez M, Giardina SF, Krstew EK, Beart PM und Jarrott B (2004) Sodium channel blocking activity of AM-36 and sipatrigine (BW619C89): in vitro and in vivo evidence. *Neuropharmacology* 47:146-155.
- (23) Chaudhry FA, Lehre KP, van Lookeren Campagne M, Ottersen OP, Danbolt NC und Storm-Mathisen J (1995) Glutamate transporters in glial plasma membranes: highly differentiated localizations revealed by quantitative ultrastructural immunocytochemistry. *Neuron* 15:711-720.
- (24) Chen Y und Swanson RA (2003) The glutamate transporters EAAT2 and EAAT3 mediate cysteine uptake in cortical neuron cultures. *J Neurochem* 84:1332-1339.
- (25) Chen Y, Ying W, Simma V, Copin JC, Chan PH und Swanson RA (2000) Overexpression of Cu,Zn superoxide dismutase attenuates oxidative inhibition of astrocyte glutamate uptake. *J Neurochem* 75:939-945.
- (26) Chesnut RM, Marshall LF, Klauber MR, Blunt BA, Baldwin N, Eisenberg HM, Jane JA, Marmarou A und Foulkes MA (1993) The role of secondary brain injury in determining outcome from severe head injury. *J Trauma* 34:216-222.
- (27) Cho Y und Bannai S (1990) Uptake of glutamate and cysteine in C-6 glioma cells and in cultured astrocytes. *J Neurochem* 55:2091-2097.
- (28) Choi DW (1992) Excitotoxic cell death. *J Neurobiol* 23:1261-1276.
- (29) Chretien F, Vallat-Decouvelaere AV, Bossuet C, Rimaniol AC, Le Grand R, Le Pavec G, Creminon C, Dormont D, Gray F und Gras G (2002) Expression of excitatory amino acid transporter-2 (EAAT-2) and glutamine synthetase (GS) in brain macrophages and microglia of SIVmac251-infected macaques. *Neuropathol Appl Neurobiol* 28:410-417.
- (30) Chu K, Lee ST, Sinn DI, Ko SY, Kim EH, Kim JM, Kim SJ, Park DK, Jung KH, Song EC, Lee SK, Kim M und Roh JK (2007) Pharmacological induction of ischemic tolerance by glutamate transporter-1 (EAAT2) upregulation. *Stroke* 38:177-182.
- (31) Clark WM, Wechsler LR, Sabounjian LA und Schwiderski UE (2001) A phase III randomized efficacy trial of 2000 mg citicoline in acute ischemic stroke patients. *Neurology* 57:1595-1602.
- (32) Clark WM, Williams BJ, Selzer KA, Zweifler RM, Sabounjian LA und Gammans RE (1999) A randomized efficacy trial of citicoline in patients with acute ischemic stroke. *Stroke* 30:2592-2597.
- (33) Conti F, DeBiasi S, Minelli A, Rothstein JD 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. *Cereb Cortex* 8:108-116.
- (34) Cooper AJ (1983) Biochemistry of sulfur-containing amino acids. *Annu Rev Biochem* 52:187-222.
- (35) Crowder JM und Bradford HF (1987) Inhibitory effects of noradrenaline and dopamine on calcium influx and neurotransmitter glutamate release in mammalian brain slices. *Eur J Pharmacol* 143:343-352.
- (36) Dallas M, Boycott HE, Atkinson L, Miller A, Boyle JP, Pearson HA und Peers C (2007) Hypoxia suppresses glutamate transport in astrocytes. *J Neurosci* 27:3946-3955.
- (37) Danbolt NC (2001) Glutamate uptake. *Prog Neurobiol* 65:1-105.

- (38) Danbolt NC, Storm-Mathisen J und Kanner BI (1992) An [Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>]coupled L-glutamate transporter purified from rat brain is located in glial cell processes. *Neuroscience* 51:295-310.
- (39) Davalos A, Castillo J, Alvarez-Sabin J, Secades JJ, Mercadal J, Lopez S, Cobo E, Warach S, Sherman D, Clark WM und Lozano R (2002) Oral citicoline in acute ischemic stroke: an individual patient data pooling analysis of clinical trials. *Stroke* 33:2850-2857.
- (40) Davis KE, Straff DJ, Weinstein EA, Bannerman PG, Correale DM, Rothstein JD und Robinson MB (1998) Multiple signaling pathways regulate cell surface expression and activity of the excitatory amino acid carrier 1 subtype of Glu transporter in C6 glioma. *J Neurosci* 18:2475-2485.
- (41) DeFranco DB, Ho L, Falke E und Callaway CW (2004) Small molecule activators of the heat shock response and neuroprotection from stroke. *Curr Atheroscler Rep* 6:295-300.
- (42) Delgado M (2002) Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide inhibit CBP-NF-kappaB interaction in activated microglia. *Biochem Biophys Res Commun* 297:1181-1185.
- (43) Deutsch PJ, Schadlow VC und Barzilai N (1993) 38-Amino acid form of pituitary adenylate cyclase activating peptide induces process outgrowth in human neuroblastoma cells. *J Neurosci Res* 35:312-320.
- (44) Domercq M, Sanchez-Gomez MV, Areso P und Matute C (1999) Expression of glutamate transporters in rat optic nerve oligodendrocytes. *Eur J Neurosci* 11:2226-2236.
- (45) Dringen R (2000) Metabolism and functions of glutathione in brain. *Prog Neurobiol* 62:649-671.
- (46) Dunn-Meynell AA, Hassanain M und Levin BE (1998) Norepinephrine and traumatic brain injury: a possible role in post-traumatic edema. *Brain Res* 800:245-252.
- (47) Dunn-Meynell AA, Yarlagadda Y und Levin BE (1997) Alpha 1-adrenoceptor blockade increases behavioral deficits in traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 14:43-52.
- (48) Eker C, Asgeirsson B, Grande PO, Schalen W und Nordstrom CH (1998) Improved outcome after severe head injury with a new therapy based on principles for brain volume regulation and preserved microcirculation. *Crit Care Med* 26:1881-1886.
- (49) Faden AI, Demediuk P, Panter SS und Vink R (1989) The role of excitatory amino acids and NMDA receptors in traumatic brain injury. *Science* 244:798-800.
- (50) Fahrig T (1993) Receptor subtype involved and mechanism of norepinephrine-induced stimulation of glutamate uptake into primary cultures of rat brain astrocytes. *Glia* 7:212-218.
- (51) Fairman WA, Vandenberg RJ, Arriza JL, Kavanaugh MP und Amara SG (1995) An excitatory amino-acid transporter with properties of a ligand-gated chloride channel. *Nature* 375:599-603.
- (52) Feeney DM, Weisend MP und Kline AE (1993) Noradrenergic pharmacotherapy, intracerebral infusion and adrenal transplantation promote functional recovery after cortical damage. *J Neural Transplant Plast* 4:199-213.
- (53) Feeney DM und Westerberg VS (1990) Norepinephrine and brain damage: alpha noradrenergic pharmacology alters functional recovery after cortical trauma. *Can J Psychol* 44:233-252.
- (54) Figiel M und Engele J (2000) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP), a neuron-derived peptide regulating glial glutamate transport and metabolism. *J Neurosci* 20:3596-3605.
- (55) Fillenz M, Lowry JP, Boutelle MG und Fray AE (1999) The role of astrocytes and noradrenaline in neuronal glucose metabolism. *Acta Physiol Scand* 167:275-284.
- (56) Fotheringham J, Williams EL, Akhyani N und Jacobson S (2008) Human herpesvirus 6 (HHV-6) induces dysregulation of glutamate uptake and transporter expression in astrocytes. *J Neuroimmune Pharmacol* 3:105-116.

- (57) Frechilla D, Garcia-Osta A, Palacios S, Cenarruzabeitia E und Del Rio J (2001) BDNF mediates the neuroprotective effect of PACAP-38 on rat cortical neurons. *NeuroReport* 12:919-923.
- (58) Froissard P, Monroq H und Duval D (1997) Role of glutathione metabolism in the glutamate-induced programmed cell death of neuronal-like PC12 cells. *Eur J Pharmacol* 326:93-99.
- (59) Ganel R, Ho T, Maragakis NJ, Jackson M, Steiner JP und Rothstein JD (2006) Selective up-regulation of the glial Na<sup>+</sup>-dependent glutamate transporter GLT1 by a neuroimmunophilin ligand results in neuroprotection. *Neurobiol Dis* 21:556-567.
- (60) Gegelashvili G, Civenni G, Racagni G, Danbolt NC, Schousboe I und Schousboe A (1996) Glutamate receptor agonists up-regulate glutamate transporter GLAST in astrocytes. *NeuroReport* 8:261-265.
- (61) Gegelashvili G, Dehnes Y, Danbolt NC und Schousboe A (2000) The high-affinity glutamate transporters GLT1, GLAST, and EAAT4 are regulated via different signalling mechanisms. *Neurochem Int* 37:163-170.
- (62) Gegelashvili G und Schousboe A (1997) High affinity glutamate transporters: regulation of expression and activity. *Mol Pharmacol* 52:6-15.
- (63) Gentleman SM, Roberts GW, Gennarelli TA, Maxwell WL, Adams JH, Kerr S und Graham DI (1995) Axonal injury: a universal consequence of fatal closed head injury? *Acta Neuropathol* 89:537-543.
- (64) Gochenauer GE und Robinson MB (2001) Dibutylryl-cAMP (dbcAMP) up-regulates astrocytic chloride-dependent L-[3H]glutamate transport and expression of both system xc(-) subunits. *J Neurochem* 78:276-286.
- (65) Golding EM, Robertson CS und Bryan RM, Jr. (2000) L-arginine partially restores the diminished CO<sub>2</sub> reactivity after mild controlled cortical impact injury in the adult rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 20:820-828.
- (66) Gonzalez BJ, Basille M, Vaudry D, Fournier A und Vaudry H (1997) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide promotes cell survival and neurite outgrowth in rat cerebellar neuroblasts. *Neuroscience* 78:419-430.
- (67) Graham DI, Gennarelli TA und McIntosh TM (2002) Trauma. In: Graham DI und Lantos PL (Hrsgb.), *Greenfield's Neuropathology*. Arnold: London, 823-898.
- (68) Graham SH, Chen J, Sharp FR und Simon RP (1993) Limiting ischemic injury by inhibition of excitatory amino acid release. *J Cereb Blood Flow Metab* 13:88-97.
- (69) Grande PO und Nordstrom C-H (1998) Treatment of increased ICP in severe head-injured patients. In: von Wild KRH (Hrsgb.), *Pathophysiological Principles and Controversies in Neurointensive Care*. Zuckerschwerdt: München, Bern, Wien, New York, 123-128.
- (70) Grieb P, Gadamski R, Wojda R und Janisz M (2001) CDP-choline, but not cytidine, protects hippocampal CA1 neurones in the gerbil following transient forebrain ischaemia. *Folia Neuropathol* 39:141-145.
- (71) Griffin JH, Fernandez JA, Liu D, Cheng T, Guo H und Zlokovic BV (2004) Activated protein C and ischemic stroke. *Crit Care Med* 32:S247-253.
- (72) Hagberg H, Lehmann A, Sandberg M, Nystrom B, Jacobson I und Hamberger A (1985) Ischemia-induced shift of inhibitory and excitatory amino acids from intra- to extracellular compartments. *J Cereb Blood Flow Metab* 5:413-419.
- (73) Hansson E und Ronnback L (1991) Receptor regulation of the glutamate, GABA and taurine high-affinity uptake into astrocytes in primary culture. *Brain Res* 548:215-221.
- (74) Hasselmo ME, Linster C, Patil M, Ma D und Cekic M (1997) Noradrenergic suppression of synaptic transmission may influence cortical signal-to-noise ratio. *J Neurophysiol* 77:3326-3339.
- (75) Haugeto O, Ullensvang K, Levy LM, Chaudhry FA, Honore T, Nielsen M, Lehre KP und Danbolt NC (1996) Brain glutamate transporter proteins form homomultimers. *J Biol Chem* 271:27715-27722.

- (76) Hazell AS (2007) Excitotoxic mechanisms in stroke: an update of concepts and treatment strategies. *Neurochem Int* 50:941-953.
- (77) Helboe L, Egebjerg J, Moller M und Thomsen C (2003) Distribution and pharmacology of alanine-serine-cysteine transporter 1 (ASC-1) in rodent brain. *Eur J Neurosci* 18:2227-2238.
- (78) Hu K, Carroll J, Rickman C und Davletov B (2002) Action of complexin on SNARE complex. *J Biol Chem* 277:41652-41656.
- (79) Huang R und Hertz L (1995) Noradrenaline-induced stimulation of glutamine metabolism in primary cultures of astrocytes. *J Neurosci Res* 41:677-683.
- (80) Hurtado O, Moro MA, Cardenas A, Sanchez V, Fernandez-Tome P, Leza JC, Lorenzo P, Secades JJ, Lozano R, Davalos A, Castillo J und Lizasoain I (2005) Neuroprotection afforded by prior citicoline administration in experimental brain ischemia: effects on glutamate transport. *Neurobiol Dis* 18:336-345.
- (81) Ikonomidou C und Turski L (2002) Why did NMDA receptor antagonists fail clinical trials for stroke and traumatic brain injury? *Lancet Neurol* 1:383-386.
- (82) Ishige N, Pitts LH, Berry I, Nishimura MC und James TL (1988) The effects of hypovolemic hypotension on high-energy phosphate metabolism of traumatized brain in rats. *J Neurosurg* 68:129-136.
- (83) Jackson M, Song W, Liu MY, Jin L, Dykes-Hoberg M, Lin CI, Bowers WJ, Federoff HJ, Sternweis PC und Rothstein JD (2001) Modulation of the neuronal glutamate transporter EAAT4 by two interacting proteins. *Nature* 410:89-93.
- (84) Jaworski DM (2000) Expression of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) and the PACAP-selective receptor in cultured rat astrocytes, human brain tumors, and in response to acute intracranial injury. *Cell Tissue Res* 300:219-230.
- (85) Jenkins LW, Moszynski K, Lyeth BG, Lewelt W, DeWitt DS, Allen A, Dixon CE, Povlishock JT, Majewski TJ, Clifton GL und et al. (1989) Increased vulnerability of the mildly traumatized rat brain to cerebral ischemia: the use of controlled secondary ischemia as a research tool to identify common or different mechanisms contributing to mechanical and ischemic brain injury. *Brain Res* 477:211-224.
- (86) Johnston MV und Coyle JT (1981) Development of central neurotransmitter systems. *Ciba Found Symp* 86:251-270.
- (87) Jordan A, Scholz R, Maier-Hauff K, van Landeghem FK, Waldoefner N, Teichgraeber U, Pinkernelle J, Bruhn H, Neumann F, Thiesen B, von Deimling A und Felix R (2006) The effect of thermotherapy using magnetic nanoparticles on rat malignant glioma. *J Neurooncol* 78:7-14.
- (88) Kakihana M, Fukuda N, Suno M und Nagaoka A (1988) Effects of CDP-choline on neurologic deficits and cerebral glucose metabolism in a rat model of cerebral ischemia. *Stroke* 19:217-222.
- (89) Kanai Y und Hediger MA (1992) Primary structure and functional characterization of a high-affinity glutamate transporter. *Nature* 360:467-471.
- (90) Kanner BI (1994) Sodium-coupled neurotransmitter transport: structure, function and regulation. *J Exp Biol* 196:237-49.:237-249.
- (91) Kanner BI und Schuldiner S (1987) Mechanism of transport and storage of neurotransmitters. *CRC Crit Rev Biochem* 22:1-38.
- (92) Katayama Y, Becker DP, Tamura T und Hovda DA (1990) Massive increases in extracellular potassium and the indiscriminate release of glutamate following concussive brain injury. *J Neurosurg* 73:889-900.
- (93) Kerkerian L, Dusticier N und Nieoullon A (1987) Modulatory effect of dopamine on high-affinity glutamate uptake in the rat striatum. *J Neurochem* 48:1301-1306.
- (94) Kettenmann H und Ransom BR (2005) *Neuroglia*. Oxford University Press; Oxford, New York.

- (95) Kew JN und Kemp JA (2005) Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology. *Psychopharmacology (Berl)* 179:4-29.
- (96) Kiening KL, van Landeghem FKH, Schreiber S, Thomale UW, Von Deimling A, Unterberg AW und Stover JF (2002) Decreased hemispheric Aquaporin-4 is linked to evolving brain edema following controlled cortical impact injury in rats. *Neurosci Lett* 324:105-108.
- (97) Kimelberg HK, Rutledge E, Goderie S und Charniga C (1995) Astrocytic swelling due to hypotonic or high K<sup>+</sup> medium causes inhibition of glutamate and aspartate uptake and increases their release. *J Cereb Blood Flow Metab* 15:409-416.
- (98) Kochanek PM, Marion DW, Zhang W, Schiding JK, White M, Palmer AM, Clark RS, O'Malley ME, Styren SD, Ho C und et al. (1995) Severe controlled cortical impact in rats: assessment of cerebral edema, blood flow, and contusion volume. *J Neurotrauma* 12:1015-1025.
- (99) Koizumi H, Fujisawa H, Ito H, Maekawa T, Di X und Bullock R (1997) Effects of mild hypothermia on cerebral blood flow-independent changes in cortical extracellular levels of amino acids following contusion trauma in the rat. *Brain Res* 747:304-312.
- (100) Komuro H und Rakic P (1993) Modulation of neuronal migration by NMDA receptors. *Science* 260:95-97.
- (101) Kondo K, Hashimoto H, Kitanaka J, Sawada M, Suzumura A, Marunouchi T und Baba A (1995) Expression of glutamate transporters in cultured glial cells. *Neurosci Lett* 188:140-142.
- (102) Kontos HA und Wei EP (1986) Superoxide production in experimental brain injury. *J Neurosurg* 64:803-807.
- (103) Kroppenstedt SN, Kern M, Thomale UW, Schneider GH, Lanksch WR und Unterberg AW (1999) Effect of cerebral perfusion pressure on contusion volume following impact injury. *J Neurosurg* 90:520-526.
- (104) Kroppenstedt SN, Sakowitz OW, Thomale UW, Unterberg AW und Stover JF (2002) Norepinephrine is superior to dopamine in increasing cortical perfusion following controlled cortical impact injury in rats. *Acta Neurochir Suppl* 81:225-7.:225-227.
- (105) Kroppenstedt SN, Stover JF und Unterberg AW (2000) Effects of dopamine on posttraumatic cerebral blood flow, brain edema, and cerebrospinal fluid glutamate and hypoxanthine concentrations. *Crit Care Med* 28:3792-3798.
- (106) Kroppenstedt SN, Stroop R, Kern M, Thomale UW, Schneider GH und Unterberg AW (1999) Lubeluzole following traumatic brain injury in the rat. *J Neurotrauma* 16:629-637.
- (107) Kroppenstedt SN, Thomale UW, Griebenow M, Sakowitz OW, Schaser KD, Mayr PS, Unterberg AW und Stover JF (2003) Effects of early and late intravenous norepinephrine infusion on cerebral perfusion, microcirculation, brain-tissue oxygenation, and edema formation in brain-injured rats. *Crit Care Med* 31:2211-2221.
- (108) Kugler P und Schmitt A (1999) Glutamate transporter EAAC1 is expressed in neurons and glial cells in the rat nervous system. *Glia* 27:129-142.
- (109) Labrande C, Velly L, Canolle B, Guillet B, Masméjean F, Nieoullon A und Pisano P (2006) Neuroprotective effects of tacrolimus (FK506) in a model of ischemic cortical cell cultures: role of glutamate uptake and FK506 binding protein 12 kDa. *Neuroscience* 137:231-239.
- (110) Lebeurrier N, Liot G, Lopez-Atalaya JP, Orset C, Fernandez-Monreal M, Sonderegger P, Ali C und Vivien D (2005) The brain-specific tissue-type plasminogen activator inhibitor, neuroserpin, protects neurons against excitotoxicity both in vitro and in vivo. *Mol Cell Neurosci* 30:552-558.
- (111) Lee SG, Su ZZ, Emdad L, Gupta P, Sarkar D, Borjabad A, Volsky DJ und Fisher PB (2008) Mechanism of ceftriaxone induction of excitatory amino acid transporter-2 expression and glutamate uptake in primary human astrocytes. *J Biol Chem*.

- (112) Lehre KP, Levy LM, Ottersen OP, Storm-Mathisen J und Danbolt NC (1995) Differential expression of two glial glutamate transporters in the rat brain: quantitative and immunocytochemical observations. *J Neurosci* 15:1835-1853.
- (113) Levy LM, Lehre KP, Rolstad B und Danbolt NC (1993) A monoclonal antibody raised against an [Na(+)+K+]coupled L-glutamate transporter purified from rat brain confirms glial cell localization. *FEBS Lett* 317:79-84.
- (114) Levy LM, Lehre KP, Walaas SI, Storm-Mathisen J und Danbolt NC (1995) Down-regulation of glial glutamate transporters after glutamatergic denervation in the rat brain. *Eur J Neurosci* 7:2036-2041.
- (115) Lewerenz J, Letz J und Methner A (2003) Activation of stimulatory heterotrimeric G proteins increases glutathione and protects neuronal cells against oxidative stress. *J Neurochem* 87:522-531.
- (116) Li S, Mealing GA, Morley P und Stys PK (1999) Novel injury mechanism in anoxia and trauma of spinal cord white matter: glutamate release via reverse Na(+)-dependent glutamate transport. *J Neurosci* 19:RC16.
- (117) Liang J, Takeuchi H, Doi Y, Kawanokuchi J, Sonobe Y, Jin S, Yawata I, Li H, Yasuoka S, Mizuno T und Suzumura A (2008) Excitatory amino acid transporter expression by astrocytes is neuroprotective against microglial excitotoxicity. *Brain Res* 1210:11-19.
- (118) Lin CI, Orlov I, Ruggiero AM, Dykes-Hoberg M, Lee A, Jackson M und Rothstein JD (2001) Modulation of the neuronal glutamate transporter EAAC1 by the interacting protein GTRAP3-18. *Nature* 410:84-88.
- (119) Lipski J, Wan CK, Bai JZ, Pi R, Li D und Donnelly D (2007) Neuroprotective potential of ceftriaxone in in vitro models of stroke. *Neuroscience* 146:617-629.
- (120) Logan WJ und Snyder SH (1972) High affinity uptake systems for glycine, glutamic and aspartic acids in synaptosomes of rat central nervous tissues. *Brain Res* 42:413-431.
- (121) López-Redondo F, Nakajima K, Honda S und Kohsaka S (2000) Glutamate transporter GLT-1 is highly expressed in activated microglia following facial nerve axotomy. *Mol Brain Res* 76:429-435.
- (122) Lu N und DiCicco-Bloom E (1997) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide is an autocrine inhibitor of mitosis in cultured cortical precursor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:3357-3362.
- (123) Luo Y, Yin W, Signore AP, Zhang F, Hong Z, Wang S, Graham SH und Chen J (2006) Neuroprotection against focal ischemic brain injury by the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist rosiglitazone. *J Neurochem* 97:435-448.
- (124) Lynch MA und Bliss TV (1986) Noradrenaline modulates the release of [<sup>14</sup>C]glutamate from dentate but not from CA1/CA3 slices of rat hippocampus. *Neuropharmacology* 25:493-498.
- (125) MacKenzie ET, McCulloch J und Harper AM (1976) Influence of endogenous norepinephrine on cerebral blood flow and metabolism. *Am J Physiol* 231:489-494.
- (126) MacKenzie ET, McCulloch J, O'Kean M, Pickard JD und Harper AM (1976) Cerebral circulation and norepinephrine: relevance of the blood-brain barrier. *Am J Physiol* 231:483-488.
- (127) Mallolas J, Hurtado O, Castellanos M, Blanco M, Sobrino T, Serena J, Vivancos J, Castillo J, Lizasoain I, Moro MA und Davalos A (2006) A polymorphism in the EAAT2 promoter is associated with higher glutamate concentrations and higher frequency of progressing stroke. *J Exp Med* 203:711-717.
- (128) Marmarou A, Bullock RM, Young HF, Eisenberg HM und Marshall L (1994) The contribution of raised ICP and hypotension to reduced cerebral perfusion pressure in severe brain injury. In: Nagai H, Kamiya K und Ishii S (Hrsgb.), *Intracranial Pressure*. Springer -Verlag: Berlin, 302-304.
- (129) May V und Braas KM (1995) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) regulation of sympathetic neuron neuropeptide Y and catecholamine expression. *J Neurochem* 65:978-987.

- (130) McDonald JW und Johnston MV (1990) Physiological and pathophysiological roles of excitatory amino acids during central nervous system development. *Brain Res Brain Res Rev* 15:41-70.
- (131) Meister A und Anderson ME (1983) Glutathione. *Annu Rev Biochem* 52:711-760.
- (132) Miller JD (1985) Head injury and brain ischaemia--implications for therapy. *Br J Anaesth* 57:120-130.
- (133) Miller JD, Butterworth JF, Gudeman SK, Faulkner JE, Choi SC, Selhorst JB, Harbison JW, Lutz HA, Young HF und Becker DP (1981) Further experience in the management of severe head injury. *J Neurosurg* 54:289-299.
- (134) Miyamoto M, Ishida M und Shinozaki H (1997) Anticonvulsive and neuroprotective actions of a potent agonist (DCG-IV) for group II metabotropic glutamate receptors against intraventricular kainate in the rat. *Neuroscience* 77:131-140.
- (135) Muir KW (2006) Glutamate-based therapeutic approaches: clinical trials with NMDA antagonists. *Curr Opin Pharmacol* 6:53-60.
- (136) Muir KW und Lees KR (2003) Excitatory amino acid antagonists for acute stroke. *Cochrane Database Syst Rev*:CD001244.
- (137) Mukhin A, Fan L und Faden AI (1996) Activation of metabotropic glutamate receptor subtype mGluR1 contributes to post-traumatic neuronal injury. *J Neurosci* 16:6012-6020.
- (138) Murphy TH und Baraban JM (1990) Glutamate toxicity in immature cortical neurons precedes development of glutamate receptor currents. *Brain Res Dev Brain Res* 57:146-150.
- (139) Murphy TH, Miyamoto M, Sastre A, Schnaar RL und Coyle JT (1989) Glutamate toxicity in a neuronal cell line involves inhibition of cystine transport leading to oxidative stress. *Neuron* 2:1547-1558.
- (140) Murphy TH, Schnaar RL und Coyle JT (1990) Immature cortical neurons are uniquely sensitive to glutamate toxicity by inhibition of cystine uptake. *Faseb J* 4:1624-1633.
- (141) Murray GD, Teasdale GM, Braakman R, Cohadon F, Dearden M, Iannotti F, Karimi A, Lapierre F, Maas A, Ohman J, Persson L, Servadei F, Stocchetti N, Trojanowski T und Unterberg A (1999) The European Brain Injury Consortium survey of head injuries. *Acta Neurochir (Wien)* 141:223-236.
- (142) Nakajima K, Tohyama Y, Kohsaka S und Kurihara T (2001) Ability of rat microglia to uptake extracellular glutamate. *Neurosci. Lett.* 307:171-174.
- (143) Nicholls D und Attwell D (1990) The release and uptake of excitatory amino acids. *Trends Pharmacol Sci* 11:462-468.
- (144) Nilsson P, Hillered L, Ponten U und Ungerstedt U (1990) Changes in cortical extracellular levels of energy-related metabolites and amino acids following concussive brain injury in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 10:631-637.
- (145) Noda M, Nakanishi H und Akaike N (1999) Glutamate release from microglia via glutamate transporter is enhanced by amyloid-beta peptide. *Neuroscience* 92:1465-1474.
- (146) Noh JS, Kim EY, Kang JS, Kim HR, Oh YJ und Gwag BJ (1999) Neurotoxic and neuroprotective actions of catecholamines in cortical neurons. *Exp Neurol* 159:217-224.
- (147) O'Shea RD (2002) Roles and regulation of glutamate transporters in the central nervous system. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 29:1018-1023.
- (148) Oehmichen M (1995) Mechanische und andere physikalische Traumen des ZNS. In: Remmele W, Peiffer, J., Schröder, J.M. (Hrsgb.), *Neuropathologie, Muskulatur, Sinnesorgane*. Springer: Berlin Heidelberg New York.

- (149) Oka A, Belliveau MJ, Rosenberg PA und Volpe JJ (1993) Vulnerability of oligodendroglia to glutamate: pharmacology, mechanisms, and prevention. *J Neurosci* 13:1441-1453.
- (150) Olney JW (1969) Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science* 164:719-721.
- (151) Onal MZ, Li F, Tatlisumak T, Locke KW, Sandage BW, Jr. und Fisher M (1997) Synergistic effects of citicoline and MK-801 in temporary experimental focal ischemia in rats. *Stroke* 28:1060-1065.
- (152) Orrenius S, Ormstad K, Thor H und Jewell SA (1983) Turnover and functions of glutathione studied with isolated hepatic and renal cells. *Fed Proc* 42:3177-3188.
- (153) Pabst S, Hazzard JW, Antonin W, Sudhof TC, Jahn R, Rizo J und Fasshauer D (2000) Selective interaction of complexin with the neuronal SNARE complex. Determination of the binding regions. *J Biol Chem* 275:19808-19818.
- (154) Pabst S, Margittai M, Vainius D, Langen R, Jahn R und Fasshauer D (2002) Rapid and selective binding to the synaptic SNARE complex suggests a modulatory role of complexins in neuroexocytosis. *J Biol Chem* 277:7838-7848.
- (155) Palmer AM, Marion DW, Botscheller ML, Swedlow PE, Styren SD und DeKosky ST (1993) Traumatic brain injury-induced excitotoxicity assessed in a controlled cortical impact model. *J Neurochem* 61:2015-2024.
- (156) Pantaloni C, Brabet P, Bilanges B, Dumuis A, Houssami S, Spengler D, Bockaert J und Journot L (1996) Alternative splicing in the N-terminal extracellular domain of the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) receptor modulates receptor selectivity and relative potencies of PACAP-27 and PACAP-38 in phospholipase C activation. *J Biol Chem* 271:22146-22151.
- (157) Park SW, Yi JH, Miranpuri G, Satriotomo I, Bowen K, Resnick DK und Vemuganti R (2007) Thiazolidinedione class of peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists prevents neuronal damage, motor dysfunction, myelin loss, neuropathic pain, and inflammation after spinal cord injury in adult rats. *J Pharmacol Exp Ther* 320:1002-1012.
- (158) Pawlak J, Brito V, Koppers E und Beyer C (2005) Regulation of glutamate transporter GLAST and GLT-1 expression in astrocytes by estrogen. *Brain Res Mol Brain Res* 138:1-7.
- (159) Pearce IA, Cambray-Deakin MA und Burgoyne RD (1987) Glutamate acting on NMDA receptors stimulates neurite outgrowth from cerebellar granule cells. *FEBS Lett* 223:143-147.
- (160) Pellerin L, Stolz M, Sorg O, Martin JL, Deschepper CF und Magistretti PJ (1997) Regulation of energy metabolism by neurotransmitters in astrocytes in primary culture and in an immortalized cell line. *Glia* 21:74-83.
- (161) Persson M, Brantefjord M, Hansson E und Ronnback L (2005) Lipopolysaccharide increases microglial GLT-1 expression and glutamate uptake capacity in vitro by a mechanism dependent on TNF-alpha. *Glia* 51:111-120.
- (162) Piani D und Fontana A (1994) Involvement of the cystine transport system xc- in the macrophage-induced glutamate-dependent cytotoxicity to neurons. *J Immunol* 152:3578-3585.
- (163) Pines G, Danbolt NC, Bjoras M, Zhang Y, Bendahan A, Eide L, Koepsell H, Storm-Mathisen J, Seeberg E und Kanner BI (1992) Cloning and expression of a rat brain L-glutamate transporter [published erratum appears in *Nature* 1992 Dec 24-31;360(6406):768]. *Nature* 360:464-467.
- (164) Pisegna JR und Wank SA (1996) Cloning and characterization of the signal transduction of four splice variants of the human pituitary adenylate cyclase activating polypeptide receptor. Evidence for dual coupling to adenylate cyclase and phospholipase C. *J Biol Chem* 271:17267-17274.
- (165) Pitt D, Nagelmeier IE, Wilson HC und Raine CS (2003) Glutamate uptake by oligodendrocytes: Implications for excitotoxicity in multiple sclerosis. *Neurology* 61:1113-1120.

- (166) Pogun S, Dawson V und Kuhar MJ (1994) Nitric oxide inhibits 3H-glutamate transport in synaptosomes. *Synapse* 18:21-26.
- (167) Prasad MR, Ramaiah C, McIntosh TK, Dempsey RJ, Hipkens S und Yurek D (1994) Regional levels of lactate and norepinephrine after experimental brain injury. *J Neurochem* 63:1086-1094.
- (168) Prasad MR, Tzigaret CM, Smith D, Soares H und McIntosh TK (1992) Decreased alpha 1-adrenergic receptors after experimental brain injury. *J Neurotrauma* 9:269-279.
- (169) Queen SA und Feeney DM (1996) Temporally changing patterns of hippocampal cerebral glucose utilization following sensorimotor cortical contusion in rats. *Brain Res* 724:246-250.
- (170) Rajan I und Cline HT (1998) Glutamate receptor activity is required for normal development of tectal cell dendrites in vivo. *J Neurosci* 18:7836-7846.
- (171) Rao VL, Bowen KK und Dempsey RJ (2001) Transient focal cerebral ischemia down-regulates glutamate transporters GLT-1 and EAAC1 expression in rat brain. *Neurochem Res* 26:497-502.
- (172) Rao VL, Dogan A, Bowen KK, Todd KG und Dempsey RJ (2001) Antisense knockdown of the glial glutamate transporter GLT-1 exacerbates hippocampal neuronal damage following traumatic injury to rat brain. *Eur J Neurosci* 13:119-128.
- (173) Rao VLR, Baskaya MK, Dogan A, Rothstein JD und Dempsey RJ (1998) Traumatic brain injury down-regulates glial glutamate transporter (GLT-1 and GLAST) proteins in rat brain. *J Neurochem* 70:2021-2027.
- (174) Reglodi D, Somogyvari-Vigh A, Vigh S, Kozicz T und Arimura A (2000) Delayed systemic administration of PACAP38 is neuroprotective in transient middle cerebral artery occlusion in the rat. *Stroke* 31:1411-1417.
- (175) Reynolds R und Herschkowitz N (1986) Selective uptake of neuroactive amino acids by both oligodendrocytes and astrocytes in primary dissociated culture: a possible role for oligodendrocytes in neurotransmitter metabolism. *Brain Res* 371:253-266.
- (176) Romera C, Hurtado O, Mallolas J, Pereira MP, Morales JR, Romera A, Serena J, Vivancos J, Nombela F, Lorenzo P, Lizasoain I und Moro MA (2007) Ischemic preconditioning reveals that GLT1/EAAT2 glutamate transporter is a novel PPARgamma target gene involved in neuroprotection. *J Cereb Blood Flow Metab* 27:1327-1338.
- (177) Rosner MJ, Rosner SD und Johnson AH (1995) Cerebral perfusion pressure: management protocol and clinical results. *J Neurosurg* 83:949-962.
- (178) Rossi DJ, Oshima T und Attwell D (2000) Glutamate release in severe brain ischaemia is mainly by reversed uptake. *Nature* 403:316-321.
- (179) Rossi DJ und Slater NT (1993) The developmental onset of NMDA receptor-channel activity during neuronal migration. *Neuropharmacology* 32:1239-1248.
- (180) Rothstein JD, Dykes-Hoberg M, Pardo CA, Bristol LA, Jin L, Kuncl RW, Kanai Y, Hediger MA, Wang Y, Schielke JP und Welty DF (1996) Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron* 16:675-686.
- (181) Rothstein JD, Jin L, Dykes-Hoberg M und Kuncl RW (1993) Chronic inhibition of glutamate uptake produces a model of slow neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:6591-6595.
- (182) Rothstein JD, Martin L, Levey AI, Dykes-Hoberg M, Jin L, Wu D, Nash N und Kuncl RW (1994) Localization of neuronal and glial glutamate transporters. *Neuron* 13:713-725.
- (183) Rothstein JD, Patel S, Regan MR, Haenggeli C, Huang YH, Bergles DE, Jin L, Dykes Hoberg M, Viden-sky S, Chung DS, Toan SV, Bruijn LI, Su ZZ, Gupta P und Fisher PB (2005) Beta-lactam antibiotics offer neuroprotection by increasing glutamate transporter expression. *Nature* 433:73-77.

- (184) Rutledge EM und Kimelberg HK (1996) Release of [3H]-D-aspartate from primary astrocyte cultures in response to raised external potassium. *J Neurosci* 16:7803-7811.
- (185) Sato H, Tamba M, Ishii T und Bannai S (1999) Cloning and expression of a plasma membrane cystine/glutamate exchange transporter composed of two distinct proteins. *J Biol Chem* 274:11455-11458.
- (186) Sato H, Tamba M, Okuno S, Sato K, Keino-Masu K, Masu M und Bannai S (2002) Distribution of cystine/glutamate exchange transporter, system x(c)-, in the mouse brain. *J Neurosci* 22:8028-8033.
- (187) Satoh T, Ishige K und Sagara Y (2004) Protective effects on neuronal cells of mouse afforded by ebselen against oxidative stress at multiple steps. *Neurosci Lett* 371:1-5.
- (188) Saver JL, Kidwell C, Eckstein M und Starkman S (2004) Prehospital neuroprotective therapy for acute stroke: results of the Field Administration of Stroke Therapy-Magnesium (FAST-MAG) pilot trial. *Stroke* 35:e106-108.
- (189) Schabitz WR, Weber J, Takano K, Sandage BW, Locke KW und Fisher M (1996) The effects of prolonged treatment with citicoline in temporary experimental focal ischemia. *J Neurol Sci* 138:21-25.
- (190) Schluter K, Figiel M, Rozyczka J und Engele J (2002) CNS region-specific regulation of glial glutamate transporter expression. *Eur J Neurosci* 16:836-842.
- (191) Schmoker JD, Zhuang J und Shackford SR (1992) Hemorrhagic hypotension after brain injury causes an early and sustained reduction in cerebral oxygen delivery despite normalization of systemic oxygen delivery. *J Trauma* 32:714-720.
- (192) Schneider GH, Baethmann A und Kempfski O (1992) Mechanisms of glial swelling induced by glutamate. *Can J Physiol Pharmacol* 70 Suppl:S334-343.
- (193) Schubert D und Piasecki D (2001) Oxidative glutamate toxicity can be a component of the excitotoxicity cascade. *J Neurosci* 21:7455-7462.
- (194) Shih AY, Johnson DA, Wong G, Kraft AD, Jiang L, Erb H, Johnson JA und Murphy TH (2003) Coordinate regulation of glutathione biosynthesis and release by Nrf2-expressing glia potently protects neurons from oxidative stress. *J Neurosci* 23:3394-3406.
- (195) Shoge K, Mishima HK, Saitoh T, Ishihara K, Tamura Y, Shiomi H und Sasa M (1999) Attenuation by PACAP of glutamate-induced neurotoxicity in cultured retinal neurons. *Brain Res* 839:66-73.
- (196) Shuaib A, Yang Y und Li Q (2000) Evaluating the efficacy of citicoline in embolic ischemic stroke in rats: neuroprotective effects when used alone or in combination with urokinase. *Exp Neurol* 161:733-739.
- (197) Sims KD, Straff DJ und Robinson MB (2000) Platelet-derived growth factor rapidly increases activity and cell surface expression of the EAAC1 subtype of glutamate transporter through activation of phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem* 275:5228-5237.
- (198) Slusher BS, Vornov JJ, Thomas AG, Hurn PD, Harukuni I, Bhardwaj A, Traystman RJ, Robinson MB, Britton P, Lu X-CM, Tortella FC, Wozniak KM, Yudkoff M, Potter BM und Jackson PF (1999) Selective inhibition of NAALADase, which converts NAAG to glutamate, reduces ischemic brain injury. *Nat Med* 5:1396-1402.
- (199) Sollmann WP (1997) [Cranio-cerebral trauma. Diagnosis, surgical and conservative therapy]. *Unfallchirurg* 100:895-907.
- (200) Stibick DL und Feeney DM (2001) Enduring vulnerability to transient reinstatement of hemiplegia by prazosin after traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 18:303-312.
- (201) 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. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:10955-10959.

- (202) Stover JF, Schoning B, Sakowitz OW, Woiciechowsky C und Unterberg AW (2001) Effects of tacrolimus on hemispheric water content and cerebrospinal fluid levels of glutamate, hypoxanthine, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha following controlled cortical impact injury in rats. *J Neurosurg* 94:782-787.
- (203) Swanson RA, Liu J, Miller JW, Rothstein JD, Farrell K, Stein BA und Longuemare MC (1997) Neuronal regulation of glutamate transporter subtype expression in astrocytes. *J Neurosci* 17:932-940.
- (204) Tan S, Sagara Y, Liu Y, Maher P und Schubert D (1998) The regulation of reactive oxygen species production during programmed cell death. *J Cell Biol* 141:1423-1432.
- (205) Tan S, Schubert D und Maher P (2001) Oxytosis: a novel form of programmed cell death. *Curr Top Med Chem* 1:497-506.
- (206) Tanaka H, Katayama Y, Kawamata T und Tsubokawa T (1994) Excitatory amino acid release from contused brain tissue into surrounding brain areas. *Acta Neurochir Suppl (Wien)* 60:524-527.
- (207) Tanaka K, Watase K, Manabe T, Yamada K, Watanabe M, Takahashi K, Iwama H, Nishikawa T, Ichihara N, Kikuchi T, Okuyama S, Kawashima N, Hori S, Takimoto M und Wada K (1997) Epilepsy and exacerbation of brain injury in mice lacking the glutamate transporter GLT-1. *Science* 276:1699-1702.
- (208) Tazaki Y, Sakai F, Otomo E, Kutsuzawa T, Kameyama M, Omae T, Fujishima M und Sakuma A (1988) Treatment of acute cerebral infarction with a choline precursor in a multicenter double-blind placebo-controlled study. *Stroke* 19:211-216.
- (209) Tetsuka K, Hosoya KI, Ohtsuki S, Takanag H, Yanai N, Ueda M, Obinata M und Terasaki T (2001) Acidic amino acid transport characteristics of a newly developed conditionally immortalized rat type 2 astrocyte cell line (TR-AST). *Cell Struct Funct* 26:197-203.
- (210) Thomale UW, Bender M, Casalis P, Rupprecht S, Griebenow M, Neumann K, Woiciechowsky C, Unterberg AW und Stover JF (2007) Tacrolimus depresses local immune cell infiltration but fails to reduce cortical contusion volume in brain-injured rats. *Immunobiology* 212:567-576.
- (211) Thomale UW, Schaser K, Kroppenstedt SN, Unterberg AW und Stover JF (2002) Cortical hypoperfusion precedes hyperperfusion following controlled cortical impact injury. *Acta Neurochir Suppl* 81:229-31.:229-231.
- (212) Troadec JD, Marien M, Darios F, Hartmann A, Ruberg M, Colpaert F und Michel PP (2001) Noradrenaline provides long-term protection to dopaminergic neurons by reducing oxidative stress. *J Neurochem* 79:200-210.
- (213) Tsuji O, Marmarou A und Bullock RM (1994) Microdialysis detection of electrolytes and amino acids changes following head impact acceleration injury coupled with secondary insult. In: Nagai H, Kamiya K und Ishii S (Hrsgb.), *Intracranial Pressure*. Springer -Verlag: Berlin, 268-270.
- (214) Tureyen K, Kapadia R, Bowen KK, Satriotomo I, Liang J, Feinstein DL und Vemuganti R (2007) Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists induce neuroprotection following transient focal ischemia in normotensive, normoglycemic as well as hypertensive and type-2 diabetic rodents. *J Neurochem* 101:41-56.
- (215) Unterharnscheidt F (1992-1994) *Traumatologie von Hirn und Rückenmark*. Springer; Berlin Heidelberg New York.
- (216) Vallano ML (1998) Developmental aspects of NMDA receptor function. *Crit Rev Neurobiol* 12:177-204.
- (217) van den Pol AN, Gao XB, Patrylo PR, Ghosh PK und Obrietan K (1998) Glutamate inhibits GABA excitatory activity in developing neurons. *J Neurosci* 18:10749-10761.
- (218) van Landeghem F, Maier-Hauff K, Jordan A, Hoffmann K-T, Gneveckow U, Scholz R, Thiesen B, Brück W und von Deimling A (2008) Post-mortem studies in glioblastoma patients treated with thermotherapy using magnetic nanoparticles. *Biomaterials*:Epub ahead of print, PMID:18848723.
- (219) van Landeghem F, Weiss T, Oehmichen M und von Deimling A (2006) Decreased expression of glutamate transporters in astrocytes following human traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 23:1518-1528.

- (220) van Landeghem FK, Schreiber S, Unterberg AW, von Deimling A und Stover JF (2003) Differential concentration-dependent effects of prolonged norepinephrine infusion on intraparenchymal hemorrhage and cortical contusion in brain-injured rats. *J Neurotrauma* 20:1327-1337.
- (221) van Landeghem FK, Weiss T, Oehmichen M und von Deimling A (2007) Cellular localization of pituitary adenylyl cyclase-activating peptide (PACAP) following traumatic brain injury in humans. *Acta Neuropathol (Berl)* 113:683-693.
- (222) van Landeghem FK, Weiss T und von Deimling A (2007) Expression of PACAP and glutamate transporter proteins in satellite oligodendrocytes of the human CNS. *Regul Pept* 142:52-59.
- (223) van Landeghem FKH (2005) Neuropathologie von traumatischen Läsionen des ZNS und PNS. In: Unterberg AW und Wallesch CW (Hrsgb.), *Neurotrauma*. Thieme Verlag: Stuttgart, 21-32.
- (224) van Landeghem FKH, Stover JF, Bechmann I, Bruck W, Unterberg A, Buhner C und von Deimling A (2001) Early expression of glutamate transporter proteins in ramified microglia after controlled cortical impact injury in the rat. *Glia* 35:167-179.
- (225) Vaudry D, Gonzalez BJ, Basille M, Fournier A und Vaudry H (1999) Neurotrophic activity of pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide on rat cerebellar cortex during development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:9415-9420.
- (226) Vaudry D, Gonzalez BJ, Basille M, Yon L, Fournier A und Vaudry H (2000) Pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide and its receptors: from structure to functions. *Pharmacol Rev* 52:269-324.
- (227) Villalba M, Bockaert J und Journot L (1997) Pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide (PACAP-38) protects cerebellar granule neurons from apoptosis by activating the mitogen-activated protein kinase (MAP kinase) pathway. *J Neurosci* 17:83-90.
- (228) Volterra A, Trotti D, Floridi S und Racagni G (1994) Reactive oxygen species inhibit high-affinity glutamate uptake: molecular mechanism and neuropathological implications. *Ann N Y Acad Sci* 738:153-162.
- (229) Volterra A, Trotti D und Racagni G (1994) Glutamate uptake is inhibited by arachidonic acid and oxygen radicals via two distinct and additive mechanisms. *Mol Pharmacol* 46:986-992.
- (230) Volterra A, Trotti D, Tromba C, Floridi S und Racagni G (1994) Glutamate uptake inhibition by oxygen free radicals in rat cortical astrocytes. *J Neurosci* 14:2924-2932.
- (231) Watanabe H und Bannai S (1987) Induction of cystine transport activity in mouse peritoneal macrophages. *J Exp Med* 165:628-640.
- (232) Watase K, Hashimoto K, Kano M, Yamada K, Watanabe M, Inoue Y, Okuyama S, Sakagawa T, Ogawa S, Kawashima N, Hori S, Takimoto M, Wada K und Tanaka K (1998) Motor discoordination and increased susceptibility to cerebellar injury in GLAST mutant mice. *Eur J Neurosci* 10:976-988.
- (233) Wong LF, Ralph GS, Walmsley LE, Bienemann AS, Parham S, Kingsman SM, Uney JB und Mazarakis ND (2005) Lentiviral-mediated delivery of Bcl-2 or GDNF protects against excitotoxicity in the rat hippocampus. *Mol Ther* 11:89-95.
- (234) Yamagata K, Ichinose S und Tagami M (2004) Amlodipine and carvedilol prevent cytotoxicity in cortical neurons isolated from stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res* 27:271-282.
- (235) Yepes M, Sandkvist M, Wong MK, Coleman TA, Smith E, Cohan SL und Lawrence DA (2000) Neuroserpin reduces cerebral infarct volume and protects neurons from ischemia-induced apoptosis. *Blood* 96:569-576.
- (236) Zelenai O, Schlag BD, Gochenauer GE, Ganel R, Song W, Beesley JS, Grinspan JB, Rothstein JD und Robinson MB (2000) Epidermal growth factor receptor agonists increase expression of glutamate transporter GLT-1 in astrocytes through pathways dependent on phosphatidylinositol 3-kinase and transcription factor NF-kappaB. *Mol Pharmacol* 57:667-678.

(237) Zhang H, Zhang X, Zhang T und Chen L (2001) Excitatory amino acids in cerebrospinal fluid of patients with acute head injuries. *Clin Chem* 47:1458-1462.

(238) Zlotnik A, Gurevich B, Tkachov S, Maoz I, Shapira Y und Teichberg VI (2007) Brain neuroprotection by scavenging blood glutamate. *Exp Neurol* 203:213-220.

(239) Zwienenberg M, Gong QZ, Berman RF, Muizelaar JP und Lyeth BG (2001) The effect of groups II and III metabotropic glutamate receptor activation on neuronal injury in a rodent model of traumatic brain injury. *Neurosurgery* 48:1119-1126.

## 7. Abkürzungsverzeichnis

4F2hc	schwere Kette des 4F2-Antigens (CD98, SLC3A2)
AMPA	$\alpha$ -Amino-3-Hydroxy-5-Methylisoxazol-4-Propionat
ASC1	kationischer Aminosäuretransporter („solute carrier family 7 member 10“, SLC7A10)
BDNF	„brain-derived neurotrophic factor“
cAMP	zyklisches Adenosin-Monophosphat
CBF	zerebraler Blutfluss
CCII	„controlled cortical impact injury“
CGA	Cystin/Glutamat-Antiporter
CPP	zerebraler Perfusionsdruck
DCG IV	(2S,1'R,2'R,3'R)-2-(2,3-Dicarboxycyclopropyl)Glycin
EAAC1	„excitatory amino acid carrier 1“ (EAAT3, SLC1A1)
EAAT	„excitatory amino acid transporter“
GABA	gamma-Aminobuttersäure
GDNF	„glial-derived neuronal neurotrophic factor“
GFAP	saures Gliafaserprotein
GLAST	Glutamat-Aspartat-Transporter (EAAT1, SLC1A3)
GLT1	Glutamatttransporter 1 (EAAT2, SLC1A2)
GluR	Glutamatrezeptor vom AMPA-Typ
GSH	Glutathion
GSTP1	Glutathion S-Transferase 3
GTRAP	Glutamatttransporter-assoziiertes Protein
h	Stunden
HE	Hämatoxylin & Eosin-Färbung
IGF	„insulin-like growth factor“
MABP	mittlerer arterieller Blutdruck
mGluR	metabotroper Glutamatrezeptor
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NO	Stickstoff (“nitric oxide”)
PACAP	„pituitary adenylate cyclase activating polypeptide“
PPAR	peroxisome proliferator-activated receptor
SHT	Schädel-Hirntrauma
SAB	Subarachnoidalblutung
SABP	systolischer arterieller Blutdruck
xCT	aktive Untereinheit des CGA (SLC7A11)
ZNS	zentrales Nervensystem

## 8. Abbildungsverzeichnis

- **Abb. 1, S. 6:** aus (223).

## Erklärung

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, daß

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde.
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden.
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

.....  
Datum

.....  
Unterschrift