

# LOKALISERING AV GLUTAMATTRANSPORTØREN EAAC I HIPPOCAMPUS CA1

*av*  
*Anette Cecilie Kanzler*



*Hovedfagsoppgave for graden Cand. Scient.*

*Program for Fysiologi,  
Institutt for Molekylær Biovitenskap,  
UIO*

*2004*

## FORORD

Denne hovedfagsoppgaven ble utført ved Centre for Molecular Biology and Neuroscience (CMBN), Anatomisk institutt, Universitetet i Oslo, fra høsten 2002 til høsten 2004.

Jeg vil takke min veileder Niels Christian Danbolt for opplæring, veiledning og kunnskapsformidling. Jeg vil også takke David Furness for hjelp med bildebehandling, den semikvantitative analysen av elektronmikroskopisk data, samt for konstruktiv hjelp og tilbakemeldinger. Takk til Aud Ragnhild Skår for opplæring i immuncytokjemi, perfusjonsfiksering, samt for alle timene i elektronmikroskopet. Takk rettes også til Silvia Holmseth og Lars Petter Bjørnsen for opplæring i antistoffproduksjon, elektroforese og immunblotting. Takker også min internveileder Göran Nilsson ved Institutt for Molekylær Biovitenskap, Universitetet i Oslo.

Jeg vil takke Bjørg Riber og Karen-Marie Gujord for opplæring i frysesubstituering og i skjæring på ultramikrotom, Carina Knutsen og Gunnar Lothe for kopiering av bilder og for lån av mørkerom, Bashir Hakim for opplæring i elektronmikroskop og dataprogrammet AnalySIS®, Sophia Salicath for immunisering og tapping av kaniner og ellers alle jeg har kunnet spørre om hjelp og som alltid har møtt meg med ett smil.

Takk til alle ved Anatomisk institutt for deres bidrag til en vennlig og stimulrende atmosfære. Spesielt takk til mine medstudenter, Marita S. Hansen, Aisha Quershi og Nina Grutle for faglige og ikke fullt så faglige diskusjoner.

En ekstra takk rettes til Maria Niki Mylonakou og Nils-Michael Jahnsen for deres vennskap og for mange, altfor lange, lunch- og kaffepauser.

Helt til slutt vil jeg takke min kjære, Egil Andresen Wold. Din enestående (og til tider irriterende) positivitet har hjulpet meg gjennom mang en vanskelig og tøff stund, så uten deg vet jeg ikke hva jeg skulle gjort!

Midler fra Norges forskningsråd og Toppforskningsprogrammet gjorde dette arbeidet mulig.

## SAMMENDRAG

Glutamat er kvantitativt den dominerende eksitatoriske neurotransmitteren i sentralnervesystemet (CNS) hos pattedyr, og er sannsynligvis involvert i de fleste aspekter ved normal hjernefunksjon, inkludert hukommelse og læring. Hjernen inneholder store mengder glutamat, men på tross av det og at glutamat hele tiden frisettes, befinner nesten all glutamat seg intracellulært. Dette skyldes at ekstracellulær glutamat raskt blir pumpet inn i cellene ved hjelp av glutamattransportører. Fem subtyper av disse transportørene er til nå blitt identifisert (GLAST, GLT, EAAC, EAAT4 og EAAT5). Når det gjelder lokaliseringen av disse i hjernevev, har man minst informasjon om EAAC og EAAT5. De eneste kvantitative elektronmikroskopiske data på distribusjonen av EAAC i hjernevev (He *et al.*, 2000) er fra hippocampusregionen CA1 (stratum radiatum) og er usikre fordi merkingen i vevet var svak. I henhold til dette studiet er den høyeste tettheten av EAAC ved siden av de postsynaptiske fortetningene (PSD). Aud Skår fra vår gruppe (upublisert, hovedfagsoppgave 2002) studerte EAAC i hippocampusregionen CA3 (stratum radiatum og stratum lucidum) og fant at hovedmengden av merkingen var i PSD. Målet med denne oppgaven, var å finne ut om forskjellene i PSD-merking skyldes forskjeller mellom ulike subregioner av hippocampus eller om det hadde andre årsaker. Vev fra CA1 regionen ble undersøkt med alle tilgjengelige antistoffer mot EAAC, og alle antistoffene gav PSD-merking. Antistoffer mot GLAST og GLT ble brukt som kontroller, og gav ingen PSD-merking. Det gjorde heller ikke antistoff fra preimmunserum. Hjernevev fra genmodifiserte mus som manglet EAAC (KO-mus), villtype mus (WT-mus) og Wistar rotter ble løst opp i SDS, separert ved elektroforese i geler laget med 10 % akrylamid og immunblottet. Antistoffene virket spesifikke for EAAC. Imidlertid gav antistoffene merking på fiksert vev fra hippocampus og striatum fra KO-musene. Elektronmikroskopisk analyse viste at merkingsmønsteret var det samme. Elektroforese i 10 – 20 % gradientgeler viste at antistoffene kryssreagerte med to små molekyler (ca 10 – 15 kDa) som ikke var synlig på de første immunblottene. Det ble også gjort forsøk på å få indirekte informasjon om distribueringen til EAAC ved å se på distribueringen til et EAAC-bindende forankringsprotein, GTRAP3-18. Dette krevde tilgang til anti-GTRAP3-18 antistoffer som verken vi eller andre grupper til nå har klart å fremskaffe. Konklusjon: Forskjellene mellom funnene til He og medarbeidere (2000) og Aud Skår skyldes antagelig antistoffene, men dette studiet kan verken bekrefte eller avkrefte konklusjonene til He og medarbeidere, og er en demonstrasjon på hvor vanskelig det er å bli sikker på hva antistoffene faktisk merker i fiksert vev.

# INNHALDSFORTEGNELSE

|   |           |
|---|-----------|
| <b>FORORD</b> .....   | <b>2</b>  |
| <b>SAMMENDRAG</b> .....                                     | <b>3</b>  |
| <b>FORKORTELSER</b> .....                                   | <b>6</b>  |
| <b>1 INTRODUKSJON</b> .....                                 | <b>8</b>  |
| <b>1.1 HIPPOCAMPUS</b> .....                                | <b>8</b>  |
| <b>1.2 GLUTAMAT</b> .....                                   | <b>9</b>  |
| 1.2.1 Nevrotransmitter.....                                 | 10        |
| 1.2.1.1 Syntese av glutamat .....                           | 11        |
| 1.2.2 Reseptorer.....                                       | 12        |
| 1.2.3 Transportører .....                                   | 13        |
| 1.2.3.1 Glutamattransportører i plasmamembranen (EAAT)..... | 13        |
| 1.2.3.2 Andre transportører for glutamat .....              | 15        |
| 1.2.3.3 Mekanismen bak glutamatopptak .....                 | 16        |
| 1.2.4 Regulering av glutamatopptak.....                     | 17        |
| <b>1.3 HENSIKT</b> .....                                    | <b>19</b> |
| <b>2 MATERIALER OG METODER</b> .....                        | <b>21</b> |
| <b>2.1 MATERIALER</b> .....                                 | <b>21</b> |
| 2.1.1 Kjemikalier.....                                      | 21        |
| 2.1.2 Forsøksdyr.....                                       | 22        |
| 2.1.3 Peptider.....   | 22        |
| 2.1.4 Primær antistoffer.....                               | 23        |
| <b>2.2 VEVSPREPARERING</b> .....                            | <b>24</b> |
| 2.2.1 Vev til fiksering.....                                | 24        |
| 2.2.1.1 Immersjonsfiksering .....                           | 24        |
| 2.2.1.2 Perfusjonsfiksering.....                            | 24        |
| 2.2.2 Ferskt vev .....                                      | 25        |
| <b>2.3 ANTISTOFFPRODUKSJON</b> .....                        | <b>25</b> |
| 2.3.1 Kobling av peptider til bærerproteiner .....          | 25        |
| 2.3.2 Immunisering .....                                    | 26        |
| 2.3.3 Affinitetsrensing.....                                | 27        |
| 2.3.3.1 Kobling av peptider til agarose .....               | 27        |
| 2.3.3.2 Antistoffrensing .....                              | 27        |
| 2.3.4 Proteinmåling .....                                   | 29        |
| 2.3.5 Testing av antistoff.....                             | 29        |
| <b>2.4 ELEKTROFORESE OG IMMUNBLOTTING</b> .....             | <b>30</b> |
| 2.4.1 Støping av gel.....                                   | 30        |
| 2.4.2 Elektroforese .....                                   | 30        |
| 2.4.3 Western-blotting.....                                 | 30        |
| 2.4.4 Immundeteksjon .....                                  | 31        |
| 2.4.4.1 Alkalisk fosfatase.....                             | 31        |

|            |  |           |
|------------|--|-----------|
| 2.4.4.2    | ECL (Enhanced Chemo Luminescence).....   | 31        |
| <b>2.5</b> | <b>IMMUNCYTOKJEMI .....</b>  | <b>32</b> |
| 2.5.1      | Lysmikroskopisk .....  | 32        |
| 2.5.1.1    | Gelatininnstøpning av vev .....  | 32        |
| 2.5.1.2    | Skjæring på vibrasjonsmikrotom .....   | 32        |
| 2.5.1.3    | HRP-DAB metoden (Peroksidasemerking) .....   | 33        |
| 2.5.2      | Elektronmikroskopisk .....   | 34        |
| 2.5.2.1    | Innstøpning i Lowicryl® (Frysesubstitusjon).....   | 34        |
| 2.5.2.2    | Skjæring av ultatynne snitt.....   | 34        |
| 2.5.2.3    | Immunmerking av ultatynne snitt (Postembedding) .....  | 35        |
| 2.5.2.4    | Semikvantitativ analyse av immunmerking .....  | 35        |
| <b>3</b>   | <b>RESULTATER .....</b>  | <b>37</b> |
| <b>3.1</b> | <b>PRODUKSJON OG RENSING AV ANTISTOFF.....</b>   | <b>37</b> |
| 3.1.1      | Rensing av antistoff mot GTRAP3-18 .....   | 37        |
| 3.1.2      | Rensing av anti-C479 mot tubulin.....  | 37        |
| 3.1.3      | Absorpsjon av anti-C491-523 mot anti-C510-523 .....  | 37        |
| <b>3.2</b> | <b>TESTING AV RENSEDE ANTISTOFFER VED IMMUNBLOTTING .....</b>  | <b>39</b> |
| 3.2.1      | Spesifisitetstesting av anti-GTRAP3-18.....  | 39        |
| 3.2.2      | Spesifisitetstesting av anti-C479 og anti-C491-509 .....   | 39        |
| 3.2.3      | Testing av de fraksjonerte anti-C491 antistoffene.....   | 40        |
| 3.2.4      | Testing av antistoffer på KO og WT mus.....  | 41        |
| <b>3.3</b> | <b>LYSMIKROSKOPISK UNDERSØKELSE AV VEV FRA ROTTE .....</b>   | <b>44</b> |
| 3.3.1      | HRP-DAB merking hos rotte (Rattus norvegicus).....   | 44        |
| <b>3.4</b> | <b>ELEKTRONMIKROSKOPISK UNDERSØKELSE AV VEV FRA ROTTE .....</b>  | <b>50</b> |
| 3.4.1      | Immunmerking av CA1 regionen, stratum radiatum, med EAAC hos rotte.....                                | 50        |
| 3.4.1.1    | Semikvantitativ analyse .....  | 53        |
| 3.4.1.2    | Distribusjon av merking i den postsynaptiske regionen.....   | 54        |
| <b>3.5</b> | <b>UNDERSØKELSER AV VEV FRA KO- OG WT-MUS .....</b>  | <b>57</b> |
| 3.5.1      | Lysmikroskopisk .....  | 57        |
| 3.5.2      | Elektronmikroskopisk .....   | 57        |
| <b>4</b>   | <b>DISKUSJON.....</b>  | <b>59</b> |
| <b>4.1</b> | <b>ANTISTOFFER MOT GTRAP3-18-PEPTIDET GJENKJENNER PEPTIDET, MEN IKKE<br/>PROTEINET .....</b>           | <b>59</b> |
| <b>4.2</b> | <b>ANTISTOFFENE MOT EAAC GJENKJENNER EAAC PÅ IMMUNBLOTT .....</b>                                      | <b>59</b> |
| <b>4.3</b> | <b>MAN KAN IKKE FORUTSI OM ET ANTISTOFF VIL GJENKJENNE EN HOMOLOG,<br/>IKKE-IDENTISK SEKVENS .....</b> | <b>61</b> |
| <b>4.4</b> | <b>ER ANTISTOFFENE SPESIFIKKE I INTAKT FIKSERT VEV .....</b>   | <b>62</b> |
| <b>4.5</b> | <b>ER EAAC DISTRIBUTERT I ELLER VED SIDEN AV PSD?.....</b>   | <b>63</b> |
| <b>4.6</b> | <b>KONKLUSJON.....</b>   | <b>64</b> |
|            | <b>REFERANSER .....</b>  | <b>65</b> |

## **FORKORTELSER**

|         |   |
|---------|---|
| AMPA    | $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-metyl-4-isoxazolepropionat      |
| ATP     | adenosin trifosfat  |
| ATPase  | adenosin trifosfatase                                       |
| BSA     | bovint serum albumin  |
| CA      | cornus ammonis (del av hippocampus)                         |
| CNS     | sentralnervesystemet  |
| DAB     | 3,3'-diaminobenzidin tetrahydroklorid                       |
| DMSO    | dimetylsulfoksid  |
| DTT     | dithiothreitol  |
| EAAC    | excitatory amino acid carrier (glutamatttransportør nr. 3)  |
| EAAT    | excitatory amino acid transporter                           |
| EDTA    | etendiamintetraeddiksyre                                    |
| EM      | elektronmikroskop   |
| GABA    | $\gamma$ -aminobutyrat                                      |
| GLAST   | glutamate aspartat transportør (glutamatttransportør nr. 1) |
| GLT     | glutamatttransportør (glutamatttransportør nr. 2)           |
| GluR    | glutamatreseptor  |
| GTRAP   | glutamatttransportør assosiert protein                      |
| HEPES   | N-2-hydroxyetyl piperazin-N'-2-etansulfonsyre               |
| HRP-DAB | pepperrot peroksidase – DAB metoden                         |
| HSA     | humant serum albumin  |
| Ig      | immunoglobulin  |
| KLH     | keyhole limpet hemacyanin                                   |
| KO      | knock-out   |
| LM      | lysmikroskop  |
| mGluR   | metabotrop glutamatreseptor                                 |
| mRNA    | messenger RNA (ribo-nukleær-syre)                           |
| NaPi    | natriumfosfatbuffer   |
| NMDA    | N-metyl-D-aspartat  |
| NCS     | Serum fra nyfødte kalver                                    |
| PBS     | fosfatbuffret saltvann (0.135 m NaCl, 10 mM NaPi pH 7.4)    |
| PKC     | proteinkinase C   |

|          |  |
|----------|--|
| PMSF     | fenylmetansulfonylfluorid  |
| PSD      | postsynapsisk fortetning   |
| rpm      | omdreininger pr minutt   |
| SDS      | natriumdodecylsulfat   |
| SDS-PAGE | natriumdodecylsulfat polyakrylamid gelelektroforese  |
| TBS      | trisbuffret saltvann (0.15 M NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 0.3 M NaCl, 0.1 M Tris-HCl pH 7.4 eller 50 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7.4)  |
| TBST     | TBS tilsatt Tween 20 (ved immunblotting; 0.15 M NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.05 % Tween 20) eller Triton X-100 (ved immuncytokjemi; 50 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 0.1 % Triton X-100) |
| TEM      | transmisjons elektronmikroskop   |
| TEMED    | N,N,N',N'-tetrametyletylenediamin  |
| Tris     | tris(hydroksymetyl)aminometan  |
| Triton X | poluetylen p-t-oktylfenol  |
| Tween    | polyoksyetylen sorbitolester   |
| WT       | wild-type (kontrollmus som ikke er genmodifisert)  |

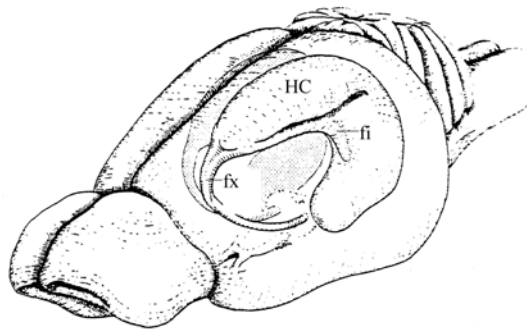
# 1 INTRODUKSJON

## 1.1 HIPPOCAMPUS

Hippocampus (fig 1.1) er en av de mest studerte strukturene i pattedyrs sentralnervesystem. Det er to grunner til dette. Hippocampus har en lett identifiserbar struktur, både makro- og mikroskopisk, og helt siden 1950-årene har hippocampus vært ansett for å være sentral både for hukommelse og læring. Hippocampus og assosierte strukturer er også av klinisk interesse på grunn av deres tilbøyelighet til å gi epileptiske anfall. Deler av hippocampus, spesielt entorrhinalbarken, er blant de strukturene som rammes hardes ved Alzheimer's sykdom. Hippocampus er også spesielt sårbar for effekter av ischemi og anoxi.

Hippocampus består av en gruppe strukturer, som tilhører det limbiske systemet, og kalles med en samlebetegnelse for den hippocampale formasjonen. Hippocampus-formasjonen består av 6 underregioner; gyrus dentatus, selve hippocampus, subiculum, presubiculum, parasubiculum og entorrhinalbarken (Amaral and Witter, 1990).

Den relativt oversiktlige anatomiske og funksjonelle organiseringen av hippocampus har gjort hippocampus til et nyttig modellsystem for studier av neuroanatomiske og elektrofysiologiske prosesser.



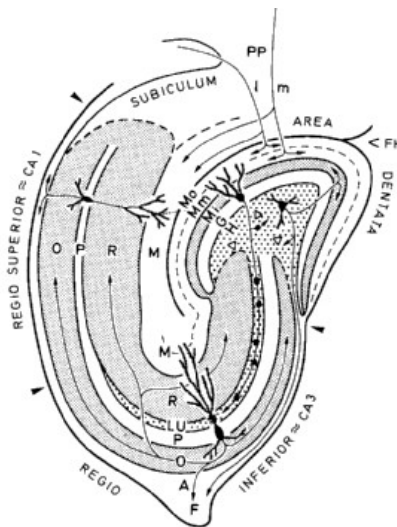
**Fig 1.1** Skisse av rotte hjerne. Hippocampus danner en C-formede struktur. HC: Hippocampus, Fi: fimbria og fx: forynx. (figur fra Amaral and Witter, 1990)

Hos rotter består hippocampus av tre deler; CA1, CA2 og CA3.



Nervecellene i hippocampusformasjonen består av celler fra gyrus dentatus, CA3 og CA1, og deres synapser (Amaral and Witter, 1990). Sensorisk informasjon entrer via celler i det overfladiske laget til entorrhinalbarken, som sender sine aksoner til molekylærlaget i gyrus dentatus. Der synapser de med dendrittene til korncellene, som har sine cellelegemer i stratum granulare. Aksoner fra korncellene, kalt mosefibre, synapser med dendritter til pyramidecellelaget i CA3. I det siste trinnet innnerverer pyramideaksonene i CA3 pyramidecelledendrittene i stratum radiatum og stratum oriens i CA1. Disse aksonene kalles Schaffer kolateraler. I tillegg sendes en gren ut til fimbria, som er en struktur i forhjernen. Den prosesserte informasjonen sendes så tilbake til entorrhinalbarken av pyramidecelleaksoner i CA1, direkte eller via subiculum. (fig. 1.2)

Mye av det som i dag er kjent om fysiologien og farmakologien ved synaptisk overføring i sentralnervesystemet kommer fra studier av hippocampus.



**Fig 1.2** Tverrsnitt av hippocampus. De ulike lagene er tydelig markert. Denne hovedoppgaven konsentrere seg om stratum radiatum (R) i CA1 regionen. O, stratum oriens; P, stratum pyramidale; M, stratum moleculare. (Figuren er hentet fra Storm-Mathisen, 1981)

Denne hovedfagsoppgaven konsentrerer seg om stratum radiatum i CA1 regionen.

## 1.2 GLUTAMAT

### 1.2.1 *Nevrotransmitter*

Glutamat regnes som den viktigste eksitatoriske nevrotransmitteren i sentralnervesystemet (CNS) hos pattedyr, og er sannsynligvis involvert i de fleste aspekter ved normal hjernefunksjon, forståelse, hukommelse og læring (for oversikt se Fonnum, 1984; Danbolt, 2001). Glutamat spiller også en viktig rolle under sentralnervesystemets utvikling (McDonald and Johnston, 1990; LaMantia, 1995), inkludert synapse-eliminering og cellemigrering, differensiering og død (Danbolt, 2001). I tillegg har glutamat en signalrolle i perifere organer og vev, så vel som i endokrine celler (for oversikt se Moriyama *et al.*, 2000). Nesten alle celler i CNS uttrykker glutamatreseptorer, og flertallet av synapsene i hjernen ser ut til å være glutamaterge (Ottersen and Storm-Mathisen, 1984).

Hjernen inneholder store mengder glutamat (for oversikt se: Schousboe, 1981), med en gjennomsnittlig konsentrasjon på ca. 10 mM, hvorav nesten alt befinner seg intracellulært. Den høyeste konsentrasjonen av glutamat befinner seg i nerveterminalene (Shupliakov *et al.*, 1992; Ottersen *et al.*, 1996). Den ekstracellulære konsentrasjonen av glutamat er generelt lav (3-4  $\mu$ M) (Hamberger and Nystrom, 1984; Lehmann *et al.*, 1983). Konsentrasjonsgradienten av glutamat over plasmamembranen er altså stor (flere tusen ganger). Umiddelbart etter synaptisk frisetning kan konsentrasjonen i synapsespalten muligens bli så høy som 1-2 mM (Clements *et al.*, 1992; Nicholls, 1993).

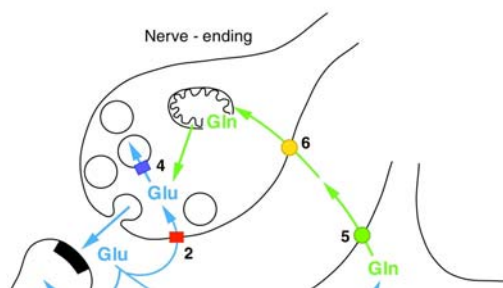
Etter at glutamat er frisatt fra synapsen må det fjernes fra ekstracellulærvæsken. Enkel diffusjon er en viktig mekanisme for fjerning av glutamat fra synapsespalten. Dette skjer pga den store konsentrasjonsforskjellen mellom synapsespalten og ekstracellulærvæsken rundt. Mekanismen som er ansvarlig for langtids opprettholdelse, og rask fjerning av glutamat fra ekstracellulærvæsken, er cellulært opptak ved hjelp av  $\text{Na}^+$ -avhengige transportører som sitter i plasmamembranen til omkringliggende celler. Disse transportørene bruker de elektrokjemiske gradientene til  $\text{Na}^+$  og  $\text{K}^+$ , over plasmamembranen, som drivkraft for opptak (oversikt se Danbolt, 2001). Glutamattransportørene er derfor essensielle for å opprettholde et høyt signal/støy forhold (oversikt se: Danbolt, 2001). Hvis glutamat ikke fjernes fra synapsespalten kan det resultere i overaktivering av glutamatreseptorer, som igjen kan føre til økt

signaloverføring, nerveskade og celledød (Choi, 1988; Olney *et al.*, 1971; Regan and Choi, 1991). Glutamat i høye doser ekstracellulært er derfor toksisk.

### 1.2.1.1 Syntese av glutamat

Både glia- og nerveceller har evnen til å ta opp glutamat (for oversikt se Danbolt, 2001). Glutamat tatt opp i cellene blir så enten brukt til metabolske prosesser (proteinsyntese, energi metabolisme, ammoniakk fiksering) eller resirkulert som transmitter.

I gliaceller blir glutamat omdannet til glutamin ved hjelp av et ATP-avhengig enzym, glutaminsyntetase. Glutamin transporteres så ut i ekstracellulærvæsken. Glutamin påvirker ikke nervecellenes eksitabilitet, og er ikke toksisk i høye konsentrasjoner (normal ekstracellulær konsentrasjon 200-500  $\mu\text{M}$ ). Dette betyr at konsentrasjonen av glutamin ikke må kontrolleres så nøye som tilfellet er for glutamat (Brodal, 2001). Glutamin transporteres inn i nerveterminalene, hvor det omdannes til glutamat via fosfataktivert glutaminase. Dette enzymet befinner seg i membranen til mitokondriene (Van den Berg and Garfinkel, 1971; Martinez-Hernandez *et al.*, 1977). Glutamat pakkes inn i synaptiske vesikler av egne transportørproteiner i vesikkelmembranen (se avsnitt 1.2.3.2), og frisettes som andre transmittere ved  $\text{Ca}^{2+}$ -avhengig eksocytose (oversikt se: Sudhof, 1995; Cousin and Robinson, 1999). Prosessen blir ansett for hovedmekanismen for glutamat resirkulering og kalles glutamat-glutamin syklusen (fig 1.3).



**Fig 1.3** Etter synaptisk frisetting fjernes glutamat fra ekstracellulærvæsken ved hjelp av Na<sup>+</sup>-avhengige transportører (se avsnitt 1.2.3.1) som sitter i plasmamembranen til omkringliggende celler. Ekstracellulært glutamat kan tas opp via dendrittmembranen (3), via nerveterminalmembranen (2) eller via gliamembranen (1). I gliaceller (1) blir toksisk glutamat omdannet til ikke toksisk glutamin og transportert ut (5) i ekstracellulærvæsken hvor det tas opp av nerveterminaler (6). I nerveterminalene omdannes glutamin til glutamat i mitokondriemembraner. Glutamat blir så pakket i vesikler (4), og er igjen klare for frisetting. Glu, glutamat; Gln, glutamin. (Figuren er hentet fra Danbolt, 2001).

I gliacellene finnes det også et annet glutamatmetaboliserende enzym, glutamatdehydrogenase, som omdanner glutamat til  $\alpha$ -ketoglutarat.  $\alpha$ -Ketoglutarat overføres til nerveterminalene på lik måte som glutamin (McKenna *et al.*, 1996).

### 1.2.2 Reseptorer

Glutamatreseptorene (GluR) blir inndelt i tre ulike klasser; de ionotrofe (iGluR) og de metabotrofe (mGluR) (for oversikt se Ozawa *et al.*, 1998). De ulike klassene blir videre delt inn i genfamilier på grunnlag av sekvenshomologi.

De ionotrofe glutamatreseptorene (iGluR) består av kation-spesifikke ionekanaler og deles inn i 3 grupper, tilhørende 2 ulike genfamilier, som er navngitt etter hvilken agonist som ble funnet i å aktivere dem; AMPA ( $\alpha$ -amino-3-hydroxyl-5-metyl-4-isoxazole propionate acid), kainat og NMDA (N-metyl-D-aspartat).

AMPA (GluR1-4)- og kainatreseptorer (GluR5-7, KA1-2) medierer rask og presis eksitatorisk nevrotransmisjon i de fleste synapser i sentralnervesystemet. Begge tillater passasje av Na<sup>+</sup> og K<sup>+</sup>, men kun svært små mengder Ca<sup>2+</sup>, som er typisk for raske, eksitatoriske synapser. AMPA-reseptorene kan også binde kainat, men da med lavere affinitet enn for AMPA. Tilsvarende binder kainat-reseptorene AMPA.

NMDA-reseptorene (NR1, NR2A-D og NR3A-B) spiller en viktig rolle for synaptiske endringer under nervesystemets utvikling og ved læring. De har flere egenskaper som skiller dem fra de andre ionotrofe glutamatreseptorene. Den første er at NMDA er spenningsavhengig. Ved hvilepotensiale er kanalen stengt ved hjelp av et  $Mg^{2+}$ -ion. Ioneflyt gjennom kanalen skjer kun når den postsynaptiske cellen er depolarisert (for oversikt se Ozawa *et al.*, 1998 og Dingledine *et al.*, 1999), som for eksempel ved stimulering av nærliggende AMPA-reseptorer. Den andre er at NMDA er mer permeabel for  $Ca^{2+}$  enn for  $Na^{+}$ .  $Ca^{2+}$  er et intracellulært signalstoff og kan sette i gang prosesser som blant annet kan føre til varig endret synaptisk aktivitet. Den siste er at NMDA-reseptoren både åpnes, lukkes og desensitiviseres langsommere enn de andre ionotrofe glutamatreseptorene (Lester *et al.*, 1990).

De metabotrofe reseptorene (mGluR) er ulike de ionotrofe ved at de virker via aktivisering av et G-protein, som modulerer produksjonen av intracellulære signalstoffer.

De metabotrofe reseptorene befinner seg både pre- og postsynaptisk. De er inndelt i 3 hovedgrupper som baserer seg på ulike intracellulære signalveier. Gruppe I fører til langvarig depolarisering, mens gruppe II og III til langvarig hyperpolarisering, som motvirker dannelsen av aksjonspotensial.

mGluR fremkaller en rekke ulike metabolske virkninger, blant annet har de vist seg å spille en viktig rolle ved utvikling av LTP og LTD (Brodal, 2001).

### **1.2.3 Transportører**

#### *1.2.3.1 Glutamatttransportører i plasmamembranen (EAAT)*

Fem medlemmer av glutamatttransportørfamilien er til nå blitt isolert og klonet fra pattedyrs sentralnervesystem: EAAT1 (GLAST) (Storck *et al.*, 1992), EAAT2 (GLT) (Pines *et al.*, 1992), EAAT3 (EAAC) (Kanai and Hediger, 1992), EAAT4 (Fairman *et al.*, 1995) og EAAT5 (Arriza *et al.*, 1997). De deler 50-60 % sekvenslikhet med hverandre, 30-40 % likhet med bærere av to nøytrale aminosyrer (alanin-serin-cystein transportørene ASCT1 og ASCT2) (Arriza *et al.*, 1993; Shafiqat *et al.*, 1993; Hoffman *et al.*, 1994; Utsunomiya-Tate *et al.*, 1996) og 20-30 % likhet med proton-avhengige bakterielle

glutamat (Tolner *et al.*, 1992) og dikarboksyilat (Engelke *et al.*, 1989; Pajor, 1996) transportører. Alle disse proteinene tilhører samme genfamilie (Slotboom *et al.*, 1996), men har ingen signifikant likhet med noen andre kjente proteinfamilier. Det er kun EAAT-transportørene som kan inkluderes i begrepet glutamattransportører.

Hos pattedyr har de fem ulike transportørene en 90 % sekvenslikhet (innen en og samme art) med det ekvivalente proteinet til en annen art. Til tross for denne likheten skiller de seg markant fra hverandre i vevsfordeling, kinetikk og farmakologiske egenskaper (Danbolt, 2001).

GLT er den kvantitativt viktigste glutamattransportøren i CNS, med unntak av de regioner hvor GLAST dominerer. Lokaliseringen av GLT avhenger om det er snakk om GLT mRNA eller GLT protein. GLT mRNA er uttrykt i både astroglia og nevroner, mens GLT protein hovedsakelig er uttrykt i astroglia (unntaket er retina hvor det befinner seg på nevroner) i ett fullt utviklet nervesystem. Den høyeste konsentrasjonen av GLT er i forhjernen. Perifere organer som uttrykker GLT er blant annet melkeproduserende brystkjertler, placenta og pancreas

GLAST uttrykkes i hele CNS, i samme astrocytter som GLT, men i ulike mengder i ulike regioner (Lehre *et al.*, 1995; Schmitt *et al.*, 1997; Berger and Hediger, 1998). GLAST-transportørene er den kvantitativt viktigste transportøren i molekylærlaget i cerebellum (Lehre and Danbolt, 1998), det indre øret (Furness and Lehre, 1997; Takumi *et al.*, 1997), vestibularorganet (Berger and Hediger, 2000) og retina (oversikt se Rauven *et al.*, 1999). GLAST er ikke funnet i nevroner, og er kun uttrykt i gliaceller i CNS (inkluderer retina). Perifere organer som har vist seg å uttrykke GLAST er blant annet placenta, benvev og melkeproduserende brystkjertler.

EAAC er uttrykt i høye konsentrasjoner i hippocampus, cerebellum og basal gangliene (Conti *et al.*, 1998; Kugler and Schmitt, 1999), men da i mye lavere konsentrasjoner enn GLT og GLAST (Haugeto *et al.*, 1996, Lehre og Danbolt, upublisert). EAAC er, i motsetning til GLT og GLAST, hovedsakelig uttrykket i nevroner (Kanai and Hediger, 1992), men er også beskrevet å være uttrykt i gliaceller i cortex cerebri og hvit substans (Conti *et al.*, 1998). Mens GLT og GLAST hovedsakelig er lokalisert i

plasmamembranen, er EAAC også lokalisert til vesikler i cytoplasma. Dette medfører at EAAC raskt kan transporteres ut til plasmamembranen.

Perifere organer som uttrykker EAAC er blant annet nyre (større konsentrasjon enn i hippocampus), tarm, hjerte og placenta. I nyrene er EAAC lokalisert i apikalmembranen til de proksimale tubuliene (Shayakul *et al.*, 1997).

EAAC KO-mus utvikler ingen store nevrologiske symptomer eller nevrodegenereringer under perioder på over 12 måneder, foruten om at homozygote mutanter har en redusert spontan lokomotorisk aktivitet (Peghini *et al.*, 1997). EAAC KO-mus taper derimot glutamat og aspartat i urinen, noe som bekrefter EAACs rolle i reabsorpsjon av glutamat fra nyrenes proksimale tubuli (Peghini *et al.*, 1997).

EAAT4 er den kvantitativt viktigste transportøren i purkinjecellene i molekylærlaget til cerebellum. Den høyeste konsentrasjonen er å finne rett utenfor den perisynaptiske membranen hvor spinamembran vender mot gliamembran.

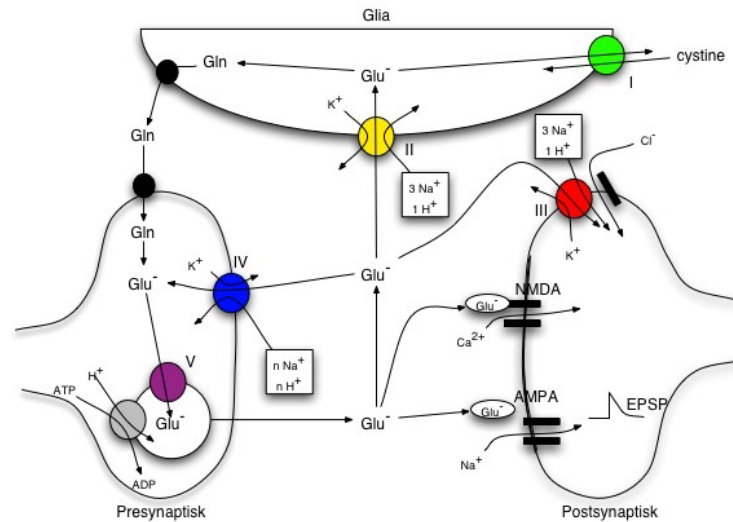
Lokaliseringen av EAAT5 er lite kjent, men den finnes uttrykt i lave konsentrasjoner i Müllercellene i retina. EAAT5 finnes også antagelig i små konsentrasjoner i hjernen. (For oversikt over lokalisering av de ulike transportørene, se figur 1.4).

### 1.2.3.2 Andre transportører for glutamat

Det finnes også en del andre transportører som har evne til å translokere glutamat. Disse finnes dels i plasmamembranen og dels intracellulært.

I plasmamembranen til gliaceller finnes de såkalte cystin-glutamat utvekslerne. Disse utvekslerne frakter cystin inn i cellen i bytte mot glutamat, og blir betraktet som glutamat-drevne transportører for cystin fordi det er glutamatgradienten som utgjør drivkraften. I tillegg finnes det intracellulære transportører, både vesikulære (VGluT 1 -3) (Ozkan and Ueda, 1998; Bellocchio *et al.*, 2000) og mitokondrielle (Palmieri *et al.*, 2001). Det er de vesikulære transportørene som fyller de synaptiske vesiklene med glutamat fra cytosol. Denne transporten stimuleres av et indre positivt membranpotensiale, som genereres av en  $H^+$ -ATPase som sitter i vesikkelmembranen og

pumper inn  $H^+$ . I mitokondriene finnes to ulike glutamattransportører; en proton-glutamat symport og en glutamat-aspartat antiport.



**Fig 1.4** Glutamattransportørene i de forskjellige cellemembranstrukturene. I: Glutamat går ut av cellen i kotransport med cystin. II: Gliacellene tar opp 1 glutamat ved hjelp av  $3 Na^+$  og  $1 H^+$  inn, og  $1 K^+$  ut (GLT og GLAST). III: Den postsynaptiske cellemembranen tar opp glutamat på samme måte som gliacellene (EAAC1). IV: Den presynaptiske terminalen tar opp  $Na^+$  og  $H^+$  sammen med glutamat, men støkiometrien her er usikker. V: Gltamat tas opp i vesikler i nervetreminalene (VGluT1 – 3) (figuren er selvkomponert).

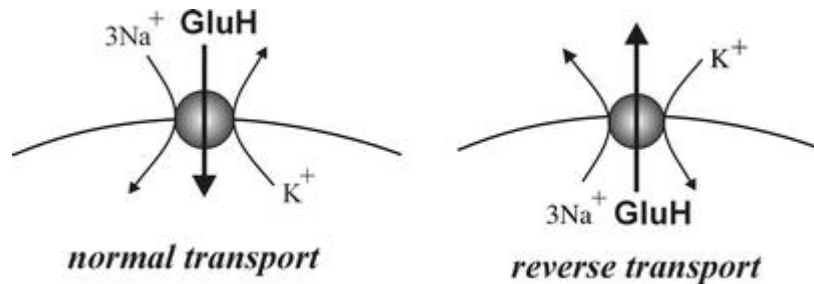
### 1.2.3.3 Mekanismen bak glutamatopptak

Opptaksmekanismen for glutamat er drevet av elektrokjemiske gradienter over cellemembranen.  $Na^+$  er nødvendig for at glutamat skal kunne binde seg, mens  $K^+$  er nødvendig for nettotransport. Nettotransport av glutamat er derfor bare mulig dersom det finnes  $K^+$  intracellulært (for oversikt se Danbolt, 2001). Prosessen er dessuten elektrogen, dvs netto positiv ladning beveger seg inn, og er dermed stimulert av et negativt membranpotensiale. Elektrogeniteten indikerer at det dannes en strøm over membranen, under transport, som kan måles med elektrofysiologiske metoder.

Transportørene bruker de elektrokjemiske gradientene til hovedsakelig  $Na^+$  og  $K^+$ , men også til  $H^+$  (Billups *et al.*, 1996; Levy *et al.*, 1998a) som energikilde for transportprosessen. Energiforbruket til transporten, konsentrasjonskapasiteten til transportørene og sensitiviteten til endringer i ionegradientene (ved f.eks ischemi) avhenger transportørenes av støkiometri. Studier basert på humant EAAC (Zerangue and



Kavanaugh, 1996) og rotte GLT (Levy *et al.*, 1998b) har vist at disse transportørene har følgende støkiometri: 1 glutamat tas opp sammen med 3 Na<sup>+</sup> og 1 H<sup>+</sup> i bytte mot 1 K<sup>+</sup>. Denne koblingen støtter en transmembran konsentrasjonsgradient ( $[Glu]_{inne}/[Glu]_{ute}$ ) som kan overskride 10<sup>6</sup> ved likevektsforhold, og tillater glutamattransportørene å fjerne glutamat over ett stort spekter av ioneforhold. (Fig 1.5)



**Fig 1.5** Støkiometri for normal og reversert transport til glutamattransportørene. GluH er protonert form av glutamat. (Figur hentet fra Kanai and Hediger, 2003).

Støkiometrien for GLAST, EAAT4 og EAAT5 er ikke kjent, og det kan ikke tas for gitt at den stemmer overens med GLT og EAAC. Men med denne forutsetningen er det blitt estimert at energiforbruket til glutamattransportører i cerebral cortex kun representerer 2 % av det totale energiforbruket i vevet (Attwell and Laughlin, 2001).

#### 1.2.4 Regulering av glutamatoptak

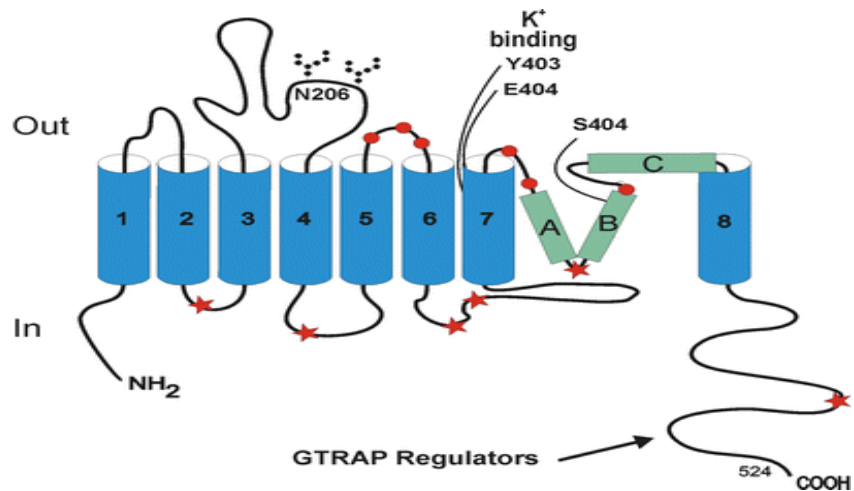
Glutamatoptaket i CNS er ikke konstant, men under stadig regulering. Dette gjelder ikke bare under utvikling, men også i det fult utviklede sentralnervesystemet. Opptaket blir regulert på alle mulige nivåer: DNA-transkripsjon, mRNA-spleising, proteinsyntese, protein-targeting, aminosyretransport og ionekanal-aktiviteter (for oversikt se Gegelashvili and Schousboe, 1998; Sims and Robinson, 1999; Danbolt, 2001).

Translokeringen av membranproteiner mellom plasmemembranen og intracellulære lagre representerer en viktig mekanisme for regulering. Slike forandringer i celleoverflaten kan opp- eller nedregulere membranproteiner på få minutter, dette er raskere enn regulering ved proteinsyntese. Det har vist seg at uttrykkelsen og funksjonen av glutamattransportører kan bli regulert ved aktiveringen av intracellulære signalmolekyler. For eksempel, ved å bruke celler som kan uttrykke EAAC, er det vist at

glutamattransporten reguleres raskt ved aktivering av visse vekstfaktorer (Sims *et al.*, 2000) eller av proteinkinase C (PKC) (Dowd and Robinson, 1996). Nylig ble det vist at EAAC uttrykt i *Xenopus laevis* oocytter blir nedregulert ved aktiveringen av PKC (Trotti *et al.*, 2001). Denne nedreguleringen viste seg å være assosiert med nedgangen i maksimal transport hastighet ( $V_{maks}$ ) og forflytingen av transportøren fra plasmamembranen til intracellulære lagre. Dette skjedde uten noen forandringer i affiniteten til glutamat ( $K_m$  Glu). Disse funnene antyder at PKC ikke direkte fosforylerer EAAC, men heller indirekte endrer fordelingen av EAAC i plasmamembranen og intracellulære vesikler. I motsetning til dette, har eksperimenter med C6-glioma celler, som kun uttrykker EAAC, vist at aktivering av PKC øker glutamattransportaktiviteten ved å forflytte EAAC til plasmamembranen (Davis *et al.*, 1998; Dowd and Robinson, 1996; Gonzalez *et al.*, 2003). Blant EAAC, GLT, og GLAST, er det kun EAAC som reguleres av PKC via intracellulære transport, og dette skjer antagelig på en måte som er spesifikk for celletypen, fordi aktiveringen av PKC gir ulike effekter i ulike celletyper.

Aktiviteten til glutamattransportørene kan også reguleres av protein-protein interaksjoner. To proteiner kalt GTRAP41 og GTRAP48 (glutamattransportassosierte proteiner for EAAT4) har vist seg å interagere med det intracellulære carboxyl-terminal domene til EAAT4 og modulere dens glutamattransportaktivitet (Jackson *et al.*, 2001). Uttrykkelsen av enten GTRAP41 eller GTRAP48 førte til en økning i  $V_{maks}$  for glutamattransporten, men ingen endring  $K_m$  verdi (Kanai and Hediger, 2003). EAAC interagerer med et helt forskjellig protein kalt GTRAP3-18, som interagerer med carboxyl-terminal domene til EAAC (Lin *et al.*, 2001) (Fig 1.6). GTRAP3-18 messenger RNA (mRNA) og protein befinner seg i samme vev og i de samme regionene som EAAC. GTRAP3-18 reduserer affiniteten av EAAC for glutamat både *in vitro* og *in vivo* (Lin *et al.*, 2001). Ved å øke uttrykkelsen av GTRAP3-18 i celler, reduseres EAAC-mediert glutamattransport ved at substrataffiniteten senkes.

Reguleringen av glutamat opptaket er i tillegg sensitiv for arakidonsyre (Trotti *et al.*, 1995) og oksidering av SH-grupper (Trotti *et al.*, 1996).



**Fig 1.6** Membran topologimodel for glutamattransportørene. Topologien som her vises er basert på eksperimenter som involverer biotinylering av cystinmutanter til glutamattransportøren GLT fra rotte hjerne (Grunewald and Kanner, 2000; Grunewald *et al.*, 1998). Modellen viser de 8 antatte transmembrane  $\alpha$ -heliksene (nr 1 – 8), en stor glykosylert ekstracellulær lomme mellom transmembran domene 3 og 4, en ”reentrant loop” (A, B) mellom transmembrandomene 7 og 8 som representerer translokeringsspenen, en lomme (C) som delvis går ned i translokeringsspenen mellom domene 7 og 8 og reguleringssetet for GTRAP3-18 (figur hentet fra Kanai and Hediger, 2003).

### 1.3 HENSIKT

Vår gruppe laget antistoffer mot EAAC allerede i 1993 og har brukt disse til å kartlegge distribusjonen av dette proteinet. Vi har imidlertid ikke følt oss trygge på resultatene. I mellomtiden har andre grupper også laget antistoffer og publisert sine resultater som omfatter data fra både lysmikroskopi og elektronmikroskopi (basert på materiale merket før innstøpning: "pre-embedding") (blant annet: Rothstein *et al.*, 1994; Kugler and Schmitt, 1999). Deres data er i hovedsak i samsvar med våre upubliserte data, noe som tyder på at antistoffene har (nokså) lik spesifisitet. Gruppen til Morrison har fulgt dette opp med kvantitative elektronmikroskopiske undersøkelser av somatosensorisk

hjernebark og av stratum radiatum i hippocampus regionen CA1 (He *et al.*, 2000). Deres data er imidlertid lite overbevisende fordi merkingen er så svak. Aud Skår i vår gruppe arbeidet med ett av våre antistoffer og klarte etter mye utprøving å få kraftigere merking. Det hun imidlertid kom fram til, var at EAAC sitter i de postsynaptiske fortetningene og ikke ved siden av disse slik He og medarbeidere konkluderte. Dette reiste spørsmålet om hva forskjellen skyldes. En mulighet er at dette er en regional forskjell, fordi Skår studerte hippocampus regionen CA3 mens He og medarbeidere så på CA1 regionen. Andre muligheter er forskjeller på forsøksdyrene, forskjeller mellom antistoffene eller immunmerkingsprosedyrene. En direkte måte å tilnærme seg spørsmålet på er å undersøke CA1 regionen i de samme dyrene og med de samme reagensene og metodene Skår benyttet. En indirekte måte er å se på lokaliseringen av et EAAC-bindende forankringsprotein (GTRAP3-18), men det forutsetter antistoffer mot GTRAP3-18 og ulike slike antistoffer har ikke vært laget.

### **Problemstillinger:**

Denne hovedfagsoppgaven tar sikte på å finne svar på følgende spørsmål:

1. Hvor i hippocampus uttrykkes EAAC forankringsproteinet GTRAP3-18?  
Lokaliseringen av dette proteinet skulle skje ved egenproduserte antistoff.
2. Skyldes forskjellene på dataene til Skår og He at lokaliseringen av EAAC er forskjellig mellom CA1 og CA3 regionene?  
For å besvare dette, vil hippocampusregionen CA1 fra Skårs rotter bli undersøkt med flere ulike EAAC-antistoffer, inkludert de Skår har brukt.
3. Er merkingen i vevet et spesifikt uttrykk for lokaliseringen til EAAC?  
For å svare på dette vil ulike EAAC-antistoffer bli testet for å se om de merket de samme strukturene. De vil også bli testet på hippocampusvev fra genmodifiserte mus som mangler EAAC (KO-mus) og deretter sammenlignet med resultater fra normal mus (WT-mus) og rotte.

## **2 MATERIALER OG METODER**

### **2.1 MATERIALER**

#### ***2.1.1 Kjemikalier***

Bovint serum albumin (BSA), diaminobenzidin (DAB), humant serum albumin (HSA), keyhole limpet hemocyanin (KLH), Miliporefilter (0.45  $\mu\text{m}$ ), fenylmetansulfonylfluorid (PMSF), Triton X-100, Trizma base og Tween 20 fra Sigma (St. Louis, MO, USA). Serum fra nyfødte kalver (NCS) var fra GIBCO (Paisley, Skottland). Blycitrat, ”nett coating pen”, hinnerammer og paraformaldehyd (renset) var fra Electron Microscopic Sciences (Pennsylvania, USA). Dimetylsulfoksid (DMSO), etanolamin, 25 % glutaraldehyd (elektronmikroskopkvalitet), 87 % glyserol, glysin, hydrogenklorid (HCl),

Lowicryl, dinatriumhydrogenfosfat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), natriumdihydrogenfosfat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ), natriumazid ( $\text{NaN}_3$ ), natriumborhydrid ( $\text{NaBH}_4$ ) og uranylacetat fra Fluka (Buchs, Sveits). Metallnett (nikkelnett) var fra Standard Supplies (Kållerød, Sverige). Natriumhydroksid (til natriumetanolat) var fra SDS (Peypin, Frankrike). Dextran 70 var fra Amersham (Uppsala, Sverige). Natriumdodecylsulfat (SDS) med høy renhet (>99 %  $\text{C}_{12}$  alkylsulfat) og Dura-system fra Pierce (Rockford, IL, USA). N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonsyre (HEPES) og Freund's adjuvans fra Difco (Detroit, MI, USA). Affigel (N-hydroxysuccininmidster på kryssbundet agarose) og gradient geler (10-20 % og 8-16 % acrylamid) fra BioRad (Richmond, CA, USA). Elektroforeseutstyr, nitrocellulosemembraner (0.22  $\mu\text{m}$  porer, 100 % nitrocellulose), Sephadex G-50 fine, steptavidin-peroksidase komplekser og standardproteiner (Rainbow markers) til SDS-polyakrylamid gelelektroforese (SDS-PAGE) fra Amersham (Buckinghamshire, UK). Akrylamid, alkalisk fosfatasekonjugert anti-kanin IgG og alkalisk fosfatase substrater (nitroblått-tetrazolium og 5-brom-4-klor-3-inodyl fosfat), ammoniumpersulfat, N,N'-methylene.bisakrylamid og TEMED fra Promega (Madison, WI, USA). Hypnorm fra Janssen-CILAG (Buckinghamshire, UK). Equithisin fra Apoteket.

### **2.1.2 Forsøksdyr**

Wistar rotter (200 – 400g) ble innkjøpt fra B & K Universal (Sollentuna, Sverige). De befant seg på dyrestallen ved instituttgruppen for medisinske basalfag. Temperaturen var 24 °C og lyset var regulert (12 timers lys/mørke syklus). De fikk mat og vann ad libidum.

Transgent musevev var fra laboratoriet til Dwight Bergles ved John Hopkins University (Baltimore, USA). Derfra ankom det tre ferdig fikserte hjerner (to KO og en WT) og to hjerner klare for homogenisering (en KO og en WT).

### **2.1.3 Peptider**

Dataprogrammet Protean (fra DNASTAR, inc., Madison, Wisconsin, USA) ble brukt til å lokalisere og velge ut de mest hydrofile, og antatt mest antigene områdene. Fig 2.1 nedenfor vises analysen av GTRAP3-18. Et peptid svarende til aminosyrene 16-31



|     |                     |                  |          |         |          |          |            |
|-----|---------------------|------------------|----------|---------|----------|----------|------------|
|     | 10                  | 20               | 30       | 40      | 50       | 60       | 70         |
| 1   | MDVNLAPLRAWDDFF     | PGSDRFARPDFRDISK | WNNNRVVS | NLLYYQ  | TNYLVVA  | AMMISVVG | FLSPFNILGG |
|     | 80                  | 90               | 100      | 110     | 120      | 130      | 140        |
| 71  | VIVVLVFMGFVWAAHNKDI | LRRMKQYPTAFVMV   | MVLA     | SYFLISM | FGGVMVFV | FGITLPL  | LLMFIHASLR |
|     | 150                 | 160              | 170      | 180     | 190      |          |            |
| 141 | LRNLKNKLENKMEGIGL   | KKTPMVI          | ILDALE   | QQEDN   | INKFADY  | ISKARE   |            |

**Tabell 2.2** Sekvensen til GTRAP3-18 proteinet. Sekvensen som ble valgt for antistoff produksjon, er markert med blått.

## 2.2 VEVSPREPARERING

### 2.2.1 *Vev til fiksering*

#### 2.2.1.1 *Immersjonsfiksering*

Biter av ferskt vev som skal studeres lys- eller elektronmikroskopisk, kan fikseres via immersjon i fiksativ (4 % formaldehyd og 0.1 % glutaraldehyd).

Vevsbitene legges i fiksativ, innkuberes først 1-2 timer (romtemperatur), og deretter over natten (4 °C). Bitene oppbevares (4 °C) i 1 del fiksativ og 9 deler 0.1 M NaPi (natriumfosfatbuffer, pH 7.4).

#### 2.2.1.2 *Perfusjonsfiksering*

Den hurtigste måten å fikserer et dyr på, er ved perfusjonsfiksering hvor fiksativet tilføres blodsystemet umiddelbart etter avlivning med narkosemiddel.



Dextran 70 løses i 0.1 M NaPi til 40 mg/ml (4 %) og ca 25 ml pumpes opp i perfusjonsslangen. Perfusjonsvæsken tilføres vha en peristaltisk pumpe, med en hastighet på ca 50 ml/min (voksne rotter). Rottene bedøves med Equisitin (0.4 ml/100 g), thorax åpnes, og det blir raskt stukket ett hull i høyre atrium og en kanylen blir stukket inn nederst i venstre ventrikkel og pumpen startes (15 min, 500 ml fiksativ (4 % formaldehyd tilsatt 0.1 % glutaraldehyd)). Hjernen dissekres ut og etterfikseres i samme fiksativ (2 – 3 timer). Vevet oppbevares (4 °C) i 1 del fiksativ og 9 deler 0.1 M NaPi.

### **2.2.2 Ferskt vev**

Ved bruk av ferskt vev dissekeres vevet ut umiddelbart post mortem, uten bruk av fiksativ. Det ønskede vevet blir så raskt som mulig tatt ut og nedkjølt i NaPi.

## **2.3 ANTISTOFFPRODUKSJON**

Det finnes flere ulike måter å immunisere dyr på, den mest tradisjonelle måten har vært å immunisere dyret med det ønskede antigenet (f.eks et rensset protein, syntetiske peptider, polysakkarider eller aminosyrer koblet til bærerproteiner med glutaraldehyd). En annen mulighet er genetisk immunisering, her blir en passende ekspresjonsvektor, med det ønskede antigenet, injisert, og ikke antigenet selv.

### **2.3.1 Kobling av peptider til bærerproteiner**

Etter at man har valgt ut de områdene man vil lage antistoffer mot, må man ta hensyn til at små molekyler (<5-10 kDa) vanligvis ikke vil gi noen immunrespons, men må kobles til større bærerproteiner (f.eks KLH; keyhole limpet hemacyanin og BSA; bovint serum albumin) for å bli antigene. Glutaraldehyd brukes for å koble peptidene til proteinene. Borohydrid kan tilsettes for å stoppe reaksjonen og redusere dobbeltbindingene og dermed gjøre koblingen irreversibel. Dette gjøres med noen av konjugatene. Disse blir etterpå gelfilterert for å få ett mest mulig rent produkt av peptid-glutaraldehyd-

proteinkoblingen. Konjugatene som ikke blir redusert og heller ikke gelfiltrert inneholder mange ulike varianter av koblinger og løse molekyler.

*Peptider som skal reduseres og gelfiltreres:*

1 mg peptid (33 µl) blandes med 1 mg KLH i en løsning av 300 mM NaCl og 50 mM NaPi pH 7.4 og 474 µl vann (til sammen 1 ml) i et 50 ml rør. 1 ml glutaraldehyd tilsettes og rørene innkuberes (overnatten, 4 °C) under omrøring. Reaksjonen stoppes og gjøres irreversibel ved tilsetning av 22 mg natriumborohydrid (NaBH<sub>4</sub>) løst i 220 µl vann. Blandingen innkuberes (1 time) og gelfiltreres (på kolonner med Sephadex G-50 fine) for å fjerne aldehyd, frie peptider og salter. Konjugatene lagres ved – 20 °C.

*Peptider uten reduksjon og gelfiltrering:*

Peptidene (1 mg) blandes med 1 mg KLH og 0.2 M NaPi opp til 400 µl. 15 µl 25 % glutaraldehyd tilsettes og blandingen innkuberes i romtemperatur (2 timer). Lagres ved ved – 20 °C.

### **2.3.2 Immunisering**

For å aktivere immunapparatet til dyret som immuniseres, blir antigenet emulgert med Freund's komplette adjuvans (FCA, olje med mycobakterier). Adjuvanset gir langsom frisetting av antigen når det vannløste antigenet omslutes av olje. Mengden antigen kan reduseres og antistoffresponsen i dyret er mer varig. Ved første gangs immunisering ble det brukt FCA (inneholder *Mycobacterium spegmatis*), mens Freund's innkomplette adjuvans (FIA; uten bakterier) ble benyttet ved påfølgende immuniseringer.

Kaninen injisert (subkutan) med antigenblandingen på ca 20 steder på ryggen, og det injiseres ca 1 ml i hvert dyr. Kaninene tappes for blod (40 ml) hver 8, 13 og 18 dager etter tredje immunisering. Blodet innkuberes (1 time) på vannbad (37 °C) før det settes i kjøleskap i minst 1 time. Da har blodet koagulert og serumet kan tas ut. Serumet sentrifugeres (3000 rpm i 10 min ved 4 °C) før å fjerne eventuelle rester av røde blodlegemer. Supernatanten overføres til nye rør og pelletten kastes. Serumet tilsettes 0.1 % NaN<sub>3</sub> og fryses ved – 20 °C

### 2.3.3 *Affinitetsrensing*

Tappet serum inneholder flere antistoffer enn det vi er interessert i. Disse kan reagere med hjerneproteiner og gi uønsket merking. For å fjerne disse uønskede antistoffene kjøres serumet gjennom en kolonne som inneholder et immobilisert peptid, som det ønskede antistoffet vil feste seg til. Det ønskede antistoffet vil da ved endt kjøring sitte igjen i kolonnen. Disse løsnes fra kolonnen igjen ved å tilsette en elueringsbuffer med lav pH (pH 2.5), deretter nøytraliseres løsningen raskt for at antistoffene ikke skal ødelegges.

#### 2.3.3.1 *Kobling av peptider til agarose*

Peptidene kobles hver for seg, og prosedyren utføres etter produsenten BioRad Laboratories' instruksjoner. Det kobles 1 mg peptid pr. 5 ml AffiGel og 0,5 ml 2 M Na-HEPES pH 8,0. AffiGelen helles i et begerglass med 3 mM HCl slik at den kan svulle noen sekunder før den helles i en kolonne. Kolonnen kobles til vakuum fra en vannstrålepumpe for å trekke vann ut av kolonnen. AffiGelen vaskes med 50 volumer 3 mM HCl (10 – 15 min) for å fjerne isopropanolen gelen er laget på og ett volum vann tilsettes. 5 ml av gelen (10 ml suspensjon) overføres til rørene med peptid, og ende-over-ende miksing starter med en gang (2 timer – overnatten). 0.1 %  $\text{NaN}_3$  tilsettes før gelen oppbevares i kjøleskap (Kan lagres i noen måneder).

#### 2.3.3.2 *Antistoffrensing*

Kolonnene med peptid-AffiGel vaskes for å fjerne frie peptider (10 kolonnevolum vaskebuffer med Tween 20 (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 0.3 M NaCl, 1 mM EDTA, 0.05 % (v/v) Tween 20 og 0.1 % (v/v)  $\text{NaN}_3$ )). 10-20 kolonnevolum serum (tilsatt 1 mM PMSF og 5 mM EDTA) kjøres gjennom kolonnen i løpet av ca 1 time. Kolonnen vaskes med vaskebuffer med Tween 20 (1 kolonnevolum/minutt) og med vaskebuffer uten Tween 20. Antistoffene som har bundet seg til gelen fjernes vha en elueringsbuffer (0.2 M glycin-HCl pH 2.5 med 0.15 M NaCl, 5 mM EDTA og 0.1 %  $\text{NaN}_3$ ) (0.5 – 1 kolonnevolum/minutt). Eluatet nøytraliseres med 2 M Na-HEPES pH 8.7, for å ikke ødelegge antistoffene og pH sjekkes med indikator papir (pH 7 – 8). Kolonnene vaskes og nøytraliseres (vaskebuffer og Na-HEPES), og det sjekkes at pH er nøytral. Kolonnene

dekkes med Parafilm og lagres på kjølerommet til senere bruk. Proteinkonsentrasjon i eluatet bestemtes og det tilsettes 1 mM PMSF.

Antistoffene (anti-C479) vår gruppe tidligere hadde laget mot 479-498 regionen av EAAC gav et lysmikroskopisk merkingsmønster i hjernevev nokså likt det mønster vi så med anti-C491. Det var imidlertid et viktig unntak: merking av aksoplasma. Silvia Holmseth i vår gruppe fant at dette skyldes at kaninene av en eller annen grunn laget antistoff mot tubulin når de ble immunisert med C479-498 på tross av at det ikke er noen primærsekvenshomologi og på tross av at antistoffene var affinitetsrenset mot immobilisert peptid (S. Holmseth og N.C. Danbolt, upublisert). Det ble derfor bestemt å rense antistoffet for reaktivitet mot tubulin (fig 2.3B)

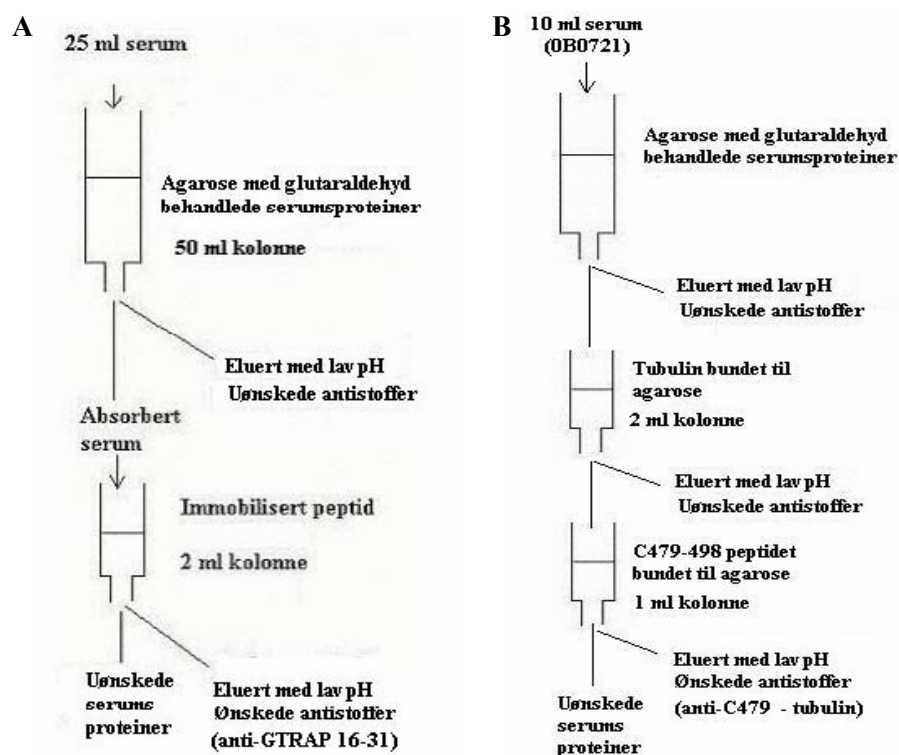


Fig 2.3 A: Kolonneoppsett for rensingen av GTRAP3-18

B: Kolonneoppsett over rensingen av C479 mot tubulin

Antistoffene mot C491-523 (fra kanin 1B0683) og mot C510-523 (fra kanin 69738) er antistoffer som er laget mot overlappende sekvenser. Før absorpsjonen, ble kolonnen først blokket med NCS, så eluert og regenerert. Deretter ble anti-C491 (1B0683) (1.9 mg) kjørt igjennom. De antistoffene som ikke bandt seg til kolonnen ble samlet opp og

betegnet ”anti-C491-509 (1B0683)”. Deretter ble de bundne antistoffene tatt løs fra kolonnen (med lav pH-buffer), samlet opp og betegnet ”anti-C510 (1B0683)” (fig 2.4).

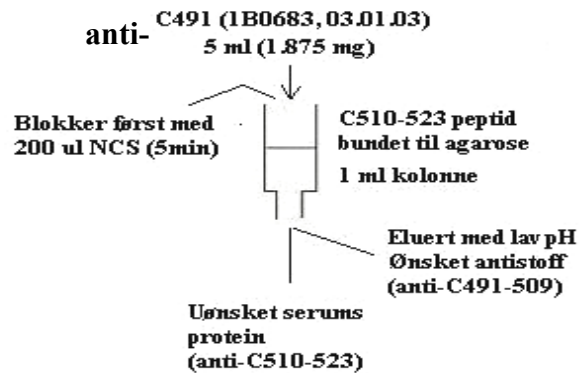


Fig 2.4 Oppsett for rensing av C491 mot C510

### 2.3.4 Proteinmåling

I denne oppgaven ble proteinkonsentrasjonen bestemt spektrofotometrisk ved 280 nm. Bovint IgG ble brukt som standard hvor 1 mg protein/ml tilsvarer en absorbans på 1.2.

### 2.3.5 Testing av antistoff

De produserte antistoffene må testes for å se om de gjenkjenner det aktuelle proteinet, i dette tilfellet en transportør, og om de er spesifikke, dvs. om de bare gjenkjenner dette proteinet. Dette gjøres ved å lage et blott med hjerneekstrakt som innkuberes med antistoffene man ønsker å teste. Viser fremkallingen mange striper, betyr det at antistoffet gjenkjenner flere ulike proteiner og dermed ikke er spesifikk mot transportør det skal gjenkjenne. En kontroll med en kjent og testet transportør viser om antistoffet gjenkjenner riktig protein (se avsnitt 2.4; Elektroforese og immunblott).

## **2.4 ELEKTROFORESE OG IMMUNBLOTTING**

### **2.4.1 *Støping av gel***

Utført som beskrevet (Laemmli, 1970). Gelene var 0.75 mm tykke, hadde 25 mm dype brønner, 20 mm stackinggel (4 % akrylamid, 0.101 % bis-akrylamid, 125 mM Tris-HCl pH 6.8, 0.1 % SDS, 7.3 mM TEMED og 2.4 mM ammoniumpersulfat) og 11 mm separeringsgel (10 % akrylamid, 0.266 % bis-akrylamid, 0.375 M Tris-HCl, 0.1 % SDS, 11 mM TEMED og 2.8 mM ammonium-persulfat).

### **2.4.2 *Elektroforese***

Ble utført som beskrevet (Danbolt *et al.*, 1990). Spacerene fjernes og kammerene fylles med running buffer (25 mM Tris pH 8.3, 0.192 M glysin, 0.1 % SDS). Prøvene tilsettes SDS-samplebuffer (10 % sucrose, 2 % SDS, 0.001 % bromfenolblått og 62.5 mM Tris-HCl pH 6.8). Som molekylvektmarkør ble Rainbow brukt. Gelene ble kjørt sakte (overnatten) med konstant strøm.

### **2.4.3 *Western-blotting***

Blottingen ble utført som beskrevet (Towbin *et al.*, 1979). Gelen legges på nitrocellulose i ett kar med blottebuffer (3 mg/ml Tris, 14.3 mg/ml glysin og 20 % (v/v) metanol) og ført ned i blottekar. Nitrocellilosen og gelen ble holdt på plass av filterpapir på over- og undersiden. 0.75 mm tykke geler ble blottet i 2 timer (ved 100 V).

#### **2.4.4 Immundeteksjon**

##### *2.4.4.1 Alkalisk fosfatase*

Prosedyre var som beskrevet (Danbolt *et al.*, 1992). Blottene vaskes (1 x 1 min) med TBST (0.15 M NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.05 % Tween 20, 0.05 % NaN<sub>3</sub>), de uspesifikke bindingssetene blokkes (30 – 60 min) i blokkeløsning (TBST med 1 % BSA) og blottene innkuberes (3 timer, eller over natten) i primærantistoff-løsning (0.2 – 10 µg/ml) i blokkerløsning. Blottene skylles (1 x 1 min pluss 3 x 10 min) i TBST og innkuberes (1 time) i sekundærantistoff-løsning konjugert til alkalisk fosfatase (1:5000) i blokkerløsning. Blottene vaskes (1 x 1 min pluss 3 x 5 min) i TBST, tørkes raskt med filterpapir og legges raskt i buffer (100 mM Tris-HCl pH 9.5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub> og 0.05 % NaN<sub>3</sub>) tilsatt substratene nitroblått tetrazolium (NBT) og 5-brom-4-klor-3-indolyfosfat (BCIP).

##### *2.4.4.2 ECL (Enhanced Chemo Luminescence)*

Denne prosedyren er mer sensitiv enn prosedyren med alkalisk fosfatase, men den må eksponeres på film.

Blottene vaskes (1 x 1 min) med TBST (0.15 M NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.0 og 0.05 % Tween 20) og de uspesifikke bindingssetene blokkes (30 min) i blokkeløsning (TBST med 4 % skummet melkepulver). Blottene innkuberes (3 timer, eller over natten) i primærantistoff-løsning (0.2 – 10 µg/ml) i 1 % BSA i TBST (med NaN<sub>3</sub>). Blottene vaskes (1 x 1 min pluss 3 x 10 min) i TBST (uten NaN<sub>3</sub>), og innkuberes (1 time) i sekundærantistoff-løsning (Sigma A-1949, 1:30 000) i blokkerløsning. Blottene vaskes (1 x 1 min pluss 3 x 10 min) i TBST (uten NaN<sub>3</sub>), og innkuberes (5 min) i Pierce Dura-

systemes (fortynnet 1 + 1 i destillert vann). Blottene tørkes raskt, dekkes med ett plastomslag og eksponeres i mørkerom.

## **2.5 IMMUNCYTOKJEMI**

### ***2.5.1 Lysmikroskopisk***

#### *2.5.1.1 Gelatininnstøpning av vev*

Små vevsbiter er ofte lettere å skjære hvis de støpes inn i gelatin.

Vevet innfiltreres med gelatin ved at det dekkes fullstendig med gelatinløsning og innkuberes ved 37 °C (1 min – 1 time, avhengig av vevs størrelse). Vevet orienteres og plasseres i en form som fylles opp med gelatin. Blokken innkuberes ved lav temperatur (– 20 °C) til gelatinen har stivnet (2 – 10 min), trimmes og innkuberes i fiksativ (4 % formaldehyd og 0.1 % glutaraldehyd) over natten. Bitene oppbevares (4 °C) i 1 del fiksativ og 9 deler 0.1 M NaPi (tilsatt 0.02 % NaN<sub>3</sub>). Gelatin-mediet bør lages like fast som vevet som skal støpes inn.

#### *2.5.1.2 Skjæring på vibrasjonsmikrotom*

En vibrerende mikrotom (Vibratom 1 000) skjærer i vått ufrosset vev (20 – 200 µm). Snittene kuttet ved at kniven beveger seg horisontalt mot vevet mens den vibrerer



sidelengs. Vevsblokken befinner seg i en kald (4 °C) bufferløsning bestående av 0.1 M NaPi (pH 7.4).

### 2.5.1.3 HRP-DAB metoden (Peroksidasemerking)

For å få et kraftig immunsignal, slik at proteinene i hjernevevet kan lokaliseres, bruker vi et trelags forsterkende system med biotin og streptavidin. Avidins høye affinitet for biotin benyttes for å få et kraftig signal. Dette signalet blir ytterligere forsterket ved bruk av et streptavidin-biotinylert tertiærmolekyl med en enzymmarkør (f.eks pepperrot peroksidase som er beregnet for bruk ved lys- og elektronmikroskopi).

Peroksidasereaksjonen skjer kun på innsiden av cellemembranen, siden cellemembranen representerer en diffusjonsbarriere. Derfor er det kun strukturer med transportører som vil gi merking. Fordi vevet er perfuksjonsfiksert med aldehyd, må aldehydgruppene blokkeres for å hindre uspesifikk merking. Dette gjøres ved innkubering i etanolamin.

Prosedyre utført som beskrevet (Danbolt *et al.*, 1998). 20 – 40 µm tykke vibratomsnitt vaskes (10 min) i 0.1 M NaPi med pH 7.4 og innkuberes (30 min) i 1 M etanolamid (regulert til pH 7.4 vha HCl og 0.1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>). Snittene vaskes (3 x 1 min) i PBS (0.135 M NaCl og 10 mM NaPi, pH 7.4) og innkuberes (1 time) i en blokkerløsning (TBS (0.3 M NaCl og 0.1 M Tris-HCl, pH 7.4), 0.1 % NaN<sub>3</sub> og 10% (v/v) nyfødt kalveserum). Snittene innkuberes (12 – 48 timer) i romtemperatur med et primærantistoff fortynnet i blokkerløsning. Snittene vaskes (3 x 1 min plus 2 x 10-20 min) i en vaskeløsning (TBS og 1 % (v/v) nyfødt kalveserum) og innkuberes (1 time) med sekundærantistoff (biotinylert esel anti-kanin Ig (Amersham RPN 1004, 1:100)) i vaskeløsning. Snittene vaskes i vaskeløsning (3 x 1 min, plus 2 x 10 – 20min) og innkuberes (1 time) i streptavidin-biotinylert pepperrot-peroksidase-kompleks (Amersham RPN 1051, 1:100) i vaskeløsning. Deretter gjentas vaskeprosessen (3 x 1 min plus 2 x 10 – 20 min). Snittene vaskes i PBS (3 x 1 min) før de først preinnkuberes i DAB- (diaminobenzidin)løsning (DAB-tablett (Sigma D-5905) i 0.1 M NaPi) (5-10 min) og deretter innkuberes i DAB-løsning tilsatt 0.01 % (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (5 – 10 min). Reaksjonen stoppes med 0.1 M NaPi (2 x 5 min). Snittene kan nå oppbevares (4 °C) i NaPi tilsatt 0.02 – 0.1 % NaN<sub>3</sub>.

For å studere snittene lysmikroskopisk (Axioplan 2 imaging, Zeiss) monteres de på dekk- eller objektglass med glyserolgelatin. Små deler av vevet kan også støpes inn (pre-embedding) og studeres i EM.

## 2.5.2 Elektronmikroskopisk

### 2.5.2.1 Innstøpning i Lowicryl<sup>®</sup> (Frysesubstitusjon)

Prosedyre stort sett basert på arbeid beskrevet (van Lookeren Campagne *et al.*, 1991). Små rektangulære biter (ca 1 mm<sup>3</sup>) av det ønskede vevet skjæres ut og frysebeskyttes i økende konsentrasjoner av glyserol (10 %, 20 %, 30 %) i 0.1 M NaPi (30 min), deretter overnatten i 30 % glyserol (4 °C). Prøvene skytes ned i en beholder med flytende propan som er nedkjølt til – 170 °C ved hjelp av flytende nitrogen (LN<sub>2</sub>) i et cryofikserings system (KF80, Reichert-Jung). Vevsbitene blir så overflyttet til et nedkjølt (– 90 °C) frysesubstitueringsapparat (AFS, Reichert).

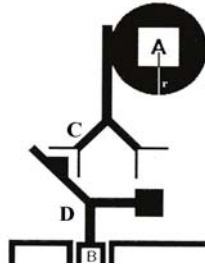
Ved frysesubstituering (Müller *et al.*, 1980) blir vevsprøvene tilsatt en løsning vannfri metanol og 0.5 % uranylacetat (blokkfiksativ). Temperaturen økes gradvis (4 °C/time) fra – 90 °C til – 45 °C. Vevsprøvene vaskes flere ganger med vannfri metanol (iskrystaller og overskudd av uranylacetat fjernes). Når all isen er borte infiltreres vevet med økende konsentrasjoner Lowicryl HM20 (Lowicryl/metanol 1:2, 1:1 og 2:1 (1 time hver) til ren Lowicryl (overnatten)). Vevet polymeriseres så med UV-lys (360 nm) i 2 dager (– 45 °C) etterfulgt av 1 dag ved romtemperatur.

### 2.5.2.2 Skjæring av ultatynne snitt

For å kunne studere snitt i elektronmikroskop må man ha ultratynne snitt (0.05 – 0.1 µm) som er festet på nikkelnett eller hinner. Det får man ved å kutte på en ultramikrotom (ultratrom) som er utstyrt med en glass – eller diamantkniv. Kuttingen krever at vevet er innstøp i et hardt plastikkmateriale (f. eks Durcupan eller Lowicryl). Ultratromen består av en arm hvor vevsblokken festes til, og som beveger seg opp og ned i forhold til kniven.

### 2.5.2.3 Immunmerking av ultatynne snitt (*Postembedding*)

Nikkelnettene med snitt innkuberes (10 min) med 0.1 % NaBH<sub>4</sub> og 50 mM glysin i TBS (50 mM med Tris-HCl, pH 7.4, 0.5 mM NaCl og 0.02 % NaN<sub>3</sub>), pH 7.4, for å inaktivere aldehydgruppene. Snittene vaskes (3 x 1 min) i TBS og blokkeres i blokkerløsning (TBS med 3 % HSA, 10 min). Nikkelnettene innkuberes over natten i primærantistoffet fortynnet i blokkerløsningen. De vaskes i TBS, (3 x 1 min + 3 x 10 min) og legges i blokkerløsningen (TBS med 3 % HSA, 10 min), før de innkuberes i sekundærantistoffet (TBS med 3 % HSA og 1/20 sekundærantistoff, GFAR BBI 15 nm for kanin antistoff). Snittene vaskes så i vann (3 x 1 min + 3 x 10 min). Tilslutt blir snittene kontrastert med 10 mg/ml uranyl acetat (20 min) og vasket i destillert vann (3 x 1 min). Snittene kan nå studeres i EM.



**Fig 2.6** Gullpartikkelen (A) kan befinne seg en viss avstand fra transportøren (B) den er forbundet med. Denne avstanden avhenger blant annet av lengden på antistoffene (C og D) og radiusen ( $r$ ) til gullpartikkelen. På det ultratynne snittet kan det derfor observeres gullpartikler i en viss radius rundt transportørene.

### 2.5.2.4 Semikvantitativ analyse av immunmerking

Distribusjonen av gullpartikler i ulike cellulære regioner ble gjort semikvantitativt ved hjelp av ett digitalt elektronmikroskop. Først ble stratum radiatum funnet, ved en forstørrelse hvor gullpartiklene ikke var synlige, og en tilfeldig region av denne ble så valgt. Forstørrelsen ble økt til merkingen var synlig. Denne regionen ble så valgt som startpunkt fra hvor 10 tilfeldige bilder ble tatt ved å tilfeldig bevege mikroskopskontrollene. De eneste restriksjonene var, at bevegelsen av kontrollene var stor nok til å forhindre overlapp med det forrige området, og at bildet ikke ble tatt i ett område med mye vevsødeleggelser eller kontrastutfelling.

Bildene ble analysert ved hjelp av dataprogrammet AnalySIS®. Antall gullpartikler ble telt opp over dendrittstammer og aksoner (membraner, mitokondrier og cytoplasma), presynaptiske terminaler (membraner, mitokondrier og cytoplasma), spina (postsynaptiske fortetninger, membraner og cytoplasma) og glia prosesser. Gullpartikler som lå inntil 25 nm fra en membran ble tildelt denne membranen (se (Takumi *et al.*, 1997 for diskusjon om immungull oppløsning). Hvis membranen lå 25 nm fra to ulike membraner ble den ikke tildelt noen av dem. Disse og andre gullpartikler som ikke med sikkerhet kunne bli plassert innenfor en kategori, ble ansett som uidentifiserbare.

I følge He og medarbeidere (He *et al.*, 2000) er gullmerkingen ved bruk av antistoffer mot EAAC lokalisert til membranen rett utenfor de synaptiske fortetningene. For å teste om våre antistoffer mot EAAC ville gi den samme merkingen, ble bilder med høy forstørrelse (64000X) tatt av tilfeldig valgte synapser. Den postsynaptiske regionen ble så analysert ved først å måle lengden av de postsynaptiske fortetningene langs membranene og deres vidde ved sentrum av fortetningene. Siden lengden varierte betraktelig (se resultater, avsnitt 3.4.1.2) ble videre studier kun gjort på postsynaptiske fortetninger på ca 200 nm (185 – 215 nm) og 250 nm (235 – 265 nm). På begge lengdene tillot vi en variasjon på  $\pm 15$  nm siden endene til de postsynaptiske fortetningene som regel ikke var godt nok definert til å kun gi en nøyaktig verdi.

Fordelingen langs de synaptiske membranene ble funnet ved å måle den korteste distansen fra partiklene til membranen og distansen fra det punktet til senteret av den postsynaptiske fortetningen.

Ved å begrense analysen til et relativt smalt lengde område av den postsynaptiske fortetningen var det mulig å plote distansen til partiklene fra senteret av fortetningen og bestemme om det er en spesifikk distribusjon langs de synaptiske membranene.

### **3 RESULTATER**

#### **3.1 PRODUKSJON OG RENSING AV ANTISTOFF**

##### ***3.1.1 Rensing av antistoff mot GTRAP3-18***

En kanin (2B0795) ble immunisert med peptid-konjugat etter reduksjon med borhydrid, og en annen (2B0816) ble immunisert med peptid-konjugatet uten forbehandling (se avsnitt 2.3.2).

25 ml serum fra hver kanin ble absorbert og deretter affinitetsrenset (se fig. 2.3A). Serumet fra kanin 2B0795 ble målt til 1.3 mg antistoff, mens serumet fra kanin 2B0816 ga 0.6 mg antistoff. Begge kaninene hadde dermed produsert antistoff mot peptidet

##### ***3.1.2 Rensing av anti-C479 mot tubulin***

10 ml serum fra kanin 0B0721 ble kjørt i gjennom en kolonne med immobilisert tubulin for å absorbere vekk uønskede antistoffer og deretter igjennom en kolonne med immobilisert C479-peptid for å samle opp de ønskede antistoffene. Dette ble gjort to ganger (den 19.09.2002 og den 19.08.2003) med serum fra to ulike tappinger av kaninen. Det ble isolert henholdsvis 0.035 og 0.37 mg antistoff.

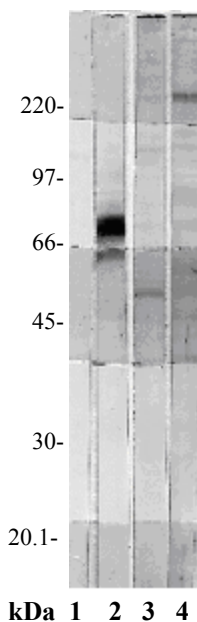
##### ***3.1.3 Absorpsjon av anti-C491-523 mot anti-C510-523***

De to fraksjonene "anti-C510" (1B0683) innehold henholdsvis 0.047 og 0.094 mg antistoff.

## 3.2 TESTING AV RENSEDE ANTISTOFFER VED IMMUNBLOTTING

### 3.2.1 Spesifisitetstesting av anti-GTRAP3-18

Antistoffene fra de to kaninene som ble immunisert med et peptid svarende til en del av GTRAP3-18 (se avsnitt 3.1.1) ble testet på Western blott av SDS-ekstrakter av rotte forhjerne (helt vev). Preimmune IgG og anti-C491 mot EAAC ble brukt som henholdsvis positiv og negativ kontroll. Som man kan se av fig. 3.1, gav ingen av de to antistoffene spesifikk merking av noe molekyl med molekylmasse på 20 kDa som er det som svarer til GTRAP3-18. Fordi antistoffene i stedet merket et antall andre bånd, ble det konkludert at antistoffene ikke var brukbare til å undersøke GTRAP3-18. Distribusjonen til dette proteinet lot seg derfor ikke undersøke i denne omgang.



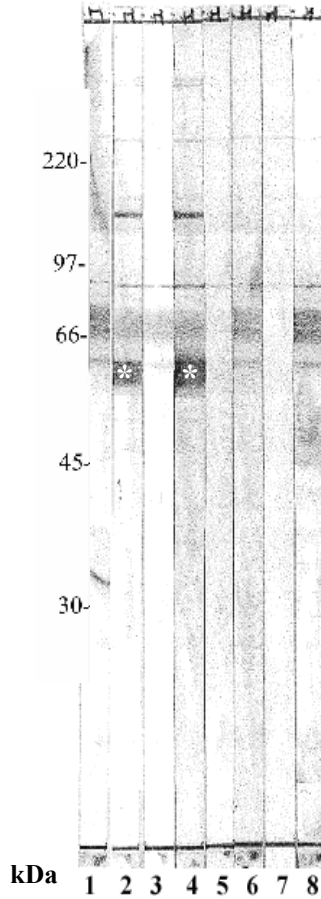
**Fig 3.1** Testing av anti-GTRAP3-18 antistoffer på Western blott (10 % acrylamid) av SDS-oppløst rottehjerne (helt vev). 1. Negativ kontroll (preimmune IgG fra kanin 1B0683). 2. Positiv kontroll (anti-C491 mot EAAC fra kanin 1B0683). 3. Anti-GTRAP3-18 (2B0795). 4. Anti-GTRAP3-18 (2B0816).

Legg merke til at flere bånd er merket på både blottstripe 3 og 4 samtidig som det ikke er merking i området rundt 20 kDa hvor GTRAP3-18 befinner seg.

### 3.2.2 Spesifisitetstesting av anti-C479 og anti-C491-509

Spesifisiteten til de tubulin-absorberte anti-C479 antistoffene (0B0721; 19.09.2002; Se avsnitt 3.1.2) ble sammenlignet med spesifisiteten til ikke-absorberte antistoffer fra den samme kaninen og med anti-C491 antistoffer. Som man kan se av fig. 3.2, merker alle antistoffene et bånd som har den elektroforetiske mobiliteten vi forventer av EAAC. De ikke-absorberte anti-C479 antistoffene merker i tillegg et ekstra bånd nedenfor dette (spor 4). Dette nedre båndet har Silvia Holmseth funnet ut at representerer tubulin. Det faktum

at absorpsjon av antistoffene mot tubulin fjerner merkingen av dette båndet uten å fjerne merkingen av det øvre båndet (spor 2), er i samsvar med hennes konklusjon.



**Fig 3.2** Spesifisitetstesting av antistoffer mot EAAC på Western blott (10 % acrylamid) av SDS-oppløst hippocampus.

1: Anti-C491 (1B0683, 03.01.03, 1 µg/ml), positive kontroll

2: Anti-C479 (0B0721, 19.08.03, 1 µg/ml), forsøkt rensset mot tubulin, av figuren ses det at dette ikke var vellykket, tubulinbåndet er fremdelse tilstedet.

3: Anti-C479 (0B0721, 19.09.02, 1µg/ml), rensset mot tubulin. Vellykket. Tubilinbåndet er nå borte fra gelen.

4: Anti-C479 (0B0721, 26.07.01, 1 µg/ml)

5: Anti-C491 (sh 4131, 16.08.01, 1 µg/ml)

6: Anti-C510 (sh 4131, 16.08.01, 1 µg/ml)

7: Anti-C479 (sh 4131, 16.08.01, 1 µg/ml)

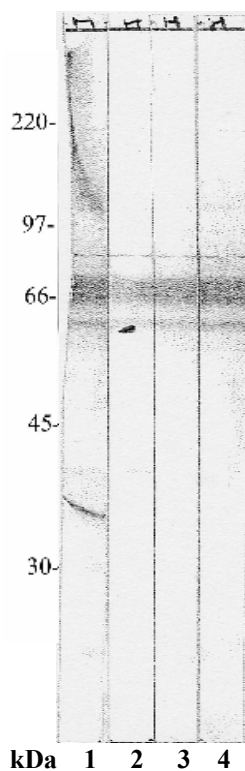
8: Anti-C491 (1B0683, 11.12.03, 1 µg/ml)

\* : Tubulinbåndet, H: hippocampus

### 3.2.3 Testing av de fraksjonerte anti-C491 antistoffene

De anti-C491 antistoffene som ble fraksjonert (se avsnitt 3.1.3), ble testet ved samme antistoffkonsentrasjon på immunblott av hjernevev. Som man kan se av Fig.3.3, gjenkjenner begge antistoff-fraksjonene det samme båndet, men den sterkeste immunreaksjonen sees med de antistoffene som gjenkjenner den C-terminale halvdel av peptidet; dvs. C510-523 (spor 3 og 4).

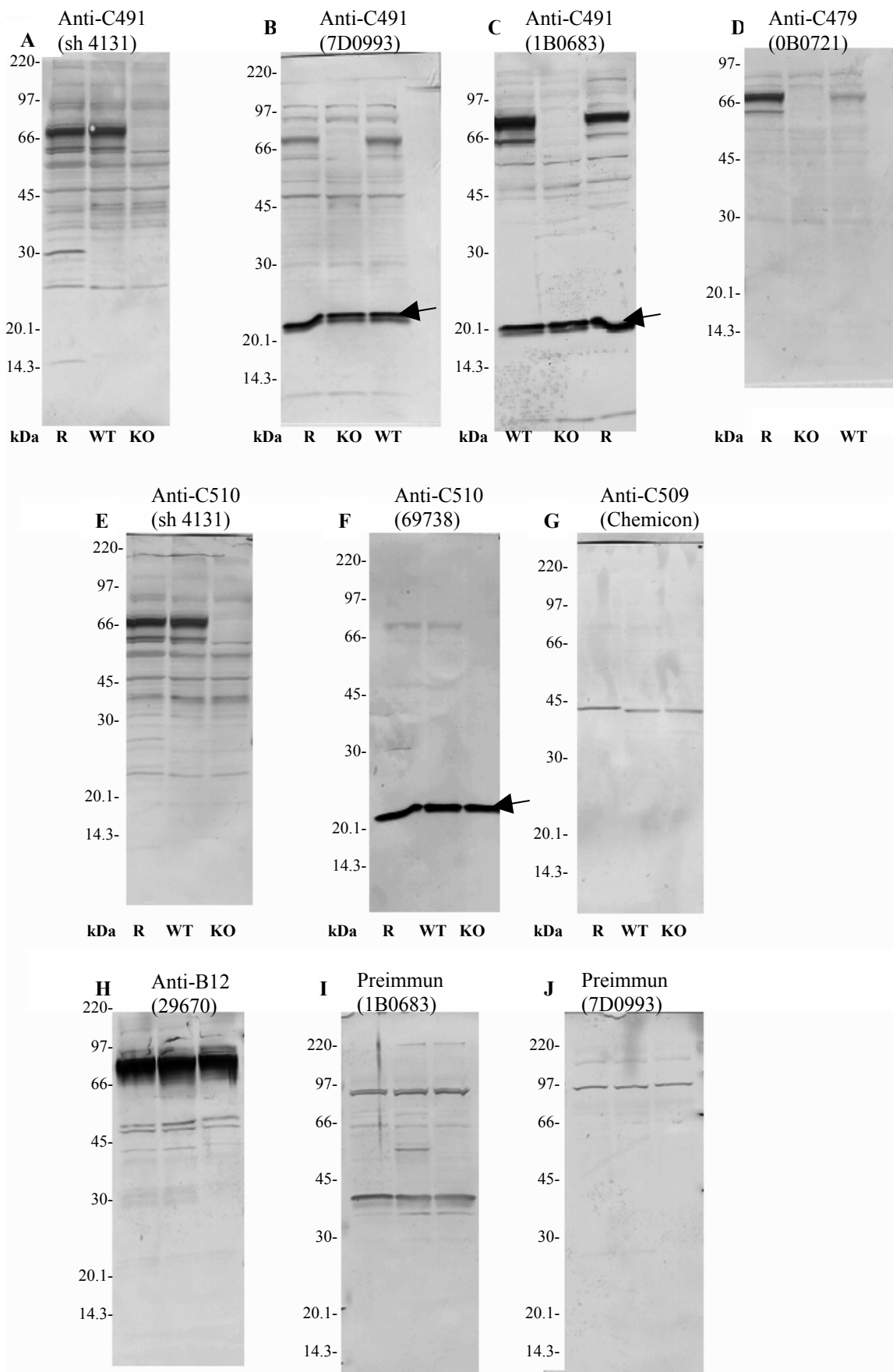




**Fig. 3.3** Testing av de fraksjonerte C-491 antistoffene på Western blott (10 % acrylamid) av SDS-oppløst hippocampus.  
 1: Anti-C491 (1B0683, 03.01.03, 1 µg/ml), positive kontroll  
 2: Anti-C491 (1B0683, 03.01.03, 1 µg/ml), absorbert mot anti-C510  
 3: Anti-C510 (1B0683, 03.01.03, 1 µg/ml), fraksjon 1  
 4: Anti-C510 (1B0683, 03.01.03, 1 µg/ml), fraksjon 2  
 H; hippocampus

### 3.2.4 Testing av antistoffer på KO og WT mus

For å teste om antistoffene faktisk merket EAAC, ble de testet på immunblott med hippocampusvev fra KO og WT mus, samt på rotte (som positiv kontroll). De ulike antistoffene som ble testet, samt resultatene er vist i tabell 3.1. Her sees en klar forskjell mellom KO og WT. Hos KO er EAAC båndet borte. Dette viste at antistoffene merket det de skulle, nemlig EAAC. Antistoffet anti-C479 gav veldig svak merking hos WT mus (se figur 3.4D).



**Fig 3.4** KO, WT og røttetevv homogenater blottet på gradient geller (8-16 % og 16-20 % acrylamid geller fra Bio-Rad). EAAC har en molekylvekt på ca 70 kDa.

A: Anti-C491 (sh 4131, 19.12.97, 1 µg/ml).

B: Anti-C491 (7D0993, 14.12.97, 1 µg/ml). Legg merke til den sterke merkingen av et bånd på ca 20 kDa hos alle tre vevstypene (se pil).

C: Anti-C491 (1B0683, 03.01.03, 1 µg/ml). Legg også her merke til tilleggsbåndet på ca 20 kDa (pil).

D: Anti-C479 (0B0721, 19.09.02, 3 µg/ml). Svak merking hos WT og ingen hos KO. Den svake merkingen kan tyde på at dette antistoffet ikke egner seg ved testing av musevev (se avsnitt 4.3).

E: Anti-C510 (sh 4131, 16.08.01, 1 µg/ml).

F: Anti-C510 (69738, 18.06.93, 1 µg/ml). Svak marking, legg også her merke til 20 kDa-båndet (pil).

G: Anti-C509 (monoklonalt, Chemicon, 2 µg/ml), EAAC-båndet er ikke market hos noen av vevstypene.

H: Anti-B12 (29670, 10.07.02, 0.2 µg/ml), positiv kontroll.

I: Preimmunsera (1B0683, 22.10.03, 1 µg/ml), negative kontroll, ingen merking av ett 70 kDa-bånd

J: Preimmunsera (0B0721, 22.10.03, 3 µg/ml), negative kontroll, ingenmerking av ett 70 kDa-bånd kDa; kilo Dalton (molekyvekt), WT; villtype, KO; knock-out, R; rotte

| Antistoffer   | Rotte | WT  | KO |
|---|-------|-----|----|
| C491 (SH 4131, 19.12.97)  | +     | +   | -  |
| C491 (7D0993, 14.12.97)   | +     | +   | -  |
| C491 (1B0683, 03.01.03)   | +     | +   | -  |
| C479 (0B0721, 19.09.02)   | +     | (+) | -  |
| C510 (69738, 18.06.93)  | (+)   | (+) | -  |
| C510 (SH 4131, 16.08.01)  | +     | +   | -  |
| C509 (monoklonalt, Chemicon International)                                    | -     | -   | -  |
| B12 (29670, 10.07.02) – Positiv kontroll                                      | +     | +   | +  |
| Preimmun IgG (1B0683, 22.10.03) – Negativ kontroll                            | -     | -   | -  |
| Preimmun IgG (0B0721, 22.10.03) – Negativ kontroll                            | -     | -   | -  |
| + Tydelig markant EAAC-bånd<br>(+) Svakt EAAC-bånd<br>- Ikke synlig EAAC-bånd |       |     |    |

**Tabell 3.1** Oversikt over de antistoffene som ble brukt ved immunblotting på rotte og muse vev, og hvilke resultater de gav. Antistoffet anti-C479 (0B0721) viste seg å ikke være noe brukbart antistoff ved testing på musevev. De andre antistoffene som ble testet viste seg å gi like god immunmerking hos rotte som hos mus, selv om peptidene representerer sekvenser fra rotte.

### 3.3 LYSMIKROSKOPISK UNDERSØKELSE AV VEV FRA ROTTE

For å bestemme lokaliseringen av EAAC i hippocampus regionen CA1, ble hjernesnitt (30 µm) kuttet på en vibrasjonsmikrotom (se avsnitt 2.5.1.2), og innkubert med fire ulike antistoffer mot EAAC (se tabell 3.2).

|  |                  |
|--|------------------|
| C491 (7D0993, 3 µg/ml)                             |                  |
| C491 (1B0683, 1 µg/ml)                             |                  |
| C479 (0B0721, 10 µg/ml) – ikke rensset mot tubulin |                  |
| C479 (0B0721, 10 µg/ml) – rensset mot tubulin      |                  |
| B12 (26970, 1 µg/ml)                               | Positiv kontroll |
| Preimmunserum fra kanin 1B0853 (1 µg/ml)           | Negativ kontroll |
| Preimmunserum fra kanin 0B0721 (10 µg/ml)          | Negativ kontroll |

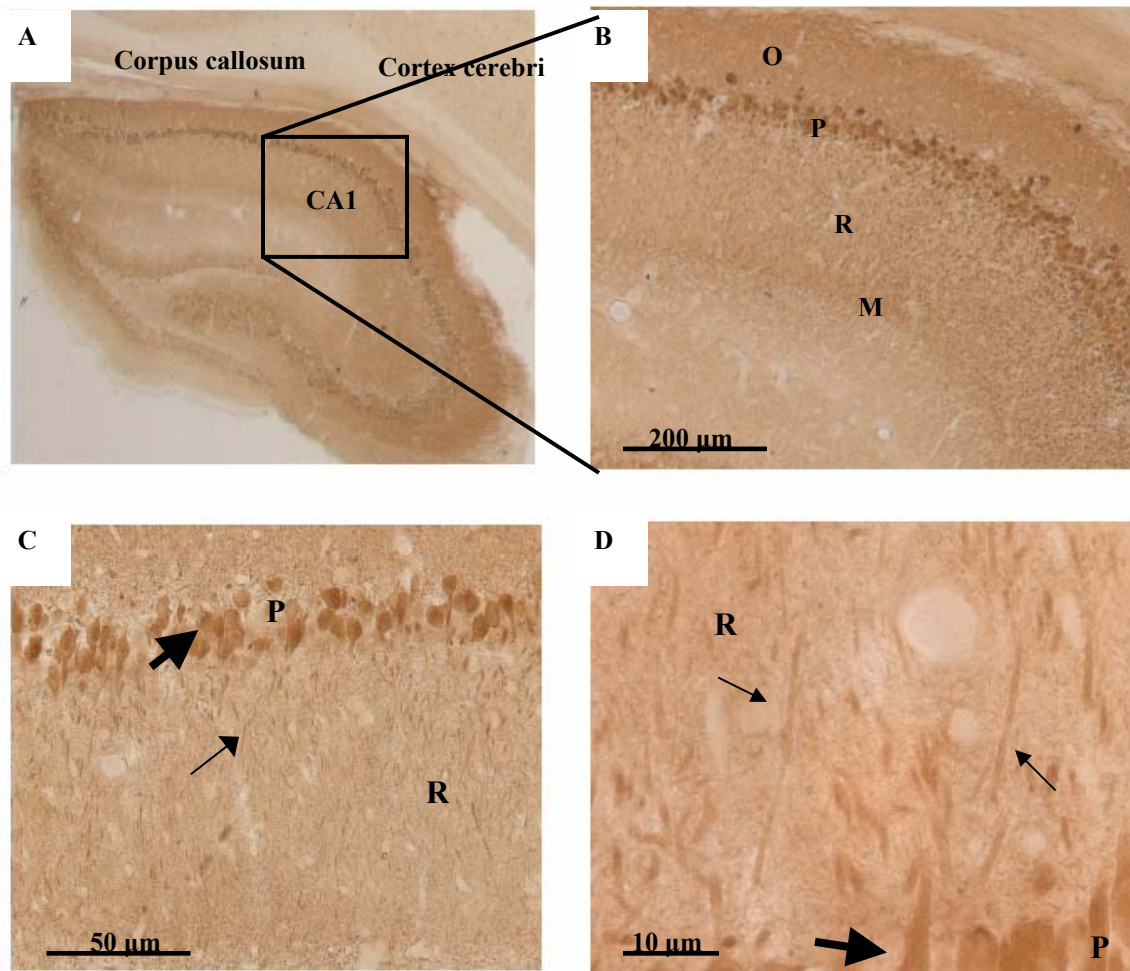
**Tabell 3.2** Oversikt over de antistoffene som ble brukt til HRP-DAB metoden

#### 3.3.1 HRP-DAB merking hos rotte (*Rattus norvegicus*)

Lysmikroskopisk ser man at merking med antistoff mot den positive kontrollen GLT ga det samme mønsteret som tidligere er beskrevet (Pines *et al.*, 1992; Lehre *et al.*, 1995). GLT merking gir ulik fargeintensitet i de ulike lagene av hippocampus i følgende orden; stratum moleculare > stratum radiatum ~ stratum oriens > stratum pyramidale. GLT merkingen ser man som fargede små prosesser, som tett omkranser de relativt store cellelegemene til pyramidecellenevnonene i stratum pyramidale. (Fig 3.9A - D). Tidligere elektronmikroskopiske studier har vist at disse strukturene er astrocyttprosesser som går i mellom synapsekompleksene mellom pyramidecellenes terminaler og dendritter.

Antistoffer mot EAAC merker nesten utelukket strukturer som ikke ble merket med antistoffer mot GLT. Det vil si i at lagene ble merket i følgende orden; stratum pyramidale > stratum moleculare > stratum radiatum ~ stratum oriens (se figur 3.5 - 3.8). Merkingen var sterkest i pyramidecellelegemene i stratum pyramidale og i de apikale dendritter og fine dendrittiske prosesser som strekker seg fra, og rundt de apikale dendrittene i stratum radiatum.

De tre ulike antistoffene mot EAAC ga omtrentlig det samme bildet, med unntak av at anti-C479 ikke merket kjernestrukturer (se figur 3.7 og 3.8). Merkingen med antistoffer mot EAAC hos rotte (*Rattus norvegicus*) ga en klar og avgrenset merking som virket spesifikk. Merkingen var klart avgrenset til nevroner.



**Fig 3.5** Lysmikroskopiske hippocampusbilder av 30 µm tykke vibratomnitt kuttet fra perfusjonsfiksert rottehjerne (4 % paraformaldehyd og 0.1 % glutaraldehyd). Snittene er merket med EAAC antistoffet anti-C491 (7D0993, 3 µg/ml)

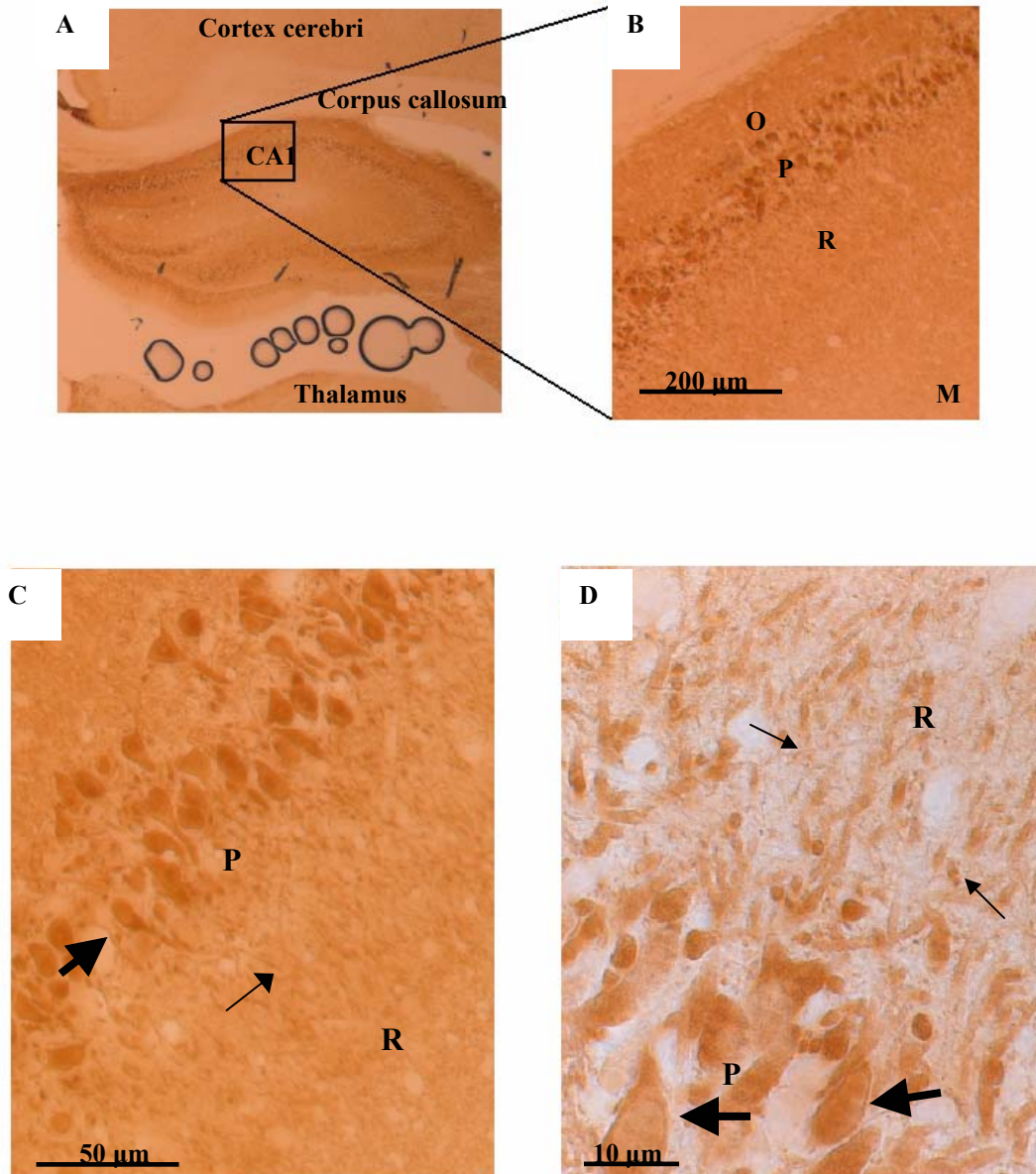
A: Oversiktsbilde med hippocampus

B: Bildet viser en del av hippocampus regionen CA1 (svarer til omtrentlig til det merkede rektangelet i bilde A).

C: Pyramidecellelaget og stratum radiatum i CA1 regionen. Pyramidecellelegemene (stor pil) og pyramidecelle dendrittene (liten pil) er farget. Ser at merking med anti-C491 gir kjernemerking.

D: Lik C, bare i høyere forstørrelse. Tydelig farging av pyramidecelledendrittene (små piler) og pyramidecellelegemene (store piler).

O: stratum oriens, P: stratum pyramidale, R: stratum radiatum, M: stratum moleculare. Fotografert i lysmikroskop (Axioplan 2 imaging, Zeiss).



**Fig 3.6** Lysmikroskopiske hippocampusbilder av 30 µm tykke vibratomsnitt kuttet fra perfusjonsfiksert rottehjerne (4 % paraformaldehyd og 0.1 % glutaraldehyd). Snittene er merket med EAAC antistoffet anti-C491 (1B0683, 1 µg/ml)

A: Oversiktsbilde med hippocampus

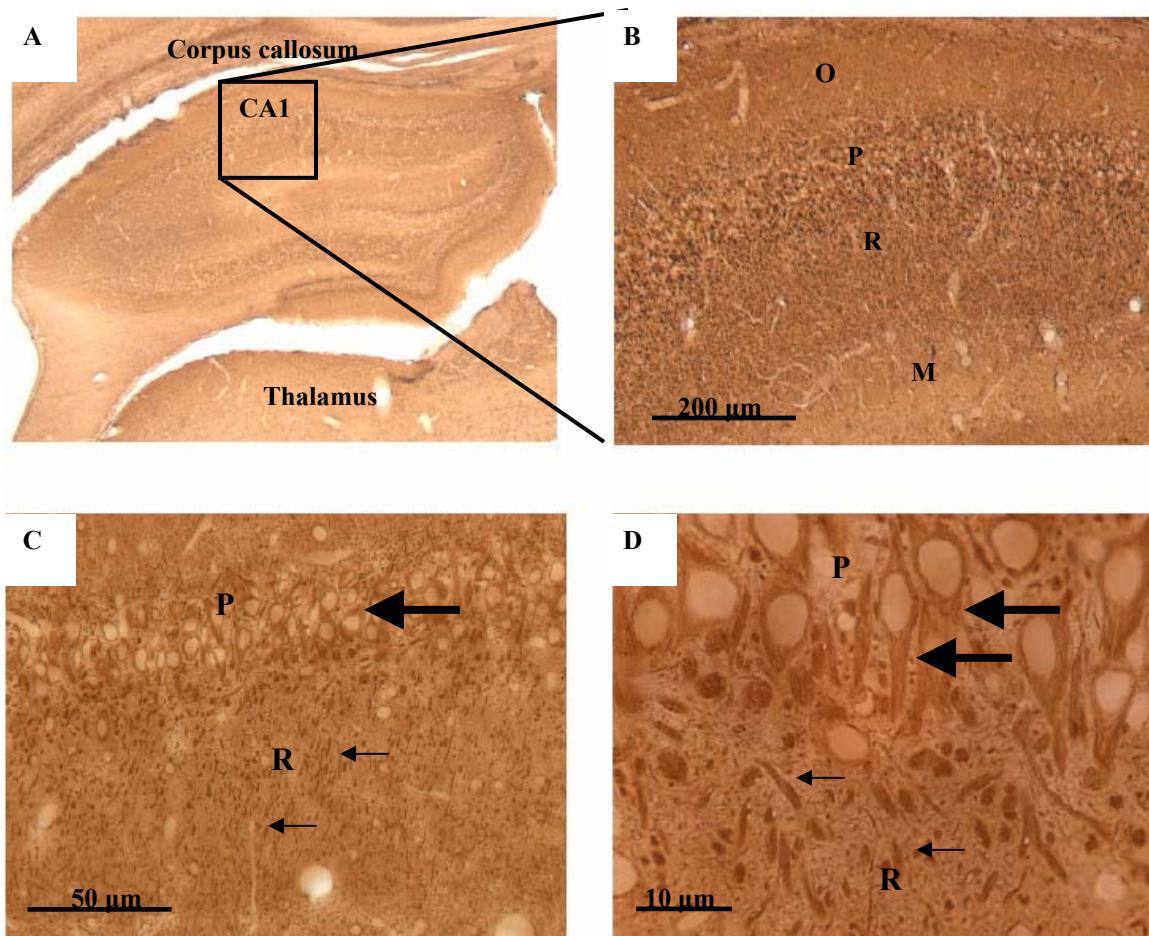
B: Bildet viser en del av hippocampus regionen CA1 (svarer til omtrentlig til det merkede rektangelet i bilde A).

C: Pyramidecellelaget og stratum radiatum i CA1 regionen. Pyramidecellelegemene (stor pil) og pyramidecelle dendrittene (liten pil) er farget. Ser at merking med anti-C491 gir kjernemerking.

D: Lik C, bare i høyere forstørrelse.

O: stratum oriens, P: stratum pyramidale, R: stratum radiatum, M: stratum moleculare. Fotografert i lysmikroskop (Axioplan 2 imaging, Zeiss)





**Fig 3.7** Lysmikroskopiske hippocampusbilder av 30 µm tykke vibratomnitt kuttet fra perfusjonsfiksert rottehjerne (4 % paraformaldehyd og 0.1 % glutaraldehyd). Snittene er merket med EAAC antistoffet anti-C479 (1B0683, 10 µg/ml) før det ble rensset mot tubulin.

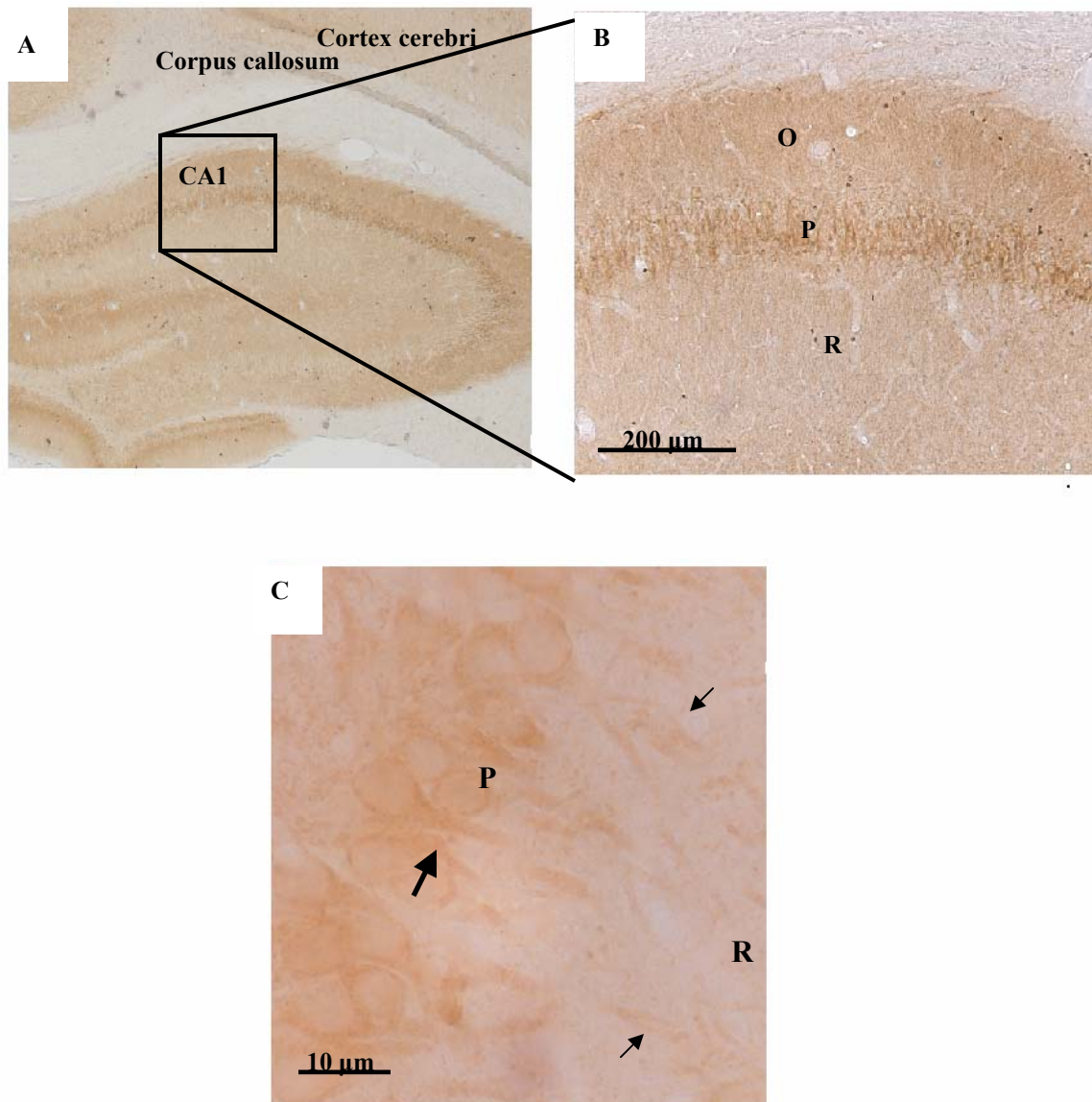
A: Oversiktsbilde med hippocampus.

B: Bildet viser en del av hippocampus regionen CA1 (svarer til omtrentlig til det merkede rektangelet i bilde A).

C: Pyramidecellelaget og stratum radiatum i CA1 regionen. Pyramidecellelegemene (stor pil) og pyramidecelle dendrittene (liten pil) er farget. Ser at merking med anti-C479 gir lite kjernemerking.

D: Lik C, bare i høyere forstørrelse. Tydelig farging av pyramidecelledendrittene (små piler) og pyramidecellelegemene (store piler).

O: stratum oriens, P: stratum pyramidale, R: stratum radiatum, M: stratum moleculare. Fotografert i lysmikroskop (Axioplan 2 imaging, Zeiss)



**Fig 3.8** Lysmikroskopiske hippocampusbilder av 30  $\mu\text{m}$  tykke vibratomsnitt kuttet fra perfusjonsfiksert rottehjerne (4 % paraformaldehyd og 0.1 % glutaraldehyd). Snittene er merket med EAAC antistoffet anti-C479 (0B0721, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) renset mot tubulin.

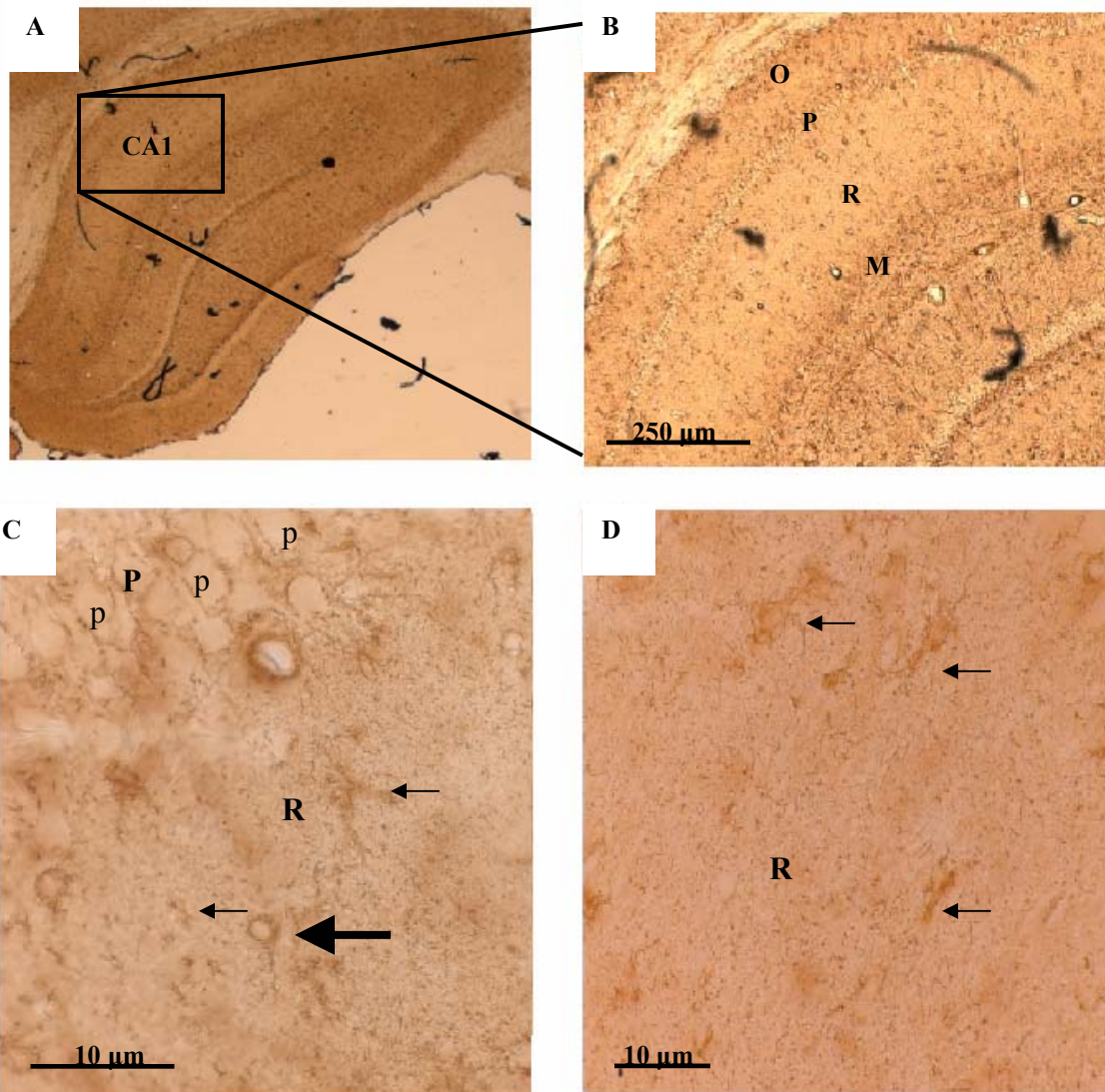
A: Oversiktsbilde med hippocampus.

B: Bildet viser en del av hippocampus regionen CA1 (svarer til omtrentlig til det merkede rektangelet i bilde A).

C: Pyramidecellelaget og stratum radiatum i CA1 regionen. Pyramidecellelegemene (stor pil) og pyramidecelle dendrittene (liten pil) er farget.

O: stratum oriens, P: stratum pyramidale, R: stratum radiatum. Fotografert i lysmikroskop (Axioplan 2 imaging, Zeiss)





**Fig 3.9** Lysmikroskopiske hippocampusbilder av 30 µm tykke vibratomsnitt kuttet fra perfusjonsfiksert rottehjerne (4 % paraformaldehyd og 0.1 % glutaraldehyd). Snittene er merket med et GLT-antistoff (positiv kontroll), anti-B12 (26970, 10.07.02 , 1 µg/ml).

A: Oversiktsbilde med hippocampus

B: Bildet viser en del av hippocampus regionen CA1 (svarer til omtrentlig til det merkede rektangelet i bilde A).

C: Pyramidecellelaget og stratum radiatum i CA1 regionen. Pyramidecellene (p) er ikke merket, mens astrocyttcellelegemene (stor pil) og astrocyttprosessene (små piler) er farget.

D: Stratum radiatum. Tydelig farging av astrocyttprosesser (små piler).

O: stratum oriens, P: stratum pyramidale, p: pyramideceller R: stratum radiatum, M: stratum moleculare.

Fotografert i lysmikroskop (Axioplan 2 imaging, Zeiss)

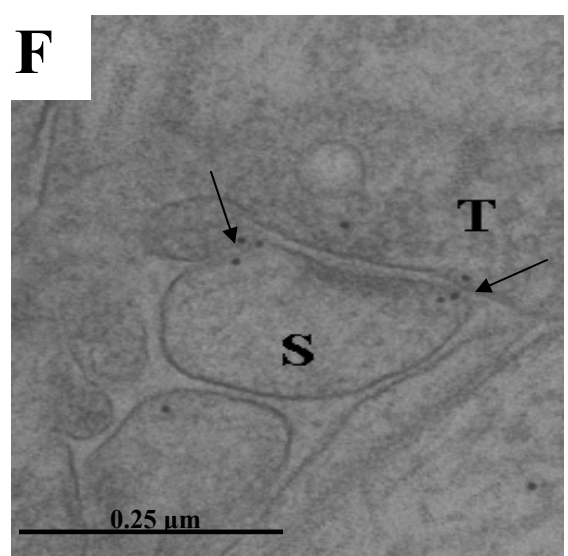
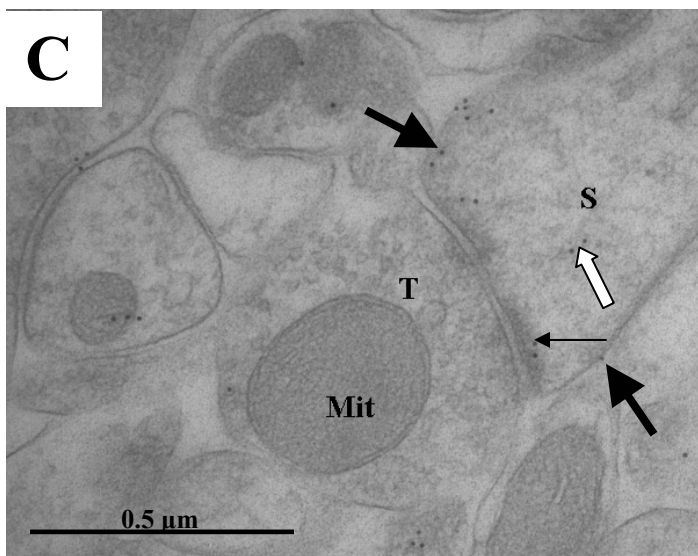
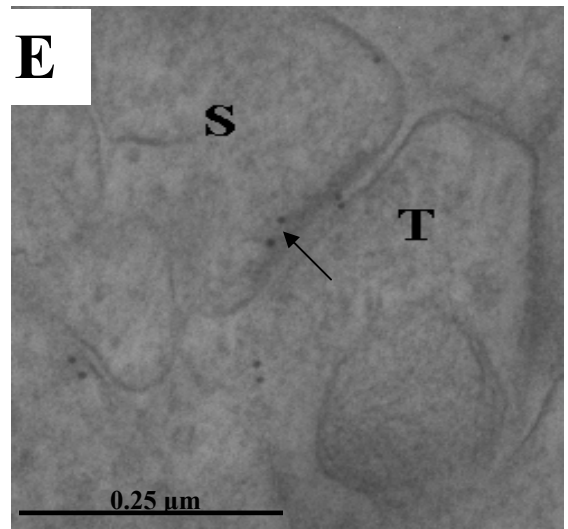
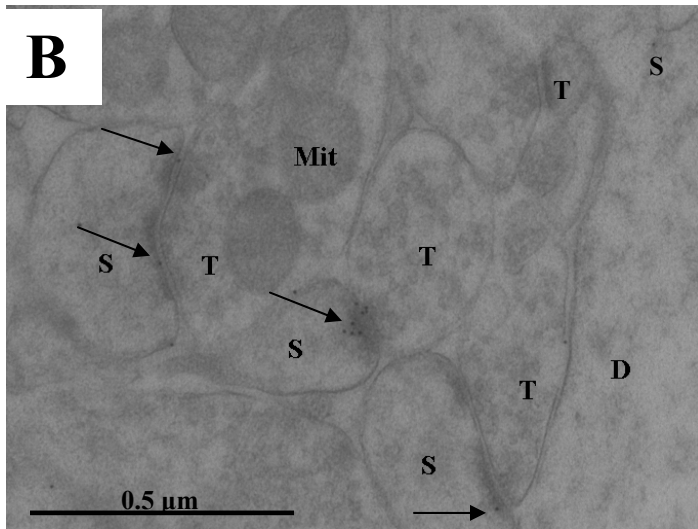
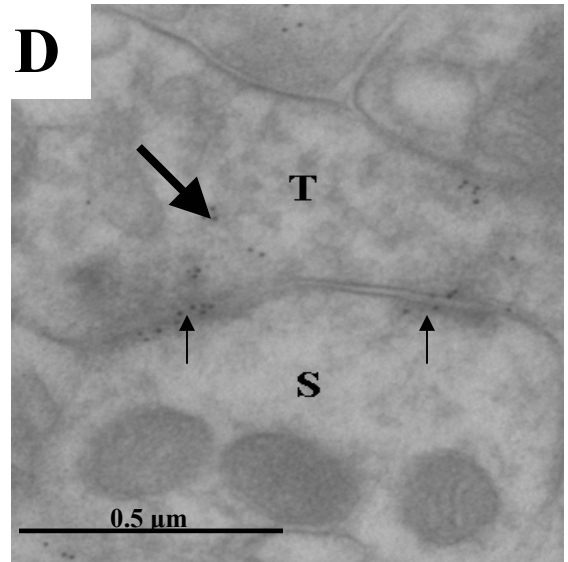
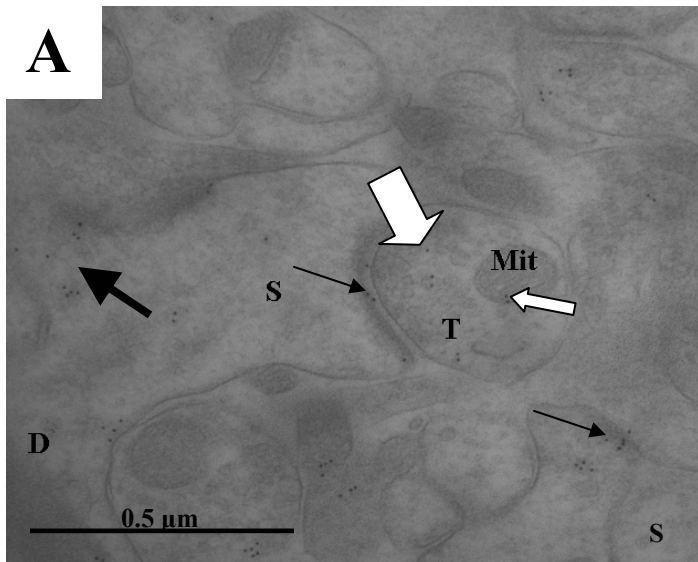
### 3.4 ELEKTRONMIKROSKOPISK UNDERSØKELSE AV VEV FRA ROTTE

#### 3.4.1 Immunmerking av CA1 regionen, stratum radiatum, med EAAC hos rotte

Immunmerkingen viste mange likheter, men også forskjeller, med peroksidasemerkingen. Strukturer som ble merket var dendrittstamme cytoplasma og membraner, spina cytoplasma og membraner, da spesielt de postsynaptiske fortetningene (Fig. 3.10). I tillegg til disse regionene ble også presynaptiske vesikler, cytosol og membraner, samt mitokondrier relativt sterkt merket.

|   |   |
|---|---|
| <b>C491-523</b> (1B0683, 1 µg/ml)                       | Brukt til semikvantitativ analysen. Og analyser av PSD. Det antatt reneste og mest spesifikke antistoffet vi har mot EAAC (hos rotte) |
| <b>C491-523</b> (7D0993)                                | Ikke brukt ved postembedding  |
| <b>C491-523</b> (Sh 4131)                               | Ikke brukt ved postembedding  |
| <b>C491-509</b> (1B0683, 19.08.03)                      | Ga ingen merking på snitt   |
| <b>C479-499</b> (1B0721, 5 µg/ml) (før tubulin rensing) | Ga mye bakgrunnsmerking, ikke spesielt spesifikk for kun EAAC   |
| <b>C479-499</b> (1B0721, 5 µg/ml)                       | Kun brukt til analyser i PSD  |
| <b>C510-523</b> (69738, 1 µg/ml)                        | Kun brukt til analyser i PSD  |
| <b>C510-523</b> (Sh 4131)                               | Ikke brukt ved postembedding  |
| <b>C509-523</b> (monoklonalt fra Chemicon)              | Ikke brukt ved postembedding  |
| <b>B12</b> (26970, 0.5 µg/ml)                           | Positiv kontroll  |
| Preimmunserum fra kanin 1B0683 (1 µg/ml)                | Negativ kontroll  |
| Preimmunserum fra kanin 0B0721 (5 µg/ml)                | Negativ kontroll  |

**Tabell 3.3** Oversikt over de ulike antistoffene for EAAC som ble brukt ved immuncyrokjemiske undersøkelser.



**Fig 3.10** EM-bilder av postsynaptiske immungullmerking med anti-C491(1B0683, 1µg/ml) i hippocampus, stratum radiatum, CA1 regionen.

A: Gullmerkingen er lokalisert over presynaptiske vesikler (Stor hvit pil). Over presynaptiske mitokondrier (liten hvit pil). Over membraner og cytoplasma til dendritterstammer (stor sort pil) og i de postsynaptiske fortetningene (liten sort pil).

B: Bildet viser fire spinaer, hvor tre av dem har merking i deres postsynaptiske fortetninger (små sorte piler).

C: Bildet viser gullmerking av en spina i både den postsynaptiske fortetningen (liten sort pil), i cytoplasma (lite hvit pil) og langs membranen (ikke PSD) (store sorte piler).

D: Viser det typiske mønsteret til merkingen med gullpartikler i alle tre dyrene, med alle antistoffene som ble prøvd. Merkingen var lokalisert til de postsynaptiske fortetningen, nær de postsynaptiske membranene (små piler). I tillegg viste det seg at det ofte var merking i presynaptisk cytoplasma (stor pil).

E: Som i D, viser det typiske merkingsmønsteret.

F: Dette bildet viser merking rett utenfor den synaptiske fortetningen (små piler) og støtter merkingen som He og medarbeidere fant (He *et al.*, 2000). Men dette var ikke ett typisk mønster.

S: spina, D: dendrittstammer, Mit: mitokondrier, T: presynaptiske terminaler

### 3.4.1.1 Semikvantitativ analyse

Det høyeste antall gullpartikler ble funnet i aksoner og i dendrittstammer ( $34.4 \pm \text{SEM}$  %), i nerveterminaler ( $26.9 \pm \text{SEM}$  %) og i spina ( $20.7 \pm \text{SEM}$  %), spesielt i selve de postsynaptiske fortetningene ( $11.8 \pm \text{SEM}$  %). Det var derimot omtrent ingen merking i gliaceller og generelt liten bakgrunnsmerking (tabell 3.4).

| Kategorier                        | 3985-2<br>(Dyr 1) | 3907-2<br>(Dyr 2) | 4003-8<br>(Dyr 3) | Gj.snitt                         |
|-----------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|----------------------------------|
| Presynaptiske vesikler            | 12,5              | 14,9              | 19,4              | 15,6 $\pm$ SEM                   |
| Presynaptiske cytoplasma          | 4,5               | 4                 | 5,4               | 4,6 $\pm$ SEM                    |
| Presynaptiske membraner           | 4,9               | 4,8               | 2                 | 3,9 $\pm$ SEM                    |
| Presynaptiske mitokondrier        | 7,6               | 0,6               | 0                 | 2,7 $\pm$ SEM                    |
| <b>Totalt presynaptisk</b>        | <b>29,5</b>       | <b>24,3</b>       | <b>26,8</b>       | <b>26,9 <math>\pm</math> SEM</b> |
| Postsynaptiske fortetninger (PSD) | 8,8               | 10,7              | 16                | 11,8 $\pm$ SEM                   |
| Spina-membraner (ikke PSD)        | 3,7               | 3,4               | 8,3               | 5,1 $\pm$ SEM                    |
| Spina-cytoplasma                  | 3,3               | 3,2               | 4,6               | 3,7 $\pm$ SEM                    |
| <b>Totalt postsynaptisk</b>       | <b>15,8</b>       | <b>17,3</b>       | <b>28,9</b>       | <b>20,7 <math>\pm</math> SEM</b> |
| Dendritt/akson cytoplasma         | 20,1              | 25,2              | 21,4              | 22,2 $\pm$ SEM                   |
| Dendritt/akson membraner          | 7,2               | 5,7               | 1,7               | 4,9 $\pm$ SEM                    |
| Dendritt/akson mitokondrier       | 10,7              | 4                 | 7,1               | 7,3 $\pm$ SEM                    |
| <b>Totalt dendritt/akson</b>      | <b>38</b>         | <b>34,9</b>       | <b>30,2</b>       | <b>34,4 <math>\pm</math> SEM</b> |
| Glia                              | 0,3               | 1,1               | 0                 | 0,5 $\pm$ SEM                    |
| Uklassifiserbar                   | 16,6              | 22,3              | 14                | 17,6 $\pm$ SEM                   |

**Tabell 3.4** Oversikt over den semikvantitative analysen av distribusjon av gullpartikler over ulike strukturer (i prosent). Antistoff som ble brukt var anti-C491 (1B0683, 1  $\mu\text{g/ml}$ ). Antall gullpartikler var i gjennomsnitt 729.3 pr dyr, og mengden av postsynaptisk fortetning som faktisk var merket var på i gjennomsnitt 53.3 %. Alle tallene i tabellen er angitt i prosent.

De ulike typene av strukturer utgjør svært forskjellige andeler av vevsvolumet. Som man kan se av tabell 3.5, opptar postsynaptiske fortetningene bare 0.6 % av snittarealet, mens dendritter og aksoner opptar 22 % og terminaler 13 %. Når man tar hensyn til dette, ser man at konsentrasjonen av gullpartikler er mer enn 10 ganger høyere i de postsynaptiske fortetningene enn i de andre strukturene.

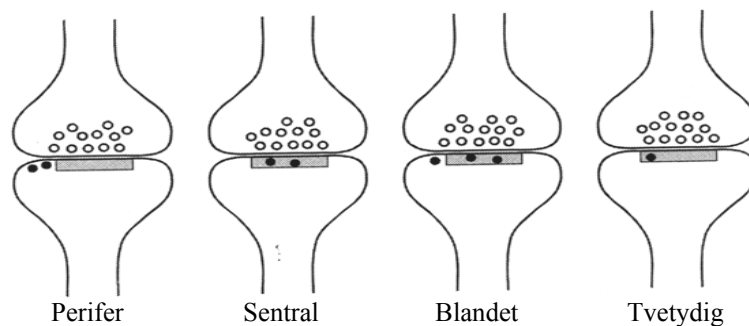
| Strukturer | Areal av strukturer i vevet (%) |
|------------|---------------------------------|
|------------|---------------------------------|

|                | 3985-2<br>(Dyr 1) | 3907-2<br>(Dyr 2) | 4003-8<br>(Dyr 3) | Gj.snitt<br>(Dyr 1-3) |
|----------------|-------------------|-------------------|-------------------|-----------------------|
| Terminal       | 12,2              | 14,1              | 12,8              | 13,0                  |
| PSD            | 0,5               | 0,6               | 0,7               | 0,6                   |
| Dendritt/akson | 22,4              | 21,4              | 23,8              | 22,5                  |

**Tabell 3.5** Andel snittareal som utgjøres av sterkt merkede strukturer, med bruk av anti-C491 (1B0683, 1 µg/ml). Legg merke til at de postsynaptiske fortetningene kun utgjør i gjennomsnitt 0.6 % av snittarealet, mens dendritter/aksoner utgjør 22.5 % og terminaler 13 %. Ved utregning av konsentrasjonen av gullpartikler i disse områdene, må man ta hensyn til denne fordelingen.

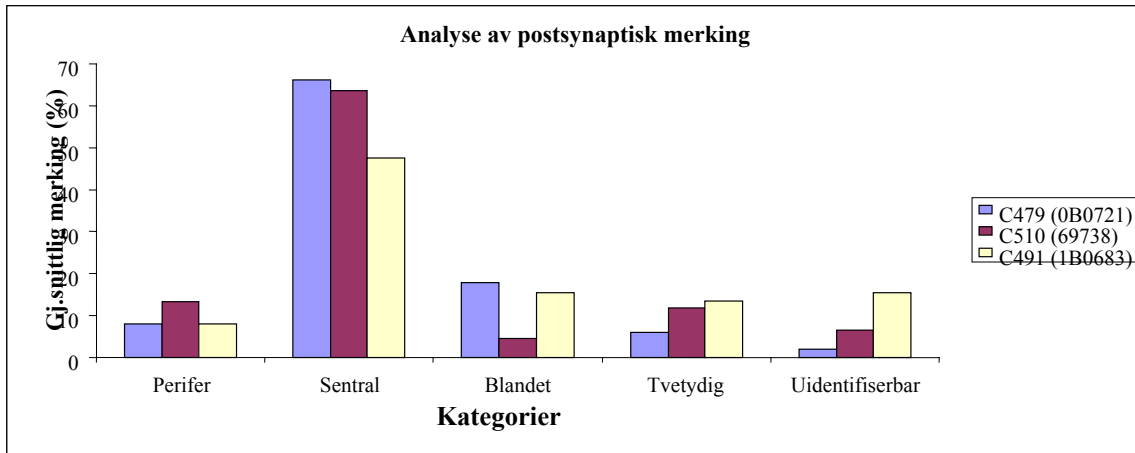
### 3.4.1.2 Distribusjon av merking i den postsynaptiske regionen

Som det fremgår av tabell 3.5, ble merkingen i stor grad observert i selve de postsynaptiske fortetningene. For å få et kvantitativt mål på dette, ble ulike varianter av merkingsmønstre i de postsynaptiske fortetningene inndelt i 4 kategorier (se figur 3.11)



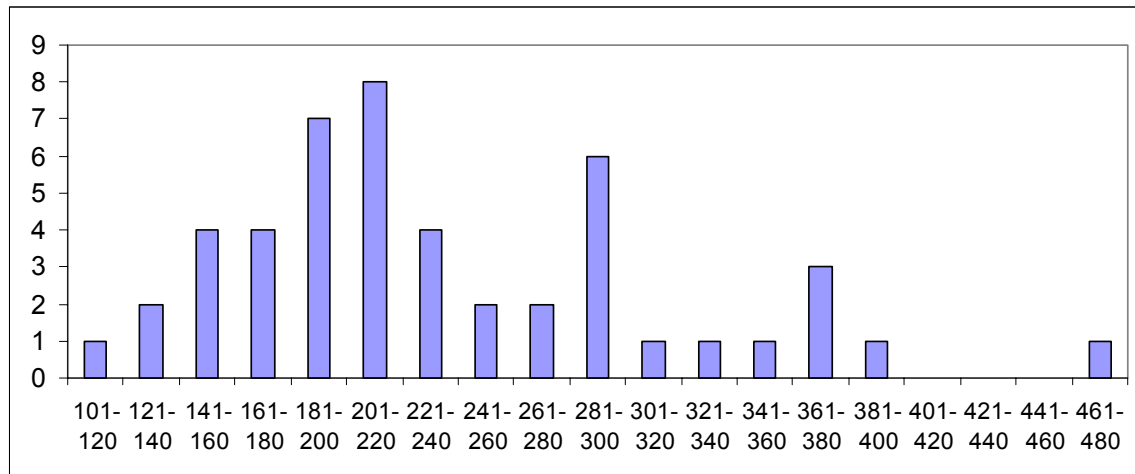
**Fig 3.11** Oversikt over definisjoner av de ulike begrepene. Perifer; partikler som ligger utenfor den postsynaptiske fortetningen og opptil 100 nm fra den. Sentralt; avgrenset av den postsynaptiske fortetningen. Blandet; partiklene ligger både sentralt og perifert. Tvetydig; partiklene ligger på grensen mellom sentralt og perifert  $\pm$  25 nm. Uidentifiserbar; partikler som ikke tydelig kunne plasseres i noen av disse kategoriene. (Figur laget av D. Furness).

Seriesnitt ble merket med tre ulike antistoffer (anti-C491 (1B0683), anti-C479 (0B0721) og anti- C510 (69738)) og 50 synapser merket med hvert antistoff ble klassifisert i henhold til systemet ovenfor (Fig. 3.11). De tre antistoffene gav omtrent den samme merkingsprofilen (Fig. 3.12). De fleste av synapsene var av den sentrale typen. Bare et lite mindretall på omkring 10 % var av den perifere typen.



**Fig 3.12** Histogram over fordelingen av gullpartikler som representerer EAAC i ulike deler av synapsekomplekser i stratum radiatum (CA1 regionen). Kvantifiseringen av gullpartikler (gjennomsnitt av 3 dyr  $\pm$  SEM) fra perfusjonsfiksert rottehjerne (4 % paraformaldehyd og 0.1 % glutaraldehyd). Hjernevevet ble støpt inn i Lowicryl ved frysesubstitusering og immungullmerket med tre ulike antistoffer mot EAAC (anti-C479 (0B0721), 5  $\mu$ g/ml, anti-C510 (69738), 1  $\mu$ g/ml og anti-C491 (1B0683), 1  $\mu$ g/ml) fra kanin og sekundærantistoff med BBI gullpartikler (10 nm). De ulike begrepene følger definisjonen fra fig 3.16. Legg merke til at overvekten av merking befinner seg sentralt

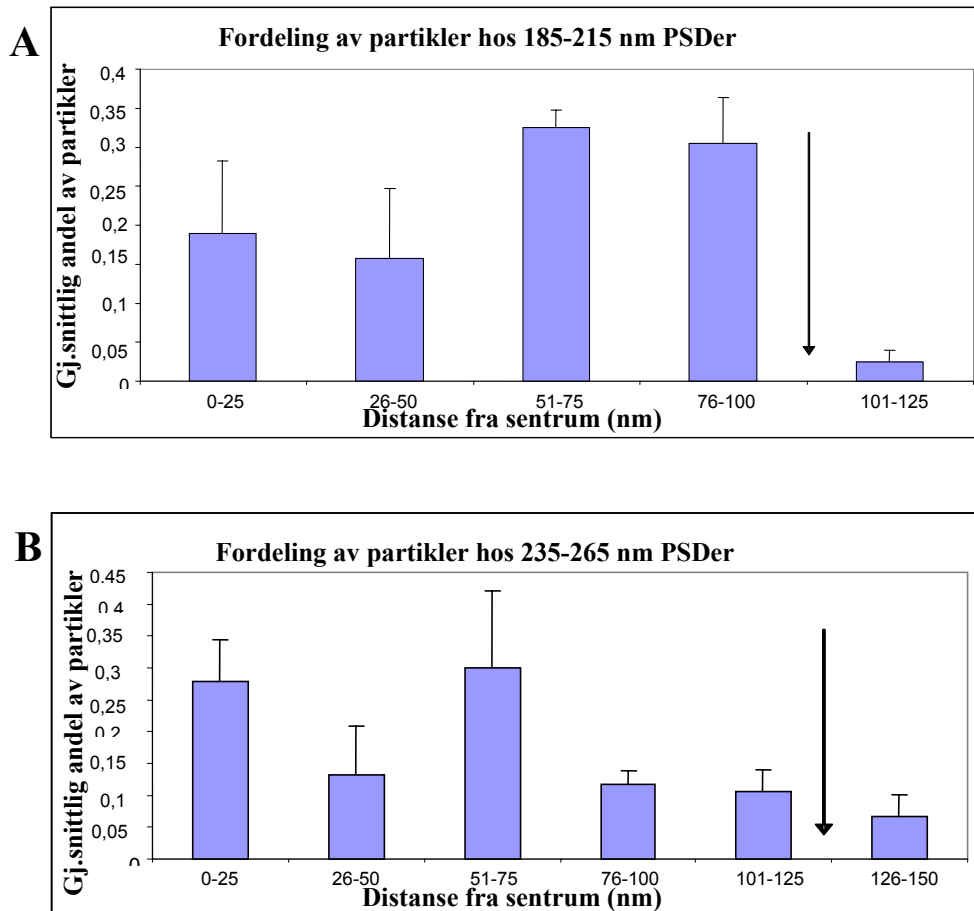
Under dette arbeidet viste det seg at det var en betydelig variasjon i lengden av den postsynaptiske fortetningen (se materiale og metoder, avsnitt 2.5.2.4 og fig 3.13).



**Fig 3.13** Histogram som viser variasjoner i lengde hos 48 tilfeldig valgte postsynaptiske fortetningene, hos ett dyr, med ett EAAC antistoff (anti-C491 (1B0683), 1  $\mu$ g/ml). Merk at det er store variasjoner, men hovedvekten ligger rundt 200 nm i lengde.

Dataene fra de tre dyrene ble satt sammen, og ett generelt mønster viste seg for både de 200 nm og 250 nm postsynaptiske fortetningene (fig 3.14). Kanten av fortetningen er

anvist med pil. Hovedmengden av merkingen befant seg i de postsynaptiske fortetningene.



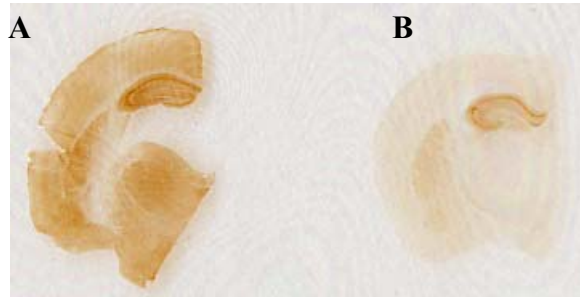
**Fig 3.15** Histogram som illustrerer fordelingen av partikler langs de postsynaptiske fortetningen. Sammensatt data for (A) 200 nm lange (n=44) og (B) 250 nm lange (n=20) postsynaptiske fortetninger. De to grafene er noe ulike, men begge illustrerer at relativt få partikler befinner seg utenfor den postsynaptiske fortetningen, sammenlignet med de som befinner seg innenfor. Det faktiske mønsteret i de postsynaptiske fortetningene er forskjellig, men dette kan skyldes den relative lave data størrelsen spesielt for de postsynaptiske fortetningene på 250 nm. (Ett dyr ble analysert av meg og to av D. Furness).



## 3.5 UNDERSØKELSER AV VEV FRA KO- OG WT-MUS

### 3.5.1 *Lysmikroskopisk*

Vibratomsnitt ble peroksidasemerket med anti-C491 (1B0683, S. Holmseth, K.P. Lehre, upublisert). Som det fremgår av figur 3.17 er det relativt liten forskjell mellom merkingen i hippocampus mellom KO og WT-mus.

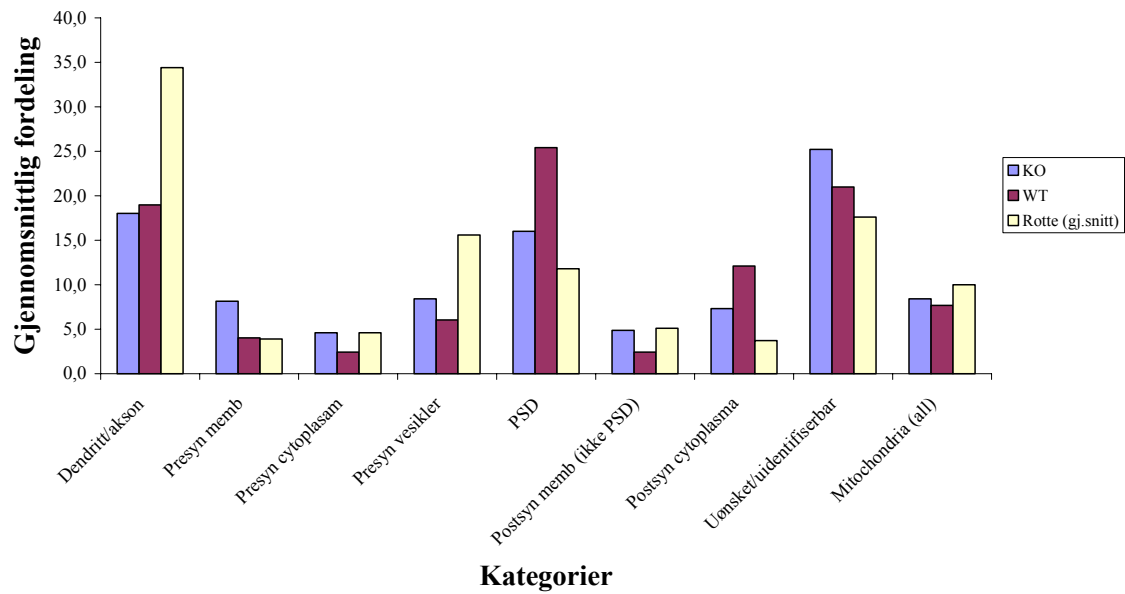


**Fig 3.17** Lysmikroskopiske hippocampusbilder av 30  $\mu\text{m}$  tykke vibratomsnitt kuttet fra perfusjonsfiksert musehjerne (4 % paraformaldehyd og 0.1 % glutaraldehyd). Snittene er merket med EAAC antistoffet anti-C491 (1B0683, 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) (S. Holmseth og K.P. Lehre, upublisert). A: WT-mus, B: KO-mus. Legg merke til at i KO-vevet er hippocampuslagene fremdeles merket, dog svakere.

### 3.5.2 *Elektronmikroskopisk*

For å bli sikrere på om merkingen i snittene faktisk representerer EAAC, ble det støpt inn og immunmerket vev fra WT-mus og KO-mus. Fordi anti-C479 (0B0721) ikke gjenkjenner EAAC hos mus (se avsnitt 3.2.4 og figur 3.4D), ble det fokusert på anti-C491 antistoffene. Det ble undersøkt 35 (370 gullpartikler) bilder fra KO-mus og 21 (250 gullpartikler) bilder fra WT-mus. Som vist i figur 3.16 var fordelingen av merking i WT-mus meget lik den i rotte (se tabell 3.4), men overraskende fikk vi også merking hos KO-mus, og fordelingen av denne merkingen var omtrent den samme som i normaldyrene.

### Analyse av merking med anti-C491 (1B0683)



**Fig 3.16** Histogram over gjennomsnittlig fordeling ( $\pm$  SEM) av gullpartikler, med anti-C491 (1B0683, 1 g/ml), i stratum radiatum (CA1 regionen) hos mus (*Mus musculus*) og rotte (*Rattus norvegicus*). Legg merke til at det er relativt sett ingen forskjell mellom merkingen hos KO-mus og WT-mus.

## 4 DISKUSJON

### 4.1 ANTISTOFFER MOT GTRAP3-18-PEPTIDET GJENKJENNER PEPTIDET, MEN IKKE PROTEINET

Fordi antistoff mot GTRAP3-18 ikke var tilgjengelig ble det bestemt å forsøke å lage et selv. Kaninen produserte relativt mye antistoff (relativt mye; 1.3 og 0.6 mg, se resultater, avsnitt 3.1.1) mot peptidet, men disse antistoffene gjenkjente ikke GTRAP3-18, og distribusjonen til dette proteinet lot seg derfor ikke undersøke i denne omgang. Dette er noe som ofte forekommer ved produksjon av antistoffer mot peptider og kan skyldes flere årsaker (Danbolt *et al.*, 1998). Når man immuniserer med syntetiske peptider som svarer til deler av et protein, får man som oftest dannet antistoffer mot peptidet, men ikke nødvendigvis mot proteinet som peptidet representerer en del av. Et annet potensielt problem er at antiserumet kan inneholde antistoffer som gjenkjenner andre proteiner, lipider, karbohydrater (Shikhman *et al.*, 1994) eller DNA (Arbuckle *et al.*, 1998). Dette kan ha flere årsaker. Peptidet kan ha en annen konformasjon enn det naturlig, intakte proteinet. Den valgte delen av sekvensen er kanskje ikke tilgjengelig fra utsiden av proteinet, enten fordi den ligger inne i proteinet eller fordi proteinet er bundet til ett annet protein i et større kompleks. Antistoffene kan være laget mot en peptid-terminal som kanskje ikke eksisterer i fri form av proteinet, eller peptidet kan skille seg fra proteinet pga peptidbånd rasemisering, sidereaksjoner under syntesen, aminosyrer kan ha falt bort, ufullstendig fjerning av beskyttende grupper eller modifisering av antigenitet pga kobling, kjemisk instabilitet til peptidet osv. Det er som regel lettere å immunisere med ett nytt peptid eller med samme peptidet på en annen måte, enn å prøve å finne ut hva årsakene til at det ikke ble dannet noe brukbart antistoff, skyldes.

### 4.2 ANTISTOFFENE MOT EAAC GJENKJENNER EAAC PÅ IMMUNBLOTT

De antistoffene som er brukt i denne oppgaven er fremstilt mot peptider fra glutamatttransportøren EAAC. Ett av kriteriene som benyttes ved utvelgelse av peptider, er at sekvensene er unike og spesifikke for de proteinene man ønsker å studere. Antistoffene er affinitetsrenset mot immobiliserte peptider, og til dels absorbert mot glutaraldehyd-behandlede serumproteiner, men selv dette er ingen absolutt garanti for spesifisitet. Alle antistoffene ble testet på immunblott som inneholdt så mange

vevsantigener som mulig. Ferskt inntakt vev ble direkte homogenisert i SDS, og satt på elektroforesegelene. I tillegg ble det brukt vev fra mus, hvor EAAC genet var slått ut (KO-mus). Ved bruk av slike dyr kan man videre spesifisitet teste om det som merkes faktisk er det som blir slått ut.

Immunblottene viser at alle EAAC-antistoffene som ble brukt i denne oppgaven merker det samme båndet på gelene (se avsnitt 3.2.2, fig 3.2 og fig 3.3), og dette båndet er ikke tilstedet i gelene med vev fra KO-mus (se avsnitt 3.2.4, fig 3.4) og heller ikke tilstede i preimmunsra fra kanin 1B0683 (kanin som produserte anti-C491) og fra kanin 0B0721 (kanin som produserte anti-C479) (se avsnitt 3.2.4, fig 3.4).

Det er ikke nok å vise reaktivitet mot det ønskede antigenet, man må i tillegg vise fravær av reaktivitet mot ikke-ønskede antigener. Dette er spesielt viktig ved immuncytokjemiske undersøkelser. En mye brukt metode for testing av antistoffer er Westernblotting (se avsnitt 3.4.4). Viser antistoffene kun reaktivitet mot den ønskede molekyllmassen, er dette et tegn på at antistoffene utviser høy grad av spesifisitet. Man må i midlertidig ikke tro at dette er et absolutt bevis for spesifisitet fordi, blottet ikke inneholder alle de antigenene som er i vevet. Dette gjelder spesielt om man bruker geler med en konstant akrylamidkonsentrasjon. Bruker man for eksempel en polyakrylamidgel med 10 % akrylamid, vil molekyler med masse mindre en 20 kDa ikke bli separert, men vandre med fargefronten. Det er derfor en god grunn til å bruke gradientgeler (f.eks 8-16 % eller 10-20 %), som separerer proteiner helt ned til 6 kDa.

Når ferskt vev homogeniseres med SDS får man en klar løsning. Dette er ett tegn på fullstendig oppløsning av vevet, og at løsningen inneholder alt som er i vevet. Blottene man her får vil inneholde mange antigener, men ikke alle. Dette skyldes dels fordi ikke alle molekylene vil binde seg til nitrocellulosen, og dels fordi proteiner denatureres slik at epitoper som krever riktig konformasjon eller oligomerstruktur ikke vil være representert på blottet. Blottet vil derfor allikevel ikke inneholder alle de antigenene som finnes i vevet, men gir en god indikasjon på deres spesifisitet.

Det vil alltid knytte seg usikkerhet til antistoffer, men antistoffene som her har blitt brukt, har gjennomgått alle de tester vår gruppe har vært i stand til å utføre. De er spesifikke, bedømt ut i fra immunblott fra hjernevev fra både villtype mus (WT) og genetisk

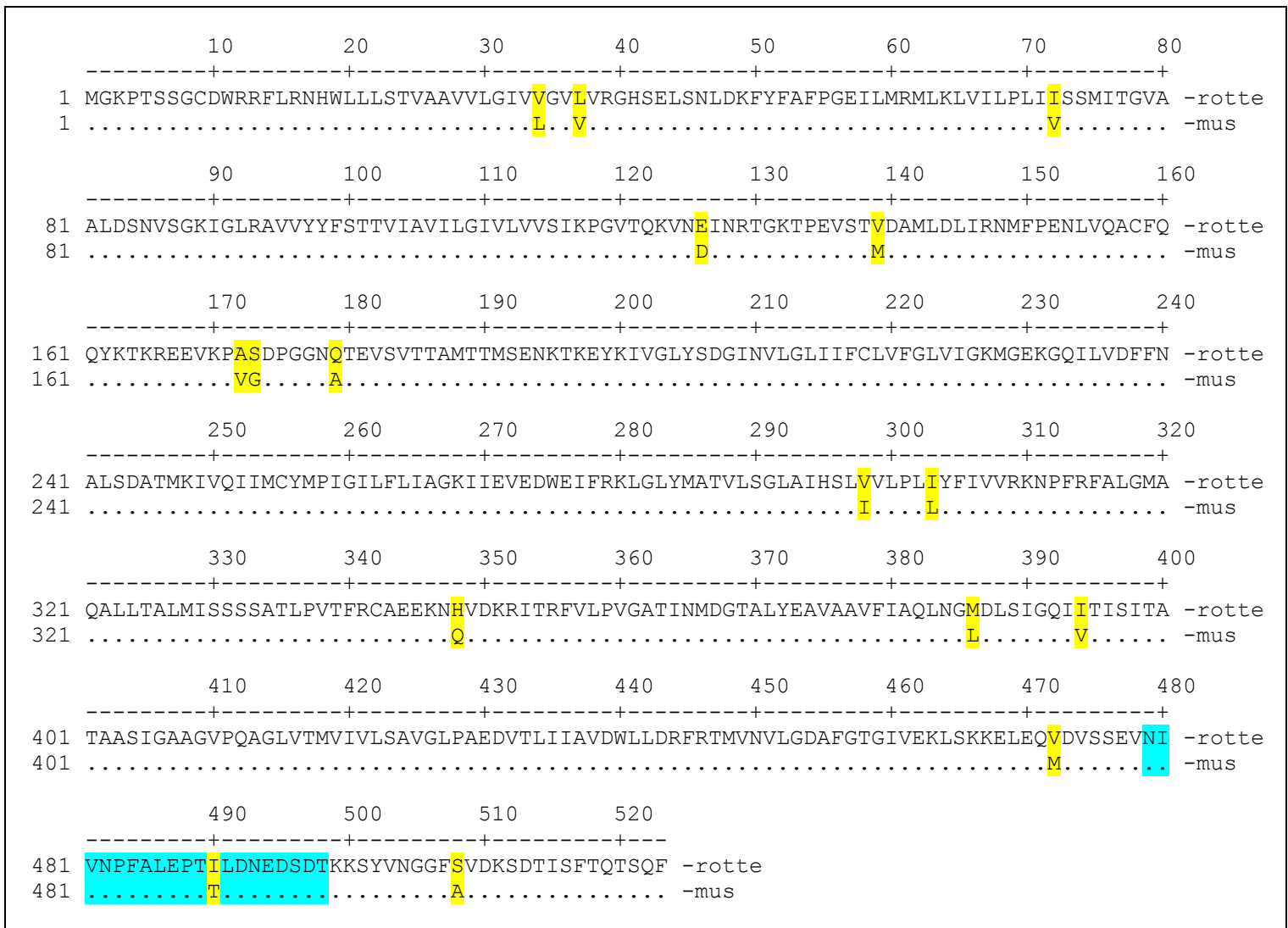
modifiserte mus (KO), som mangler transportøren mot EAAC. Immunblott fra EAAC-KO mus er helt negative (se avsnitt 3.2.4, fig 3.4). I midlertidig viste også blottene noe uønsket reaktivitet som tidligere ikke hadde blitt oppdaget, fordi gradientgeler ikke var blitt brukt. Tubulin historien (se avsnitt 2.3.3.2) illustrer at immunisering kan gi opphav til antistoffer som gjenkjenner helt andre ting. Det gjør også KO-mus immunblottene.

På bakgrunn av disse testene vil jeg konkludere med at de antistoffene her har blitt testet gjenkjenner EAAC-proteinet.

#### **4.3 MAN KAN IKKE FORUTSI OM ET ANTISTOFF VIL GJENKJENNE EN HOMOLOG, IKKE-IDENTISK SEKVENNS**

Et antistoff som er laget mot gensekvensen til en dyreart gjenkjenner ikke nødvendigvis den homologe, ikke identiske sekvensen til det tilsvarende proteinet hos en annen art. EAAC-proteinet hos rotte og mus er ikke helt identiske (se fig 4.1). C491-peptidet og C479-peptidet er begge peptider som representerer rottesekvensen, og begge peptidene har en aminosyre som avviker i forhold til de tilsvarende sekvensene hos mus. Dette viste seg å ikke ha noen betydning for anti-C491; merkingen på immunblott var like sterk hos rotte som hos WT-mus. Det ble derimot problemer ved bruk av anti-C479. Som man kan se på immunblottet (se fig 3.4D, spor 3) merker anti-C479 svært svakt det båndet som skal representere EAAC hos mus. Denne ene aminosyren, aminosyre nr 490 (se fig. 4.1), er altså nok til at anti-C479 ikke kan brukes i musevev.

At denne ene aminosyren (se figur 4.1) utgjør så stor forskjell på immunblott, tyder på en meget høy grad av spesifisitet.



**Fig 4.1** Forskjeller i sekvens hos rotte (*Rattus norvegicus*) og mus (*Mus musculus*). Ulikhetene som gjør at anti-C479 ikke er brukbar hos mus er at denne sekvensen skiller seg med en, antagelig viktig, aminosyre (nr 490).

#### 4.4 ER ANTISTOFFENE SPESIFIKKE I INTAKT FIKSERT VEV

En forutsetning for immuncytokjemi er at antistoffene man bruker er spesifikke. Det innebærer at antistoffene kun gjenkjenner det antigenet man er interessert i, og ikke andre molekyler. Dette er en selvfølge, men det er likevel ikke mulig å være 100 % sikker på at antistoffet virkelig gjenkjenner det molekylet man er ute etter.

Immunblott på gradientgeler merket med antistoffene anti-C491 (7D0993), anti-C491 (1B0683) og anti-C510 (69738) (se fig 3.4B, C og F) gir ingen merking hos KO-mus, men de har ett bånd som jeg ennå ikke vet hva representerer. Dette ekstra båndet kan være en av forklaringene på hvorfor det blir merking hos KO-mus med postembedding. Et annet moment er at vevet det gjøres immuncytokjemi på er fiksert. Dette medfører

kjemisk modifisering av proteinene og derved en mulighet for å skape nye epitoper som heller ikke finnes på blottene.

#### **4.5 ER EAAC DISTRIBUTERT I ELLER VED SIDEN AV PSD?**

He og medarbeidere konkluderer i sin artikkel (He *et al.*, 2000) med at elektronmikroskopisk (immungullmerking) er hovedtyngden av EAAC å finne postsynaptisk, men også at noe presynaptiske. I stratum radiatum (CA1 regionen) befinner EAAC seg i ytterkanten eller rett utenfor synapsene på postsynaptisk side i tillegg til i nerveterminalmembraner (presynaptisk). Det er grunn til å være skeptisk til dette arbeidet, fordi immungullmerkingen er svært svak. Bildene i artikkelen har synapser med veldig få gullpartikler, og antallet gullpartikler i membraner er ikke sammenlignet med andre membranstrukturer for å undersøke om merkingen er tilfeldig.

Aud R. Skår derimot fant under sin hovedfagsperiode at hovedtyngden av EAAC i stratum radiatum (CA3 regionen) befant seg i selve synapsen (PSD). Dette var i forhold til andre membranstrukturer. Resultatene til He og Skår skiller seg fra hverandre, en grunn til det kan være at He og medarbeidere studerte CA1 regionen og Skår CA3 regionen. Det er ulike forgreninger av pyramidecelleaksonene som danner synapser i disse to områdene. Derfor ble det bestemt å undersøke merkingen av EAAC i stratum radiatum, CA1 regionen. Mine funn støtter de funnen som Skår fant. Dette taler imot at det er regionale forskjeller i CA1 og CA3.

Det finnes relativt lite EAAC i forhjernen, dette medfører lite merking. Det er også vanskeligere å lage gode EAAC-antistoffer, siden lavere antigenkonsentrasjon krever høyere spesifisitet til antistoffene som skal detektere det. En grunn til forskjellene i merking hos He og medarbeidere og vår gruppe, kan skyldes antistoffene; våre antistoffer kan muligens kryss reagere med et PSD-protein.

De lysmikroskopiske data til He og medarbeidere passer godt med våre; sterkest merking av pyramidecellelaget (CA1-CA3), både av nevronene og deres apikale dendritter (se avsnitt 3.3).

## 4.6 KONKLUSJON

1. Kaninene laget ikke brukbare antistoffer mot GTRAP3-18 slik at distribusjonen til GTRAP3-18 ikke lot seg undersøke.
2. Det er ingen holdepunkter for at forskjellen mellom resultatene til He og Skår skyldes regionale forskjeller. Antistoffene gir overveiende merking av PSD både i CA1 regionen, og slik som Skår observerte i CA3 regionene. Imidlertid er det en viss variasjon. I noen synapser sitter merkingen ved siden av de postsynaptiske fortetningene slik som He beskrev (He *et al.*, 2000). Hvorvidt dette er noe som varierer, og som derved kan variere mellom ulike rottestammer og avlivingsmetoder, er ikke undersøkt.
3. Immungullmerkingen er ikke et spesifikt uttrykk for EAAC i hippocampus fordi mye av merkingen er bevart i vev fra genmodifiserte mus som mangler EAAC.



## REFERANSER

- Amaral, D.G., Witter, M.P., 1990. Hippocampal formation. In: Paxinos, G. (Eds.), *The Rat Nervous System*. Academic Press, s. 443-493.
- Arbuckle, M.R., Gross, T., Scofield, R.H., Hinshaw, L.A., 1998. Lupus humoral autoimmunity induced in a primate model by short peptide immunization. *Journal of Investigative Medicine* **46**, 58-65.
- Arriza, J.L., Eliasof, S., Kavanaugh, M.P., Amara, S.G., 1997. Excitatory amino acid transporter 5, a retinal glutamate transporter coupled to a chloride conductance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 4155-4160.
- Arriza, J.L., Kavanaugh, M.P., Fairman, W.A., Wu, Y.N., Murdoch, G.H., North, R.A., Amara, S.G., 1993. Cloning and expression of a human neutral amino acid transporter with structural similarity to the glutamate transporter gene family. *Journal of Biological Chemistry* **268**, 15329-15332.
- Attwell, D., Laughlin, S.B., 2001. An energy budget for signaling in the grey matter of the brain. *Journal of Cerebral Blood Flow Metabolism* **21**, 1133-1145.
- Bellocchio, E.E., Reimer, R.J., Fremeau, R.T., Edwards, R.H., 2000. Uptake of glutamate into synaptic vesicles by an inorganic phosphate transporter. *Science* **289**, 957-960.
- Berger, U.V., Hediger, M.A., 1998. Comparative analysis of glutamate transporter expression in rat brain using differential double in situ hybridization. *Anatomy and Embryology* **198**, 13-30.
- Berger, U.V., Hediger, M.A., 2000. Distribution of the glutamate transporters GLAST and GLT-1 in rat circumventricular organs, meninges and dorsal root ganglia. *Journal of Comparative Neurology* **421**, 385-399.
- Billups, B., Rossi, D., Attwell, D., 1996. Anion conductance behavior of the glutamate uptake carrier in salamander retinal glial cells. *Journal of Neuroscience* **16**, 6722-6731.
- Brodal, P., 2001. Hovedtrekk i nervesystemets bygning og funksjon. In: Brodal, P. (Eds.), *Sentralnervesystemet*. Universitetsforlaget: Oslo, Norway, s. 29-186.
- Choi, D.W., 1988. Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron* **1**, 623-634.
- Clements, J.D., Lester, R.A., Tong, G., Jahr, C.E., Westbrook, G.L., 1992. The time course of glutamate in the synaptic cleft. *Science* **258**, 1498-1501.
- Conti, F., DeBiasi, S., Minelli, A., Rothstein, J.D., Melone, M., 1998. EAAC1, a high-affinity glutamate transporter, is localized to astrocytes and GABAergic neurons besides pyramidal cells in the rat cerebral cortex. *Cerebral Cortex* **8**, 108-116.
- Cousin, M.A., Robinson, P.J., 1999. Mechanisms of synaptic vesicle recycling illuminated by fluorescent dyes. *Journal of Neurochemistry* **73**, 2227-2239.
- Danbolt, N.C., 2001. Glutamate uptake. *Progress in Neurobiology* **65**, 1-105.
- Danbolt, N.C., Lehre, K.P., Dehnes, Y., Chaudhry, F.A., Levy, L.M., 1998. Localization of transporters using transporter-specific antibodies. *Methods in Enzymology* **296**, 388-407.
- Danbolt, N.C., Pines, G., Kanner, B.I., 1990. Purification and reconstitution of the sodium- and potassium-coupled glutamate uptake into membrane bound saccules. *Journal of Neurochemistry* **47**, 819-824.
- Davis, K.E., Straff, D.J., Weinstein, E.A., Bannerman, P.G., Correale, D.M., Rothstein, J.D., Robinson, M.B., 1998. Multiple signaling pathways regulate cell surface expression and activity of

the excitatory amino acid carrier 1 subtype of Glu transporter in C6 glioma. *Journal of Neuroscience* **18**, 2475-2485.

Dingledine, R., Borges, K., Bowie, D., Traynelis, S.F., 1999. The glutamate receptor ion channels. *Pharmacological Reviews* **51**, 7-61.

Dowd, L.A., Robinson, M.B., 1996. Rapid stimulation of EAAC1-mediated Na<sup>+</sup>- dependent L- glutamate transport activity in C6 glioma cells by phorbol ester. *Journal of Neurochemistry* **67**, 508-516.

Engelke, T., Jording, D., Kapp, D., Puhler, A., 1989. Identification and sequence analysis of the *Rhizobium meliloti* dctA gene encoding the C4-dicarboxylate carrier. *Journal of Bacteriology* **171**, 5551-5560.

Fairman, W.A., Vandenberg, R.J., Arriza, J.L., Kavanaugh, M.P., Amara, S.G., 1995. An excitatory amino-acid transporter with properties of a ligand-gated chloride channel. *Nature* **375**, 599-603.

Fonnum, F., 1984. Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain. *Journal of Neurochemistry* **42**, 1-11.

Furness, D.N., Lehre, K.P., 1997. Immunocytochemical localization of a high-affinity glutamate-aspartate transporter, GLAST, in the rat and guinea-pig cochlea. *European Journal of Neuroscience* **9**, 1961-1969.

Gegelashvili, G., Schousboe, A., 1998. Cellular distribution and kinetic properties of high-affinity glutamate transporters. *Brain Research Bulletin* **45**, 233-238.

Gonzalez, M.I., Bannerman, P.G., Robinson, M.B., 2003. Phorbol myristate acetate-dependent interaction of protein kinase C (alpha) and the neuronal glutamate transporter EAAC1. *Journal of Neuroscience* **37**, 163-170.

Grunewald, M., Bendahan, A., Kanner, B.I., 1998. Biotinylation of single cysteine mutants of the glutamate transporter GLT-1 from rat brain reveals its unusual topology. *Neuron* **21**, 623-632.

Grunewald, M., Kanner, B.I., 2000. The accessibility of a novel reentrant loop of the glutamate transporter GLT-1 is restricted by its substrate. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 9684-9689.

Hamberger, A., Nystrom, B., 1984. Extra- and intracellular amino acids in the hippocampus during development of hepatic encephalopathy. *Neurochemical Research* **9**, 1181-1192.

Haugeto, R., Ullensvang, K., Levy, L.M., Chaudhry, F.A., Honoré, T., Nielsen, M., Lehre, K.P., Danbolt, N.C., 1996. Brain glutamate transporter proteins form homomultimers. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 27715-27722.

He, Y., Janssen, W.G.M., Rothstein, J.D., Morrison, J.H., 2000. Differential synaptic localization of the glutamate transporter EAAC1 and glutamate receptor subunit GluR2 in the rat hippocampus. *Journal of Comparative Neurology* **418**, 255-269.

Hoffman, K., Duker, M., Fink, T., Lichter, P., Stoffel, W., 1994. Human neutral amino acid transporter ASCT1: structure of the gene (SSSLC1a4) and localization to chromosome 2p13-p15. *Genomics* **24**, 20-26.

Jackson, M., Song, W., Liu, M.Y., Jin, L., Dykes-Hoberg, M., Lin, C.I., Bowers, W.J., Federoff, H.J., Sternweis, P.C., Rothstein, J.D., 2001. Modulation of the neuronal glutamate transporter EAAT4 by two interacting proteins. *Nature* **410**, 89-93.

Kanai, Y., Hediger, M.A., 1992. Primary structure and functional characterization of a high-affinity glutamate transporter. *Nature* **360**, 467-471.

Kanai, Y., Hediger, M.A., 2003. The glutamate/neutral amino acid transporter family SLC1: molecular physiological and pharmacological aspects. *European Journal of Physiology* **479**, 237-

Kugler, P., Schmitt, A., 1999. Glutamate transporter EAAC1 is expressed in neurons and glial cells in the rat nervous system. *Glia* **27**, 129-142.

Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.

LaMantia, A.S., 1995. The usual suspects: GABA and glutamate may regulate proliferation in the neocortex. *Neuron* **15**, 1223-1225.

Lehmann, A., Isacson, H., Hamberger, A., 1983. Effects of in vivo administration of kainic acid on the extracellular amino acid pool in the rabbit hippocampus. *Journal of Neurochemistry* **40**, 1314-1320.

Lehre, K.P., Danbolt, N.C., 1998. The number of glutamate transporter subtype molecules at glutamatergic synapses: chemical and stereological quantification in young adult rat brain. *Journal of Neuroscience* **18**, 8751-8757.

Lehre, K.P., Levy, L.M., Ottersen, O.P., Storm-Mathisen, J., Danbolt, N.C., 1995. Differential expression of two glial glutamate transporters in the rat brain: quantitative and immunocytochemical observations. *Journal of Neuroscience* **15**, 1835-1853.

Lester, R.A.J., Clements, J.D., Westbrook, G.L., Jahr, C.E., 1990. Channel kinetics determine the time course of NMDA receptor-mediated synaptic currents. *Nature* **346**, 565-567.

Levy, L.M., Attwell, D., Hoover, F., Ash, J.F., Danbolt, N.C., 1998a. Inducible expression of the GLT-1 glutamate transporter in a CHO cell line selected for low endogenous glutamate uptake. *FEBS Letters* **422**, 339-342.

Levy, L.M., Warr, O., Attwell, D., 1998b. Stoichiometry of the glial glutamate transporter GLT-1 expressed inducibly in a chinese hamster ovary cell line selected for low endogenous Na<sup>+</sup>-dependent glutamate uptake. *Journal of Neuroscience* **18**, 9620-9628.

Lin, C.I., Orlov, I., Ruggiero, A.M., Dykes-Holberg, M., Lee, A., Jackson, M., Rothstein, J.D., 2001. Modulation of the neuronal glutamate transporter EAAC1 by the interacting protein GTRAP3-18. *Nature* **410**, 84-88.

Martinez-Hernandez, A., Bell, K.P., Norenberg, M.D., 1977. Glutamine synthetase: glial localization in brain. *Science* **195**, 1356-1358.

McDonald, J.W., Johnston, M.V., 1990. Physiological and pathophysiological roles of excitatory amino acids during central nervous system development. *Brain Research* **15**, 41-70.

McKenna, M.C., Sonnewald, U., Huang, X., Stevenson, J., Zielke, H.R., 1996. Exogenous glutamate concentration regulates the metabolic fate of glutamate in astrocytes. *Journal of Neurochemistry* **66**, 386-393.

Moriyama, Y., Hayashi, M., Yamada, H., Yatsushiro, S., Ishio, S., Yamamoto, A., 2000. Synaptic-like microvesicles, synaptic vesicle counterparts in endocrine cells, are involved in a novel regulatory mechanism for the synthesis and secretion of hormones. *Journal of Experimental Biology* **203**, 117-125.

Nicholls, D.G., 1993. The glutamatergic nerve terminal. *European Journal of Biochemistry* **212**, 613-631.

Olney, J.W., Lain, H.O., Rhee, V., 1971. Cytotoxic effects of acidic and sulphur containing amino acids on the infant mouse central nervous system. *Experimental Brain Research* **14**, 61-78.

Ottersen, O.P., Laake, J.H., Reichelt, W., Haug, F.M., Torp, R., 1996. Ischemic disruption of glutamate homeostasis in brain: quantitative immunocytochemical analyses. *Journal of Chemical*

*Neuroanatomy* **12**, 1-14.

Ottersen, O.P., Storm-Mathisen, J., 1984. Neurons containing or accumulating transmitter amino acids. In: Bjorklund, A., Hökfelt, T., Kuhar, M.J. (Eds.), *Handbook of Chemical Neuroanatomy: Classical Transmitters and transmitter receptors in the CNS*. Elsevier Science Publisher B. V: Amsterdam, s. 141-246.

Ozawa, S., Kamiya, H., Tsuzuki, K., 1998. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Progress in Neurobiology* **54**, 581-618.

Ozkan, E.D., Ueda, T., 1998. Glutamate transport and storage in synaptic vesicles. *Japanese Journal of Pharmacology* **77**, 1-10.

Pajor, A.M., 1996. Molecular cloning and functional expression of a sodium-dicarboxylate cotransporter from human kidney. *American Journal of Physiology* **270**, F642-F648.

Palmieri, L., Pardo, B., Lasorsa, F.M., del Arco, A., Kobayashi, K., Iijima, M., Runswick, M.J., Walker, J.E., Saheki, T., Satrustegui, J., Palmieri, F., 2001. Citrin and aralar1 are Ca(2+)-stimulated aspartate/glutamate transporters in mitochondria. *EMBO Journal* **20**, 5060-5069.

Peghini, P., Janzen, J., Stoffel, W., 1997. Glutamate transporter EAAC-1-deficient mice develop dicarboxylic aminoaciduria and behavioral abnormalities but no neurodegeneration. *EMBO Journal* **16**, 3822-3832.

Rauen, T., Fischer, F., Wiessner, M., 1999. Glia-neuron interaction by high-affinity glutamate transporters in neurotransmission. *Adv Experimental Medical Biology* **468**, 81-95.

Regan, R.F., Choi, D.W., 1991. Glutamate neurotoxicity in spinal cord cell culture. *Journal of Neuroscience* **43**, 585-591.

Rothstein, J.D., Martin, L., Levey, A.I., Dykes-Hoberg, M., Jin, L., Wu, D., Nash, N., Kuncl, R.W., 1994. Localization of neuronal and glial glutamate transporters. *Neuron* **13**, 713-725.

Schmitt, A., Asan, E., Puschel, B., Kugler, P., 1997. Cellular and regional distribution of the glutamate transporter GLAST in the CNS of rats: nonradioactive in situ hybridization and comparative immunocytochemistry. *Journal of Neuroscience* **17**, 1-10.

Schousboe, A., 1981. Transport and metabolism of glutamate and GABA in neurons and glial cells. *Int Review of Neurobiology* **22**, 1-45.

Shafqat, S., Tamarappoo, B.K., Kilberg, M.S., Puranam, R.S., McNamara, J.O., Guadano-Ferraz, A., Fremeau, R.T. Jr, 1993. Cloning and expression of a novel Na(+)-dependent neutral amino acid transporter structurally related to mammalian Na+/glutamate cotransporters. *Journal of Biological Chemistry* **268**, 15351-15355.

Shayakul, C.K.Y., Lee, W.S., Brown, D., Rothstein, J.D., Hediger, M.A., 1997. Localization of the high-affinity glutamate transporter EAAC1 in rat kidney. *American Journal of Physiology* **273**, 1023-1029.

Shikhman, A.R., Greenspan, N.S., Cunningham, M.W., 1994. Cytokeratin peptide SFGSGFGGGY mimics N-acetyl-beta-D-glycosamine in reaction with antibodies and lectins, and induces in vivo anti-carbohydrate antibody response. *Journal of Immunology* **153**, 5593-5606.

Shupliakov, O., Brodin, L., Cullheim, S., Ottersen, O.P., Storm-Mathisen, J., 1992. Immunogold quantification of glutamate in two types of excitatory synapse with different firing patterns. *Journal of Neuroscience* **12**, 3789-3803.

Sims, K.D., Robinson, M.B., 1999. Expression patterns and regulation of glutamate transporters in the developing and adult nervous system. *Critical Review of Neurobiology* **13**, 169-197.

Sims, K.D., Straff, D.J., Robinson, M.B., 2000. Platelet-derived growth factor rapidly increase

- activity and cell surface expression of the EAAC1 subtype of glutamate transporter through activation of phosphatidylinositol 3-Kinase. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 5228-5237.
- Skår, A.R., 2002. Lokalisering av glutamattransportører i hippocampus CA3 hos rotte. *Hovedfagsoppgave*.
- Slotboom, D.J., Lolkema, J.S., Konings, W.N., 1996. Membrane topology of the C-terminal half of the neuronal, glial, and bacterial glutamate transporter family. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 31317-31321.
- Storck, T., Schulte, S., Hofmann, K., Stoffel, W., 1992. Structure, expression, and functional analysis of a Na<sup>+</sup>-dependent glutamate/aspartate transporter from rat brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**, 10955-10959.
- Storm-Mathisen, J., 1981. Autoradiographic and microchemical localization of high affinity glutamate uptake. In: Roberts, P.J., Storm-Mathisen, J., Johnston, G.A.R. (Eds.), *Glutamate: Transmitter in the Central Nervous System*. Wiley: New York, s. 89-115.
- Storm-Mathisen, J., Leknes, A.K., Bore, A.T., Vaaland, J.L., Edminson, P., Haug, F.S., Ottersen, O.P., 1983. First visualization of glutamate and GABA in neurons by immunocytochemistry. *Nature* **301**, 517-520.
- Sudhof, T.C., 1995. The synaptic vesicle cycle: a cascade of protein-protein interactions. *Nature* **375**, 645-653.
- Takumi, Y., Matsubara, A., Danbolt, N.C., Laake, J.H., Storm-Mathisen, J., Usami, S., Shinkawa, H., Ottersen, O.P., 1997. Discrete cellular and subcellular localization of glutamine synthetase and the glutamate transporter GLAST in the rat vestibular end organ. *Journal of Neuroscience* **79**, 1137-1144.
- Tolner, B., Poolman, B., Wallace, B., Konings, W.N., 1992. Revised nucleotide sequence of the gltP gene, which encodes the proton- glutamate-aspartate transport protein of Escherichia coli K-12. *Journal of Bacteriology* **174**, 2391-2393.
- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J., 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* **76**, 4350-4354.
- Trotti, D., Rossi, D., Gjesdal, O., Levy, L.M., Racagni, G., Danbolt, N.C., Volterra, A., 1996. Peroxynitrite inhibits glutamate transporter subtypes. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 5976-5979.
- Trotti, D., Volterra, A., Lehre, K.P., Rossi, D., Gjesdal, O., Racagni, G., Danbolt, N.C., 1995. Arachidonic acid inhibits a purified and reconstituted glutamate transporter directly from the water phase and not via the phospholipid membrane. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 9890-9895.
- Trotti, T., Aoki, M., Pasinelli, P., Berger, U.V., Danbolt, N.C., Brown, R.H.J., Hediger, M.A., 2001. Amyotrophic lateral sclerosis-linked glutamate transporter mutant has impaired glutamate clearance capacity. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 576-583.
- Utsunomiya-Tate, N., Endou, H., Kanai, Y., 1996. Cloning and functional characterization of a system ASC-like Na<sup>+</sup>-dependent neutral amino acid transporter. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 14883-14890.
- Van den Berg, C.J., Garfinkel, D., 1971. A simulation study of brain compartments - metabolism of glutamate and related substances in mouse brain. *Biochemical Journal* **123**, 211-218.
- van Lookeren Campagne, M., Oestericher, A.B., van der Krift, T.P., Gispen, W.H., Verkleij, A.J., 1991. Freeze-substitution and Lowicryl HM20 embedding of fixed rat brain: suitability of immunogold ultrastructural localization of neural antigens. *Journal of Histochemical Cytochemistry* **39**, 1267-1279.

Zerangue, N. , Kavanaugh, M.P., 1996. Flux coupling in a neuronal glutamate transporter. *Nature* **383**, 634-637.