

Glutamat, glutamin og iskemi i sentralnervesystemet

Sammendrag

Bakgrunn. Forfatterne har forsket på membrantransport av glutamat og glutamin i sentralnervesystemet. I møte med klinikere ved norske sykehus fant vi at det var interesse for en kort oversiktsartikkel over emnet som bakgrunn for å forstå deler av patofysiologien ved iskemisk hjerneslag og dermed lettere kunne ta stilling til nye behandlingsalternativer.

Resultater og fortolkning. Aminosyren glutamat er den viktigste eksitatoriske neurotransmitteren i sentralnervesystemet. Etter stimulering av de postsynaptiske glutamatreseptorene må glutamat fjernes raskt fra den synaptiske spalten. Mens flere andre neurotransmittere tas opp direkte i den presynaptiske terminalen, tas glutamat i hovedsak opp i nærliggende gliaceller. Deretter må glutamat krysse ekstracellulærrømmet i en form som ikke stimulerer glutamatreseptorene. Problemet kan løses med en glutamat-glutamin-syklus der glutamat tas opp i gliaceller og amideres til glutamin som fraktes tilbake til nerveterminalene og omdannes til glutamat. Denne syklusen er imidlertid avhengig av energikrevende enzymer og membrantransportproteiner, og dermed svært sårbar ved anoksi og iskemi.

Engelsk sammendrag finnes i artikkelen på www.tidsskriftet.no

Oppgitte interessekonflikter: Ingen

Jean-Luc Boulland

Anatomisk institutt og Senter for molekylærbiologi og nevrovitenskap Universitetet i Oslo

Line M. Levy

line.boulland@lds.no
Medisinsk avdeling
Lovisenberg Diagonale Sykehus
0440 Oslo

Når et aksjonspotensial når frem til en glutamat-erg nerveterminal, åpnes spenningsavhengige Ca^{2+} -kanaler. Ca^{2+} -innstrømning gjennom kanalene fører til at presynaptiske vesikler smelter sammen med plasmamembranen og frigjør neurotransmitter til den synaptiske spalten. Glutamat binder seg spesifikt til pre- og postsynaptiske glutamatreseptorer som klassifiseres i to familier: ionotrope og metabotrope glutamatreseptorer. Tre typer ionotrope glutamatreseptorer er blitt beskrevet og navngitt etter agonisten som stimulerer reseptoren: NMDA (N-metyl-D-aspartat)-reseptorer, AMPA (amino-3-hydroksy-5-metyl-4-isoksazol propionat)-reseptorer og kainatreseptorer. Disse reseptorene er pentamere proteinkomplekser som danner ionekanaler. Når en agonist binder seg, åpnes kanalene slik at kationer kan strømme inn. Ved innstrømning av kationer i det postsynaptiske nevronet genereres et eksitatorisk postsynaptisk potensial som kan generere et aksjonspotensial hvis amplituden er stor nok (1). Metabotrope reseptorer er koblet til G-proteiner og virker langsomt fordi den intracellulære signaloverføringen er tidkrevende. De metabotrope glutamatreseptorene er lokalisert i plasmamembranen til postsynaptiske dendritter og presynaptiske nerveterminaler. I de sistnevnte kan glutamat via binding til reseptorene regulere frisetting av glutamat fra synaptiske vesikler.

Glutamat må fjernes raskt fra den synaptiske spalten, både for å oppnå et godt signal-støy-forhold og fordi høy konsentrasjon av glutamat i den synaptiske spalten over tid kan skade det postsynaptiske nevronet ved overstimulering, også kalt eksitotoksitet. Rask fjerning av glutamat kan også hindre at glutamat skaper krysskommunikasjon ved å diffundere til nabosynapser og stimulere glutamatreseptorer der. Glutamat kan i teorien følge mange ruter:

- Opptak via presynaptiske transportører (det er holdepunkter for at det skjer presynaptisk opptak, men den kvantitative betydningen av dette er ukjent og de ansvarlige transportørene er ikke blitt identifisert)
- Opptak via postsynaptiske transportører og videre metabolisering i nevronet
- Opptak via glutamattransportører i gliacellenes plasmamembran etterfulgt av oksidering til α -ketoglutarat via glutamat dehydrogenase, alternativt via aspartat aminotransferase, eller amidering til glutamin

I det følgende omtales kun glutamats skjebne etter opptak i gliaceller med hovedvekt på omdanning til glutamin. Ettersom glutamin ikke er en neurotransmitter, kan denne aminosyren trygt frisettes fra gliaceller, krysse det ekstracellulære rom og tas opp av de presynaptiske nerveterminalene der glutamin kan omdannes til glutamat, som så akkumuleres i presynaptiske vesikler.

Glutamat-glutamin-syklus

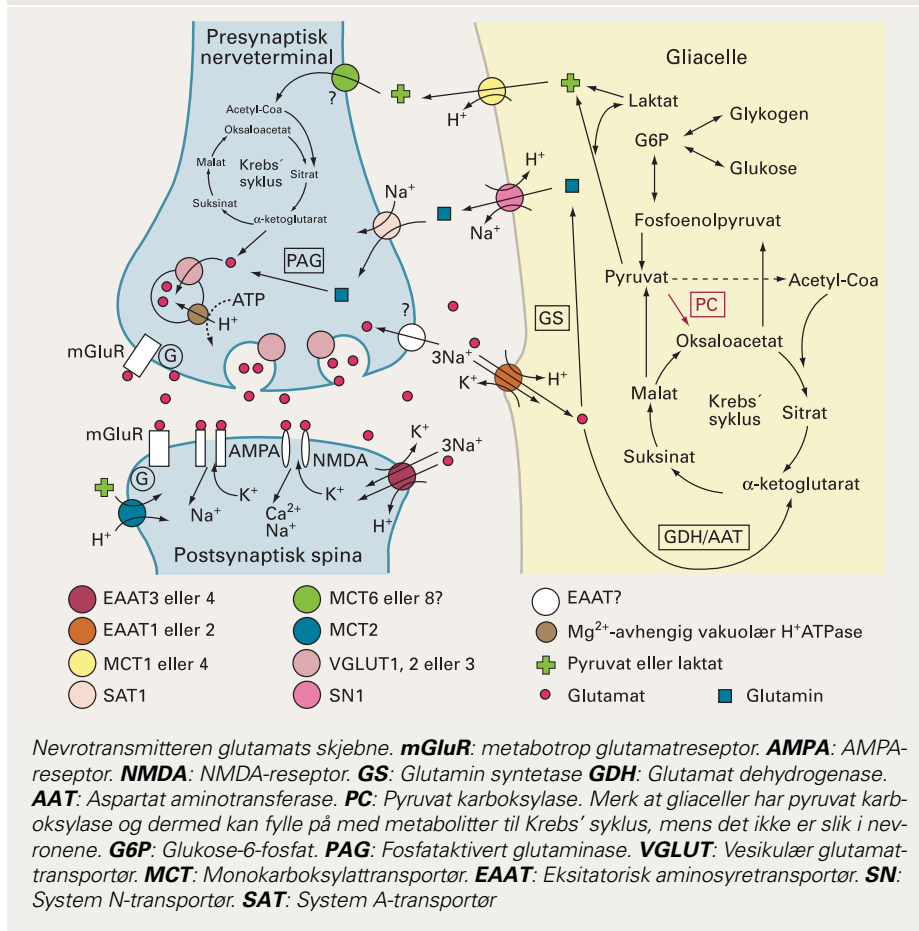
Gjenvinning av glutamat er viktig ettersom nevroner, i motsetning til astroglia, ikke uttrykker pyruvat karboksylase og dermed ikke kan nysyntetisere glutamat fra metabollitter i Krebs' syklus uten at det medfører netto tap av disse metabolittene (fig 1). Første trinn i gjenvinningen av glutamat er opptak i astroglia mediert av glutamattransportørene EAAT (excitatory amino acid transporter) 1 og 2 (fig 1). Opptaket skjer mot glutamats konsentrasjonsgradient, det er energikrevende og drives i hovedsak av natriumgradienten (2, 3). I astrocyttene omdannes glutamat til glutamin av glutaminsyntetase som kun finnes i gliaceller. I reaksjonen forbrukes 1 mol ATP per mol glutamin som dannes. Glutamin kan frigjøres fra astroglia til ekstracellulærrømmet via den gliale glutamintransportøren SN1 (system N1). Deretter kan glutamin tas opp i det presynaptiske nevronet via den neuronale glutamintransportøren SAT1 (system A transportør) og omdannes tilbake til glutamat av fosfataktivert glutaminase (4–5). Endelig akkumuleres glutamat i presynaptiske vesikler via de vesikulære glutamattransportørene VGLUT (vesicular glutamate transporter) 1, 2 eller 3 (6–10) og er klar til ny frisetting.



Hovedbudskap

- Etter frisetting gjenvinnes neurotransmitteren glutamat via glutamat-glutamin-syklus som omfatter nevroner og gliaceller
- Proteiner i nevroner og gliaceller bidrar til regulering av den ekstracellulære glutamatkonsentrasjonen
- Iskemi forstyrrer glutamathomøostasen med påfølgende nevrotoksisk økning i ekstracellulær glutamatkonsentrasjon

Figur 1



Aminosyretransportører

De gliale glutamattransportørene EAAT1 og 2

Hittil er fem Na⁺-avhengige eksitatoriske aminosyretransportører klonet: EAAT1, 2, 3, 4 og 5 (2). Støkiometrien er bestemt for EAAT3 (11) og EAAT2 (12) som presentert i figuren. Glutamat med en netto negativ ladning kotransporteres med 3 Na⁺ (hoveddrivkraft) og en H⁺. For at transportøren skal vende tilbake til utgangskonformasjonen, bindes en K⁺ intracellulært og slippes løs ekstracellulært (2). EAAT1 og 2 finnes i hele hjernen og er lokalisert i astrocyttiske plasmamembraner som omgir synapser (13). Glutamatopptak mediert av EAAT1 og 2 er et nøkkeltrinn i glutamat-glutamin-syklus.

SN1 – en glial system N glutamintransportør

System N-glutamintransportøren SN1 kan transportere histidin, glutamin, asparagin og alanin. Den ble klonet fra rotte (14). I normal voksen rottehjerne uttrykkes SN1 utelukkende i astroglia, inkludert astrogliautløpere som omgir synapser (14, 15). Transport av substrat inn i cellen via SN1 fører til økning i intracellulær pH og prosessen kan reverseres ved å fjerne substrat fra det ekstracellulære mediet. Disse observasjonene indikerer for det første at det skjer en mottransport av protoner (H⁺

byttes mot Na⁺ og glutamin) og for det andre at SN1 kan transportere substrat både inn i og ut av cellen avhengig av substratkonsentrasjon (14). Dessuten har SN1 en frikoblet protonkanal som motvirker at kotransporten av proton fører til oppbygging av en protongradient (3, 15). Glutamintransporten reverseres like over normal ekstracellulær glutaminkonsentrasjon (16). Dermed bestemmes transportretningen av små variasjoner i intra- eller ekstracellulær glutaminkonsentrasjon. Resultatet er at SN1 medierer glialt opptak av glutamin når det ikke er synaptisk aktivitet. Derimot, etter glutamatfrigjøring fra nerveterminaler, fører glutamatopptak og glutamin syntetaseaktivitet til en så høy intracellulær glutaminkonsentrasjon at SN1 medierer frigjøring av glutamin til ekstracellulærommet (4).

SAT1 – nevronal system A-glutamintransportør

System A-proteiner kan ikke transportere H⁺ i bytte mot Na⁺ og glutamin. De er elektrogene og bruker Na⁺-gradienten (1 Na⁺ kotransporteres per aminosyre) og membranpotensialet til å akkumulere glutamin mot en konsentrasjonsgradient (4). SAT1-mediert opptak reverseres ikke ved hvilemembranpotensialet. I voksen rottehjerne viser in situ hybridisering at SAT1-mRNA er lokalisert i nevroner, men ikke i glia. I cellekultur viser

immunofluorescens at SAT1 hovedsakelig er lokalisert i terminaler (17). SAT1 er derfor en god kandidat for å ta opp glutamin som er frigjort til ekstracellulærommet av SN1 (fig 1).

De vesikulære glutamattransportørene VGLUT1/BNPI, VGLUT2/DNPI og VGLUT3

Drivkraften for glutamatopptak i synaptiske vesikler er en elektrokjemisk H⁺-gradient generert av en Mg²⁺-avhengig vakuolær ATPase som oppkonsentrerer H⁺ i presynaptiske vesikler (18). Jakten på de vesikulære glutamattransportørene var lang: Først ble en fosfattransportør isolert fra hjernevev (19) og kalt BNPI (brain specific Na⁺-dependent P_i transporter). Den viste seg å være lokalisert i presynaptiske glutamaterge vesikler, og seks år senere ble det vist at BNPI kunne transportere glutamat (20). Proteinet ble derfor omdøpt til VGLUT1 (6). Like etter ble en fosfattransportør med 82 % homologi klonet og kalt DNPI (differentiation associated Na⁺-dependent P_i transporter) (21). Det ble demonstrert at også dette proteinet kunne transportere glutamat og utelukkende var uttrykt i glutamaterge presynaptiske vesikler. Navnet ble derfor endret til VGLUT2 (7). VGLUT1 og VGLUT2 finnes i hovedsak i komplementære nevronpopulasjoner (7, 22–24). I noen regioner der både VGLUT1 og VGLUT2 er uttrykt, kan de uttrykkes hver for seg eller i samme nevron (24). VGLUT2 finnes fortrinnsvis i synapser med høy sannsynlighet for frigjøring, mens VGLUT1 er assosiert med lav sannsynlighet for frigjøring (7, 24). En tredje vesikulær glutamattransportør, VGLUT3, er klonet (25, 8–10). VGLUT3 er uttrykt i nevroner spredt i ulike deler av hjernen, ikke bare i glutamaterge synapser, men også i GABA-erge, kolinerge og monoaminerge, noe som åpner for at ulike neurotransmittere kan frisettes i samme synapse (8, 9, 24). Dessuten ser det ut til at VGLUT3 er lokalisert i dendritter, i overensstemmelse med at det er observert retrograd synaptisk signaloverføring (26). Endelig er det detektert lave nivåer av VGLUT3 immunreaktivitet i astrogliautløpere nær synapser (9, 24). En slik lokalisering kan umiddelbart virke slående, men ettersom Ca²⁺-avhengig glial frisetting av glutamat er beskrevet (27, 28) kan VGLUT3 tenkes å være involvert i denne nye typen av glutamatmediert signaloverføring. Det er nylig vist at astroglia også har VGLUT1 og/eller VGLUT2 i vesikler som likner synaptiske vesikler (SLMV, synaptic-like microvesicles) og kan frisette glutamat ved eksocytose (29).

Patofysiologiske aspekter

Gjenvinning av glutamat for ny frisetting til den synaptiske spalten skjer delvis via glutamat-glutamin-syklus som involverer en rekke til dels energikrevende enzymer og membrantransportørproteiner, både i astroglia og i nevroner. Det er ikke klarlagt hvor stor an-

del av frisatt glutamat som gjenvinnes via glutamat-glutamin-syklus: Mens dette ser ut til å være den dominerende omsetningsveien i retina (30, 31), er situasjonen mer uklar i andre deler av sentralnervesystemet. Iskemi vil i teorien påvirke flere energikrevende trinn i glutamat-glutamin-syklus: Mangel på ATP vil hemme omdanning av glutamat til glutamin ved enzymet glutamin syntetase (fig 1) slik at konsentrasjonen av glutamat i astroglia øker. Dette påvirker i sin tur glutamatopptaket via de gliale glutamattransportørene som må pumpe glutamat inn i cellen mot en høyere konsentrasjonsgradient. Samtidig fører iskemi til en depolarisering av cellen fordi den energikrevende Na^+/K^+ -ATPasen ikke kan opprettholde iongradientene. Resultatet kan bli at glutamattransportørene pumper glutamat ut i synapsen slik at de bidrar til eksitotoksisitet istedenfor å motvirke den. Beregninger basert på støkiometrien til EAAT2 viser at den ekstracellulære glutamatkonsentrasjon er ca. 2 nmol/l ved normalfysiologiske forhold og over 60 $\mu\text{mol/l}$ ved iskemi (12). Teoretisk sett kunne det være en fordel å blokkere glutamattransportørene under iskemi, men egnede hemmere finnes ikke, og det er praktisk vanskelig å tilføre slike hemmere når det ikke er blodsirkulasjon i det iskemiske området. I ytterkantene av et hjerneinfarkt er det som kjent en randzone som delvis mottar blodforsyning fra andre arterier. I randsonen kan man tenke seg en terapeutisk gevinst av å tilføre hemmere av glutamattransportører eller å holde metabolismen på et lavere nivå (f.eks. senke kroppstemperaturen og redusere forhøyet blodsukkernivå) i forløpet av cerebral iskemi for å redusere utbredelsen av infarkt.

Vi takker Jon Storm-Mathisen for gjennomlesning og gode råd. Arbeidet var støttet av Norges forskningsråd og EU (QLG3-CT2001-02004, DECG) – JLB.

Litteratur

- Dichter MA, Wilcox KS. Excitatory synaptic transmission. I: Engel J, Pedley JR, Pedley TA. Epilepsy: a comprehensive textbook. Kap. 23. Philadelphia, PA: Lippincott-Raven, 1997: 251–63.
- Levy LM. Structure, function and regulation of glutamate transporters. I: Egebjerg J, Schousboe A, Krosgaard-Larsen P. Glutamate and GABA receptors and transporters: structure, function and pharmacology. Kap 13. Boca Raton, FL: CRC Press, 2001: 307–36.
- Danbolt NC. Glutamate uptake. *Prog Neurobiol* 2001; 65: 1–105.
- Chaudhry FA, Reimer RJ, Edwards RH. The glutamine commute: take the N line and transfer to the A. *J Cell Biol* 2002; 157: 349–55.
- Kvamme E, Torgner IA, Roberg B. Kinetics and localization of brain phosphate activated glutaminase. *J Neurosci Res* 2001; 66: 951–8.
- Bellocchio EE, Reimer RJ, Fremeau RT jr. et al. Uptake of glutamate into synaptic vesicles by an inorganic phosphate transporter. *Science* 2000; 289: 957–60.
- Fremeau RT, Troyer MD, Pahnner I et al. The expression of vesicular glutamate transporters defines two classes of excitatory synapse. *Neuron* 2001; 31: 247–60.
- Gras C, Herzog E, Belenchi GC et al. A third vesicular glutamate transporter expressed by cholinergic and serotonergic neurons. *J Neurosci* 2002; 22: 5442–51.
- Fremeau RT jr., Burman J, Qureshi T et al. The identification of vesicular glutamate transporter 3 suggests novel modes of signaling by glutamate. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 14488–93.
- Schafer MK, Varoqui H, Defamie N et al. Molecular cloning and functional identification of mouse vesicular glutamate transporter 3 and its expression in subsets of novel excitatory neurons. *J Biol Chem* 2002; 277: 50734–48.
- Zerangue N and Kavanaugh MP. ASCT-1 is a neutral amino acid exchanger with chloride channel activity. *J Biol Chem* 1996; 271: 27991–4.
- Levy LM, Warr O, Attwell D. Stoichiometry of the glial glutamate transporter GLT-1 expressed inducibly in a Chinese hamster ovary cell line selected for low endogenous Na^+ -dependent glutamate uptake. *J Neurosci* 1998; 18: 9620–8.
- Lehre KP, Levy LM, Ottersen OP et al. Differential expression of two glial glutamate transporters in the rat brain: quantitative and immunocytochemical observations. *J Neurosci* 1995; 15: 1835–53.
- Chaudhry FA, Reimer RJ, Krizaj D et al. Molecular analysis of system N suggests novel physiological roles in nitrogen metabolism and synaptic transmission. *Cell* 1999; 99: 769–80.
- Boulland JL, Osen KK, Levy LM et al. Cell-specific expression of the glutamine transporter SN1 suggests differences in dependence on the glutamine cycle. *Eur J Neurosci* 2002; 15: 1615–31.
- Chaudhry FA, Krizaj D, Larsen P et al. Coupled and uncoupled proton movement regulates amino acid transport by System N. *EMBO J* 2001; 20: 7041–51.
- Armario S, Coco S, Bacci A et al. Localization and functional relevance of system A neutral amino acid transporters in cultured hippocampal neurons. *J Biol Chem* 2002; 277: 10467–73.
- Naito S, Ueda T. Characterization of glutamate uptake into synaptic vesicles. *J Neurochem* 1985; 44: 99–109.
- Ni B, Rosteck PR jr., Nadi NS et al. Cloning and expression of a cDNA encoding a brain-specific Na^+ -dependent inorganic phosphate cotransporter. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 5607–11.
- Takamori S, Rhee JS, Rosenmund C et al. Identification of a vesicular glutamate transporter that defines a glutamatergic phenotype in neurons. *Nature* 2000; 407: 189–94.
- Aihara Y, Mashima H, Onda H et al. Molecular cloning of a novel brain-type Na^+ -dependent inorganic phosphate cotransporter. *J Neurochem* 2000; 74: 2622–5.
- Herzog E, Belenchi GC, Gras C et al. The existence of a second vesicular glutamate transporter specifies subpopulations of glutamatergic neurons. *J Neurosci* 2001; 21: RC181.
- Varoqui H, Schafer MK, Zhu H et al. Identification of the differentiation-associated Na^+/PI transporter as a novel vesicular glutamate transporter expressed in a distinct set of glutamatergic synapses. *J Neurosci* 2002; 22: 142–55.
- Boulland JL, Qureshi T, Seal R et al. Expression of the vesicular glutamate transporters indicate the widespread co-release of multiple neurotransmitters during development. *J Comp Neurol* 2004; 480: 264–80.
- Takamori S, Malherbe P, Broger C et al. Molecular cloning and functional characterization of human vesicular glutamate transporter 3. *EMBO Rep* 2002; 3: 798–803.
- Zilberter Y. Dendritic release of glutamate suppresses synaptic inhibition of pyramidal neurons in rat neocortex. *J Physiol* 2000; 528: 489–96.
- Bezzi P, Carmignoto G, Pasti L et al. Prostaglandins stimulate calcium-dependent glutamate release in astrocytes. *Nature* 1998; 391: 281–5.
- Araque A, Li N, Doyle RT et al. SNARE protein-dependent glutamate release from astrocytes. *J Neurosci* 2000; 20: 666–73.
- Bezzi P, Gundersen V, Galbete JL et al. Astrocytes contain a vesicular compartment that is competent for regulated exocytosis of glutamate. *Nat Neurosci* 2004; 7: 613–20.
- Pow DV, Robinson SR. Glutamate in some retinal neurons is derived solely from glia. *Neuroscience* 1994; 60: 355–66.
- Barnett NL, Pow DV, Robinson SR. Inhibition of Muller cell glutamine synthetase rapidly impairs the retinal response to light. *Glia* 2000; 30: 64–73.