



UPPSALA
UNIVERSITET

Excitotoxicitet

Hur, när och varför neuroner exciteras till döds

Johan Svensson

Independent Project in Biology
Självständigt arbete i biologi, 15 hp, vårterminen 2009
Institutionen för biologisk grundutbildning, Uppsala universitet

Sammandrag

Glutamat är den huvudsakliga excitatoriska neurotransmittorn i centrala nervsystemet (CNS). Glutamat syntetiseras från glutamin i neuroner. Efter dess frisläppning till synapsklyftan binder glutamat till AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-metyl-4-isoxazolpropansyra)-, NMDA (N-metyl-D-aspartat)- och kainatreceptorer på postsynaptiska neuroner. Aktivering av dessa receptorer leder till inflöde av Na^+ och Ca^{2+} med efterföljande depolarisering och eventuell initiering av aktionspotentialer. För att snabbt avbryta signalering tas glutamat upp av neuroner och närliggande gliaceller för att metaboliseras eller återanvändas.

Glutamat har förutom sin roll som förmedlare av excitatorisk signalering visat sig vara ett potent neurotoxin. Förhöjd frisläppning och/eller minskat upptag av glutamat leder till förhöjd extracellulär glutamatkoncentration med medföljande överaktivering av glutamatreceptorer som följd. Detta leder till den process för glutamatinducerad celldöd som kallas excitotoxicitet. Överaktivering av glutamatreceptorer leder till förhöjd intracellulär Ca^{2+} -koncentration huvudsakligen via inflöde genom NMDA-receptorer. Detta leder till aktivering av proteaser och nukleaser, mitokondriell dysfunktion, energiunderskott, depolarisering samt produktion av reaktiva syre- och kväveföreningar. Allt detta leder till att neuroner skadas och dör via nekros och/eller apoptos.

Förhöjd extracellulär glutamatkoncentration orsakad av ökad frisläppning och/eller minskat upptag med efterföljande excitotoxisk neurodegenerering har påvisats vid flera vanliga patologiska tillstånd i CNS. Dessa inkluderar akuta tillstånd som stroke, trauma och epilepsi samt neurodegenerativa sjukdomar som Alzheimers, Parkinsons, Huntingtons, multipel skleros (MS) och amyotrofisk lateralskleros (ALS).

Behandling mot excitotoxisk neurodegenerering har huvudsakligen riktat in sig på inhibering av NMDA-receptorer. Detta har visat sig svårt då inhibering av glutamatsignalering, som står för huvuddelen av en normala excitatoriska signaleringen i CNS, ger svåra biverkningar. Annan forskning har försökt öka glutamatupptag via ökat uttryck av glutamattransportproteiner. En tredje infallsvinkel är att angripa excitotoxiska mekanismer intracellulärt. Man har lyckats hindra Ca^{2+} -inflöde från att aktivera ett enzym som producerar reaktiva kväveföreningar. Detta torde vara ett bra angreppssätt då man hindrar excitotoxiska mekanismer utan att påverka normal excitatorisk signalering.

Inledning

Signalering mellan neuroner i centrala nervsystemet (CNS) består av inhibitoriska och excitatoriska signaler. En inhibitorisk signal från en neuron minskar chansen att nästa neuron ska skicka en elektrisk signal. En excitatorisk signal däremot ökar chansen att nästa neuron ska skicka en signal. Överdriven excitatorisk signalering är toxisk och kan leda till att neuroner dör via så kallad "excitotoxicitet".

Glutamat är den huvudsakliga neurotransmittorn vid excitatorisk signalering i CNS. Förutom dess roll vid signalöverföring vid excitatoriska synapser producerar glutamat långvarig förstärkning eller försvagning av synapser och spelar på så sätt en mycket viktig roll vid inlärning och minne (Purves *et al.* 2008). Glutamat förmedlar excitatoriska signaler genom att binda till specifika receptorer på postsynaptiska neuroner. Men förutom dess mycket viktiga roll vid normal CNS-funktion kom rapporter vpf gt andra halvfr grgp av 1900-talet qo "att i nwco cv'@gp" kunde fungera som ett potent neurotoxin (Olney 1969, Rothman 1983, Simon *et al.* 1984). Det har visat sig och är allmänt accepterat att överdriven frisläppning av glutamat och efterföljande överaktivering av glutamatreceptorer leder till celldöd. Denna neurodegenerativa process har kommit att kallas excitotoxicitet. Excitotoxicitet har visat sig vara en betydande orsak till den neurodegenerering som ses vid stroke, trauma, epilepsi och flera neurodegenerativa sjukdomar.

Syftet med denna uppsats är att i detalj beskriva de cellulära och molekylära mekanismerna bakom excitotoxicitet, hur det leder till neuronal celldöd, dess roll vid olika patologiska tillstånd samt olika strategier som använts och bör användas för att behandla och undvika att neuroner "exciteras till döds".

Excitatorisk signalering i centrala nervsystemet

Neuroner kommunicerar huvudsakligen via kemiska synapser genom frisläppning och bindning av neurotransmittorer. En elektrisk signal i form av en aktionspotential fortplantar sig längs axonen hos presynaptiska neuroner. När aktionspotentialen når änden på axonen, den presynaptiska terminalen, frisläpps neurotransmittorer in i synapsklyftan där den diffunderar till den postsynaptiska terminalen på postsynaptiska neuroner. Där kommer neurotransmittorn att binda till receptorer, vilka förmedlar olika signaler i de postsynaptiska neuronerna. Beroende på vilken neurotransmittor som frisläpps och vilka receptorer den binder till är denna signalering inhibitorisk eller excitatorisk. Inhibitoriska signaler leder till inflöde av Cl^- eller utflöde av K^+ , vilket leder till hyperpolarisering av det postsynaptiska membranet. Denna hyperpolarisering för membranpotentialen längre från tröskelvärdet för öppnandet av spänningsreglerade Na^+ -kanaler, vilket minskar sannolikheten för att en aktionspotential skall startas i den postsynaptiska neuronerna. Inhibitorisk signalering i CNS förmedlas huvudsakligen via GABA (γ -aminosmörsyra) i hjärnan och glycin i ryggmärgen. Excitatorisk signalering leder till ett inflöde av Na^+ och Ca^{2+} i den postsynaptiska neuronerna, med depolarisering av cellmembranet som följd. Depolariseringen leder till ökad sannolikhet för att en aktionspotential ska startas. Excitatorisk signalering i CNS förmedlas huvudsakligen av glutamat. (Purves *et al.* 2008)

Glutamat i centrala nervsystemet

Glutamat är den joniserade formen av den icke-essentiella aminosyran glutaminsyra. Glutamat korsar inte blod-hjärnbarriären, utan syntetiseras i CNS från aminosyran glutamin och glukosmetaboliter i citronsyrcykeln (Hertz *et al.* 1999, Purves *et al.* 2008). I neuroner syntetiseras glutamat från glutamin via enzymet glutaminas, och från aspartat och 2-oxoglutarat via enzymet aspartataminotransferas (Fønnum & Hassel 1995). Glutamat lagras i vesiklar i presynaptiska neuroner via Mg^{2+} - och ATP-beroende transportproteiner som kallas VGLUT (vesikulär glutamattransportör) (Danbolt 2001, Purves *et al.* 2008). När en aktionspotential når den presynaptiska terminalen kommer depolariseringen att öppna spänningsreglerade Ca^{2+} -kanaler. Det följande inflödet av Ca^{2+} leder till sammansmältning av glutamatfyllda vesiklar med det presynaptiska membranet varvid glutamat frisläpps till synapsklyftan. Där diffunderar glutamat till det postsynaptiska membranet och binder till glutamatreceptorer, vilka förmedlar olika excitatoriska signaler. För att snabbt sänka glutamatkoncentrationen i synapsklyftan och avbryta signalering finns det transportproteiner på den presynaptiska neuronerna och framförallt på närliggande gliaceller som aktivt tar upp glutamat. Astrocyter står för det huvudsakliga glutamatupptaget i grå substans, medan oligodendrocyter har samma roll i vit substans. Glutamattransportproteinerna, av vilket det viktigaste heter EAAT2 (GLT-1 hos råttor), transporterar glutamat mot dess koncentrationsgradient genom kopplad transport, där tre Na^+ och en H^+ transporteras in i cellen tillsammans med en glutamatmolekyl, och en K^+ transporteras ut (Levy *et al.* 1998). Gliaceller omsluter ofta glutamaterga synapser helt, och det glutamat som tagits upp i dessa gliaceller omvandlas av enzymet glutaminsyntetas till glutamin (Hertz *et al.* 1999). Detta glutamin transporteras ut ur gliacellen och tas upp av neuronerna för att där sedan återbildas till glutamat via glutaminas. Denna återanvändning av glutamat via gliaceller kallas glutamat-glutaminocykeln. Allt glutamat som tas upp av gliaceller återanvänds inte, utan en betydande del går in i citronsyrcykeln där det används till gliacellens energimetabolism (Hertz *et al.* 1999). Glutamat kan även tas upp från synapsklyftan direkt av presynaptiska neuroner för att återanvändas eller metaboliseras (Purves *et al.* 2008).

Glutamatreceptorer

Glutamatreceptorer indelas i jonotropiska (ligandreglerade jonkanaler) och metabotropiska (G-proteinkopplade) receptorer. Då metabotropiska glutamatreceptorer inte har visats spela någon betydande roll vid excitotoxicitet behandlas dessa inte vidare.

Jonotropiska glutamatreceptorer

De jonotropiska glutamatreceptorerna delas vanligen in i tre undergrupper, vilka namnges efter välkända syntetiska agonister som binder till dem. Dessa tre grupper är AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-metyl-4-isoxazolpropansyra)-receptorer, NMDA (N-metyl-D-aspartat)-receptorer och kainatreceptorer (Ozawa *et al.* 1998). Jonotropiska glutamatreceptorer är homo- eller heterotetramerer eller pentamerer, och 14 subenheter har hittills identifierats (Ozawa *et al.* 1998). Gemensamt för dessa subenheter är en stor extracellulär N-terminal, tre transmembrandomäner och en intracellulär C-terminal (Ozawa *et al.* 1998). C-terminalerna i jonotropiska glutamatreceptorer är oftast kopplade till så kallade PSD-domäner i det postsynaptiska membranet. PSD står för postsynaptisk densitet och är en aggregering av proteiner i det postsynaptiska membranet som binder samman receptorer med varandra och cytoskelettproteiner, och på så sätt håller receptorerna på plats (Sheng & Pak, 2000). PSD-domäner innehåller proteiner som kopplar receptorerna direkt till enzymer och intracellulära signaltransduktionsvägar (Sheng & Pak, 2000).

AMPA-receptorer medierar huvuddelen av den snabba excitatoriska signaleringen i CNS, där de finns i stort sett överallt. AMPA-receptorer är homo- eller heterotetramerer bestående av subenheterna GluR1-GluR4, och beroende på sammansättningen av dessa får receptorn olika egenskaper. AMPA-receptorer är permeabla huvudsakligen för Na^+ och K^+ . Frånvaro av GluR2-subenheten ger däremot receptorn en betydande permeabilitet även för Ca^{2+} . Detta beror på att GluR2 har en positivt laddad argininrest nära jonkanalsmyningen, vilket förhindrar Ca^{2+} -flöde (Ozawa *et al.* 1998, Arundine & Tymianski 2003). Då de flesta AMPA-receptorer är heteromerer innehållande GluR2 har AMPA-receptorer generellt mycket låg Ca^{2+} -permeabilitet. AMPA-receptorer uppvisar snabb kinetik, dvs. de aktiveras och desensitiserar snabbt. Denna egenskap gör att i glutamaterga synapser så står AMPA-receptorer för den snabba och kortvariga signalöverföringen, i kontrast till NMDA-receptorer som med sin långsammare kinetik ger upphov till långsammare men mer långvarig signalering (Ozawa *et al.* 1998).

NMDA-receptorer har egenskaper som gör att de medierar excitatorisk signalering på annat sätt än AMPA- och kainatreceptorer. Alla NMDA-receptorer innehåller subenheten NR1, och är sedan sammansatta av subenheterna NR2A-NR2D (Ozawa *et al.* 1998). NMDA-receptorer finns i hela CNS, med den högsta koncentrationen i framhjärnan och speciellt i hippocampus (Ozawa *et al.* 1998). NMDA-receptorer har hög permeabilitet för Na^+ , K^+ och Ca^{2+} . Det som huvudsakligen skiljer NMDA-receptorer från AMPA- och kainatreceptorer är deras Mg^{2+} -blockering och krav på glycin som coagonist. Vid fysiologisk Mg^{2+} -koncentration sker inget jonflöde genom NMDA-receptorer förrän membranpotentialen depolariseras till mellan -30 och -20 mV. Detta beror på att vid vilopotentialen, som ligger runt -40 till -90 mV, så blockeras jonkanalen i NMDA-receptorer av en Mg^{2+} -jon även när kanalen är öppnad av glutamat (Ozawa *et al.* 1998, Purves *et al.* 2008). När membranet depolariseras t ex genom Na^+ -inflöde genom AMPA-receptorer och membranpotentialen når -30 mV, kommer Mg^{2+} -jonen att lossna från receptorn, varvid Ca^{2+} kan flöda in i neuronerna. Denna egenskap hos NMDA-receptorer ger upphov till så kallad synaptisk plasticitet, där synapser förstärks eller försvagas. Ca^{2+} fungerar som en signalmolekyl, och kan leda till en ökning av antalet AMPA-

receptorer i synapsen samt ökat antal synaptiska sammankopplingar. NMDA-receptorer fungerar på så sätt som en sensor för koppling av pre- och postsynaptisk aktivitet, som leder till en förstärkning av glutamaterga synapser som används mycket. Detta kallas LTP (long-term potentiation) och utgör en av mekanismerna för hur minnen skapas (Purves *et al.* 2008). Aktivering av NMDA-receptorer kräver närvaro av aminosyran glycine, som binder till en annan position än glutamat på receptorn och därmed fungerar som en coagonist (Ozawa *et al.* 1998). NMDA-receptorer har långsammare kinetik än både AMPA- och kainatreceptorer, med långsammare aktivering, deaktivering och desensitisering (Ozawa *et al.* 1998). Vid glutamaterga synapser binder det frisläppta glutamatet således till både AMPA- och NMDA-receptorer. AMPA-receptorer öppnas snabbt och kortvarigt och depolariserar det postsynaptiska membranet. Blir depolariseringen tillräckligt stor kommer Mg^{2+} att lossna från NMDA-receptorerna och Ca^{2+} och mer Na^+ kommer att flöda in i den postsynaptiska neuronerna och ge en förlängd och förstärkt signal.

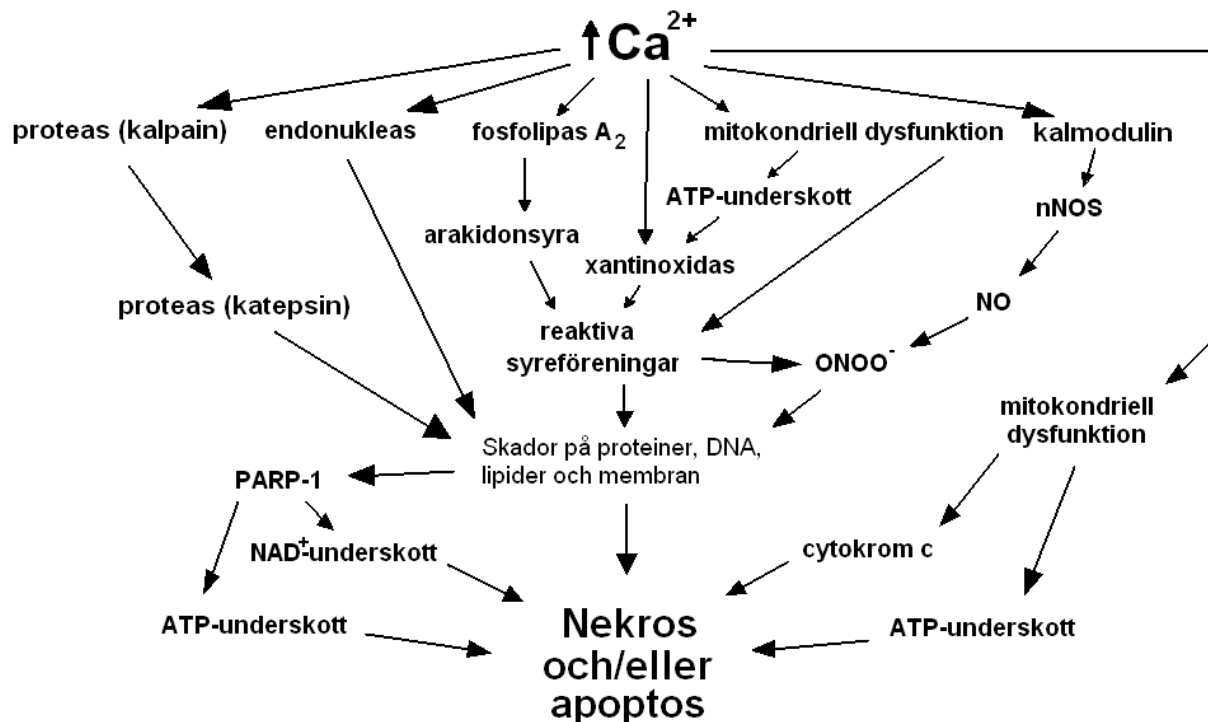
Kainatreceptorer är sammansatta av subenheterna GluR5-GluR7, KA1 och KA2. Kainatreceptorer är inte lika talrika som AMPA- och NMDA-receptorer, men är utspridda i hela CNS (Ozawa *et al.* 1998). Kainatreceptorer är permeabla för Na^+ och K^+ och uppvisar även en betydande permeabilitet för Ca^{2+} , speciellt när receptorn innehåller GluR6-subenheter (Ozawa *et al.* 1998). Inte mycket är känt om kainatreceptorers kinetik, förutom att de snabbt aktiveras och desensitiserar av kainat. Svårigheten att studera kainatreceptorers kinetik beror på att kainatreceptorer alltid uttrycks tillsammans med AMPA-receptorer. AMPA-receptorer aktiveras också av kainat, men utan att desensitiserar. Då kainatreceptorer desensitiserar snabbt döljs deras signal av den förlängda AMPA-receptormedierade signalen (Ozawa *et al.* 1998).

Ca^{2+} i centrala nervsystemet

Ca^{2+} fungerar som en intracellulär signalmolekyl och styr en mängd olika cellulära funktioner. Ca^{2+} styr dels kortvariga funktioner som t ex exocytos och exciterbarhet, dels mer långvariga funktioner som t ex tillväxt, differentiering och synaptisk plasticitet (Sattler & Tymianski 2000). Då Ca^{2+} har så många viktiga funktioner i neuronerna finns det en mängd homeostatiska mekanismer som håller den intracellulära Ca^{2+} -koncentrationen så pass låg att även små inflöden ger de effekter de ska. Ca^{2+} -inflöde sker genom ligandreglerade och spänningsreglerade jonkanaler, och utflödet sker via ATP-krävande Ca^{2+} -pumpar och via transportproteiner där utflödet av Ca^{2+} kopplas till inflödet av Na^+ (Tymianski & Tator 1996). Ca^{2+} lagras även in i det endoplasmiska nätverket och i mitokondrier, och buffras av Ca^{2+} -bindande proteiner i cytoplasman (Tymianski & Tator 1996).

Excitotoxiska mekanismer för celldöd

När AMPA-, kainat-, och i synnerhet NMDA-receptorer aktiveras i för stor utsträckning kommer stora mängder Ca^{2+} att strömma in i neuronerna. Den intracellulära Ca^{2+} -koncentrationen blir då så hög att intracellulära processer aktiveras eller inhiberas, vilket leder till neuronal celldöd (Fig.1). Dessa mekanismer, inducerade genom Ca^{2+} -inflöde via aktiverade glutamatreceptorer, utgör fenomenet excitotoxicitet. Excitotoxicitet leder huvudsakligen till celldöd via nekros, då cellen bryts ned okontrollerat och spricker, men även via apoptos, programmerad celldöd.



Figur 1: Signalvägar som leder till celldöd till följd av förhöjd intracellulär Ca^{2+} -koncentration. Aktivering av proteaser och endonukleaser leder till överdriven protolys av cytoskelett och fragmentering av DNA. Fragmentering av DNA aktiverar DNA-polymeraset PARP-1, vars aktivitet vid lagning av DNA-kedjan konsumerar stora mängder ATP och NAD^+ . För hög Ca^{2+} -koncentration leder till mitokondriell dysfunktion, vilket leder till minskad ATP-produktion och ökad produktion av reaktiva syreföreningar. Reaktiva syreföreningar produceras också vid metabolism av arakidonsyra, som frisätts av Ca^{2+} -aktiverat fosfolipas A_2 . Ökning av Ca^{2+} -koncentrationen leder till bildning av xantinoxidas, vilket producerar reaktiva syreföreningar vid metabolism av ATP-metaboliter. Ca^{2+} binder till proteinet kalmmodulin som då aktiverar neuronalt kväveoxidsyntas (nNOS), vilket i sin tur syntetiserar kväveoxid (NO). NO reagerar med en reaktiv syreförening och bildar peroxynitrit (ONOO^-). ONOO^- är som de reaktiva syreföreningarna mycket reaktivt och tillsammans orsakar de skador på makromolekyler. Mitokondriell dysfunktion leder till frisättning av cytokrom c, vilket initierar en serie reaktioner som leder till apoptos.

Proteaser och nukleaser

Ca^{2+} aktiverar en familj cytosoliska cysteinproteas, kalpainer, vilka bryter ned olika cytoskelettproteiner som t ex spektrin och tubulin (Seubert *et al.* 1989). Vid förhöjd Ca^{2+} -koncentration kommer dessa komponenter av cytoskelettet att proteolyseras i för stor utsträckning, vilket leder till förhindrad intracellulär transport och instabilitet av neuronala utskott som axoner och dendriter (Seubert *et al.* 1989). Aktiverat kalpain gör även att lysosomer frisätter en annan grupp cysteinproteaser som kallas katepsiner, vilka också bidrar till nedbrytning av olika cellkomponenter (Yamashima *et al.* 1998). Ca^{2+} aktiverar även ett Ca^{2+} -beroende intranukleärt endonukleas, vilket klyver DNA mellan nukleosomer, oberoende av apoptosinducerande proteiner (Tominaga *et al.* 1993).

Mitokondriell dysfunktion

Mitokondrier kan lagra betydande mängder Ca^{2+} och är en viktig del av cellers Ca^{2+} -buffertsystem. Mitokondrier skapar en kraftig koncentrationsgradient över sitt inre membran vid den oxidativa respirationen, där protoner pumpas ut ur matrix. Ca^{2+} flödar nedför denna elektrokemiska gradient in i matrix via Ca^{2+} -permeabla jonkanaler (Miller 1998). Ca^{2+} -utflöde ur mitokondrier vid normal intracellulär Ca^{2+} -koncentration och respiration sker via $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -

antiportproteiner (Gunter & Pfeiffer 1990). När Ca^{2+} -koncentrationen i cellen blir för hög kommer mitokondriernas buffertkapacitet att minska. Den intramitokondriella Ca^{2+} -koncentrationen blir då så pass hög att det inre mitokondriella membranet depolariseras. Detta minskar den elektrokemiska gradienten som vanligtvis driver protoner genom ATP-syntas, och cellens ATP-produktion kommer därmed att minska (Schinder *et al.* 1996). Vid hög intracellulär Ca^{2+} -koncentration arbetar de ATP-krävande Ca^{2+} -pumparna i cellmembranet mer än vanligt, så den minskade ATP-produktionen sammanfaller med ett ökat ATP-behov, vilket leder till ett energiunderskott i cellen (Schinder *et al.* 1996). Som tidigare beskrivits, så är NMDA-receptorer permeabla för både Na^+ och Ca^{2+} . Den stora ökning av intracellulär Na^+ -koncentration vid excitotoxisk glutamatreceptoraktivering leder därför till ökad aktivitet av Na^+/K^+ -ATPas, vilket också leder till ökad ATP-användning och förstärkning av cellens energiunderskott (Czyz *et al.* 2002). Ett för stort neuronalt ATP-underskott leder till att jonpumpar i cellmembranet inte kan upprätthålla elektrokemiska gradienter, vilket leder till celldöd. Blir den intramitokondriella Ca^{2+} -koncentrationen tillräckligt hög kommer en typ av protein kallat permeabilitetstransitionspor (PTP) i mitokondriens inre membran att öppnas irreversibelt (Schinder *et al.* 1996). Detta protein fungerar som en kanal och släpper igenom i stort sätt alla lösta molekyler mindre än 2 kDa (White & Reynolds 1996). Detta leder till fullständig depolarisering av det intramitokondriella membranet och kan även leda till mitokondriell svullnad och ruptur. Detta leder i sin tur till frisläppning av upplagrat Ca^{2+} och andra ämnen vilka kan leda till celldöd (Schinder *et al.* 1996).

Reaktiva syreföreningar

Förhöjd intracellulär Ca^{2+} -koncentration och mitokondriell dysfunktion leder till produktion av reaktiva syreföreningar. Reaktiva syreföreningar innefattar bland annat superoxid (O_2^-), väteperoxid (H_2O_2) och hydroxylradikal (OH^\bullet) (Atlante *et al.* 2001). Dessa radikaler är extremt reaktiva och kan vid hög koncentration leda till omfattande skador på proteiner, DNA och membran (Atlante *et al.* 2001).

Mitokondriell dysfunktion

Vid den tidigare beskrivna mitokondriella dysfunktionen störs elektrontransportkedjans funktion. Exciterade elektroner läcker då ut och reagerar med O_2 , varvid superoxid bildas (Sengpiel *et al.* 1998).

Xantinoxidas

ATP-underskottet i cellen orsakat av den mitokondriella dysfunktionen leder till förhöjd koncentration av ATP-metaboliter som t ex adenosin, inosin och hypoxantin (Lazzarino *et al.* 1992). Hypoxantin metaboliseras vanligen via enzymet xantindehydrogenas, men den förhöjda Ca^{2+} -koncentrationen i cytosolen leder till aktivering av ett serinproteas som omvandlar enzymet xantindehydrogenas till xantinoxidas (Sussman & Bulkley 1990, Dykens 1994). Xantinoxidas använder O_2 som elektronacceptor istället för NAD^+ , vilket leder till att stora mängder superoxid produceras vid metabolismen av hypoxantin (Sussman & Bulkley 1990).

Fosfolipas A_2

Glutamatinducerad ökning av intracellulär Ca^{2+} -koncentration och PLC-aktivitet aktiverar cytosoliskt fosfolipas A_2 (Kim *et al.* 1995). Fosfolipas A_2 binder då in i cellmembranet, där det katalyserar frisättning av arakidonsyra från fosfolipider (Kim *et al.* 1995). Vid metabolismen av arakidonsyra produceras sedan stora mängder superoxid (Kukreja *et al.* 1986).

Reaktiva kväveföreningar

Det är inte bara en generell intracellulär ökning av Ca^{2+} -koncentrationen som orsakar excitotoxiska skadeverkningar. Ca^{2+} påverkar effektorproteiner som är direkt kopplade till glutamatreceptorer i PSD-domäner. C-terminalen på NR2-subenheten hos NMDA-receptorer binder direkt till ett PSD-protein kallat PSD-95 (Sheng & Pak 2000). PSD-95 binder i sin tur till enzymet neuronalt kväveoxidsyntas (nNOS) (Sheng & Pak 2000). En del av det Ca^{2+} som strömmar in via NMDA-receptorer binder till det lösta proteinet kalmodulin, vilket när det aktiverats binder till och aktiverar nNOS (Abu-Soud *et al.* 1994). nNOS syntetiserar kvävemoxid (NO), som är en viktig intracellulär signalmolekyl. NO har dessutom visat sig spela en viktig roll vid excitotoxisk celldöd, då behandling av neuroner med NO-inhibitorer förhindrar NMDA-medierad neurotoxicitet (Dawson *et al.* 1991). När de intracellulära koncentrationerna av både NO och superoxid ökar, reagerar dessa två radikaler med varandra och bildar det starkt toxiska ämnet peroxynitrit (ONOO^-) (Koppenol *et al.* 1992). ONOO^- är ingen radikal själv, men oxiderar en stor mängd ämnen i cellen. Exempel på dessa är enzymsbundna metalljoner, lipider, proteiner och DNA (Alvarez *et al.* 1999, Radi *et al.* 1991, Yu *et al.* 2005). ONOO^- , och även i viss utsträckning superoxid och H_2O_2 , verkar inhiberande på glutamattransportproteinerna GLT-1, GLAST och EAAC1 (Trotti *et al.* 1996). Detta ger ett minskat upptag av glutamat av gliaceller, vilket leder till ännu högre extracellulära halter av glutamat.

Poly(ADP-ribos)polymeras

DNA-skador orsakade av NO och ONOO^- leder till aktivering av det nukleära enzymet poly(ADP-ribos)polymeras (PARP-1) (Zhang *et al.* 1994). Aktiverat PARP-1 lagar brott i DNA-kedjan men denna aktivitet konsumerar så stora mängder ATP och nikotinamid-adenin-dinukleotid (NAD^+) vid excitotoxiskt tillstånd att brist på dessa kan leda till celldöd (Zhang *et al.* 1994, Endres *et al.* 1997).

Tillfällig receptorpotential-proteiner

Förhöjda intracellulära koncentrationer av de excitotoxiska signalmolekyler som nämnts, Ca^{2+} , reaktiva syreföreningar, NO, ONOO^- och arakidonsyra leder till öppnandet av en familj membranbundna katjonkanaler som kallas TRP (tillfällig receptorpotential)-proteiner (Hara *et al.* 2002, Wehage *et al.* 2002). Mer specifikt aktiveras underfamiljen TRPM-proteiner, där M står för melastatin. Kanalerna TRPM2 och TRPM7 är permeabla för Ca^{2+} , Zn^{2+} och Mg^{2+} . När dessa kanaler öppnas av excitotoxiska signalmolekyler följer ett ännu större inflöde av Ca^{2+} vilket skapar en ond cirkel där inflödet och bildandet av toxiska ämnen leder till mer inflöde och bildande av dessa. Zn^{2+} kan i sig även potentiella kainatreceptorförmedlad neurotoxicitet (Nave & Connor 1993).

Apoptos

Excitotoxisk glutamatexponering leder även till att neuroner genomgår apoptos (Ankarcrona *et al.* 1995, Larm *et al.* 1997). Apoptos är en form av aktiv kontrollerad celldöd som äger rum kontinuerligt i organismer. Mycket apoptos sker under tillväxt och utveckling, för endast nödvändiga celler skall finnas i den färdigutvecklade organismen. Alla celler har förmågan att genomgå apoptos, och har inbyggda program för detta. Fördelen med att en cell genomgår apoptos istället för nekros är att inga eventuellt toxiska cellkomponenter läcker ut till närliggande celler, då cellmembranet inte går sönder vid apoptos som det gör vid nekros. Vid apoptos bryts DNA ned i tydliga segment, cellen minskar i volym, cytoskelett och organeller

bryts ned och bildar vakuoler i cytosolen (Martin *et al.* 1998). Cellen delas sedan upp genom avknoppning i små delar som kallas apoptotiska kroppar, som fagocyteras av makrofager och liknande celler (Martin *et al.* 1998). Det finns ett flertal vägar genom vilka celler kan genomgå apoptos. Den mest uppmärksammade vägen vid excitotoxicitet är den då mitokondriell dysfunktion och superoxidproduktion leder till att proteinet cytokrom *c* frisätts från det inre mitokondriella membranet (Luetjens *et al.* 2000). Detta fria cytokrom *c* binder till apoptosproteasaktiverande faktor 1 (APAF-1), som sedan binder till ATP (Zou *et al.* 1999). Det bundna ATP:t hydrolyseras, varefter dessa APAF-1-cytokrom *c*-komplex multimeriseras och bildar en så kallad apoptosom (Zou *et al.* 1999). Apoptosomen binder sedan till prokaspas-9 och klyver detta till kaspas-9 (Rodriguez & Lazebnik 1999). Kaspas-9 aktiverar sedan kaspas-3, som är ett av de viktigaste effektorenzymen vid apoptos, och medierar den apoptotiska nedmonteringen av cellen (Rodriguez & Lazebnik 1999).

Excitotoxicitet vid patologiska tillstånd

Vid ett flertal vanliga neuropatologiska tillstånd som stroke, trauma, epilepsi och neurodegenerativa sjukdomar störs den normala glutamaterga signaleringen mellan neuroner. Via patologiskt ökad frisläppning från presynaptiska neuroner eller minskat upptag av gliaceller blir den extracellulära glutamatkoncentrationen så hög att närliggande neuroner drabbas av excitotoxicitet.

Stroke

Stroke, eller slaganfall som det också kallas, definieras som en hjärnskada som består längre än 24 timmar eller leder till döden och är orsakad av nedsatt blodförsörjning (ischemi) (Aarts *et al.* 2003). Stroke orsakas av övergående eller permanent reduktion av blodflödet till delar av eller hela hjärnan, vilket leder till ett hypoxiskt tillstånd (Aarts *et al.* 2003). Ischemin kan drabba ett avgränsat område i hjärnan om en hjärnartär täpps till av en blodpropp eller då en artär gått sönder vid hjärnblödning. Ischemin kan även drabba hela hjärnan vid generellt nedsatt blodförsörjning till hjärnan vid t ex hjärtstillestånd, huvudtrauma eller lungskador (Aarts *et al.* 2003). Utbredningen av celldöden vid stroke beror på hur stort område som omfattas av ischemin samt hur länge denna ischemi pågår. I det område som drabbas direkt av ischemin dör i stort sett alla neuroner inom bara några minuter på grund av syrebrist (Aarts *et al.* 2003). När inte syre finns tillgängligt avstannar elektrontransportkedjan i mitokondrierna, och ATP kan inte längre syntetiseras via oxidativ fosforylering (DeLorenzo *et al.* 2005). Detta lämnar anaerob glykolys som enda ATP-syntetiserande process. Neuroner har ett mycket högt energibehov, som inte kan uppfyllas via enbart glykolys. Energiunderskottet i neuronerna leder till att jonpumpar som t ex Na^+/K^+ -ATPas inte kan upprätthålla elektrokemiska gradienter, varvid neuronerna depolariseras och dör via nekros (Aarts *et al.* 2003). Runt detta fullständigt ischemiska område som drabbas av omedelbara irreversibla skador finns ett område där hjärnvävnaden utsätts för lindrigare ischemi, vilket i sig inte leder till omedelbar celldöd. Detta område kan däremot också bli nekrotiskt via excitotoxicitet som sprider sig från redan nekrotiska områden. Kraftigt förhöjda halter av extracellulärt glutamat i strokedrabbade hjärnor har uppmätts både hos människor och hos djur (Beneviste *et al.* 1984, Bullock *et al.* 1995). Dessa höga extracellulära glutamathalter uppkommer som en följd av det energiunderskott och den depolarisering som följer ischemin. Den depolarisering som sker i ischemiska neuroner leder till att presynaptiska spänningsreglerade Ca^{2+} -kanaler öppnas, vilket leder till att stora mängder glutamat frisläpps extracellulärt via exocytos (Dawson *et al.* 2000). Även upptaget av glutamat av neuroner och gliaceller påverkas av ischemi. Efter en period av ischemi visar neuroner och gliaceller signifikant lägre uttryck av

glutamatttransportproteiner (Fukamachi *et al.* 2001, Rao *et al.* 2001, Yeh *et al.* 2005). Den oxidativa stress som uppkommer vid syrebrist leder till produktion av reaktiva syre- och kväveföreningar, vilka kan oxidera svavelbryggor i glutamatttransportproteiner och därmed leda till minskat glutamatupptag (Volterra *et al.* 1994, Trotti *et al.* 1996). Depolariseringen av neuroner och gliaceller som orsakas av energiunderskottet vid ischemi leder till att Na^+ strömmar in i dessa celler. När den intracellulära Na^+ -koncentrationen blir för hög kommer Na^+ att strömma ut genom glutamatttransportproteiner och då ta med sig glutamat genom kopplad transport (Gemba *et al.* 1994, Rossi *et al.* 2000). Depolariseringen leder helt enkelt till omvänd transport av glutamat ut i det extracellulära utrymmet. Sammanfattningsvis kan man alltså säga att den förhöjda extracellulära glutamatkoncentrationen vid stroke beror på frisättning från neuroner och gliaceller via exocytos och omvänt upptag, samt minskat upptag på grund av minskat uttryck och radikal-inducerad funktionsnedsättning hos glutamatttransportproteiner. Detta glutamat kommer att aktivera glutamatreceptorer på närliggande neuroner och leda till excitotoxicitet, vilken kommer att sprida sig från det ischemiska området och förstora och förvärra hjärnskador orsakade av stroke.

Trauma

Traumatisk hjärnskada (TBI, traumatic brain injury) orsakas av att en yttre kraft mekaniskt skadar hjärnan. TBI är ett mångfacetterat syndrom. De omedelbara skadorna innefattar vanligtvis kross- och skärskador, lokaliserade eller diffusa blödningar samt utspridda axonala skador (DeLorenzo *et al.* 2006, Yi & Hazell 2006). Dessa primära skador kan leda till allvarliga sekundära skademekanismer såsom ischemi, oxidativ stress, inflammation, funktionsnedsättning av blod-hjärnbarriären, ödem samt excitotoxicitet (DeLorenzo *et al.* 2006, Yi & Hazell 2006). Flera studier, både kliniska och experimentella, har visat på förhöjd extracellulär glutamatkoncentration i hjärnan efter TBI (Faden *et al.* 1989, Bullock *et al.* 1998). Denna förhöjning av extracellulär glutamatkoncentration beror på flera orsaker. Mekanisk och strukturell skada kan i sig leda till depolarisering med efterföljande exocytotisk glutamatfrisläppning (Katayama *et al.* 1990). Mekanisk påfrestning på neuroner kan även leda till att mikroporer öppnas i cellmembranet, genom vilka aminosyror kan läcka ut extracellulärt (Bullock *et al.* 1998). TBI kan leda till nedsatt funktion av blod-hjärnbarriären, vilken i normala fall förhindrar att glutamat i blodet tar sig in i hjärnvävnaden (Yi & Hazell 2006). Autoradiografi efter intravenös injektion av ^{14}C -märkt glutamat har visat på betydande glutamatläckage från TBI-inducerad blödning (Koizumi *et al.* 1997). Blödningar orsakade av TBI leder till ödem och blodkärlspasm, vilket ger minskat blodflöde och kan leda till excitotoxiska skadeverkningar på samma sätt som beskrivits ovan för stroke.

Epilepsi

Epilepsi är en neurologisk sjukdom som karaktäriseras av återkommande övergående anfall, vilket innebär spontan, okontrollerad och oordnad neuronsignaler med hög frekvens i delar av eller hela hjärnan (DeLorenzo *et al.* 2005). Epileptiska anfall kan vara mycket varierande både vad gäller symtom, frekvens och omfattning i hjärnan. Gemensamt för all epilepsi är dock en förhöjd neuronal exciterbarhet som periodvis utlöser anfall (DeLorenzo *et al.* 2005). Ungefär 50 % av fallen av epilepsi uppkommer spontant av okänd anledning och utan några påvisbara förändringar i hjärnan (DeLorenzo *et al.* 2005). Resterande 50 % uppkommer efter t ex skador, infektioner eller hjärntumörer (DeLorenzo *et al.* 2005). Epileptiska anfall är inte skadliga i sig, utan epilepsi-relaterade skador orsakas oftast av fall. I vissa fall uppkommer däremot epileptiska anfall som inte slutar av sig själva. Anfall längre än 30 minuter eller upprepade anfall mellan vilka medvetandet inte återfås klassificeras som status epilepticus

(SE) (DeLorenzo *et al.* 2005). Flera studier har visat att SE orsakar nekrotisk neuronal celldöd (Meldrum & Brierley 1973, Nevander *et al.* 1985). Celldöden vid SE orsakas av depolarisering på grund av högfrekvent signalering, produktion av radikaler som följd av energiunderskott, samt förhöjd extracellulär glutamatkoncentration som leder till excitotoxicitet (DeLorenzo *et al.* 2005). Förhöjd extracellulär glutamatkoncentration förekommer vid SE i hjärnor från både människor och djur, och denna glutamatkoncentration når excitotoxiska nivåer (Sherwin *et al.* 1988, During & Spencer 1993, Liu *et al.* 1997). Att excitotoxicitet är en av orsakerna till neuronal celldöd vid SE har visats i flera studier där behandling med NMDA-receptorantagonister har minskat neurodegenereringen (Lason *et al.* 1988, Fariello *et al.* 1989, Ebert *et al.* 2002). Man skulle kunna tro att detta skulle bero på att inhiberingen av NMDA-receptorsignalering i sig minskar den epileptiska signaleringen, men Fariello *et al.* (1989) visade att en NMDA-receptorantagonist skyddade mot neurodegenerering utan att minska den elektriska aktiviteten i hjärnan.

Neurodegenerativa sjukdomar

Alzheimers sjukdom

Alzheimers sjukdom (AD, Alzheimer's disease) är den vanligaste neurodegenerativa sjukdomen och den vanligaste orsaken till demens (Hynd *et al.* 2004). 5-10 % av AD-fallen är genetiskt betingade, och resterande 90-95 % orsakas av spontana mutationer (Hynd *et al.* 2004). Sannolikheten att drabbas av spontan AD är mycket låg fram till ca 65 års ålder, varefter sannolikheten ökar exponentiellt och når 50 % hos personer över 85 år (Suh & Checler 2002). AD är en progressiv sjukdom, och symtomen börjar med försämring av närminne, talförmåga och kognition. Allteftersom sjukdomen fortskrider förvärras symtomen med förlust av långtidsminne, tal- och skrivsvårigheter, försämrad motorik och personlighetsförändringar (Hynd *et al.* 2004). Vid långt framskriden AD är patienten helt beroende av assistans för att klara av även de enklaste vardagliga aktiviteter. AD drabbar cortex i vilken det uppkommer extracellulära utfällningar av ett protein som kallas β -amyloid ($A\beta$ -plackar), samt intracellulära så kallade neurofibrillära trassel, vilka är sammansatta av hyperfosforilerat tau-protein (Suh & Checler 2002). $A\beta$ -plackar och neurofibrillära trassel orsakar inflammation, synaptisk störning, oxidativ stress samt mitokondriell och enzymatisk dysfunktion, vilket leder till celldöd (Suh & Checler 2002). Studier har även visat att excitotoxicitet kan ha en betydande roll vid neurodegenereringen som ses hos personer med AD. β -amyloid, som föreligger i förhöjda koncentrationer vid AD, har visat sig störa Ca^{2+} -homeostas i neuroner från cortex samt göra dessa neuroner mer känsliga för glutamatinducerad excitotoxicitet (Mattson *et al.* 1992). Förhöjda halter av β -amyloid leder till högre intracellulära halter av polyaminer (Yatin *et al.* 2001). Polyaminer är en grupp polykatjoner som finns i alla eukaryota celler (Hynd *et al.* 2004). Polyaminer reglerar cellulär tillväxt, differentiering, genuttryck, proteinsyntes och, mest relevant i det här fallet, aktivitet av NMDA-receptorer (Hynd *et al.* 2004). En polyamin, spermidin, är en prekursor vid biosyntesen av en annan polyamin, spermin. Halten av spermidin i hjärnor från avlidna AD-patienter har visat sig vara upp till 70 % högre än normalt, medan halten av polyaminen putrescin var 28 % lägre än normalt (Morrison & Kish 1995). Spermidin och i synnerhet dess metabolit spermin, potentierar NMDA-receptorer, medan putrescin fungerar som en svag antagonist till dessa (de Vera *et al.* 2008). Kombinationen av högre halter av spermidin och spermin samt lägre halt av putrescin ger förhöjd potentiering och minskad antagonism av NMDA-receptorer, vilket leder till ökad risk för excitotoxicitet. β -amyloid kan även orsaka direkt inflöde av Ca^{2+} i neuroner genom att bilda katjonkanaler i cellmembranet (Arispe *et al.* 1993). Excitotoxiciteten vid AD beror också på minskat upptag av glutamat från synapsklyftan. I hjärnor från avlidna AD-patienter ses betydligt lägre nivåer av

glutamatupptagsproteiner än normalt (Masliah *et al.* 1996). Neurodegenereringen vid AD beror således till viss del på excitotoxicitet som orsakas av NMDA-receptoraktivering, störd Ca^+ -homeostas samt minskat upptag av glutamat från synapsklyftan.

Parkinsons sjukdom

Parkinsons sjukdom (PD, Parkinson's disease) är en av de vanligaste neurodegenerativa sjukdomarna och innebär en selektiv förlust av dopaminerga neuroner i substantia nigra (Przedborski 2005). Dessa neuroner har sina cellkroppar i substantia nigra och deras axoner bildar synapser i striatum. Dessa nervbanor utgör den så kallade nigrostriatala banan och dess aktivitet medierar initiering och avslutande av frivilliga rörelser via striatum (Przedborski 2005). Symtomen vid PD är skakningar, stelhet, svårighet att starta och avsluta rörelser samt svårighet att stå upprätt (Przedborski 2005). Förutom att dopaminerga neuroner dör ses vid PD så kallade "Lewikroppar" i kvarvarande neuroner i substantia nigra. Lewikroppar är runda utfällningar sammansatta av olika proteiner som α -synuklein, parkin, ubiquitin och neurofilament (Przedborski 2005). Man vet fortfarande inte exakt vad som orsakar PD, men celldöden i substantia nigra verkar bero på en kombination av mitokondriell dysfunktion, fria radikaler, apoptos, inflammation och även excitotoxicitet (Przedborski 2005). Denna kaskad av skadliga processer kan sättas igång av t ex muterat α -synuklein (Przedborski 2005). I PD-djurmodeller har nucleus subthalamicus, som ger glutamaterga signaler till substantia nigra, ökad signalfrekvens (Bergman *et al.* 1994). Blodplättar används ofta som en modell för att mäta glutamatupptag i hjärnan, då de använder liknande energikrävande glutamatupptagsmekanismer. Blodplättar från PD-patienter har ca 50 % mindre glutamatupptag (Ferrarese *et al.* 1999). Båda dessa resultat kan betyda förhöjda extracellulära glutamathalter, vilket kan leda till excitotoxicitet. Det excitotoxiska inslaget vid PD beror dock förmodligen på det energiunderskott oxidativ stress och mitokondriell dysfunktion leder till (Ferrarese *et al.* 1999). Energiunderskottet leder till depolarisering, varvid Mg^{2+} -blockeringen av NMDA-receptorer försvinner och ger ett förhöjt Ca^{2+} -inflöde i neuronerna i substantia nigra.

Huntingtons sjukdom

Huntingtons sjukdom (HD, Huntington's disease) är en dödlig neurodegenerativ sjukdom som karaktäriseras av psykiska, kognitiva och motoriska störningar (Borrell-Pagès *et al.* 2006). HD är ärftlig och nedärvs autosomt dominant (Sanchèz *et al.* 2008). Personer med HD drabbas av symtom vid 15-20 års ålder, och dessa inkluderar kraftiga ofrivilliga rörelser, demens, depression, aggressivitet, viktnedgång och kramper (Borell-Pagès *et al.* 2006, Sanchèz *et al.* 2008). Sjukdomen fortlöper och förvärras under ca 20 års tid, med tillkommande symtom som stelhet och oförmåga till rörelser, varefter den drabbade avlider (Borell-Pagès *et al.* 2006, Sanchèz *et al.* 2008). Vid HD sker en selektiv dysfunktion och celldöd i inhibitoriska neuroner i corpus striatum i de basala ganglierna, som kontrollerar initiering och avslutande av frivilliga rörelser (Sanchèz *et al.* 2008). HD orsakas av en mutation som ger en upprepning av minst 40 glutaminrester i proteinet huntingtin (Borell-Pagès *et al.* 2006, Sanchèz *et al.* 2008). Detta muterade huntingtin bildar aggregat och utfällningar i neuronerna. Dessa aggregat skadar dendritter och axoner, påverkar exo- och endocytos, orsakar mitokondriella skador, påverkar DNA-transkription och fastnar i proteasomer (Borell-Pagès *et al.* 2006, Sanchèz *et al.* 2008). Studier har också visat att excitotoxicitet spelar en viktig roll vid HD-patogenesen. Kinolinsyra är en tryptofanmetabolit och en naturlig agonist till NMDA-receptorer. Halten av kinolinsyra har visat sig vara tre till fyra gånger högre än normalt i striatum och cortex hos avlidna HD-patienter, vilket kan ha lett till excitotoxisk NMDA-receptoraktivering (Guidetti *et al.* 2004). Normalt huntingtin binder till PSD-95, och inhiberar därmed i viss utsträckning dess interaktion med NMDA-receptorer. Vid HD

kan inte det muterade huntingtinet binda till PSD-95, och orsakar därmed en sensitisering av NMDA-receptorerna och ökar graden av glutamatinducerad celldöd (Sun *et al.* 2001). Muterat huntingtin ackumuleras även i gliaceller och bidrar till excitotoxiciteten genom att minska gliacellernas upptag av glutamat från synapsklyftan (Shin *et al.* 2005). Detta orsakas av att gliacellerna får minskat uttryck av glutamattransportproteiner som t ex GLT-1 (Shin *et al.* 2005). Det excitotoxiska bidraget till celldöden vid HD beror således på sensitisering och aktivering av NMDA-receptorer kombinerat med minskat upptag av glutamat från synapsklyftan.

Multipel skleros

Multipel skleros (MS) är en autoimmun sjukdom som karaktäriseras av demyelinering, axonal dysfunktion och neurodegenerering i CNS (Compston & Coles 2002). MS uppkommer vanligen vid 20-40 års ålder (Compston & Coles 2002). Symtomen vid MS är muskelsvaghet, koordinationssvårigheter, trötthet, depression och förändrad känsl. Svår MS kan leda till blindhet och förlamning (Compston & Coles 2002). MS orsakas av att immunceller, mer specifikt mikroglia, angriper och förstör myelinskidor på axoner i CNS (Compston & Coles 2002). Myelinskidor är utskott från en typ av gliaceller som heter oligodendrocyter. Dessa utskott lindar sig i flera varv runt axoner på uppåt 40 närliggande neuroner (Compston & Coles 2002). De lipidrika myelinskidorna fungerar som isolatorer på axoner och gör att aktionspotentialer färdas längs axoner med förhöjd hastighet eftersom aktionspotentialen ”hoppas” mellan myelinskidorna (Compston & Coles 2002). När myelinskidorna förstörs vid MS färdas aktionspotentialerna längs axonerna med nedsatt hastighet. Demylinerade axoner kan även starta aktionspotentialer spontant (Compston & Coles 2002). När det isolerande myelinet förstörs kan elektriska signaler även överföras mellan axoner vilket ger störningar i den neuronala signaleringen (Compston & Coles 2002). Neuro- och myelindegenereringen vid MS beror troligtvis på oxidativ stress och excitotoxicitet orsakad av inflammatoriska processer som mikrogliaaktivering (Block & Hong 2005). MS-patienter har förhöjda halter av glutamat i cerebrospinalvätskan, vilket indikerar att excitotoxiska processer äger rum (Sarchielli *et al.* 2003). Oligodendrocyter uttrycker både Ca²⁺-permeabla AMPA- och kainatreceptorer och är exceptionellt känsliga för excitotoxicitet (Rosin *et al.* 2004). Aktivering av kainatreceptorer på oligodendrocyter leder även till att dessa blir mer känsliga för attack av komplementsystemet (Alberdi *et al.* 2006). Aktiverade mikroglia frisätter stora mängder glutamat till närliggande celler efter autokrin uppreglering av glutamins (Takeuchi *et al.* 2006). Oligodendrocyter står för det huvudsakliga upptaget av glutamat i vit substans. I områden av skadade axoner vid MS har studier visat att oligodendrocyter har mycket lågt uttryck av glutamattransportproteinet GLT-1, samt saknar enzymerna glutamatdehydrogenas och glutaminsyntetas (Werner *et al.* 2001). Detta leder till förhöjd extracellulär glutamatkoncentration och indikerar att störd glutamathomeostas med efterföljande excitotoxicitet kan spela en viktig roll vid den axonala och oligodendrocytiska patologin vid MS.

Amyotrofisk lateralskleros

Amyotrofisk lateralskleros (ALS) är en dödlig neurodegenerativ sjukdom som karaktäriseras av progressiv förlust av motorneuroner i motorcortex, hjärnstam och ryggmärg (van Damme *et al.* 2005). ALS drabbar vanligtvis medelålders människor och leder till döden efter ca 2-5 år. Symtomen vid ALS är progressiv motorisk nedsättning, muskelförtvining och slutligen förlamning (van Damme *et al.* 2005). Den direkta dödsorsaken är oftast förlamning av andningsmuskulaturen. Man känner ännu inte helt säkert till orsakerna bakom ALS. Några mekanismer som föreslagits är oxidativ stress, proteinutfällningar, mitokondriell dysfunktion men framförallt excitotoxicitet. Gliaceller i motorcortex och ryggmärg hos ALS-patienter har

visat sig ha betydligt lägre nivåer av EAAT2 jämfört med normala gliaceller (Rothstein *et al.* 1995, Fray *et al.* 1998). Detta leder till förhöjd glutamatkoncentration i synapsklyftan vilket i sig kan leda till excitotoxicitet. Dessutom har motorneuroner visat sig vara exceptionellt känsliga för excitotoxicitet. Detta beror för det första på att motorneuroner har AMPA-receptorer som till största delen saknar GluR2-subenheten (van Damme *et al.* 2002). Detta ger AMPA-receptorerna hög permeabilitet för Ca^{2+} , vilket gör att Ca^{2+} -inflödet vid glutamatexponering blir ovanligt högt (van Damme *et al.* 2002). För det andra har motorneuroner mycket låga halter av de Ca^{2+} -bindande proteinerna parvalbumin och calbindin D-28k, vilket ger motorneuroner en mycket lägre buffertkapacitet för glutamatinducerat inflöde av Ca^{2+} (Alexianu *et al.* 1994). Celldöden hos motorneuroner i ALS beror således på kraftigt nedsatt upptag av glutamat från synapser kombinerat med hög känslighet för excitotoxicitet hos motorneuroner.

Behandling och undvikande av excitotoxicitet

Behandling av excitotoxicitet har hittills visat sig vara svår. Då huvuddelen av de excitotoxiska mekanismerna förmedlas via aktivering av NMDA-receptorer har huvuddelen av forskningen riktat in sig på att behandla excitotoxicitet med NMDA-receptorantagonister. Denna typ av läkemedel har visat stor potential i djurstudier, men de flesta studier har avslutats vid kliniska försök på grund av låg effektivitet och svåra neurologiska och kognitiva biverkningar (Morris *et al.* 1999, Davis *et al.* 2000, Albers *et al.* 2001). NMDA-receptorantagonister har också visat sig inducera omfattande neuronal apoptos hos nyfödda möss (Ikonomidou *et al.* 1999). Problemet med att använda läkemedel som minskar glutamatsignalering är just att denna signalering är så fundamentalt viktig för normal CNS-funktion och neuronal överlevnad. En NMDA-antagonist som däremot har visat sig ha både hög effektivitet och få biverkningar är memantin, som används vid behandling av AD. Memantin är en icke-kompetitiv antagonist till NMDA-receptorer som är spänningsberoende och till största utsträckning blockerar NMDA-receptorer vid excitotoxisk aktivering (Chen & Lipton 1997, 2005). Behandling med memantin har visat sig hjälpa mot de kognitiva, psykologiska och motoriska nedsättningarna vid AD (Reisberg *et al.* 2006).

Då excitotoxicitet förekommer vid flera neurodegenerativa sjukdomar på grund av nedsatt glutamatupptag har även försök att öka uttrycket av glutamattransportproteiner genomförts. En ALS-modell hos möss med ett högt uttryck av humant EAAT2-glutamatupptagsprotein har visat på minskade och fördröjda ALS-symtom jämfört med kontrollen (Guo *et al.* 2003).

En ny infallsvinkel vid behandling av excitotoxicitet är att inte angripa själva NMDA-receptorn, utan att istället angripa kopplingen mellan aktivering av denna och excitotoxiska signalvägar. Peptiden Tat-NR2B9c har visats bryta kopplingen mellan NMDA-receptorer och PSD-95, och på så sätt stoppa excitotoxicitet orsakad av NO-produktion eftersom nNOS är bundet till PSD-95 (Aarts *et al.* 2002.) Behandling av odlade neuroner med Tat-NR2B9c minskade NMDA-receptorförmedlad excitotoxicitet utan att påverka NMDA-receptorsignalering samt minskade stroke-relaterad hjärnskada hos råttor (Aarts *et al.* 2002).

Diskussion

Excitotoxicitet innebär att neuroner skadas och dör till följd av ett för stort inflöde av Ca^{2+} till följd av överaktivering av glutamatreceptorer. Detta Ca^{2+} -inflöde leder till aktivering av proteaser och nukleaser, mitokondriell dysfunktion samt produktion av reaktiva syre- och kväveföreningar. Detta leder till skador på makromolekyler, energiunderskott och depolarisering vilket leder till att neuroner dör via nekros eller apoptos.

Excitotoxicitet har visat sig vara en viktig mekanism vid sekundär neurodegenerering vid de vanligaste patologiska tillstånden i CNS. Att excitotoxicitet förekommer så ofta beror på att de system genom vilka det uppkommer finns överallt i CNS. Glutamat, dess frisläppning och upptag, dess receptorer och de intracellulära signaltransduktionsvägar genom vilka det signalerar, utgör det vanligaste signaleringssystemet mellan neuroner i CNS. Att för kraftig aktivering av detta signalsystem leder till omfattande neuronal celldöd är ett tydligt exempel på känsligheten och vikten av balans i nervsystemet. Då neurodegenerering är en så vanlig och irreversibel skada och att denna så ofta orsakas av excitotoxiska mekanismer är det av största vikt att utreda dessa mekanismer och hur de kan förhindras. Svårigheten att angripa det excitotoxiska problemet är intimt sammankopplad med den absoluta nödvändigheten av glutamatförmedlad signalering för normal funktion av CNS.

Att behandla excitotoxicitet genom att minska glutamatsignalering har försökts med NMDA-receptorantagonister. Detta har visat sig svårt i och med att svåra biverkningar uppkommer när den normala excitatoriska signaleringen i hjärnan inhiberas. Då minskat glutamatupptag har visat sig vara en betydande faktor vid förhöjd extracellulär glutamatkoncentration vid flera olika patologier i hjärnan har försök gjorts av till exempel Gou *et al.* (2003) med att öka uttrycket av proteiner som tar upp glutamat. Detta är en bra infallsvinkel, men då det har visat sig att glutamattransportproteiner kan få omvänd funktion vid excitotoxicitet och istället frisläppa glutamat finns risken att ett ökat uttryck av glutamattransportproteiner leder till ännu mer glutamatfrisläppning. Den infallsvinkel vid behandling av excitotoxicitet som använts av Aarts *et al.* (2002), som har inhiberat en intracellulär excitotoxisk signaleringsväg utan att påverka normal excitatorisk signalering, är ett angreppssätt som framtida studier borde använda sig av. Detta har inte prövats i kliniska studier än, men förhoppningsvis kommer det att visa lika goda resultat som djurstudien.

För att kunna förebygga excitotoxicitet utan att inhibera normal excitatorisk signalering genom att angripa specifika signaltransduktionsvägar krävs det ökad kunskap om dessa. Exempelvis bör glutamatreceptorers koppling till PSD-proteiner studeras djupare. Störst möjlighet för att förhindra och behandla excitotoxicitet torde finnas vid de neurodegenerativa sjukdomarna. Detta eftersom neurodegenereringen hos dessa är mycket långsammare än vid mer akuta neurodegenerativa tillstånd som stroke, trauma och epilepsi.

Tack

Jag vill tacka Karin Carlson, Daniel Ocampo-Daza, Richard Havam, David Lagman, Anna Lundin och Ida Netzel.

Referenser

- Aarts, M. M., Arundine, M. & Tymianski, M. 2003. Novel concepts in excitotoxic neurodegeneration after stroke. *Expert reviews in molecular medicine* 5: 1-22
- Aarts, M., Liu, Y., Liu, L., Besshoh, S., Arundine, M., Gurd, J. W., Wang, Y. T., Salter, M. W. & Tymianski, M. 2002. Treatment of ischemic brain damage by perturbing NMDA receptor- PSD-95 protein interactions. *Science* 298: 846-850
- Abu-Soud, H. M., Yoho, L. L. & Stuehr, D. J. 1994. Calmodulin controls neuronal nitric oxide synthase by a dual mechanism: activation of intra- and interdomain electron transfer. *The journal of biological chemistry* 269: 32047- 32050
- Alberdi, E., Sánchez-Gómez, M. V., Torre, I., Domercq, M., Pérez-Samartín, A., Pérez-Cerdá, F. & Matute, C. 2006. Activation of kainite receptors sensitizes oligodendrocytes to complement attack. *The journal of neuroscience* 26: 3220-3228
- Albers, G. W., Goldstein, L. B., Hall, D. & Lesko, L. M. 2001. Aptiganel hydrochloride in acute ischemic stroke: a randomized controlled trial. *JAMA* 286: 2673-2682
- Alexianu, M. E., Ho, B. K., Mohamed, A. H., La Bella, V., Smith, R. G. & Appel, S. H. 1994. The role of calcium binding proteins in selective motorneuron vulnerability in amyotrophic lateral sclerosis. *Annals of neurology* 36: 846-858
- Alvarez, B., Ferrer-Sueta, B., Freeman, B. A. & Radi, R. 1999. Kinetics of peroxynitrite reaction with amino acids and human serum albumin. *The journal of chemistry* 274: 842-848
- Ankarcrona, M., Dypbukt, J. M., Bonfoco, E., Zhivotovsky, B., Orrenius, S., Lipton, S. A. & Nicotera, P. 1995. Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron* 15: 961-973
- Arispe, N., Rojas, E. & Pollard, H. B. 1993. Alzheimer disease amyloid protein forms calcium channels in bilayer membranes: blockade by tromethamine and aluminum. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90: 567-571
- Arundine, M. & Tymianski, M. 2003. Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity. *Cell calcium* 34: 325-337
- Atlante, A., Calissano, P., Bobba, A., Giannattasio, S., Marra, E & Passarella, S. 2001. Glutamate neurotoxicity, oxidative stress and mitochondria. *FEBS letters* 497: 1-5
- Beneviste, H., Drejer, J., Schousboe, A. & Deimer, N. H. 1984. Elevations of the extracellular concentrations of glutamate and aspartate in rat hippocampus during transient cerebral ischemia monitored by intracerebral microdialysis. *Journal of cerebral blood flow and metabolism* 13: 575-585
- Bergman, H., Wichmann, T., Karmon, B. & DeLong, M. R. 1994. The primate subthalamic nucleus II: neuronal activity in the MPTP model of parkinsonism. *Journal of neurophysiology* 72: 507-520
- Block, M. L. & Hong, J. S. 2005. Microglia and inflammation-mediated neurodegeneration: multiple triggers with a common mechanism. *Progress in neurobiology* 76: 77-98
- Borrell-Pagès, M., Zala, D., Humbert, S. & Saudou, F. 2006. Huntington's disease: from huntingtin function and dysfunction to therapeutic strategies. *Cellular and molecular life sciences* 63: 2642-2660
- Bullock, R., Zauner, A., Woodward, J., Myseros, J., Choi, S. C., Ward, J. D., Marmamrou, A. & Young, H. F. 1998. Factors affecting excitatory amino acid release following severe human head injury. *Journal of neurosurgery* 89: 507-518
- Bullock, R., Zauner, A., Woodward, J. & Young, H. F. 1995. Massive persistent release of excitatory amino acids following human occlusive stroke. *Stroke* 26: 2187-2189
- Chen, H. S. & Lipton, S. A. 1997. Mechanism of memantine block of NMDA-activated channels in rat retinal ganglion cells: uncompetitive antagonism. *The journal of physiology*

499: 27-46

- Chen, H. S. & Lipton, S. A. 2005. Pharmacological implications of two distinct mechanisms of interaction of memantine with N-methyl-D-aspartate-gated channels. *The journal of pharmacology and experimental therapeutics* 314: 961-071
- Compston, A. & Coles, A. 2002. Multiple sclerosis. *Lancet* 359: 1221-1231
- Czyz, A., Baranauskas, G. & Kiedrowski, L. 2002. Instrumental role of Na⁺ in NMDA excitotoxicity in glucose-deprived and depolarised cerebellar granule cells. *Journal of neurochemistry* 81: 379-389
- Danbolt, N. C. 2001. Glutamate uptake. *Progress in neurobiology* 65: 1-105
- Davis, S. M., Lees, K. R., Albers, G. W. Diener, H. C., Markabi, S., Karlsson, G. & Norris, J. 2000. Selfotel in acute ischemic stroke: possible neurotoxic effects of an NMDA antagonist. *Stroke* 31: 347-354
- Dawson, L. A., Djali, S., Gonzales, C., Vinegra, M. A. & Zaleska, M. M. 2000. Characterization of transient focal ischemia-induced increases in extracellular glutamate and aspartate in spontaneously hypertensive rats. *Brain research bulletin* 53: 767-776
- Dawson, V. L., Dawson, T. M., London, E. D., Bredt, D. S. & Snyder, S. H. 1991. Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America* 88: 6368-6371
- DeLorenzo, R. J., Sun, D. A. & Deshpande, L. S. 2005. Cellular mechanisms underlying acquired epilepsy: the calcium hypothesis of induction and maintenance of epilepsy. *Pharmacology & therapeutics* 105: 229-266
- de Vera, N., Martínez, E. & Sanfeliu, C. 2008. Spermine induces cell death in cultured human cerebral cortical neurons through N-methyl-D-aspartate receptor activation. *Journal of neuroscience research* 86: 861-872
- During, M. J. & Spencer, D. D. 1993. Extracellular hippocampal glutamate and spontaneous seizure in the conscious human brain. *The lancet* 341: 1607-1610
- Dykens, J. A. 1994. Isolated cerebral and cerebellar mitochondria produce free radicals when exposed to elevated Ca²⁺ and Na⁺: implications for neurodegeneration. *Journal of neurochemistry* 63: 584-591
- Ebert, U., Brandt, C. & Löscher, W. 2002. Delayed sclerosis, neuroprotection, and limbic epileptogenesis after status epilepticus in the rat. *Epilepsia* 43: 86-95
- Endres, M., Wang, Z. Q., Namura, S., Waeber, C. & Moskowitz, M. A. 1997. Ischemic brain injury is mediated by the activation of poly(ADP-ribose) polymerase. *Journal of cerebral blood flow and metabolism* 17: 1143-1151
- Faden, A. I., Demediuk, P., Panter, S. S. & Vink, R. 1989. The role of excitatory amino acids and NMDA receptors in traumatic brain injury. *Science* 244: 798-800
- Fariello, R. G., Golden, G. T., Smith, G. G. & Reyes, P. F. 1989. Potentiation of kainic acid epileptogenicity and sparing from neuronal damage by an NMDA receptor antagonist. *Epilepsy research* 3: 206-213
- Ferrarese, C., Zoia, C., Pecora, N., Piolti, R., Frigo, M., Bianchi, G., Sala, G., Begni, B., Riva, R. & Frattola, L. 1999. Reduced platelet glutamate uptake in Parkinson's disease. *Journal of neural transmission* 106: 685-692
- Fonnum, F. & Hassel, B. 1995. Glutamate synthesis, metabolism and uptake. I: CNS neurotransmitters and neuromodulators: glutamate, sid. 19-35. CRC Press.
- Fray, A. E., Ince, P. G., Banner, S. J., Milton, I. D., Usher, P. A., Cookson, M. R. & Shaw, P. J. 1998. The expression of the glial glutamate transporter protein EAA2 in motor neuron disease: an immunohistochemical study. *The European journal of neuroscience* 10: 2481-2489
- Fukamachi, S., Furuta, A., Ikeda, T., Ikenoue, T., Kaneoka, T., Rothstein, J. D. & Iwaki, T. 2001. Altered expressions of glutamate transporter subtypes in rat model of neonatal

- cerebral hypoxia-ischemia. *Brain research. Developmental brain research* 132: 131-139
- Gemba, T., Oshima, T. & Ninomiya, M. 1994. Glutamate efflux via the reversal of the sodium-dependent glutamate transporter caused by glycolytic inhibition in rat cultured astrocytes. *Neuroscience* 63: 789-795
- Guidetti, P., Luthi-Carter, R. E., Augood, S. J. & Schwarcz, R. 2004. Neostriatal and cortical quinolinate levels are increased in early grade Huntington's disease. *Neurobiology of disease* 17: 455-461
- Gunter, T. E. & Pfeiffer, D. R. 1990. Mechanisms by which mitochondria transport calcium. *The american journal of physiology* 258: 755-786
- Guo, H., Lai, L., Butchbach, M. E., Stockinger, M. P., Shan, X., Bishop, G. A. & Lin, C. L. 2003. Increased expression of the glial glutamate transporter EAAT2 modulates excitotoxicity and delays the onset but not the outcome of ALS in mice. *Human molecular genetics* 12: 2519-2532
- Hara, Y., Wakamori, M., Ishii, M., Maeno, E., Nishida, M., Yoshida, T., Yamada, H., Shimizu, S., Mori, E., Kudoh, J., Shimizu, N., Kurose, H., Okada, Y., Imoto, K. & Mori, Y. 2002. LTRPC2 Ca^{2+} -permeable channel activated by changes in redox status confers susceptibility to cell death. *Molecular cell* 9: 163-173
- Hertz, L., Dringen, R., Schousboe, A. & Robinson, S. R. 1999. Astrocytes: glutamate producers for neurons. *Journal of neuroscience research* 57: 417-428
- Hynd, M. R., Scott, H. L. & Dodd, P. R. 2004. Glutamate-mediated excitotoxicity and neurodegeneration in Alzheimers disease. *Neurochemistry international* 45: 583-595
- Ikonomidou, C., Bosch, F., Miksa, M., Bittagau, P., Vöckler, J., Dikranian, K., Tenkova, T. I., Stefovskaja, V., Turski, L. & Olney, J. W. 1999. Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Science* 283: 70-74
- Katayama, Y., Becker, D. P., Tamura, T. & Hovda, D. A. 1990. Massive increases in extracellular potassium and the indiscriminate release of glutamate following concussive brain injury. *Journal of neurosurgery* 73: 889-900
- Kim, D. K., Rordorf, G., Nemenoff, R. A., Koroshetz, W. J. & Bonventre, J. V. 1995. Glutamate stably enhances the activity of two cytosolic forms of phospholipase A_2 in brain cortical cultures. *The biochemical journal* 15: 83-90
- Koizumi, H., Fujizawa, H., Ito, H., Maekawa, T., Di, X. & Bullock, R. 1997. Effects of mild hypothermia on cerebral blood flow-independent changes in cortical extracellular levels of amino acids following contusion trauma in the rat. *Brain research* 747: 304-312
- Koppenol, W. H., Moreno, J. J., Pryor, W. A., Ischiropoulos, H. & Beckman, J. S. 1992. Peroxynitrite, a cloaked oxidant formed by nitric oxide and superoxide. *Chemical research in toxicology* 5: 834-842
- Kukreja, R. C., Kontos, H. A., Hess, M. L. & Ellis, E. F. 1986. PGH synthase and lipoxygenase generate superoxide in the presence of NADH and NADPH. *Circulation research* 59: 612-619
- Lason, W., Simpson, J. N. & McGinty, J. F. 1988. Effects of D-(-)-aminophosphonovalerate on behavioral and histological changes induced by kainic acid. *Neuroscience letters* 87: 23-28
- Larm, J. A., Cheung, N. S. & Beart, P. M. 1997. Apoptosis induced via AMPA-selective glutamate receptors in cultured murine cortical neurons. *Journal of neurochemistry* 69: 617-622
- Lazarino, G., Vagnozzi, R., Tavazzi, B., Pastore, F. S., Di Pierro, D., Siragusa, P., Belli, A., Giuffrè, R. & Giardina, B. 1992. MDA, oxypurines and nucleosides relate to reperfusion in short-term incomplete cerebral ischemia in the rat. *Free radical biology and medicine* 13: 489-498
- Leerma, J. 2006. Kainate receptor physiology. *Current opinion in pharmacology* 6: 89-97
- Levy, L. M., Warr, O. & Atwell, D. 1998. Stoichiometry of the glial glutamate transporter

- GLT-1 expressed inducibly in a Chinese hamster ovary cell line selected for low endogenous Na⁺-dependent glutamate uptake. *The journal of neuroscience* 19: 9620-9628
- Liu, Z., Stafstrom, C. E., Sarkisian, M. R., Yang, Y., Hori, A., Tandon, P. & Holmes, G. L. 1997. Seizure-induced glutamate release in mature and immature animals: an in vivo microdialysis study. *Neuroreport* 8: 2019-2023
- Luetjens, C. M., Bui, N. T., Sengpiel, B., Münstermann, G., Poppe, M., Krohn, A. J., Bauerbach, E., Krieglstein, J. & Prehn, J. H. 2000. Delayed mitochondrial dysfunction in excitotoxic neuron death: cytochrome c release and a secondary increase in superoxide production. *The journal of neuroscience* 20: 5715-5723
- Martin, L. J., Al-Abdulla, N. A., Brambrink, A. M., Kirsch, J. R., Sieber, F. E. & Portera-Cailliau, C. 1998. Neurodegeneration in excitotoxicity, global cerebral ischemia, and target deprivation: a perspective on the contributions of apoptosis and necrosis. *Brain research bulletin* 46: 281-309
- Masliah, E., Alford, M., DeTeresa, R., Mallory, M. & Hansen, L. 1996. Deficient glutamate transport is associated with neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Annals of neurology* 40: 759-766
- Mattson, M. P., Cheng, B., Davis, D., Bryant, K., Lieberburg, I. & Rydel, R. E. 1992. β -amyloid peptides destabilize calcium homeostasis and render human cortical neurons vulnerable to excitotoxicity. *The journal of neuroscience* 12: 376-389
- Meldrum, B. S. & Brierley, J. B. 1973. Prolonged epileptic seizures in primates. Ischemic cell change and its relation to ictal physiological events. *Archives of neurology* 28:
- Miller, R. J. 1998. Mitochondria-the kraken wakes! *Trends in neuroscience* 21: 95-97
- Morris, G. F., Bullock, R., Marshall, S. B., Marmarou, A., Maas, A. & Marshall, L. F. 1999. Failure of the competitive N-methyl-D-aspartate antagonist Selfotel (CGS 19755) in the treatment of severe head injury: results of two phase III clinical trials. The Selfotel Investigators. *Journal of neurosurgery* 91: 737-743
- Morrison, L. D. & Kish, S. J. 1995. Brain polyamine levels are altered in Alzheimer's disease. *Neuroscience letters* 197: 5-8
- Nave, J. M. & Connor, J. D. 1993. Influence of ZnCl₂ pretreatment on behavioral and histological responses to kainic acid in rats. *Brain research* 604: 298-303
- Nevander, G., Ingvar, M., Auer, R. & Siesjö, B. K. 1985. Status epilepticus in well-oxygenated rats causes neuronal necrosis. *Annals of neurology* 18: 281-290
- Olney, J. W. 1969. Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science* 164: 719-721
- Ozawa, S., Kamiya, H. & Tsuzuki, K. 1998. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Progress in neurobiology* 54: 581-618
- Przedborski, S. 2005. Pathogenesis of nigral cell death in Parkinson's disease. *Parkinsonism & related disorders* 11: S3-S7
- Purves, D., Augustine, J. G., Fitzpatrick, D., Hall, W. C., LaMantia, A., McNamara, J. O., Mooney, R. D., Platt, M. L., Simon, S. A., White, L. E. & Williams, S. M. 2008. Neurotransmitters and their receptors. I: Neuroscience, sid. 119-152. Sinauer Associates, Inc.
- Radi, R., Beckman, J. S., Bush, K. M. & Freeman, B. A. 1991. Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Archives of biochemistry and biophysics* 288: 481-487
- Rao, V. L., Bowen, K. K. & Dempsey, R. J. 2001. Transient focal cerebral ischemia down-regulates glutamate transporters GLT1 and EAAC1 expression in rat brain. *Neurochemical research* 26: 497-502
- Reisberg, B., Doody, R., Stöffler, A., Schmitt, F., Ferris, S. & Möbius, H. J. 2006. A 24-week open-label extension study of memantine in moderate to severe Alzheimer disease.

- Archives of neurology 63: 49-54
- Rodriguez, J. & Lazebnik, Y. 1999. Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme. *Genes & development* 13: 3179-3184
- Rosin, C., Bates, T. E. & Skaper, S. D. 2004. Excitatory amino acid induced oligodendrocyte cell death in vitro: receptor-dependent and -independent mechanisms. *Journal of neurochemistry* 90: 1173-1185
- Rossi, D. J., Oshima, T. & Attwell, D. 2000. Glutamate release in severe brain ischaemia is mainly by reversed uptake. *Nature* 403: 316-321
- Rothman, S. M. 1983 Synaptic activity mediates death of hypoxic neurons. *Science* 220: 536-537
- Rothstein, J. D., Van Kammen, M., Levey, A., Martin, L. J. & Kuncl, R. W. 1995. Selective loss of glial glutamate transporter GLT-1 in amyotrophic lateral sclerosis. *Annals of neurology* 38: 73-84
- Sanchèz, A. M. E., Mejia-Toiber, J. & Massieu, L. 2008. Excitotoxic neuronal death and the pathogenesis of Huntington's disease. *Archives of medical research* 39: 265-276
- Sarchielli, P., Greco, L., Floridi, A., Floridi, A. & Gallai, V. 2003. Excitatory amino acids and multiple sclerosis: evidence from cerebrospinal fluid. *Archives of neurology* 60: 1082-1088
- Sattler, R. & Tymianski, M. 2000. Molecular mechanisms of calcium-dependent excitotoxicity. *Journal of molecular medicine* 78: 3-13
- Sengpiel, B., Preis, E., Kriegelstein, J. & Prehn, J. H. 1998. NMDA-induced superoxide production and neurotoxicity in cultured rat hippocampal neurons: the role of mitochondria. *The european journal of neuroscience* 10: 1903-1910
- Seubert, P., Lee, K. & Lynch, G. 1989. Ischemia triggers NMDA receptor-linked cytoskeletal proteolysis in hippocampus. *Brain research* 492: 366-370
- Schinder, A. F., Olson, E. C., Spitzer, E. C. & Montal, M. 1996. Mitochondrial dysfunction is a primary event in glutamate neurotoxicity. *The journal of neuroscience* 16: 6125-6133
- Sheng, M. & Pak, T. S. 2000. Ligand-gated ion channel interactions with cytoskeletal and signaling proteins. *Annual review of physiology* 62: 755-778
- Sherwin, A., Robitaille, Y., Quesney, F., Olivier, A., Villemure, J., Leblanc, R., Feindel, W., Andermann, E., Gotman, J., Andermann, F., Ethier, R. & Kish, S. 1998. Excitatory amino acids are elevated in human epileptic cerebral cortex. *Neurology* 38: 920-923
- Shin, J. Y., Fang, Z. H., Yu, Z. X., Wang, C. E., Li, S. H. & Li X. J. 2005. Expression of mutant huntingtin in glial cells contributes to neuronal excitotoxicity. *The journal of cell biology* 171: 1001-1012
- Simon, R. P., Swan, J. H., Griffiths, T. & Meldrum, B. S. 1984. Blockade of N-methyl-D-aspartate receptors may protect against ischemic damage in the brain. *Science* 226: 850-852
- Suh, Y. H. & Checler, F. 2002. Amyloid precursor proteins, presenelins, and alpha-synuclein: molecular pathogenesis and pharmacological applications in Alzheimer's disease. *Pharmacological reviews* 58: 469-525
- Sun, Y., Savanenin, A., Reddy, P. H. & Liu, Y. F. 2001. Polyglutamine-expanded huntingtin promotes sensitization of N-methyl-D-aspartate receptors via post-synaptic density 95. *The journal of biological chemistry* 276: 24713-24718
- Sussman, M. S. & Bulkley, G. B. 1990. Oxygen-derived free radicals in reperfusion injury. *Methods in enzymology* 186: 711-723
- Takeuchi, H., Jin, S., Wang, J., Zhang, G., Kawanokuchi, J., Kuno, R., Sonobe, Y., Mizuno, T. & Suzamura, A. 2006. Tumor necrosis factor-alpha induces neurotoxicity via glutamate release from hemichannels of activated microglia in an autocrine manner. *The journal of biological chemistry* 281: 21362-21368

- Tominaga, T., Kure, S., Narisawa, K. & Yoshimoto, T. 1993. Endonuclease activation following focal ischemic injury in the rat brain. *Brain research* 608: 21-26
- Trotti, D., Rossi, D., Gjesdal, O., Levy, L. M., Racagni, G., Danbolt, N. C. & Volterra, A. 1996. Peroxynitrite inhibits glutamate transporter subtypes. *The journal of biological chemistry* 271: 5976-5979
- Tymianski, M. & Tator, C. M. 1996. Normal and abnormal calcium homeostasis in neurons: a basis for the pathophysiology of traumatic and ischemic central nervous system injury. *Neurosurgery* 38: 1176-1195
- van Damme, P., Dewil, M., Robberecht, W. & Van Den Bosch, L. 2005. Excitotoxicity and amyotrophic lateral sclerosis. *Neurodegenerative diseases* 2: 147-159
- van Damme, P., Van Den Bosch, L., Van Houtte, E., Callevaert, G. & Robberecht, W. 2002. GluR2-dependent properties of AMPA receptors determine the selective of motor neurons to excitotoxicity. *Journal of neurophysiology* 88: 1279-1282
- Volterra, A., Trotti, D., Tromba, C., Floridi, S. & Racagni, G. 1994. Glutamate uptake inhibition by oxygen free radicals in rat cortical astrocytes. *The journal of neuroscience* 14: 2924-2932
- Wehage, E., Eisfeld, J., Heiner, I., Jüngling, E., Zitt, C. & Lückhoff, A. 2002. Activation of the cation channel long transient receptor potential channel 2 (LTRPC2) by hydrogen peroxide. A splice variant reveals a mode of activation independent of ADP-ribose. *The journal of biological chemistry* 277: 23150-23156
- Werner, P., Pitt, D. & Raine, C. S. 2001. Multiple sclerosis: Altered glutamate homeostasis in lesions correlates with oligodendrocyte and axonal damage. *Annals of neurology* 50: 169-180
- White, R. J. & Reynolds, I. J. 1996. Mitochondrial depolarization in glutamate-stimulated neurons: an early signal specific to excitotoxin exposure. *The journal of neuroscience* 16: 5688-5697
- Yamashima, T., Kohda, Y., Tsuchiya, K., Ueno, T., Yamashita, J., Yoshioka, T. & Kominami, E. 1998. Inhibition of ischaemic hippocampal neuronal death in primates with cathepsin B inhibitor CA-074: a novel strategy for neuroprotection based on 'calpain-cathepsin hypothesis'. *The European journal of neuroscience* 10: 1723-1733
- Yatin, S. M., Yatin, M., Varadarajan, S., Ain, K. B. & Butterfield, D. A. 2001. Role of spermine in amyloid β -peptide-associated free radical-induced neurotoxicity. *Journal of neuroscience research* 63: 395-401
- Yeh, T. H., Hwang, H. M., Chen, J. J., Wu, T., Li, A. H. & Wang, H. L. 2005. Glutamate transporter function of rat hippocampal astrocytes is impaired following the global ischemia. *Neurobiology of disease* 18: 476-483
- Yi, J. H. & Hazell, A. S. 2006. Excitotoxic mechanisms and the role of astrocytic glutamate transporters in traumatic brain injury. *Neurochemistry international* 48: 394-403
- Yu, H., Venkatarangan, L., Wishnok, J. S. & Tannenbaum, S. R. 2005. Quantitation of four guanine oxidation products from reaction of DNA with varying doses of peroxynitrite. *Chemical research in toxicology* 18: 1849-1857
- Zhang, J., Dawson, V. L., Dawson, T. M. & Snyder, S. H. 1994. Nitric oxide activation of poly(ADP-ribose) synthetase in neurotoxicity. *Science* 263: 687-689
- Zou, H., Li, Y., Liu, X. & Wang, X. 1999. An APAF-1-cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *The journal of biological chemistry* 274: 11549-11556