

Mechanismen und Konsequenzen astrozytärer Natrium-Signalgebung in verschiedenen Hirnarealen der Maus

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Daniel Ziemens
aus Krefeld

Düsseldorf, September 2018

aus dem Institut für Neurobiologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gutachter:

Prof. Dr. rer. nat. Christine R. Rose, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Prof. Dr. rer. nat. Thomas Klein, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Tag der mündlichen Prüfung: 23.11.2018

„Den Wissenschaftlern geht es wie den Chaoten. Es ist
alles da, man muss es nur suchen.“

Franz Kern

Zusammenfassung

Glutamat ist der wichtigste erregende Neurotransmitter im Gehirn. Bei neuronaler Aktivität wird Glutamat an präsynaptischen Endigungen in den synaptischen Spalt freigesetzt und vermittelt durch Bindung an ionotrope Glutamatrezeptoren (iGluR) an der Postsynapse unter anderem Na^+ -Einstrom. Benachbarte Astrozyten bilden feine Ausläufer, welche an neuronalen Synapsen positioniert sind. Dort detektieren und modulieren sie die synaptische Transmission über die Na^+ -vermittelte Wiederaufnahme von Glutamat über hochaffine Glutamat-Transporter. Als Konsequenz generieren Astrozyten ebenfalls Na^+ -Signale. In vielen Hirnregionen konnte gezeigt werden, dass die Na^+ -vermittelte Glutamataufnahme die Hauptursache für transiente Na^+ -Änderungen in Astrozyten darstellt. Neuere Studien weisen allerdings auf eine regionspezifische Expression von zusätzlichen iGluR auch an Astrozyten hin, welche einen zusätzlichen, bisher unbeschriebenen Na^+ -Signalweg vermitteln könnten.

Um dies zu untersuchen, wurden quantitative Fluoreszenzmessungen am Weitfeld- sowie Zwei-Photonen-Mikroskop an Gewebeschnitten des visuellen Kortex (wo Hinweise auf eine funktionelle Expression von iGluR an Astrozyten vorliegen) und dem Hippocampus (wo Hinweise für iGluR an Astrozyten fehlen) durchgeführt. Aktivitäts-induzierte Na^+ -Signale in Astrozyten wurden hinsichtlich ihrer Entstehungsmechanismen charakterisiert und regional verglichen.

Stimulierte Na^+ -Transienten waren in kortikalen Astrozyten etwa doppelt so groß wie in hippocampalen. Das pharmakologische Profil offenbart, dass astrozytäre Na^+ -Signale im Kortex bei Inhibition des iGluR: N-Methyl-D-Aspartat (NMDAR) um etwa 50% reduziert waren, während hippocampale Na^+ -Signale nicht beeinflusst wurden. Direkte Aktivierung der NMDAR, durch Applikation von NMDA, führte zu deutlichen Na^+ -Signalen in kortikalen, aber nicht in hippocampalen Astrozyten. NMDAR kortikaler Astrozyten sind vorwiegend an distalen Ausläufern exprimiert und vermitteln bei Aktivierung globale Na^+ -, jedoch lokale Ca^{2+} -Signale. Die Ca^{2+} -Signale wurden durch Ca^{2+} -Einstrom über den Na^+ - Ca^{2+} -Austauscher (NCX) verlängert. Mathematische Berechnungen, gestützt auf experimentelle Daten der Studie, zeigen, dass NMDAR-vermittelter Na^+ -Einstrom die Transportrichtung des NCX beeinflusst, sodass dieser zur lokalen Ca^{2+} -Signalgebung an Ausläufern beiträgt.

Die Ergebnisse zeigen eine deutlich heterogene Na^+ -Signalgebung in kortikalen gegenüber hippocampalen Astrozyten: **1.** In kortikalen Astrozyten sind Na^+ -Signale bei glutamaterger Aktivität größer als im Hippocampus. **2.** In kortikalen Astrozyten werden Na^+ -Signale neben dem Glutamat-Transport zusätzlich über NMDAR vermittelt und **3.** NMDAR-vermittelte Na^+ -Signale beeinflussen die lokale astrozytäre Ca^{2+} -Signalgebung über den NCX.

Abstract

Glutamate is the main excitatory neurotransmitter in the brain. Upon neuronal activity glutamate is released from presynaptic terminals and mediates postsynaptic Na^+ -influx via binding on ionotropic glutamate receptors (iGluR). Astrocytic processes enwrap neuronal synapses, take up glutamate locally via high-affinity glutamate transporters (GluT), and thereby modulate synaptic transmission. Glutamate transport is fuelled by the cotransport of three sodium ions and thus produces astrocytic Na^+ -transients. In different brain regions, it was shown that Na^+ -dependent GluT represent the predominant mechanism for generation of astrocyte Na^+ -signaling. However, astrocytes show considerable functional and molecular heterogeneity. This includes astrocytic iGluR expression, which is heterogeneously distributed in the brain. These receptors could mediate an additional, as yet undescribed, sodium influx pathway.

To address this question, activity-related Na^+ -transients in astrocytes were compared within the cortex (where astrocytes probably express functional iGluR) and in the hippocampal CA1 region (where Astrocytes lack iGluR) by using quantitative sodium imaging on acutely isolated tissue slices of the mouse brain.

Glutamatergic activity resulted in Na^+ -transients in both cortical and hippocampal astrocytes, however amplitudes of cortical Na^+ -signals were twice as large. Additionally, the pharmacological profile differed between the two brain regions: Na^+ -transients were reduced by about 50% through inhibition of the iGluR: N-Methyl-D-aspartate (NMDAR) in cortical astrocytes, but were totally unaffected in hippocampal astrocytes. Moreover, cortical astrocytes responded with prominent Na^+ -transients upon direct activation of NMDAR via NMDA application, while hippocampal astrocytes underwent only small and brief Na^+ -increases. Cortical NMDAR are enriched at distal processes and were activated upon direct application of NMDA, mediating global Na^+ -but local Ca^{2+} -influxes. Ca^{2+} -transients were prolonged by additional Ca^{2+} -influx via the Na^+ - Ca^{2+} -exchanger (NCX). Mathematical computation based on measured data predict that NMDA-induced Na^+ -increases change the transport direction of the NCX, resulting in additional Ca^{2+} -influx.

The study shows that: **i.** cortical astrocytes respond with larger Na^+ -transients upon glutamatergic activity than their hippocampal counterparts, **ii:** NMDAR-activation mediates prominent Na^+ -influx only in cortical, not in hippocampal, astrocytes and **iii:** NMDAR-mediated Na^+ -influxes promote transient Ca^{2+} influx through reversal of the NCX and thus add an additional mechanism for the generation of local Ca^{2+} -signaling in cortical astrocytes.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	3
2. Die Na⁺-Homöostase und Signalgebung	4
2.1 Na ⁺ -Detektion in lebenden Zellen	6
3. Neuronen-Astrozyten-Interaktion	8
4. Astrozyten	9
4.1 Astrozyten-Neuronen-Laktat-Shuttle	11
4.2 Gliotransmission	13
4.3 K ⁺ -Pufferung	14
4.4 Na ⁺ -vermittelte Glutamataufnahme	14
4.4.1 Funktionsweise	15
4.4.2 Der Glutamat-Glutamin-Zyklus	15
4.4.3 Glutamat-Transporter Subtypen	16
4.4.4 Das EAAT-Expressionsprofil ändert sich während der Gehirnentwicklung	17
4.4.5 Modulation der synaptischen Transmission	17
5. Astrozyten als heterogene Zellgruppe	18
5.1 Ionotrope Glutamatrezeptoren in Astrozyten	18
5.1.1 AMPA-Rezeptoren	19
5.1.2 Kainat-Rezeptoren	20
5.1.3 NMDA-Rezeptoren	20
6. Heterogenität astrozytärer Na⁺-Signalgebung. Neue Erkenntnisse aus vorliegender Studie	21
6.1 Ionotrope Glutamatrezeptoren vermitteln Na ⁺ -Einstrom in kortikalen Astrozyten	21
6.2 NMDAR vermitteln globale Na ⁺ - und lokale Ca ²⁺ -Signale	24
6.3 NMDAR-vermittelter Na ⁺ -Einstrom lässt die Transportrichtung des NCX umdrehen	25
6.4 Physiologische Relevanz	27
7. Publikationen und Manuskripte	29
7.1 Publierte Manuskripte:	
1. Karus C, Ziemens D , Rose CR (2015) Lactate rescues neuronal sodium homeostasis during impaired energy metabolism. Channels (Austin), 4;9(4):200-8. Epub 2015 Jun 3.	29
2. Rose CR, Ziemens D , Untiet V, Fahlke C (2017) Molecular and cellular physiology of sodium-dependent glutamate transporters. Brain Res Bull, 28. pii: S0361-9230(16)30482-8	39

3. Moshrefi-Ravasdjani B, **Ziemens D**, Pape N, Färfers M, Rose CR (2018) Action potential firing induces sodium transients in macroglial cells of the mouse *corpus callosum*. *Neuroglia*, 1(1), 106-125 54

7.2 Eingereichtes Manuskript:

1. **Ziemens D**, Oschmann F, Gerkau NJ, Rose CR (2018) Mechanisms and consequences of sodium signals in astrocytes of the mouse neocortex. Eingereicht in *Journal of Neuroscience* 76

8. Literaturverzeichnis 122

1. Einleitung

Im Gehirn sind im Wesentlichen zwei Zelltypen vorherrschend: Neurone und Gliazellen. Während Neurone seit ihrer Entdeckung bis heute ausgiebig morphologisch als auch funktionell untersucht worden sind, wurden Gliazellen lange Zeit vernachlässigt (Abb.1). Dabei machen sie ~ 25% im Nervensystem der Fruchtfliege, ~ 65% im Mausgehirn und sogar ~ 90% der Zellen im menschlichen Gehirn aus (Allen und Barres, 2009). Pionier auf dem Gebiet der Gliazellen war Rudolf Virchow, welcher 1827 erstmals die Bezeichnung „*Neurogliazelle*“ verwendete. Er beschrieb die Zellen als „Zwischenmasse“, in welcher die Nervenzellen eingebettet sind (Virchow, 1970). Nachfolgend begann die anatomische Erforschung der Gliazellen, vor allem durch Camillo Golgi, Gustav Retzius und Santiago Ramón y Cajal, begünstigt durch Fortschritte in der Mikroskopie als auch der Färbemethoden, um diese sichtbar zu machen (Golgi, 1870; Golgi, 1885; Retzius, 1896; García-Marín et al., 2007). Auf ihnen beruht die heute noch verwendete Unterscheidung in drei Gliazelltypen: den **Mikroglia, Oligo- und Astrozyten**.

Mittlerweile ist bekannt, dass Gliazellen weit mehr als eine „Zwischenmasse“ darstellen, sondern vielfältige essentielle Aufgaben übernehmen wie die Myelinisierung der neuronalen Axone durch Oligodendrozyten (erlaubt erst die schnelle Erregungsweiterleitung im Gehirn), die Immunkompetenz im Gehirn durch Mikrogliazellen oder die Kontrolle über den Blutfluss sowie die Ionen- und Neurotransmitterkonzentration im Extrazellularraum durch Astrozyten.

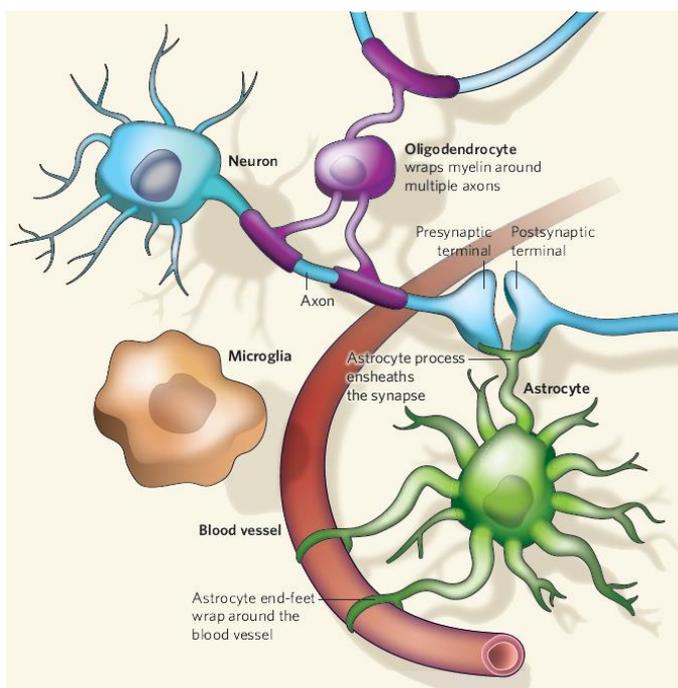


Abbildung 1: Verschiedene Gliazelltypen und Neurone im Gehirn. **Neurone (blau)** vom Zellkörper aus projizieren Dendriten und Axone in distaler Richtung. Die Axone stehen mit den Dendriten anderer Neurone über Synapsen im Kontakt. **Oligodendrozyten (Violett)** bilden lipidreiches Myelin an ihren Ausläufern, welches die Axone der Neurone umhüllt und somit isoliert, um die elektrische Übertragung zu beschleunigen. **Mikrogliazellen (braun)** sind die immunkompetenten Zellen im Gehirn, zeigen eine erstaunliche Mobilität und besitzen die Fähigkeit der Phagozytose. **Astrozyten (grün)** bilden feine Ausläufer (Endfüße) an Blutgefäßen aus und sind somit Teil der Bluthirnschranke. Dort beeinflussen sie u.a. den Blutfluss. Mit weiteren Ausläufern an Synapsen kontrollieren sie lokal den Extrazellularraum und können direkt in die synaptische Transmission eingreifen. Aus Allen und Barres, 2009.

Die Funktionalität des Gehirns wird also erst durch die orchestrierte Zusammenarbeit zwischen Neuronen und Gliazellen ermöglicht. Fundamentale Grundlage ihrer Zusammenarbeit sowie der neuronalen Erregung ist eine asymmetrische Verteilung von geladenen Teilchen (Ionen) im Intra- bzw. Extrazellularraum. Der **Extrazellularraum** beinhaltet eine relativ hohe Konzentration an **Natrium** (Na^+), **Calcium** (Ca^{2+}) und **Chlorid** (Cl^-), während im **Intrazellularraum** eine hohe Konzentration an organischen Anionen und **Kalium** (K^+) vorliegt (Bear et al., 2008). Die Membran der Zellen im Gehirn ist **semipermeabel**, d.h. sie ist gut durchlässig für K^+ und nahezu undurchlässig für andere Ionen. Das hat zur Folge, dass K^+ , getrieben vom Konzentrationsgradienten, ausströmen kann und somit positive Ladung den Intrazellularraum verlässt (Bear et al., 2008). Dies legt die Grundlage dafür, dass die Zellen im Gehirn eine negative Ladung des Zellinneren aufweisen (je nach Zelltyp: etwa -70 bis -85 mV).

2. Die Na^+ -Homöostase und Signalgebung

Darüber hinaus hat auch Na^+ eine große physiologische Relevanz für die Zellen im Gehirn. Denn neben der Na^+ -vermittelten neuronalen Erregungsweiterleitung verbraucht auch ein Großteil der Transportprozesse, die Zellen über die Plasmamembran bewerkstelligen, keine direkte Energie in Form von ATP, sondern sind an die asymmetrische Verteilung von Na^+ -Ionen über der Zellmembran gekoppelt.

Die Konzentration für Na^+ unterscheidet sich im Gehirn zwischen dem Extrazellularräum ($[\text{Na}^+]_e$) sowie Intrazellularraum ($[\text{Na}^+]_i$). Es gilt für die $[\text{Na}^+]_e \sim 140\text{-}150$ mM, wohingegen die $[\text{Na}^+]_i$ beispielsweise in Neuronen und Astrozyten bei $\sim 10\text{-}20$ mM liegt (Schreiner und Rose, 2012; Mondragao et al., 2016; Ziemens et al., Eingereicht). Neben der negativen Ladung der Zellen stellt der einwärts gerichtete Konzentrationsgradient eine weitere Triebkraft dar, welche Na^+ in die Zelle treibt. Zusammen ist dieser **elektrochemische Gradient** die entscheidende Voraussetzung für die Ausbildung von Aktionspotentialen sowie für die synaptische Transmission durch Na^+ -Einstrom in Neuronen über **spannungsabhängige Ionenkanäle** bzw. **ionotrope Glutamatrezeptoren wie AMPA-** (α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isloxazolepropionsäure) und **NMDA-** (N-Methyl-D-Aspartat) **Rezeptoren** (Abb.2).

Der elektrochemische Na^+ -Gradient dient gleichzeitig als Energiequelle für eine ganze Reihe von Na^+ -abhängigen Transportprozessen. Dies ist beispielsweise entscheidend für die pH-Homöostase. In Astrozyten wird der pH-Wert unter anderem durch den Natriumbikarbonat-Cotransporter reguliert (NBC; Abb.2), welcher 3 HCO_3^- und 2 Na^+

$[Na^+]_e$ 140 - 150 mM

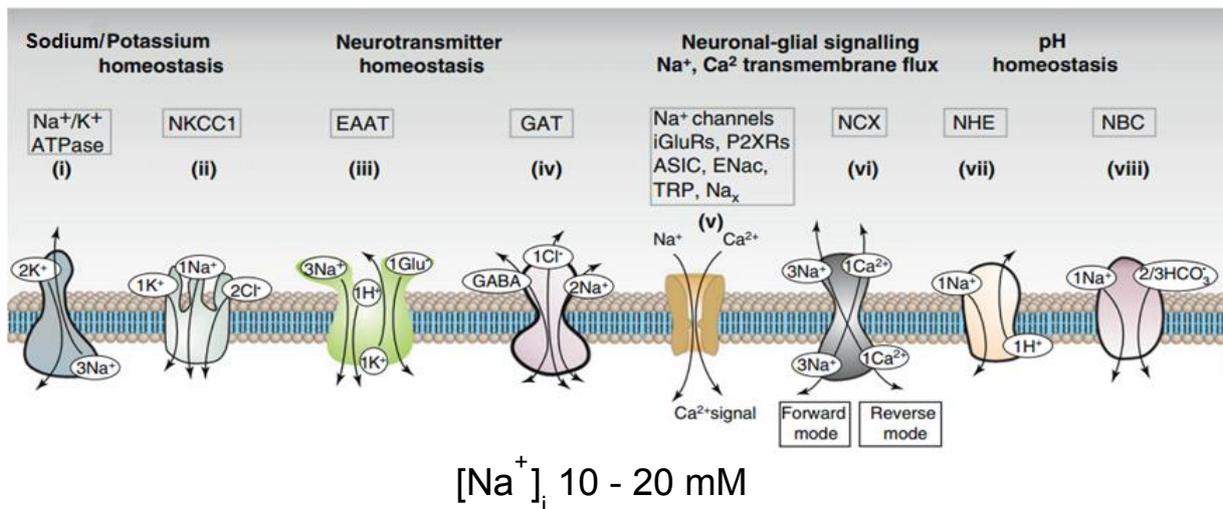


Abbildung 2: Schematische Darstellung der wichtigsten astrozytären Rezeptoren und Transporter, welche den einwärts gerichteten Na^+ -Gradienten als Energiequelle nutzen. Abkürzungen: NKCC1: Na^+ - K^+ - Cl^- -Cotransporter; EAAT: (excitatory amino acid transporter; Glutamat-Transporter); GAT: GABA Transporter; Na^+ channels: Na^+ -Kanäle; iGluRs: ionotrope Glutamatrezeptoren; P2XRs: Ionotrope Purinorezeptoren (ATP sensitiv); ASIC: Säuresensitive Ionenkanäle; ENaC: epithelialer Natriumkanal; TRP: („transient receptor potential“) Kanal; Na_x : durch extrazelluläres Na^+ aktivierter Na^+ -Kanal; NCX: Na^+ - Ca^{2+} -Austauscher; NHE: Natrium-Protonen-Austauscher; NBC: Natrium-Bikarbonat-Austauscher. Weitere Erläuterungen: siehe Text. Angepasst von Kirischuk et al., 2012.

gemeinsam in das Zellinnere transportiert (Rose und Karus, 2013). Zusätzlich ist der Natrium-Protonen-Austauscher (NHE) an der pH-Regulation beteiligt, welcher $1 H^+$ im Austausch gegen $1 Na^+$ in den Extrazellularraum befördert. Dies ist elementar für die Zellen, um die intrazelluläre Protonenkonzentration konstant zu halten, da im Zellmetabolismus stetig Protonen als Nebenprodukte entstehen, welche den Intrazellularraum ansäuern (Yao et al., 1999; Chesler, 2003).

Auch die Wiederaufnahme von zuvor freigesetzten Neurotransmittern an Synapsen ist Na^+ -abhängig; ein Prozess, der überwiegend von Astrozyten realisiert wird (Abb.2). Glutamat-Transporter (GluT) transportieren pro Molekül Glutamat $3 Na^+$ sowie $1 H^+$ in den Intrazellularraum und $1 K^+$ in den Extrazellularraum (Danbolt, 2001; Rose et al., 2018; Abb.2, 9; siehe Abschnitt 4.4). Auch der wichtigste inhibitorische Neurotransmitter γ -Aminobuttersäure (GABA) wird durch spezifische GABA-Transporter der GAT-Familie aufgenommen, welche $2 Na^+$ zusammen mit $1 Cl^-$ pro Molekül GABA in den Intrazellularraum befördern (Abb.2; Wu et al., 2007).

Zudem interessant ist die Kopplung der Na^+ -Homöostase mit der Regulierung anderer Ionenverteilungen. Dies geschieht im Fall von Ca^{2+} über den Na^+ - Ca^{2+} -Austauscher (NCX), welcher unter Ruhebedingungen $3 Na^+$ in das Zellinnere befördert und dafür $1 Ca^{2+}$ nach außen austauscht (*forward mode*; Clapham, 2007; Abb.2). Der NCX trägt somit zur relativ

niedrigen intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) bei. Allerdings kann der NCX seine Transporteigenschaften, abhängig vom Membranpotential bzw. der $[\text{Na}^+]_i$, umkehren (zum Ca^{2+} -Importer und Na^+ -Exporter; siehe Abschnitt 6.3; Oschmann et al., 2017). Neben Ca^{2+} - wird auch die Cl^- -Konzentration in Astrozyten Na^+ -abhängig über die Aktivität des Na^+ - K^+ - Cl^- -Cotransporter 1 (NKCC1) beeinflusst. Dieser transportiert bei erhöhter $[\text{K}^+]_e$ Kalium zusammen mit Na^+ und 2 Cl^- in den Intrazellularraum, sorgt aber so für die relativ hohe $[\text{Cl}^-]_i$ in Astrozyten (30-60 mM; Vergleich adulte Neuronen: ~ 5 mM; Wright, 2009; Verkhratsky und Nedergaard, 2017).

Alle oben genannten Beispiele verdeutlichen die vielseitige physiologische Bedeutung des einwärts gerichteten Na^+ -Gradienten. Gerade infolge synaptischer Transmission kommt es nicht nur in Neuronen, sondern auch in umgebenen Astrozyten entweder zu aktiven und/oder sekundär vermitteltem Na^+ -Einstrom. Es verwundert daher nicht, dass die Aufrechterhaltung bzw. Wiederherstellung der Na^+ -Konzentrationsverhältnisse, insbesondere nach neuronaler Erregung, den Prozess mit dem höchsten ATP-Verbrauch im Gehirn darstellt (Belanger et al., 2011). Diese Regulation wird durch die beständige Aktivität der Natrium-Kalium-ATPase (NKA) realisiert.

Aufgrund der komplexen und vielschichtigen Wirkungen des Natriums ist die Untersuchung der Na^+ -Signalgebung in lebenden Zellen von hohem Interesse. Insbesondere in Astrozyten ist diese unter physiologischen als auch unter pathophysiologischen Bedingungen noch unzureichend erforscht und daher Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

2.1 Na^+ -Detektion in lebenden Zellen

Für die Messung von intrazellulären Na^+ -Änderungen wurde in dieser Arbeit überwiegend von der **ratiometrischen Fluoreszenzmikroskopie** Gebrauch gemacht. Hierfür wird in einen zuvor angefertigten Gehirnschnitt ein Ionenindikator für Natrium (Sodium-Binding Benzofuran Isophthalat; **SBFI**) mittels einer feinen Pipette an verschiedenen Stellen eingebracht (Abb.3,4). Dieser ist bezüglich seiner *in situ* Eigenschaften hervorragend geeignet, um physiologische Na^+ -Änderungen zu detektieren (Meier et al., 2006; Schreiner und Rose, 2012). SBFI färbt Neurone als auch Astrozyten an. Um zwischen beiden Zelltypen unterscheiden zu können, wurden die Hirnschnitte zusätzlich mit einem astrozyten-spezifischen Farbstoff (Sulforhodamin 101 (SR101); Abb.3B; Kafitz et al., 2008) angefärbt. SBFI wird im ultravioletten Bereich angeregt und ändert sein Emissionsspektrum bei Na^+ -Bindung (ohne dabei eine Pufferwirkung aufzuweisen; Mondragao et al., 2016), sodass bei steigender $[\text{Na}^+]_i$ die Fluoreszenzintensität abnimmt. In einem Bereich von 5-50 mM

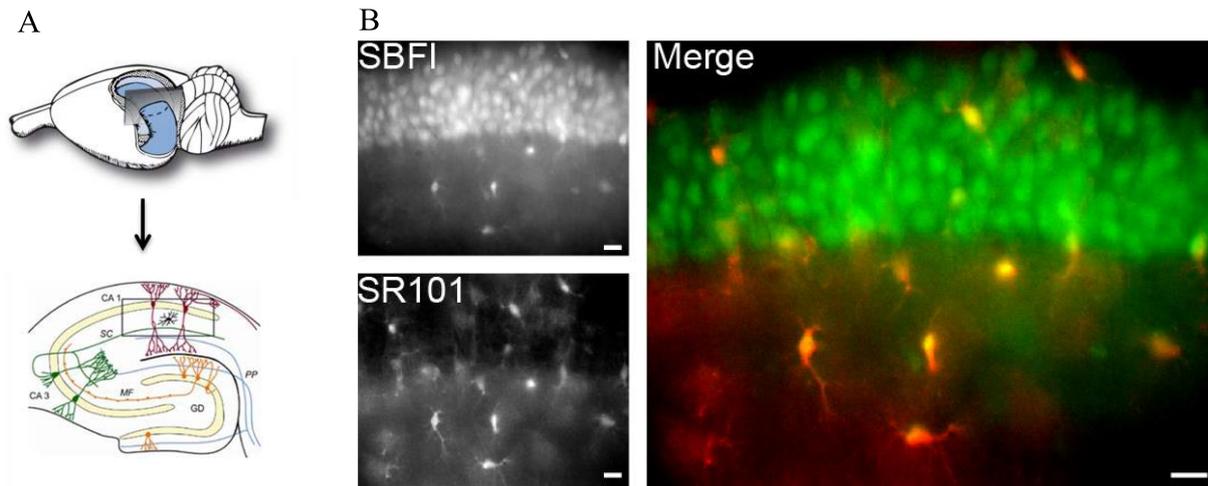


Abbildung 3: Anfertigung und Färbung eines Hirnschnittes. Zunächst wird ein Hirnschnitt nach dem Schema (A) angefertigt und nachfolgend in einem definierten Bereich (A:Kasten unten) mittels einer feinen Pipette mit SBFI angefärbt (B oben links). SBFI färbt Neuronen und Astrozyten an. Um zwischen beiden Zelltypen unterscheiden zu können, werden die Hirnschnitte zusätzlich mit einem astrozyten-spezifischen Farbstoff (SR101; B links unten) beladen. Im Merge-Bild (B rechts) erkennt man in grün neuronale und in rot astrozytäre Zellkörper. Maßstabsbalken:10 μm . A oben, aus Meier et al, 2006.; unten, Schema Institut; B, Ziemens D., unveröffentlicht.

geschieht dies annähernd linear. Daher können mittels einer zuvor angefertigten Kalibrierung im Nachhinein prozentuale Änderungen von einem Ursprungswert (üblicherweise vor einer Stimulation) in Konzentrationsänderungen umgerechnet werden (Langer und Rose, 2009; Karus et al., 2015a). Für die ratiometrische Fluoreszenzmikroskopie wird SBFI alternierend bei einer Wellenlänge am isosbestischen Punkt (Emission ist unabhängig von der Na^+ -Bindung; 340 nm) und einer maximal sensitiven Wellenlänge für Na^+ angeregt (380 nm). Bildet man anschließend den Quotient aus beiden Wellenlängen, wird die Messung unabhängig von Faktoren wie **Belichtungsdauer**, **variabler Farbstoffkonzentration** oder dem **Bleichen** des Farbstoffes (Schreiner und Rose, 2012). Ratiometrisches Imaging mit dieser Färbemethode erlaubt überwiegend die Messung der $[\text{Na}^+]_i$ in den Somata der Zellen, bietet hingegen aber den Vorteil, eine relativ große Zellanzahl quantifizieren zu können (siehe Bildausschnitt Abb.3B). Um die räumliche Auflösung für bestimmte Versuchsansätze zu verbessern (Messung von Ionenänderungen in Zellkompartimenten), wurde zudem Gebrauch von der **Zwei-Photonen-Fluoreszenzmikroskopie** gemacht (Abb.4). Fundamental hierfür ist, dass der Farbstoff anstelle eines Photons zwei kurz hintereinander eintreffende Photonen ($\sim 0,5$ fs) der doppelten Wellenlänge absorbiert. Dies erfordert einen gepulsten Laser mit hohen Lichtintensitäten. Die nötige Lichtintensität ist vorwiegend auf den Brennpunkt begrenzt, sodass die Zwei-Photonen-Anregung dort am

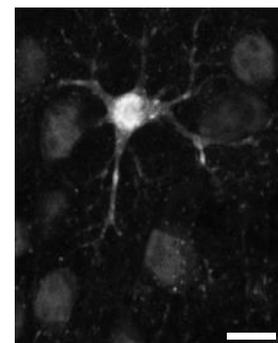


Abbildung 4: Ein SBFI gefärbter Astrozyt (zentral) mit umgebenen neuronalen Somata. Aufgenommen am Zwei-Photonen-Mikroskop. Maßstabsbalken:10 μm . Ziemens D., unveröffentlicht.

wahrscheinlichsten ist (Diaspro et al., 2006). Aufgrund dieser lokalen Anregung verbessert sich vor allem die **räumliche Auflösung** und verhindert das fälschliche Messen von Fluoreszenzänderungen unter- und oberhalb des Brennpunktes. Neben SBF1 existiert auch ein Zwei-Photonen-gängiger Ca^{2+} -Farbstoff: Oregon Green Bapta-1 (OGB-1), der ebenso Verwendung fand.

Zusätzlich wurden mit Hilfe der **Patch-Clamp-Technik** aktivitäts-induzierte Membranströme an der Zellmembran gemessen. Dafür wird eine feine Glaselektrode auf die Zellmembran aufgesetzt und ein kleiner Membranfleck (*Patch*) elektrisch vom Außenmedium abgedichtet (Bear et al., 2008). Entfernt man anschließend das Membranstück, wird eine stabile Verbindung zur Zelle geschaffen und man kann unter anderem das Membranpotential der Zelle bestimmen (*Voltage-Clamp*). Bei Stimulationen ist es nun möglich, den Ionenstrom über die Zellmembran zu beobachten. Da Na^+ der Hauptladungsträger bei aktivitäts-induzierten Einwärtsströmen ist, dienen die Messungen als guter Indikator für eine bestehende Na^+ -Signalgebung.

3. Neuronen-Astrozyten-Interaktion

Physiologische Na^+ -Signalgebung findet vor allem während der synaptischen Transmission statt. Bei diesem Vorgang sind allerdings nicht nur ausschließlich Neurone, sondern auch in räumlicher Nachbarschaft befindliche Astrozyten beteiligt. Die bidirektionale Kommunikation zwischen Astrozyten und Neuronen wird in der Literatur als „**Tripartite Synapse**“ (*dreiteilige Synapse*) beschrieben (Araque et al., 1999). Demnach formen astrozytäre Ausläufer mit neuronalen Prä- und Postsynaptischen Kompartimenten eine dreiteilige Synapse und sind somit involviert in Informationstransfer-, Verarbeitung und Speicherung (Perea et al., 2009; Abb.5).

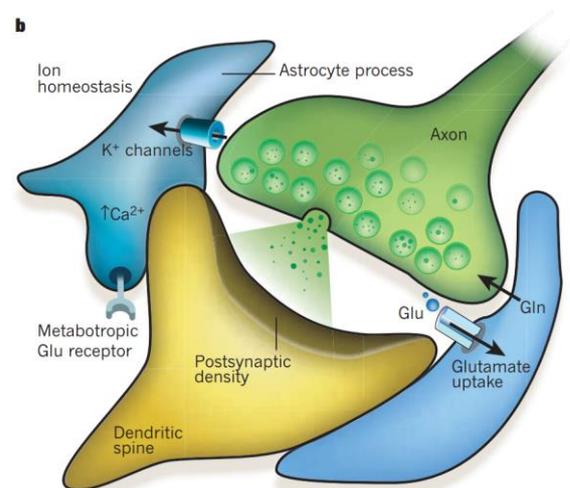
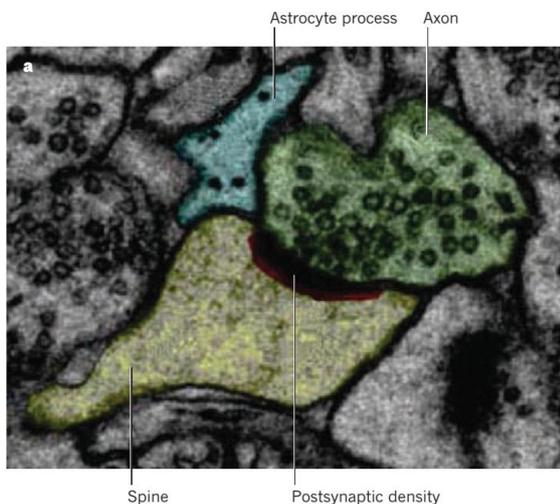


Abbildung 5: Elektronenmikroskopische Aufnahme sowie schematische Darstellung einer dreiteiligen Synapse. **a:** Elektronenmikroskopische Aufnahme eines astrozytären Ausläufers (blau) am synaptischen Spalt zwischen der Prä- (grün) und Postsynapse (gelb). **b:** zeigt 3 wesentliche astrozytäre (blau) Eingriffe an synaptischen Verbindungen: 1. die Glutamat-Aufnahme; 2. die Umwandlung von Glutamat zu Glutamin (Gln) sowie die nachfolgende Freisetzung bzw. Rückführung zu den Neuronen und 3. die Aufnahme von K^+ über K^+ -Kanäle. Aus Eroglu und Barres, 2010.

Dabei kann ein einzelner Astrozyt etwa 20.000-120.000 Synapsen im Mausgehirn kontaktieren (~ 2 Millionen im menschlichen Gehirn; Bushong et al., 2002; Halassa et al., 2007; Oberheim et al., 2009). Die Präsenz astrozytärer Ausläufer an Synapsen variiert allerdings je nach Hirnregion. So findet man im visuellen Kortex ungefähr 30%, im Hippocampus fast 60% und im Kleinhirn an Kletterfasern sogar bis zu 90% der Synapsen durch Ausläufer umhüllt (Špaček, 1985; Grosche et al., 1999; Ventura und Harris, 1999; Witcher et al., 2007; Bernardinelli et al., 2014).

Allerdings fehlt diesen Zahlen die dynamische Komponente, weil die oben genannten Studien mit fixiertem Gewebe unter dem Elektronenmikroskop durchgeführt wurden (z.B. in Abb.5a). Synaptische Aktivität und kurzzeitige Glukose/Sauerstoff-Unterversorgung oder die Stimulation von Schnurrhaaren bei Nagetieren können nämlich zu einer Zunahme an umhüllten Synapsen im Hippocampus als auch im somatosensorischen Kortex führen (Genoud et al., 2006; Lushnikova et al., 2009). Die Partizipation der Astrozyten bei der synaptischen Transmission illustriert ihre außerordentliche Bedeutung im Gehirn. Deshalb nachfolgend eine Einführung in die Merkmale und Funktionen der Astrozyten.

4. Astrozyten

Astrozyten repräsentieren etwa 10-20% der Zellen im gesamten Gehirn bzw. je nach Hirnregion ~ 20-40% der Gliazellen in Nagetieren (Pelvig et al., 2008; Sun et al., 2017). Aufgrund von morphologischen Beobachtungen im 19. Jahrhundert wurden Astrozyten in zwei Gattungen eingeordnet: die **protoplasmatischen-** sowie **fibrösen Astrozyten** (Abb.6).

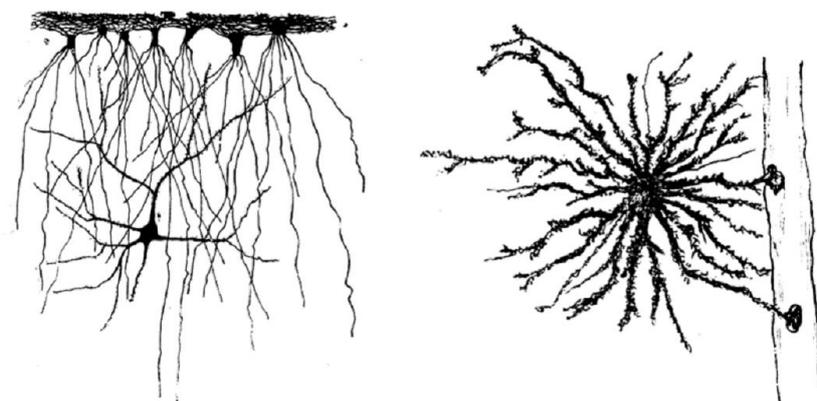


Abbildung 6: Zeichnung humaner Astrozyten im Kortex. **Links:** Darstellung eines fibrösen Astrozyten mit umgebenden neuronalen Pyramidenzellen. **Rechts:** Zeichnung eines protoplasmatischen Astrozyten, welcher mit mehreren Ausläufern ein Blutgefäß kontaktiert. Aus Andriezen, 1893.

Protoplasmatische Astrozyten sind überwiegend in der *grauen Substanz* vorherrschend (Gehirnbereiche, die eine Vielzahl an Zellkörpern enthalten, sodass diese Gehirnbereiche im Durchlicht des Mikroskops grau erscheinen). Sie haben einen Zellkörper ($\emptyset = \text{ca. } 10 \mu\text{m}$; in Nagetieren), von dem aus 4-10 primäre Ausläufer distal in alle Richtungen projizieren (ca. $50 \mu\text{m}$) und sich weitergehend in Sekundär- und Tertiäerausläufer verzweigen (Abb.6 rechts; Verkhratsky und Nedergaard, 2017). Diese morphologische Beobachtung war es, die den Astrozyten ihren Namen brachte (von griechisch: astron „Stern“ und kytos „Zelle“; Lenhossék, 1895).

Fibröse Astrozyten sind hingegen vorwiegend in der *weißen Substanz* zu finden (Gehirnbereiche, die im Durchlicht des Mikroskops weiß erscheinen aufgrund von wenigen Zellkörpern und vielen myelinisierten Axonen) und bilden im Gegensatz zu den protoplasmatischen Astrozyten deutlich weniger verzweigte Ausläufer aus. Diese projizieren allerdings bis zu $100 \mu\text{m}$ in Orientierung am Verlauf von benachbarten neuronalen Axonen (Lundgaard et al., 2014; Abb.6 links).

In der frühen Gehirnentwicklung findet man neben den bereits beschriebenen Astrozyten zusätzlich **Radialgliazellen (RGZ)** im Gehirn. RGZ sind multipotente Stammzellen. Ihre in der Ventrikulärzone befindlichen Zellkörper projizieren lange gliale Fasern zur Pia Mater, an welchen unreife Neuronen zu ihrem Bestimmungsort im sich entwickelnden Kortex wandern können (Kriegstein und Alvarez-Buylla, 2009). Zum Ende dieser Entwicklungsperiode differenzieren die meisten RGZ zu Astrozyten (Kriegstein und Alvarez-Buylla, 2009). Im adulten Gehirn kann man nur noch modifizierte RGZ finden, die in Abhängigkeit der funktionellen Anforderungen und räumlichen Bedingungen als spezialisierte Astrozyten betrachtet werden können. Beispiele sind **Bergmann-Gliazellen** im Kleinhirn, **Müllerzellen** in der Retina oder **Tanyzyten** im Hypothalamus (Rakic, 2003).

Die vorliegende Arbeit widmet sich vor allem der Interaktion zwischen Neuronen und Astrozyten in der *grauen Substanz* adulter Mäuse, sodass nachfolgend überwiegend protoplasmatische Astrozyten behandelt werden.

Astrozyten in der *grauen Substanz* erfüllen eine Vielzahl von Aufgaben im Gehirn und erlauben den Neuronen erst zu funktionieren. Sie greifen an dreiteiligen Synapsen durch Aufnahme oder Abgabe von Neurotransmittern als auch über die Kontrolle der Ionenkonzentrationen im Extrazellularraum lokal in die synaptische Transmission ein. Darüber hinaus umschließen sie mit ihren feinen Ausläufern (Endfüßen) benachbarte Blutgefäße und bilden zusammen mit den Endothelzellen und Perizyten die Blut-Hirn-Schranke aus (Ballabh et al., 2004). Dort beeinflussen sie auch den Blutfluss und können

Glukose aus dem Blut aufnehmen und Neurone mit Energie versorgen (Pellerin et al., 1998; Zonta et al., 2003; Takano et al., 2006).

4.1 Astrozyten-Neuronen-Laktat-Shuttle

Das Säugetiergehirn hat einen enormen Energiebedarf. Es verbraucht bei nur etwa 2% der Körpermasse ungefähr 20% der Energie und des Sauerstoffs im Körper (Belanger et al., 2011). Der primäre Energieträger im Gehirn ist Glukose, welche aus dem Blut in Zellen über spezifische Glukose-Transporter eintritt (Mergenthaler et al., 2013). Eine Speicherung von Energie findet im Gehirn nahezu exklusiv in Astrozyten statt (Brown und Ransom 2007). Dafür kann Glukose zu Glykogen umgewandelt und angelagert werden. Wahrscheinlich bedingt durch höhere Energieanforderungen, ist die intrazelluläre Glykogenkonzentration in der *grauen Substanz* deshalb etwa doppelt so hoch wie in der *weißen Substanz* (Brown und Ransom, 2007). Astrozyten selbst tragen zu 5-10 % des Energieverbrauchs im Gehirn bei (Pellerin und Magistretti, 2004), wobei gezeigt werden konnte, dass die Glukoseaufnahme ungleich höher ist (Chuquet et al., 2010). Diese widersprüchliche Erkenntnis könnte jedoch durch eine metabolische Kopplung von Astrozyten und Neuronen begründet werden, welche in der Literatur als „*Astrozyten-Neuronen-Laktat-Shuttle*“ (ANLS) beschrieben ist. Diese Interaktion wird durch einen **Anstieg der $[Na^+]_i$** in Astrozyten **initiiert**.

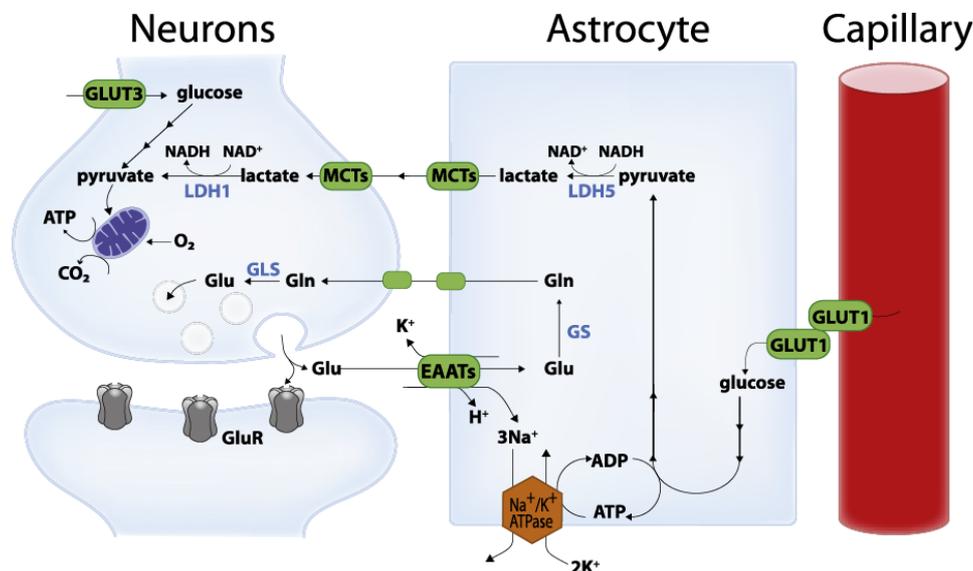


Abbildung 7: Das durch Neuronen freigesetzte Glutamat (Glu) wird von astrozytären Glutamat-Transportern (EAAT's) zusammen mit Na^+ aufgenommen und führt zu einem Anstieg der $[Na^+]_i$. Dieser Anstieg stimuliert die ATP verbrauchende die Na^+/K^+ -ATPase und führt nachfolgend zu einer erhöhten Glukoseaufnahme (über GLUT1) und einer gesteigerten Glykolyserate. In der Glykolyse generiertes Pyruvat wird anschließend durch spezielle Laktatdehydrogenasen (LDH5) zu Laktat konvertiert und mittels der Monocarboxylat-Transporter (MCTs) in den Extrazellularraum entlassen. Neuronen nehmen Laktat mithilfe ihrer MCTs auf und nutzen es nach Umwandlung in Pyruvat (durch LDH1) als Energiequelle. Astrozytär aufgenommenes Glutamat wird zum größten Teil durch die Glutamin-Synthase (GS) zu Glutamin (Gln) umgewandelt und den Neuronen zurückgeführt. In Neuronen wird Gln durch Glutaminasen (GLS) wieder zu Glutamat konvertiert. Aus Belanger et al., 2011.

Präsynaptisch freigesetztes Glutamat wird nach Wirkung an der Postsynapse über GluT zusammen mit Na^+ in Astrozyten aufgenommen (siehe Abschnitt 4.4). Als Konsequenz kommt es zu einer Erhöhung der $[\text{Na}^+]_i$, welche zunächst die NKA stimuliert. Darauf folgt ein messbarer Anstieg der Glykolyserate, des Glykogenabbaus als auch der Laktatproduktion (Pellerin und Magistretti, 1994; Magistretti, 2009; Chatton et al., 2016). Laktat kann nachfolgend von Astrozyten über Monocarboxylat-Transporter (MCT) in den Extrazellularraum freigesetzt und von Neuronen wieder mittels MCT's aufgenommen werden (Abb.7). In Neuronen wird Laktat zu Pyruvat umgewandelt und als Energiequelle oxidativ metabolisiert (Abb.7). Studien bestätigen zudem, dass Astrozyten eine höhere Glykolyserate haben, während Neurone die höhere Rate am oxidativem Metabolismus aufweisen (Barros und Deitmer, 2010; Belanger et al., 2011; Weber und Barros, 2015).

Auf funktioneller Ebene konnte man zeigen, dass Neurone bei Abwesenheit von Glukose alternativ durch Laktat die synaptische Transmission aufrechterhalten können (Wender et al., 2000; Suh et al., 2007). Zudem scheint der ANLS insbesondere für Prozesse mit hohen Energieanforderungen, wie z.B. Lernvorgänge, Gedächtnisbildung sowie auch für die neuronale Entwicklung, von Bedeutung zu sein (Voutsinos-Porche et al., 2003; Suzuki et al., 2011).

In Gehirnschnitten des Hippocampus konnten wir im Institut für Neurobiologie (**Claudia Karus, Daniel Ziemens und Christine R. Rose**) zudem zeigen, dass die Regulation der $[\text{Na}^+]_i$ in Astrozyten im Besonderen von der Glykolyse abhängt. Bei inhibierter Glykolyse (durch Natriumfluorid (NaF)) und 0 Glukose in der Umgebungslösung stieg die $[\text{Na}^+]_i$ in Astrozyten nach 110 Minuten um ~ 35 mM an und reduzierte somit Triebkraft für Na^+ -abhängige Transportprozesse, wie z.B. den Glutamat-Transport (GluT transportieren auch Aspartat). Folglich führten Applikationen von D-Aspartat unter diesen Bedingungen zu kleineren astrozytären, aber größeren neuronalen Na^+ -Signalen, im Vergleich mit einem vorherigen Signal unter Kontrollbedingungen (Abb.8 A,B links; Karus et al., 2015b). Zudem waren die Na^+ -Transienten deutlich verlängert, wahrscheinlich begründet durch die verringerte ATP-Verfügbarkeit der NKA. Interessanterweise konnte eine Zugabe von Laktat trotz inhibierter Glykolyse und 0 Glukose in der Umgebungslösung einzig die Na^+ -Regulierung in Neuronen nahezu vollständig wiederherstellen, während der Effekt auf die Astrozyten deutlich geringer war (Abb.8 A,B rechts; Karus et al., 2015b).

Dieses *Rescue*-Experiment zeigt sehr anschaulich, dass Neurone gegenüber Astrozyten präferiert Laktat nutzen. Dies kann dadurch begründet werden, dass die astrozytär exprimierten MCT-Isoformen vorwiegend den Export von Laktat favorisieren (Dimmer et al.,

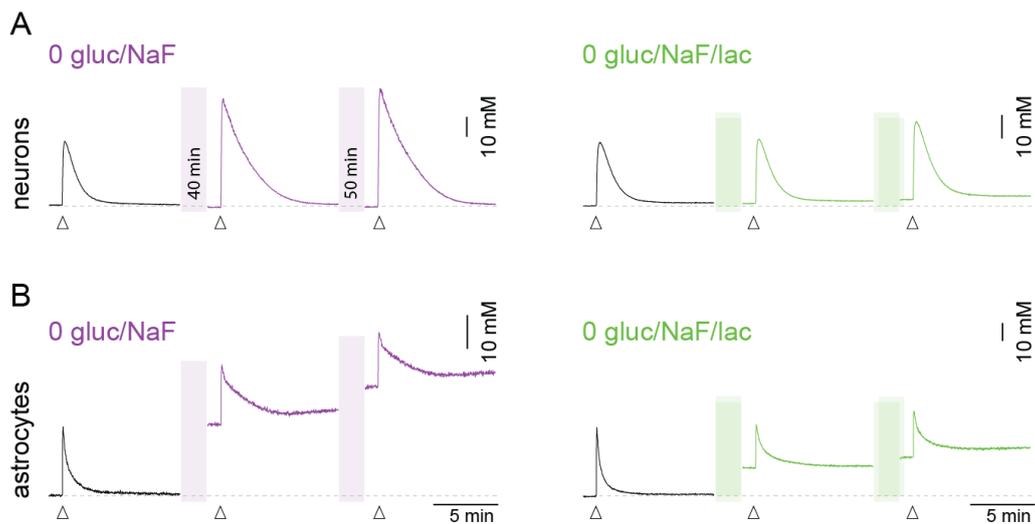


Abbildung 8: D-Aspartat stimulierte Na^+ -Signale in Neuronen (**A**) und Astrozyten (**B**). **A Links:** Repetitiv stimulierte Na^+ -Signale in hippocampalen Neuronen. Nach einem ersten Kontrollsignal (schwarze Spur; in 20 mM Glukose haltiger Lösung) wurde für 110 Minuten zu 0 Glukose und Natriumfluorid- (NaF; inhibiert die Glykolyse) haltiger Lösung gewechselt und nach jeweils 40 bzw. weiteren 50 Minuten erneut stimuliert. **A Rechts:** Der gleiche zeitliche Ablauf; nur wurde nach dem Kontrollsignal (schwarze Spur) zu 0 Glukose/NaF-Lösung zusätzlich Laktat hinzugefügt. **B links und rechts:** zeigen dieselben Versuchsbedingungen, allerdings für hippocampale Astrozyten. Angepasst nach Karus et al., 2015b.

2000), während die Laktatdehydrogenase-Isoform in Neuronen überwiegend die Umwandlung von Laktat zu Pyruvat bevorzugt (Bittar et al., 1996).

Glutamat-vermittelt können auch Änderungen der astrozytären $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in verschiedenen Signalkaskaden dazu führen, dass Astrozyten Substanzen freisetzen, welche die glatten Muskelzellen an Blutgefäßen beeinflussen, was zur **Vasodilation** oder **Vasokonstriktion** der Gefäße führt. Somit wird neuronale Aktivität (erhöhter Energiebedarf) dynamisch an einen höheren Blutfluss gekoppelt (Zonta et al., 2003; Belanger et al., 2011).

4.2 Gliotransmission

Neben der metabolischen Unterstützung durch Lakatabgabe können Astrozyten auch aktiv in die synaptische Transmission eingreifen und, gesteuert durch transiente Erhöhungen der $[\text{Ca}^{2+}]_i$, neuroaktive Moleküle freisetzen. Das sind beispielsweise: Glutamat, D-Serin, ATP, Taurin oder GABA (Parpura et al., 1994; Bezzi et al., 1998; Kang et al., 1998; Mothet et al., 2000; Coco et al., 2002; Mongin und Kimelberg, 2005). Diese neuroaktiven Substanzen werden alle unter dem Sammelbegriff „**Gliotransmitter**“ in der Literatur zusammengefasst. Darüber hinaus sind astrozytär freigesetzte Substanzen wie Cholesterin, Thrombospondine oder $\text{TNF-}\alpha$ essentiell für die Bildung bzw. Reifung von Synapsen (Mauch et al., 2001; Eroglu und Barres, 2010).

4.3 K^+ -Pufferung

Bei neuronaler Aktivität wird K^+ von Neuronen u.a. durch spannungsabhängige K^+ -Kanäle zur Repolarisierung in den Extrazellularraum entlassen (Heinemann und Lux, 1977; Heinemann et al., 1978). Dieses K^+ wird überwiegend von Astrozyten wieder aufgenommen (Kofuji und Newman, 2004). Das ist entscheidend, denn eine Erhöhung der extrazellulären K^+ -Konzentration ($[K^+]_e$) depolarisiert die umgebenen Zellen und kann unter anderem die Aktionspotentialschwelle verschieben und zu Übererregung führen.

K^+ wird in Astrozyten durch K^+ -Kanäle ($K_{ir}4.1$), über die NKA (kann im Gegensatz zur neuronalen NKA ihre Aktivität bei erhöhter $[K^+]_e$ steigern; Sweadner, 1992) als auch über den NKCC1 aufgenommen (Walz, 2000). Astrozyten sind untereinander über sogenannte „**gap junctions**“ verbunden und bilden ein Synzytium aus. Über gap junctions können sowohl metabolische Produkte als auch Ionen ausgetauscht werden (Kofuji und Newman, 2004; Langer et al., 2012). K^+ wird somit im gesamten Synzytium verteilt und an Orten niedriger $[K^+]_e$ wieder entlassen (Orkand et al., 1966). Dieser Vorgang wird in der Literatur als „**spatial buffering**“ beschrieben (Kofuji und Newman, 2004).

4.4 Na^+ -vermittelte Glutamataufnahme

Glutamat ist der wichtigste erregende Neurotransmitter im Gehirn. Bei neuronaler Erregung wird Glutamat an präsynaptischen Endigungen in den synaptischen Spalt freigesetzt und kann nachfolgend an der Postsynapse oder umliegenden Astrozyten wirken (Abb.5). Unter physiologischen als auch pathophysiologischen Bedingungen ist eine rasche Wiederaufnahme des Neurotransmitters entscheidend, um Übererregung und Rezeptor-Desensitisierungen zu verhindern oder um Erregung lokal zu begrenzen. Die Glutamataufnahme erfolgt zu etwa 90% über astrozytäre **excitatory amino acid transporter (EAAT's)**; Danbolt, 2001).

Zu diesem Sachverhalt liegen bereits eine Fülle von Studien als auch ein herausragendes Review aus dem Jahre 2001 vor (Danbolt, 2001). Allerdings fehlte es an einer weiteren Einordnung der wissenschaftlichen Erkenntnisse der letzten 17 Jahre, welche wir: **Christine R. Rose** und **Daniel Ziemens** (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf), in Kooperation mit **Verena Untiet** und **Christoph Fahlke** (Forschungszentrum Jülich) in einem gemeinsamen Review herausgearbeitet haben (Rose et al., 2018). Die wichtigsten Erkenntnisse sind nachfolgend skizziert.

4.4.1 Funktionsweise

Glutamat-Transporter nutzen, wie oben beschrieben, den einwärts gerichteten elektrochemischen Na^+ -Gradienten als Energiequelle. Sie mobilisieren pro Molekül Glutamat 3 Na^+ -Ionen zusammen mit 1 H^+ in das Zellinnere im Austausch gegen 1 K^+ -Ion in den Extrazellularraum (Abb.9A). Somit führt die Aufnahme von Glutamat zu einem Nettoeinstrom an positiver Ladung und respektive zur Depolarisation der Zellmembran (Kettenmann et al., 1984). Hauptladungsträger für die Depolarisation ist Na^+ . Nach glutamatergen Stimulationen sind somit kurzzeitige Anstiege der $[\text{Na}^+]_i$ messbar (Langer und Rose, 2009; Abb.9B links). GluT-vermittelte Na^+ -Signale sind für Astrozyten in diversen Hirnregionen beschrieben, darunter: Hippocampus, Kleinhirn, *Corpus callosum* (*weiße Substanz*) und im Kortex (Kirischuk et al., 2007; Bennay et al., 2008; Langer und Rose, 2009; Lamy und Chatton, 2011; Unichenko et al., 2012; Moshrefi-Ravasdjani et al., 2018). Der Na^+ -assoziierte Glutamat-Transport stellt für Astrozyten in den meisten Hirnregionen die Hauptursache für transiente Na^+ -Änderungen dar. Das kann man funktionell nachweisen, denn Glutamat-induzierte Na^+ -Signale in Astrozyten sind bei Inhibition der GluT (durch TFB-TBOA) deutlich minimiert oder bleiben meist vollständig aus (Langer und Rose, 2009; Moshrefi-Ravasdjani et al., 2018; Ziemens et al., Eingereicht; Abb.9B rechts).

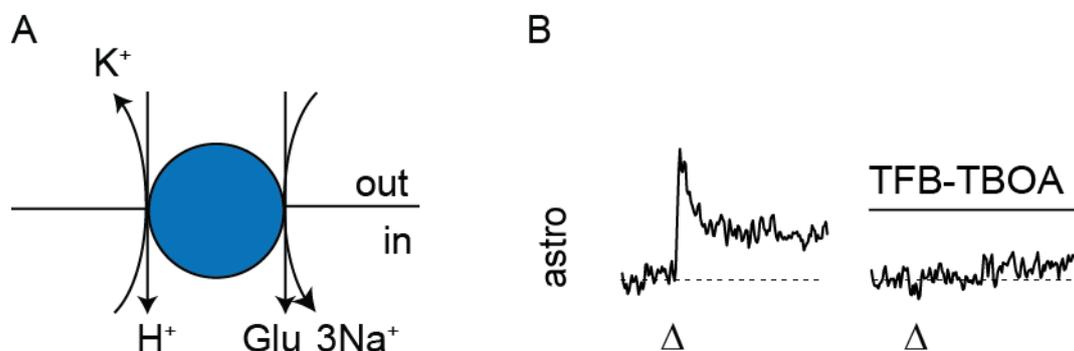


Abbildung 9: Funktionsweise der Glutamat-Transporter. **A:** Schematische Darstellung der Funktionsweise eines Glutamat-Transporters (GluT). GluT transportieren pro Molekül Glutamat 3 Na^+ und 1 H^+ in den Intrazellularraum und 1 K^+ in den Extrazellularraum. **B:** Eine Messung der intrazellulären Natriumkonzentration in einem hippocampalen Astrozyten bei synaptischer Stimulation, welches zu einer präsynaptischen Glutamatfreisetzung führt. Nachfolgend wird Glutamat von Astrozyten über GluT zusammen mit Na^+ aufgenommen. Folglich ist ein zeitweiser Anstieg der $[\text{Na}^+]_i$ messbar (**B links**). Dieser Na^+ -Anstieg bleibt bei Inhibition der GluT durch TFB-TBOA trotz Stimulation aus (**B rechts**) A: Aus Rose et al., 2018. B: Ziemens D., unveröffentlicht.

4.4.2 Der Glutamat-Glutamin-Zyklus

Ein Teil des aufgenommenen Glutamats wird in α -Ketoglutarat umgewandelt und im Zitratzyklus (TCA) oxidativ metabolisiert (McKenna, 2007; Sonnewald, 2014; Abb.10). Der

überwiegende Teil des Glutamats wird hingegen, mittels der astrozytär exprimierten Glutamin-Synthase, zu Glutamin umgewandelt und über sogenannte SN1-Transporter in den Extrazellularraum entlassen (Martinez-Hernandez et al., 1977; Bröer et al., 2002; Abb.7,10). Glutamin weist keine Transmitterwirkung auf und kann nachfolgend von neuronal exprimierten System A-Transportern wieder aufgenommen werden (Billups et al., 2013). Aus Glutamin können Neurone wieder Glutamat oder GABA generieren und ihre *Vesikelpools* auffüllen (Bak et al., 2006). Dieses „Glutamat-Recycling“ wird in der Literatur als „*Glutamat-Glutamin-Zyklus*“ beschrieben und unterstreicht erneut die starke Interaktion von Astrozyten und Neuronen.

4.4.3 Glutamat-Transporter Subtypen

Es sind fünf Glutamat-Transporter Subtypen (EAAT1-5) charakterisiert. EAAT1 (in Nagetieren: GLAST) und EAAT2 (in Nagetieren: GLT-1) sind vorwiegend als astrozytäre Glutamat-Transporter beschrieben, wobei EAAT2 auch an neuronalen präsynaptischen Endigungen nachgewiesen wurde (Mennerick et al., 1998; Danbolt, 2001; Zhou et al., 2014; Rose et al., 2018). In adulten Tieren wird der überwiegende Teil des freigesetzten Glutamats über EAAT2 aufgenommen. Denn Studien mit Knock-out-Tieren für EAAT2 zeigen, dass die Versuchstiere stark erhöhte extrazelluläre Glutamatkonzentrationen, geschädigte Hirnregionen und letale epileptische Anfälle nach der Geburt aufweisen (Rothstein et al., 1994; Tanaka et al., 1997). In Mäusen mit konditionell ausgeknockten astrozytären EAAT2 zeigen die Tiere eine erhöhte Sterberate sowie epileptische Anfälle bei noch vorhandenen neuronalen EAAT2 (Petr et al., 2015). KO-Tiere für EAAT1 oder den neuronalen EAAT3- (in Nagetieren EAAC1) und 4 zeigen deutlich weniger schwerwiegende Phänotypen (Peghini et al., 1997; Watase et al., 1998; Huang et al., 2004). Für EAAT5 sind keine Knock-out-Tiere beschrieben und somit dessen physiologische Rolle unklar (Rose et al., 2018).

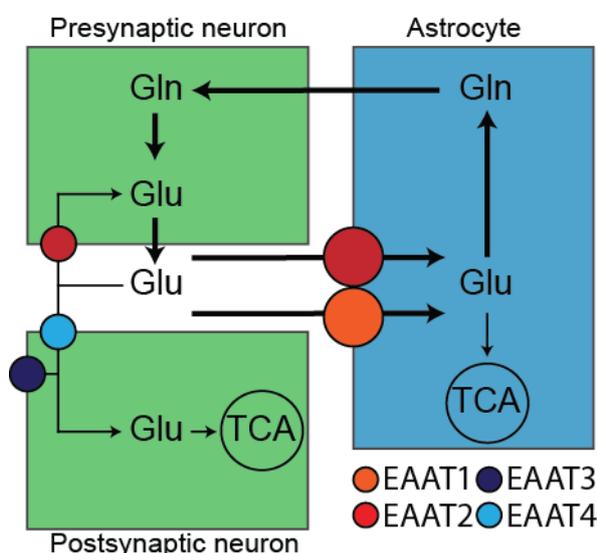


Abbildung 10: Schematische Darstellung einer präsynaptischen Glutamatfreisetzung (grüne Box oben) und nachfolgende Glutamataufnahme durch vorwiegend astrozytär exprimierte EAAT1- und 2 (blaue Box; rot und orangefarbener Kreis). Ein Großteil des aufgenommenen Glutamats wird in Glutamin (Gln) umgewandelt und in den Extrazellularraum entlassen und von Neuronen aufgenommen. In Neuronen kann Glutamin wieder zu Glutamat umgewandelt werden. Alternativ kann Glutamat zur Energiegewinnung im Zitratzyklus (TCA) oxidativ metabolisiert werden. Ein Teil des Glutamats (~ 10%) wird von neuronalen EAAT3 oder EAAT4 aufgenommen. Zudem gibt es Hinweise auf eine geringe EAAT2-vermittelte Glutamataufnahme in Präsynapsen. Abkürzungen: EAAT1-4: excitatory amino acid Transporter 1-4. Aus Rose et al., 2018.

4.4.4 Das EAAT-Expressionsprofil ändert sich während der Gehirnentwicklung

Die GluT-Expression nimmt über die Zeit zu. Interessanterweise überwiegt in jungen Nagetieren im Hippocampus wie auch im Kortex die Expression an EAAT1 (Schreiner et al., 2014; Hanson et al., 2015). In den ersten postnatalen Tagen (in Nagetieren) fungiert noch GABA als erregender Neurotransmitter (Ben-Ari, 2001; Rivera et al., 2005). Glutamat übernimmt diese Funktion erst zum Ende der ersten postnatalen Woche. Während dieser Zeit steigt in neuronal-astrozytärer Interaktion sowohl die Dichte an Astrozyten, die Zahl der synaptischen Verbindungen und deren Reifung als auch die Expression an EAAT2 (Ben-Ari, 2001; Schreiner et al., 2014; Rose et al., 2018). Im adulten Tier exprimieren Astrozyten dann überwiegend EAAT2 (Kugler und Schleyer, 2004; Morel et al., 2014; Hanson et al., 2015).

Funktionell können deshalb Glutamat-induzierte Na^+ -Transienten in Astrozyten des Hippocampus in adulten Knock-out-Mäusen für EAAT1 (GLAST(-/-)) mit einem EAAT2 spezifischen Inhibitor (DHK) nahezu vollständig inhibiert werden (Abb.11A rechts; Ziemens et al., Eingereicht). Das lässt den Schluss zu, dass EAAT1 in adulten Tieren eine untergeordnete Rolle bei der Glutamataufnahme spielt.

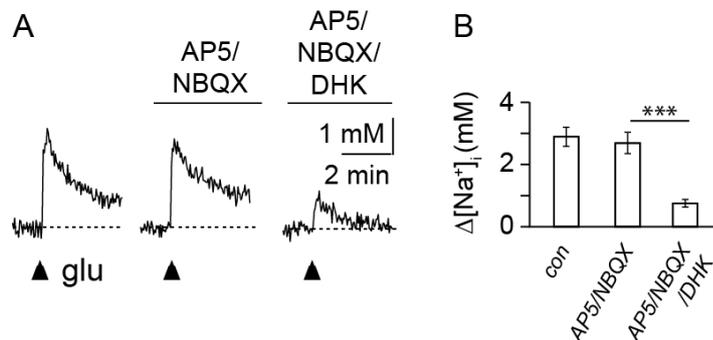


Abbildung 11: Glutamat-induzierte Na^+ -Signale eines hippocampalen Astrozyten in GLAST (-/-) Mäusen. Verglichen mit dem ersten Kontrollsignal haben Inhibitoren für ionotrope Glutamatrezeptoren (AP5/NBQX) keinen Einfluss auf das Na^+ -Signal. Nahezu vollständig kann das Signal allerdings durch den GLT-1- (EAAT2) Inhibitor DHK reduziert werden. Aus Ziemens et al., Eingereicht.

Einzig in Hirnregionen wie dem Kleinhirn und der Retina überwiegt auch im adulten Tier die Expression an EAAT1 in den dortigen Bergmann-Glia- bzw. Müllerzellen (Rose et al., 2018). Der Grund für das heterogene Expressionsprofil ist derzeit unklar, da gezeigt werden konnte, dass EAAT1 die extrazelluläre Glutamatkonzentration in einem vergleichbaren Maße verringern kann wie EAAT2 (Owe et al., 2006; Rose et al., 2018).

4.4.5 Modulation der synaptischen Transmission

GluT werden dynamisch an astrozytären Ausläufern auf- bzw. abgebaut und bestimmen somit die Stärke der synaptischen Transmission (Murphy-Royal et al., 2015). Immunohistochemisch konnten Cluster von EAATs bevorzugt an Ausläufern in der Nähe von aktiven Synapsen identifiziert werden (Cholet et al., 2002; Benediktsson et al., 2012), was eine Glutamat-

induzierte Expression suggeriert. Zudem führen Stimulationen der Schnurrhaare von Mäusen in den zugehörigen Bereichen des somatosensorischen Kortex (*Barrel Kortex*) zu einer Verdoppelung der EAAT1- und 2-Expression (Genoud et al., 2006). Neben der dynamischen GluT-Expression können auch ganze astrozytäre Ausläufer sich mitsamt der GluT zu Synapsen hin- bzw. wegbewegen und so die synaptische Übertragung modulieren (Hirrlinger et al., 2004; Pannasch et al., 2014).

Die lokale Glutamataufnahme unterstreicht zum einen den hohen Grad der Neuron-Astrozyten-Interaktion, besonders durch die Tatsache, dass freigesetztes Glutamat ohne Astrozyten nicht ausreichend „recycelt“ werden kann. Zum anderen sind Astrozyten durch bewegliche Ausläufer mit dynamisch exprimierten GluT in Nachbarschaft zu Synapsen in der Lage, die **Erregungsdauer** wie auch die **räumliche Ausbreitung** des Glutamats zu modellieren.

5. Astrozyten als heterogene Zellgruppe

Astrozyten sind eine heterogene Zellgruppe, die sich je nach Gehirnregion, neuronaler Umgebung oder während der Gehirnentwicklung auf **morphologischer**, **molekularer** als auch **funktioneller** Ebene unterscheiden können.

Auf funktioneller Ebene sind beispielsweise geringere Expressionsraten an gap junction-Proteinen (Connexin 30/43) oder K^+ -Kanäle ($K_{ir}4.1$) in fibrösen gegenüber protoplasmatischen Astrozyten bekannt (Nagy et al., 1999; Poopalasundaram et al., 2000). Zusätzlich variieren, wie oben beschrieben, in adulten Tieren GluT-Subtypen in ihrer Expressionsrate an Astrozyten in Retina und Kleinhirn gegenüber den übrigen Hirnregionen. Es existieren ferner aber auch Variationen innerhalb der protoplasmatischen Astrozyten. Zum Beispiel findet man eine stärkere gap junction-Kopplung der Astrozyten im *Barrel Kortex* (ein Barrel repräsentiert somatosensorisch ein Schnurrhaar in Nagetieren) als bei Astrozyten außerhalb dieser Barrels (Houades et al., 2008).

5.1 Ionotrope Glutamatrezeptoren in Astrozyten

Darüber hinaus existierten Hinweise auf eine regional heterogene Expression von ionotropen Glutamatrezeptoren (AMPA und NMDAR) auch an Astrozyten. Diese könnten ähnlich wie in Neuronen exprimiert sein und neben dem sekundär vermittelten Na^+ -Einstrom über GluT einen zusätzlichen Na^+ -Signalweg vermitteln. Dies ist bisher auf funktioneller Ebene noch nicht untersucht und beschrieben worden und ist Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

5.1.1 AMPA-Rezeptoren

AMPA sind Heterotetramere und können aus einer Kombination aus vier Untereinheiten bestehen (GluA1-GluA4; Hollmann und Heinemann, 1994), deren Existenz auch an Astrozyten in vielen Hirnregionen nachgewiesen wurde (darunter: Kortex, Hippocampus (in GluR Astrozyten), *Corpus callosum* und dem Kleinhirn (in Bergmann-Gliazellen; Gallo und Ghiani, 2000; Verkhratsky und Steinhäuser, 2000; Seifert und Steinhäuser, 2001). Die Komposition der Untereinheiten unterscheidet sich zwischen den Hirnregionen, wobei die Expression der GluA2-Untereinheit über die Ca^{2+} -Leitfähigkeit der AMPAR bestimmt. In Bergmann-Gliazellen im Kleinhirn fehlt die GluA2-Untereinheit, sodass dort exprimierte AMPAR eine höhere Ca^{2+} -Leitfähigkeit aufweisen als in GluA2-haltigen AMPAR in anderen Hirnregionen (Geiger et al., 1995). Aktivierte AMPAR in Astrozyten lassen neben Ca^{2+} auch Na^+ ein- und K^+ ausströmen, desensibilisieren aber sehr schnell (nach etwa 100 ms) und sind dann nicht mehr für Ionen permeabel (Abb.12; Verkhratsky und Kirchhoff, 2007). Aufgrund dieser Tatsache fehlt in den meisten Hirnregionen der funktionelle Nachweis für astrozytäre AMPAR. Die überzeugendsten funktionellen Nachweise findet man für Bergmann-Gliazellen im Kleinhirn, wo AMPAR-vermittelte Ca^{2+} -Transienten beschrieben wurden (Muller et al., 1992). Zusätzlich konnte in AMPAR Knock-out-Tieren (GluA1/GluA4 spezifisch) eine reduzierte Präsenz der Ausläufer an Synapsen, eine veränderte synaptische Transmission sowie Motorkoordination beobachtet werden (Saab et al., 2012). Für andere Regionen ist die funktionelle Relevanz nicht zweifelsfrei belegt.

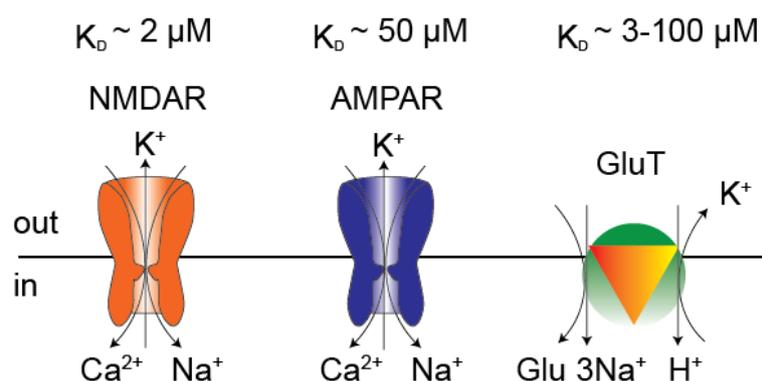


Abbildung 12: Glutamat-vermittelter Na^+ -Einstrom in Astrozyten. Glutamat kann an NMDAR binden, welche die höchste Affinität zu Glutamat aufweisen. Bei Öffnung fließen Na^+ und Ca^{2+} in den Intrazellularraum und 1K^+ wird nach außen befördert. Des Weiteren sind AMPAR in Astrozyten in vielen Gehirnregionen nachgewiesen und transportieren die Ionen genauso wie NMDAR, jedoch sind $\sim 25\text{x}$ weniger sensitiv für Glutamat. Zusätzlich wird Glutamat über GluT zusammen mit Na^+ in die Zelle aufgenommen. Ziemens D., unveröffentlicht.

5.1.2 Kainat-Rezeptoren

Kainat-Rezeptoren sind aus fünf Untereinheiten aufgebaut (KA1-2 und KA5-7; Lerma, 2003). Alle fünf Untereinheiten wurden in Astrozyten diverser Hirnregionen auf Protein oder mRNA-Ebene nachgewiesen (Garcia-Barcina und Matute, 1996; Brand-Schieber et al., 2004), jedoch gibt es derzeit keine Hinweise für ihre funktionelle Aktivierung und Relevanz.

5.1.3 NMDA-Rezeptoren

NMDAR sind Heterotetramere, die aus einer Kombination der Untereinheiten NR1, NR2A-D und NR3 bestehen können (Verkhratsky und Kirchhoff, 2007). Aktivierte NMDAR lassen, wie astrozytäre AMPAR, Na^+ und Ca^{2+} ein- bzw. K^+ ausströmen, sind jedoch $\sim 25\text{x}$ sensitiver für Glutamat und weisen unter physiologischen Bedingungen nahezu keine Desensibilisierung auf (Verkhratsky und Kirchhoff, 2007; Abb.12). Astrozytäre NMDAR haben gegenüber neuronalen NMDAR eine höhere Expression der NR3-Untereinheit, was wahrscheinlich dafür verantwortlich ist, dass sie nur etwa $\frac{1}{3}$ der Ca^{2+} -Leitfähigkeit und keinen Mg^{2+} -Block aufweisen (neuronale NMDAR sind bei Membranpotentialen von etwa -70 bis -40 mV durch einen Mg^{2+} -Block nicht aktivierbar; Mori und Mishina, 1995; Verkhratsky und Kirchhoff, 2007).

NMDAR sind in Astrozyten immunohistochemisch, auf Protein- und mRNA-Ebene im Kortex, Kleinhirn (Bergmann-Gliazellen) und in der Retina (Müllerzellen) detektiert worden (Luque und Richards, 1995; Conti et al., 1996; Puro et al., 1996; Van Bockstaele et al., 1996; Schipke et al., 2001). Für andere Hirnregionen fehlen entsprechende Nachweise.

Der funktionelle Nachweis von NMDAR an Astrozyten führte in der Vergangenheit je nach untersuchter Gehirnregion zu unterschiedlichen Ergebnissen. **Für kortikale Astrozyten bestehen allerdings einige überzeugende Hinweise:** NMDAR-vermittelte Einwärtsströme, die sensitiv für NMDAR-Inhibitoren sind; sowie NMDAR-vermittelte Ca^{2+} -Signale an distalen Ausläufern oder Somata (Schipke et al., 2001; Lalo et al., 2006; Palygin et al., 2010). **In anderen Regionen ist der funktionelle Nachweis hingegen umstritten:** In Bergmann-Gliazellen konnten zwar kleine NMDA-induzierte Einwärtsströme gemessen werden, jedoch war deren Profil eigentümlich: Das Umkehrpotential lag bei -40 mV (Membranpotential an dem der NMDAR seine Transporteigenschaften umkehrt) und die NMDAR zeigten keine Ca^{2+} -Leitfähigkeit (Muller et al., 1992). In Astrozyten aus dem Hippocampus konnten in Hirnschnitten oder isolierten Astrozyten in den meisten Fällen keine NMDA-induzierten Einwärtsströme oder Ca^{2+} -Signale gemessen werden (Seifert und Steinhäuser, 1995; Cai und Kimelberg, 1997). Vermeintliche NMDAR-vermittelte Ca^{2+} -Transienten waren teilweise

sensitiv für Tetrodotoxin (TTX; inhibiert spannungsabhängige Na^+ -Kanäle (überwiegend in Neuronen exprimiert)), was für sekundär vermittelte Signale spricht (Porter und McCarthy, 1995).

6. Heterogenität astrozytärer Na^+ -Signalgebung. Neue Erkenntnisse aus vorliegender Studie

Über ionotrope Glutamatrezeptoren vermittelter Na^+ -Einstrom könnte in Astrozyten regionsspezifisch zur bestehenden Na^+ -Signalgebung beitragen und vielfältige Konsequenzen haben. Um dies zu überprüfen wurden astrozytäre Na^+ -Signale im **visuellen Kortex** (wo Hinweise für eine funktionelle Expression von ionotropen Glutamatrezeptoren an Astrozyten vorliegen) und im **Hippocampus** (wo Hinweise für funktionelle ionotrope Glutamatrezeptoren an Astrozyten weitestgehend fehlen) stimuliert und nachfolgend hinsichtlich ihrer Entstehungsmechanismen charakterisiert. Für genauere methodische Informationen siehe Ziemens et al., Eingereicht. Die zentralen Ergebnisse werden nachfolgend diskutiert.

6.1 Ionotrope Glutamatrezeptoren vermitteln Na^+ -Einstrom in kortikalen Astrozyten

Na^+ -Signale können beispielsweise mittels elektrischer Stimulationen an afferenten Fasern, welches in präsynaptischer Glutamatfreisetzung resultiert, oder durch direkte Glutamat-Applikationen mittels feiner Pipetten in räumlicher Nähe ($25 \pm 5 \mu\text{m}$) der Zellen, erzeugt werden. Der Vergleich der stimulierten Na^+ -Transienten zeigt zunächst, dass unabhängig von der Stimulationsart die Na^+ -Signale der Astrozyten im Kortex um $\sim 50\%$ größer waren als im Hippocampus, obwohl die neuronalen Na^+ -Signale in beiden Hirnregionen ähnliche Amplituden aufwiesen (Abb. 13).

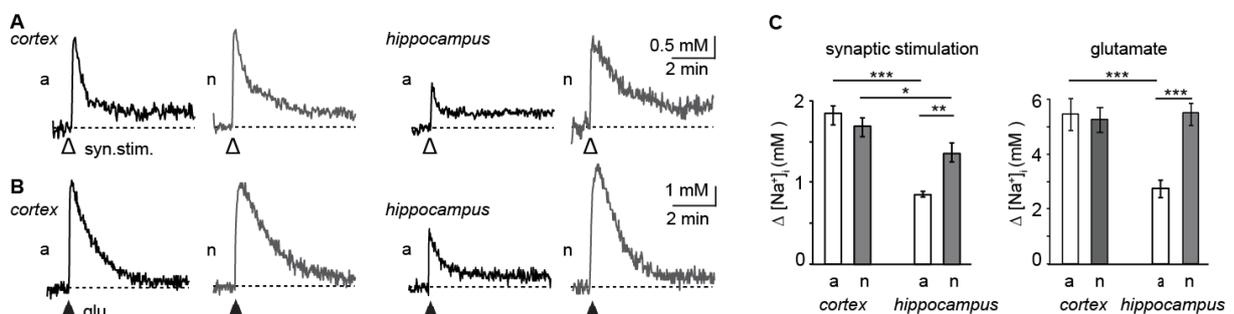


Abbildung 13: Glutamaterge Stimulation im Kortex und Hippocampus. Na^+ -Transienten induziert durch (A) synaptische Stimulation oder (B) über Druckapplikation von Glutamat; gemessen in Zellkörpern einzelner Astrozyten (a) und umgebenen Neuronen (n). C Histogramme zeigen die mittleren Amplituden der astrozytären und neuronalen Na^+ -Transienten \pm Standardfehler. *** repräsentiert einen signifikanten Unterschied von $p < 0.001$; **: $0.001 \leq p < 0.01$; *: $0.01 \leq p < 0.05$. Angepasst nach Ziemens et al., Eingereicht.

Dass wahrscheinlich zusätzlicher Na^+ -Einstrom über ionotrope Glutamatrezeptoren für die größeren Na^+ -Signale in kortikalen Astrozyten verantwortlich ist, zeigen pharmakologische Experimente mit spezifischen Inhibitoren für NMDAR, AMPAR oder GluT (Abb.14; Ziemens et al., Eingereicht).

In kortikalen Astrozyten waren die Na^+ -Signale bei beiden Stimulationsarten durch Inhibition der NMDAR (AP5) um $\sim 50\%$ reduziert (Abb.14A), während NBQX, ein Inhibitor für AMPAR nur bei direkter Glutamatapplikation einen kleinen Effekt zeigte (siehe Ziemens et al., Eingereicht). Zusätzliche Inhibition der GluT (durch TFB-TBOA) reduzierte die Na^+ -Signale nahezu komplett (Ziemens et al., Eingereicht).

Im Gegensatz dazu zeigten die Inhibitoren für ionotrope Glutamatrezeptoren in hippocampalen Astrozyten keinerlei Effekt auf die Na^+ -Signale (Abb.14B). Einzig die Inhibition der GluT durch TFB-TBOA reduzierte die Signale nahezu vollständig (Ziemens et al., Eingereicht).

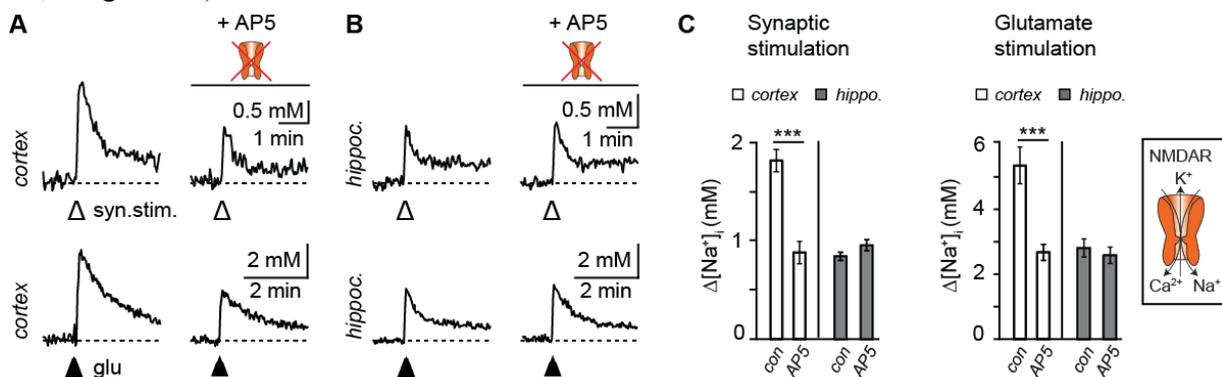


Abbildung 14: Pharmakologisches Profil von synaptisch- (obere Spuren) und Glutamat-stimulierten Na^+ -Signalen (untere Spuren); gemessen in Somata von Astrozyten im Kortex (A) und im Hippocampus (B). Das jeweils erste Signal ist ein Kontrollsignal ohne Inhibitoren. Die jeweils zweite Stimulation zeigt den Effekt des NMDAR-Inhibitors AP5 auf die Na^+ -Transienten. Histogramme in C (synaptische Stimulation; links) (Glutamat Applikation; rechts) zeigen die mittleren Amplituden der astrozytären Na^+ -Transienten \pm Standardfehler unter Kontrollbedingungen (con) und unter Einfluss des NMDAR-Inhibitors AP5. *** repräsentiert einen signifikanten Unterschied von $p < 0.001$; **: $0.001 \leq p < 0.01$; *: $0.01 \leq p < 0.05$. Angepasst nach Ziemens et al., Eingereicht.

Das deutet auf eine vorwiegend GluT-vermittelte Na^+ -Signalgebung in hippocampalen Astrozyten, wie bereits in früheren Arbeiten aus dem Hippocampus (Langer und Rose, 2009; Karus et al., 2015a), Kleinhirn (Kirischuk et al., 2007; Bennay et al., 2008) oder *Corpus callosum* (Moshrefi-Ravasdjani et al., 2018; siehe Abschnitt 4.4) beschrieben. Während die Inhibitoren für ionotrope Glutamatrezeptoren im Hippocampus keinen Effekt auf die astrozytären Signale hatten, reduzierten diese jedoch die Na^+ -Signale annähernd vollständig in den umgebenen Neuronen im Hippocampus sowie im Kortex (Ziemens et al., Eingereicht). Das unterstreicht die Funktionalität der Inhibitoren und die Relevanz der ionotropen Glutamatrezeptoren für die Na^+ -Signalgebung in Neuronen (Callaway und Ross, 1997;

Mondragao et al., 2016; Miyazaki und Ross, 2017; Ziemens et al., Eingereicht).

In kortikalen Astrozyten ist die Na^+ -Signalgebung wahrscheinlich neben den GluT auch zum Großteil durch funktionell exprimierte NMDAR vermittelt. Patch-Clamp-Experimente bestätigen zudem, dass Glutamat-vermittelte Einwärtsströme durch NMDAR-Inhibition (durch MK801) um ca. 60 % bzw. um fast 70 % (durch AP5) reduziert werden konnten (Lalo et al., 2006; Ziemens et al., Eingereicht; Abb.15). Dass AMPAR-vermittelte Na^+ -Signale in kortikalen Astrozyten wahrscheinlich eine untergeordnete Rolle spielen, kann dadurch begründet werden, dass AMPAR verglichen mit NMDAR zwar schnelle Einwärtsströme vermitteln, jedoch unter physiologischen Bedingungen rasch desensibilisieren (Lalo et al., 2006). Verhindert man die Desensibilisierung (durch Cyclothiazid) sind Amplituden von synaptisch induzierten Einwärtsströmen deutlich vergrößert (Lalo et al., 2006). Zusätzlich sind AMPAR $\sim 25\text{x}$ weniger sensitiv für Glutamat, sodass diese bei glutamaterger Stimulation wahrscheinlich weniger stark aktiviert werden als NMDAR.

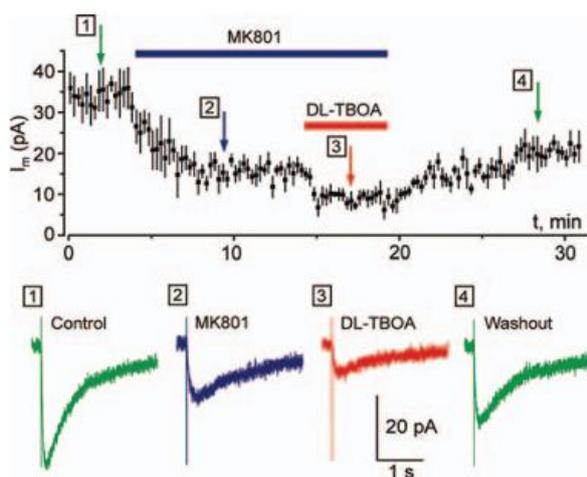


Abbildung 15: Synaptisch stimulierte Einwärtsströme in kortikalen Astrozyten. Die Einwärtsströme sind überwiegend sensitiv für den NMDAR-Inhibitor: MK801 (2). Der Einwärtsstrom konnte zudem weiter minimiert werden durch den GluT-Inhibitor: DL-TBOA (3). Der Effekt beider Inhibitoren war teilweise reversibel (Washout;4) Aus Verkhratsky und Kirchhoff, 2007.

Dass Aktivierung der NMDAR zu einem Na^+ -Einstrom in Astrozyten führen kann, bestätigen auch direkte Applikationen

von NMDA (Agonist für NMDAR). Dies führte im Kortex zu deutlichen Na^+ -Transienten in Astrozyten als auch in den umgebenen Neuronen (Abb.16A,B links). In hippocampalen Astrozyten konnten allerdings auch geringfügige kurzzeitige Na^+ -Erhöhungen gemessen werden. Diese waren aber im Vergleich zu den kortikalen Na^+ -Signalen deutlich kleiner und

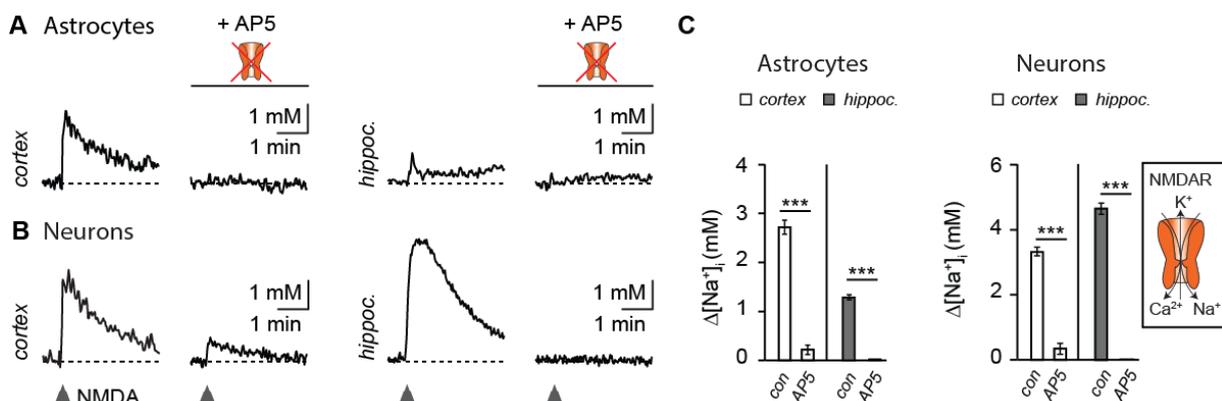


Abbildung 16: NMDA-induzierte Na^+ -Signale in Astrozyten (**A**) und in Neuronen (**B**) im Kortex (links) und Hippocampus (rechts). Die jeweils zweite Applikation zeigt den Effekt des NMDAR-Inhibitors AP5 auf die induzierten Na^+ -Signale **C:** Quantifizierung zu A und B. *** repräsentiert einen signifikanten Unterschied von $p < 0.001$; **: $0.001 \leq p < 0.01$; *: $0.01 \leq p < 0.05$. Bearbeitet nach Ziemens et al., Eingereicht.

kürzer, während die neuronalen Na^+ -Transienten im Hippocampus sogar größer waren als im Kortex (Abb.16A,B rechts). Direkte Aktivierung hippocampaler Astrozyten durch NMDA wurde zwar bereits in einer Studie beschrieben (Serrano et al., 2008), jedoch ist der funktionelle Nachweis - wie bereits in 5.1.3 dargestellt in hippocampalen Astrozyten nach wie vor kontrovers (Matthias et al., 2003; Lalo et al., 2011; Dzamba et al., 2013).

Die Studie zeigt also, dass die Na^+ -Signalgebung in hippocampalen Astrozyten überwiegend GluT-vermittelt ist (Abb.17), wobei kleine kurze NMDA-induzierte Na^+ -Signale in hippocampalen Astrozyten eine funktionelle NMDAR-Expression nicht vollständig ausschließen lassen (Serrano et al., 2008; Ziemens et al., Eingereicht). Die dargestellten Ergebnisse zeigen allerdings für kortikale Astrozyten erstmalig, dass aktivierte NMDAR zu einem substanziellen Na^+ -Einstrom beitragen können, welcher aktivitäts-induzierte Na^+ -Signale um etwa 50 % verstärkt (Abb.17).

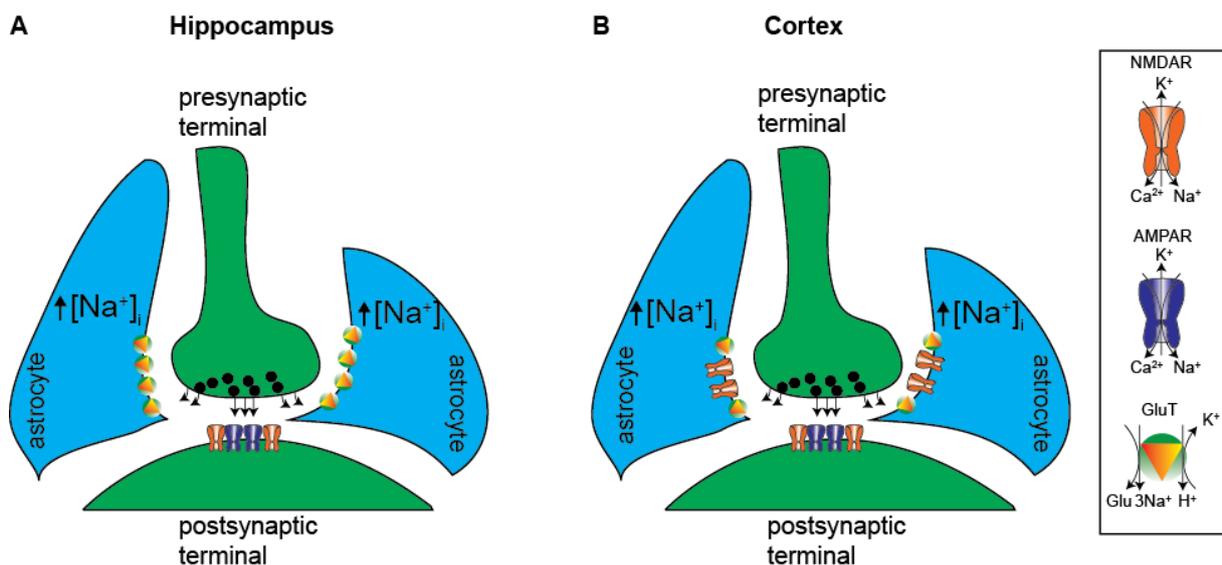


Abbildung 17. A: Schematische Darstellung einer dreiteiligen Synapse im Hippocampus. Präsynaptisch freigesetztes Glutamat induziert Na^+ -Transienten in der Postsynapse über Bindung an ionotrope Glutamatrezeptoren (AMPA/NMDA). In Astrozyten ist die Na^+ -Signalgebung überwiegend durch die Na^+ -assoziierte Glutamataufnahme vermittelt. **B:** Schematische Darstellung einer dreiteiligen Synapse im Kortex. Präsynaptisch freigesetztes Glutamat induziert Na^+ -Transienten in der Postsynapse über Bindung an ionotrope Glutamatrezeptoren (AMPA/NMDA). In Astrozyten tragen zusätzlich neben der Na^+ -assoziierten Glutamataufnahme auch NMDAR zum Na^+ -Einstrom bei. Ziemens D., unveröffentlicht.

6.2 NMDAR vermitteln globale Na^+ - und lokale Ca^{2+} -Signale

Astrozytäre NMDAR wurden immunohistochemisch vorwiegend an distalen Ausläufern im Kortex nachgewiesen (Aoki et al., 1994; Conti et al., 1996), allerdings zeigen lokale NMDA-

Stimulationen an astrozytären Ausläufern, dass Na^+ -Signale in Ausläufern und Somata eine vergleichbare Amplitude aufweisen (Abb. 18A). Wenngleich der Haupteinstrom von Na^+ an distalen Ausläufern stattfindet, diffundiert Na^+ in Astrozyten ungepuffert mit einer Geschwindigkeit von 60-120 μm pro Sekunde (Mondragao et al., 2016; Langer et al., 2017), sodass die zeitliche Komponente in diesen Messungen wahrscheinlich nicht erfasst wurde.

Anders als für Na^+ existieren für Ca^{2+} in Astrozyten diverse Bindeproteine und Puffer wie z.B. S100 β , Calmodolin, Troponin C und einige weitere, welche die Ca^{2+} -Signalgebung entweder lokal begrenzen und/oder die Diffusionsgeschwindigkeit deutlich reduzieren (auf 10-30 $\mu\text{m}/\text{s}$; Giaume und Venance, 1998; Berridge et al., 2003; Scemes und Giaume, 2006). Demzufolge resultierten lokale NMDA-Applikationen an astrozytären Ausläufern in auf den Ausläufer begrenzte Ca^{2+} -Signale, die nur selten den Zellkörper erreichten (Abb.18B). Die fehlenden somatischen Ca^{2+} -Transienten sind nicht auf mangelnde Diffusion des Agonisten zurückzuführen, denn direkte NMDA-Applikationen in Nähe der Somata induzierten keine Ca^{2+} -Signale im Soma, hingegen aber kleine Signale in den Ausläufern (Ziemens et al., Eingereicht). Neuronale Somata in Nähe der Applikationspipette generierten bei Applikation deutlich größere Ca^{2+} -Transienten als die astrozytären Ausläufer, was auf eine höhere Dichte an NMDAR und/oder die bereits erwähnte höhere Leitfähigkeit für Ca^{2+} schließen lässt (Abb.18B rechts).

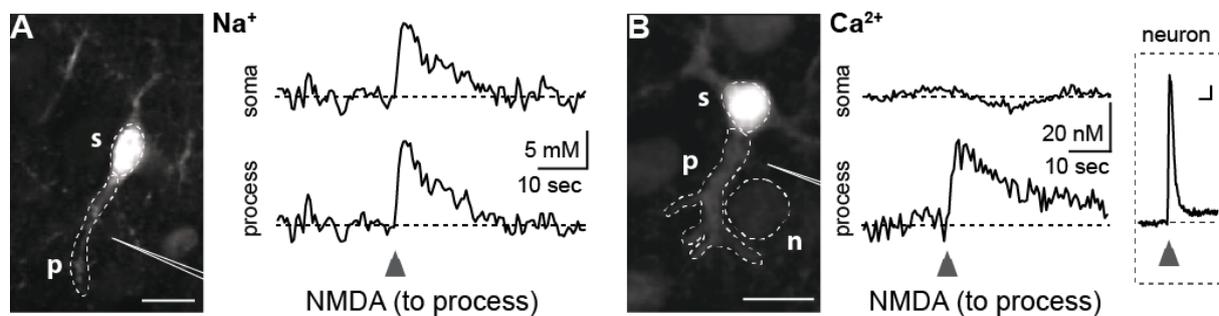


Abbildung 18: NMDA-induzierte Na^+ - und Ca^{2+} -Signale in Astrozyten und Neuronen im Kortex, gemessen am Zwei-Photonen-Mikroskop. **A:** Bild eines SBFI-gefärbten Astrozyten. NMDA-Applikation am Ausläufer (schematisch angedeutet) resultiert in vergleichbaren Na^+ -Signalen im Soma und Ausläufer (rechts) **B:** Bild eines OGB-1-gefärbten Astrozyten und Neuron. NMDA-Applikation am Ausläufer resultiert in Ca^{2+} -Signalen im Ausläufer und im neuronalen Soma (Skalierung Neuron: 100 nM; 10 sec). „Regions of Interests“: dargestellt durch gestrichelte Linien (s: Soma; p: Process/Ausläufer; n: Neuron). Maßstabsbalken: 10 μm . Angepasst nach Ziemens et al., Eingereicht.

6.3 NMDAR-vermittelter Na^+ -Einstrom lässt die Transportrichtung des NCX umdrehen

Die Natrium- und Calciumhomöostase ist über die Aktivität des Natrium-Calcium-Austauschers (NCX) eng miteinander verknüpft. Interessanterweise ist die NCX- wie auch die

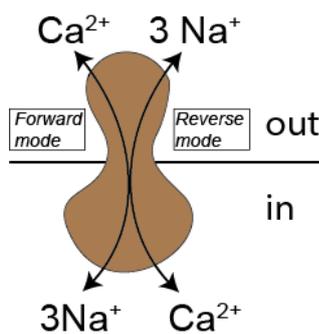


Abbildung 19:
Der NCX tauscht unter Ruhebedingungen im *forward mode* 3 Na⁺ in das Zellinnere gegen 1 Ca²⁺ in den Extrazellularraum. Der NCX kann seine Transportrichtung umkehren und auch im *reverse mode* arbeiten und so Ca²⁺ in- bzw. Na⁺ aus der Zelle befördern. Ziemens, unveröffentlicht.

NMDAR-Expression vorwiegend an distalen Ausläufern in kortikalen Astrozyten konzentriert. (Minelli et al., 2007). Unter Ruhebedingungen arbeitet der NCX im *forward mode* als Ca²⁺-Exporter und tauscht 1 Ca²⁺ in den Extrazellularraum gegen 3 Na⁺ in den Intrazellularraum aus (Abb.19). Allerdings ist das Umkehrpotential des NCX nahe dem Ruhemembranpotential der Astrozyten, sodass bei erhöhten Natrium- oder Calciumkonzentrationen der NCX seine Transporteigenschaften umkehren und als Calcium-Importer fungieren kann (*reverse mode*; Blaustein und Lederer, 1999; Abb.19). Dies wurde bereits unter physiologischen als auch pathophysiologischen Bedingungen beschrieben (Carafoli und Longoni, 1987; Kirischuk et al., 2012; Boddum et al., 2016; Gerkau et al., 2017). Auch für die hier präsentierten NMDA-induzierten Ca²⁺-Signale konnte eine NCX-Beteiligung im *reverse mode* gezeigt werden. Denn bei pharmakologischer Inhibition des NCX (durch KB-R9743; KBR) waren NMDA-induzierte Ca²⁺-Transienten gegenüber den Kontrollbedingungen um ~ 45% verkürzt (Abb.20). Ein Phänomen, das reversibel war.

A calcium (processes)

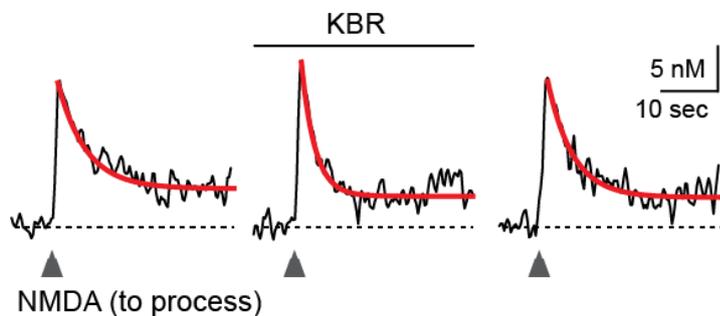
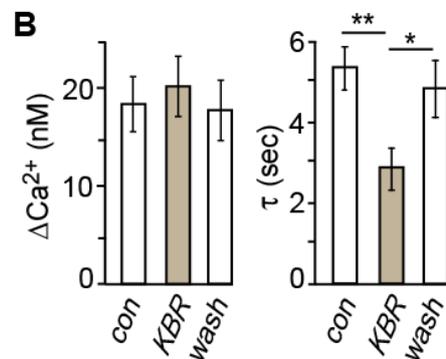


Abbildung 20: Repetitive NMDA-induzierte Ca²⁺-Signale in astrozytären Ausläufern im Kortex. **A:** Nach einem ersten Kontrollsignal wurde ein weiteres Ca²⁺-Signal unter Einfluss des NCX-Inhibitors KBR und ein drittes Signal nach einem Auswaschen des Inhibitors stimuliert. Die Abfallzeitkonstante (τ) des Signals ist durch die rote Linie angedeutet. **B:** Quantifizierung zu A. *** repräsentiert einen signifikanten Unterschied von $p < 0.001$; **: $0.001 \leq p < 0.01$; *: $0.01 \leq p < 0.05$. Aus Ziemens et al., Eingereicht.



Es konnte also zum ersten Mal gezeigt werden, dass NMDAR-vermittelte Signale in Astrozyten den NCX in seiner Transportrichtung umdrehen lassen und dieser zur lokalen Ca²⁺-Signalgebung beiträgt. Mathematische Berechnungen, auf Grundlage der experimentellen Daten dieser Studie (unter anderem NMDA-induzierte Na⁺-, Ca²⁺- und Spannungsänderungen als auch das Volumen der Ausläufer), konnten den NCX-vermittelten Ca²⁺-Einstrom bestimmen (Ziemens et al., Eingereicht; Abb.21A). Unter Ruhebedingungen (vor der Stimulation mit NMDA) arbeitet der NCX im *forward mode*, wechselt dann bei

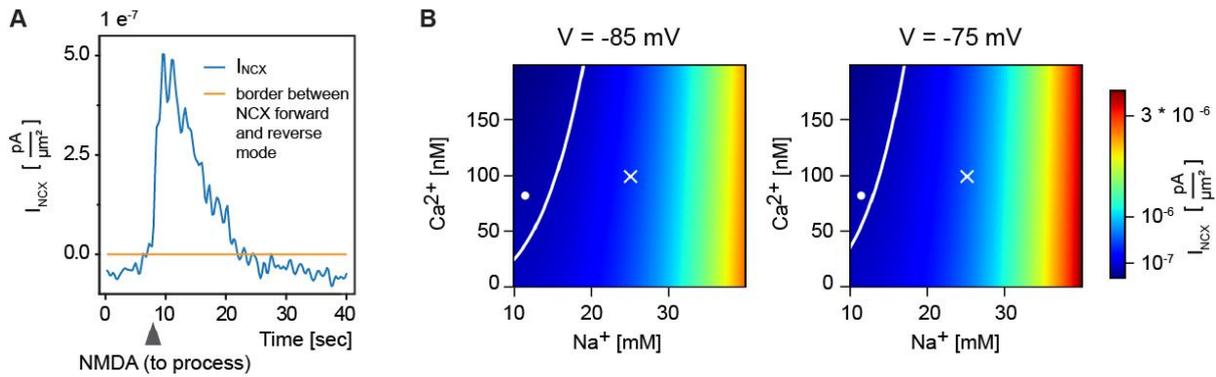


Abbildung 21. A: Berechneter NCX-vermittelter Ca^{2+} -Einstrom bei NMDA-Applikation am Ausläufer. Die orangefarbene Linie markiert die Grenze zwischen dem *forward*- und dem *reverse mode* des NCX. **B:** zeigt die Einstromstärke (Farbcode) in Abhängigkeit zur Na^+ - und Ca^{2+} -Konzentration unter ruhe Bedingungen (-85mV; links) und bei NMDA-induzierter Depolarisation (-75mV; rechts). Die weiße Linie zeigt jeweils die Grenze zwischen dem *forward*- und dem *reverse mode* des NCX (links *forward*; rechts *reverse*). Der Punkt markiert die Ruhe Na^+ - und Ca^{2+} -Konzentration. Das Kreuz markiert die mittlere Na^+ - und Ca^{2+} -Konzentration bei NMDA-Applikation. Angepasst nach Ziemens et al., Eingereicht.

NMDA-Applikation für etwa 12 Sekunden in den *reverse mode* und trägt zum Ca^{2+} -Einstrom bei. Dass vor allem der transiente NMDAR-vermittelte Na^+ -Einstrom in den Ausläufer zur Umkehr des NCX führt, illustrieren die Diagramme in 21B. Dabei zeigt sich, dass nur wenige mM Änderung der $[\text{Na}^+]_i$ ausreichen, um die NCX-Transportrichtung umzudrehen, während die transiente Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ eine untergeordnete Rolle spielt (Abb.21 B).

6.4 Physiologische Relevanz

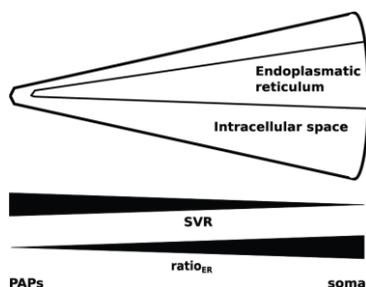


Abbildung 22: Das Verhältnis der Membranoberfläche zum Volumen im Intrazellularraum nimmt vom Soma zu den Ausläufern (PAP's) zu, während gleichzeitig das Volumen des ERs abnimmt. Angepasst nach Oschmann et al., 2017.

In den Somata der Astrozyten werden Ca^{2+} -Signale überwiegend durch Ca^{2+} -Freisetzung aus internen Ca^{2+} -Speichern (vorwiegend das Endoplasmatische Retikulum; ER) generiert. Dies geschieht durch Aktivierung von metabotropen Glutamatrezeptoren (mGluR), welche die Produktion der Phospholipase C als auch des *second messenger* Moleküls Inositoltriphosphat (IP_3) stimulieren (Aguilhon et al., 2008). IP_3 kann nachfolgend an IP_3 -Rezeptoren am ER binden und so zur Ca^{2+} -Freisetzung aus dem ER in den Intrazellularraum führen. (Pasti et al., 1997; Aguilhon et al., 2008).

Im Gegensatz dazu fehlen in distalen Ausläufern interne Ca^{2+} -Speicher (Patrushev et al., 2013; Srinivasan et al., 2015), da das Verhältnis der Membranoberfläche zum Volumen des Intrazellularraums vom Soma zu den Ausläufern steigt bzw. das Volumen des ERs abnimmt (Abb.22). Die NMDAR-vermittelte Umkehr des NCX moduliert also die über die Plasmamembran generierte Ca^{2+} -Signalgebung. Lokale Ca^{2+} -

Signalgebung kann vielseitige Konsequenzen haben wie beispielsweise die Freisetzung von Gliotransmittern (Halassa et al., 2007) oder die Beeinflussung des Blutflusses (Fiacco und McCarthy, 2006). Zudem kann aufgrund der NMDAR-vermittelten Na^+ -Signalgebung in kortikalen- gegenüber hippocampalen Astrozyten auf höhere Energieanforderungen geschlossen werden. Dies könnte vor allen Dingen unter metabolischem Stress wie der Ischämie relevant sein und bedarf einer weitergehenden Untersuchung.

7. Publikationen und Manuskripte

Aus Gründen des Kopierschutzes wurden für die Veröffentlichung dieser Dissertation die Publikationen entfernt und lediglich die Zusammenfassungen darstellt.

Publizierte Manuskripte

Seiten: 30-38

Lactate rescues neuronal sodium homeostasis during impaired energy metabolism.

Karus C, **Ziemens D**, Rose CR

Channels (Austin), 4;9(4):200-8. Epub 2015 Jun 3.(2015)

Recently, we established that recurrent activity evokes network sodium oscillations in neurons and astrocytes in hippocampal tissue slices. Interestingly, metabolic integrity of astrocytes was essential for the neurons' capacity to maintain low sodium and to recover from sodium loads, indicating an intimate metabolic coupling between the 2 cell types. Here, we studied if lactate can support neuronal sodium homeostasis during impaired energy metabolism by analyzing whether glucose removal, pharmacological inhibition of glycolysis and/or addition of lactate affect cellular sodium regulation. Furthermore, we studied the effect of lactate on sodium regulation during recurrent network activity and upon inhibition of the glial Krebs cycle by sodium-fluoroacetate. Our results indicate that lactate is preferentially used by neurons. They demonstrate that lactate supports neuronal sodium homeostasis and rescues the effects of glial poisoning by sodium-fluoroacetate. Altogether, they are in line with the proposed transfer of lactate from astrocytes to neurons, the so-called astrocyte-neuron-lactate shuttle.

Impact Faktor: 2,5

Die Daten für die Abbildungen 1 und 2 wurden während des Masterstudiums erhoben und bereits in meine Masterarbeit präsentiert. Die Daten wurden anschließend während meiner Promotion zusätzlich veröffentlicht.

Mein Betrag zur Publikation während der Promotion war:

- Ideen zur Darstellung der Ergebnisse
- Prüfung des Manuskriptes
- Beteiligung Revision des Manuskriptes

Seiten: 40-53

Molecular and cellular physiology of sodium-dependent glutamate transporters

Rose CR, **Ziemens D**, Untiet V, Fahlke C.

Brain Res Bull, 28. pii: S0361-9230(16)30482-8. (2018)

Glutamate is the major excitatory transmitter in the vertebrate brain. After its release from presynaptic nerve terminals, it is rapidly taken up by high-affinity sodium-dependent plasma membrane transporters. While both neurons and glial cells express these excitatory amino acid transporters (EAATs), the majority of glutamate uptake is accomplished by astrocytes, which convert synaptically-released glutamate to glutamine or feed it into their own metabolism. Glutamate uptake by astrocytes not only shapes synaptic transmission by regulating the availability of glutamate to postsynaptic neuronal receptors, but also protects neurons from hyper-excitability and subsequent excitotoxic damage. In the present review, we provide an overview of the molecular and cellular characteristics of sodium-dependent glutamate transporters and their associated anion permeation pathways, with a focus on astrocytic glutamate transport. We summarize their functional properties and roles within tripartite synapses under physiological and pathophysiological conditions, exemplifying the intricate interactions and interrelationships between neurons and glial cells in the brain.

Impact Faktor: 3,4

Mein Betrag zur Publikation war:

- Planung und Konzeptualisierung
- Zusammenstellung der Abbildungen 1,4,5
- Prüfung des Manuskriptes
- Revision des Manuskriptes

Action potential firing induces sodium transients in macroglial cells of the mouse corpus callosum

Moshrefi-Ravasdjani B, **Ziemens D**, Pape N, Färfers M, Rose CR

Neuroglia, 1(1), 106-125 (2018)

Recent work has established that glutamatergic synaptic activity induces transient sodium elevations in grey matter astrocytes by stimulating glutamate transporter 1 (GLT-1) and glutamate-aspartate transporter (GLAST). Glial sodium transients have diverse functional consequences but are largely unexplored in white matter. Here, we employed ratiometric imaging to analyse sodium signalling in macroglial cells of mouse corpus callosum. Electrical stimulation resulted in robust sodium transients in astrocytes, oligodendrocytes and NG2 glia, which were blocked by tetrodotoxin, demonstrating their dependence on axonal action potentials (APs). Action potential-induced sodium increases were strongly reduced by combined inhibition of ionotropic glutamate receptors and glutamate transporters, indicating that they are related to release of glutamate. While AMPA receptors were involved in sodium influx into all cell types, oligodendrocytes and NG2 glia showed an additional contribution of NMDA receptors. The transporter subtypes GLT-1 and GLAST were detected at the protein level and contributed to glutamate-induced glial sodium signals, indicating that both are functionally relevant for glutamate clearance in corpus callosum. In summary, our results demonstrate that white matter macroglial cells experience sodium influx through ionotropic glutamate receptors and glutamate uptake upon AP generation. Activity-induced glial sodium signalling may thus contribute to the communication between active axons and macroglial cells.

Impact Faktor: Neu gegründetes Journal daher nicht verfügbar

Mein Beitrag zur Publikation war:

- Die Durchführung von Kontrollexperimenten (Repetitive elektrische Stimulationen) sowie deren Auswertung
- Darstellung der Ergebnisse in Abb.1 A und D
- Interpretation der Daten
- Prüfung des Manuskriptes
- Revision des Manuskriptes und der Abbildungen
- Revision des Manuskriptes

Eingereichtes Manuskript

Seiten: 76-121

Mechanisms and consequences of sodium signals in astrocytes of the mouse neocortex

Ziemens D, Oschmann F, Gerkau NJ, Rose CR

Eingereicht in *Journal of Neuroscience*

Activity-related sodium signaling resulting from activation of glutamate uptake represents a new form of astrocyte excitability. Astrocytes of the neocortex, as opposed to the hippocampus proper, also express ionotropic glutamate receptors, which might provide additional sodium influx pathways. We compared the mechanisms of sodium signaling in astrocytes and neurons in tissue slices of the neocortex and hippocampus of mice of both sexes, employing wide field and multiphoton imaging. Stimulation of glutamatergic afferents or glutamate application induced sodium transients that were twice as large in astrocytes of the neocortex than in the hippocampal CA1 area, despite similar neuronal responses. Astrocyte sodium signals were reduced by ~50% upon blocking of NMDA receptors in the neocortex, but not the hippocampus. Neocortical, but not hippocampal, astrocytes exhibited marked sodium increases in response to NMDA. Moreover, NMDA evoked local calcium transients in processes of neocortical astrocytes, which were dampened upon blocking sodium/calcium exchange (NCX) with KB-R7943. Mathematical computation based on our data predict that NMDA-induced sodium increases drive the NCX into reverse mode, resulting in calcium influx. Taken together, our study reveals a considerable regional heterogeneity in astrocyte sodium signaling. Neocortical astrocytes respond with much larger sodium transients to glutamatergic activity than hippocampal astrocytes. Moreover, they experience NMDA-receptor-mediated sodium influx, which hippocampal astrocytes lack. NMDA-mediated sodium increases promote import of calcium through reverse NCX in astrocyte processes, adding to the calcium influx through NMDA receptors. This pathway thereby represents a new mechanism for the generation of local astrocyte calcium signaling in the neocortex.

Impact factor 2017: 5.9

Mein Beitrag zur Publikation war:

- Planung und Konzeptualisierung
- Etwa 90 % der Messungen wie illustriert in Abbildung 1-6
- Interpretation und Gestaltung der Daten in den präsentierten Abbildungen
- Prüfung des Manuskriptes
- Revision des Manuskriptes

8. Literaturverzeichnis

- Agulhon C, Petravicz J, McMullen AB, Sweger EJ, Minton SK, Taves SR, Casper KB, Fiacco TA, McCarthy KD (2008) What is the role of astrocyte calcium in neurophysiology? *Neuron* 59:932-946.
- Allen NJ, Barres BA (2009) Neuroscience: glia-more than just brain glue. *Nature* 457:675.
- Andriezen WL (1893) The neuroglia elements in the human brain. *British medical journal* 2:227.
- Aoki C, Venkatesan C, Go C, Mong JA, Dawson TM (1994) Cellular and subcellular localization of NMDA-R1 subunit immunoreactivity in the visual cortex of adult and neonatal rats. *Journal of Neuroscience* 14:5202-5222.
- Araque A, Parpura V, Sanzgiri RP, Haydon PG (1999) Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci* 22:208-215.
- Bak LK, Schousboe A, Waagepetersen HS (2006) The glutamate/GABA-glutamine cycle: aspects of transport, neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer. *J Neurochem* 98:641-653.
- Ballabh P, Braun A, Nedergaard M (2004) The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiology of disease* 16:1-13.
- Barros LF, Deitmer JW (2010) Glucose and lactate supply to the synapse. *Brain Res Rev* 63:149-159.
- Bear MF, Connors BW, Engel A, Held A, Hornung C, Jarosch B, Lange C, Maxam G, Niehaus-Osterloh M, Paradiso MA (2008) *Neurowissenschaften: Ein grundlegendes Lehrbuch für Biologie, Medizin und Psychologie*: Spektrum Akademischer Verlag.
- Belanger M, Allaman I, Magistretti PJ (2011) Brain energy metabolism: focus on astrocyte-neuron metabolic cooperation. *Cell Metab* 14:724-738.
- Ben-Ari Y (2001) Developing networks play a similar melody. *Trends Neurosci* 24:353-360.
- Benediktsson AM, Marrs GS, Tu JC, Worley PF, Rothstein JD, Bergles DE, Dailey ME (2012) Neuronal activity regulates glutamate transporter dynamics in developing astrocytes. *Glia* 60:175-188.
- Bennay M, Langer J, Meier SD, Kafitz KW, Rose CR (2008) Sodium signals in cerebellar Purkinje neurons and Bergmann glial cells evoked by glutamatergic synaptic transmission. *Glia* 56:1138-1149.
- Bernardinelli Y, Muller D, Nikonenko I (2014) Astrocyte-synapse structural plasticity. *Neural plasticity* 2014.
- Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL (2003) Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:517-529.
- Bezzi P, Carmignoto G, Pasti L, Vesce S, Rossi D, Rizzini BL, Pozzan T, Volterra A (1998) Prostaglandins stimulate calcium-dependent glutamate release in astrocytes. *Nature* 391:281.
- Billups D, Marx M-C, Mela I, Billups B (2013) Inducible presynaptic glutamine transport supports glutamatergic transmission at the calyx of Held synapse. *Journal of Neuroscience* 33:17429-17434.
- Bittar PG, Charnay Y, Pellerin L, Bouras C, Magistretti PJ (1996) Selective distribution of lactate dehydrogenase isoenzymes in neurons and astrocytes of human brain. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 16:1079-1089.
- Blaustein MP, Lederer WJ (1999) Sodium/calcium exchange: its physiological implications. *Physiol Rev* 79:763-854.
- Boddum K, Jensen TP, Magloire V, Kristiansen U, Rusakov DA, Pavlov I, Walker MC (2016) Astrocytic GABA transporter activity modulates excitatory neurotransmission. *Nat Commun* 7:13572.
- Brand-Schieber E, Lowery SL, Werner P (2004) Select ionotropic glutamate AMPA/kainate receptors are expressed at the astrocyte-vessel interface. *Brain research* 1007:178-182.
- Bröer A, Albers A, Setiawan I, Edwards RH, Chaudhry FA, Lang F, Wagner CA, Bröer S (2002) Regulation of the glutamine transporter SN1 by extracellular pH and intracellular sodium ions. *The Journal of physiology* 539:3-14.
- Brown AM, Ransom BR (2007) Astrocyte glycogen and brain energy metabolism. *Glia* 55:1263-1271.
- Bushong EA, Martone ME, Jones YZ, Ellisman MH (2002) Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains. *Journal of Neuroscience* 22:183-192.

- Cai Z, Kimelberg HK (1997) Glutamate receptor-mediated calcium responses in acutely isolated hippocampal astrocytes. *Glia* 21:380-389.
- Callaway JC, Ross WN (1997) Spatial distribution of synaptically activated sodium concentration changes in cerebellar Purkinje neurons. *J Neurophysiol* 77:145-152.
- Carafoli E, Longoni S (1987) The plasma membrane in the control of the signaling function of calcium. *Soc Gen Physiol Ser* 42:21-29.
- Chatton JY, Magistretti PJ, Barros LF (2016) Sodium signaling and astrocyte energy metabolism. *Glia* 64:1667-1676.
- Chesler M (2003) Regulation and modulation of pH in the brain. *Physiological reviews* 83:1183-1221.
- Cholet N, Pellerin L, Magistretti P, Hamel E (2002) Similar perisynaptic glial localization for the Na⁺, K⁺-ATPase α 2 subunit and the glutamate transporters GLAST and GLT-1 in the rat somatosensory cortex. *Cerebral Cortex* 12:515-525.
- Chuquet J, Quilichini P, Nimchinsky EA, Buzsaki G (2010) Predominant enhancement of glucose uptake in astrocytes versus neurons during activation of the somatosensory cortex. *J Neurosci* 30:15298-15303.
- Clapham DE (2007) Calcium signaling. *Cell* 131:1047-1058.
- Coco S, Calegari F, Pravettoni E, Pozzi D, Taverna E, Rosa P, Matteoli M, Verderio C (2002) Storage and release of ATP from astrocytes in culture. *Journal of Biological Chemistry*.
- Conti F, DeBiasi S, Minelli A, Melone M (1996) Expression of NR1 and NR2A/B subunits of the NMDA receptor in cortical astrocytes. *Glia* 17:254-258.
- Danbolt NC (2001) Glutamate uptake. *Prog Neurobiol* 65:1-105.
- Diaspro A, Bianchini P, Vicidomini G, Faretta M, Ramoino P, Usai C (2006) Multi-photon excitation microscopy. *Biomedical engineering online* 5:36.
- Dimmer KS, Friedrich B, Florian L, Deitmer JW, Bröer S (2000) The low-affinity monocarboxylate transporter MCT4 is adapted to the export of lactate in highly glycolytic cells. *Biochemical Journal* 350:219-227.
- Dzamba D, Honsa P, Anderova M (2013) NMDA Receptors in Glial Cells: Pending Questions. *Curr Neuropharmacol* 11:250-262.
- Eroglu C, Barres BA (2010) Regulation of synaptic connectivity by glia. *Nature* 468:223-231.
- Fiacco TA, McCarthy KD (2006) Astrocyte calcium elevations: properties, propagation, and effects on brain signaling. *Glia* 54:676-690.
- Gallo V, Ghiani CA (2000) Glutamate receptors in glia: new cells, new inputs and new functions. *Trends in Pharmacological Sciences* 21:252-258.
- García-Marín V, García-López P, Freire M (2007) Cajal's contributions to glia research. *Trends in neurosciences* 30:479-487.
- Garcia-Barcina JM, Matute C (1996) Expression of kainate-selective glutamate receptor subunits in glial cells of the adult bovine white matter. *European Journal of Neuroscience* 8:2379-2387.
- Geiger JR, Melcher T, Koh D-S, Sakmann B, Seeburg PH, Jonas P, Monyer H (1995) Relative abundance of subunit mRNAs determines gating and Ca²⁺ permeability of AMPA receptors in principal neurons and interneurons in rat CNS. *Neuron* 15:193-204.
- Genoud C, Quairiaux C, Steiner P, Hirling H, Welker E, Knott GW (2006) Plasticity of astrocytic coverage and glutamate transporter expression in adult mouse cortex. *PLoS biology* 4:e343.
- Gerkau NJ, Rakers C, Durry S, Petzold G, Rose CR (2017) Reverse NCX attenuates cellular sodium loading in metabolically compromised cortex. *Cerebral Cortex* Nov 9:1-7.
- Giaume C, Venance L (1998) Intercellular calcium signaling and gap junctional communication in astrocytes. *Glia* 24:50-64.
- Golgi C (1870) Sulla sostanza connettiva del cervello (nevrogli). *Rendiconti del R Istituto Lombardo di Scienze e Lettere* 3:275-277.
- Golgi C (1885) Sulla fina anatomia degli organi centrali del sistema nervoso: S. Calderini.
- Grosche J, Matyash V, Möller T, Verkhratsky A, Reichenbach A, Kettenmann H (1999) Microdomains for neuron-glia interaction: parallel fiber signaling to Bergmann glial cells. *Nature neuroscience* 2:139.
- Halassa MM, Fellin T, Haydon PG (2007) The tripartite synapse: roles for gliotransmission in health and disease. *Trends in molecular medicine* 13:54-63.

- Hanson E, Armbruster M, Cantu D, Andresen L, Taylor A, Danbolt NC, Dulla CG (2015) Astrocytic glutamate uptake is slow and does not limit neuronal NMDA receptor activation in the neonatal neocortex. *Glia* 63:1784-1796.
- Heinemann U, Lux HD (1977) Ceiling of stimulus induced rises in extracellular potassium concentration in the cerebral cortex of cat. *Brain research* 120:231-249.
- Heinemann U, Lux H, Gutnick M (1978) Changes in extracellular free calcium and potassium activity in the somatosensory cortex of cats. In: *Abnormal neuronal discharges*, pp 329-345: Raven Press New York.
- Hirrlinger J, Hülsmann S, Kirchhoff F (2004) Astroglial processes show spontaneous motility at active synaptic terminals in situ. *European Journal of Neuroscience* 20:2235-2239.
- Hollmann M, Heinemann S (1994) Cloned glutamate receptors. *Annual review of neuroscience* 17:31-108.
- Houades V, Koulakoff A, Ezan P, Seif I, Giaume C (2008) Gap junction-mediated astrocytic networks in the mouse barrel cortex. *Journal of Neuroscience* 28:5207-5217.
- Huang YH, Dykes-Hoberg M, Tanaka K, Rothstein JD, Bergles DE (2004) Climbing fiber activation of EAAT4 transporters and kainate receptors in cerebellar Purkinje cells. *Journal of Neuroscience* 24:103-111.
- Kafitz KW, Meier SD, Stephan J, Rose CR (2008) Developmental profile and properties of sulforhodamine 101-labeled glial cells in acute brain slices of rat hippocampus. *J Neurosci Methods* 169:84-92.
- Kang J, Jiang L, Goldman SA, Nedergaard M (1998) Astrocyte-mediated potentiation of inhibitory synaptic transmission. *Nature neuroscience* 1:683.
- Karus C, Mondragao MA, Ziemens D, Rose CR (2015a) Astrocytes restrict discharge duration and neuronal sodium loads during recurrent network activity. *Glia* 63:936-957.
- Karus C, Ziemens D, Rose CR (2015b) Lactate rescues neuronal sodium homeostasis during impaired energy metabolism. *Channels* 9:200-208.
- Kirischuk S, Kettenmann H, Verkhratsky A (2007) Membrane currents and cytoplasmic sodium transients generated by glutamate transport in Bergmann glial cells. *Pflugers Arch* 454:245-252.
- Kirischuk S, Parpura V, Verkhratsky A (2012) Sodium dynamics: another key to astroglial excitability? *Trends Neurosci* 35:497-506.
- Kofuji P, Newman E (2004) Potassium buffering in the central nervous system. *Neuroscience* 129:1043-1054.
- Kriegstein A, Alvarez-Buylla A (2009) The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annual review of neuroscience* 32:149-184.
- Kugler P, Schleyer V (2004) Developmental expression of glutamate transporters and glutamate dehydrogenase in astrocytes of the postnatal rat hippocampus. *Hippocampus* 14:975-985.
- Lalo U, Pankratov Y, Parpura V, Verkhratsky A (2011) Ionotropic receptors in neuronal-astroglial signalling: what is the role of "excitable" molecules in non-excitable cells. *Biochim Biophys Acta* 1813:992-1002.
- Lalo U, Pankratov Y, Kirchhoff F, North RA, Verkhratsky A (2006) NMDA receptors mediate neuron-to-glia signaling in mouse cortical astrocytes. *J Neurosci* 26:2673-2683.
- Lamy CM, Chatton JY (2011) Optical probing of sodium dynamics in neurons and astrocytes. *Neuroimage* 58:572-578.
- Langer J, Rose CR (2009) Synaptically induced sodium signals in hippocampal astrocytes in situ. *J Physiol* 587:5859-5877.
- Langer J, Stephan J, Theis M, Rose CR (2012) Gap junctions mediate intercellular spread of sodium between hippocampal astrocytes in situ. *Glia* 60:239-252.
- Langer J, Gerkau NJ, Derouiche A, Kleinhans C, Moshrefi-Ravasdjani B, Fredrich M, Kafitz KW, Seifert G, Steinhäuser C, Rose CR (2017) Rapid sodium signaling couples glutamate uptake to breakdown of ATP in perivascular astrocyte endfeet. *Glia* 65:293-308.
- Lenhossék M (1895) *Der feinere Bau des Nervensystems im Lichte neuester Forschungen: eine allgemeine Betrachtung der Strukturprinzipien des Nervensystems, nebst einer Darstellung des feineren Baues des Rückenmarkes*: Fischer.
- Jerina J (2003) Roles and rules of kainate receptors in synaptic transmission. *Nature Reviews Neuroscience* 4:481.

- Lundgaard I, Osório MJ, Kress B, Sanggaard S, Nedergaard M (2014) White matter astrocytes in health and disease. *Neuroscience* 276:161-173.
- Luque JM, Richards JG (1995) Expression of NMDA 2B receptor subunit mRNA in Bergmann glia. *Glia* 13:228-232.
- Lushnikova I, Skibo G, Muller D, Nikonenko I (2009) Synaptic potentiation induces increased glial coverage of excitatory synapses in CA1 hippocampus. *Hippocampus* 19:753-762.
- Magistretti PJ (2009) Role of glutamate in neuron-glia metabolic coupling. *Am J Clin Nutr* 90:875S-880S.
- Martinez-Hernandez A, Bell KP, Norenberg MD (1977) Glutamine synthetase: glial localization in brain. *Science* 195:1356-1358.
- Matthias K, Kirchhoff F, Seifert G, Huttmann K, Matyash M, Kettenmann H, Steinhauser C (2003) Segregated expression of AMPA-type glutamate receptors and glutamate transporters defines distinct astrocyte populations in the mouse hippocampus. *J Neurosci* 23:1750-1758.
- Mauch DH, Nägler K, Schumacher S, Göritz C, Müller E-C, Otto A, Pfrieder FW (2001) CNS synaptogenesis promoted by glia-derived cholesterol. *Science* 294:1354-1357.
- McKenna MC (2007) The glutamate-glutamine cycle is not stoichiometric: Fates of glutamate in brain. *Journal of neuroscience research* 85:3347-3358.
- Meier SD, Kovalchuk Y, Rose CR (2006) Properties of the new fluorescent Na⁺ indicator CoroNa Green: comparison with SBFI and confocal Na⁺ imaging. *J Neurosci Methods* 155:251-259.
- Mennerick S, Dhond RP, Benz A, Xu W, Rothstein JD, Danbolt NC, Isenberg KE, Zorumski CF (1998) Neuronal expression of the glutamate transporter GLT-1 in hippocampal microcultures. *Journal of Neuroscience* 18:4490-4499.
- Mergenthaler P, Lindauer U, Dienel GA, Meisel A (2013) Sugar for the brain: the role of glucose in physiological and pathological brain function. *Trends Neurosci* 36:587-597.
- Minelli A, Castaldo P, Gobbi P, Salucci S, Magi S, Amoroso S (2007) Cellular and subcellular localization of Na⁺-Ca²⁺ exchanger protein isoforms, NCX1, NCX2, and NCX3 in cerebral cortex and hippocampus of adult rat. *Cell Calcium* 41:221-234.
- Miyazaki K, Ross WN (2017) Sodium Dynamics in Pyramidal Neuron Dendritic Spines: Synaptically Evoked Entry Predominantly through AMPA Receptors and Removal by Diffusion. *J Neurosci* 37:9964-9976.
- Mondragao MA, Schmidt H, Kleinhans C, Langer J, Kafitz KW, Rose CR (2016) Extrusion versus diffusion: mechanisms for recovery from sodium loads in mouse CA1 pyramidal neurons. *J Physiol* 594:5507-5527.
- Mongin AA, Kimelberg HK (2005) ATP regulates anion channel-mediated organic osmolyte release from cultured rat astrocytes via multiple Ca²⁺-sensitive mechanisms. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 288:C204-C213.
- Morel L, Higashimori H, Tolman M, Yang Y (2014) VGluT1⁺ neuronal glutamatergic signaling regulates postnatal developmental maturation of cortical protoplasmic astroglia. *Journal of Neuroscience* 34:10950-10962.
- Mori H, Mishina M (1995) Structure and function of the NMDA receptor channel. *Neuropharmacology* 34:1219-1237.
- Moshrefi-Ravasdjani B, Ziemens D, Pape N, Färfers M, Rose CR (2018) Action potential firing induces sodium transients in macroglial cells of the mouse corpus callosum *Neuroglia* 1:9.
- Mothet J-P, Parent AT, Wolosker H, Brady RO, Linden DJ, Ferris CD, Rogawski MA, Snyder SH (2000) D-serine is an endogenous ligand for the glycine site of the N-methyl-D-aspartate receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97:4926-4931.
- Muller T, Moller T, Berger T, Schnitzer J, Kettenmann H (1992) Calcium entry through kainate receptors and resulting potassium-channel blockade in Bergmann glial cells. *Science* 256:1563-1566.
- Murphy-Royal C, Dupuis JP, Varela JA, Panatier A, Pinson B, Baufreton J, Groc L, Oliet SH (2015) Surface diffusion of astrocytic glutamate transporters shapes synaptic transmission. *Nat Neurosci* 18:219.
- Nagy J, Patel D, Ochalski P, Stelmack G (1999) Connexin30 in rodent, cat and human brain: selective expression in gray matter astrocytes, co-localization with connexin43 at gap junctions and late developmental appearance. *Neuroscience* 88:447-468.

- Oberheim NA, Takano T, Han X, He W, Lin JH, Wang F, Xu Q, Wyatt JD, Pilcher W, Ojemann JG (2009) Uniquely hominid features of adult human astrocytes. *Journal of Neuroscience* 29:3276-3287.
- Orkand R, Nicholls J, Kuffler S (1966) Effect of nerve impulses on the membrane potential of glial cells in the central nervous system of amphibia. *Journal of neurophysiology* 29:788-806.
- Oschmann F, Mergenthaler K, Jungnickel E, Obermayer K (2017) Spatial separation of two different pathways accounting for the generation of calcium signals in astrocytes. *PLoS Comput Biol* 13:e1005377.
- Owe SG, Marcaggi P, Attwell D (2006) The ionic stoichiometry of the GLAST glutamate transporter in salamander retinal glia. *J Physiol* 577:591-599.
- Palygin O, Lalo U, Verkhatsky A, Pankratov Y (2010) Ionotropic NMDA and P2X_{1/5} receptors mediate synaptically induced Ca²⁺ signalling in cortical astrocytes. *Cell Calcium* 48:225-231.
- Pannasch U, Freche D, Dallérac G, Ghézali G, Escartin C, Ezan P, Cohen-Salmon M, Benchenane K, Abudara V, Dufour A (2014) Connexin 30 sets synaptic strength by controlling astroglial synapse invasion. *Nature neuroscience* 17:549.
- Parpura V, Basarsky TA, Liu F, Jefinija K, Jefinija S, Haydon PG (1994) Glutamate-mediated astrocyte-neuron signalling. *Nature* 369:744.
- Pasti L, Volterra A, Pozzan T, Carmignoto G (1997) Intracellular calcium oscillations in astrocytes: a highly plastic, bidirectional form of communication between neurons and astrocytes in situ. *Journal of Neuroscience* 17:7817-7830.
- Patrushev I, Gavrilov N, Turlapov V, Semyanov A (2013) Subcellular location of astrocytic calcium stores favors extrasynaptic neuron-astrocyte communication. *Cell calcium* 54:343-349.
- Peghini P, Janzen J, Stoffel W (1997) Glutamate transporter EAAC-1-deficient mice develop dicarboxylic aminoaciduria and behavioral abnormalities but no neurodegeneration. *The EMBO journal* 16:3822-3832.
- Pellerin L, Magistretti PJ (1994) Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91:10625-10629.
- Pellerin L, Magistretti PJ (2004) Neuroenergetics: calling upon astrocytes to satisfy hungry neurons. *Neuroscientist* 10:53-62.
- Pellerin L, Pellegrini G, Bittar PG, Charnay Y, Bouras C, Martin J-L, Stella N, Magistretti PJ (1998) Evidence supporting the existence of an activity-dependent astrocyte-neuron lactate shuttle. *Developmental neuroscience* 20:291-299.
- Pelvig D, Pakkenberg H, Stark A, Pakkenberg B (2008) Neocortical glial cell numbers in human brains. *Neurobiology of aging* 29:1754-1762.
- Perea G, Navarrete M, Araque A (2009) Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends Neurosci* 32:421-431.
- Petr GT, Sun Y, Frederick NM, Zhou Y, Dhamne SC, Hameed MQ, Miranda C, Bedoya EA, Fischer KD, Armsen W (2015) Conditional deletion of the glutamate transporter GLT-1 reveals that astrocytic GLT-1 protects against fatal epilepsy while neuronal GLT-1 contributes significantly to glutamate uptake into synaptosomes. *Journal of Neuroscience* 35:5187-5201.
- Poopalasundaram S, Knott C, Shamotienko OG, Foran PG, Dolly JO, Ghiani CA, Gallo V, Wilkin GP (2000) Glial heterogeneity in expression of the inwardly rectifying K⁺ channel, Kir_{4.1}, in adult rat CNS. *Glia* 30:362-372.
- Porter JT, McCarthy KD (1995) GFAP-positive hippocampal astrocytes in situ respond to glutamatergic neuroligands with increases in [Ca²⁺]_i. *Glia* 13:101-112.
- Puro DG, Yuan JP, Sucher NJ (1996) Activation of NMDA receptor-channels in human retinal Müller glial cells inhibits inward-rectifying potassium currents. *Visual neuroscience* 13:319-326.
- Rakic P (2003) Elusive radial glial cells: historical and evolutionary perspective. *Glia* 43:19-32.
- Retzius G (1896) *Das Menschenhirn: Studien in der makroskopischen Morphologie*: Königlich Buchdruckerei.
- Rivera C, Voipio J, Kaila K (2005) Two developmental switches in GABAergic signalling: the K⁺-Cl⁻ cotransporter KCC2 and carbonic anhydrase CAVII. *The Journal of physiology* 562:27-36.
- Rose CR, Karus C (2013) Two sides of the same coin: sodium homeostasis and signaling in astrocytes under physiological and pathophysiological conditions. *Glia* 61:1191-1205.

- Rose CR, Ziemens D, Untiet V, Fahlke C (2018) Molecular and cellular physiology of sodium-dependent glutamate transporters. *Brain Res Bull* 136:3-16.
- Rothstein JD, Martin L, Levey AI, Dykes-Hoberg M, Jin L, Wu D, Nash N, Kuncl RW (1994) Localization of neuronal and glial glutamate transporters. *Neuron* 13:713-725.
- Rothstein JD, Dykes-Hoberg M, Pardo CA, Bristol LA, Jin L, Kuncl RW, Kanai Y, Hediger MA, Wang Y, Schielke JP (1996) Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron* 16:675-686.
- Saab AS, Neumeyer A, Jahn HM, Cupido A, Šimek AA, Boele H-J, Scheller A, Le Meur K, Götz M, Monyer H (2012) Bergmann glial AMPA receptors are required for fine motor coordination. *Science*:1221140.
- Scemes E, Giaume C (2006) Astrocyte calcium waves: what they are and what they do. *Glia* 54:716-725.
- Schipke CG, Ohlemeyer C, Matyash M, Nolte C, Kettenmann H, Kirchhoff F (2001) Astrocytes of the mouse neocortex express functional N-methyl-D-aspartate receptors. *The FASEB Journal* 15:1270-1272.
- Schreiner A, Rose C (2012) Quantitative imaging of intracellular sodium. *Current Microscopy Contributions to Advances in Science and Technology* (Méndez-Vilas A, ed):119-129.
- Schreiner AE, Durry S, Aida T, Stock MC, Ruther U, Tanaka K, Rose CR, Kafitz KW (2014) Laminar and subcellular heterogeneity of GLAST and GLT-1 immunoreactivity in the developing postnatal mouse hippocampus. *J Comp Neurol* 522:204-224.
- Seifert G, Steinhäuser C (1995) Glial cells in the mouse hippocampus express AMPA receptors with an intermediate Ca^{2+} permeability. *European Journal of Neuroscience* 7:1872-1881.
- Seifert G, Steinhäuser C (2001) Ionotropic glutamate receptors in astrocytes. In: *Progress in brain research*, pp 287-299: Elsevier.
- Serrano A, Robitaille R, Lacaille JC (2008) Differential NMDA-dependent activation of glial cells in mouse hippocampus. *Glia* 56:1648-1663.
- Sonnewald U (2014) Glutamate synthesis has to be matched by its degradation-where do all the carbons go? *Journal of neurochemistry* 131:399-406.
- Špaček J (1985) Three-dimensional analysis of dendritic spines. *Anatomy and embryology* 171:235-243.
- Srinivasan R, Huang BS, Venugopal S, Johnston AD, Chai H, Zeng H, Golshani P, Khakh BS (2015) Ca^{2+} signaling in astrocytes from *Ip3r2^{-/-}* mice in brain slices and during startle responses in vivo. *Nature neuroscience* 18:708.
- Suh SW, Bergher JP, Anderson CM, Treadway JL, Fosgerau K, Swanson RA (2007) Astrocyte glycogen sustains neuronal activity during hypoglycemia: studies with the glycogen phosphorylase inhibitor CP-316,819 ([R-R*,S*]-5-chloro-N-[2-hydroxy-3-(methoxymethylamino)-3-oxo-1-(phenylmethyl)propyl]-1H-indole-2-carboxamide). *J Pharmacol Exp Ther* 321:45-50.
- Sun W, Cornwell A, Li J, Peng S, Osorio MJ, Wanga NAS, Benraiss A, Lou N, Goldman SA, Nedergaard M (2017) SOX9 is an astrocyte-specific nuclear marker in the adult brain outside the neurogenic regions. *Journal of Neuroscience*:3199-3116.
- Suzuki A, Stern SA, Bozdagi O, Huntley GW, Walker RH, Magistretti PJ, Alberini CM (2011) Astrocyte-neuron lactate transport is required for long-term memory formation. *Cell* 144:810-823.
- Sweadner KJ (1992) Overlapping and diverse distribution of Na-K ATPase isozymes in neurons and glia. *Canadian journal of physiology and pharmacology* 70:S255-S259.
- Takano T, Tian G-F, Peng W, Lou N, Libionka W, Han X, Nedergaard M (2006) Astrocyte-mediated control of cerebral blood flow. *Nature neuroscience* 9:260.
- Tanaka K, Watase K, Manabe T, Yamada K, Watanabe M, Takahashi K, Iwama H, Nishikawa T, Ichihara N, Kikuchi T (1997) Epilepsy and exacerbation of brain injury in mice lacking the glutamate transporter GLT-1. *Science* 276:1699-1702.
- Unichenko P, Myakhar O, Kirischuk S (2012) Intracellular Na^{+} concentration influences short-term plasticity of glutamate transporter-mediated currents in neocortical astrocytes. *Glia* 60:605-614.
- Van Bockstaele EJ, Colago EE, Valentino RJ (1996) Corticotropin-releasing factor-containing axon terminals synapse onto catecholamine dendrites and may presynaptically modulate other

- afferents in the rostral pole of the nucleus locus coeruleus in the rat brain. *Journal of Comparative Neurology* 364:523-534.
- Ventura R, Harris KM (1999) Three-dimensional relationships between hippocampal synapses and astrocytes. *Journal of Neuroscience* 19:6897-6906.
- Verkhatsky A, Steinhäuser C (2000) Ion channels in glial cells. *Brain Research Reviews* 32:380-412.
- Verkhatsky A, Kirchhoff F (2007) NMDA Receptors in glia. *Neuroscientist* 13:28-37.
- Verkhatsky A, Nedergaard M (2017) Physiology of astroglia. *Physiological reviews* 98:239-389.
- Virchow R (1970) *Gesammelte Abhandlungen zur wissenschaftlichen Medizin*. Frankfurt 1856. Google Scholar.
- Voutsinos-Porche B, Bonvento G, Tanaka K, Steiner P, Welker E, Chatton J-Y, Magistretti PJ, Pellerin L (2003) Glial glutamate transporters mediate a functional metabolic crosstalk between neurons and astrocytes in the mouse developing cortex. *Neuron* 37:275-286.
- Walz W (2000) Role of astrocytes in the clearance of excess extracellular potassium. *Neurochemistry international* 36:291-300.
- Watase K, Hashimoto K, Kano M, Yamada K, Watanabe M, Inoue Y, Okuyama S, Sakagawa T, Ogawa Si, Kawashima N (1998) Motor discoordination and increased susceptibility to cerebellar injury in GLAST mutant mice. *European Journal of Neuroscience* 10:976-988.
- Weber B, Barros LF (2015) The astrocyte: powerhouse and recycling center. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*:a020396.
- Wender R, Brown AM, Fern R, Swanson RA, Farrell K, Ransom BR (2000) Astrocytic glycogen influences axon function and survival during glucose deprivation in central white matter. *Journal of Neuroscience* 20:6804-6810.
- Witcher MR, Kirov SA, Harris KM (2007) Plasticity of perisynaptic astroglia during synaptogenesis in the mature rat hippocampus. *Glia* 55:13-23.
- Wright R (2009) The necessity of NKCC1: loss of the chloride cotransporter in a knock-out model and potential compensatory mechanisms. *Journal of Neuroscience* 29:13094-13096.
- Wu Y, Wang W, Diez-Sampedro A, Richerson GB (2007) Nonvesicular inhibitory neurotransmission via reversal of the GABA transporter GAT-1. *Neuron* 56:851-865.
- Yao H, Ma E, Gu X-Q, Haddad GG (1999) Intracellular pH regulation of CA1 neurons in Na⁺/H⁺ isoform 1 mutant mice. *The Journal of clinical investigation* 104:637-645.
- Zhou Y, Wang X, Tzingounis AV, Danbolt NC, Larsson HP (2014) EAAT2 (GLT-1; slc1a2) glutamate transporters reconstituted in liposomes argues against heteroexchange being substantially faster than net uptake. *Journal of Neuroscience* 34:13472-13485.
- Ziemens D, Oschmann F, Gerkau NJ, Rose CR (Eingereicht) Mechanisms and consequences of sodium signals in astrocytes of the mouse neocortex. *Eingereicht in J Neurosci*
- Zonta M, Angulo MC, Gobbo S, Rosengarten B, Hossmann KA, Pozzan T, Carmignoto G (2003) Neuron-to-astrocyte signaling is central to the dynamic control of brain microcirculation. *Nat Neurosci* 6:43-50.

Danksagung

Mein größter Dank gilt Frau Prof. Dr. Christine Rose für die Möglichkeit meine Bachelor, Master und schließlich meine Doktorarbeit in ihrer Arbeitsgruppe anzufertigen. Es war eine sehr konstruktive und prägende Zeit, die mich fachlich wie auch menschlich unglaublich hat reifen lassen. Mit dem Motto „Fördern und Fordern“ war es genau das, was ich mir von einer Doktormutter erhofft hatte. Vielen Dank dafür!

Ein besonderer Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Thomas Klein für die Übernahme des Koreferats sowie für die Möglichkeit einmal jährlich meine Fortschritte im Institut für Genetik vortragen zu dürfen. Danke, dass sie sich die Zeit genommen haben. Das Präsentieren vor einem „fachfremden“ Publikum hat mich geschult meine Forschung auch etwas mehr aus der Distanz zu betrachten.

Herrn Dr. Karl Kafitz möchte ich für die hervorragende fachliche Betreuung in allen Lebenslagen danken. Man kann getrost sagen: Ohne ihn wäre das Experimentieren im Labor nicht möglich.

Darüber hinaus ein herzlichstes Dankeschön an alle Arbeitskollegen, die mir bei allen wissenschaftlichen Fragen, aber auch beim allergrößten Wahnsinn in sämtlichen Kaffee oder Mittagspausen zur Verfügung standen. Eine Zeit, die immer mit euch verbunden in Erinnerung bleiben wird. Eine Kopie der „Schweizer Liste“ werde ich meinem eigenen Exemplar der Dissertation beilegen. Danke an alle langjährigen Begleiter: Niklas, Behrouz, Christian, Julia, Claudia, Jan und Lisa. Besten Dank auch an alle „Neuen“: es ist eine Freude mit euch zusammenzuarbeiten.

Natürlich ein riesiges Danke an meine Freundin Sandra für all ihr Verständnis ihre Geduld und Anteilnahme besonders beim anfertigen dieser Dissertation. Ohne dich hätte ich das nicht geschafft. Aber auch ein Danke für all die schönen Momente bisher mit dir. Auf das noch viele weitere folgen werden. Ich liebe dich!

Zum Schluss bedanke ich mich noch bei meiner Familie und meinen Freunden. Ihr seid das Fundament auf dem erst aufgebaut werden kann.

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides Statt, dass die vorliegende Dissertation von mir selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist. Textstellen oder Abbildungen, die wörtlich oder abgewandelt aus anderen Arbeiten stammen, habe ich mit einer Quellenangabe versehen.

Diese Arbeit wurde weder vollständig noch in Teilen einem anderen Prüfungsamt zur Erlangung eines akademischen Grades vorgelegt.

Daniel Ziemens

Düsseldorf, den 13.09.2018