Auswirkungen von Energiemangel auf die zelluläre Ionenhomöostase im Mausgehirn

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Nils Pape
aus Neuss

Düsseldorf, Juli 2023

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

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

Gutachterinnen:

Prof. Dr. rer. nat. Christine R. Rose, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Jun.-Prof. Dr. rer. nat. Nadine Erlenhardt, Universitätsklinikum Düsseldorf

Tag der mündlichen Prüfung: 17.11.2023

Science isn't about 'why', it's about 'why not?'

- *Cave Johnson*

Zusammenfassung

Das Gehirn von Vertebraten verbraucht trotz seines geringen Anteils an der Körpermasse von ca. 2% bis zu einem Fünftel der Energie des Körpers. Der Großteil wird dabei von der Na^+/K^+-ATPase (NKA) zur Aufrechterhaltung des einwärtsgerichteten Na^+-Gradienten über die Plasmamembran verwendet. Dieser bietet die Grundlage für synaptische Signaltransduktion wie auch sekundäre Transportprozesse, über welche die Gradienten weiterer Ionen reguliert werden. Dem Na^+-Einstrom in Neurone und Astrozyten, der unter physiologischen und pathologischen Bedingungen durch eine Vielzahl von Kanälen und Transportern im Gehirn vermittelt wird, muss die NKA unter Energieverbrauch entgegenwirken. Hierdurch sind der zelluläre Energiemetabolismus und Na^+-Homöostase eng aneinandergekoppelt. Unklar bleibt jedoch, welchen genauen Anteil an der Na^+-Beladung sowie am zellulären Energieverbrauch diese einzelnen Mechanismen haben.

Dieser Fragestellung widmet sich die vorliegende Dissertation. Hierzu wurde der Gehalt des Energieträgers Adenosintriphosphat (ATP) in Neuronen und Astrozyten des somatosensorischen Cortex der Maus mit Hilfe des Zelltyp-spezifisch exprimierten Nanosensors ATeam1.03^{YEMK} in organotypischen Hirnschnittkulturen durchgeführt. Zusätzlich wurden Änderungen der intrazellulären Na^+-Konzentration mit Hilfe des Fluoreszenzindikators ION NaTRIUM Green-2 detektiert.

Eine kurzzeitige pharmakologische Inhibition der Glykolyse und Atmungskette führte zu einem Na^+-Einstrom und gleichzeitigem ATP-Abfall in beiden Zelltypen, wobei Neurone generell stärker auf diese Manipulation reagierten als Astrozyten. Zusätzliche Inhibition verschiedener Na^+-Kanäle zeigte deren Einfluss auf den ATP-Gehalt während Energiemangel. So wiesen die an der glutamatergen Signalübertragung beteiligten TTX-sensitiven spannungsabhängigen Na^+-Kanäle und NMDA-Rezeptoren den größten Einfluss auf den ATP-Verlust auf, während eine Blockade der astrozytären Glutamattransporter keinen Effekt auf Astrozyten und einen verstärkenden auf Neurone zeigte. Auch Glutamat-unabhängige Transporter wie der Na^+-Bikarbonat-Cotransporter oder der TRPV4-Kanal wirkten sich substanziell auf den ATP-Verbrauch aus. Obwohl letzterer primär als Ca^{2+}-Kanal bekannt ist, trug er ebenfalls signifikant zum Na^+-Einstrom während eingeschränktem Energiemetabolismus bei.

Diese Ergebnisse meiner Arbeit zeigen damit deutlich den hohen Energieverbrauch glutamaterger Signalübertragung und die damit verbundene hohe Anfälligkeit von Neuronen gegenüber kurzzeitigem Energiemangel. Außerdem weisen sie erstmals einen unerwartet starken Einfluss von TRPV4-Kanälen auf die Na^+-Beladung und damit verbundenen ATP-Verlust bei Hemmung des Energiemetabolismus nach. Dies könnte die bereits vorgeschlagene neuroprotektive Wirkung von Antagonisten des TRPV4-Kanals nach einem Schlaganfall mit bedingen.

Abstract

Despite its low mass the vertebrate brain is responsible for up to a fifth of the body's energy expenditure. The main portion of this energy is used by the Na^+/K^+ ATPase (NKA) to maintain the inwardly directed Na^+ gradient across the plasma membrane, which is the foundation for synaptic signal transduction as for secondary active transport processes, by which the gradients of other ions are maintained. Na^+ influx into neurons and astrocytes, which is mediated under physiological and pathological conditions by numerous channels and transporters in the brain, needs to be counteracted by the NKA under energy usage, coupling the cellular energy metabolism closely to Na^+ homeostasis. What remains unclear, however, is what exact proportion of Na^+ loading and cellular energy consumption these individual mechanisms account for.

The present dissertation is dedicated to this question. To this end, the content of the energy carrier adenosine triphosphate (ATP) was measured in neurons and astrocytes of the somatosensory cortex employing the nanosensor ATeam1.03^{YEMK}, which was expressed cell type-specifically in organotypic brain slice cultures. Additionally, changes in the intracellular Na^+ concentration were measured using the fluorescent indicator ION NaTRIUM Green-2.

A short-term pharmacological inhibition of glycolysis and the respiratory chain lead to a Na^+ increase and simultaneous ATP-decrease in both cell types, where neurons generally showed a stronger reaction to this manipulation than astrocytes. Additional inhibition of different Na^+ channels revealed their impact on ATP-content during energy deprivation. TTX-sensitive voltage-gated Na^+ channels and NMDA-receptors, which both play a role in the glutamatergic signal transduction, showed the strongest impact of ATP-loss, while inhibition of astrocytic glutamate transporters had no effect in astrocytes and an aggravating one in neurons. Also, non-glutamatergic transporters like the Na^+ bicarbonate cotransporter 1 or the TRPV4 channel affected the ATP-loss substantially. Even though the latter is primarily known as a Ca^{2+} channel it showed significant influence on the Na^+ load during compromised energy metabolism.

These results of my work clearly illustrate the high energy demand of glutamatergic signaling und the resulting high vulnerability of neurons to short-term energy loss. Moreover, they show the unexpectedly strong influence of TRPV4 channels on Na^+ load and the following loss of ATP during compromised energy metabolism. This could be a contributing factor to the previously proposed neuroprotective effect of antagonists of the TRPV4 channel after a stroke.

Inhaltsverzeichnis

1. Zellulärer Energiestoffwechsel des Gehirns 1

1.1 Glukose als Hauptmetabolit des Gehirns 2

1.2 Oxidative Phosphorylierung 3

1.3 Das Astrozyten-Neuronen-Laktat-Shuttle 4

2. Die Natrium/Kalium-ATPase als Hauptenergieverbraucher des Gehirns 5

3. Na^+ erfüllt eine Vielzahl wichtiger Rollen im Gehirn 8

3.1 Na^+ ist der Treiber der synaptischen Signaltransduktion 8

3.2 Die Kopplung sekundär aktiver Transportmechanismen an Na^+ 11

4. Das Gehirn unter Energiemangel 12

4.1 Die Beeinträchtigung des Gehirns durch einen ischämischen Schlaganfall 13

5. Ziel dieser Arbeit 16

6. ATP- und Na^+-Detektion in lebenden Zellen 16

7. ATP-Änderungen unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen 19

7.1 Glutamat induziert ATP-Änderungen in corticalen und hippocampalen Astrozyten 19

7.2 Chemisch induzierte Ischämie sorgt für einen ATP-Abfall in Neuronen und Astrozyten 20

7.3 Einfluss des Na^+-Einstroms auf ATP-Levels während chemischer Ischämie 24

7.4 Der TRPV4-Kanal trägt während Energiemangel entscheidend zum ATP-Verlust bei 27

7.5 Zusammenfassung 29

8. Publikationen und Manuskripte 30

8.1 Publizierte Manuskripte 30

1. **Pape N**, Rose CR (2023) Activation of TRPV4 channels promotes the loss of cellular ATP in organotypic slices of the mouse neocortex exposed to chemical ischemia. J Physiol 601:2975-2990. 30

2. Thapaliya P, **Pape N**, Rose CR, Ullah G (2023) Modeling the heterogeneity of sodium and calcium homeostasis between cortical and hippocampal astrocytes and its impact on bioenergetics. Front Cell Neurosci 17:1035553 47

3. Eitelmann S, Stephan J, Everaerts K, Durry S, **Pape N**, Gerkau NJ, Rose CR (2022) Changes in Astroglial K^+ upon Brief Periods of Energy Deprivation in the Mouse Neocortex. Int J Mol Sci 23. 62

8.3 Eingereichte Manuskripte 81

4. Everaerts K, Thapaliya P, **Pape N**, Durry S, Eitelmann S, Roussa E, Ullah G, Rose CR (2023) Inward Operation of NBCe1 Promotes Astrocytic Na^+ loading and Loss of ATP in Mouse Neocortex during Brief Chemical Ischemia. Eingereicht in Cells. 81

8.4 Manuskripte in Vorbereitung 105

5. Ziebarth T, **Pape N**, Nelson JSE, Rose CR, Reiner A. Atypical, plume-like events drive glutamate accumulation during chemical ischemia in cortical slice cultures 105

9. Literaturverzeichnis 175

1. Zellulärer Energiestoffwechsel des Gehirns

Obwohl das Gehirn in Vertebraten nur 2% der Körpermasse einnimmt, ist es schon unter Ruhebedingungen für 20% des Energie- und Sauerstoffverbrauchs des Körpers verantwortlich (Raichle und Gusnard, 2002; Harris et al., 2012). Um diesen hohen Energiebedarf decken zu können, ist es auf eine konstante Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen aus dem Blut angewiesen. Der Metabolit, den die Zellen des Gehirns für die Produktion von Energie primär verwenden, ist Glukose (Lund-Andersen, 1979; Mergenthaler et al., 2013). Diese wird zunächst von Endothelzellen der Blutgefäße aus dem Blut aufgenommen (Abb. 1B). Aus den Endothelzellen wird die Glukose dann über den Glukosetransporter 1 (GLUT1) in die perivaskulären Endfüße von Astrozyten transportiert (Kacem et al., 1998). Diese Endfüße umschließen die Blutgefäße beinahe komplett (Abb. 1A) (McCaslin et al., 2011) und sind neben der Aufnahme von Glukose für die Bildung und Instandhaltung der Bluthirnschranke (BBB, engl.: ***b****lood* ***b****rain* ***b****arrier*) verantwortlich (Daneman und Prat, 2015). Alle Astrozyten des Mauscortex stehen in Kontakt mit mindestens einem Blutgefäß, was die wichtige Rolle der perivaskulären Endfüße unterstreicht (Hösli et al., 2022). Mit Hilfe ihrer Endfüße sind Astrozyten darüber hinaus in der Lage, den Blutfluss durch Vasodilatation (Erweiterung) und Vasokonstriktion (Verengung) der Blutgefäße zu steuern (Bélanger et al., 2011) und so die Versorgung der Zellen an metabolische Bedürfnisse anzupassen. Neurone exprimieren den Glukosetransporter 3 (GLUT3) (Vannucci et al., 1997), die Hauptaufnahme von Glukose geschieht jedoch durch Astrozyten über ihren Kontakt mit Endothelzellen (Chuquet et al., 2010). Die aufgenommene Glukose durchläuft eine Reihe von anaeroben (sauerstoffunabhängigen) und aeroben (sauerstoffabhängigen) Reaktionen, um Adenosintriphosphat (ATP) zu generieren, den Hauptenergieträger der Zellen. Im Gehirn wurde für Astrozyten und Neurone unter Ruhebedingen in vielen Studien eine ATP-Konzentration von ca. 2 mM beschrieben (Fukuda et al., 1983; Rangaraju et al., 2014; Toloe et al., 2014; Pathak et al., 2015).

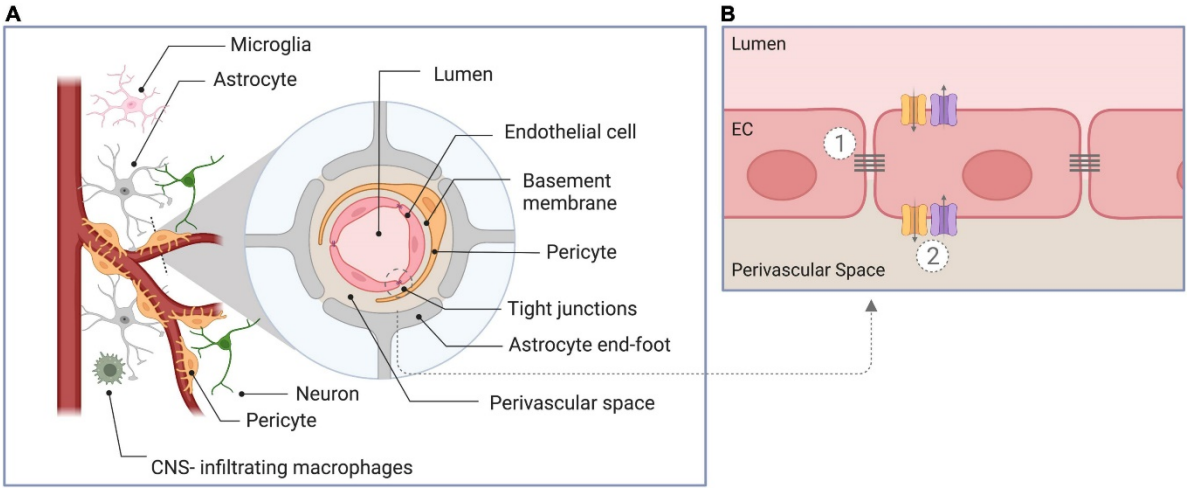

Abbildung 1: Umhüllung der Blutgefäße durch perivaskuläre Endfüße von Astrozyten. A) Querschnitt eines Blutgefäßes im Gehirn. Die Endothelzellen des Gefäßes sind durch Tight Junctions (engl.: Enge Verbindungen) verbunden. Die astrozytären Endfüßen umfassen das Blutgefäß und den perivaskulären Raum komplett. B) Schematische Darstellung der Endothelzellen (EC). Gezeigt sind Tight Junctions (1) und Transporter, die die Aufnahme von Substraten wie Glukose aus dem Blut ermöglichen (2). Verwendet mit Genehmigung aus (Moyaert et al., 2023).

1.1 Glukose als Hauptmetabolit des Gehirns

Sobald die Glukose über GLUT1 bzw. GLUT3 in Astrozyten und Neurone aufgenommen wurde, wird sie von der *Hexokinase* zu Glukose-6-Phosphat (G6P) phosphoryliert. G6P ist ein Schlüsselintermediat, welches in viele verschiedene Stoffwechselwege eintreten kann (Abb. 2) (Bélanger et al., 2011). Einerseits kann G6P mit Hilfe der *Glykogensynthase* in Form von Glykogen in Astrozyten gespeichert werden (Abb. 2iii). Dies ist ein langkettiges Monomer, das zur Langzeitspeicherung von Energie dient und in Zeiten von großem Energiebedarf zur ATP-Produktion herangezogen werden kann (Brown, 2004). Primär wird G6P jedoch für die Energiegewinnung über die Glykolyse verwendet (Abb. 2i) (Berg et al., 2018a). Hierzu wird es über die *Isomerase* zu Fruktose-6-Phosphat und anschließend über einige Zwischenschritte hin zu zwei Molekülen Pyruvat verarbeitet. Bei diesem Prozess entstehen pro G6P-Molekül zwei Moleküle ATP. Die Glykolyse in Astrozyten kann durch synaptische Stimulation von Neuronen (Fernandez-Moncada et al., 2018) sowie durch die damit einhergehende erhöhte extrazelluläre Kaliumkonzentration ($[K^+]_e$) (Bittner et al., 2011) stimuliert werden. Dies bietet neben der bereits beschriebenen Erweiterung und Verengung der Blutgefäße einen weiteren Weg für Astrozyten den Stoffwechsel an einen steigenden Energiebedarf anzupassen. Ein weiterer Stoffwechselweg, in den G6P eingebunden werden kann, ist der Pentose-Phosphat-Weg (PPP, engl.: *pentose phosphate pathway*; Abb. 2ii). Die Endprodukte des PPP sind Metabolite, die ebenfalls in der Glykolyse verwendet werden

(Dienel und Cruz, 2016). Somit stellt der PPP eine alternative Zufuhr von Zwischenprodukten für die Glykolyse und die damit verbundene Produktion von ATP und Pyruvat dar.

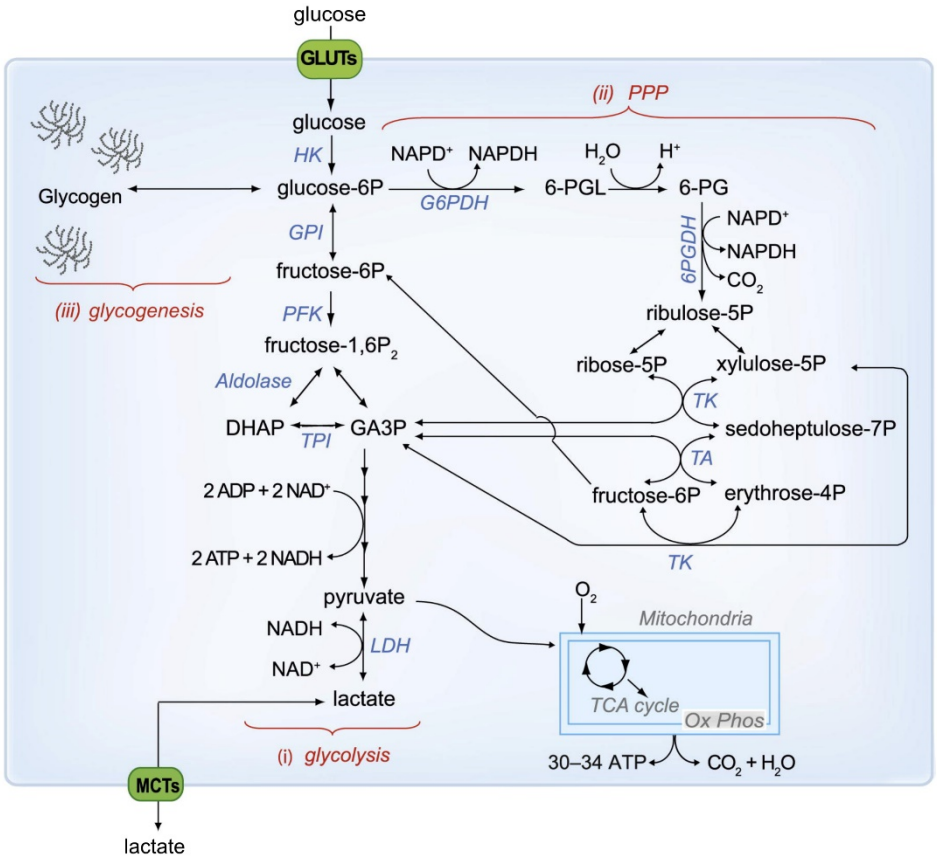

Abbildung 2: Die Verwendung von Glukose im Gehirn. Glukose wird durch Glukosetransporter (GLUTs) in die Zelle aufgenommen und durch die Hexokinase (HK) zu Glukose-6-Phosphat (glucose-6P) phosphoryliert. Dies kann nun (i) in der Glykolyse über mehrere Schritte zur ATP-Gewinnung zu Pyruvat metabolisiert werden. Pyruvat wird entweder zur weiteren ATP-Produktion in die Mitochondrien transportiert oder in Laktat umgewandelt und über Monocarboxylat-Transporter (MCTs) aus der Zelle transportiert. Alternativ kann glucose-6P (ii) über den Pentosephosphatweg (PPP) verarbeitet werden, um NADPH zu produzieren und dann später über die Endprodukte Glyceraldehyd-3-Phosphat (GA3P) oder Fructose-6-Phosphat (fructose-6P) wieder in die Glykolyse eingeschleust zu werden. In Astrozyten kann glucose-6P (iii) außerdem in Form von Glykogen über die Glykogenese über längere Zeit gespeichert werden. Angepasst mit Genehmigung aus (Bélanger et al., 2011)

1.2 Oxidative Phosphorylierung

Das so aus der Glykolyse gewonnene Pyruvat wird anschließend in die Mitochondrien der Zellen transportiert, wo es in den Citratzyklus eingebunden wird. Hier werden pro Zyklus ein Molekül ATP sowie die Reduktionsmittel NADH und $FADH_2$ produziert (Berg et al., 2018b). Letztere tragen energiereiche Elektronen, die anschließend über eine Reihe von Cytochromen an der inneren Mitochondrienmembran übertragen werden, was als mitochondriale Elektronentransportkette bezeichnet wird (Guo et al., 2018). Durch diesen Elektronentransport werden Protonen (H^+) aus der mitochondriellen Matrix in den Intermembranraum gepumpt, wodurch ein H^+-Gradient über die innere Mitochondrienmembran aufgebaut wird. H^+ fließt entlang seines Konzentrationsgradienten in

die Matrix zurück, wodurch es die ATP-Synthase antreiben. Diese nutzt die potentielle Energie des H^+-Gradienten, um ADP (Adenosindiphosphat) zum energiereicheren ATP zu phosphorylieren (Berg et al., 2018c). Dieser Prozess wird als oxidative Phosphorylierung bezeichnet. Während in der Glykolyse pro Glukosemolekül zwei Moleküle ATP produziert werden, erzeugt die oxidative Phosphorylierung 30-32 Moleküle ATP (Hertz, 2008).

1.3 Das Astrozyten-Neuronen-Laktat-Shuttle

Der Hauptanteil des synthetisierten ATPs im Gehirn wird von Neuronen verbraucht, um ihre elektrische Signalweiterleitung und exzitatorische Aktivität zu gewährleisten (Lennie, 2003; Harris et al., 2012). Astrozyten, die im Gegensatz zu Neuronen keine elektrische Aktivität aufweisen, beanspruchen nur 5-10% des Energiebudgets des Gehirns (Lennie, 2003; Howarth et al., 2012). Trotz ihres deutlich geringeren Energieverbrauchs sind sie, wie eingangs beschrieben, für den Großteil der Glukoseaufnahme aus den Blutgefäßen verantwortlich (Chuquet et al., 2010). Dieser Umstand kann durch die als *„Astrozyten-Neuronen-Laktat-Shuttle“* (ANLS) bezeichnete metabolische Kopplung zwischen den beiden Zelltypen erklärt werden (Abb. 3). Synaptische Aktivität von Neuronen stimuliert in Astrozyten den Abbau von Glykogen, die Glykolyse und die Umwandlung des daraus gewonnen Pyruvat zu Laktat über die Laktatdehydrogenase 5 (LDH5) (Pellerin und Magistretti, 1994; Chatton et al., 2016). Das Laktat kann anschließend über astrozytäre Monocarboxylat-Transporter (MCT) in den

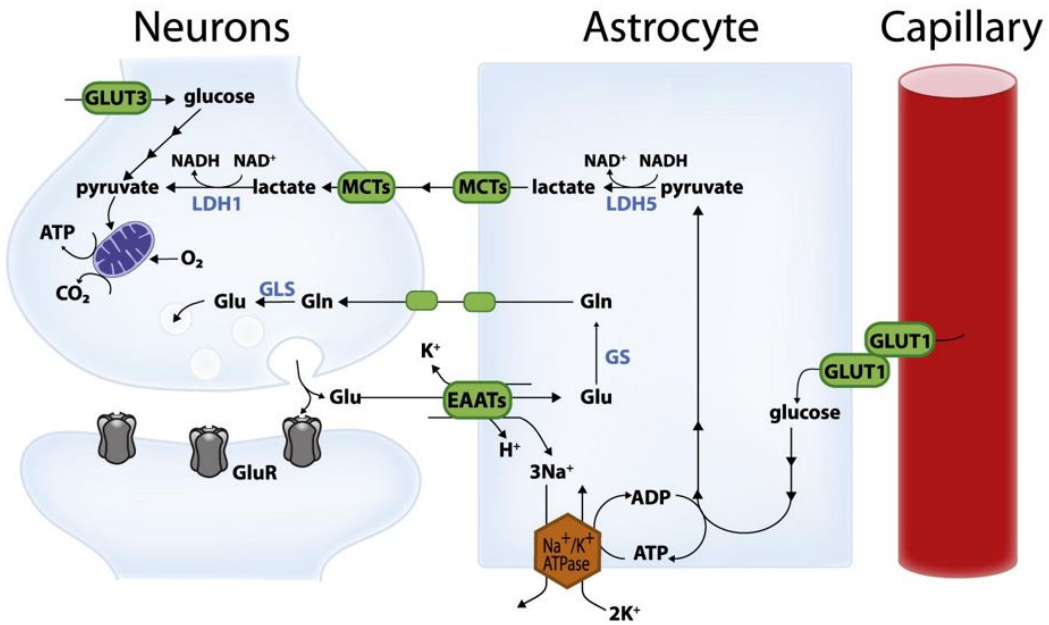

Abbildung 3: Neuro-metabolische Kopplung zwischen Neuronen und Astrozyten. Astrozyten nehmen Glukose aus dem Blut über Glukosetransporter 1 (GLUT1) auf und können dies in Form von Laktat über Monocarboxylat-Transporter (MCTs) an Neurone zur Energiegewinnung weitergeben. Von Neuronen freigesetztes Glutamat wird von Astrozyten mit Hilfe der Glutamattransporter (EAATs) aufgenommen, durch die Glutaminsynthase (GS) in Glutamin umgewandelt und so an Neurone zurücktransportiert. Angepasst mit Genehmigung aus (Bélanger et al., 2011).

extrazellulären Raum (ECS, engl.: *extracellular space*) freigesetzt und dort von Neuronen über eigene MCTs zusammen mit einem H^+ aufgenommen werden (Abb. 3). Hier wird es wieder zu Pyruvat metabolisiert und für die oxidative Phosphorylierung zur ATP-Produktion verwendet (Bélanger et al., 2011). Die Existenz des ANLS und die Notwendigkeit von Laktat als Energiesubstrat sind umstritten (Dienel und Cruz, 2016; Dienel, 2017). Studien konnten jedoch zeigen, dass synaptische Aktivität von Neuronen in Abwesenheit von Glukose unter Anwesenheit von Laktat aufrechterhalten werden kann (Wender et al., 2000; Karus et al., 2015). Ferner unterscheiden sich die LDH- und MCT-Isoformen zwischen Neuronen und Astrozyten: astrozytäre Formen favorisieren Produktion bzw. Export von Laktat, während die neuronalen Pendants Import und den Abbau zu Pyruvat bevorzugen (Bittar et al., 1996; Dimmer et al., 2000).

2. *Die Natrium/Kalium-ATPase als Hauptenergieverbraucher des Gehirns*

Das in Glykolyse und oxidativer Phosphorylierung synthetisierte ATP wird für eine Vielzahl von zellulären Prozessen benötigt. Ein großer Energiekonsument sind hierbei ATPasen, eine Klasse von Transportproteinen, die Ionen unter ATP-Verbrauch entgegen ihres Konzentrationsgradienten über Membranen transportieren (Palmgren und Nissen, 2011). Der mit Abstand größte Verbraucher ist dabei die Natrium/Kalium-ATPase (NKA; Abb.4). Schon

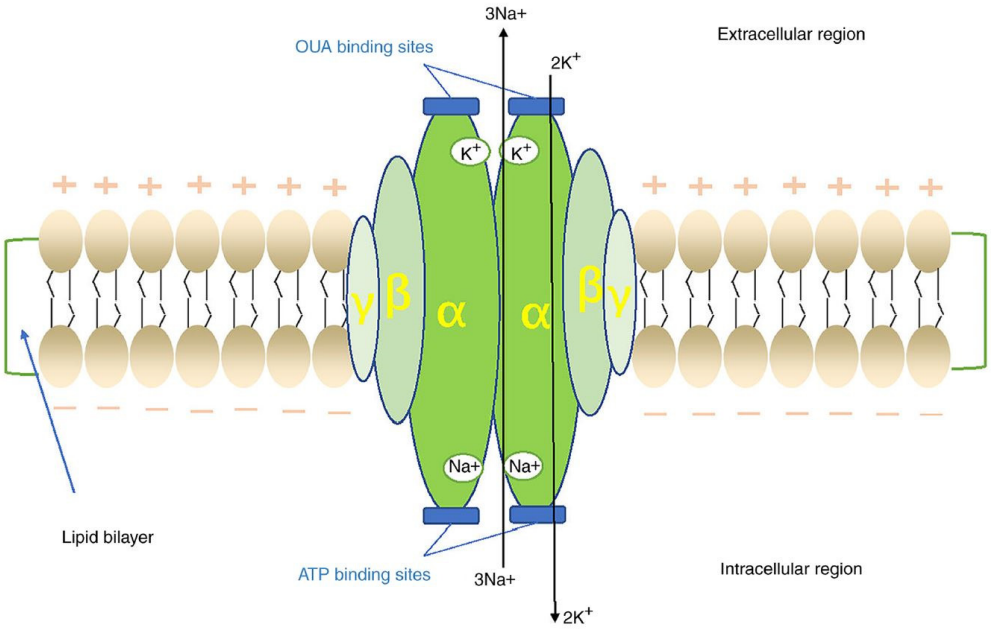

Abbildung 4: *Schematische Darstellung der Na^+/K^+-ATPase (NKA) in der Lipiddoppelmembran*. Die NKA transportiert 3 Na^+ aus dem negativ geladenen Zellinneren in den dazu positiv geladenen Extrazellulärraum im Austausch für 2 K^+. Dafür besitzt sie im Zellinneren eine ATP-Bindestelle, an der ATP hydrolysiert werden kann. Extrazellulär besitzt sie eine Bindestelle für den spezifischen Inhibitor Ouabain (OUA). Verwendet mit Genehmigung aus (Wen und Wan, 2021).

unter Ruhebedingungen ist sie für 15-20% des Energieverbrauchs des gesamten zerebralen Cortex der Ratte verantwortlich (Abb. 5) (Howarth et al., 2012), durch synaptische Übertragung zwischen Neuronen kann der Verbrauch auf ca. 60% ansteigen (Erecinska und Silver, 1994; Howarth et al., 2012; Dienel, 2019). Ein weiterer großer Teil des Energiebudgets wird für den Haushalt der Zellen, also nicht-signalleitende Prozesse, wie Bewegungen der Mikrotubuli, Protein- und Lipidsynthese und Leckströme von Protonen über die Mitochondrienmembran, verwendet (Engl und Attwell, 2015). Die NKA ist dafür verantwortlich, die ungleiche Verteilung von Natrium (Na^+) und Kalium (K^+), zwei der wichtigsten Ionen im Gehirn, aufrecht zu erhalten. Im ECS liegt Na^+ in einer Konzentration von 140-150 mM vor, ca. zehnmal höher als die intrazelluläre Konzentration von 12-15 mM in Neuronen und Astrozyten (Mondragao et al., 2016; Ziemens et al., 2019; Meyer et al., 2022). Die Verteilung von K^+ ist invers zu der von Na^+, es liegt extrazellulär in niedriger Konzentration mit ca. 3 mM und intrazellulär mit 130-150 mM vor (Verkhratsky und Nedergaard, 2018; Eitelmann et al., 2022). Durch diese Verteilung ergeben sich ein einwärtsgerichteter Na^+-Gradient und ein auswärts gerichteter für K^+.

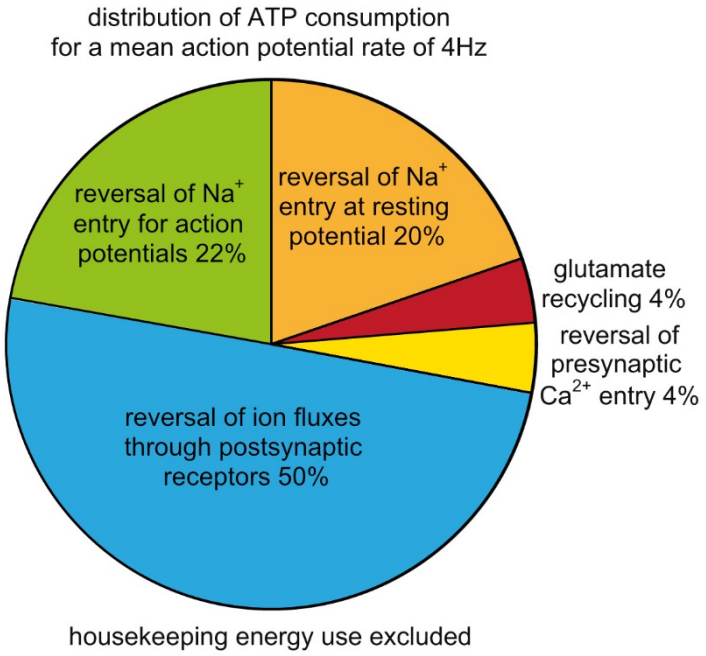

Abbildung 5: ATP-Verbrauch des Cortex der Ratte während synaptischer Erregung. Der Großteil der Energie wird zur Wiederherstellung der Ionengradienten, insbesondere der von Na^+ gebraucht. Der ATP-Verbrauch durch zelluläre Haushaltsprozesse ist hier nicht mit einbezogen. Angepasst mit Genehmigung aus (Harris et al., 2012)

Durch zelluläre Aktivität werden die Gradienten verringert, die Aufgabe der NKA ist es, sie wiederaufzubauen bzw. aufrecht zu erhalten. Pro Molekül ATP, das sie hydrolysiert, werden drei Na^+ aus der Zelle hinaus und zwei K^+ in die Zelle hinein transportiert (Kaplan, 2002; Geering, 2008). Dieser Prozess ist eine der wenigen Möglichkeiten, Na^+ unter physiologischen Bedingungen aus der Zelle zu entfernen (Rose und Ransom, 1996; Mondragao et al., 2016). Die Aufrechterhaltung der Na^+- und K^+-Homöostase ist ein hochdynamischer

Prozess, auch unter Ruhebedingungen ist die NKA konstant aktiv. Hierbei haben Modellierungen gezeigt, dass diese Aufrechterhaltung bereits unter Ruhebedingungen in Neuronen etwa dreimal so viel ATP verbraucht, wie in Astrozyten (Abb. 6) (Attwell und Laughlin, 2001). Inhibition der NKA durch spezifische Antagonisten, wie z.B. Ouabain, sorgt somit für einen direkten Anstieg der intrazellulären Na^+-Konzentration ($[Na^+]_i$) in Neuronen und Astrozyten (Rose und Ransom, 1996; Silver und Erecińska, 1997).

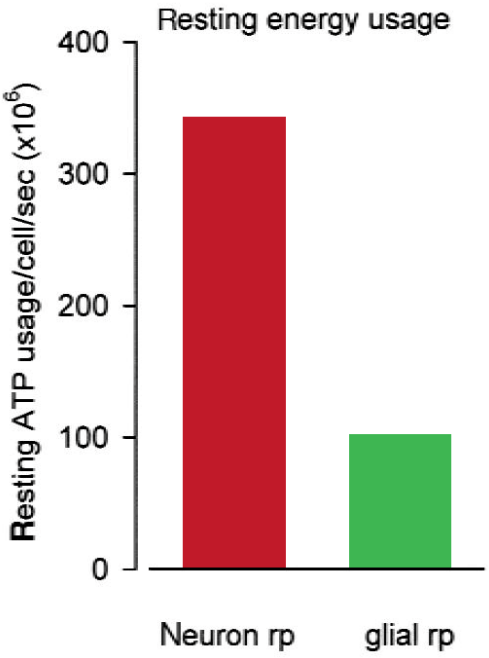

Abbildung 6: *Energieverbrauch von Neuronen und Astrozyten der grauen Hirnsubstanz unter Ruhebedingungen*. Der Verbrauch von ATP in Neuronen (rot) ist ca. dreimal höher als in Astrozyten (grün). Angepasst mit Genehmigung aus (Attwell und Laughlin, 2001).

Die NKA ist aus der α- und der β-Untereinheit aufgebaut (Abb.4), die im Gehirn in verschiedenen Isoformen vorliegen können (α1-3, β1-3) (Sweadner, 1989; Larsen et al., 2016). Die α-Einheit stellt die Bindungsstelle für Na^+, K^+ und ATP dar, während die β-Einheit die Transporteigenschaften von α reguliert (Sweadner, 1992; Geering, 2008). Die verschiedenen Isoformen der beiden Untereinheiten werden je nach Zelltyp unterschiedlich stark exprimiert und kombiniert. α1 und β1 sind sowohl in Neuronen als auch in Astrozyten aufzufinden, α2 und β2 werden primär in Astrozyten exprimiert, α3 in Neuronen. β3 ist in Oligodendrozyten vorzufinden, in Neuronen und Astrozyten jedoch vernachlässigbar (McGrail und Sweadner, 1986; Cameron et al., 1994; Zhang et al., 2014). Die verschiedenen Isoformen und deren Kombinationen besitzen abweichende Bindungsaffinitäten für Na^+ und K^+, was die Funktion der NKA in Neuronen und Astrozyten stark beeinflusst: Kombinationen aus α1-3 und β1 zeigen eine hohe Affinität zu K^+, wodurch sie bei $[K^+]_e$ unter Ruhebedingungen bereits gesättigt sind. Die astrozytäre α2β2-Variante weist jedoch eine geringere K^+-Affinität auf, wodurch sie bei steigender $[K^+]_e$ ihre Aktivität erhöht (Rose und Ransom, 1996; Larsen et al., 2014). Astrozyten können so auf einen Anstieg der $[K^+]_e$, wie z.B. während neuronaler Signaltransduktion, reagieren und durch erhöhte NKA-Aktivität überschüssiges K^+ aus dem ECS entfernen (Silver und Erecińska, 1997). NKA-Varianten mit β1, insbesondere die neuronale Isoform α3β1, besitzen hingegen eine geringe Na^+-Affinität, und können so auf steigende $[Na^+]_i$ mit erhöhter Aktivität reagieren und so zum Erhalt der physiologischen $[Na^+]_i$ beitragen (Larsen et al., 2016).

Als einzige effektive Möglichkeit, Na^+ aus der Zelle zu befördern, und aufgrund des hohen anteiligen ATP-Verbrauchs stellt die NKA eine Verbindung zwischen dem Energiemetabolismus von Neuronen und Astrozyten und der Na^+-Homöostase dar.

3. Na^+ erfüllt eine Vielzahl wichtiger Rollen im Gehirn

Na^+ nimmt eine wichtige Rolle in der Physiologie der Zellen im Gehirn ein. Dies wird daran deutlich, wie viel Energie von den Zellen aufgewendet wird, um mit Hilfe der NKA den einwärtsgerichteten Na^+-Gradienten aufrecht zu erhalten. Obwohl die Aufgaben von Neuronen und Astrozyten teils sehr unterschiedlich sind, basiert eine Vielzahl der zellulären Prozesse beider Zelltypen auf dem Na^+-Gradienten.

3.1 Na^+ ist der Treiber der synaptischen Signaltransduktion

An einer Synapse findet die Übertragung eines elektrischen Signals von der präsynaptischen Endigung eines Neurons auf den postsynaptischen Dornfortsatz (engl.: *Spine*) eines anderen statt. Zusätzlich werden diese beiden Kompartimente vom perisynaptischen Endfuß eines Astrozyten umschlossen. Dieser Zusammenschluss wird als *Tripartite Synapse*

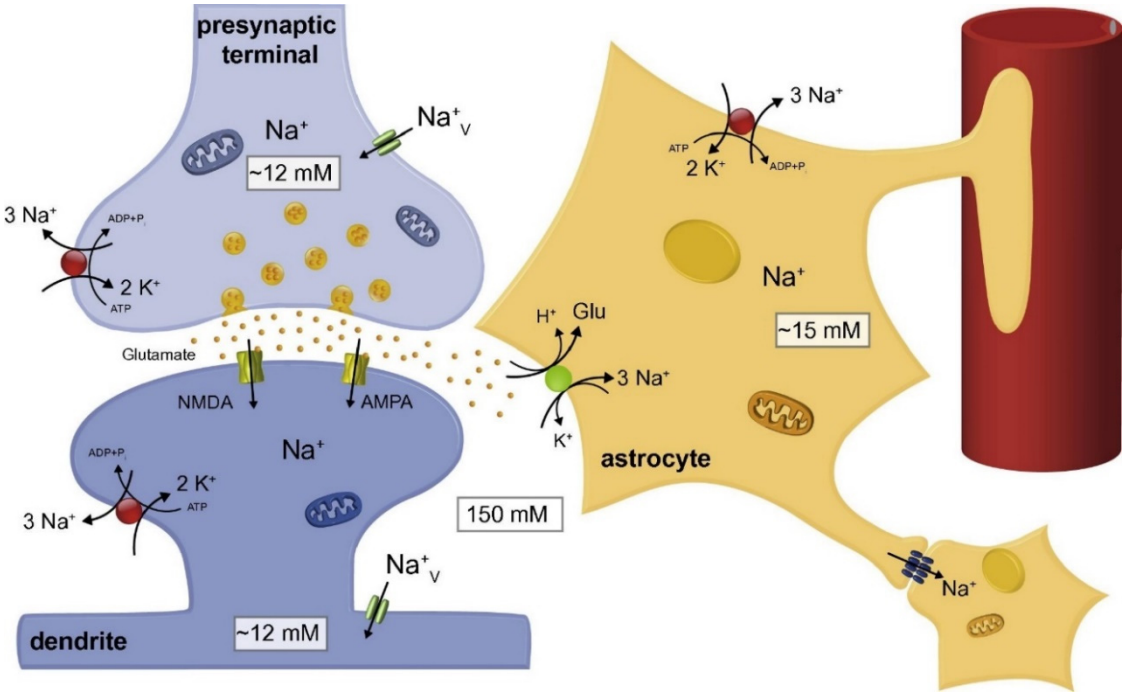

Abbildung 7: Wege für Natriumein- und ausstrom an der dreiteiligen Synapse. An der glutamatergen Synapse bewirken Aktionspotentiale einen Na^+-Einstrom im präsynaptischen Neuron durch TTX-sensitive Na^+-Kanäle (Na^+_V). Die darauf folgende Glutamatausschüttung führt zu einem Einstrom von Na^+ in die postsynaptische Membran durch ionotrope AMPA- und NMDA-Rezeptoren. Das ausgeschüttete Glutamat wird von astrozytären Na^+-abhängigen Transportern aufgenommen, was zu einem Na^+-Einstrom in Astrozyten führt. Das eingeströmte Na^+ kann sich über Gap-Junctions zu benachbarten Astrozyten ausbreiten. In beiden Zelltypen sorgt die Na^+/K^+-ATPase für den Export von Na^+ aus dem Zellinneren. Verwendet mit Genehmigung aus (Rose und Chatton, 2016)

(engl. für dreiteilige Synapse; Abb. 7) bezeichnet (Araque et al., 1999). Hierbei kann ein Astrozyt im Mausgehirn mit bis zu 120.000, im Menschen mit bis zu zwei Millionen Synapsen in Verbindung stehen (Oberheim et al., 2009). Je nach Hirnregion variiert die Abdeckung von Synapsen durch astrozytäre Endfüße zwischen 60-90% (Ventura und Harris, 1999; Witcher et al., 2007).

Beginn der synaptischen Signaltransduktion ist eine Depolarisation des Membranpotentials in der präsynaptischen neuronalen Endigung. Dies führt zur Öffnung von Tetrodotoxin (TTX)-sensitiven spannungsabhängigen Na^+-Kanälen (Na_v) (Müller und Somjen, 2000), durch die Na^+ entlang seines einwärtsgerichteten Gradienten einströmt. Diese Kanäle sind neuronenspezifisch, Astrozyten besitzen sie nicht (Verkhratsky und Nedergaard, 2018). Das so eingeströmte Na^+ muss anschließend wieder von der NKA aus der Zelle transportiert werden, was 16% des zerebralen Energiebudgets in Anspruch nimmt (Abb. 5) (Attwell und Laughlin, 2001; Howarth et al., 2012). Die Na^+-induzierte Depolarisation der Zellmembran bewirkt die Öffnung von spannungsabhängigen Calcium (Ca^{2+})-Kanälen, woraufhin Ca^{2+} entlang seines Gradienten in die Zelle einströmt und die Freisetzung von Neurotransmittern bewirkt. Der Fokus der vorliegenden Arbeit lag hierbei auf Glutamat, dem wichtigsten erregenden Neurotransmitter im Gehirn (Fonnum, 1984; Danbolt, 2001). Ca^{2+} fungiert darüber hinaus als *second messenger*, der eine Vielzahl von Zellkaskaden steuert (Hardingham und Bading, 1999), weshalb es intrazellulär streng reguliert werden muss. Dies geschieht zum einen durch Pufferung, zum anderen durch aktiven Transport aus dem Zellsoma durch die Plasmamembran-Ca^{2+}-ATPase (PMCA, engl.: *plasma membrane calcium ATPase*) (Brini und Carafoli, 2011), die für ca. 5% des Energieverbrauchs des Gehirns verantwortlich ist (Abb. 5) (Attwell und Laughlin, 2001).

Das freigesetzte Glutamat bindet im synaptischen Spalt an ionotrope Glutamatrezeptoren an der postsynaptischen Membran, wodurch diese öffnen und einen Einstrom von Na^+ in die Postsynapse erlauben. Hierbei wird zwischen AMPA-, Kainat- und NMDA-Rezeptoren (NMDA-R) unterschieden, wobei letztere den Großteil an Na^+- und zusätzlich auch Ca^{2+}-Einstrom vermitteln (Denk et al., 1996; Rose und Konnerth, 2001). Neben Neuronen wurde die funktionelle Expression von NMDA-R ebenfalls in Astrozyten des Neocortex beschrieben (Schipke et al., 2001; Ziemens et al., 2019). Durch diesen postsynaptischen Einstrom wird die NKA- und PMCA-Aktivität im postsynaptischen Neuron verstärkt, um die Gradienten für Na^+ und Ca^{2+} wiederherzustellen, was für über die Hälfte des Energieverbrauchs verantwortlich ist (Harris et al., 2012; Gerkau et al., 2019a).

Das freigesetzte Glutamat muss anschließend aus dem synaptischen Spalt entfernt werden, um eine Übererregung der Neurone zu vermeiden. Dies geschieht in erster Linie über Glutamattransporter (Abb. 8; EAATs, engl.: *excitatory amino acid transporters*), die in astrozytären Endfüßen exprimiert werden (Danbolt, 2001). Astrozyten exprimieren zwei Arten von EAATs, den Glutamat-Aspartat-Transporter (GLAST) und den Glutamattransporter 1 (GLT1), deren Expressionsmuster sich während der Gehirnentwicklung ändert. In der neonatalen Entwicklung überwiegt die Expression von GLAST (Schreiner et al., 2014), während GLT1 der primär exprimierte Transporter im adulten Gehirn ist (Abb.8) (Arranz et al., 2008). Neurone exprimieren zwar ebenfalls Glutamattransporter (EAAT 3/4) (Rose et al., 2018), der Hauptanteil an Glutamat wird jedoch von Astrozyten aufgenommen. Die Aufnahme von Glutamat aus dem ECS ist an den einwärtsgerichteten Na^+-Gradienten gekoppelt und verläuft mit zusätzlichem Import von einem H^+ und dem Export von einem K^+ (Danbolt, 2001). Diese Na^+-Aufnahme muss ebenfalls wieder von der NKA unter ATP-Verbrauch kompensiert werden und stellt einen der Hauptwege für Na^+-Einstrom in Astrozyten dar (Kirischuk et al., 2012; Rose und Chatton, 2016).

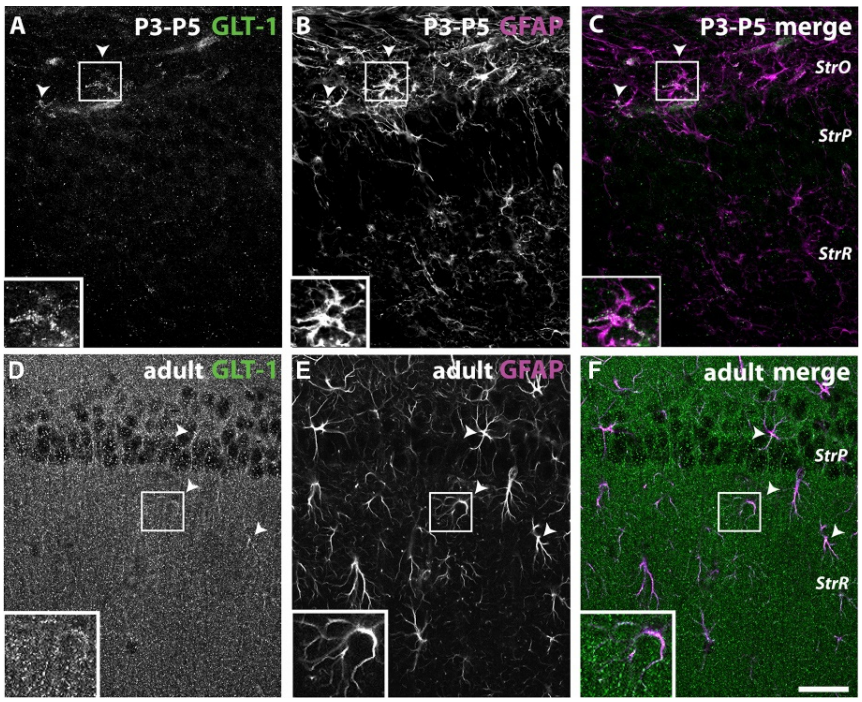

Abbildung 8: Expression des Glutamat-transporters 1 (GLT-1) im neonatalen und adulten Mausgehirn in der CA1-Region es Hippocampus. Immunohistochemische Färbungen gegen GLT-1 (A, D) und GFAP (B, E), sowie eine Überlagerung (merge) beider Kanäle (C, F). A-C) Im nenonatalen Gehirn sind nur wenige GLT-1-positive Zellen im *Stratum Radiatum* und *Stratum Oriens* erkennbar. D-F) Im adulten Gehirn nimmt die GLT-1-Expression stark zu. Pfeilspitzen zeigen GLT-1- und GFAP-positive Astrozyten. StrO: *Statum Oriens*; StrP: *Stratum Pyramidale*; StrR: *Stratum Radiatum*. Maßstabsbalken: 20 µm. Angepasst mit Genehmigung aus (Schreiner et al., 2014)

Das aufgenommene Glutamat wird mit Hilfe der *Glutaminsynthase* zu Glutamin umgewandelt. Dies kann im Folgenden über SN1-Transporter in den ECS freigesetzt (Bröer et al., 2002), und dort von Neuronen über System-A-Transporter wieder aufgenommen werden (Bröer und Brookes, 2001). Anschließend können Neurone aus dem Glutamin wieder Glutamat generieren (Magistretti et al., 1999; Bak et al., 2006). Dieser *Glutamat-Glutamin-Zyklus* stellt neben dem ANLS eine weitere wichtige Form der neurometabolischen Kopplung zwischen

Astrozyten und Neuronen dar (vgl. Abb. 3). Ein Teil des Glutamats kann alternativ in α-Ketoglutarat umgewandelt und so zur ATP-Produktion in den Citratzyklus eingebracht werden (McKenna, 2007).

3.2 Die Kopplung sekundär aktiver Transportmechanismen an Na^+

Neben der zentralen Rolle, die Na^+ in der glutamatergen synaptischen Signalübertragung als Ladungsträger und treibende Kraft für die Reabsorption von freigesetztem Glutamat einnimmt, gibt es viele weitere Transportmechanismen, die die potentielle Energie des Na^+-Gradienten nutzen, um andere Ionen über die Plasmamembran zu bewegen (Kirischuk et al., 2012) (Abb. 9). Diese Art des Ionentransports, die indirekt an die Hydrolyse von ATP gekoppelt ist, wird als sekundär aktiver Transport bezeichnet.

So ist beispielsweise die Regulierung des intra- und extrazellulären pH an den Na^+-Gradienten gekoppelt. Diese liegen im Großhirn bei 7.2 und 7.35 (Putnam, 2001; Chesler, 2003). In Astrozyten ist unter anderem der Na^+-Bikarbonat-Cotransporter (NBC; Abb. 9) für die pH-Regulierung verantwortlich. Dieser transportiert Na^+ gemeinsam mit Bikarbonat (HCO_3^-) in das Zellinnere (Chesler, 2003). Der NBC trägt somit zur Na^+-Beladung der Zelle

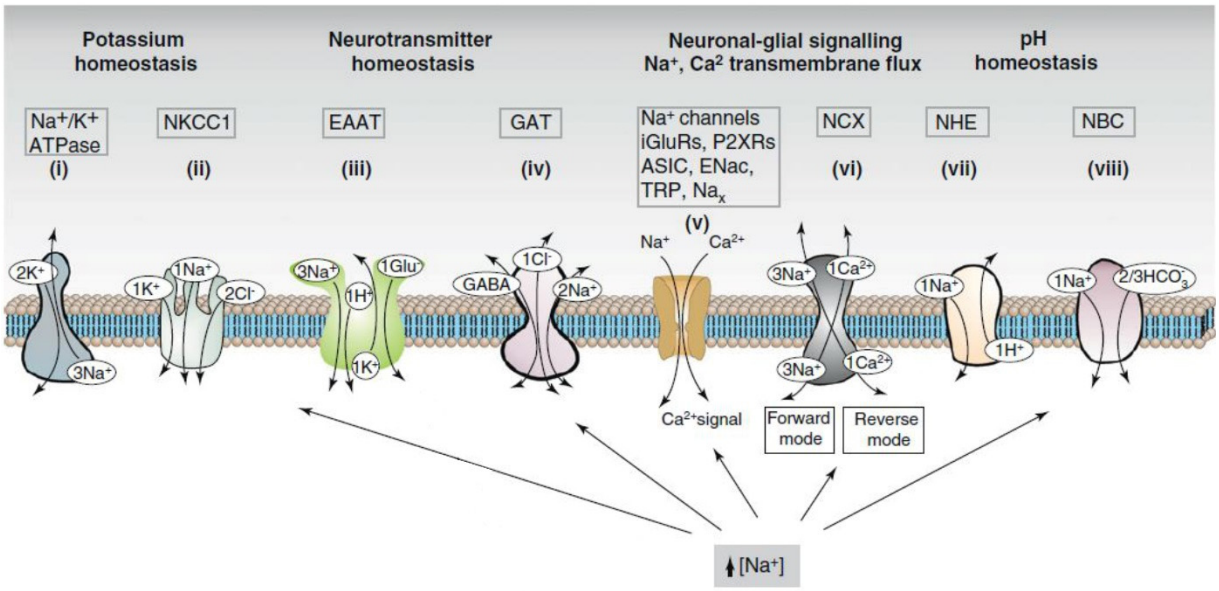

Abbildung 9: Schematische Darstellung der wichtigsten Na^+-abhängige Transportmechanismen. Viele Kanäle und Transporter sind für die Bewegung von Ionen und anderen Molekülen über die Plasmamembran an den einwärtsgerichteten Na^+-Gradienten gekoppelt (ii – viii). Diese Transportwege führen zu einem Anstieg der $[Na^+]_i$. Die Na^+/K^+ ATPase (i) ist der einzige Weg, Na^+ unter Ruhebedingungen aus der Zelle zu entfernen. Abkürzungen: NKCC1: Na^+-K^+-$2Cl^-$-Cotransporter; EAAT: *excitatory amino acid transporter* (Glutamattransporter); GAT: GABA-Transporter; Na^+ channels: Na^+-Kanäle; iGluRs: ionotrope Glutamatrezeptoren; P2XRs: ionotrope Purinrezeptoren; ASIC: *acid sensing ion channel* (Säuresensitiver Ionenkanal); ENac: epithelialer Na^+-Kanal; TRP: *transient receptor potential* Kanal; Na_x: Na^+-Kanal, durch extrazelluläres Na^+ aktiviert; NCX: Na^+-Ca^{2+}-Austauscher; NHE: Na^+-H^+-Austauscher; NBC: Na^+-Bikarbonat-Austauscher. Für weitere Erläuterungen: siehe Text. Angepasst mit Genehmigung aus (Kirischuk et al., 2012).

und dem damit einhergehenden ATP-Verbrauch der NKA bei. Außerdem wird der pH in Astrozyten und Neuronen durch den Na^+-H^+-Austauscher reguliert (Abb. 9; NHE, engl.: *Na*$^+$-*H*$^+$-*Exchanger*), der Na^+ in die Zelle und im Tausch H^+ aus der Zelle hinausbewegt. Dies ist wichtig, da im Zellmetabolismus H^+ als Nebenprodukte anfällt, und die Zelle so ohne den NHE ansäuern würde (Chesler, 2003).

Neben dem pH ist auch Ca^{2+} an den Na^+-Gradienten gekoppelt. Ca^{2+} muss intrazellulär, wie eingangs bereits erwähnt, aufgrund seiner *second messenger* Eigenschaften (Hardingham und Bading, 1999) bei einer niedrigen Konzentration gehalten werden. Dies wird neben ATP-hydrolysierenden Pumpen auch durch den Na^+-Ca^{2+}-Austauscher (Abb. 9; NCX, engl.: *Na*$^+$-*Ca*$^{2+}$-*Exchanger*) realisiert. Dieser transportiert unter Ruhebedingungen Na^+ in das Zellinnere und im Gegenzug Ca^{2+} in den ECS (Rose et al., 2020). Abhängig von der $[Na^+]_i$ und dem damit verbundenen Membranpotential kann der NCX seine Transportrichtung jedoch umkehren und so neben der NKA einen weiteren Weg zum Na^+-Export bieten (Oschmann et al., 2017; Ziemens et al., 2019).

Insgesamt wird deutlich, wie viele zelluläre Funktionen und Prozesse sowohl in Neuronen als auch in Astrozyten von der physiologischen Na^+-Homöostase und dessen einwärtsgerichteten Gradienten abhängig sind. Es ist daher nicht überraschend, dass über die Hälfte der im Gehirn verfügbaren Energie aufgewendet wird, um mit Hilfe der NKA den Na^+-Gradienten aufrecht zu erhalten (Howarth et al., 2012).

4. Das Gehirn unter Energiemangel

Aus den vorangegangenen Kapiteln wird ersichtlich, dass die ungestörte Funktion der NKA und damit der Erhalt des einwärtsgerichteten Na^+-Gradienten die Grundlage für die Gehirnfunktion bildet. Um dies zu gewährleisten ist eine konstante Versorgung des Gehirns mit Glukose und Sauerstoff über das Blut nötig, da Energie in Form von ATP für die NKA-Funktion benötigt wird. In verschiedenen Krankheitsbildern, wie z.B. einem Schlaganfall, kann diese Versorgung mit Energiemetaboliten gestört sein, was schon nach kurzer Zeit zu zellulären Schäden führen kann. Mit jährlich 500.000 assoziierten Todesfällen in den USA (Nedergaard und Dirnagl, 2005) und 62.000 in Deutschland (Heuschmann et al., 2010) zählen Schlaganfälle mit zu den häufigsten Todesursachen weltweit, weshalb die Forschung auf diesem Gebiet von großer Relevanz ist. Demnach sind die zellulären Folgen von Energiemangel des Gehirns zentraler Teil dieser Arbeit.

4.1 Die Beeinträchtigung des Gehirns durch einen ischämischen Schlaganfall

Während eines ischämischen Schlaganfalls kommt es zu einer Verstopfung eines oder mehrerer Blutgefäße des Hirns. Hierdurch wird der Blutfluss im betroffenen Areal reduziert und reicht nicht mehr aus, um den hohen Energiebedarf der vielfältigen zellulären Prozesse zu decken, was zu einem schnellen Abfall des intrazellulären ATPs führt. Im ischämischen Kern sinkt der Blutfluss auf unter 20% ab (Abb. 10) (Kaufmann et al., 1999). Der Verlust der Versorgung mit Sauerstoff und Glukose verhindert die ATP-Produktion durch Glykolyse und oxidative Phosphorylierung und führt in wenigen Minuten zur Erschöpfung der Energiereserven, was in einem Zusammenbruch der Ionengradienten, Depolarisation, Zellschwellen und letztendlich irreversiblem Schaden resultiert. Um den ischämischen Kern herum liegt die Penumbra (Abb. 10), in der der Blutfluss auf 20-40% reduziert ist (Dirnagl et al., 1999; Moskowitz et al., 2010). Der Energiemetabolismus der Zellen in dieser Region ist hierdurch stark beeinträchtigt, der Zelltod kann hier jedoch durch rechtzeitige Reperfusion

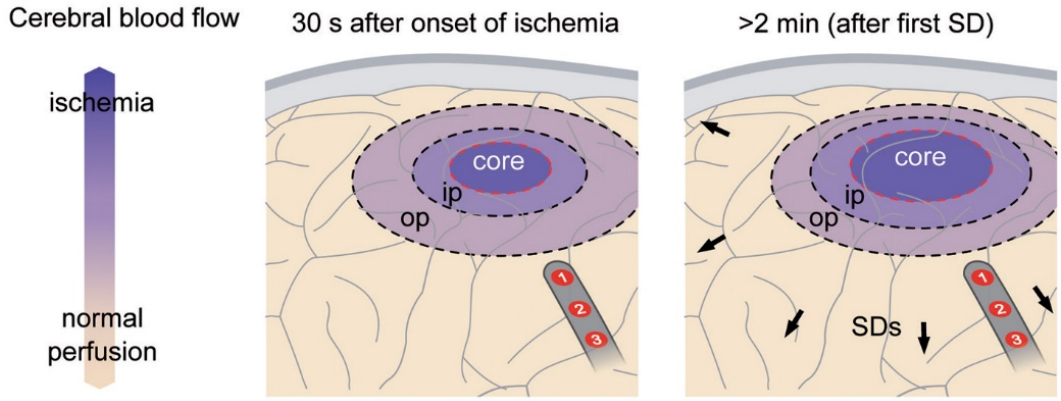

Abbildung 10: *Ausbreitung von Infarktwellen während Ischämie*. Im ischämischen Kern (core) ist der cerebrale Blutfluss komplett inhibiert. Um den Kern herum liegt die innere und äußere Penumbra (ip, op). Infarktwellen (SDs) breiten sich vom Kern her in Richtung der Penumbra aus (Pfeile). Angepasst mit Genehmigung aus (Dreier et al., 2017)

verhindert werden (Gerkau et al., 2017). Die Fähigkeit der Zellen, sich erholen zu können, wird jedoch durch sich ausbreitende Infarktwellen (SDs, engl.: *spreading depolarizations*) beeinträchtigt, die vom Kern in die Penumbra eindringen (Pietrobon und Moskowitz, 2014). Diese gehen unter anderem mit einer (anfangs noch vollständig reversiblen) Akkumulation von Glutamat und K^+ im ECS und einem Zusammenbruch der Ionenhomöostase einher (Abb. 11) (Takano et al., 2007). Dies depolarisiert die Zellen der Penumbra und setzt sie so wiederholt starker metabolischer Belastung aus, was letztendlich zur Ausbreitung der Kernregion in die Penumbra hinein führt.

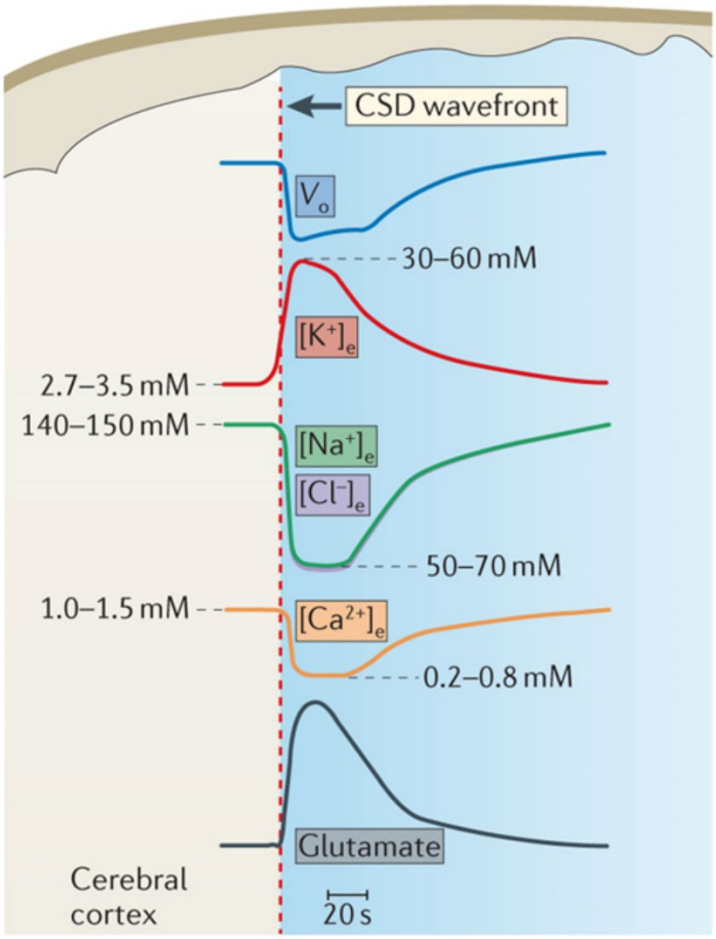

Abbildung 11: *Änderung der extrazellulären Ionenkonzentrationen während corticaler Infarktwellen (CSD: cortical spreading depression)*. Entlang der Front der Infarktwelle akkumulieren Glutamat und K^+ im Extrazellulärraum. Die Konzentration von Na^+, Cl^- und Ca^{2+}, sowie die extrazelluläre Spannung fallen parallel dazu ab. Angepasst mit Genehmigung aus (Pietrobon und Moskowitz, 2014)

Ein einschneidendes Phänomen, das während SDs den Metabolismus der Zellen stark beeinträchtigt, ist der Anstieg der $[Na^+]_i$. Er führt zu einer Stimulation der NKA, und beschleunigt so den Verbrauch des verbliebenen ATPs in den Zellen (Larsen et al., 2016). Die Depolarisation von Neuronen sorgt für weiteren Na^+- und Ca^{2+}-Einstrom durch ionotrope Glutamatrezeptoren und spannungsabhängige Kanäle, was zur weiteren Freisetzung von Glutamat in den ECS führt (Belov Kirdajova et al., 2020). Die Aufnahme des freigesetzten Glutamats durch Astrozyten ist aufgrund ihrer gestörten Na^+-Homöostase eingeschränkt, da dieser Prozess, wie zuvor bereits beschrieben, an den Na^+-Gradienten gekoppelt ist (Danbolt, 2001). Zudem kann es durch die erhöhte $[Na^+]_i$ zu einer Umkehr der EAATs kommen, wodurch sie Glutamat in den ECS freigeben und so die extrazelluläre Glutamatkonzentration weiter erhöhen (Rossi et al., 2000). Sind die Energiereserven in den Zellen der Penumbra erschöpft, führt die stetige Akkumulation von extrazellulärem Glutamat zu weiterem Einstrom von Na^+ und Ca^{2+} über ionotrope Rezeptoren, weiterer Freisetzung von Ca^{2+} aus internen Speichern, Ansäuerung der Zellen, Zellschwellen und letztendlich dem Zelltod. Diese Rückkopplungsschleife von extrazellulärem Glutamat, die die Energiereserven des Gehirns leert und zu Schädigungen der Zellen führt, wird als „Exzitotoxizität“ bezeichnet (Choi und Rothman, 1990).

Ein wichtiger Faktor, der einen erheblichen Beitrag zum zellulären Schwellen während des ischämischen Schlaganfalls leistet, ist der TRPV4 Kanal (engl.: *transient receptor potential vanilla 4*) (Meyer et al., 2022). Hierbei handelt es sich um osmotisch gesteuerte unspezifische

Ionenkanäle, die in Neuronen und Astrozyten (Yu et al., 2019) aber auch in vielen anderen Zellen des Körpers wie im vaskulären System exprimiert werden (Hatano et al., 2013; White et al., 2016). Sie besitzen eine hohe Ca^{2+}- und moderate Na^{+}-Leitfähigkeit (Yu et al., 2019) und tragen unter inhibiertem Energiemetabolismus entscheidend zur Bildung von Hirnödemen und Zellschwellen bei (Jie et al., 2015; Hoshi et al., 2018).

Die Vulnerabilität von Neuronen und Astrozyten gegenüber eingeschränktem Energiemetabolismus unterscheidet sich zudem stark: Astrozyten zeigen sich in diversen Studien als widerstandsfähiger gegen Energiemangel als Neurone (Nedergaard und Dirnagl, 2005; Rossi et al., 2007). Dieser Umstand kann zum einen durch den bereits erwähnten astrozytären Glykogenspeicher zu begründen sein, den Astrozyten unter hypoglykämischen Bedingungen zur Energiegewinnung verwenden können (Wender et al., 2000; Brown, 2004). Neurone besitzen keinen solchen Energiespeicher und sind dadurch anfälliger für energiearme Zustände wie die Ischämie. Zudem weisen Neurone wie eingangs beschrieben einen deutlich höheren ATP-Verbrauch unter Ruhebedingungen und während glutamaterger Signalübertragung von bis zu 60% der verfügbaren Energie auf, der vor allem auf die NKA zurückgeht (Lennie, 2003; Howarth et al., 2012). Unter ischämischen Bedingungen wird dieser Verbrauch durch die permanent erhöhte Glutamatkonzentration im ECS vor allem in Neuronen durch NMDA-R vermittelte Na^{+}-Einströme weiter potenziert (Gerkau et al., 2018). Somit sind während transientem Energiemangel vor allem Neurone von nekrotischem Zelltod betroffen, während Astrozyten dies besser kompensieren können (Pulsinelli, 1985; Martin et al., 1998).

5. Ziel dieser Arbeit

Wie bereits in der Einleitung betont, ist die konstante Produktion von ATP für das Überleben der Neurone und Astrozyten von entscheidender Bedeutung, da es als Hauptenergieträger im Gehirn eine zentrale Rolle einnimmt. Es wird in vielen Prozessen für den Haushalt der Zellen verwendet, und zum Großteil, um den einwärtsgerichteten Na^+-Gradienten aufzubauen und aufrecht zu erhalten, sowohl unter Ruhebedingungen als auch bei synaptischer Aktivität. Hier sorgt der Einstrom von Na^+ über verschiedene Transportmechanismen für den Verbrauch von ATP durch die NKA, wobei verschiedene Einstromwege je nach Menge an eintretendem Na^+ unterschiedlich stark zu diesem beitragen.

Vorangegangene Studien unseres Instituts haben bereits den Anstieg von Na^+ und Abfall von ATP in Zellen des Mausgehirns sowohl unter physiologischen Bedingungen wie synaptischer Stimulation (Gerkau et al., 2019b), als auch unter pathophysiologischen Bedingungen wie Epilepsie-ähnlicher Netzwerkaktivität (Karus et al., 2016; Gerkau et al., 2019b; Lerchundi et al., 2020) oder chemisch induziertem Schlaganfall-ähnlichem Energiemangel (Gerkau et al., 2018; Lerchundi et al., 2019b) gezeigt.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist nun, den Zusammenhang zwischen Na^+-Einstrom und ATP-Abfall des Gehirns zu beleuchten und zu charakterisieren. Der Einfluss verschiedener Wege des Na^+-Einstroms auf die intrazelluläre ATP-Konzentration von Neuronen und Astrozyten soll mit Hilfe von bildgebender Fluoreszenzmikroskopie während glutamaterger synaptischer Übertragung und chemisch induzierten ischämischen Bedingungen untersucht und quantifiziert werden. Vor allem letzteres soll Aufschluss über die ersten kritischen Minuten eines ischämischen Schlaganfalls geben, in denen die betroffenen Zellen in der Penumbra durch rechtzeitige Reperfusion gerettet werden können und so Hinweise auf potentielle therapeutische Ansätze liefern.

6. ATP- und Na^+-Detektion in lebenden Zellen

Um Änderungen der ATP-Konzentration in lebenden Zellen messen zu können, wurde im Rahmen dieser Arbeit der Nanosensor *ATeam1.03*^{YEMK} („ATeam“) (Imamura et al., 2009; Lerchundi et al., 2019a) verwendet, da sich dessen dynamischer Bereich *in situ* genau im Bereich der angenommen intrazellulären ATP-Konzentration von ~2 mM in Zellen des Großhirns befindet (Fukuda et al., 1983; Toloe et al., 2014; Pathak et al., 2015). Dieser basiert auf dem Prinzip des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers (FRET; Abb. 12). Hier wird Energie von einem Fluoreszenzprotein mit niedriger Emissionswellenlänge („Donor“) auf eines

mit höherer Emissionswellenlänge („Akzeptor“) übertragen. Wichtig ist dabei, dass das Emissionsspektrum des Donors mit dem Anregungsspektrum des Akzeptors überlappt (Clegg, 1995). Wird das Donormolekül durch Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt, kann man so durch den Energietransfer das Fluoreszenzlicht des Akzeptors detektieren. Beide Fluoreszenzproteine müssen räumlich nah (wenige Nanometer) zueinander gelegen sein (Clegg, 2009), damit die Energieübertragung stattfinden kann. Im Fall von ATeam sind Donor (*enhanced cyan fluorescent protein*, eCFP) und Akzeptor (Venus) durch die ε-Untereinheit der bakteriellen F_0F_1-ATP-Synthase verbunden, welche ATP mit hoher Spezifität binden kann (Kato-Yamada und Yoshida, 2003). Ist ATP an das Verbindungsprotein gebunden, ist dessen Konstellation so, dass Donor und Akzeptor räumlich nah zueinander stehen, wodurch FRET ermöglicht wird und man emittierte Fluoreszenz des Akzeptors detektieren kann. Liegt der Sensor in ATP-ungebundener Form vor, findet eine Konformationsänderung statt, wodurch Donor und Akzeptor weiter auseinander liegen. Hierdurch wird die Effizienz des Energietransfers eingeschränkt, wodurch weniger Akzeptor- und mehr Donorfluoreszenz detektiert werden kann (Abb. 12). Gleichzeitiges Messen der Donor- und Akzeptorfluoreszenz

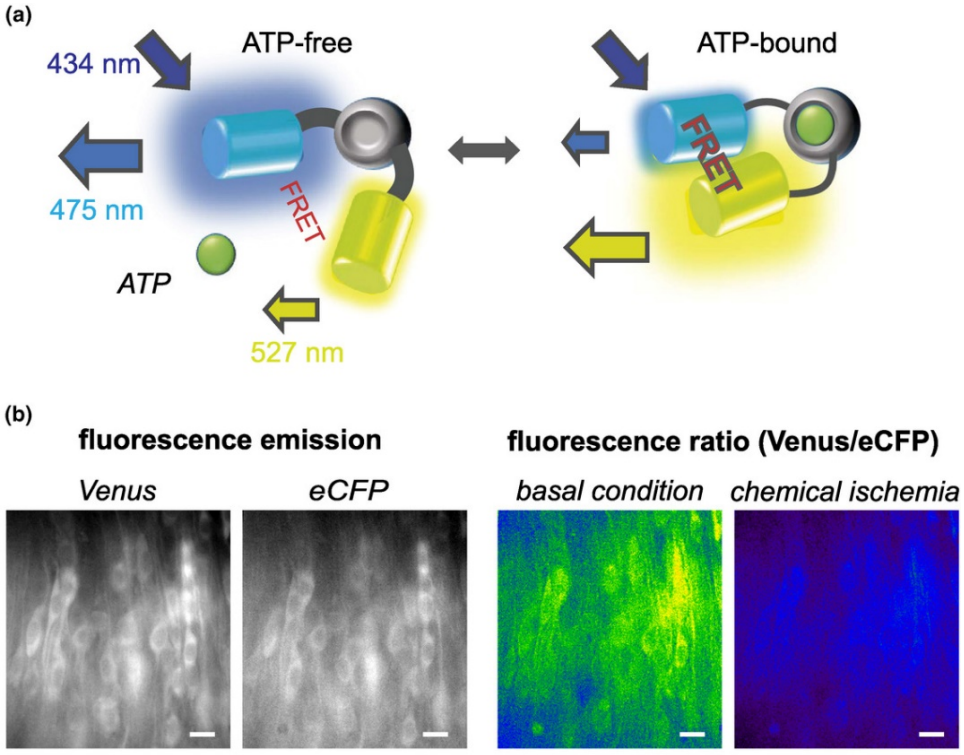

Abbildung 12: Imaging des intrazellulären ATPs mit ATeam1.03^{YEMK}. A) Schema der Funktionsweise von ATeam. Anregung erfolgt bei 434 nm, die Emission liegt bei 475 nm (Donor) und 527 nm (Akzeptor). Unter Abwesenheit von ATP liegen Donor und Akzeptor weit auseinander, die Donorfluoreszenz überwiegt. Bei Anwesenheit von ATP liegen beide nah beieinander, FRET kann stattfinden und die Akzeptorfluoreszenz überwiegt. B) Links: Fluoreszenzbilder von Venus (Akzeptor) und eCFP (Donor). Rechts: ATeam-Ratio unter Ruhebedingungen und während chemischer Ischämie. Blaue Farben repräsentieren geringe ATeam-Ratio (und damit ATP-Gehalt), gelb hohe. Maßstabsbalken 10 µM. Angepasst mit Genehmigung aus (Lerchundi et al., 2019b).

und das Errechnen des Quotienten der beiden (Venus/eCFP, „ATeam-Ratio“) kann so als Maß für die intrazelluläre ATP-Konzentration verwendet werden (Imamura et al., 2009).

Die Messungen mit ATeam wurden in organotypischen Hirnschnittkulturen durchgeführt. Dies sind Hirnschnitte der Maus, die auf eine semipermeable Biomembran übertragen und anschließend in einem Brutschrank bei 36 °C gehalten werden. Zu Beginn des Kultivierungsprozesses kann über Adeno-assoziierte Viren (AAV; Abb. 13) der offene Leserahmen für ATeam in die Zellen eingebracht werden, sodass diese den Sensor selbst exprimieren. Dieser Leserahmen ist einem Zelltyp-spezifischen Promotor nachgeschaltet, wodurch die Expression von ATeam entweder nur in Astrozyten (Promotor: *glial fibrillary acidic protein*, GFAP; engl. für saures Gliafaserprotein) oder nur in Neuronen (Promotor: Synapsin1) stattfindet (Lerchundi et al., 2019a). Durch die spezifische Expression des Sensors in nur einem Zelltyp können Interferenzen von Signalen aus den jeweils anderen Zelltypen während der Messungen vermieden werden. ATeam eignet sich daher als perfektes Werkzeug, um Änderungen des ATP-Gehalts im Maushirn Zelltyp-spezifisch experimentell zu bestimmen.

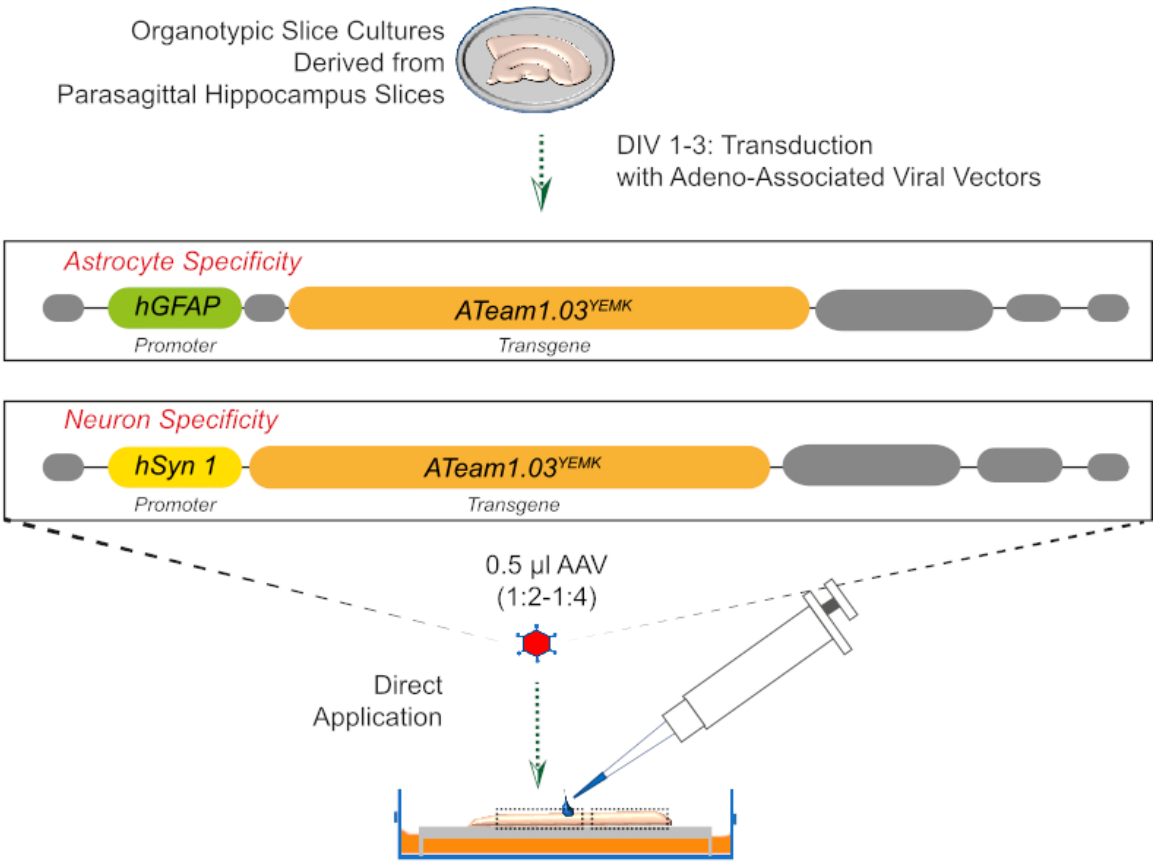

Abbildung 13: *Schematische Darstellung der Transfektion von organotypischen Hirnschnitten mit dem genetisch kodierten Sensor ATeam1.03^{YEMK}*. Organotypische parasagittale Hirnschnitte werden innerhalb der ersten drei Tage in Kultur mit einem Adeno-assoziierten Virus transfiziert, der entweder den astrozytenspezifischen Promotor hGFAP oder den neuronenspezifischen Promotor hSynapsin1 und die Sequenz für die Expression von ATeam1.03^{YEMK} enthält. Verdünnte Aliquots wurden direkt auf die Schnitte appliziert. Angepasst mit Genehmigung aus (Lerchundi et al., 2019a)

Um Änderungen der $[Na^+]_i$ zu messen, wurde in dieser Arbeit die Technik der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie verwendet. Hierzu wurde ein organotypischer Maushirnschnitt mit Hilfe einer feinen Glaspipette mit dem Na^+-sensitiven Ionenindikator *ION NaTRIUM Green-2* (ING-2) beladen (Meyer et al., 2022). Um Neurone und Astrozyten voneinander zu unterscheiden, wurden die Hirnschnitte vorher zusätzlich mit dem astrozytenspezifischen Farbstoff *Sulforhodamin 101* gefärbt (SR101; Abb. 20) (Kafitz et al., 2008). ING-2 erfährt bei Na^+ Bindung eine Änderung in seinen spektralen Eigenschaften, sodass seine Fluoreszenzintensität bei steigender $[Na^+]_i$ zunimmt (Meyer et al., 2022).

7. ATP-Änderungen unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen

Zelluläre Aktivität im Gehirn verbraucht bereits unter Ruhebedingungen konstant ATP (Lennie, 2003; Harris et al., 2012). Dieser Verbrauch wird durch neuronale Aktivität sowie durch Krankheitsbilder erhöht und die Wiederherstellung des verbrauchten ATPs teils beeinträchtigt (Hertz, 2008). Um erstmalig detaillierte Aufschlüsse über den Verbrauch und die Wiederherstellung von ATP während physiologischer und pathologischer Konditionen zu erhalten, wurden in dieser Arbeit Messungen mit ATeam im Hippocampus und im somatosensorischen Cortex in organotypischen Hirnschnitten der Maus unter verschiedenen pharmakologischen Manipulationen durchgeführt. Die wichtigsten Ergebnisse werden im Nachfolgenden diskutiert.

7.1 Glutamat induziert ATP-Änderungen in corticalen und hippocampalen Astrozyten

Glutamat ist der wichtigste erregende Neurotransmitter des Gehirns (Danbolt, 2001). An der glutamatergen Synapse bindet freigesetztes Glutamat an die postsynaptischen AMPA-, Kainat- und NMDA-Rezeptoren und ermöglicht so die Signalübertragung durch den Einstrom von Na^+. Astrozyten des Cortex besitzen jedoch, im Gegensatz zu denen des Hippocampus, auch funktionelle NMDA-R (Schipke et al., 2001; Lalo et al., 2011), die ebenfalls unter Anwesenheit von Glutamat einen messbaren astrozytärem Na^+-Einstrom vermitteln. Dies konnte ebenfalls in vorangegangen Arbeiten bestätigt werden (Ziemens et al., 2019). In Anbetracht der engen Kopplung zwischen Na^+ und ATP wirft dies zwingend die Frage auf, ob der gemessene Na^+-Einstrom zu einer messbaren Reduktion des zellulären ATPs in Astrozyten führt.

Hierzu wurden im Rahmen dieser Studie Hirnschnittkulturen, die ATeam in Astrozyten exprimieren, untersucht. Diese wurden für 10 Sekunden 1 mM Glutamat in der umspülenden artifiziellen Cerebrospinalflüssigkeit (ACSF) ausgesetzt. Dies führte in Astrozyten des Cortex zu einem größeren Abfall des zellulären ATPs als im Hippocampus. Dieser Abfall ließ sich im Cortex abschwächen, indem die NMDA-R mit Hilfe des Inhibitors AP5 geblockt wurden (Abb. 14). Diese Ergebnisse legen nahe, dass der gemessene Glutamat-induzierte ATP-Abfall in Astrozyten in der Tat zu einem substanziellen Anteil durch den NMDA-R-vermittelten Na^+-Einstrom erzeugt wurde. Die Ergebnisse dieser Untersuchung wurden in Kollaboration mit Thapaliya et al. 2023 veröffentlich (Thapaliya, **Pape**, et al., 2023).

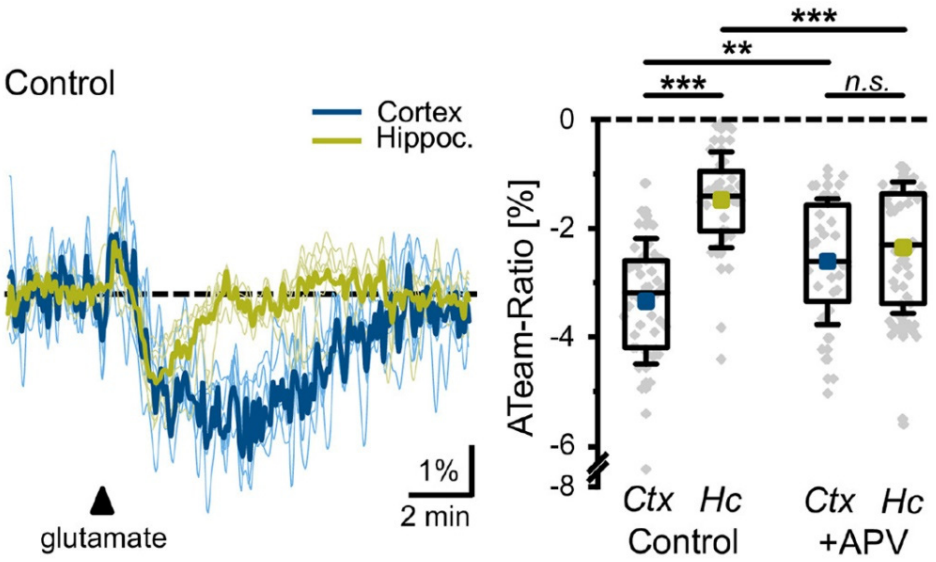

Abbildung 14: Glutamat-induzierter Abfall von ATP in corticalen und hippocampalen Astrozyten. Links: Astrozytäre ATP-Änderungen im Cortex (blau) und Hippocampus (gelb) durch 10 s Glutamateinwasch (Pfeil). Gezeigt sind die Spuren jeweils einer Messung, dünne Linien repräsentieren einzelne Zellen, dicke Linien die Mittelwerte dieser. Rechts: Box-Plots der Änderungen der ATeam-Ratio bei Glutamateinwasch im Cortex (Ctx) und Hippocampus (Hc) unter Kontrollbedingungen (Control) und unter Anwesenheit des NMDA-R-Blockers APV. Gezeigt sind einzelne Datenpunkte (graue Diamanten), Mittelwert (Quadrat), Median (Querlinie), IQ50 (Box) und SD (Whisker). **P < 0.01; ***P < 0.001; n.s. = nicht signifikant. Angepasst mit Genehmigung aus (Thapaliya et al., 2023).

7.2 Chemisch induzierte Ischämie sorgt für einen ATP-Abfall in Neuronen und Astrozyten

Um die neuronale und astrozytäre Funktion zu gewährleisten, ist die konstante Produktion von ATP durch die Glykolyse und die oxidative Phosphorylierung unabdingbar. Diese ist in einigen Krankheitsbildern, wie dem ischämischen Schlaganfall, nicht mehr gegeben. Um die Auswirkung von ischämischen Schlaganfällen auf die ATP-Homöostase zu untersuchen, wurden organotypische Hirnschnitte einer glukosefreien Lösung ausgesetzt, die pharmakologische Inhibitoren 2-DG (2-Deoxyglukose, 2 mM; Glukoseanalogon, das die

Glykolyse inhibiert) (Woodward und Hudson, 1955) und NaN_3 (Natriumazid, 5 mM; Inhibitor der Cytochrom C-Oxidase in der mitochondriellen Elektronentransportkette) (Swanson, 1992) enthält (Abb. 15). Da diese Behandlung die Zustände eines ischämischen Schlaganfalls simuliert, wird sie im Folgenden als chemische Ischämie bezeichnet.

Die Ergebnisse meiner Arbeit zeigen einen Abfall des intrazellulären ATPs während chemischer Ischämie in Neuronen und Astrozyten in organotypischen Hirnschnitten der Maus (Eitelmann, …, **Pape**, et al., 2022; **Pape** und Rose, 2023; Everaerts, Thapaliya, **Pape**, et al., *Eingereicht*). Interessanterweise führte die alleinige Inhibition der Glykolyse zu keinem detektierbaren ATP-Abfall (Abb. 15). Dies ist im Einklang mit vorangegangenen Experimenten in akuten Hirnschnitten (Karus et al., 2015) und Zellkultur (Rose et al., 1998), die zeigten, dass ein Block der Glykolyse keinen Effekt auf die Na^+-Homöostase in Neuronen und nur einen vernachlässigbar geringen auf die in Astrozyten hat. Inhibition der mitochondriellen Zellatmung hingegen führte zu einem deutlich detektierbaren Abfall der ATeam-Ratio in beiden Zelltypen (Abb. 15). Hierbei ist auffällig, dass die ATP-Reduktion bei chemischer Ischämie größer war, als die Summe der beiden einzelnen Inhibitionen. Dem ATP-Verlust in

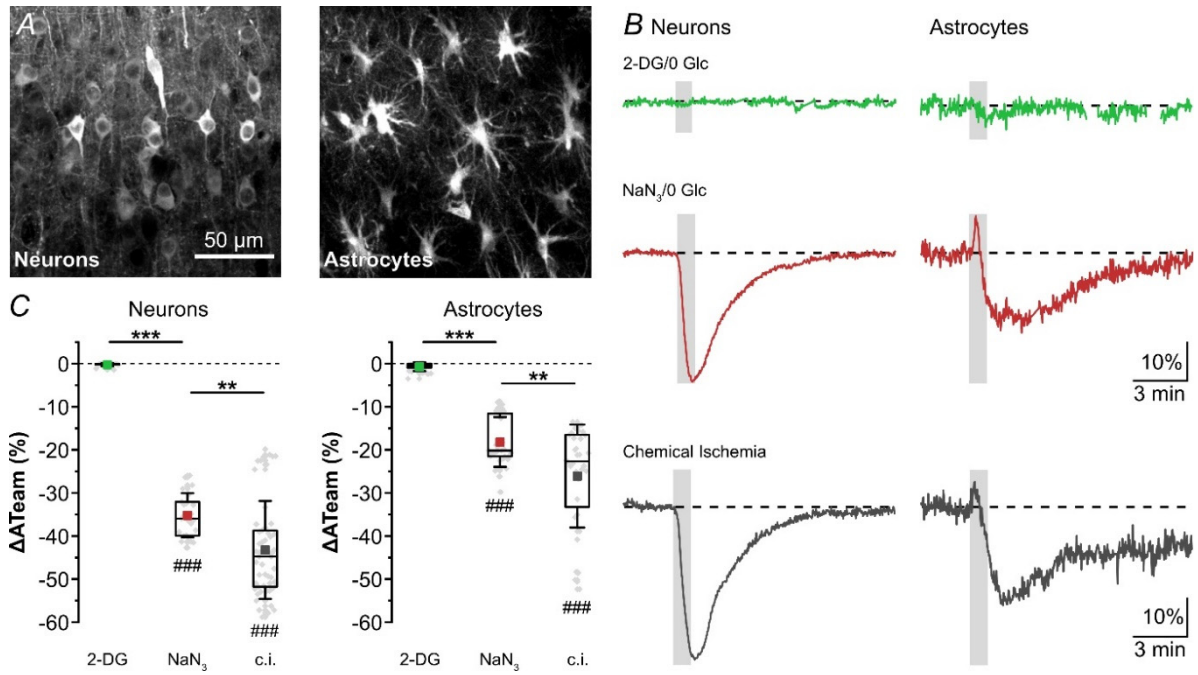

Abbildung 15: ATP-Änderungen bei eingeschränktem Energiemetabolismus. A) Konfokale Aufnahme der ATeam-Fluoreszenz in Neuronen (Synapsin1-Promotor; links) und Astrozyten (GFAP-Promotor; rechts). B) Änderungen der ATeam-Ratio in einzelnen Neuronen und Astrozyten durch 1-minütige Perfusion mit glukosefreier Lösung und 2 mM 2-Deoxyglukose (2-DG; Oben), 5 mM Natriumazid (NaN_3; Mitte), und einer Kombination aus beidem (Chemische Ischämie; Unten), wie durch die grauen Kästen angedeutet. C) Box-Plots der Änderungen der ATeam-Ratio in Neuronen und Astrozyten während der in (B) beschriebenen Manipulationen (c.i. = Chemische Ischämie). Gezeigt sind einzelne Datenpunkte (graue Diamanten), Mittelwert (Quadrat), Median (Querlinie), IQ50 (Box) und SD (Whisker). Sterne zeigen Signifikanzen zwischen verschiedenen Manipulationen für einen Zelltyp, Rauten zeigen Signifikanzen zwischen Neuronen und Astrozyten für eine Manipulation. **P < 0.01; ***/###P < 0.001. Angepasst mit Genehmigung aus (Pape und Rose, 2023).

Astrozyten gingen kurze, geringe Anstiege voraus, ein Verhalten, das nicht bei Neuronen beobachtet werden konnte (Abb. 15). Es konnte bereits gezeigt werden, dass eine erhöhte $[K^+]_e$, wie sie zum einen während Ischämie aufgrund der fehlenden NKA-Aktivität vorherrscht (Gerkau et al., 2018), sowie neuronale Stimulation die astrozytäre ATP-Produktion anregen können (Fernandez-Moncada et al., 2018; Lerchundi et al., 2019b). Diese Produktion ist vermutlich auf Aktivierung des NBCe1 als Folge der erhöhten $[K^+]_e$ zurückzuführen (Deitmer und Rose, 2010; Bittner et al., 2011; Chatton et al., 2016). Dies könnte hier in der initialen Phase der chemischen Ischämie den ATP-Verlust in Astrozyten überschreiben.

Der ATP-Abfall wurde stärker, je länger die chemische Ischämie induziert wurde, wobei beide Zelltypen bei 10 min ein Plateau in ihrer ATeam-Ratio aufwiesen (Abb. 16). Dies deutet auf eine komplette Erschöpfung des intrazellulären ATPs hin. Mit Hilfe unserer vorangegangenen Kalibrierung für ATeam (Lerchundi et al., 2020) konnten wir von dieser Depletion den anfänglichen ATP-Gehalt der Zellen berechnen. Demnach liegen Neurone unter Ruhebedingungen bei 2,8 mM ATP, Astrozyten bei 2,1 mM. Dies ist im Rahmen der in der Literatur durch verschiedene Methoden beschriebenen Werte (Fukuda et al., 1983; Toloe et al.,

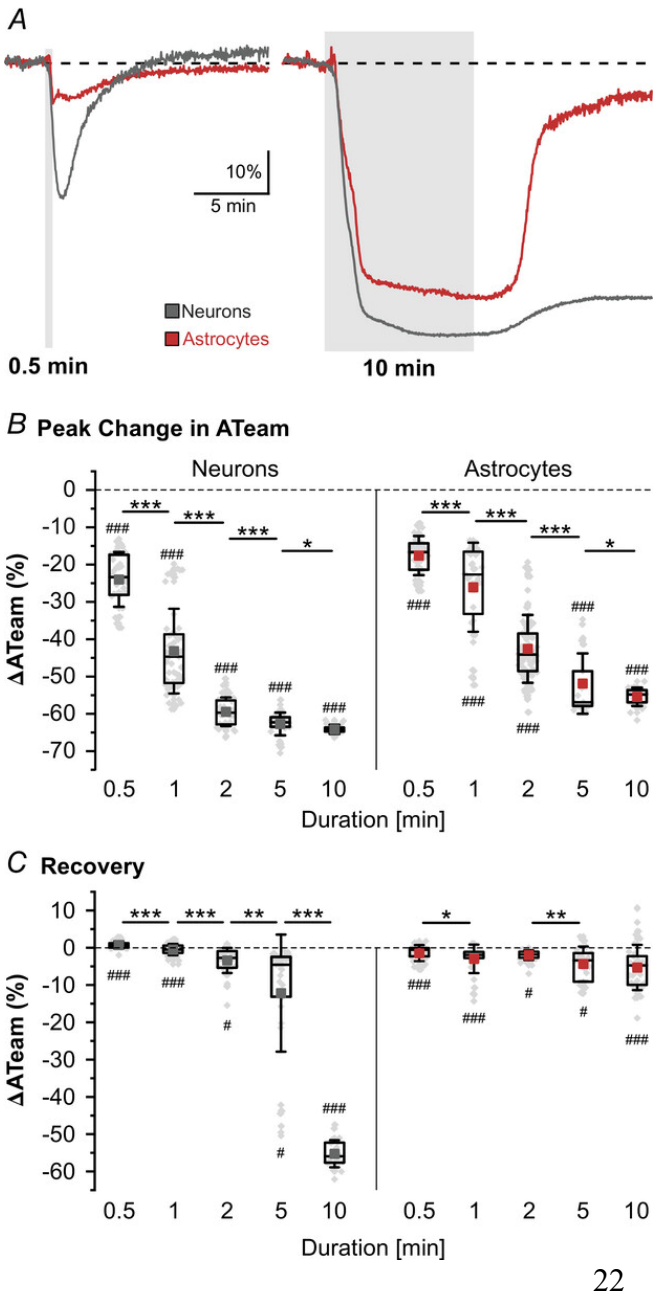

Abbildung 16: ATP-Änderungen bei unterschiedlich langer chemischen Ischämie. A) Änderungen der ATeam-Ratio in einzelnen Neuronen (grau) und Astrozyten (rot) bei 0.5 Minuten (links) und 10 Minuten (rechts) chemischer Ischämie (grauer Kasten). B) Box-Plots der maximalen Änderung der ATeam-Ratio in Neuronen und Astrozyten bei 0.5 – 10 Minuten chemischer Ischämie. C) Erholung der ATeam-Ratio 20 Minuten nach dem Auswasch der chemsichen Ischämie. B, C) Gezeigt sind einzelne Datenpunkte (graue Diamanten), Mittelwert (Quadrat), Median (Querlinie), IQ50 (Box) und SD (Whisker). Sterne zeigen Signifikanzen zwischen verschiedenen Manipulationen für einen Zelltyp, Rauten zeigen Signifikanzen zwischen Neuronen und Astrozyten für eine Manipulation. */#P < 0.05; **/##P < 0.01; ***/###P < 0.001. Angepasst mit Genehmigung aus (Pape und Rose, 2023)

2014; Pathak et al., 2015) und trägt durch eine neue Methode zur Bestimmung der ATP-Konzentration unter Ruhebedingungen weiter zum fundamentalen Verständnis der Physiologie der Zellen des Gehirns bei. Die höhere ATP-Konzentration in Ruhe war im Kontext des höheren Energiebedarfs von Neuronen im Vergleich zu Astrozyten durch ihre Signalaktivität zu erwarten (Lennie, 2003; Harris et al., 2012).

Neurone reagierten zudem in allen untersuchten Zeitspannen mit einem stärkeren Abfall des ATP als Astrozyten (Abb. 16). Diese höhere Empfindlichkeit von Neuronen gegenüber Energiemangel wurde in anderen Studien bereits gezeigt und ist wie eingangs beschrieben wahrscheinlich auf ihre höhere Dichte an NMDA-R (Kawasaki et al., 1990; Rose und Konnerth, 2001) in Verbindung mit der exzitotoxischen extrazellulären Glutamatkonzentration (Choi und Rothman, 1990; Schurr et al., 1995) und das Fehlen von Glykogenspeichern, wie Astrozyten sie besitzen (Rossi et al., 2000; Wender et al., 2000), zurückzuführen. In einer Kollaboration mit Ziebarth et al. konnte in dieser Arbeit erstmals gezeigt werden, dass Glutamat im ECS in organotypischen Hirnschnitten während chemisch induzierter Ischämie in der Tat akkumuliert. Ein Manuskript, welches diese Ergebnisse beinhaltet wird in den nächsten Wochen eingereicht (Ziebarth, **Pape**, et al., *in Vorbereitung*). Der Unterschied in der Vulnerabilität ist ebenfalls erkennbar in der Fähigkeit der Zellen, sich von der chemischen Ischämie zu erholen. Während Neurone bei 5 Minuten Schwierigkeiten zeigten, zu ihrem initialen ATP-Level zurückzukehren und nach 10 Minuten Ischämie nur noch 50% des anfänglichen Wertes erreichten, wo sich möglicherweise ein *pathologisches Equilibrium* (Dijkstra et al., 2016) einstellte, konnten Astrozyten nach jeder Ischämie-Dauer zu mindestens 95% ihrer Baseline zurückkehren (Abb. 16).

Insgesamt zeigt diese Studie, dass transiente chemische Ischämie den ATP-Gehalt von Neuronen und Astrozyten vorrübergehend erniedrigt, wovon Neurone unabhängig von der Dauer der Ischämie stärker betroffen waren als Astrozyten und größere Schwierigkeiten zeigten, sich von dieser zu erholen.

7.3 Einfluss des Na^+-Einstroms auf ATP-Levels während chemischer Ischämie

Der Hauptverbraucher der Energie im Gehirn ist die NKA, die so den Na^+-Gradienten aufrechterhält (Somjen, 2004). Als direkte Konsequenz daraus sind Änderungen der $[Na^+]_i$ eine der ersten Folgen von ATP-Mangel des Gehirns (Hansen, 1985; Somjen, 2004; Hertz, 2008), was eine Depolarisation der Zellen und weiteren Na^+-Einstrom mit sich bringt. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es daher, den Einfluss der verschiedenen Wege des Na^+-Einstroms auf den ATP-Abfall während ischämischen Konditionen in Neuronen und Astrozyten zu untersuchen.

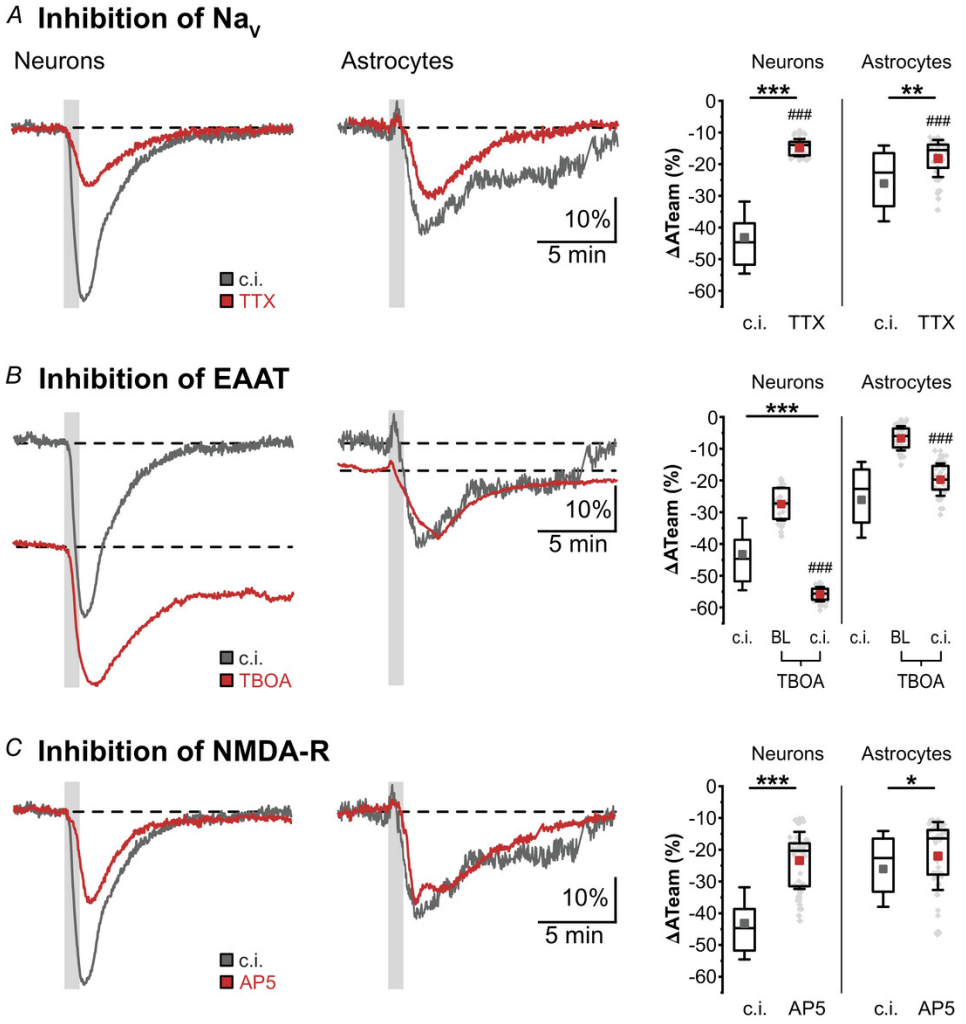

Abbildung 17: Einfluss verschiedener Wege des Na^+-Einstroms auf Ischämie-induzierte ATP-Änderungen. A-C) Änderungen der ATeam-Ratio in einzelnen Neuronen (links) und Atrozyten (Mitte) bei 1-minütiger chemischer Ischämie (grauer Kasten). Graue Spuren zeigen Kontrollmessungen, rote Spuren zeigen Messungen in Anwesenheit von 0.5 µM TTX (A), 1 µM TFB-TBOA (TBOA; B), oder 100 µM AP5 (C). Box-Plots (rechts) zeigen die maximalen Änderugen der ATeam-Ratio bei chemischer Ischämie (c.i.) in Ab- und Anwesenheit der Inhibitoren. Gezeigt sind einzelne Datenpunkte (graue Diamanten), Mittelwert (Quadrat), Median (Querlinie), IQ50 (Box) und SD (Whisker). Sterne zeigen Signifikanzen zwischen verschiedenen Manipulationen für einen Zelltyp, Rauten zeigen Signifikanzen zwischen Neuronen und Astrozyten für eine Manipulation. *P < 0.05; **P < 0.01; ***/$^{\#\#\#}$P < 0.001. Verwendet mit Genehmigung aus (Pape und Rose, 2023).

Während Aktionspotentialen wird der neuronale Na^+-Einstrom durch TTX-sensitive Na_v vermittelt (Müller und Somjen, 2000). Inhibition der Na_v durch den selektiven Blocker TTX (0.5 µM) (Narahashi, 2008) reduzierte den ATP-Abfall während chemischer Ischämie um 65% in Neuronen und 30% in Astrozyten (Abb. 17). Obwohl letztere diese Kanäle nicht exprimieren (Verkhratsky und Nedergaard, 2018), zeigte deren Inhibition einen deutlichen Effekt auf den ATP-Verlust, was indirekt durch weniger neuronale Erregung und damit verbundene Ausschüttung von Glutamat und K^+ zu erklären ist. Stark aktive Na_v in organotypischen hippocampalen Hirnschnitten führten in vorangegangenen Studien zu zellulären Schäden (Kovács et al., 1999), was den starken Effekt ihrer Inhibition in der vorliegenden Studie erklären könnte.

Ein weiterer wichtiger Weg des Na^+-Einstroms in Pyramidenzellen sind die NMDA-R, sowohl während physiologischer (Rose und Konnerth, 2001; Mondragao et al., 2016) als auch pathophysiologischer Bedingungen (Gerkau et al., 2018). Dementsprechend zeigte sich der Einfluss von NMDA-R als substanziell, ihre pharmakologische Inhibition reduzierte den ATP-Verlust in Neuronen um 40% (Abb. 17). In Astrozyten wurde die funktionelle Expression von NMDA-R ebenfalls nachgewiesen (Schipke et al., 2001; Ziemens et al., 2019). Entsprechend waren diese für 15% des ATP-Abfalls in Astrozyten verantwortlich (Abb. 17).

Astrozyten nehmen Na^+ zum großen Teil während der Glutamataufnahme über EAATs auf (Bozzo und Chatton, 2010). Die physiologische Relevanz dieser Transporter wurde bei ihrer pharmakologischen Inhibition deutlich, da sie in wenigen Minuten zu einer Abnahme des ATPs führte, noch bevor die chemische Ischämie induziert wurde (Abb. 17). Diese Abnahme wurde begleitet von sichtlicher Verschlechterung der Schnittpräparate, ein Phänomen, das so schon in akuten Hirnschnitten gezeigt werden konnte (Gerkau et al., 2018). Neurone wurden hiervon stärker betroffen als Astrozyten. Dies bestätigt Erkenntnisse früherer Studien, die einen Zusammenbruch der Na^+-Homöostase durch inhibierte Glutamataufnahme (Langer und Rose, 2009; Karus et al., 2016) aufgrund der langen erhöhten Präsenz von Glutamat im ECS (Jabaudon et al., 1999) zeigten. Trotz der drastischen Folgen der gehinderten Glutamataufnahme für die zellulären ATP-Levels wurden diese durch chemische Ischämie weiter reduziert, was in Neuronen zu ähnlichen Niveaus wie während der kompletten Depletion nach 10 Minuten Ischämie führte (vgl. Abb. 16).

Neben den Mechanismen des Na^+-Einstroms, die unmittelbar mit glutamaterger Aktivität in Verbindung stehen, werden durch den gestörten Na^+-Gradienten unter ischämischen Bedingungen zahlreiche weitere Transportmechanismen beeinflusst, die an diesen gekoppelt sind. Hierzu zählt unter anderem der in Astrozyten exprimierte NBC

(Theparambil et al., 2014). In einer Kooperation mit Everaerts et al. konnte durch seine pharmakologische Inhibition mit Hilfe des NBC-spezifischen Blockers S0859 (Ch'en et al., 2008) gezeigt werden, dass er während chemischer Ischämie zur Na^+-Beladung und ebenfalls zum damit assoziierten Verbrauch von ATP in Astrozyten beiträgt (Abb. 18) (Everaerts, Thapaliya, **Pape**, et al., *Eingereicht*).

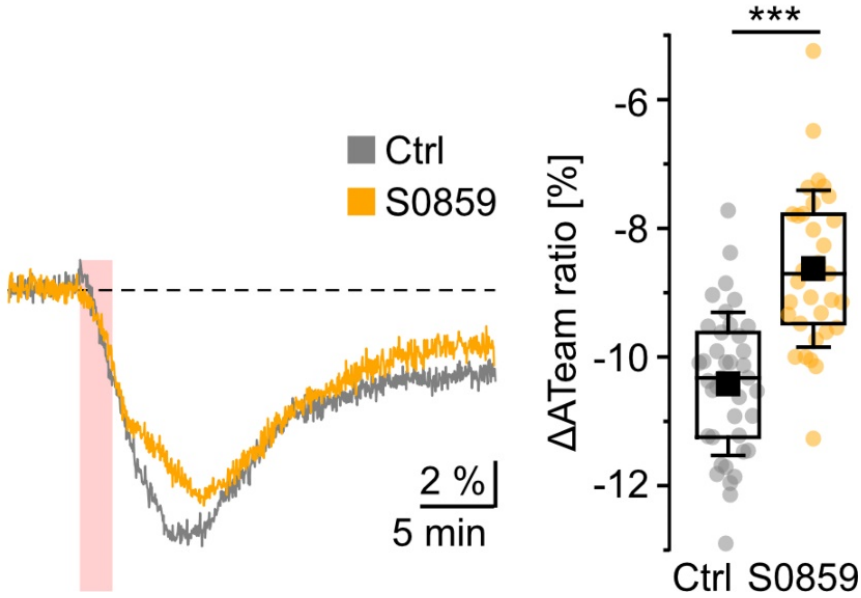

Abbildung 18: Einfluss des NBC auf Ischämie-induzierte ATP-Änderungen. Links: Änderungen der ATeam-Ratio in einzelnen Astrozyten bei chemischer Ischämie (roter Kasten). Die graue Spur zeigt eine Kontrollmessung, die orangefarbene Spur zeigt eine Messung in Anwesenheit von S0859. Rechts: Box-Plots der maximalen Änderungen der ATeam-Ratio bei chemischer Ischämie unter An- und Abwesenheit des NBC-Inhibtors S0859. Gezeigt sind einzelne Datenpunkte (Kreise), Mittelwert (Quadrat), Median (Querlinie), IQ50 (Box) und SD (Whisker). ***/$^{###}$P < 0.001. Verwendet mit Genehmigung aus (Everaerts et al., *Eingereicht*).

Diese Arbeit zeigt die Relevanz und den direkten Einfluss von diversen Wegen des Na^+-Einstroms auf den ATP-Haushalt während ischämischen Konditionen sowohl für Neurone als auch Astrozyten auf und hebt so die Rolle der NKA und den damit verbundenen Link zwischen Energiemetabolismus und Na^+-Homöstase hervor.

7.4 Der TRPV4-Kanal trägt während Energiemangel entscheidend zum ATP-Verlust bei

Neben den zuvor untersuchten glutamatergen Einstromwegen gibt es zahlreiche weitere Pfade, über die Na^+ in die Zellen unter patho-/physiologischen Konditionen eintreten kann. Ein Kanal, der kürzlich als Weg des Na^+-Einstroms in Neuronen während metabolischer Inhibition identifiziert wurde, ist der TRPV4-Kanal (Meyer et al., 2022). Hierbei handelt es sich um einen nicht-selektiven Kationenkanal, der durch verschiedene Stimuli wie osmotisches Zellschwellen oder Hitze aktiviert wird (Vriens et al., 2004) und entscheidend zur Entwicklung von ischämischen Hirnödemen beiträgt (Jie et al., 2015; Hoshi et al., 2018). Der in akuten Hirnschnitten gezeigte TRPV4-abhängige Na^+-Einstrom während chemischer Ischämie (Meyer et al., 2022) konnte im Rahmen dieser Studie in organotypischen Hirnschnittkulturen ebenfalls für Neurone und erstmals auch für Astrozyten gezeigt werden (Abb. 20). Analog zu den glutamatergen Na^+-Kanälen und -Transportern konnte die pharmakologische Inhibition von TRPV4 außerdem den Ischämie-bedingten ATP-Abfall reduzieren (Abb. 19). Diese Erkenntnisse decken sich mit anderen Studien, die Expression von TRPV4 in beiden Zelltypen,

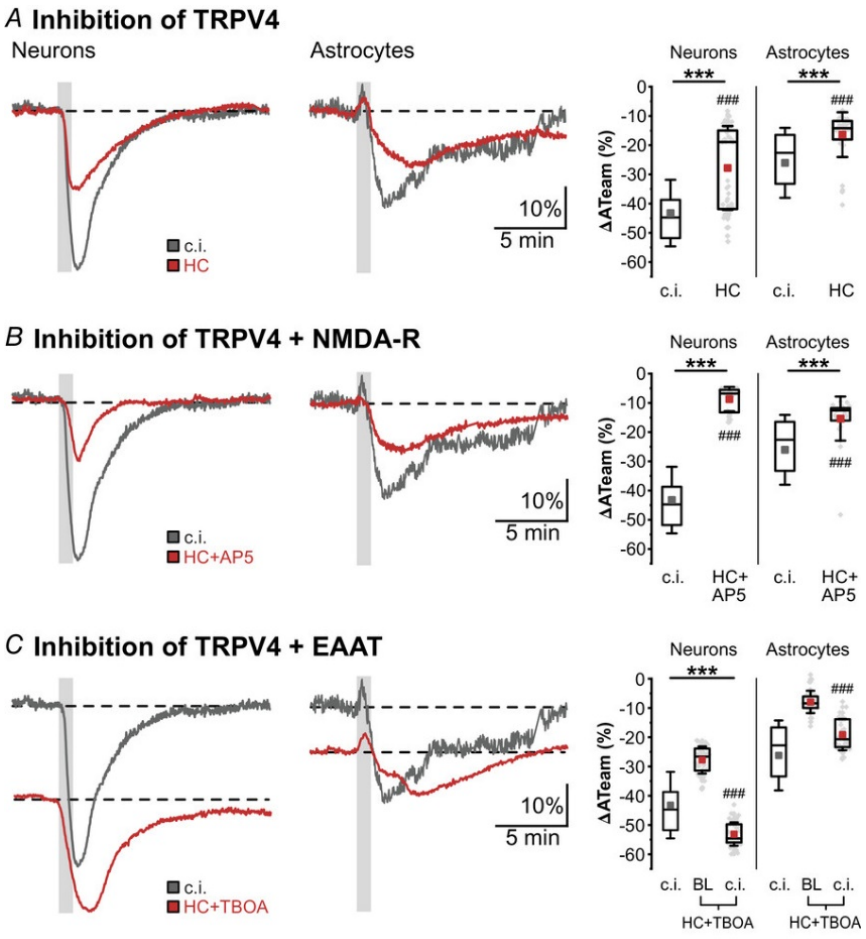

Abbildung 19: Einfluss der TRPV4-Kanäle auf Ischämie-induzierte ATP-Änderungen. A-C) Änderungen der ATeam-Ratio in einzelnen Neuronen (links) und Astrozyten (Mitte) bei 1-minütiger chemischer Ischämie (grauer Kasten) Graue Spuren zeigen Kontrollmessungen, rote Spuren zeigen Messungen in Anwesenheit von 10 µM HC-067047 (HC) alleine (A) und HC kombiniert mit 100 µM AP5 (B) oder 1 µM TFB-TBOA (TBOA; C). Box-Plots (rechts) zeigen die maximalen Änderungen der ATeam-Ratio bei chemischer Ischämie (c.i.) in Ab- und Anwesenheit der Inhibitoren. Gezeigt sind einzelne Datenpunkte (graue Diamanten), Mittelwert (Quadrat), Median (Querlinie), IQ50 (Box) und SD (Whisker). ***/###P < 0.001. Angepasst mit Genehmigung aus (Pape und Rose, 2023).

sowie dessen Rolle für Ca^{2+} Einströme in der ischämischen Penumbra zeigen konnten (Shibasaki, 2016; Rakers et al., 2017).

TRPV4-Kanäle sind primär als Ca^{2+}-Kanäle bekannt, ihre Leitfähigkeit für Na^{+} ist im Vergleich zu der für Ca^{2+} eher gering (Yu et al., 2019). Daher wird für ihren starken Effekt auf die Na^{+}-Beladung während chemischer Ischämie und den damit verbundenen Einfluss auf den ATP-Verlust ein Zusammenspiel mit anderen Transportern angenommen (White et al., 2016). So wurde beispielsweise die Interaktion zwischen TRPV4 und NMDA-R nachgewiesen (Shibasaki et al., 2007; Li et al., 2013). Um zu untersuchen, ob die Reduktion in Na^{+}-Beladung und damit einhergehende ATP-Abfall während chemischer Ischämie durch diese Interaktion zu begründen ist, wurden beide Kanäle gemeinsam inhibiert. Dieser Doppelblock führte zu einem additiven Effekt, der Na^{+} Einstrom und ATP-Verlust fast vollständig verhindern konnte (Abb. 19, 20). Dies legt nahe, dass der Einfluss von TRPV4 auf Na^{+} und ATP während eingeschränktem Energiemetabolismus primär unabhängig von NMDA-R zu sein scheint.

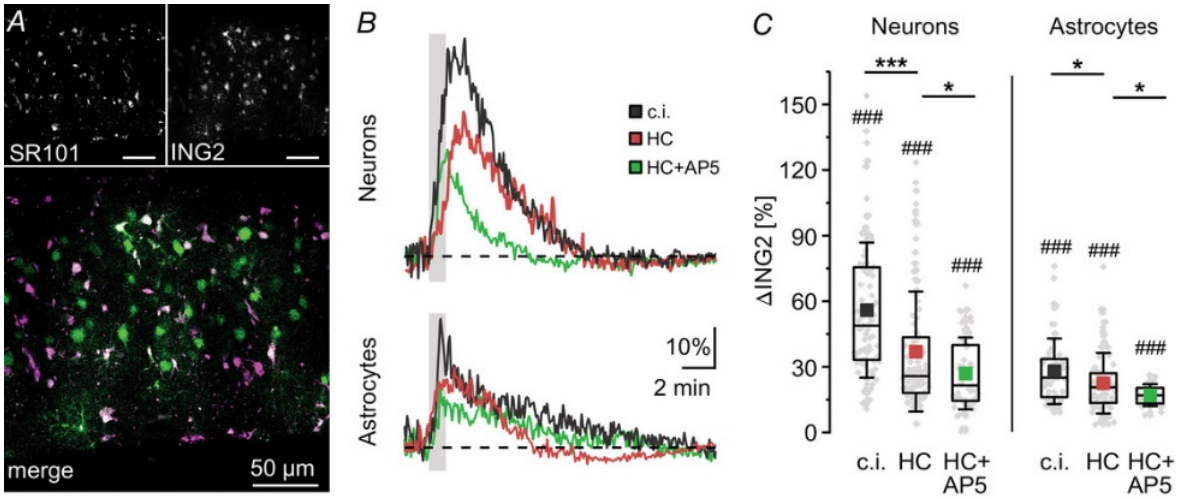

Abbildung 20: TRPV4-abhängiger Na^{+}-Einstrom bei chemischer Ischämie. A) Konfokale Aufnahme der SR101- (oben links) und ING-2-Fluoreszenz (oben rechts). Unten: Merge beider Kanäle (magenta: SR101; grün: ING-2; Zellen, die mit beiden Farbstoffen gefärbt sind (Astrozyten) erscheinen weiß. Maßstabsbalken 50 µM. B) Änderungen der ING-2-Fluoreszenz in einzelnen Neuronen (oben) und Astrozyten (unten) bei 1-minütiger chemischer Ischämie (graue Kästen) unter Kontrollbedinungen (dunkelgrau), in Anwesenheit von 10 µM HC (rot) und von 10 µM HC kombiniert mit 100 µM AP5 (grün). C) Box-Plots der maximalen Änderungen der ING-2-Fluoreszenz durch chemische Ischämie ohne Ihnhibtoren (c.i.) und unter Anwesenheit von HC und HC plus AP5. Gezeigt sind einzelne Datenpunkte (graue Diamanten), Mittelwert (Quadrat), Median (Querlinie), IQ50 (Box) und SD (Whisker). Sterne zeigen Signifikanzen zwischen verschiedenen Manipulationen für einen Zelltyp, Rauten zeigen Signifikanzen zwischen Neuronen und Astrozyten für eine Manipulation. *P < 0.05; **P < 0.01; ***/###P < 0.001. Verwendet mit Genehmigung aus (Pape und Rose, 2023)

7.5 Zusammenfassung

Seit einigen Jahren werden genetisch enkodierte Nanosensoren als robustes, etabliertes Werkzeug benutzt, um eine Vielzahl von Energiemetaboliten, wie z.B. Laktat (San Martin et al., 2013), NADH (Hung et al., 2011) oder ATP (Tantama et al., 2013; Lerchundi et al., 2019b; Kohler et al., 2023) zu untersuchen. Diese Studie verwendet den Sensor ATeam1.03^{YEMK} (Imamura et al., 2009), um den intrazellulären ATP-Haushalt während physiologischer und pathologischer Konditionen zu untersuchen.

Vorangegangene Studien konnten bereits den Glutamat-induzierten Einstrom von Na^+ über NMDA-R in Neurone (Rose und Konnerth, 2001) und Astrozyten (Ziemens et al., 2019), sowie den dadurch entstehenden Abfall in intrazellulärem ATP in Neuronen zeigen (Gerkau et al., 2019b). Die vorliegende Arbeit zeigt erstmals ebenfalls den NMDA-R vermittelten ATP-Verlust bei Glutamatapplikation in Astrozyten (Thapaliya, **Pape**, et al., 2023).

Diese Arbeit unterstreicht zusätzlich die unterschiedliche Vulnerabilität von Neuronen und Astrozyten gegenüber inhibiertem Energiemetabolismus und zeigt die ungleiche ATP-Konzentration zwischen den beiden Zelltypen auf. Zudem konnte sie den Beitrag und die Rolle verschiedener Wege des Na^+-Einstroms zum Ischämie-induzierten ATP-Verlust aufzeigen. Der Hauptanteil wird durch spannungs- und glutamatabhängige Kanäle vermittelt (**Pape** und Rose, 2023), wobei auch ein substanzieller ATP-Verbrauch vom glutamatunabhängigen NBC abhängig ist (Everaerts, Thapaliya, **Pape**, et al., *Eingereicht*). Darüber hinaus trägt der TRPV4-Kanal entscheidend zur Na^+-Beladung und dem ATP-Verlust während Ischämie bei und bietet somit einen vielversprechenden Behandlungsansatz für Betroffene eines ischämischen Schlaganfalls.

Insgesamt zeigt sich die starke Auswirkung von nur kurzzeitigem Energiemangel auf den ATP-Haushalt und damit die Überlebensfähigkeit der Zellen des Gehirns und die hohen metabolischen Kosten des Na^+-Einstroms, was die Notwendigkeit von schnellem Handeln während eines ischämischen Schlaganfalls hervorhebt.

8. Publikationen und Manuskripte

Die Publikationen sind chronologisch sortiert, angefangen bei der neusten Publikation. Mein Beitrag zu den Publikationen während der Promotion ist jeweils aufgeführt. Aus Gründen des Kopierschutzes wurden die Publikationen für die Veröffentlichung dieser Dissertation entfernt.

8.1 Publizierte Manuskripte

Seiten 31-46

Activation of TRPV4 channels promotes the loss of cellular ATP in organotypic slices of the mouse neocortex exposed to chemical ischemia

Nils Pape and Christine R. Rose

J Physiol. DOI: 10.1113/JP284430 (**2023**)

Impact Factor 2023: 6.228

Mein Beitrag zur Publikation während der Promotion:

- Planung und Konzeptualisierung
- Durchführung und Analyse aller Messungen
- Interpretation und Gestaltung der Daten in den präsentierten Abbildungen
- Erstellen des Manuskriptes
- Prüfung und Revision des finalen Manuskriptes

Seiten 48-61

Modeling the heterogeneity of sodium and calcium homeostasis between cortical and hippocampal astrocytes and its impact on bioenergetics

Pawan Thapaliya, **Nils Pape**, Christine R. Rose and Ghanim Ullah

Front. Cell. Neurosci. DOI: 10.3389/fncel.2023.1035553 (**2023**)

Impact Factor 2023: 6.147

Mein Beitrag zur Publikation während der Promotion:

- Durchführung und Analyse der Experimente in Abb. 8
- Erstellen von Abb. 8
- Verfassen des „Material und Methoden“- und „Ergebnis“-Abschnitts zu ATP-Imaging
- Prüfung und Revision des finalen Manuskriptes

Seiten 63-80

Changes in Astroglial K^+ upon Brief Periods of Energy Deprivation in the Mouse Neocortex

Sara Eitelmann, Jonathan Stephan, Katharina Everaerts, Simone Durry, **Nils Pape**, Niklas J. Gerkau and Christine Rose

Int J Mol Sci. DOI: 10.3390/ijms23094836 (**2022**)

Impact Factor 2022/2023: 6.208

Mein Beitrag zur Publikation während der Promotion:

- Durchführung und Analyse der ATeam-Messungen, dargestellt in Abb. 1
- Erstellen von Abb. 1
- Verfassen des „Material und Methoden"- und „Ergebnis"-Abschnitts zu ATP-Imaging
- Prüfung und Revision des finalen Manuskriptes

8.3 Eingereichte Manuskripte

Seiten 82-104

Inward Operation of NBCe1 Promotes Astrocytic Na^+ loading and Loss of ATP in Mouse Neocortex during Brief Chemical Ischemia

Katharina Everaerts, Pawan Thapaliya, **Nils Pape**, Simone Durry, Sara Eitelmann, Eleni Roussa, Ghanim Ullah and Christine R. Rose

Eingereicht bei *Cells* (**06.07.2023**)

Impact Factor 2023: 7.67

Mein Beitrag zur Publikation während der Promotion:

- Durchführung und Analyse der Experimente in Abb. 5
- Verfassen des „Material und Methoden"- und „Ergebnis"-Abschnitts zu ATP-Imaging
- Prüfung und Revision des finalen Manuskriptes

8.4 Manuskripte in Vorbereitung

Seiten 106-174

Atypical, plume-like events drive glutamate accumulation during chemical ischemia in cortical slice cultures

Tim Ziebarth, **Nils Pape**, Joel S.E. Nelson, Christine R. Rose, Andreas Reiner

Mein Beitrag zur Publikation während der Promotion:

- Durchführung und Analyse der Experimente in Abb. S1
- Erstellen von Abb. S1
- Verfassen des „Material und Methoden"- und „Ergebnis"-Abschnitts zu ATP-Imaging
- Prüfung und Revision des Manuskriptes

9. Literaturverzeichnis

Araque A, Parapura V, Sanzgiri RP, Haydon PG (1999) Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. Trends in neurosciences 22:208–215.

Arranz AM, Hussein A, Alix JJP, Pérez-Cerdá F, Allcock N, Matute C, Fern R (2008) Functional glutamate transport in rodent optic nerve axons and glia. Glia 56:1353–1367.

Attwell D, Laughlin SB (2001) An energy budget for signaling in the grey matter of the brain. Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism 21:1133-1145.

Bak LK, Schousboe A, Waagepetersen HS (2006) The glutamate/GABA-glutamine cycle: aspects of transport, neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer. Journal of neurochemistry 98:641-653.

Bélanger M, Allaman I, Magistretti PJ (2011) Brain energy metabolism: focus on astrocyte-neuron metabolic cooperation. Cell metabolism 14:724-738.

Berg JM, Tymoczko JL, Gatto jr GJ, Stryer L (2018a) Glykolyse und Gluconeogenese. In: Stryer Biochemie, pp 529-579: Springer.

Berg JM, Tymoczko JL, Gatto jr GJ, Stryer L (2018b) Der Citratzyklus. In: Stryer Biochemie, pp 581-611: Springer.

Berg JM, Tymoczko JL, Gatto jr GJ, Stryer L (2018c) Die oxidative Phosphorylierung. In: Stryer Biochemie, pp 613-660: Springer.

Belov Kirdajova D, Kriska J, Tureckova J, Anderova M (2020) Ischemia-Triggered Glutamate Excitotoxicity From the Perspective of Glial Cells. Front Cell Neurosci 14:51.

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.

Bittner CX, Valdebenito R, Ruminot I, Loaiza A, Larenas V, Sotelo-Hitschfeld T, Moldenhauer H, San Martin A, Gutierrez R, Zambrano M, Barros LF (2011) Fast and reversible stimulation of astrocytic glycolysis by K+ and a delayed and persistent effect of glutamate. J Neurosci 31:4709-4713.

Bozzo L, Chatton J-Y (2010) Inhibitory effects of (2S, 3S)-3-[3-[4-(trifluoromethyl)benzoylamino]benzyloxy]aspartate (TFB-TBOA) on the astrocytic sodium responses to glutamate. Brain Research 1316:27-34.

Brini M, Carafoli E (2011) The plasma membrane Ca(2)+ ATPase and the plasma membrane sodium calcium exchanger cooperate in the regulation of cell calcium. Cold Spring Harb Perspect Biol 3.

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.

Bröer S, Brookes N (2001) Transfer of glutamine between astrocytes and neurons. Journal of Neurochemistry 77:705–719.

Brown AM (2004) Brain glycogen re-awakened. Journal of neurochemistry 89:537-552.

Cameron R, Klein L, Shyjan AW, Rakic P, Levenson R (1994) Neurons and astroglia express distinct subsets of Na, K-ATPase α and β subunits. Molecular brain research 21:333-343.

Ch'en FF, Villafuerte FC, Swietach P, Cobden PM, Vaughan-Jones RD (2008) S0859, an N-cyanosulphonamide inhibitor of sodium-bicarbonate cotransport in the heart. Br J Pharmacol 153:972-982.

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.
Choi DW, Rothman SM (1990) The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death. Annual review of neuroscience 13:171-182.
Chuquet J, Quilichini P, Nimchinsky EA, Buzsáki G (2010) Predominant enhancement of glucose uptake in astrocytes versus neurons during activation of the somatosensory cortex. Journal of Neuroscience 30:15298-15303.
Clegg RM (1995) Fluorescence resonance energy transfer. Current opinion in biotechnology 6:103-110.
Clegg RM (2009) Förster resonance energy transfer—FRET what is it, why do it, and how it's done. Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology 33:1-57.
Danbolt NC (2001) Glutamate uptake. Progress in neurobiology 65:1-105.
Daneman R, Prat A (2015) The blood–brain barrier. Cold Spring Harbor perspectives in biology 7:a020412.
Deitmer JW, Rose CR (2010) Ion changes and signalling in perisynaptic glia. Brain research reviews 63:113-129.
Denk W, Yuste R, Svoboda K, Tank DW (1996) Imaging calcium dynamics in dendritic spines. Current opinion in neurobiology 6:372-378.
Dienel GA (2017) Lack of appropriate stoichiometry: Strong evidence against an energetically important astrocyte–neuron lactate shuttle in brain. Journal of Neuroscience Research 95:2103-2125.
Dienel GA (2019) Brain glucose metabolism: integration of energetics with function. Physiological reviews 99:949-1045.
Dienel GA, Cruz NF (2016) Aerobic glycolysis during brain activation: adrenergic regulation and influence of norepinephrine on astrocytic metabolism. Journal of neurochemistry 138:14-52.
Dijkstra K, Hofmeijer J, van Gils SA, van Putten MJ (2016) A Biophysical Model for Cytotoxic Cell Swelling. J Neurosci 36:11881-11890.
Dimmer K-S, FRIEDRICH B, Lang F, 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.
Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA (1999) Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. Trends in neurosciences 22:391-397.
Dreier JP, Fabricius M, Ayata C, Sakowitz OW, William Shuttleworth C, Dohmen C, Graf R, Vajkoczy P, Helbok R, Suzuki M (2017) Recording, analysis, and interpretation of spreading depolarizations in neurointensive care: review and recommendations of the COSBID research group. Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism 37:1595-1625.
Eitelmann S, Stephan J, Everaerts K, Durry S, Pape N, Gerkau NJ, Rose CR (2022) Changes in Astroglial K(+) upon Brief Periods of Energy Deprivation in the Mouse Neocortex. Int J Mol Sci 23.
Engl E, Attwell D (2015) Non-signalling energy use in the brain. The Journal of physiology 593:3417-3429.
Erecinska M, Silver IA (1994) Ions and energy in mammalian brain. Progress in neurobiology 43:37-71.
Everaerts K, Thapaliya P, Pape N, Durry S, Eitelmann S, Roussa E, Ullah G, Rose CR (Eingereicht) Inward Operation of NBCe1 Promotes Astrocytic Na^+ loading and Loss of ATP in Mouse Neocortex during Brief Chemical Ischemia. Eingereicht in Cells
Fernandez-Moncada I, Ruminot I, Robles-Maldonado D, Alegria K, Deitmer JW, Barros LF (2018) Neuronal control of astrocytic respiration through a variant of the Crabtree effect. Proc Natl Acad Sci U S A 115:1623-1628.

Fonnum F (1984) Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain. Journal of neurochemistry 42:1-11.
Fukuda J, Fujita Y, Ohsawa K (1983) ATP content in isolated mammalian nerve cells assayed by a modified luciferin-luciferase method. Journal of neuroscience methods 8:295-302.
Geering K (2008) Functional roles of Na, K-ATPase subunits. Current opinion in nephrology and hypertension 17:526-532.
Gerkau NJ, Kafitz KW, Rose CR (2019a) Imaging of Local and Global Sodium Signals in Astrocytes. Methods Mol Biol 1938:187-202.
Gerkau NJ, Rakers C, Petzold GC, Rose CR (2017) Differential effects of energy deprivation on intracellular sodium homeostasis in neurons and astrocytes. Journal of neuroscience research.
Gerkau NJ, Rakers C, Durry S, Petzold GC, Rose CR (2018) Reverse NCX Attenuates Cellular Sodium Loading in Metabolically Compromised Cortex. Cereb Cortex 28:4264-4280.
Gerkau NJ, Lerchundi R, Nelson JSE, Lantermann M, Meyer J, Hirrlinger J, Rose CR (2019b) Relation between activity-induced intracellular sodium transients and ATP dynamics in mouse hippocampal neurons. J Physiol 597:5687-5705.
Guo R, Gu J, Zong S, Wu M, Yang M (2018) Structure and mechanism of mitochondrial electron transport chain. Biomedical journal 41:9-20.
Hansen AJ (1985) Effect of anoxia on ion distribution in the brain. Physiological reviews 65:101-148.
Hardingham GE, Bading H (1999) Calcium as a versatile second messenger in the control of gene expression. Microscopy research and technique 46:348-355.
Harris JJ, Jolivet R, Attwell D (2012) Synaptic energy use and supply. Neuron 75:762-777.
Hatano N, Suzuki H, Itoh Y, Muraki K (2013) TRPV4 partially participates in proliferation of human brain capillary endothelial cells. Life sciences 92:317-324.
Hertz L (2008) Bioenergetics of cerebral ischemia: a cellular perspective. Neuropharmacology 55:289-309.
Heuschmann PU, Busse O, Wagner M, Endres M, Villringer A, Röther J, Kolominsky-Rabas P, Berger K (2010) Frequency and care of stroke in Germany. Aktuelle Neurologie 37:333-340.
Hoshi Y, Okabe K, Shibasaki K, Funatsu T, Matsuki N, Ikegaya Y, Koyama R (2018) Ischemic Brain Injury Leads to Brain Edema via Hyperthermia-Induced TRPV4 Activation. J Neurosci 38:5700-5709.
Hösli L, Zuend M, Bredell G, Zanker HS, de Oliveira CEP, Saab AS, Weber B (2022) Direct vascular contact is a hallmark of cerebral astrocytes. Cell Reports 39:110599.
Howarth C, Gleeson P, Attwell D (2012) Updated energy budgets for neural computation in the neocortex and cerebellum. Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism 32:1222-1232.
Hung YP, Albeck JG, Tantama M, Yellen G (2011) Imaging cytosolic NADH-NAD+ redox state with a genetically encoded fluorescent biosensor. Cell metabolism 14:545-554.
Imamura H, Nhat KPH, Togawa H, Saito K, Iino R, Kato-Yamada Y, Nagai T, Noji H (2009) Visualization of ATP levels inside single living cells with fluorescence resonance energy transfer-based genetically encoded indicators. Proceedings of the National Academy of Sciences 106:15651-15656.
Jabaudon D, Shimamoto K, Yasuda-Kamatani Y, Scanziani M, Gähwiler B, Gerber U (1999) Inhibition of uptake unmasks rapid extracellular turnover of glutamate of nonvesicular origin. Proceedings of the National Academy of Sciences 96:8733-8738.

Jie P, Tian Y, Hong Z, Li L, Zhou L, Chen L, Chen L (2015) Blockage of transient receptor potential vanilloid 4 inhibits brain edema in middle cerebral artery occlusion mice. Frontiers in Cellular Neuroscience 9:141.
Kacem K, Lacombe P, Seylaz J, Bonvento G (1998) Structural organization of the perivascular astrocyte endfeet and their relationship with the endothelial glucose transporter: a confocal microscopy study. Glia 23:1-10.
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. Journal of neuroscience methods 169:84-92.
Kaplan JH (2002) Biochemistry of na, K-ATPase. Annual review of biochemistry 71:511-535.
Karus C, Ziemens D, Rose CR (2015) Lactate rescues neuronal sodium homeostasis during impaired energy metabolism. Channels (Austin) 9:200-208.
Karus C, MondragÃ£o MA, Ziemens D, Rose CR (2016) Astrocytes restrict discharge duration and neuronal sodium loads during recurrent network activity. Glia 63:936-957.
Kato-Yamada Y, Yoshida M (2003) Isolated ϵ subunit of thermophilic F1-ATPase binds ATP. Journal of Biological Chemistry 278:36013-36016.
Kaufmann AM, Firlik AD, Fukui MB, Wechsler LR, Jungries CA, Yonas H (1999) Ischemic core and penumbra in human stroke. Stroke 30:93-99.
Kawasaki K, Traynelis SF, Dingledine R (1990) Different responses of CA1 and CA3 regions to hypoxia in rat hippocampal slice. Journal of neurophysiology 63:385-394.
Kirischuk S, Parpura V, Verkhratsky A (2012) Sodium dynamics: another key to astroglial excitability? Trends in neurosciences 35:497-506.
Kohler S, Winkler U, Junge T, Lippmann K, Eilers J, Hirrlinger J (2023) Gray and white matter astrocytes differ in basal metabolism but respond similarly to neuronal activity. Glia 71:229-244.
Kovács R, Gutierrez R, Kivi A, Schuchmann S, Gabriel S, Heinemann U (1999) Acute cell damage after low Mg2+-induced epileptiform activity in organotypic hippocampal slice cultures. Neuroreport 10:207-213.
Lalo U, Palygin O, North RA, Verkhratsky A, Pankratov Y (2011) Age-dependent remodelling of ionotropic signalling in cortical astroglia. Aging cell 10:392-402.
Langer J, Rose CR (2009) Synaptically induced sodium signals in hippocampal astrocytes in situ. The Journal of physiology 587:5859-5877.
Larsen BR, Stoica A, MacAulay N (2016) Managing Brain Extracellular K(+) during Neuronal Activity: The Physiological Role of the Na(+)/K(+)-ATPase Subunit Isoforms. Front Physiol 7:141.
Larsen BR, Assentoft M, Cotrina ML, Hua SZ, Nedergaard M, Kaila K, Voipio J, MacAulay N (2014) Contributions of the Na+/K+-ATPase, NKCC1, and Kir4. 1 to hippocampal K+ clearance and volume responses. Glia 62:608-622.
Lennie P (2003) The cost of cortical computation. Current biology 13:493-497.
Lerchundi R, Huang N, Rose CR (2020) Quantitative Imaging of Changes in Astrocytic and Neuronal Adenosine Triphosphate Using Two Different Variants of ATeam. Frontiers in Cellular Neuroscience 14.
Lerchundi R, Kafitz KW, Faerfers M, Beyer F, Huang N, Rose CR (2019a) Imaging of intracellular ATP in organotypic tissue slices of the mouse brain using the FRET-based sensor ATeam1. 03YEMK. J Vis Exp 154:10.3791.
Lerchundi R, Kafitz KW, Winkler U, Färfers M, Hirrlinger J, Rose CR (2019b) FRET-based imaging of intracellular ATP in organotypic brain slices. Journal of neuroscience research 97:933-945.

Li L, Qu W, Zhou L, Lu Z, Jie P, Chen L, Chen L (2013) Activation of Transient Receptor Potential Vanilloid 4 Increases NMDA-Activated Current in Hippocampal Pyramidal Neurons. Front Cell Neurosci 7:17.
Lund-Andersen H (1979) Transport of glucose from blood to brain. Physiological reviews 59:305-352.
Magistretti PJ, Pellerin L, Rothman DL, Shulman RG (1999) Energy on demand. Science 283:496-497.
Martin LJ, Al-Abdulla NA, Brambrink AM, Kirsch JR, Sieber FE, Portera-Cailliau C (1998) Neurodegeneration in excitotoxicity, global cerebral ischemia, and target deprivation: a perspective on the contributions of apoptosis and necrosis. Brain research bulletin 46:281-309.
McCaslin AF, Chen BR, Radosevich AJ, Cauli B, Hillman EM (2011) In vivo 3D morphology of astrocyte—vasculature interactions in the somatosensory cortex: implications for neurovascular coupling. Journal of cerebral blood flow & metabolism 31:795-806.
McGrail KM, Sweadner KJ (1986) Immunofluorescent localization of two different Na, K-ATPases in the rat retina and in identified dissociated retinal cells. Journal of Neuroscience 6:1272-1283.
McKenna MC (2007) The glutamate-glutamine cycle is not stoichiometric: fates of glutamate in brain. Journal of neuroscience research 85:3347-3358.
Mergenthaler P, Lindauer U, Dienel GA, Meisel A (2013) Sugar for the brain: the role of glucose in physiological and pathological brain function. Trends in neurosciences 36:587-597.
Meyer J, Gerkau NJ, Kafitz KW, Patting M, Jolmes F, Henneberger C, Rose CR (2022) Rapid Fluorescence Lifetime Imaging Reveals That TRPV4 Channels Promote Dysregulation of Neuronal Na(+) in Ischemia. J Neurosci 42:552-566.
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. The Journal of physiology 594:5507-5527.
Moskowitz MA, Lo EH, Iadecola C (2010) The science of stroke: mechanisms in search of treatments. Neuron 67:181-198.
Moyaert P, Padrela BE, Morgan CA, Petr J, Versijpt J, Barkhof F, Jurkiewicz MT, Shao X, Oyeniran O, Manson T (2023) Imaging blood-brain barrier dysfunction: A state-of-the-art review from a clinical perspective. Frontiers in Aging Neuroscience 15.
Müller M, Somjen GG (2000) Na+ and K+ concentrations, extra-and intracellular voltages, and the effect of TTX in hypoxic rat hippocampal slices. Journal of neurophysiology 83:735-745.
Narahashi T (2008) Tetrodotoxin—A brief history—. Proceedings of the Japan Academy, Series B 84:147-154.
Nedergaard M, Dirnagl U (2005) Role of glial cells in cerebral ischemia. Glia 50:281-286.
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.
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 computational biology 13:e1005377.
Palmgren MG, Nissen P (2011) P-type ATPases. Annual review of biophysics 40:243-266.
Pape N, Rose CR (2023) Activation of TRPV4 channels promotes the loss of cellular ATP in organotypic slices of the mouse neocortex exposed to chemical ischemia. J Physiol 601:2975-2990.

Pathak D, Shields LY, Mendelsohn BA, Haddad D, Lin W, Gerencser AA, Kim H, Brand MD, Edwards RH, Nakamura K (2015) The role of mitochondrially derived ATP in synaptic vesicle recycling. J Biol Chem 290:22325-22336.
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.
Pietrobon D, Moskowitz MA (2014) Chaos and commotion in the wake of cortical spreading depression and spreading depolarizations. Nature Reviews Neuroscience 15:379.
Pulsinelli WA (1985) Selective neuronal vulnerability: morphological and molecular characteristics. Progress in brain research 63:29-37.
Putnam RW (2001) Intracellular pH regulation of neurons in chemosensitive and nonchemosensitive areas of brain slices. Respiration physiology 129:37-56.
Raichle ME, Gusnard DA (2002) Appraising the brain's energy budget. Proceedings of the National Academy of Sciences 99:10237-10239.
Rakers C, Schmid M, Petzold GC (2017) TRPV4 channels contribute to calcium transients in astrocytes and neurons during peri-infarct depolarizations in a stroke model. Glia 65:1550-1561.
Rangaraju V, Calloway N, Ryan TA (2014) Activity-driven local ATP synthesis is required for synaptic function. Cell 156:825-835.
Rose C, Chatton J-Y (2016) Astrocyte sodium signaling and neuro-metabolic coupling in the brain. Neuroscience 323:121-134.
Rose CR, Ransom BR (1996) Intracellular sodium homeostasis in rat hippocampal astrocytes. The Journal of physiology 491:291-305.
Rose CR, Konnerth A (2001) NMDA receptor-mediated Na+ signals in spines and dendrites. Journal of Neuroscience 21:4207-4214.
Rose CR, Waxman SG, Ransom BR (1998) Effects of glucose deprivation, chemical hypoxia, and simulated ischemia on Na+ homeostasis in rat spinal cord astrocytes. Journal of Neuroscience 18:3554-3562.
Rose CR, Ziemens D, Untiet V, Fahlke C (2018) Molecular and cellular physiology of sodium-dependent glutamate transporters. Brain research bulletin 136:3-16.
Rose CR, Ziemens D, Verkhratsky A (2020) On the special role of NCX in astrocytes: Translating Na(+)-transients into intracellular Ca(2+) signals. Cell Calcium 86:102154.
Rossi DJ, Oshima T, Attwell D (2000) Glutamate release in severe brain ischaemia is mainly by reversed uptake. Nature 403:316.
Rossi DJ, Brady JD, Mohr C (2007) Astrocyte metabolism and signaling during brain ischemia. Nat Neurosci 10:1377-1386.
San Martin A, Ceballo S, Ruminot I, Lerchundi R, Frommer WB, Barros LF (2013) A genetically encoded FRET lactate sensor and its use to detect the Warburg effect in single cancer cells. PLoS One 8:e57712.
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 AE, Durry S, Aida T, Stock MC, Rüther U, Tanaka K, Rose CR, Kafitz KW (2014) Laminar and subcellular heterogeneity of GLAST and GLT-1 immunoreactivity in the developing postnatal mouse hippocampus. The Journal of comparative neurology 522:204–224.
Schurr A, Payne RS, Heine MF, Rigor BM (1995) Hypoxia, excitotoxicity, and neuroprotection in the hippocampal slice preparation. Journal of neuroscience methods 59:129-138.
Shibasaki K (2016) TRPV4 ion channel as important cell sensors. J Anesth 30:1014-1019.

Shibasaki K, Suzuki M, Mizuno A, Tominaga M (2007) Effects of body temperature on neural activity in the hippocampus: regulation of resting membrane potentials by transient receptor potential vanilloid 4. J Neurosci 27:1566-1575.
Silver IA, Erecińska M (1997) Energetic demands of the Na+/K+ ATPase in mammalian astrocytes. Glia 21:35-45.
Somjen GG (2004) Ions in the brain: normal function, seizures, and stroke: Oxford University Press.
Swanson RA (1992) Astrocyte glutamate uptake during chemical hypoxia in vitro. Neuroscience letters 147:143-146.
Sweadner KJ (1989) Isozymes of the na+/K+-AtPase. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes 988:185-220.
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, Lovatt D, Hansen AJ, Kasischke KA, Nedergaard M (2007) Cortical spreading depression causes and coincides with tissue hypoxia. Nature neuroscience 10:754-762.
Tantama M, Martinez-Francois JR, Mongeon R, Yellen G (2013) Imaging energy status in live cells with a fluorescent biosensor of the intracellular ATP-to-ADP ratio. Nat Commun 4:2550.
Thapaliya P, Pape N, Rose CR, Ullah G (2023) Modeling the heterogeneity of sodium and calcium homeostasis between cortical and hippocampal astrocytes and its impact on bioenergetics. Front Cell Neurosci 17:1035553.
Theparambil SM, Ruminot I, Schneider H-P, Shull GE, Deitmer JW (2014) The electrogenic sodium bicarbonate cotransporter NBCe1 is a high-affinity bicarbonate carrier in cortical astrocytes. Journal of Neuroscience 34:1148-1157.
Toloe J, Mollajew R, Kugler S, Mironov SL (2014) Metabolic differences in hippocampal 'Rett' neurons revealed by ATP imaging. Mol Cell Neurosci 59:47-56.
Vannucci SJ, Maher F, Simpson IA (1997) Glucose transporter proteins in brain: delivery of glucose to neurons and glia. Glia 21:2-21.
Ventura R, Harris KM (1999) Three-dimensional relationships between hippocampal synapses and astrocytes. Journal of Neuroscience 19:6897-6906.
Verkhratsky A, Nedergaard M (2018) Physiology of Astroglia. Physiol Rev 98:239-389.
Vriens J, Watanabe H, Janssens A, Droogmans G, Voets T, Nilius B (2004) Cell swelling, heat, and chemical agonists use distinct pathways for the activation of the cation channel TRPV4. Proceedings of the National Academy of Sciences 101:396-401.
Wen XP, Wan QQ (2021) Regulatory effect of insulin on the structure, function and metabolism of Na(+)/K(+)-ATPase (Review). Exp Ther Med 22:1243.
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.
White JP, Cibelli M, Urban L, Nilius B, McGeown JG, Nagy I (2016) TRPV4: Molecular Conductor of a Diverse Orchestra. Physiol Rev 96:911-973.
Witcher MR, Kirov SA, Harris KM (2007) Plasticity of perisynaptic astroglia during synaptogenesis in the mature rat hippocampus. Glia 55:13-23.
Woodward GE, Hudson MT (1955) Phosphorylation of 2-deoxy-D-glucose by yeast hexokinase: Competition between 2-deoxy-D-glucose and glucose. Journal of the Franklin Institute 259:543-547.
Yu S, Huang S, Ding Y, Wang W, Wang A, Lu Y (2019) Transient receptor potential ion-channel subfamily V member 4: a potential target for cancer treatment. Cell Death Dis 10:497.

Zhang Y, Chen K, Sloan SA, Bennett ML, Scholze AR, O'Keeffe S, Phatnani HP, Guarnieri P, Caneda C, Ruderisch N (2014) An RNA-sequencing transcriptome and splicing database of glia, neurons, and vascular cells of the cerebral cortex. Journal of Neuroscience 34:11929-11947.

Ziebrath T, Pape N, Nelson JSE, Rose CR, Reiner A (in Vorbereitung) Atypical, plume-like events drive glutamate accumulation during chemical ischemia in cortical slice cultures.

Ziemens D, Oschmann F, Gerkau NJ, Rose CR (2019) Heterogeneity of activity-induced sodium transients between astrocytes of the mouse hippocampus and neocortex: Mechanisms and consequences. Journal of Neuroscience 39:2620-2634.

Danksagung

Allen voran möchte ich mich bei Prof. Dr. Christine R. Rose bedanken, die mich von meiner Bachelorarbeit über meine Masterarbeit bis zu meiner Promotion begleitet und gefördert hat. Danke für die Unterstützung sowie die vielen motivierenden Gespräche und Diskussionen.

Ein besonderer Dank gilt außerdem Jun.-Prof. Dr. Nadine Erlenhardt für die Übernahme des Koreferats.

Herzlich bedanken möchte mich auch bei Herrn Dr. W. KArl Kafitz für fachliche Beratung, sowie die Bereitstellung und Pflege einer hervorragenden Infrastruktur, die unsere wissenschaftliche Arbeit hier im Institut erst ermöglicht.

Ein großer Dank geht an Dr. Niklas Gerkau und Dr. Daniel Ziemes, die mich in meiner akademischen Laufbahn unter ihre Fittiche genommen haben. Die Zeit mit ihnen hat mich sowohl wissenschaftlich als auch persönlich sehr geprägt.

Ein dickes Dankeschön geht an meine Mitleidenden im Institut und die „Doktorinos“, die mich seit dem Master und durch die Promotion begleitet, unterstützt und aufgeheitert haben. Insbesondere geht mein Dank an Kathi und Jolli: ohne euch wäre ich das eine oder andere Mal verzweifelt und hätte das Handtuch geworfen. Die Zeit mit euch im Büro und außerhalb wird mir immer in Erinnerung bleiben.

Natürlich geht ein riesiges Danke an meine Freundin Laura B. für all deine Geduld, dein Verständnis und deine Unterstützung. Ohne dich hätte ich das nie geschafft. Snip snap!

Ein großer Dank gilt meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, die mich immer wieder aufgebaut haben, und ohne die ich das Ganze nicht geschafft hätte.

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides Statt, dass die vorliegende Dissertation von mir selbstständig 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 Arbeite wurde weder vollständig noch in Teilen einem anderen Prüfungsamt zur Erlangung eines akademischen Grades vorgelegt.

_____ Düsseldorf, den _____

Nils Pape