

# **Auswirkung von Glutamat und Dopamin auf den Energiestoffwechsel in Astrozyten: Untersuchung mittels genetisch kodierter fluoreszenter Sensoren für ATP**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades Dr. med.

an der medizinischen Fakultät  
der Universität Leipzig

eingereicht von:

Pauline Seim

geb. 12.05.1988 in Berlin

angefertigt an der:

Universität Leipzig, Medizinische Fakultät

Carl-Ludwig-Institut für Physiologie

Betreuer:

Prof. Dr. Johannes Hirrlinger

Beschluss über die Verleihung des Doktorgrads vom: 15.08.2017

---

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	II
Abkürzungsverzeichnis .....	IV
1 Einleitung .....	1
1.1 Zellen des zentralen Nervensystems .....	1
1.1.1 Neurone .....	1
1.1.2 Gliazellen .....	2
1.2 Astrozyten .....	3
1.2.1 Entwicklung und Morphologie .....	4
1.2.2 Allgemeine Eigenschaften und Funktionen .....	5
1.2.3 Gliale und neuronale Kommunikation .....	6
1.2.4 Transmitteraufnahme .....	8
1.2.5 Nährfunktion und Metabolismus .....	11
1.2.6 Pathologische Prozesse .....	12
1.3 Zellkulturen als Modell .....	13
1.4 Neurotransmitter .....	14
1.5 FRET-Sensoren .....	15
1.5.1 ATeam: Ein FRET-basierter Sensor für ATP .....	18
2 Ziele .....	21
3 Material und Methoden .....	22
3.1 Material .....	22
3.1.1 Lösungen und Medien .....	22
3.1.2 Plasmide und Reagenzien für Transfektion und Midi .....	25
3.1.3 Antikörper und Lösungen für die Immunfärbung .....	25
3.1.4 Geräte .....	26
3.2 Methoden .....	26
3.2.1 Zellkulturen .....	26
3.2.2 Midi-Präparation von Plasmiden .....	27
3.2.3 Transfektion .....	28
3.2.4 Immunfärbung .....	28
3.2.5 Fluoreszenzmikroskopie .....	28
3.2.6 Ablauf der Experimente .....	30
3.2.7 Auswertung .....	31

4	Ergebnisse .....	34
4.1	Etablierung des experimentellen Systems .....	34
4.1.1	Nachweis der Transfektion von Astrozyten mit Hilfe immunhistochemischer Färbungen .....	34
4.1.2	Überprüfung der Funktionalität des Sensors ATeam .....	35
4.2	ATP-Dynamik bei Stimulation mit Neurotransmittern .....	39
4.2.1	Wirkung der Neurotransmitter Glutamat und Dopamin .....	40
4.2.2	Beteiligung der Rezeptoren .....	43
4.2.3	Beteiligung der Glutamattransporter .....	44
4.2.4	Die Rolle der Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPase .....	47
5	Diskussion.....	49
5.1	Etablierung der ATP-Messung mit ATeam in kultivierten Astrozyten .....	49
5.2	Stimulation mit Glutamat und Einordnung der Effekte in die Physiologie des Gehirns .....	53
5.3	Stimulation mit Dopamin .....	58
5.4	Einschränkungen des Systems und Ausblick.....	58
6	Zusammenfassung.....	60
7	Literaturverzeichnis .....	63
8	Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit .....	78

---

## Abkürzungsverzeichnis

AP	Aktionspotential
2DG	2-Desoxyglukose
ADP	Adenosindiphosphat
AK	Antikörper
AMPA	$\alpha$ -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazol-Propionat
APK	Astroglia-reiche Primärkultur
ATeam	<i>Adenosine 5'-Triphosphate indicator based on Epsilon subunit for Analytical Measurements</i>
ATP	Adenosintriophosphat
avGFP	grün fluoreszierendes Protein aus der Qualle <i>Aequorea victoria</i>
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>bovine serum albumin</i> )
CFP	blau fluoreszierendes Protein ( <i>cyan fluorescent protein</i> )
CMV	Cytomegalievirus
COMT	Catechol-O-Methyltransferase
DAPI	4',6-Diamino-2-Phenylindol
D-Asp	D-Aspartat
DA	Dopamin
DAT	Dopamintransporter
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>
DNA	Desoxyribonucleinsäure ( <i>deoxyribonucleic acid</i> )
EAAC	<i>excitatory amino acid carrier</i>
EAAT	<i>excitatory amino acid transporter</i>
EMT	extraneuronaler Monoamintransporter
FKS	fetales Kälberserum
FP	Fluoreszierende Proteine
FRET	Förster- (auch Fluoreszenz-) Resonanzenergietransfer
GABA	Gamma-Aminobuttersäure ( <i>gamma-Aminobutyric acid</i> )
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GFAP	gliales fibrilläres saures Protein ( <i>glial fibrillary acidic protein</i> )
GFP	grün fluoreszierendes Protein ( <i>green fluorescent protein</i> )
GLAST	Glutamat-Aspartat-Transporter
Glu	Glutamat
GLT	Glutamatttransporter

GLUT	Glukosetransporter
GTP	Guanosintriphosphat
HeLa-Zellen	Zelllinie aus Cervixcarcinom der Patientin Henrietta Lacks
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-Ethansulfonsäure)
IA	Iodacetat
LB-Medium	Kultivierungsmedium für Bakterien ( <i>lysogeny broth</i> )
MAO	Monoaminoxxygenase
n.s.	nicht signifikant
NAD(P)H	reduziertes Nicotinsäureamidadeninucleotid(phosphat)
NET	Norepinephrintransporter
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
OCT	organischer Kationentransporter
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PFA	Paraformaldehyd
ROI	<i>region of interest</i>
RT	Raumtemperatur
SBT	<i>spectral bleed through</i>
SERT	Serotonintransporter
SNAT	<i>sodium-coupled neutral amino acid transporter</i>
TBOA	<i>Threo-<math>\beta</math>-Benzyloxyaspartic acid</i>
YFP	gelb fluoreszierendes Protein ( <i>yellow fluorescent protein</i> )
ZNS	zentrales Nervensystem

# 1 Einleitung

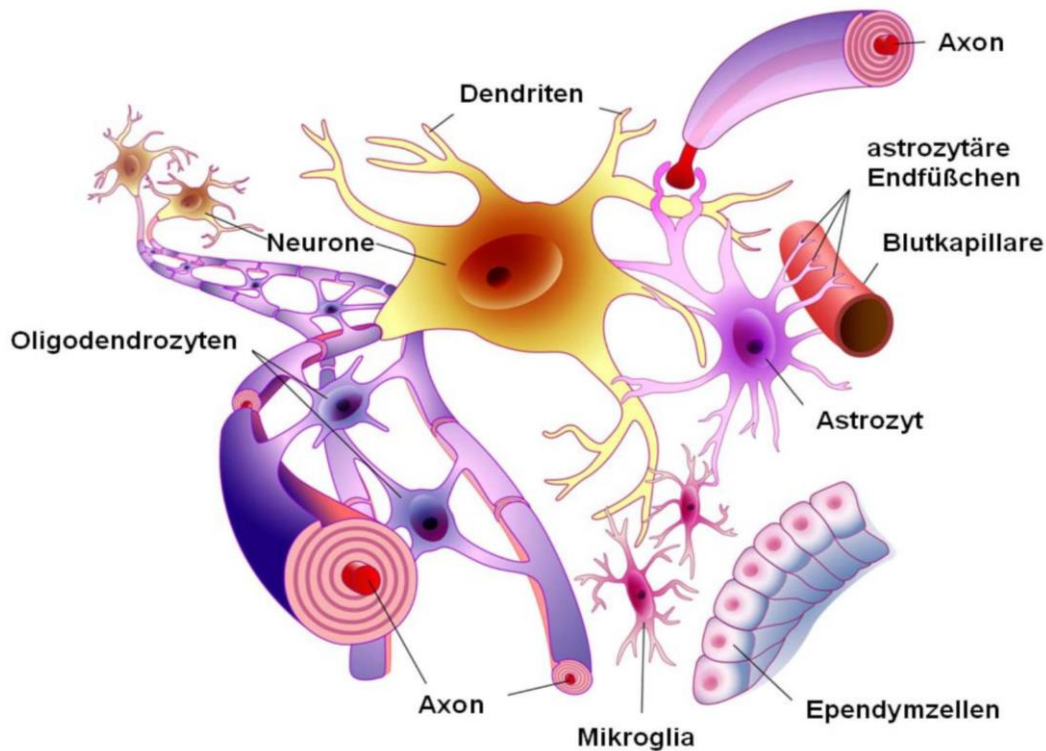
Unser Gehirn ist sowohl ein hochkomplexes als auch ein sehr anspruchsvolles Organ. So trägt es bei einem Anteil von nur 2 % unseres Körpergewichts bis zu 20 % zum Ruhemetabolismus bei und nutzt dabei bis zu 95 % Glukose als Energiesubstrat (Pellerin und Magistretti 2003; Bittner et al. 2010). Seine Komplexität zeigt sich in der unüberschaubaren Anzahl der Verknüpfungen sowohl der Neurone untereinander als auch zwischen den unterschiedlichen Zelltypen des Gehirns. Seit Beginn des 20. Jahrhunderts herrschte die Meinung vor, dass ausschließlich Neurone für die Informationsverarbeitung und -weiterleitung zuständig sind, jedoch stehen inzwischen für diese Aufgaben zunehmend auch die Gliazellen, insbesondere die Astrozyten und Oligodendrozyten, im wissenschaftlichen Fokus (Giaume et al. 2007; Hirrlinger und Nave 2014).

## 1.1 Zellen des zentralen Nervensystems

Das menschliche Gehirn enthält zu annähernd gleichen Anteilen Neurone und Gliazellen (Abb. 1), deren Verteilung zwischen den einzelnen Hirnarealen stark variiert. So befinden sich im gesamten Cortex (graue und weiße Substanz), welcher 82 % der Masse des menschlichen Gehirns ausmacht, 72 % aller Gliazellen, hingegen nur 19 % aller Neurone (Azevedo et al. 2009). Dies steht in Einklang mit den vielfältigen essentiellen Aufgaben, welche Gliazellen für die Aufrechterhaltung der kortikalen Funktionen übernehmen.

### 1.1.1 Neurone

Neurone stellen die funktionelle Grundeinheit des Nervensystems dar und sind dadurch gekennzeichnet, dass sie elektrische Impulse in Form von Aktionspotentialen (AP) weiterleiten können. Sie besitzen i.d.R. mehrere Dendriten, welche Erregungen von anderen Neuronen aufnehmen sowie ein Axon, welches die Erregung vom Zellkörper fortleitet. Untereinander sind sie zu Netzwerken verknüpft und kommunizieren über Synapsen, an welchen die Signalübertragung durch die Ausschüttung von Neurotransmittern wie Glutamat, GABA, Dopamin u.v.a. mit anschließender Ausbildung exzitatorischer oder inhibitorischer postsynaptischer Potentiale gewährleistet wird (Allen und Barres 2009).



**Abb. 1 Zellen des ZNS.** Neurone dienen der Weiterleitung von Erregungen. Ihre Axone werden von Oligodendrozyten umhüllt, um eine schnellere Erregungsleitung zu ermöglichen. Astrozyten stellen den größten Anteil der Gliazellen dar und kontaktieren sowohl Kapillaren als auch Neurone und deren Synapsen. Sie sind u.a. für die Nährstoffversorgung der Neurone und die Transmitteraufnahme aus dem synaptischen Spalt spezialisiert. Mikroglia dienen der Immunabwehr und Phagozytose abgestorbener Zellen. Ependymzellen kleiden die Ventrikel aus und sind an der Bildung der Blut-Liquor-Schranke beteiligt. Sie werden häufig zu den Astrozyten gezählt. NG2-Zellen (nicht abgebildet) sind pluripotente Vorläuferzellen für Oligodendrozyten (Abb. aus Wilhelm 2010).

### 1.1.2 Gliazellen

Die Gruppe der Gliazellen wird unterteilt in Mikroglia und Makroglia; zu letzteren zählen Oligodendrozyten, Astrozyten, Ependymzellen sowie NG2-Zellen (Abb. 1; Kuffler und Nicholls 1966; Somjen 1988; Trotter et al. 2010). Als ihr Entdecker gilt Rudolf Virchow, welcher 1856 erstmals den Begriff „Nerven kitt“ oder „Neuroglia“ (griech. *glia* = Leim, Kitt) verwendete, da er diesem neu entdeckten Zelltyp v.a. Stützfunktionen zuschrieb. Gliazellen wurden anschließend u.a. durch Ramon y Cajal, del Rio Hortega, Golgi und Lugaro weiter klassifiziert. Auch wurden Aufgaben wie die Versorgung von Neuronen mit Nährstoffen oder die Beendigung von Signalübertragungen durch die Aufnahme von Transmittern postuliert (Virchow

1858; del Rio-Hortega 1921; Somjen 1988). Jedoch sind Gliazellen im Gegensatz zu Neuronen nicht in der Lage APs zu leiten.

Mit Ausnahme der Mikroglia sind Neurone und Gliazellen ektodermaler Herkunft. Mikroglia haben als Teil des Immunsystems mesodermalen Ursprung und wirken v.a. als ansässige Immunzellen des Nervensystems, welche an Entzündungsprozessen beteiligt und zur Phagozytose fähig sind (Giulian 1987). Oligodendrozyten hüllen die Axone der Neurone mit Myelin ein, welches elektrisch isolierend wirkt. Dies ermöglicht eine saltatorische und somit schnelle, zuverlässige und ökonomische Erregungsleitung (Baumann und Pham-Dinh 2001). Darüber hinaus sind sie maßgeblich an der Versorgung von Axonen mit Energie beteiligt (Nave 2010; Hirrlinger und Nave 2014; Saab et al. 2016). NG2-Zellen, auch als Polydendrozyten bezeichnet, sind pluripotente Vorläuferzellen für Oligodendrozyten sowie für Neuronen- und Astrozytensubtypen (Belachew et al. 2003; Trotter et al. 2010). Ependymzellen sind ebenso wie Plexus Choroideus-Zellen, welche den Liquor bilden, spezialisierte Gliazellen und kleiden die Ventrikel aus. Sie sind miteinander über *Zonulae adherentes* und *Tight junctions* verbunden und bauen somit die Blut-Liquor-Schranke auf (Wolburg et al. 2008). Da sie einige astrozytäre Eigenschaften besitzen, werden sie häufig zur Gruppe der Astrozyten gezählt (Liu et al. 2006; Wang und Bordey 2008; Kettenmann und Verkhratsky 2011).

## 1.2 Astrozyten

Astrozyten bilden die größte Gruppe der Gliazellen im Gehirn. Sie erhielten ihren Namen, da sie durch ihre zahlreichen radialen Fortsätze ein sternförmiges Aussehen besitzen (griech. *ástron* = Stern) (Lenhossék 1895). Lange Zeit wurden sie als einheitliche Zellpopulation angesehen, welche lediglich eine unterstützende Funktion ausübt. Heute weiß man jedoch, dass Astrozyten eine sehr heterogene Gruppe mit einem breiten Funktionsspektrum darstellen. So treten neben ihren klassischen Aufgaben wie der Aufrechterhaltung eines geeigneten Mikromilieus für Neurone und deren Versorgung mit Nährstoffen zunehmend auch aktivere Rollen in den wissenschaftlichen Fokus. Hierzu zählen u.a. die Beteiligung an der Bildung von Synapsen, die Beeinflussung synaptischer Aktivität und des Gedächtnisses sowie ihre Bedeutung als Stammzellen (Wang und Bordey 2008; Perea und Araque 2010; Zhang und Barres 2010; Orr et al. 2015).



Die klassische Aufteilung der Astrozyten erfolgt in die fibrösen (oder Faser-) und protoplasmatischen Astrozyten (Andriezen 1893). Fibröse Astrozyten finden sich in der weißen Substanz. Häufig sind ihre Somata in Reihen zwischen den Axonen angeordnet und ihre langen Fortsätze verlaufen parallel zu den Nervenbündeln. In der grauen Substanz dominieren die protoplasmatischen Astrozyten, welche den größten Anteil der Astrozyten darstellen (Magistretti und Ransom 2002). Die große Heterogenität erschwert jedoch eine eindeutige Definition, da sich Astrozyten sowohl morphologisch, in ihren physiologischen, metabolischen und funktionellen Eigenschaften, ihrer Genexpression, ihrer Reaktion auf pathologische Prozesse und ihrer Entwicklung als auch in ihrem Vorkommen abhängig von Gehirnregion und Spezies unterscheiden (Zhang und Barres 2010; Hu et al. 2016). Es existieren weitere (bisher nicht einheitliche) Einteilungen der Astrozyten, welche diese Unterschiede berücksichtigen (Emsley und Macklis 2006; Kettenmann und Verkhratsky 2011; Bribián et al. 2016).

### **1.2.1 Entwicklung und Morphologie**

Astrozyten stammen von den Radialglia ab, welche als bipolare Zellen mit Ausläufern zur Ventrikelwand und zur Pia Mater während der Entwicklung des Gehirns als Leitstrukturen und Vorläufer für Neuronen und Makroglia dienen (Malatesta et al. 2008; Kettenmann und Ransom 2013). Sowohl im sich entwickelnden als auch im adulten Gehirn stehen Astrozyten in engem Kontakt mit Synapsen und sind essentiell für deren regelrechte Ausbildung und Reifung (Pfrieger und Barres 1997; Ullian et al. 2004). Synapsen zeigen auch nach Abschluss der Entwicklung eine hohe Dynamik. Sowohl dendritische Spines als auch astrozytäre Fortsätze können ihre Position und Struktur als Reaktion auf Einflüsse aus dem sie umgebenden Milieu verändern. Diese Motilität trägt zur Stabilisierung bzw. Destabilisierung von Synapsen und damit zur Formung und Plastizität des neuronalen Netzwerkes bei (Hirrlinger et al. 2004; Haber et al. 2006; Theodosis et al. 2008).

Astrozyten sind in Domänen organisiert, welche sich nur geringfügig überlappen und stehen im Durchschnitt mit elf weiteren Astrozyten in direkter Verbindung (Wang und Bordey 2008; Xu et al. 2010). Ein typischer Astrozyt (Nager) besitzt 4-10 Hauptfortsätze, von denen unzählige kleinere Ausläufer ausgehen,

welche mit ihren Endfüßen verschiedene Strukturen wie Synapsen, Blutgefäße oder die Pia Mater kontaktieren (Khakh und Sofroniew 2015). Ein menschlicher Astrozyt kann dabei rund 2 Mio. Synapsen kontaktieren, Astrozyten von Nagern ca. 100.000-140.000 (Bushong et al. 2002; Oberheim et al. 2006). Innerhalb der astrozytären Fortsätze bilden sich durch Falten der Plasmamembran gliale Mikrodomänen, welche einen Signalaustausch auf subzellulärer Ebene ermöglichen (Grosche et al. 1999). Die enge Assoziation von astrozytärem Fortsatz, prä- und postsynaptischem Nervenende wird als Tripartite Synapse bezeichnet, da Astrozyten sowohl durch ihre räumliche Nähe als auch die Fähigkeit, neuronale Signale wahrzunehmen und zu regulieren, als wesentliche Komponente einer Synapse angesehen werden können (Araque et al. 1999).

Eine charakteristische Eigenschaft von Astrozyten ist die Expression des Intermediärfilaments Gliales Fibrilläres Säures Protein (*Glial Fibrillary Acidic Protein*, GFAP), welches den bekanntesten und am häufigsten eingesetzten Marker für diesen Zelltyp darstellt. Es wurde bereits 1971 entdeckt (Eng et al. 1971) und zur immunhistochemischen Markierung von Astrozyten verwendet (Uyeda et al. 1972; Bignami et al. 1972), ist jedoch nach neueren Erkenntnissen nicht immer eineindeutig. So gibt es sowohl eine große Subpopulation GFAP-negativer Astrozyten (v.a. in der grauen Substanz) als auch andere Gliazellen (z.B. Ependymzellen), welche häufig nicht zur Familie der Astrozyten gezählt werden aber dennoch GFAP exprimieren (Walz und Lang 1998; Liu et al. 2006). Kultivierte Astrozyten exprimieren zuverlässig GFAP (Chiu et al. 1981; Kettenmann und Verkhratsky 2011). Als weitere Marker für Astrozyten werden z.B. S100B (ein Calciumbindendes Protein), GLT-1 (ein Glutamat-transporter), GS (Glutaminsynthase), Aldh1L1 (eine Aldehyddehydrogenase) oder 3PGDH (ein Schlüsselenzym der Serin-biosynthese) eingesetzt, jedoch sind diese Proteine ebenso wenig eineindeutig (Yamasaki et al. 2001; Steiner et al. 2007; Cahoy et al. 2008; Wang und Bordey 2008; Oberheim et al. 2012).

### **1.2.2 Allgemeine Eigenschaften und Funktionen**

Elektrophysiologisch zeichnen sich die meisten Astrozyten gegenüber Neuronen durch ihre fehlende elektrische Erregbarkeit und ein stark negatives Ruhemembranpotential zwischen -80 und -90 mV aus. Hierfür scheinen

insbesondere  $K_{ir}$   $K^+$ -Kanäle verantwortlich zu sein (Magistretti und Ransom 2002; Wang und Bordey 2008; Halassa und Haydon 2010). Die astrozytäre Aufnahme von  $K^+$  und anderen Substanzen, welche im Rahmen neuronaler Aktivität freigesetzt werden, stellt außerdem ebenso wie die Regulierung des extrazellulären pH-Wertes einen wichtigen Mechanismus zur Aufrechterhaltung der Ionenhomöostase und eines geeigneten Mikromilieus dar. Dies ist essentiell für die reibungslose Funktion der Neurone und der Signaltransmission (Syková 1997).

Astrozytäre Endfüße stehen in engem Kontakt zu Neuronen und Blutgefäßen und beteiligen sich am Aufbau der Blut-Hirn-Schranke, sodass Astrozyten als Hauptvermittler zwischen den Kapillaren und dem umgebenden Nervengewebe fungieren. Ihre Ausstattung mit diversen spezifischen Proteinen wie z.B. dem Glukosetransporter GLUT1, Transporter für Aminosäuren, P-Glykoprotein, Ionenkanälen und Aquaporin-4 befähigt sie, regulierende Funktionen bezüglich der Nährstoffversorgung, Entfernung toxischer Metabolite, Volumenkontrolle oder Kontrolle des lokalen Blutflusses und dessen Anpassung an den tatsächlichen Bedarf zu übernehmen (Magistretti und Pellerin 1999; Abbott et al. 2006).

### 1.2.3 Gliale und neuronale Kommunikation

Astrozyten sind untereinander durch *Gap junctions* verbunden, welche für Ionen und andere kleinere Moleküle passierbar sind und bilden somit ein funktionelles, in Kompartimenten organisiertes „gliales Synzytium“ (Houades et al. 2008; Wasseff und Scherer 2011). Dieses scheint wesentlich zur koordinierten elektrischen und biochemischen Aktivität benachbarter Zellen und dem Ausgleich intrazellulärer Ionenkonzentrationen beizutragen (Magistretti und Ransom 2002; Hu et al. 2016). Für die intra- und interzelluläre Kommunikation von Astrozyten spielt  $Ca^{2+}$  eine entscheidende Rolle. Astrozyten sind in der Lage sowohl spontan als auch nach Stimulation z.B. mit Glutamat oder Dopamin  $Ca^{2+}$ -Signale zu generieren (Cornell-Bell et al. 1990; Requardt et al. 2012). Sowohl *in vitro* als auch *in situ* konnten eine Ausbreitung von interzellulären  $Ca^{2+}$ -Wellen im Anschluss an eine Stimulation (Cornell-Bell et al. 1990; Porter und McCarthy 1996; Scemes und Giaume 2006) sowie spontane intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Oszillationen und  $Ca^{2+}$ -Signale innerhalb astrozytärer Mikrodomänen beobachtet werden (Grosche et al. 1999; Fiacco und McCarthy 2006; Oheim et al. 2006; Shigetomi et al. 2013). *In vivo* wurden

zudem „Glissandi“ beschrieben, von neuronaler Aktivität abhängige weitreichende  $\text{Ca}^{2+}$ -Wellen, welche mit einer Reduktion der neuronalen Aktivität und des Blutflusses einhergehen (Kuga et al. 2011).  $\text{Ca}^{2+}$ -Fluktuationen stellen somit eine Art „Erregbarkeit“ der Astrozyten dar und dienen als Signal für die Verarbeitung und Weiterleitung von Informationen (Scemes und Giaume 2006). Ähnlich der  $\text{Ca}^{2+}$ -Wellen scheinen Astrozyten auch über  $\text{Na}^+$ -Wellen zu kommunizieren. Der Anstieg von intrazellulärem  $\text{Na}^+$  ist ein Signal für erhöhten Nährstoffbedarf und führt zu einer gesteigerten Glykolyse und Glukoseaufnahme (Chatton et al. 2000; Bernardinelli et al. 2004; Langer et al. 2012; Rose und Karus 2013). Das Signal kann sich durch Diffusion von  $\text{Na}^+$  über *Gap junctions* ausbreiten und auch in benachbarten Astrozyten eine metabolische Aktivierung hervorrufen (Langer et al. 2012; Pellerin und Magistretti 2012; Rose und Verkhratsky 2016).

Astrozyten exprimieren alle für die Neurotransmission relevanten Transmitter- und Hormonrezeptoren, sodass sie jede Aktivität im Hirn wahrnehmen können (Abb. 2; Porter und McCarthy 1997). Ebenso können sie auf Grund ihrer Plastizität sowie über die Freisetzung von Gliotransmittern die neuronale Erregbarkeit und synaptische Aktivität beeinflussen. Zu den Gliotransmittern gehören u.a. Glutamat, ATP und D-Serin, deren Freisetzung häufig im Anschluss an einen Anstieg des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegels erfolgt und sowohl der autokrinen als auch parakrinen Kommunikation mit anderen Gliazellen und Neuronen dient (Mothet et al. 2005; Deitmer et al. 2006; Pangršič et al. 2007). Es entsteht somit zunehmend die Vorstellung, dass Astrozyten nicht auf ihre unterstützende Funktion beschränkt sind, sondern sich aktiv an der Verarbeitung, Übertragung und Speicherung von Informationen im ZNS beteiligen (Araque et al. 1999; Halassa und Haydon 2010; Perea und Araque 2010).

Astrozyten besitzen diverse ligandengesteuerte Rezeptorkanäle (ionotrope Rezeptoren) für Botenstoffe wie Glutamat, GABA, ATP, Glycin und Acetylcholin (Parpura und Haydon 2009). Im zentralen Nervensystem kommt den exzitatorischen ionotropen Glutamatrezeptoren (iGluR) eine dominierende Rolle zu. Sie werden entsprechend selektiver Agonisten weiter in NMDA-Rezeptoren (N-Methyl-D-Aspartat), AMPA-Rezeptoren ( $\alpha$ -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isloxazol-Propionat) und Kainat-Rezeptoren unterteilt. Diese Ionenkanäle sind für kleine Kationen wie  $\text{Na}^+$  und  $\text{Ca}^{2+}$  durchlässig, vermitteln die schnelle exzitatorische Erregungsweiterleitung

zwischen Neuronen und spielen in Astrozyten z.B. bei der Auslösung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalen eine Rolle (Verkhratsky und Steinhäuser 2000; Danbolt 2001). In kultivierten Astrozyten finden sich ausschließlich AMPA und Kainat Rezeptoren, während *in situ* auch funktionelle NMDA-Rezeptoren auf Astrozyten nachgewiesen werden konnten (Lalo et al. 2006), was jedoch umstritten ist (Höft et al. 2014; Matyash und Kettenmann 2010).

Eine weitere große Rezeptorklasse stellen die G-Protein gekoppelten (metabotropen) Rezeptoren dar. Diese führen entweder zu einem Anstieg bzw. Abfall des sekundären Botenstoffes cAMP ( $G_s$  bzw.  $G_i$ - gekoppelt) oder einem Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ( $G_q$ -gekoppelt) (Heckmann et al. 2011). Astrozyten besitzen diese Rezeptoren für Glutamat, Dopamin, GABA, ATP, Acetylcholin sowie diverse weitere Transmitter und Hormone (Parpura und Haydon 2009). Für Glutamat dominieren sowohl in Kultur als auch *in vivo* die Rezeptoren mGluR3 ( $G_i$ -gekoppelt) und mGluR5 ( $G_q$ -gekoppelt; D'Antoni et al. 2008). Diese sind ebenfalls an der Ausbildung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalen, sowie an verschiedenen weiteren Signalwegen beteiligt und tragen somit zur Astrozyten-Neuronen-Interaktion bei (Bezzi et al. 1998; D'Antoni et al. 2008). Für Dopamin konnte in Astrozyten des Cortex eine hohe Expression von  $G_i$ -gekoppelten D2-Rezeptoren nachgewiesen werden (Khan et al. 2001; Mladinov et al. 2010). Ebenso wurden  $G_s$ - und  $G_q$ -gekoppelte Dopaminrezeptoren der D1-Gruppe beschrieben (Zanassi et al. 1999; Liu et al. 2009; Requardt et al. 2012).

#### **1.2.4 Transmitteraufnahme**

Die Entfernung von Neurotransmittern aus dem Extrazellulärraum ermöglicht eine schnelle Beendigung der synaptischen Übertragung und ist Voraussetzung für eine präzise Neurotransmission. Astrozyten besitzen diverse Transportsysteme für Neurotransmitter wie Glutamat, Dopamin, Serotonin und GABA (Inazu et al. 1999).

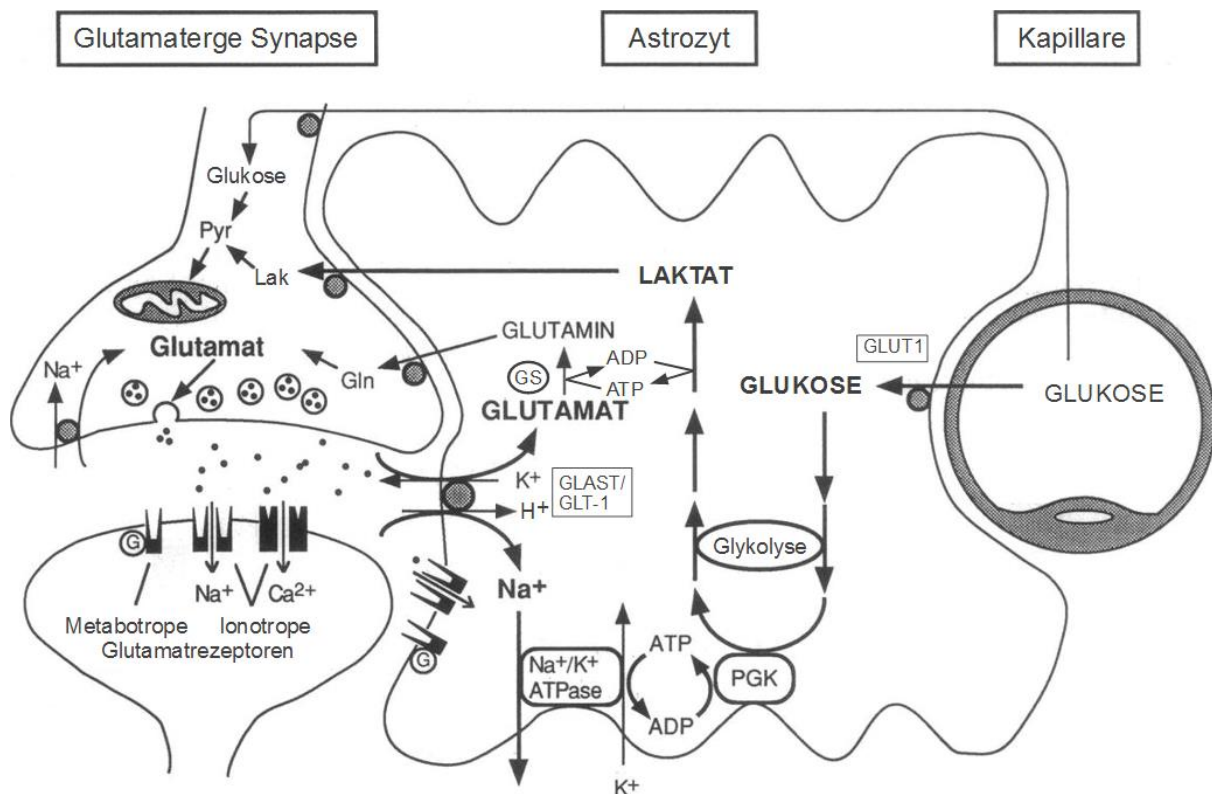
Die Aufrechterhaltung einer niedrigen extrazellulären Glutamatkonzentration durch Astrozyten begünstigt die Diffusion von Glutamat aus dem synaptischen Spalt heraus und dient neben der Signalterminierung dazu, Neurone vor der exzitotoxischen Wirkung des Glutamats zu schützen (Kanai et al. 1993; Allen und Barres 2009). Für diese Aufgabe besitzen sie den Glutamat-Aspartat Transporter (GLAST) und Glutamat Transporter 1 (GLT-1), auch als *excitatory amino acid*

*transporter* (EAAT 1 und 2) bezeichnet (Abb. 2). GLAST und GLT-1 können in einer Zelle koexprimiert werden, ihr Anteil variiert jedoch abhängig von der Hirnregion. Während GLAST im Kleinhirn überwiegt, wird GLT-1 vermehrt im Großhirn exprimiert (Lehre et al. 1995; Gegelashvili und Schousboe 1998; Schousboe et al. 2004). Der Glutamattransport erfolgt gekoppelt an den Einstrom von 3 Na<sup>+</sup> und einem H<sup>+</sup> sowie dem Auswärtsstrom von einem K<sup>+</sup>. Die besondere Kopplung an mehrere Ionen gibt dem sekundär aktiven Transporter eine enorme Triebkraft und ermöglicht einen Konzentrationsgradienten ( $[Glu]_{iz}/[Glu]_{ez}$ ) bis 10<sup>6</sup> (Zerangue und Kavanaugh 1996; Danbolt 2001; Bak et al. 2006). Teilweise wird Glutamat über den *excitatory amino acid carrier 1* (EAAC1, entspricht EAAT3) direkt von den Neuronen wieder aufgenommen, überwiegend erfolgt die Aufnahme jedoch durch Astrozyten (Danbolt 2001).

Da für die Glutamataufnahme der Na<sup>+</sup>-gradient als Triebkraft genutzt wird, ist dessen Aufrechterhaltung eine essentielle Voraussetzung für die schnelle Glutamat-Entfernung. Dies geschieht hauptsächlich durch die ubiquitäre Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, welche intrazelluläres Na<sup>+</sup> gegen K<sup>+</sup> im Verhältnis 3:2 unter Verbrauch von 1 ATP austauscht (Apell 1997). Für die Erhöhung der intrazellulären Na<sup>+</sup>-Konzentration sind v.a. Glutamattransporter verantwortlich, während ionotrope Glutamatrezeptoren nur einen geringen Beitrag zum Na<sup>+</sup>-Einstrom darstellen (Chatton et al. 2000). Daher liegt eine gegenseitige Regulierung von GLT-1 bzw. GLAST und Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase nahe. Tatsächlich konnten sowohl eine funktionelle, über die  $\alpha 2$  Untereinheit der ATPase vermittelte Aktivitätserhöhung, als auch eine räumliche Kollokalisierung und physikalische Interaktionen und damit wahrscheinliche direkte Kopplung der Transporterproteine mit der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase gezeigt werden (Pellerin und Magistretti 1997; Rose et al. 2009; Robinson und Jackson 2016).

Dopamin kann im Anschluss an die Ausschüttung in den synaptischen Spalt über neuronale „*uptake*“ Transporter durch das präsynaptische Neuron wiederaufgenommen und erneut verwendet werden (Takeda et al. 2002; Sotnikova et al. 2006). Zu diesen Na<sup>+</sup>-abhängigen Transportern gehören der Dopamin-, Norepinephrin- und Serotonintransporter (DAT, NET und SERT), von denen sowohl DAT als auch NET Dopamin transportieren (Eisenhofer 2001). Auch Astrozyten exprimieren DAT und NET sowie den organischen Kationentransporter 3 (OCT3, auch extraneuronaler Monoamintransporter, EMT), welcher (neben OCT1 und 2) zu

den  $\text{Na}^+$ -unabhängigen extraneuronalen „*uptake<sub>2</sub>*“ Transportern gehört. Astrozyten besitzen weiterhin die Enzyme Monoaminoxigenase (MAO) und Catechol-O-Methyltransferase (COMT), welche für den Abbau von Dopamin notwendig sind. Somit sind sie maßgeblich an der Signalterminierung und Regulierung der Monoaminkonzentration beteiligt (Takeda et al. 2002).



**Abb. 2 Stoffwechselprozesse an der Tripartiten Synapse.** Glukose wird von Astrozyten über GLUT1 (und zu einem geringeren Anteil direkt von Neuronen über GLUT4) aufgenommen und fließt zum ATP-Gewinn in die Glykolyse. Das entstandene Laktat wird über den Transporter MCT1 an die Neuronen weitergegeben, wo es als Energiesubstrat dient (Laktatshuttle). Während der Signalübertragung an exzitatorischen Synapsen freigesetztes Glutamat diffundiert aus dem synaptischen Spalt und wird überwiegend durch GLAST und GLT-1 im Cotransport mit 3  $\text{Na}^+$ , 1  $\text{H}^+$  und Antiport von 1  $\text{K}^+$  von Astrozyten aufgenommen. Der  $\text{Na}^+$ -Gradient wird von der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase wiederhergestellt. Es bestehen eine funktionelle und physische Kopplung zwischen den Glutamattransportern und der ATPase (hier nicht dargestellt), sodass die synaptische Aktivität direkt an die Bereitstellung von Energie über eine erhöhte Glykolysetätigkeit gekoppelt wird. Aufgenommenes Glutamat wird u.a. durch die astrozytenspezifische Glutaminsynthetase unter ATP-Verbrauch zu Glutamin umgewandelt, welches über SNA-Transporter in die Neurone gelangt. Dort katalysiert die Phosphat aktivierte Glutaminase die Rückreaktion zu Glutamat, welches in Vesikel verpackt wird und somit wieder für die Neurotransmission zur Verfügung steht (Glutamat-Glutamin-Zyklus; modifiziert nach Pellerin und Magistretti 1994).

### 1.2.5 Nährfunktion und Metabolismus

Astrozyten sind wichtige Nährstofflieferanten für Neurone. Während Neurone ca. 95 % der Energie im ZNS verbrauchen, wird Glukose als nahezu exklusives Energiesubstrat überwiegend durch Astrozyten aufgenommen (Pellerin und Magistretti 2003). Sie besitzen dafür den Glukosetransporter GLUT1 und weiterhin den Transporter MCT1 (Monocarboxylasetransporter) für den Transport von Laktat, Pyruvat und Ketonkörpern, während Neurone GLUT3 und MCT2 exprimieren (Morgello et al. 1995; Bröer et al. 1997). Astrozyten zeigen die ungewöhnliche Fähigkeit, selbst unter normoxischen Bedingungen Glukose zu Laktat umzusetzen. Dieser Prozess wird als „aerobe Glykolyse“ bezeichnet und wurde ursprünglich insbesondere Tumorzellen zugeschrieben (Warburg et al. 1926). Jedoch scheinen Astrozyten ebenfalls einen großen Teil ihrer Energie in der oxidativen Phosphorylierung zu gewinnen, wofür u.a. die Existenz von Mitochondrien in astrozytären Fortsätzen spricht (Grosche et al. 1999; San Martín A. et al. 2013; Derouiche et al. 2015). Der Anteil von Glykolyse und oxidativer Phosphorylierung an der Energiegewinnung in Astrozyten sowie das bevorzugte Energiesubstrat (insb. Glukose oder Laktat) sind jedoch nicht abschließend geklärt (Schousboe et al. 2007; Diemel 2012).

Astrozyten exprimieren hauptsächlich das LDH5-Isoenzym, welches in Zellen mit einer hohen glykolytischen Aktivität vorkommt und auf Grund seiner kinetischen Eigenschaften unter den gegebenen zellulären Bedingungen die schnelle Umwandlung von Pyruvat zu Laktat vorantreibt. In Neuronen kommt hingegen v.a. LDH1 vor, welches auf Grund seiner niedrigeren  $K_m$  und hohen Affinität die Umsetzung von Laktat zu Pyruvat kinetisch begünstigt (Pellerin et al. 1998). Es konnte gezeigt werden, dass Astrozyten Laktat freisetzen und Neurone dieses als Energiesubstrat nutzen können (Walz und Mukerji 1988; Pellerin et al. 1998).

Auf Grund dieser Beobachtungen wurde der Astrozyten-Neuronen-Laktatshuttle zur Versorgung der Neurone postuliert, dessen Existenz durch *in vivo* Beobachtungen gestützt wird (Mächler et al. 2016): Glukose wird von den Astrozyten aufgenommen, unter Gewinnung von 2 ATP zu 2 Laktat metabolisiert und das entstandene Laktat an die Neurone weitergegeben. Dort fließt es über Pyruvat in den Citratzyklus ein und kann pro Molekül bis zu 18 ATP einbringen (Abb. 2; Pellerin et al. 1998; Pellerin und Magistretti 2003). Auch das in Astrozyten gespeicherte



Glykogen kann bei Bedarf in Form von Laktat den Neuronen als Energiesubstrat bereitgestellt werden (Magistretti und Ransom 2002).

Während der Neurotransmission freigesetztes Glutamat kann den Laktatshuttle stimulieren, sodass der Nährstoffbedarf an die synaptische Aktivität angepasst wird. Diese metabolischen Kopplung basiert auf einem Anstieg der intrazellulären  $\text{Na}^+$ -Konzentration durch die Glutamataufnahme, welche über eine Aktivierung der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase die Glukoseaufnahme und Glykolyse anregt (Lipton und Robacker 1983; Pellerin und Magistretti 1994; Pellerin und Magistretti 1997; Rose und Karus 2013). Auch bestehen direkte Interaktionen der Glutamattransporter und der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase mit Enzymen der Glykolyse und des Glykogenstoffwechsels sowie mit mitochondrialen Proteinen für die Kopplung von synaptischer Aktivität und Energiegewinnung (Rose et al. 2009; Bauer et al. 2012; Robinson und Jackson 2016).

Glutamat wird im Anschluss an die Aufnahme durch die astrozytenspezifische Glutaminsynthetase unter Verbrauch von ATP zu Glutamin umgewandelt (Martinez-Hernandez et al. 1977). Dieses wird von den Astrozyten an die Neurone abgegeben, wo es durch die neuronenspezifische Phosphat aktivierte Glutaminase wieder zu Glutamat desaminiert und in Vesikel verpackt wird (Kvamme et al. 2001; Chaudhry et al. 2002). An diesem Glutamat-Glutamin-Zyklus sind die *sodium-coupled neutral amino acid transporter* (SNAT) 3 und 5 (Astrozyten) sowie SNAT1 und 2 (Neurone) beteiligt (Bak et al. 2006). Weiterhin kann Glutamat über den Zitratzyklus metabolisiert werden. Der Anteil oxidierten Glutamats variiert dabei je nach extrazellulärer Glutamatkonzentration zwischen 15 und 70 % und stellt eine wichtige Energiequelle dar (Bak et al. 2006; McKenna 2007; Robinson und Jackson 2016). Auch kann Glutamat, ebenso wie für Glutamin, als Vorläufer für GABA oder für die Synthese von Glutathion und Proteinen verwendet werden (McKenna 2007).

### **1.2.6 Pathologische Prozesse**

Gesunde Astrozyten unterstützen die regelrechte Funktion der Neurone, synaptische Transmission und weitere Prozesse für einen reibungslosen Ablauf der Hirnfunktionen. Im Rahmen von neurologischen Erkrankungen kommt es jedoch zu molekularen und zellulären Veränderungen der Astrozyten, welche unter Umständen zu Funktionseinschränkungen führen können (Ridet et al. 1997). Diese sogenannte

reaktive Astroglie kann bei zahlreichen Erkrankungen des ZNS auftreten, so bei traumatischen und ischämischen Ereignissen, aber auch bei Tumoren, Infektionen, Epilepsie, neurodegenerativen und psychiatrischen Erkrankungen (Pekny und Nilsson 2005; Heneka et al. 2010; Sloan und Barres 2014). Sie ist v.a. durch eine verstärkte Expression von GFAP und Veränderungen weiterer Proteinexpressionen, gesteigerte Proliferation und Hypertrophie der astrozytären Fortsätze gekennzeichnet (Fawcett und Asher 1999; Pekny und Nilsson 2005; Sofroniew 2009). Die reaktive Astrozytose ist ein komplexer Prozess, welcher von feinen, reversiblen Änderungen bis hin zu irreversibler glialer Narbenbildung führen kann (Sofroniew 2009). Sie stellt (wie lange angenommen) keine per se maladaptive Reaktion dar, sondern kann durchaus dazu beitragen, entstandenen Schaden zu begrenzen und zu reparieren indem z.B. verstärkt exzitotoxisches Glutamat und Ammoniak aufgenommen sowie Energiesubstrate und antioxidative Verbindungen (Glutathion) für die umgebenden Neurone bereit gestellt werden (Dringen und Hirrlinger 2003; Sofroniew 2009; Osborn et al. 2016). Unter bestimmten Umständen können jedoch diese potentiell protektiven Funktionen vermindert sein oder sich umkehren (z.B. wird verstärkt Glutamat abgegeben), sodass sie zur Entstehung eines neurotoxischen Milieus und somit Verstärkung des Schadens beitragen (Pekny und Nilsson 2005; Bak et al. 2006; Harada et al. 2015). Ebenso können dysfunktionale Astrozyten, einhergehend mit Astroglie oder dem Verlust wichtiger Funktionen, selbst primäre Ursache von ZNS Erkrankungen wie z.B. Alzheimer, Amyotrophe Lateralsklerose oder Neuromyelitis Optica sein (Sofroniew 2009; Pekny et al. 2015; Lan et al. 2015).

### **1.3 Zellkulturen als Modell**

Im komplexen Netzwerk der Zellen des Gehirns ist es auf Grund zahlreicher Verknüpfungen der Zellen untereinander sowie der großen Heterogenität oft schwierig, Eigenschaften einzelner Zelltypen zu untersuchen. Daher wurden für die Experimente mit Astrozyten angereicherte Zellkulturen verwendet, welche eine zelltypspezifische Analyse *in vitro* ohne den Einfluss anderer Zelltypen ermöglichen. Die Zellkulturen erlauben weiterhin die einfache Manipulation von Zellen wie z.B. Transfektion zur Expression von Proteinen sowie die einfache Veränderung des die Zellen umgebenden Mediums.

Jedoch muss berücksichtigt werden, dass sich kultivierte Astrozyten teilweise von ihren *in vivo* Korrelaten unterscheiden. Die Kulturen zeigen einen leicht abweichenden, vermutlich unreifen oder reaktiven Phänotyp (Cahoy et al. 2008). Rein morphologisch stellen sie sich deutlich weniger verzweigt dar als ihre Korrelate in Hirnschnitten. Astrozyten in Kultur sind GFAP-positiv, zeigen ähnliche elektrophysiologische Eigenschaften und keine Neuronen- oder Oligodendroglia spezifischen Marker (Chiu et al. 1981; Kimelberg 1983). Sie exprimieren viele (jedoch nicht alle) der astrozytären Gene sowie einige zusätzliche Gene (Cahoy et al. 2008). So finden sich in kultivierten Astrozyten AMPA/Kainat-Subtypen der Glutamatrezeptoren, jedoch nicht der NMDA-Subtyp (Cornell-Bell et al. 1990; Verkhratsky und Steinhäuser 2000). Sie zeichnen sich ebenfalls durch die Aufnahme von Glutamat aus, jedoch erfolgt diese im Gegensatz zu *in vivo* Astrozyten v.a. über GLAST und kaum über GLT-1 (Robinson und Jackson 2016). Der Dopamintransport in kultivierten kortikalen Astrozyten scheint ausschließlich über OCT3 (Na<sup>+</sup>-unabhängig) und NET (Na<sup>+</sup>-abhängig) stattzufinden, letzterer konnte jedoch nicht in allen Studien nachgewiesen werden (Takeda et al. 2002).

## 1.4 Neurotransmitter

Für die chemische Übertragung der Aktionspotentiale an Synapsen verwenden Neurone eine Vielzahl von Transmitter wie Acetylcholin, GABA, Glycin, Serotonin etc., einschließlich der für die vorliegende Arbeit relevanten Transmitter Glutamat und Dopamin. Glutamat ist als wichtigster exzitatorischer Neurotransmitter des ZNS an den meisten normalen Hirnfunktionen wie Wahrnehmung, Gedächtnis und Lernen beteiligt (Danbolt 2001). Seine Konzentration an der Synapse kann in Ruhe auf bis zu 25 nM sinken und steigt bei synaptischer Transmission stark an auf ca. 100 µM bis 1 mM (McKenna 2007; Robinson und Jackson 2016).

Dopamin ist der verbreitetste katecholamine Neurotransmitter und Neuromodulator des ZNS und an wichtigen Prozessen wie der Regulierung motorischer Aktivität und des Hormonhaushalts, Aufmerksamkeit, Motivation, Lernen und Gedächtnis beteiligt (Beaulieu und Gainetdinov 2011). Dopaminerge Neurone befinden sich überwiegend im Mesencephalon und im Hypothalamus, von wo aus sie u.a. in das limbische System, Striatum und in den Cortex projizieren (Dahlstroem und Fuxe 1964; Björklund und Dunnett 2007). Da Dopamin nicht in der Lage ist, die Blut-

Hirn-Schranke zu passieren, wird es in Neuronen aus Tyrosin mit Hilfe der Tyrosinhydroxylase gebildet (Heinrich et al. 2014). Dopamin kann je nach vorherrschendem Rezeptortyp und Konzentration sowohl exzitatorisch als auch inhibitorisch auf kortikale Neurone wirken und es wird davon ausgegangen, dass seine Wirkung auf dem Zusammenspiel der basalen Konzentration und Schwankungen durch phasische Ausschüttung beruht (Kroener et al. 2009). Basale Dopaminkonzentrationen wurden zwischen 1-9 nM gemessen und steigen bei Stimulation auf 50-570 nM (Chen et al. 1997; Shiraishi et al. 1997; Kroener et al. 2009).

## 1.5 FRET-Sensoren

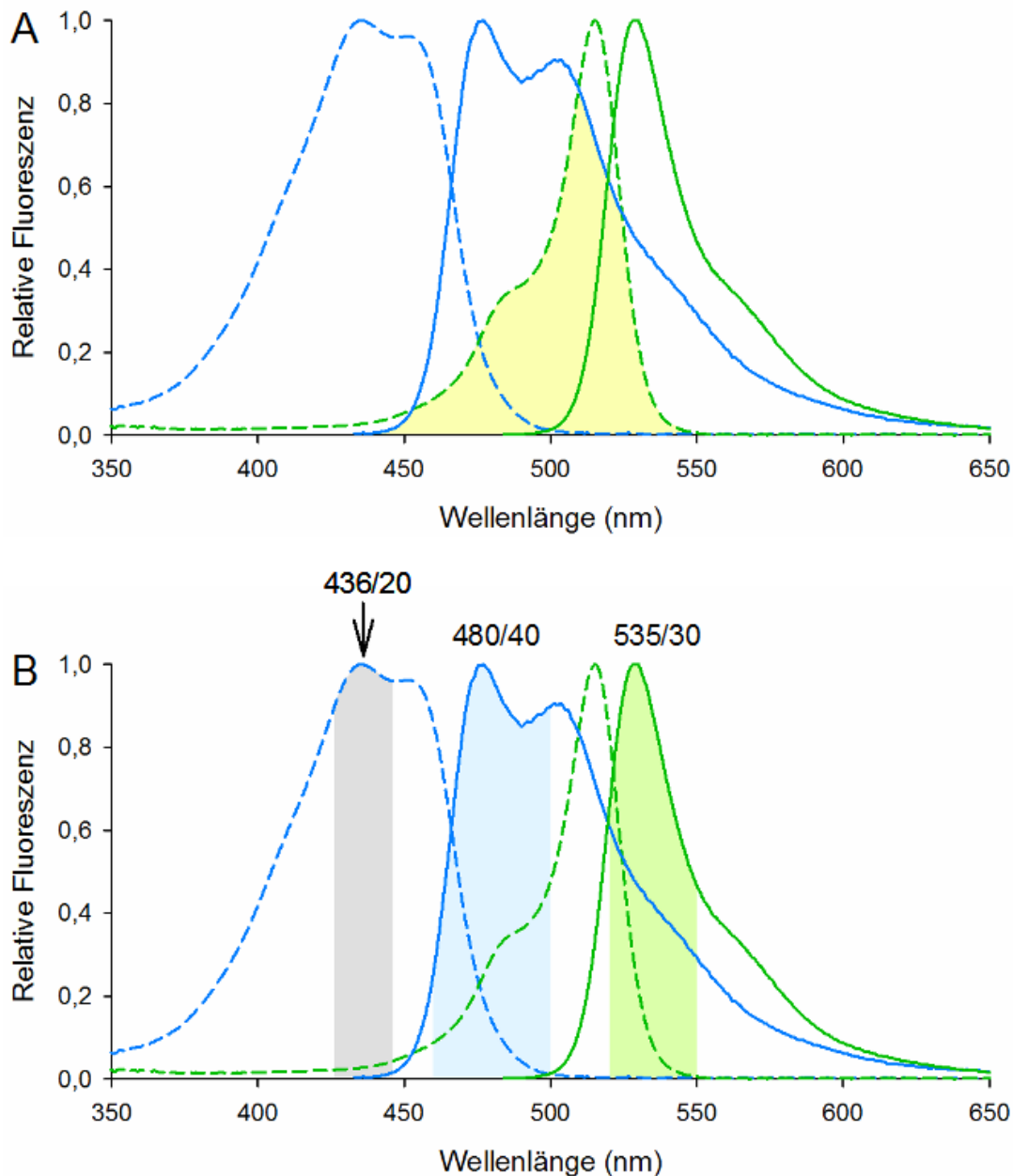
Fluoreszierende Proteine (FP) bieten unzählige Möglichkeiten zur Erforschung zellulärer Strukturen und Prozesse. Eines der ersten bekannten intrinsisch fluoreszierenden Proteine, GFP (*green fluorescent protein*), wurde aus der Qualle *Aequorea victoria* extrahiert (avGFP; Shimomura et al. 1962). Die Sequenzierung und Modifizierung des avGFP ermöglichte die molekulargenetische Herstellung verstärkter, verschiedenfarbiger oder an Moleküle gekoppelter Varianten und schaffte somit die Grundlage für ein breites Anwendungsspektrum. So ist u.a. die Beobachtung von Expression, Lokalisation und dynamischen Veränderungen von Proteinen und zellulären Strukturen sowie der Einsatz als Biosensor möglich (Tsien 1998; Frommer et al. 2009).

Fluoreszenz beschreibt das Phänomen der Lichtaussendung eines geeigneten Fluorophores im Anschluss an die Absorption von Energie in Form von Photonen. Diese heben in Abhängigkeit ihrer Energie (also der Wellenlänge) Elektronen des Fluorophors in einen angeregten, labilen Zustand. Fallen die Elektronen zurück auf ihren Grundzustand, wird erneut Energie (v.a. als Photonen) freigesetzt. Da ein Teil der Energie strahlungsfrei verloren geht, besitzt das emittierte Licht eine geringere Energie (und damit größere Wellenlänge) als das absorbierte Licht (Hochreiter et al. 2015).

Förster- (gelegentlich auch Fluoreszenz-) Resonanzenergietransfer (FRET) ist ein nach Theodor Förster benannter physikalischer Prozess, bei dem ein Teil dieser absorbierten Energie strahlungsfrei (über Dipol-Dipol-Wechselwirkungen) von einem angeregten Donor auf einen geeigneten Akzeptor übertragen wird (Förster 1948).

Wesentliche Voraussetzungen für einen FRET-Effekt zwischen zwei FP sind (i) eine räumliche Distanz zwischen 1-10 nm (ii) eine geeignete Ausrichtung der Schwingungsebenen des Emissions- und Absorptionsdipols von Donor und Akzeptor; hier ist der FRET-Effekt am höchsten, wenn die Vektoren parallel verlaufen sowie (iii) eine Überschneidung des Emissionsspektrums des Donors mit dem Anregungsspektrum des Akzeptors, wobei 30 % oder mehr für einen ausreichenden FRET-Effekt angestrebt werden (Tsien 1998; Hochreiter et al. 2015). Da der Donor energetisch höhere (also kürzere) Wellenlängen absorbieren und emittieren muss um den Akzeptor anzuregen, liegen Absorptions- und Emissionsspektrum des Donors bei kürzeren Wellenlängen als die des Akzeptors (Abb. 3).

Ein geeignetes und weit verbreitetes FRET-Paar sind z.B. das blau fluoreszierende *cyan fluoreszent protein* (CFP) und das gelb fluoreszierenden *yellow fluoreszent protein* (YFP) sowie deren Derivate; möglich ist ebenfalls die Kombination aus einem grün fluoreszierenden Donor (z.B. *enhanced GFP*, eGFP) und einem rot fluoreszierenden Akzeptor (z.B. mRuby) (Kredel et al. 2009; Frommer et al. 2009; Hochreiter et al. 2015). Diese FP können durch eine Sensordomäne verbunden werden und gelangen so in eine geeignete Position für einen intramolekularen FRET-Effekt. Reagiert die Sensordomäne auf Veränderungen der Umwelt, so verändern sich Abstand und Ausrichtung der FP zueinander und damit der Anteil des messbaren FRET-Signals (Abb. 4; Frommer et al. 2009). Unterschiedliche Mechanismen wie enzymatische Spaltung, Konformationsänderung oder eine mechanische Änderung der Sensordomäne können als Grundlage für Veränderungen des FRET-Signals genutzt werden und ermöglichen sowohl die qualitative als auch quantitative Beurteilung z.B. von Enzymaktivitäten, Signalwegen, Metabolitkonzentrationen oder Zelladhäsionskräften (Hochreiter et al. 2015).



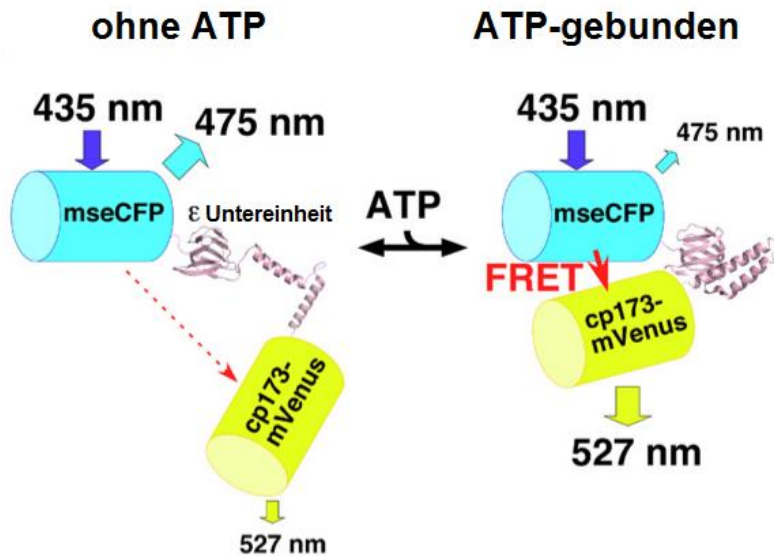
**Abb. 3 Anregungs- und Emissionsspektren des Donors CFP (blau) und Akzeptors YFP (grün).** Die Anregung (unterbrochene Linien) erfolgt bei kürzerer Wellenlänge als die Emission (durchgezogene Linien). **A:** Überschneidung des CFP-Emissionsspektrums mit dem YFP-Anregungsspektrum (hellgelbe Fläche) als Voraussetzung für das Auftreten eines FRET-Effekts. **B:** Die Anregung des CFP erfolgt bei 436 nm (Pfeil), die Emission wird bei 480 nm (CFP-Emission, hellblaue Fläche) sowie bei 535 nm (YFP-Emission bzw. FRET-Signal, hellgrüne Fläche) gemessen. Weiterhin kann die YFP-Emission bei direkter YFP-Anregung bei 500 nm gemessen werden (nicht dargestellt). Dargestellt wurden die in den Experimenten verwendeten Filtereigenschaften, 436/20 bedeutet: Maximum bei 436 nm  $\pm$  10 nm. Die Daten der Fluoreszenzspektren sind R. Tsien's Website entnommen (<http://www.tsienlab.ucsd.edu/Documents.htm>).

### 1.5.1 ATeam: Ein FRET-basierter Sensor für ATP

Adenosintriphosphat (ATP) dient ubiquitär als unmittelbarer Energieträger und Regulator energieliefernder Prozesse und kann zudem als intra- und extrazellulärer Botenstoff agieren. Die detaillierte Analyse dieser Vorgänge ist jedoch mit herkömmlichen Methoden nur eingeschränkt möglich: Biochemische Ansätze erfordern eine Lyse der Zellen, wodurch subzelluläre und zeitliche Auflösung sowie Zelltypspezifität verloren gehen, während bisherige bildgebende Methoden Unspezifität und erschwerte ATP-Kalibration aufweisen.

Der von Imamura et al. (2009) entwickelte FRET-basierte Sensor für ATP bietet nun die Möglichkeit, den ATP-Gehalt in einzelnen Zellen und Zellkompartimenten in Echtzeit zu beobachten. Dieser Sensor verwendet die  $\epsilon$ -Untereinheit der  $F_0F_1$ -ATP Synthase von *Bacillus subtilis* als Sensordomäne. Diese zeichnet sich dadurch aus, dass sie eine sehr hohe Spezifität für ATP gegenüber anderen Nukleotiden wie ADP oder GTP zeigt, ATP bindet aber nicht hydrolysiert und bei Bindung von ATP einer großen Konformationsänderung unterliegt. An den N- bzw. C-Terminus wurden die Fluoreszenzproteine „mseCFP“ und „cp173mVenus“ als Donor bzw. Akzeptor angefügt (Abb. 4). Hierbei handelt es sich um Varianten der FP CFP bzw. YFP, welche die gleichen Anregungs- und Emissionsspektren besitzen, jedoch Verbesserungen hinsichtlich der effizienten Proteinreifung, dynamischen Breite und Resistenz gegenüber Umwelteinflüssen wie z.B. dem pH-Wert aufweisen (Nagai et al. 2002; Nagai et al. 2004; Matsuda et al. 2008). Im Folgenden werden aus Gründen der Übersichtlichkeit für die FPs im hier verwendeten Sensor die Bezeichnungen CFP und YFP verwendet.

Kommt es zur Bindung von ATP an die  $\epsilon$ -Untereinheit, so nähern sich die FP einander an. Dies resultiert in einer Verstärkung des FRET-Effekts, d.h. in der ATP-gebundenen Form wird bei CFP-Anregung vermehrt YFP durch Energie des CFP angeregt. Als Resultat ist eine verstärkte Emission von YFP bei verminderter CFP-Emission messbar. Die Messung des FRET-Indexes erlaubt direkte Rückschlüsse auf den relativen ATP-Gehalt der Zelle. Der Sensor erhielt den Namen ATeam (*A*denosine 5'-*T*riphosphate indicator based on *E*psilon subunit for *A*nalytical *M*easurements) (Imamura et al. 2009).



**Abb. 4 Der FRET-basierte ATP-Sensor ATeam.** An der  $\epsilon$ -Untereinheit der F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP Synthase von *Bacillus subtilis* befinden sich Varianten von CFP (mseCFP) und YFP (cp173mVenus) als Donor- bzw. Akzeptorfluoreszenzprotein. Ist kein ATP gebunden, so befinden sich diese in relativer Distanz, sodass bei Anregung des CFP kaum eine Anregung des YFP auftritt. Wird ATP gebunden, so unterliegt die  $\epsilon$ -Untereinheit einer Konformationsänderung und die Fluoreszenzproteine nähern sich einander an. Bei CFP-Anregung tritt nun ein starker FRET-Effekt auf: Das YFP wird durch einen Teil der Energie des CFP angeregt und leuchtet verstärkt, während die CFP-Emission abnimmt (Abb. modifiziert nach Imamura et al. 2009).

Für die Bestimmung des FRET-Indexes werden die Emissionsintensitäten von Donor und Akzeptor bei Anregung des Donors gemessen und deren Verhältnis angegeben. Die YFP-Emission bei CFP-Anregung wird im Folgenden zur Veranschaulichung und Differenzierung der YFP-Emission bei YFP-Anregung als FRET-Signal bezeichnet. Das Verhältnis von FRET/CFP ist eine gängige Methode der FRET-Sensor Analyse und eignet sich, solange das Verhältnis der Konzentration von Donor und Akzeptor (wie in dem hier vorliegenden intramolekularen FRET-Sensor) konstant ist (Imamura et al. 2009; Hou et al. 2011; Shrestha et al. 2015).

Die erste Variante des ATeam Sensors mit einem hohen dynamischen Bereich, AT1.03, zeigte eine Dissoziationskonstante  $K_d$  von 3.3 mM (bei 37°C). Durch Substitution der  $\epsilon$ -Untereinheit mit der des thermophilen Bakteriums *Bacillus* sp. PS3 und Mutationen im Bereich des ATP-Bindungszentrums entstanden Varianten mit unterschiedlicher Affinität, welche ATP-Messungen im Bereich von 2  $\mu$ M bis 8 mM ermöglichen. Die verwendete Variante AT1.03<sup>YEMK</sup> besitzt eine  $K_d$  von 1,2 mM sowie



einen Hill-Koeffizient von 2,1 und eignet sich somit für Messungen im physiologischen Bereich. Der ATeam Sensor AT1.03<sup>YEMK</sup> zeigt weiterhin folgende Eigenschaften: Nahezu unveränderliche Fluoreszenzemission bei pH-Werten zwischen 7,1 und 8,5; ATP-Bindungs- und Dissoziationsrate ( $k_{on}$  bzw.  $k_{off}$ ) von  $1,7 \times 10^{-2} \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$  bzw.  $9,8 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$  (Imamura et al. 2009).

## 2 Ziele

Die Bedeutung von Astrozyten für den Energiestoffwechsel des Gehirns ist unumstritten, jedoch wird eine zelltypspezifische Analyse durch intensive Interaktionen verschiedener Zelltypen im Gehirn und fehlende zelltypspezifische Analysen herkömmlicher biochemischer Methoden erschwert. Ziel der vorliegenden Arbeit ist die zelltypspezifische Analyse von ATP-Veränderungen in kultivierten Astrozyten unter physiologischen und pathologischen Stimuli mit Hilfe des genetisch kodierten, fluoreszenten Sensors „ATeam“. Hierdurch sollen bisher nicht messbare ATP-Veränderungen auf zellulärer Ebene der Analyse zugänglich gemacht werden um Aspekte zum vertieften Verständnis der komplexen metabolischen Vorgänge im Gehirn beizutragen. Dies schließt eine Charakterisierung des Sensors ATeam in primären Astrozyten ein, ebenso war die Einrichtung eines geeigneten Versuchsaufbaus Voraussetzung für die Durchführung der Experimente.

Des Weiteren sollen die Untersuchungen die Grundlage für anschließende Analysen *in vivo* legen, in denen der Sensor durch zelltypspezifische Promotoren in einzelnen Zelltypen (Astrozyten, Oligodendrozyten, Mikroglia, Neuronen) exprimiert wird und somit eine zelltypspezifische Analyse von ATP unter Berücksichtigung der morphologischen und physiologischen Interaktionen der verschiedenen Zelltypen ermöglicht.

## **3 Material und Methoden**

### **3.1 Material**

Wenn nicht anders angegeben, wurden alle verwendeten Chemikalien im höchstmöglichen Reinheitsgrad von den Firmen AppliChem [Darmstadt], Gibco [Karlsruhe], Invitrogen [Karlsruhe], PAA [Pasching], Merck [Darmstadt], Sigma-Aldrich [München] und Roth [Karlsruhe] bezogen. Verbrauchsmaterialien wurden bei Gibco [Karlsruhe], Sarstedt [Nümbrecht], TPP [Trasadingen, Schweiz] und Eppendorf [Hamburg] bestellt.

#### **3.1.1 Lösungen und Medien**

Alle Lösungen wurden, wenn nicht anders angegeben, mit doppelt destilliertem Wasser (Aqua bidestillata, A. bidest) aus einer TKA-GenPure Anlage (Hainichen) hergestellt. Hitzeempfindliche Lösungen wurden durch Filtration mit einem Porendurchmesser von 0,22 µm sterilisiert.

Alle Verbrauchsmaterialien zur Kultivierung von Zellen wurden steril verpackt von den Firmen TPP [Trasadingen], Millipore [Schwalbach] und Sarstedt [Nümbrecht] bezogen. Glaswaren wurden vor der Verwendung autoklaviert (120 °C für 20 min). Alle kommerziellen Kultivierungsmedien wurden steril bezogen und nach Zusatz der Additiva steril filtriert (Porengröße 0,22 µm). Die Lagerung erfolgte bei 4 °C. Fötales Kälberserum (FKS) wurde vor seiner Verwendung in Zellkulturmedien für 20 min bei 56 °C hitzeinaktiviert. Tab. 1 zeigt die Zusammensetzung der Lösungen für den allgemeinen Gebrauch sowie die Präparation und Kultivierung der Zellkulturen.

**Tab. 1 Lösungen für den allgemeinen Gebrauch und die Zellkulturen**

<b>Allgemeine Lösungen</b>	
10x PBS (pH 7,4) (PBS: <i>phosphate buffered saline</i> )	1,4 M NaCl; 80 mM Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 27 mM KCl; 15 mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
1x Ringerlösung	125 mM NaCl; 25 mM NaHCO <sub>3</sub> ; 5,4 mM KCl; 1,25 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 1 mM MgCl <sub>2</sub> ; 1,8 mM CaCl <sub>2</sub> ; 5mM Glc
<b>Lösungen für Präparation der Zellkultur</b>	
Puck's Medium	137 mM NaCl; 5,4 mM KCl; 0,22 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 0,17 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 5 mM Glukose; 58,4 mM Sucrose; 200 U/ml Penicillin; 150 U/ml Streptomycin; pH 7,4
Trypanblaulösung	5 mg/ml Trypanblau in PBS
<b>Kultivierungsmedium für die Zellkultur</b>	
DMEM ( <i>Dulbecco's Modified Eagles Medium</i> , 5 g/l bzw. 1 g/l Glukose); 10 % FKS; 2 mM Glutamin; 50 U/ml Penicillin; 37,5 U/ml Streptomycin	

Für die Experimente wurde der HEPES-Puffer täglich neu angesetzt und mit  $\text{CaCl}_2$  und Glc ergänzt (Endkonzentration: 20mM HEPES; 1mM  $\text{MgCl}_2$ ; 5,4 mM KCl; 145 mM NaCl; 0,8 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1,8 mM  $\text{CaCl}_2$ , 5 mM Glc; pH 7,4). Es erfolgten routinemäßig pH- und Osmolalitätskontrollen. Die übrigen Substanzen wurden entsprechend der in den Experimenten angegebenen Konzentrationen hinzugegeben. Bei Lösungen mit Dopamin wurde Catalase hinzugefügt, um Autooxidation und  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Bildung zu vermeiden (Requardt et al. 2010). Die für die Experimente verwendeten Lösungen können Tab. 2 entnommen werden.

**Tab. 2 Lösungen zur Durchführung der Experimente**

Lösung	Stammlösung	Lösungsmittel	Hersteller
2x HEPES-Puffer	40mM HEPES; 2mM $\text{MgCl}_2$ ; 10,8 mM KCl; 290 mM NaCl; 1,6 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4$	$\text{H}_2\text{O}$	
Glucose	1M	$\text{H}_2\text{O}$	Roth
$\text{CaCl}_2$	1M	$\text{H}_2\text{O}$	Roth
Na-Glutamat	100mM	$\text{H}_2\text{O}$	AppliChem
DL-TBOA	100mM	DMSO	Tocris
D-Aspartat	100mM	NaOH	Tocris
AMPA	100mM	$\text{H}_2\text{O}$	abcam
Ouabain	10 bzw. 2mM	$\text{H}_2\text{O}$	Tocris
Dopamin	100mM	$\text{H}_2\text{O}$	Sigma
Catalase	130 000 U/ml	$\text{H}_2\text{O}$	Sigma
Iodacetat	1M	$\text{H}_2\text{O}$	AppliChem
Natriumazid	1M	$\text{H}_2\text{O}$	AppliChem

### 3.1.2 Plasmide und Reagenzien für Transfektion und Midi

Die für die Midi-Präparation und die Transfektion verwendeten Plasmide und Reagenzien sind in Tab. 3 aufgeführt

**Tab. 3** Verwendete Plasmide, Reagenzien und Kits

Plasmid	DNA-Konstrukt	c [ $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ]	Referenz
ATP Sensor ATeam	p132-MS- ATeam1.03YEMK	2,1 bzw. 1,05	Imamura et al. 2009
Negativkontrolle zu ATeam	p133-MS- ATeam1.03YEMKmut	3,4	
<b>Kommerzielle Reagenzien und Reaktionssysteme (Kits)</b>		<b>Hersteller</b>	
LB-Medium, Lennox		MP Biomedicals	
Plasmid Midi Kits		Qiagen [Hilden]	
Opti-MEM		gibco	
Lipofectamin 2000		invitrogen	

### 3.1.3 Antikörper und Lösungen für die Immunfärbung

Tab. 4 können die für die Immunfärbung verwendeten Antikörper und Lösungen entnommen werden.

**Tab. 4** Verwendete Antikörper und Lösungen für Immunfärbung

Antikörper	Verdünnung	Hersteller
Cy3-gekoppelter anti-Kaninchen-IgG	1:500	Dianova
DAPI	1:10000	Carl Roth
anti-GFAP (Kaninchen)	1:500	Dako, Hamburg
<b>Lösung</b>	<b>Zusammensetzung</b>	<b>Hersteller</b>
Fixationsmedium	4% Paraformaldehyd in H <sub>2</sub> O	Otto Fischar GmbH
Permeabilisierungslösung	0,01% Tween20 in PBS	Carl Roth
Blockierungs- & AK-Lösung	1%BSA, 0,5% Triton in PBS	AppliChem

### 3.1.4 Geräte

Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200	Zeiss [Jena]
Kamera: AxioCam MRm	Zeiss [Jena]
Objektiv: LD Plan-Neofluar 40x/0,6 Korr	Zeiss [Jena]
Lampe: X-Cite 120	Excelitas Technologies
Filterwürfel: s. Tab. 5	Zeiss [Jena], AHF [Tübingen]

**Tab. 5 Übersicht der verwendeten Filter** Angabe der Wellenlängen in nm

Filter	Anregung	Strahlteiler	Emission	Hersteller/FS
CFP	436/25	455	480/40	Zeiss/47HE
YFP	500/25	515	535/30	Zeiss/46HE
FRET	436/20	455	535/30	AHF/F31-052
DAPI	G365	395	445/50	Zeiss/49
Cy3	550/25	570	605/70	Zeiss/43HE

Durchlichtmikroskop CKX31	Olympus [Hamburg]
Präparierbesteck	FST [Heidelberg]
Zentrifuge Biofuge primoR	Heraeus [Hanau]
Wasserbad	Memmert [Schwabach]
Spectrophotometer Gene Quant II	Pharmacia Biotech [Madrid, Spanien]
Centrifuge 5810R	Eppendorf [Wesseling-Berzdorf]
Sterilbank	Heraeus [Hanau]
Pumpe Vacusafe	IBS [Thun, Schweiz]
Neubauer Zählkammer	Marienfeld [Lauda-Königshofen]
Brutschrank cytoperm 2	Heraeus [Hanau]

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Zellkulturen

#### Arbeiten mit Mäusen

Alle Mäuse wurden entsprechend der Richtlinien für Versuchstiere am MEZ Leipzig gezüchtet und durch das Tierstallpersonal versorgt. Als Inzuchtstamm wurden C57BL/6 für die Präparation von Primärzellkulturen verwendet. Die Tiere

lebten in einem konstanten Hell-Dunkel-Rhythmus und hatten freien Zugang zu Wasser und Futter. Die Tötung zur Entnahme des Gehirns wurde unter der Registriernummer T13/12, T04/13 sowie AG30/12 von der zuständigen Genehmigungsbehörde (Landesdirektion Leipzig) genehmigt.

### **Astroglia-reiche Primärkulturen (APK)**

Zur Präparation von Astroglia-reichen Primärkulturen aus Mäusen des Stammes C57BL/6 wurden Tiere im Alter von maximal einem Tag eingesetzt. Die Methode ist bereits am Institut etabliert (Requardt et al. 2010) und orientierte sich am Protokoll zur Isolierung von Astrozyten aus Ratten (Hamprecht und Löffler 1985). Hierzu wurden neugeborene Mäuse dekapitiert, der Kortex herauspräpariert und in Puck's Medium aufgenommen. Über mechanische Dissoziation mittels zweier Zellsiebe (Porengrößen von 250 bzw. 135  $\mu\text{m}$ ) wurden die Zellen vereinzelt. Nach Zentrifugation wurden die Zellen zu 400.000/ml im Kultivierungsmedium mit 25 mM Glucose aufgenommen und je 3 ml/Kavität in 6-well-Platten eingesät, wobei jede Kavität ein Deckglas (30 mm Durchmesser) enthielt, sodass die Zellen auf den Deckgläsern adhärten. Nach einer Woche erfolgte ein Wechsel auf das gleiche Kultivierungsmedium mit lediglich 5 mM Glukose. Anschließend wurden die primären Astrozyten mit zweimal wöchentlichem Medienwechsel für zwei Wochen kultiviert, bis sie einen konfluenten Rasen gebildet hatten und für Experimente verwendet werden konnten. Die Inkubation der APK erfolgte im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 100 % Luftfeuchte. Die immunzytochemische Kontrolle zeigte, dass die Kulturen zu  $97,8 \pm 2,5$  % aus GFAP-positiven Zellen bestanden (n = 927 Zellen aus 3 unabhängigen Kulturen).

### **3.2.2 Midi-Präparation von Plasmiden**

Zur Präparation von Plasmiden wurden Bakterien transformiert, über Nacht bei 37 °C in LB-Medium inkubiert und durch alkalische Lyse aufgeschlossen. Die für eine Transfektion von Säugerzellen benötigte DNA wurde über Midi- (bis 100  $\mu\text{g}$ ) Plasmid-Kits [Qiagen] präpariert. Dafür wurden 80 ml Bakteriensuspension einer Übernachtskultur entsprechend den Herstellerangaben aufgearbeitet. Anschließend wurde die Konzentration der Plasmid-DNA mit einem Spectrophotometer bestimmt.



### 3.2.3 Transfektion

Auf Deckgläsern mit 30 mm Durchmesser kultivierte Astroglia-reiche Primärkulturen wurden mittels Lipofectamin transfiziert. Dazu wurden 4,0 µg DNA sowie 10 µl Lipofectamin in jeweils 250 µl Opti-MEM verdünnt. Nach 5 min Inkubation bei RT wurden die Lösungen zusammengegeben und weitere 20 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 500 µl der Transfektionsmischung auf die Zellkultur gegeben, welche mit 2 ml Medium bedeckt waren. Die transfizierten Kulturen wurden über Nacht im Brutschrank inkubiert und am darauffolgenden Tag verwendet.

### 3.2.4 Immunfärbung

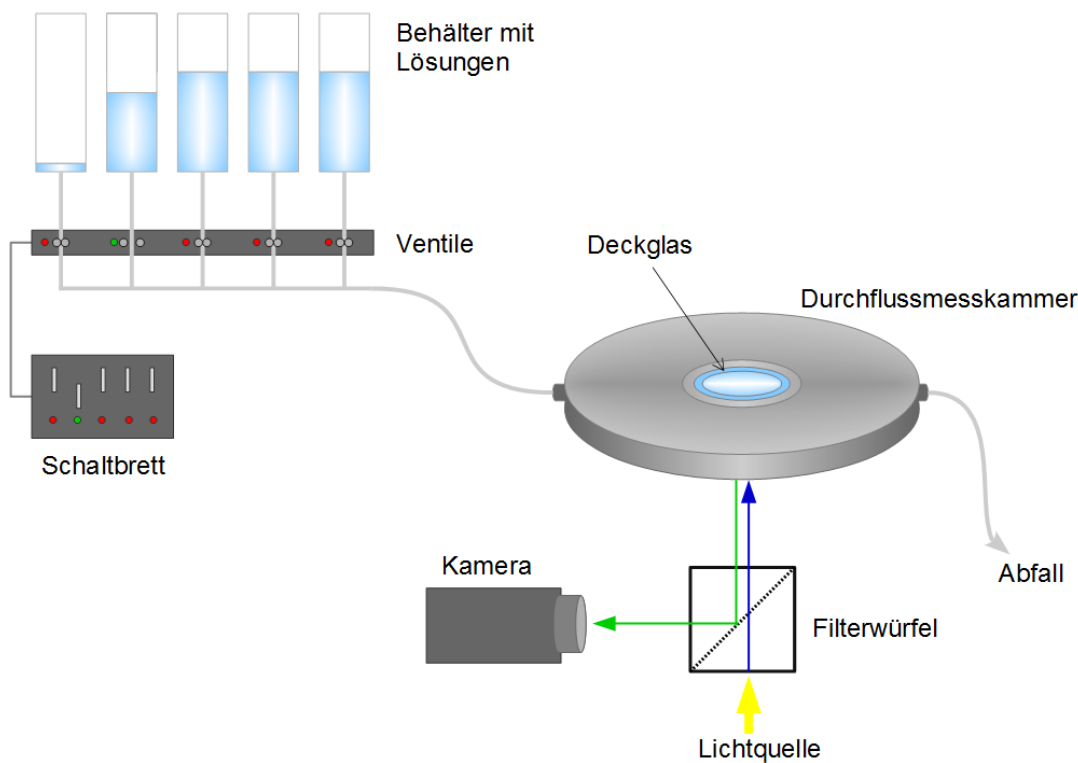
Die Deckgläser mit den transfizierten primären Astrozyten wurden nach Waschen mit 1x PBS für 10 min bei RT mit 4 % PFA fixiert und anschließend erneut mit 1x PBS gewaschen. Es folgte eine Permeabilisierung der Zellen mit 0,01 % Tween 20 in 1x PBS für 5 min bei RT und danach die Blockierung mit 1 % BSA (Roth), 0,5 % TritonX-100 in 1x PBS für 20 min bei RT. Die Inkubation mit anti-GFAP-AK verdünnt in der Blockierungslösung erfolgte für 1 h bei RT. Nach dreimaligem Waschen mit 1x PBS wurden die Zellen mit dem Cy3-AK (verdünnt in Blockierungslösung) für 1 h bei RT inkubiert. Danach wurde zweimal mit 1x PBS gewaschen und anschließend für 5 min mit 4,6-Diamidino-2 phenylindol (DAPI, in 1x PBS gelöst, Endkonzentration: 1 µg/ml) zum Anfärben der Zellkerne inkubiert. Es folgte ein letzter Waschschriff mit 1x PBS. Die Zellen wurden anschließend auf dem Objektträger mit dem Einbettmedium Aqua Poly/Mount (Polysciences, Eppelheim) eingedeckt. Zum Schutz vor Ausbleichen wurden die Objektträger bei 4 °C im Dunkeln gelagert. Die Auswertung der Färbungen erfolgte am Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200 (Zeiss).

### 3.2.5 Fluoreszenzmikroskopie

In Abb. 5 ist der Versuchsaufbau schematisch dargestellt. Die Aufnahme der Bilder erfolgte mit einem inversen Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200M unter Verwendung eines 40x Öbobjektives. Zur Anregung diente die Lichtquelle X-cite, deren Licht durch Filterwürfel auf die Anregungswellenlänge reduziert wurde. Diese waren rotierbar und durch die Software AxioVision steuerbar im Mikroskop

eingesetzt. Die emittierte Fluoreszenz wurde mit Hilfe der Kamera AxioCam MRm digital aufgenommen. Um *photobleaching* zu minimieren, wurde eine niedrige Anregungsintensität in Kombination mit einem *binning* von 4x4 gewählt (Hou et al. 2011).

Für jeden Versuch wurde ein Deckglas mit am Vortag transfizierten APKs in eine Durchflussmesskammer eingelegt. Über Schläuche erfolgte die Perfusion der Zellen mit unterschiedlichen Lösungen, zwischen denen mit Hilfe von über ein Schaltbrett gesteuerten Ventilen gewechselt werden konnte. Somit war ein kontinuierlicher Fluss des Mediums über die Zellen und ein einfacher Wechsel der Inkubationsbedingungen bei gleichzeitiger kontinuierlicher Bildaufnahme gewährleistet. Die Flussrate wurde durch die Schwerkraft über die Höhe des Abfallbehälters reguliert und betrug in allen Experimenten ca. 1 ml/min.

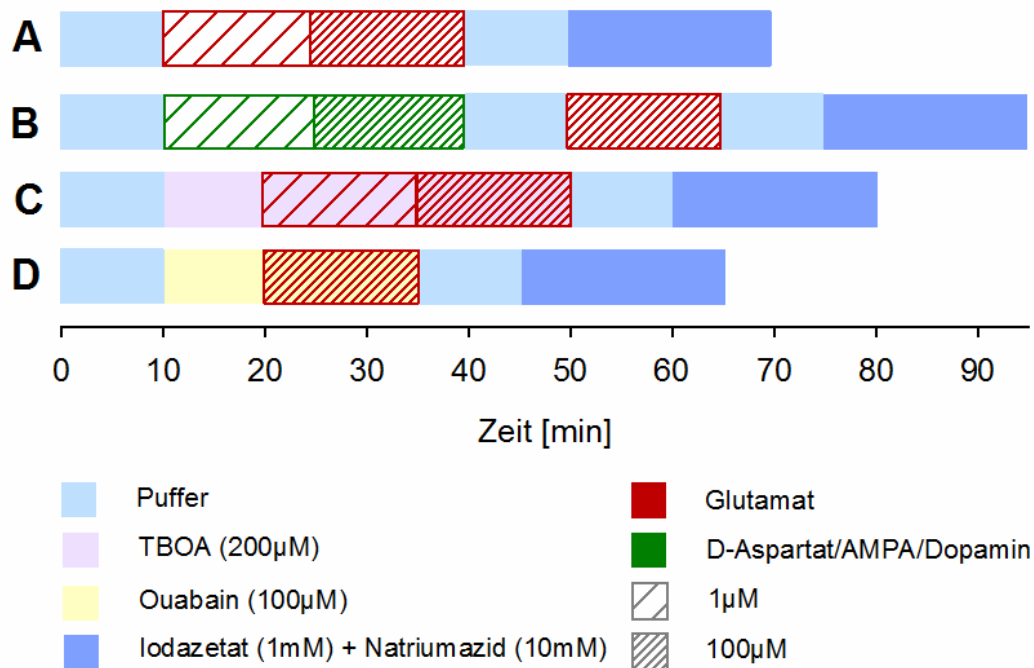


**Abb. 5 Schematischer Versuchsaufbau.** Die unterschiedlichen Lösungen befinden sich in Behältern oberhalb des Mikroskops und sind über Schläuche mit der Durchflussmesskammer verbunden. Zwischen den Lösungen kann mit Hilfe von über ein Schaltbrett gesteuerten Ventilen gewechselt werden. Die Flussrate wird durch die Schwerkraft über die Höhe des Abfallbehälters reguliert. Die Filterwürfel befinden sich rotierbar im Mikroskop.

Nach der Einstellung eines geeigneten Areal mit mehreren gut abgrenzbaren transfizierten Astrozyten wurde über die angegebenen Zeiträume alle 15 s in den 3 Kanälen CFP (CFP-Anregung, CFP-Emission), FRET (CFP-Anregung, YFP-Emission) und YFP (YFP-Anregung, YFP-Emission; s. Tab. 5) ein Bild aufgenommen und entsprechend zwischen den Lösungen gewechselt. Die Belichtungszeit betrug i.d.R. 150 ms für den CFP-, 100 ms für den FRET- sowie 50 ms für den YFP-Kanal.

### **3.2.6 Ablauf der Experimente**

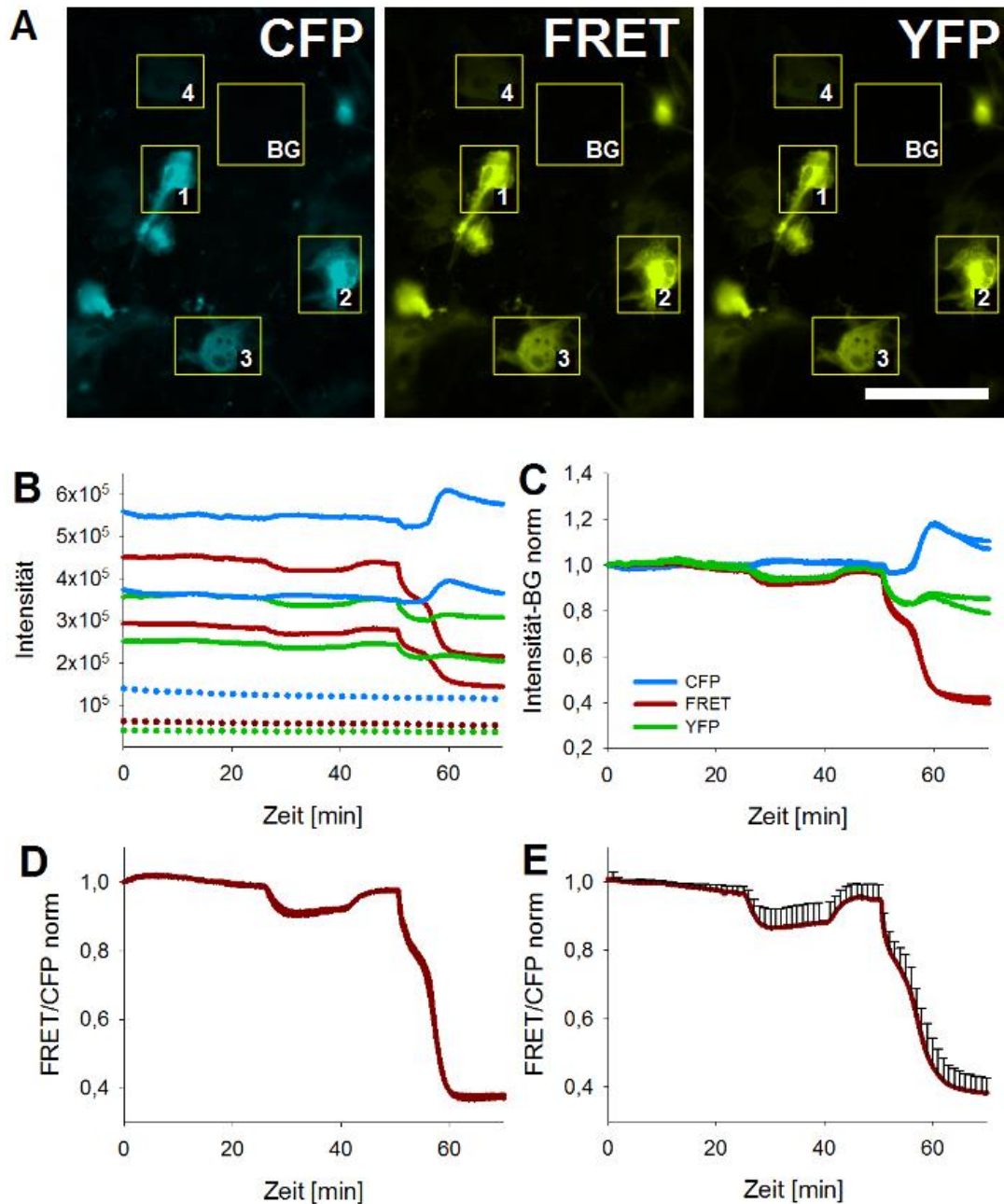
Zu Beginn der Experimente wurden die Zellen über 10 min mit normalem Puffer aufgenommen, um ein möglichst stabiles Ausgangsniveau zu erhalten. Anschließend wurde der Experimentablauf je nach Wirkmechanismus der zu untersuchenden Substanz gestaltet (Abb. 6). Im Falle der Glutamat-, D-Aspartat-, AMPA- und Dopaminexperimente bestand dieser aus jeweils 15 min Stimulation durch die Substanz in einer niedrigen (1  $\mu$ M) und anschließend höheren (100  $\mu$ M) Konzentration. Darauf folgten weitere 10 min Puffer und eine 15 minütige Kontrollphase mit einer 100  $\mu$ M Glutamatlösung (D-Aspartat-, AMPA-, Dopaminexperiment). Für die Experimente mit TBOA und Ouabain wurde zunächst nur der Blocker appliziert, um eventuelle TBOA- oder Ouabain-bedingte Änderungen sichtbar zu machen. Anschließend wurden die Zellen dem Blocker gemeinsam mit Glutamat in unterschiedlichen Konzentrationen ausgesetzt. Unter Ouabain wurde auf die Phase mit 1  $\mu$ M Glutamat verzichtet, da bereits deutliche Signaländerungen unter alleiniger Zugabe von Ouabain sichtbar waren und somit eine geringe Änderung durch 1  $\mu$ M Glutamat nicht zuverlässig differenziert werden kann. Am Ende der Experimente erfolgte nach weiteren 10 min Pufferlösung die Zugabe von Iodacetat und Natriumazid zur vollständigen Depletion des zellulären ATPs durch Hemmung der ATP-Produktion (s. 4.1.2.1).



**Abb. 6 Abfolge und Dauer der applizierten Lösungen in der Versuchsdurchführung.** Nach einer zehnminütigen Pufferphase zum Erreichen eines stabilen Ausgangsniveaus folgte die Applikation der jeweiligen Lösungen. Jedes Experiment wurde zur Kontrolle mit der Hemmung der ATP-Synthese durch Iodazetat und Natriumazid abgeschlossen. **A:** Ablauf der Glutamatexperimente; **B:** Ablauf der Experimente mit D-Aspartat, AMPA und Dopamin; **C/D:** Ablauf der Experimente mit den Blockern TBOA und Ouabain.

### 3.2.7 Auswertung

Die Aufnahmen erfolgten mit Hilfe der Software AxioVision Release 4.8.2 (Zeiss) und wurden anschließend mit der Software ImageJ 1.50e ausgewertet (Schneider et al. 2012). In den Bildstapeln wurden hier *Regions of interest* (ROIs) über mehreren Zellen und dem Hintergrund ausgewählt und anschließend die Fluoreszenzintensitäten aller ROIs über die Zeit extrahiert. Diese Werte wurden mit Microsoft Excel weiterbearbeitet und ausgewertet (Abb. 7). Es erfolgte die Subtraktion des Hintergrundes sowie die Bildung des FRET/CFP-Verhältnisses, um Parameter wie den Expressionsgrad des Sensors herauszurechnen. Dieses Verhältnis ist unabhängig vom Expressionsgrad und stellt somit den relativen ATP-Gehalt der Zelle dar (Hou et al. 2011). Weiterhin erfolgte die Berechnung der Mittelwerte und Standardabweichung aller identischen Experimente sowie zur übersichtlicheren Darstellung die Normierung auf den Mittelwert der ersten 10 min.



**Abb. 7 Ablauf der Auswertung.** Gezeigt sind Bilder und Daten eines Einzelexperiments (A-D) bzw. die Zusammenfassung aller identischen Experimente (E). Um den Verlauf der Intensität der Fluoreszenzsignale graphisch darzustellen, wurden die Werte einzelner Zellen extrahiert und weiterverarbeitet. **A:** Darstellung der einzelnen Kanäle im Fluoreszenzmikroskop und Auswahl von *Regions of Interest* (ROIs). Die Anregung erfolgte bei 436 nm (CFP, FRET) bzw. 500 nm (YFP), die Emission wurde bei 480 nm (CFP) bzw. 535 nm (FRET, YFP) gemessen. Mit der software ImageJ wurden ROIs über bis zu 4 Zellen (1-4) und dem Hintergrund (*background*, BG) ausgewählt und deren Graustufenwerte extrahiert. Diese wurden mit Microsoft Excel weiterverarbeitet. Für die Abbildung wurden die Bilder in Anlehnung an das tatsächliche Erscheinen zur Veranschaulichung künstlich eingefärbt. Der Maßbalken entspricht 100  $\mu\text{m}$ . **B:** Graphische Darstellung der Rohwerte. Jede Kurve entspricht dem Verlauf des Fluoreszenzsignals einer Zelle in einem Kanal, wobei der

CFP-Kanal blau, der FRET-Kanal rot und der YFP-Kanal grün dargestellt sind. Aus Übersichtsgründen sind nur die Daten von 2 Zellen (Zelle 1+3) dargestellt. Die gepunkteten Kurven repräsentieren den Hintergrund des jeweiligen Kanals. **C**: Daten nach Subtraktion des Hintergrundes und Normierung auf den ersten Wert zur besseren Beurteilbarkeit des Verlaufs. Der Verlauf der CFP-Fluoreszenz verhält sich wie erwartet gegenläufig zur FRET-Fluoreszenz. Ebenfalls ist eine Veränderung der YFP-Fluoreszenz zu beobachten. **D**: Bildung des FRET/CFP Verhältnisses (Ratio) zur Darstellung des relativen ATP-Gehalts **E**: Mittelwert der Ratio aus allen identischen Experimenten. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung und sind zur Übersichtlichkeit nur für die Messwerte jede Minute dargestellt. Die Messung erfolgte alle 15 s.

Die graphische Darstellung zeigt die Verläufe der einzelnen Kanäle bzw. die Mittelwerte mit Standardabweichung über die Zeit. Zur besseren Übersicht ist nur ein Fehlerbalken pro Minute abgebildet, die Zeitauflösung der Experimente beträgt 15 s.

Für die Balkendiagramme wurde aus jedem Abschnitt des Experiments ein Zeitraum von 2 min gewählt, dessen FRET/CFP Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt ist.

Signifikante Unterschiede wurden mit dem One Way RM Anova Test bestimmt, wobei die Signifikanzniveaus wie folgt dargestellt werden: \* für  $p < 0,05$ , \*\* für  $p < 0,01$ , \*\*\* für  $p < 0,001$ . Die statistische Auswertung und Darstellung erfolgte mit SigmaPlot 12.3 (Systat Software).

Abbildungen wurden mit Corel Draw, Open Office Draw und Paint erstellt. Zur Archivierung der Referenzen wurde das Programm Citavi5 (Wädenswil, Schweiz) verwendet.

## 4 Ergebnisse

Alle gezeigten Experimente wurden an Zellen aus mindestens drei unabhängigen Kulturen durchgeführt. Die vorliegenden Abbildungen zeigen dabei entweder repräsentative Einzelexperimente oder zusammengefasste Daten, wobei in diesem Fall die Anzahl der zusammengefassten Einzeldaten (n) angegeben ist. Falls nicht anders erläutert, ist der Mittelwert angegeben, Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der Daten.

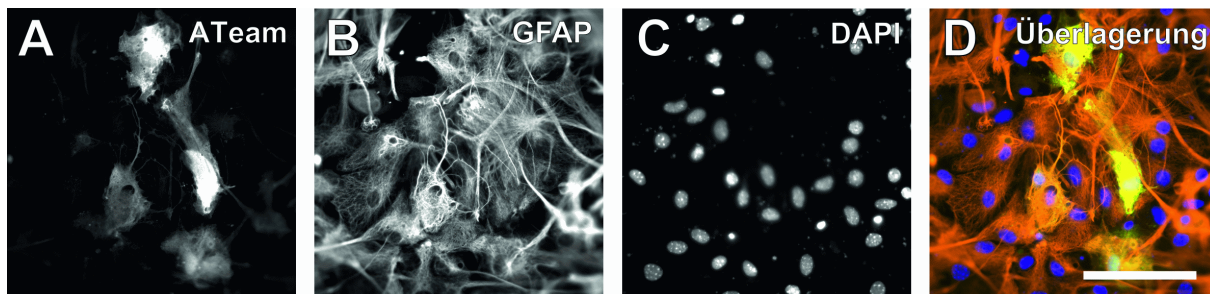
### 4.1 Etablierung des experimentellen Systems

Die zelltypspezifische Analyse von ATP-Veränderungen in Astrozyten erfolgte unter der Annahme, dass (i) es sich bei den beobachteten transfizierten Zellen nahezu ausschließlich um Astrozyten handelt und (ii) die erhaltenen Signale messbare, ATP-spezifische Veränderungen zeigen. Diese Voraussetzungen wurden wie im Folgenden beschrieben überprüft.

#### 4.1.1 Nachweis der Transfektion von Astrozyten mit Hilfe immunhistochemischer Färbungen

Die verwendeten astrogliareichen Primärkulturen (APK) wurden aus dem Cortex neugeborener C57BL/6 Mäuse angelegt. In diesen Zellkulturen sind durchschnittlich mehr als 90 % der Zellen Astrozyten (Hamprecht und Löffler 1985; Requardt et al. 2010), was durch eigene Auszählungen bestätigt werden konnte ( $97,8 \pm 2,5$  % GFAP-positive Zellen, n = 927 Zellen aus 3 unabhängigen Kulturen). In dem für die Experimente eingesetzten Expressionsplasmid wird die Expression des Sensors ATeam durch den zelltypunspezifischen CMV-Promotor getrieben. Daher sollte zuerst nachgewiesen werden, dass es sich bei den transfizierten Zellen tatsächlich vorwiegend um Astrozyten handelt. Hierzu wurde in transfizierten Zellkulturen das gliale fibrilläre saure Protein (GFAP) als Marker für Astrozyten (Eng et al. 1971; Uyeda et al. 1972; Bignami et al. 1972) immunhistochemisch angefärbt (Abb. 8). Zur Bestimmung der Gesamtzellzahl wurden alle Zellkerne mit DAPI angefärbt.  $94,8 \pm 2,8$ % der mit ATeam transfizierten Zellen waren GFAP positiv (n = 155 Zellen aus drei unabhängigen Kulturen). Dieses Ergebnis zeigt, dass für die weiteren Experimente davon ausgegangen werden kann, dass es sich bei den

transfizierten Zellen fast ausschließlich um Astrozyten handelt und somit die im folgenden erhaltenen Daten metabolische Eigenschaften dieses Zelltyps widerspiegeln.



**Abb. 8 Immunhistochemischer Nachweis transfizierter Astrozyten.** A-D zeigen denselben Ausschnitt einer mit ATeam transfizierten Astrozytenprimärkultur. **A:** YFP-Fluoreszenz des Sensors ATeam **B:** immunhistochemischer Nachweis von GFAP **C:** Anfärbung der Zellkerne mittels DAPI. In der Überlagerung (**D**) sind die transfizierten Zellen grün, GFAP positive Zellen rot und die Zellkerne blau dargestellt. Alle transfizierten Zellen in diesem Ausschnitt sind auch GFAP-positiv. Der Maßbalken in D entspricht 100  $\mu\text{m}$ .

#### 4.1.2 Überprüfung der Funktionalität des Sensors ATeam

Des Weiteren stellte sich die Frage, ob das erhaltene Signal messbare Änderungen zeigt und spezifisch für ATP ist. Um einen möglichst starken Abfall der ATP-Konzentration zu erreichen, wurde die intrazelluläre ATP-Synthese gehemmt und die Signalveränderungen beobachtet. Für die Überprüfung der Spezifität erfolgte die Durchführung des gleichen Experiments unter Verwendung eines mutanten ATeam-Sensors, welcher kein ATP bindet.

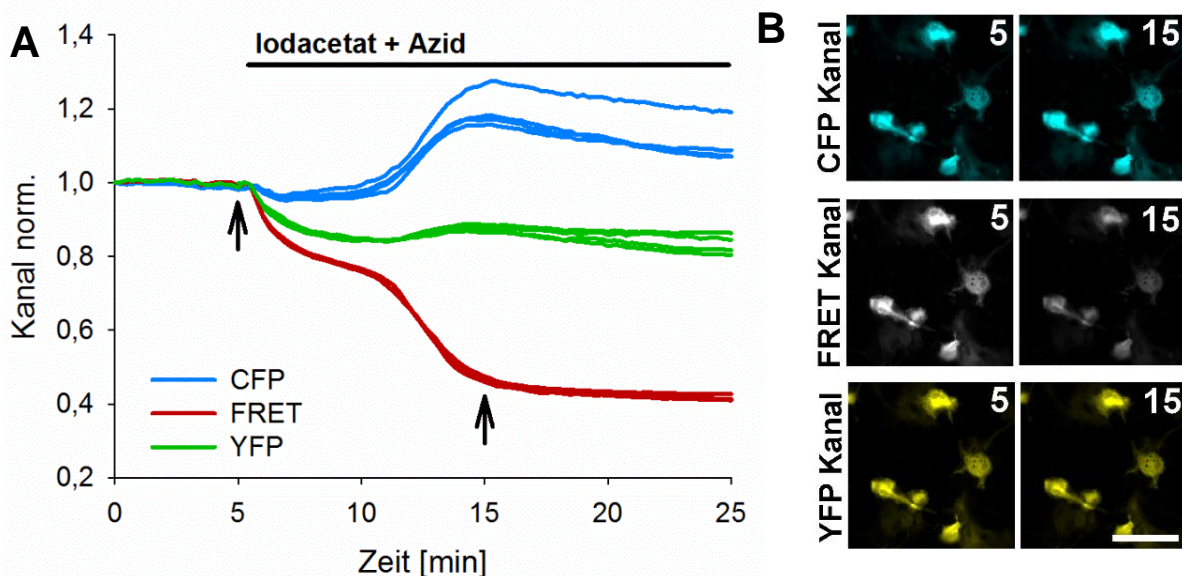
##### 4.1.2.1 Hemmung der intrazellulären ATP-Synthese

Es wurden bekannte Inhibitoren der Glykolyse (1 mM Iodacetat) und der Atmungskette (10 mM Natriumazid) eingesetzt, sodass die Zellen keine Möglichkeit zur ATP-Produktion hatten. Sie verbrauchten jedoch weiterhin ATP, daher kommt es in den Zellen zu einem starken Abfall der intrazellulären ATP-Konzentration bis hin zur völligen Depletion.

Das FRET-Signal nimmt bei der Zugabe von Iodacetat und Natriumazid deutlich ab, wohingegen das CFP-Signal ansteigt (Abb. 9). Diese Beobachtungen sind gut mit dem theoretischen Modell des FRET-Sensors ATeam vereinbar: Die geringere Sättigung des Sensors mit ATP führt über eine Konformationsänderung zu



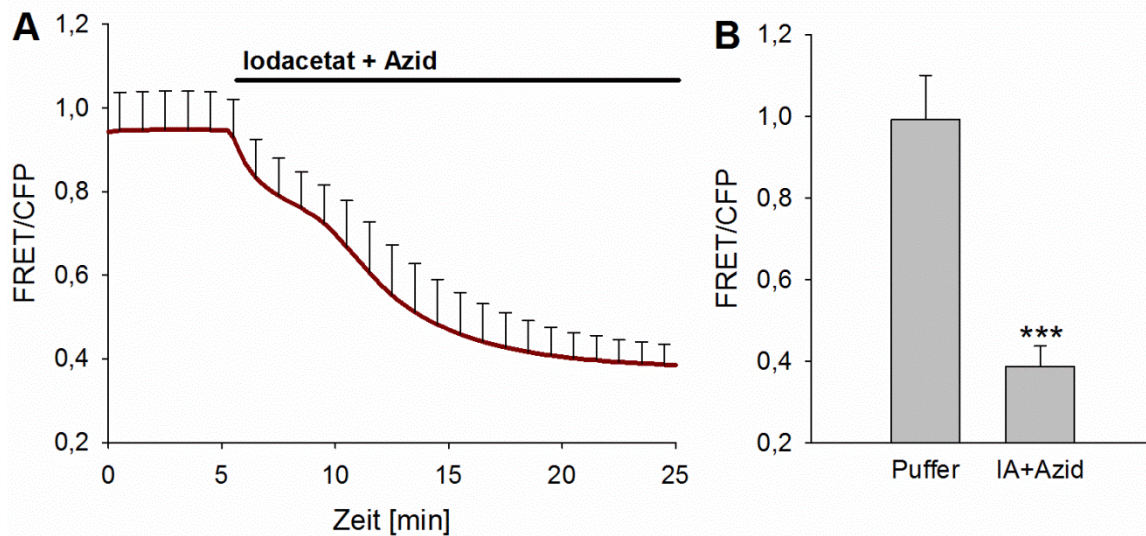
einer größeren räumlichen Entfernung der Fluoreszenzproteine. Dadurch wird bei CFP-Anregung weniger Energie vom CFP auf das YFP übertragen, sodass das CFP stärker leuchtet während das YFP weniger angeregt wird (Imamura et al. 2009), d.h. der FRET-Effekt und somit das FRET-Signal nehmen ab. Der Abfall erfolgte zweiphasig, was auf die unterschiedlichen Wirkungszeiten von Iodacetat bzw. Natriumazid zurückzuführen sein könnte. Die beobachteten leichten Veränderungen des YFP-Signals entsprachen nicht den Erwartungen, da bei YFP-Anregung theoretisch von einem FRET-Effekt unabhängigen Signal des YFP auszugehen ist.



**Abb. 9: Die Hemmung der ATP Produktion in Astrozyten führt zu den erwarteten Änderungen des FRET-Signals. A:** zeitlicher Verlauf des Signals von 4 repräsentativen Zellen. Dargestellt sind die drei Kanäle CFP (blau), FRET (rot) und YFP (grün) über einen Zeitraum von 25 min. Nach 5 min wurden Natriumazid (10 mM) und Iodacetat (1 mM) appliziert, um Atmungskette und Glykolyse zu hemmen. Wird die ATP-Synthese der Zellen gehemmt, so sinkt das FRET-Signal während das CFP-Signal ansteigt. Aus Übersichtsgründen wurde hier jeweils auf den ersten Wert normiert. Die Pfeile zeigen die Zeitpunkte der Bilder in (B) an. **B** Mikroskopische Bilder der Astrozyten aus demselben Experiment zum Zeitpunkt 5 min und 15 min wie angegeben. Der Abfall des FRET-Signals zwischen der 5. und 15. Minute ist deutlich zu erkennen; ebenso die Zunahme des CFP-Signals. Der Maßbalken entspricht 100  $\mu$ m.

Die beobachtete absolute Fluoreszenz in den einzelnen Kanälen hängt zum einen von der ATP Konzentration ab, darüber hinaus wird sie jedoch auch von anderen Parametern wie z.B. dem Expressionsniveau des Sensors beeinflusst. Als Messparameter für die intrazelluläre ATP-Konzentration wird im Folgenden das

FRET/CFP Verhältnis verwendet, da dieses eine ratiometrische Analyse unabhängig von Expressionslevel und anderen Einflussfaktoren ermöglicht (Abb. 10).

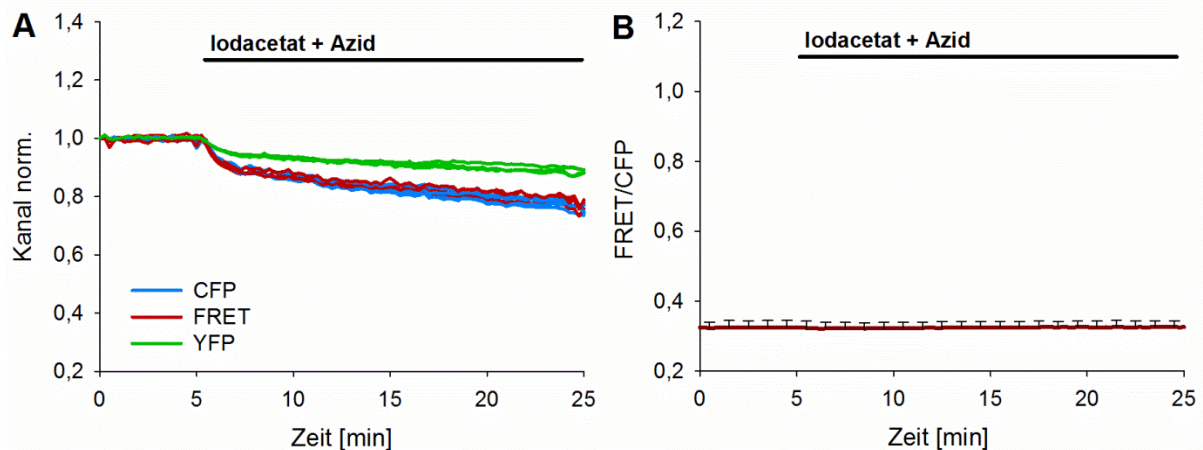


**Abb. 10: Das FRET/CFP-Verhältnis als Maß für den ATP-Gehalt von Astrozyten.** Dargestellt sind zusammengefasste Daten aller Experimente (n=69 Zellen aus 19 unabhängigen Experimenten). **A:** Das FRET/CFP-Verhältnis in Astrozyten, die ATeam exprimieren, wurde über einen Zeitraum von 25 min beobachtet. Zum Zeitpunkt 5 min wurden 10 mM Azid und 1 mM Iodacetat appliziert. **B:** FRET/CFP-Verhältnisse unter Kontrollbedingungen sowie nach Applikation von Iodacetat und Azid. \*\*\*:  $p < 0,001$  im Vergleich zum Puffer.

Die Hemmung der ATP-Synthese wurde zum Ende jedes Experimentes wiederholt, woraus sich insgesamt als Endwert ein FRET/CFP-Verhältnis von  $0,39 \pm 0,05$  ergab (Abb. 10 zum Zeitpunkt 25 min; n=69 Zellen aus 19 unabhängigen Experimenten). Dieses FRET/CFP-Verhältnis repräsentiert daher annähernd die Fluoreszenz des Sensors in Abwesenheit von ATP (keines der Sensormoleküle hat ATP gebunden).

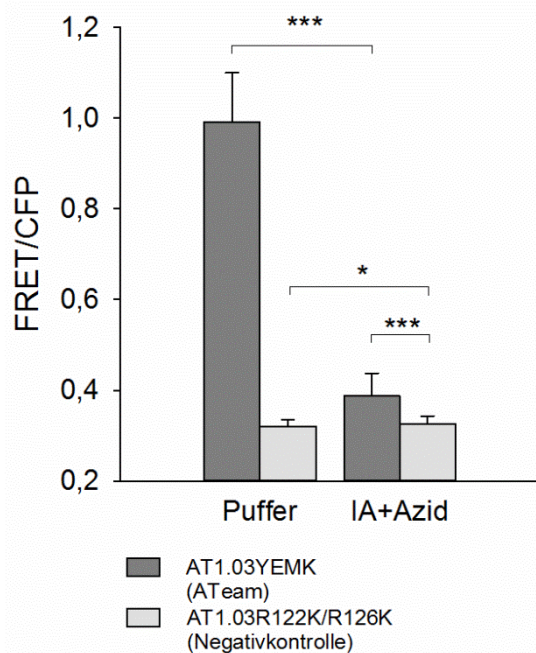
#### 4.1.2.2 Kontrolle mittels mutantern Sensor

Um die Spezifität des Signals für den ATP-Gehalt der Zelle weiter zu überprüfen, wurden die Experimente mit dem mutanten Sensor AT1.03<sup>R122K/R126K</sup> des ATeam-Sensors AT1.03YEMK wiederholt. Diese Mutante bindet auf Grund eines Aminosäureaustausches im aktiven Zentrum kein ATP (Imamura et al. 2009).



**Abb. 11 Kontrolleexperimente mit dem mutanten, ATP-bindungsdefizienten Sensor AT1.03<sup>R122K/R126K</sup>.** **A:** Die drei Kanäle CFP (blau), FRET (rot) und YFP (grün) wurden unter analogen Bedingungen zu 4.1.2.1 aufgenommen. Die Veränderungen im CFP- und FRET-Kanal sind geringer und verlaufen konkordant. Aus Übersichtsgründen wurde hier jeweils auf den ersten Wert normiert. **B:** Darstellung als FRET/CFP-Verhältnis. Hierbei werden ATP-unabhängige Signalveränderungen nicht berücksichtigt. Der mutante Sensor zeigt keine ATP-abhängigen Veränderungen. Die Daten stammen aus allen Kontrolleexperimenten, die mit AT1.03<sup>R122K/R126K</sup> durchgeführt wurden (n=55 Zellen aus 14 unabhängigen Experimenten).

Zwar sind für die einzelnen Kanäle (CFP, FRET, YFP) Signaländerungen bei der Zugabe von Iodacetat und Natriumazid zu erkennen (Abb. 11A), jedoch sind diese Änderungen weitaus geringer als bei Verwendung des nicht mutierten ATeam-Sensors (Abb. 9A). Zudem verlaufen das CFP- und FRET-Signal im Gegensatz zu Abb. 9A gleichsinnig, sodass sich das FRET/CFP-Verhältnis verglichen mit dem des ATeam-Sensors nicht wesentlich ändert (Abb. 11B, Abb. 12). Dies lässt vermuten, dass die Signaländerung in den einzelnen Kanälen auf ATP-unabhängige Prozesse wie z.B. pH-Änderungen zurückzuführen ist. Weiterhin ist zu erkennen, dass das FRET/CFP-Verhältnis von ATeam unter Hemmung der ATP-Synthese dem des ATP-bindungsdefizienten Sensors ähnelt (Abb. 12), was vermuten lässt, dass dieses Signal dem eines unbesetzten Sensors entspricht. Der dennoch statistisch signifikante Unterschied zwischen den beiden Sensoren ist vermutlich auf die hohe Anzahl und geringe Streuung der Daten zurückzuführen. Möglicherweise weist der mutante Sensor auch eine durch die Mutation bedingte leicht abgeänderte Konformation und somit ein geringfügig verändertes FRET/CFP-Verhältnis auf.



**Abb. 12 Vergleich des ATeam-Sensors mit dem mutanten, ATP-bindungsdefizienten Sensor unter Kontrollbedingungen sowie nach Applikation von Iodazetat und Azid.** Während der ATeam-Sensor einen starken Abfall des FRET/CFP Verhältnisses zeigt, ist bei der Negativkontrolle keine deutliche Veränderung zu erkennen. Die dennoch mathematisch statistisch signifikanten Unterschiede sind am ehesten auf die hohe Anzahl und geringe Streuung der Daten zurückzuführen (\*:  $p < 0,05$ , \*\*\*:  $p < 0,001$ ).

Die gezeigten Ergebnisse legen nahe, dass der ATeam-Sensor tatsächlich spezifisch den ATP-Gehalt der Astrozyten anzeigt und diese Messungen bei Analyse des FRET/CFP-Verhältnisses nicht durch andere Einflüsse wie z.B. pH-Veränderungen oder Expressionsgrad verfälscht werden.

## 4.2 ATP-Dynamik bei Stimulation mit Neurotransmittern

Vorangehend konnte gezeigt werden, dass ein starker Abfall der ATP-Konzentration in den Astrozyten sich im vorliegenden System sehr gut beobachten lässt. Jedoch sind solch starke Änderungen unter kompletter Inhibition der ATP Synthese rein experimentell und kommen *in vivo* zumindest unter physiologischen Bedingungen nicht vor. Daher wurden nun physiologische Substanzen wie die Neurotransmitter Glutamat und Dopamin sowie bekannte selektive Agonisten und Antagonisten der vermuteten beteiligten Transporter, Rezeptoren und Ionenpumpen eingesetzt (Tab. 6). Im Falle von beobachtbaren Signaländerungen soll dies ermöglichen, Rückschlüsse auf die ATP-verbrauchenden Prozesse zu ziehen.

Tab. 6 Übersicht der verwendeten Substanzen und deren Wirkungsweise

Substanz	Wirkung
Glutamat	Agonist an metabotropen und ionotropen Glutamatrezeptoren Transport in die Zelle über Glutamattransporter
Dopamin	Agonist an metabotropen Dopaminrezeptoren Transport in die Zelle über Monoamintransporter
AMPA	Agonist am ionotropen AMPA-Rezeptor
D-Aspartat	Agonist am ionotropen NMDA-Rezeptor Transport in die Zelle über Glutamattransporter
TBOA	kompetitiver, nicht transportabler Blocker für Glutamattransporter
Ouabain	Hemmung der Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPase

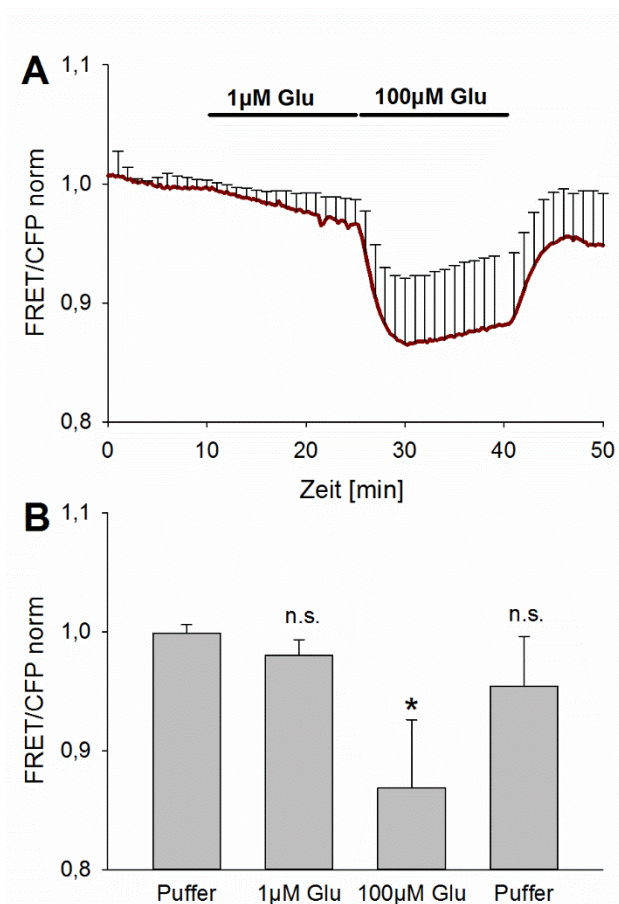
Für die Darstellung der Messergebnisse wurde, wie bereits unter 4.1.2.1 erläutert, lediglich das Verhältnis aus FRET- und CFP-Signal gewählt. Um den Verlauf aller Zellen ohne Berücksichtigung kleiner Differenzen in den Startwerten besser vergleichen zu können, wurde auf den Mittelwert der ersten 10 min normiert. Auch wurde aus Übersichtlichkeitsgründen auf die Darstellung der letzten 20 min (starker ATP-Abfall durch Zugabe von Iodacetat und Natriumazid) verzichtet.

Alle Experimente wurden ebenfalls mit dem mutierten, ATP-bindungsdefizienten Sensor durchgeführt. Dabei wurden in keinem Experiment signifikante Änderungen des FRET/CFP-Verhältnisses beobachtet (Daten nicht gezeigt).

#### 4.2.1 Wirkung der Neurotransmitter Glutamat und Dopamin

Glutamat besitzt eine zentrale Rolle in der Neurotransmission und ist in zahlreiche, teilweise energieabhängige, Stoffwechselprozesse des ZNS involviert (s. 1.2.3-1.2.5). Es wurde postuliert, dass Glutamat über die Aktivierung der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase einen Abfall des intrazellulären ATP in Astrozyten hervorruft (Magistretti und Chatton 2005). Daher sollte überprüft werden, ob Astrozyten unter Stimulation mit Glutamat Änderungen in ihrem ATP-Haushalt zeigen, welche mit dem vorliegenden System messbar sind.

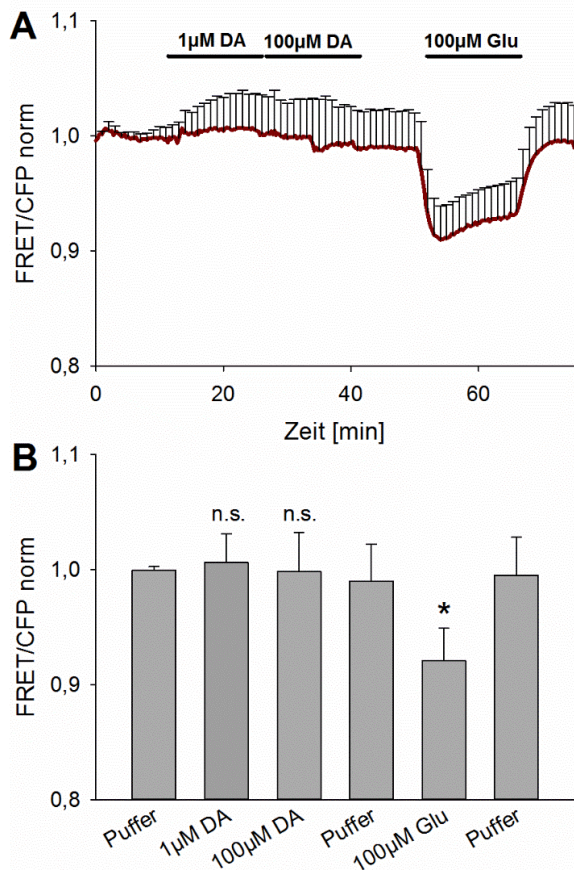
Astrozyten wurden für jeweils 15 min zunächst mit einer niedrig (1  $\mu\text{M}$ ) und anschließend einer höher (100  $\mu\text{M}$ ) konzentrierten Glutamatlösung inkubiert. Bei der Zugabe von 1  $\mu\text{M}$  Glutamatlösung ist ein leichter kontinuierlicher Abfall des FRET/CFP-Verhältnisses (also des ATPs) zu erkennen, welcher jedoch nicht statistisch signifikant ist (Abb. 13). Mit dem Wechsel auf 100  $\mu\text{M}$  kommt es zu einem schnellen Abfall des FRET/CFP-Signals um  $13 \pm 6\%$ , gefolgt von einer Plateauphase. Anschließend erfolgt unter glutamatfreiem Puffer eine Annäherung an das Ausgangsniveau, welches jedoch innerhalb der gegebenen Zeit nicht vollständig erreicht wird. Glutamat bewirkt also einen sofortigen, konzentrationsabhängigen und reversiblen Abfall der ATP-Konzentration, der mit Hilfe des ATeam-Sensors im Zellsystem der Astrozyten messbar ist (Abb. 13).



**Abb. 13 Glutamat induziert einen konzentrationsabhängigen und reversiblen Abfall des zytosolischen ATP in Astrozyten.** **A** zeigt den zeitlichen Verlauf des FRET/CFP Verhältnisses der ersten 50 min des Glutamatexperiments (n=12 Zellen aus 3 unabhängigen Experimenten). **B** Der Abfall bei Zugabe von 100  $\mu\text{M}$  Glutamat ist gegenüber dem Ausgangsniveau (Puffer) signifikant (\*:  $p < 0,05$ ).

Dopamin ist neben Glutamat ein weiterer wichtiger Neurotransmitter im ZNS und entfaltet seine Wirkung v.a. über metabotrope Dopaminrezeptoren. Das folgende Experiment dient dazu, das ATP-Level in Astrozyten bei Stimulation durch den Neurotransmitter Dopamin darzustellen.

Nach Zugabe von Dopamin traten keine signifikanten Veränderungen des ATP in den kultivierten Astrozyten auf (Abb. 14). Die Stimulation metabotroper Dopaminrezeptoren sowie die Aufnahme von Dopamin scheinen daher keine messbaren ATP-Änderungen in Astrozyten hervorzurufen.



**Abb. 14 Dopamin bewirkt keine messbaren Änderungen der ATP-Konzentration in Astrozyten.** **A** zeigt den zeitlichen Verlauf des FRET/CFP Verhältnisses der ersten 75 min des Dopamin-Experiments (n=10 Zellen aus 3 unabhängigen Experimenten). **B** Bei der Zugabe von 1 μM bzw. 100 μM Dopamin zeigen sich keine signifikanten Änderungen. Hingegen ist der Abfall bei Zugabe von Glutamat gegenüber dem Ausgangsniveau (Puffer) signifikant (\*: p<0,05).

Für den unter Glutamat beobachteten ATP-Abfall kommen unterschiedliche metabolische Prozesse in Betracht.

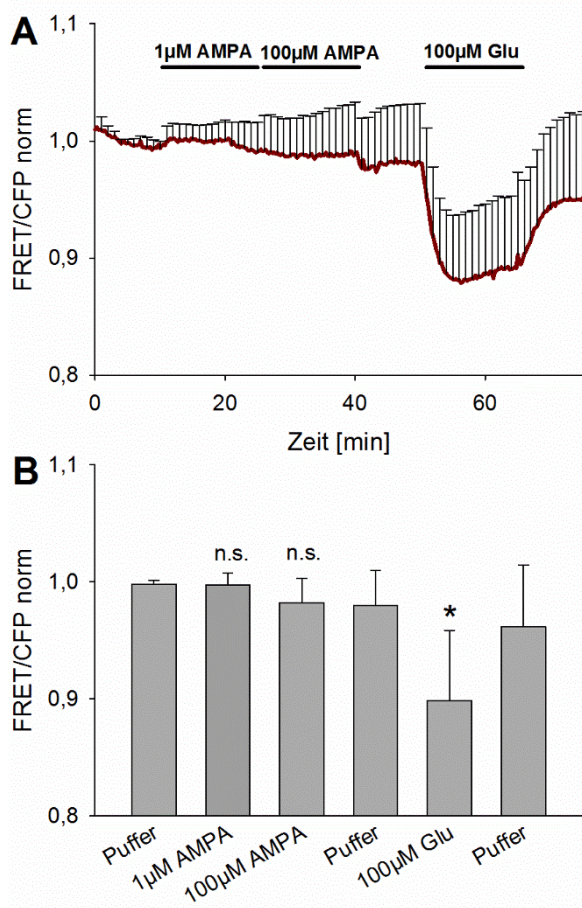
- (i) Glutamattransport in die Zelle, Kotransport mit  $\text{Na}^+$  →  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase muss unter Energieverbrauch Ionengradienten wiederherstellen
- (ii) Glutamattransport in die Zelle → Verstoffwechslung von Glutamat zu Glutamin durch Glutaminsynthetase unter ATP-Verbrauch
- (iii) Energieverbrauch im Anschluss an Aktivierung ionotroper oder metabotroper Rezeptoren

Ausgehend von diesen Möglichkeiten wurden die folgenden Experimente durchgeführt, um Rückschlüsse auf den am ehesten energieverbrauchenden Schritt ziehen zu können.

## 4.2.2 Beteiligung der Rezeptoren

Zur Beurteilung des Einflusses von Glutamaterezeptoren auf den ATP-Gehalt von Astrozyten wurde  *$\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid* (AMPA) als spezifischer Agonist für den auf kultivierten Astrozyten vorkommenden ionotropen AMPA-Glutamaterezeptor in unterschiedlichen Konzentrationen angewendet. Hiermit können Effekte auf den ATP-Spiegel beobachtet werden, welche durch den Einstrom von Ionen, insbesondere  $\text{Na}^+$  und  $\text{Ca}^{2+}$ , bei Aktivierung des Rezeptors entstehen.

Es zeigten sich bei der Stimulierung der Astrozyten mit AMPA keine signifikanten Signaländerungen (Abb. 15). Daher ist davon auszugehen, dass die Aktivierung der ionotropen AMPA-Rezeptoren nicht zu einer starken Änderung des ATP-Gehalts in Astrozyten führt.



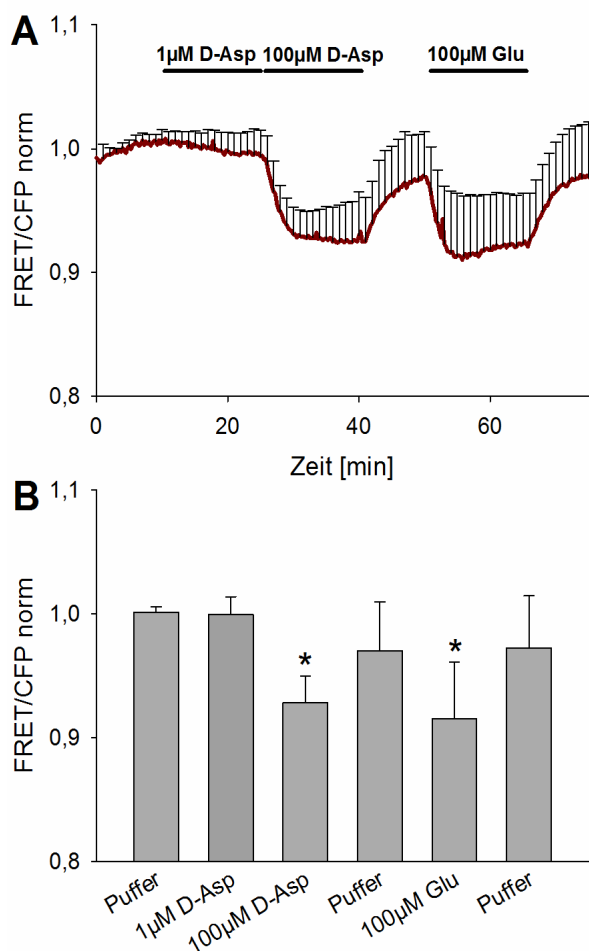
**Abb. 15 Die Aktivierung von AMPA-Rezeptoren führt nicht zu einem Abfall des ATP in Astrozyten.** **A** zeigt den zeitlichen Verlauf des FRET/CFP Verhältnisses der ersten 75 min des AMPA-Experiments (n=11 Zellen aus 3 unabhängigen Experimenten). **B**: Bei der Zugabe von 1  $\mu\text{M}$  bzw. 100  $\mu\text{M}$  AMPA zeigen sich keine signifikanten Änderungen. Der Abfall bei Zugabe von Glutamat ist jedoch gegenüber dem Ausgangsniveau (Puffer) signifikant (\*:  $p < 0,05$ ).



### 4.2.3 Beteiligung der Glutamattransporter

Um die Effekte der Glutamattransporter auf den ATP-Spiegel zu beurteilen, wurden D-Aspartat als Transporteragonist sowie TBOA als Blocker der Glutamattransporter in Kombination mit Glutamat eingesetzt.

D-Aspartat wird ebenso wie Glutamat über Glutamat/Na<sup>+</sup> Symporter in Astrozyten aufgenommen, jedoch nicht in der Zelle verstoffwechselt. Außerdem wirkt es agonistisch an NMDA-Rezeptoren, welche jedoch in kultivierten Astrozyten nicht nachgewiesen werden konnten (Verkhatsky und Steinhäuser 2000). Somit werden vorrangig transporter-vermittelte Effekte dargestellt. Unter D-Aspartat Stimulation kommt es ebenso wie unter Glutamat bei Zugabe von 1  $\mu$ M D-Aspartat zu einem leichten kontinuierlichen Abfall des FRET/CFP-Signals und anschließend bei 100  $\mu$ M D-Aspartat zu einem starken Abfall des Signals um  $6 \pm 1$  % mit Bildung einer Plateauphase. Der Abfall des FRET/CFP-Verhältnisses, welcher dem Abfall des relativen ATP-Gehalts entspricht, ist bei Zugabe von 100  $\mu$ M D-Aspartat bzw. Glutamat erneut signifikant gegenüber dem Ausgangsniveau (Abb. 16).



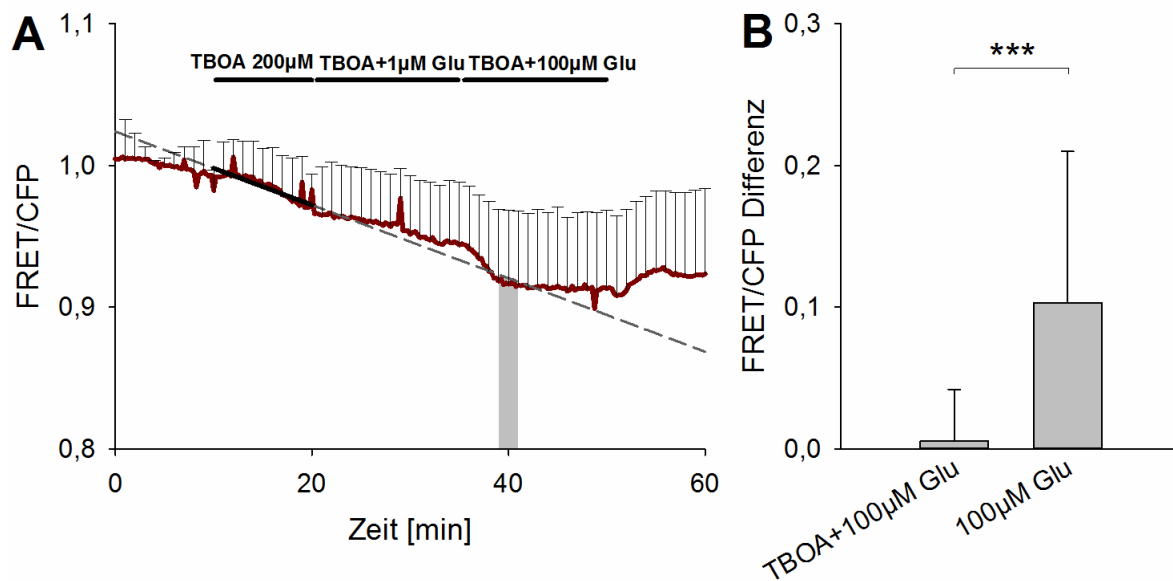
**Abb. 16** Der relative ATP-Gehalt zeigt unter Stimulation mit D-Aspartat einen ähnlichen Abfall wie unter Glutamat. **A** zeigt den zeitlichen Verlauf des FRET/CFP Verhältnisses der ersten 75 min des D-Aspartat-Experiments (n=12 Zellen aus 3 unabhängigen Experimenten). **B**: Der Abfall des ATP-Sensorsignals bei Zugabe von 100  $\mu$ M D-Aspartat bzw. Glutamat ist gegenüber dem Ausgangsniveau (Puffer) signifikant (\*: p<0,05).

*Threo-β-Benzyloxyaspartic acid* (TBOA) ist ein kompetitiver, nicht transportabler Blocker für Glutamattransporter (EAAT 1-5) und zeichnet sich dabei durch hohe Selektivität aus, d.h. er besitzt keine Wirkung auf Glutamatrezeptoren. Somit ist das folgende Experimentdesign ebenfalls dazu geeignet, die Rolle des Glutamattransporters beim Glutamat vermittelten ATP-Abfall zu demonstrieren.

TBOA wurde im Anschluss an den Puffer für 10 min einzeln appliziert, um eventuelle rein TBOA-bedingte Änderungen zu erkennen. Anschließend wurde wie bei 4.2.1 für jeweils 15 min 1  $\mu\text{M}$  bzw. 100  $\mu\text{M}$  Glutamatlösung gemeinsam mit TBOA angewendet, wobei wie erwartet ein geringerer Abfall des Signals zu beobachten war (Abb. 17).

Bei der Auswertung des Experiments ergab sich die Schwierigkeit, dass bereits bei alleiniger Zugabe von TBOA ein Abfall des Signals zu beobachten war. Um dennoch den Abfall unter Zugabe von 100  $\mu\text{M}$  Glutamat bei Blockade der Transporter mit TBOA zuverlässig mit dem Abfall bei 100  $\mu\text{M}$  Glutamat ohne Transporterblockade zu vergleichen, wurde die Auswertung wie folgt ergänzt: Durch die TBOA-Phase (Minute 10-20) wurde eine Regressionsgerade gelegt und auf den gesamten Zeitraum verlängert (Abb. 17A). Nach Zugabe von TBOA und 100  $\mu\text{M}$  Glutamat wurde in einem zweiminütigen Abschnitt (Minute 39-41) die Differenz zwischen dieser Geraden und dem FRET/CFP Signal der Zellen gebildet. Ebenso wurde für den Abfall des Signals unter alleiniger Zugabe von 100  $\mu\text{M}$  Glutamat mit Daten aus dem Glutamatexperiment verfahren. Hierbei wurde eine Regressionslinie durch die ersten 10 min (Puffer) zur Bildung der Differenzen herangezogen (nicht dargestellt). Alle Berechnungen wurden ausgehend von den Einzeldaten durchgeführt. Die Differenzen entsprechen dem Abfall des Signals vom Ausgangsniveau bei Zugabe von 100  $\mu\text{M}$  Glutamat.

Zwar ist unter der Zugabe von TBOA+100  $\mu\text{M}$  ein leichter Abfall des Signals zu erkennen, jedoch fällt dieser deutlich geringer aus als ohne TBOA (Abb. 17B). Dieser Unterschied ist statistisch signifikant ( $p < 0,001$ ), d.h. die Blockade der Transporter durch TBOA verhindert nahezu den Abfall der ATP-Konzentration bei Zugabe von 100  $\mu\text{M}$  Glutamat



**Abb. 17 Bei Blockade der Glutamattransporter zeigt sich ein signifikant geringerer ATP-Abfall.**

**A** zeigt den zeitlichen Verlauf des FRET/CFP Verhältnisses der ersten 60 min des TBOA-Experiments ( $n=14$  Zellen aus 4 unabhängigen Experimenten). Zusätzlich wurde für jede Zelle eine Regressionsgerade durch die TBOA-Phase gelegt, da sich hier bereits Veränderungen zeigten. Dargestellt ist der Mittelwert aller Regressionsgeraden. Ausgehend von dieser Geraden wurde die Differenz zur Kurve bei Zugabe von 100  $\mu$ M Glutamat (weiterhin unter Blockade mit TBOA) über 2 min (Minute 39-41, grauer Balken) für jede Zelle berechnet. Ebenso wurde für einen Abschnitt des Glutamatexperiments bei Stimulation mit 100  $\mu$ M Glutamat (Minute 29-31) verfahren, ausgehend von einer Regressionslinie durch die ersten 10 min des Experiments (nicht dargestellt). In **B** sind die Differenzen des FRET/CFP-Verhältnisses zur Regressionsgeraden (entspricht dem Abfall des Signals vom Ausgangsniveau) mit Standardabweichung dargestellt. Bei Blockade der Glutamatrezeptoren zeigt sich unter Zugabe von 100  $\mu$ M Glutamat nur eine geringe Abweichung, während die Differenz bei alleiniger Zugabe von 100  $\mu$ M Glutamat signifikant höher ist (\*\*\*:  $p < 0,001$ ).

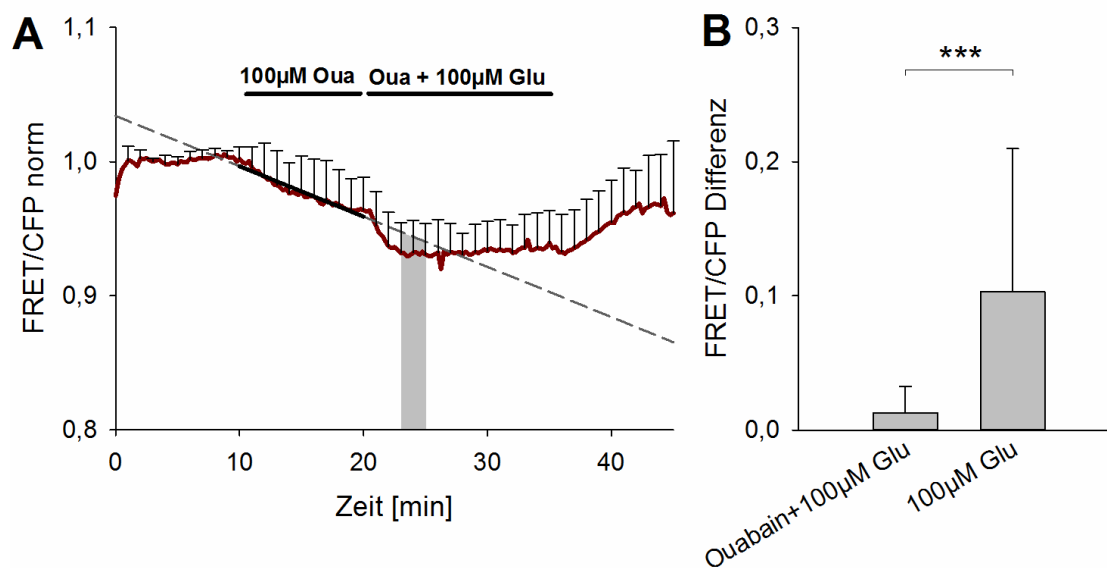
#### 4.2.4 Die Rolle der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase

Die Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase spielt eine zentrale Rolle in der Aufrechterhaltung der Ionenkonzentrationen jeder Körperzelle und legt somit die Grundlage für einen funktionierenden Stoffwechsel und Energiegewinn der Zellen. Gleichzeitig verbraucht sie jedoch auch ATP für den Transport der Ionen gegen den Konzentrationsgradienten. Das folgende Experimentdesign ermöglichte, den relativen ATP-Gehalt der Zellen bei Blockade der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase durch Ouabain zu beobachten.

Des Weiteren beruhte eine These des ATP-Abfalls unter Glutamatstimulation auf dem gesteigerten Umsatz der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase in Folge des erhöhten Na<sup>+</sup>-Einstroms in die Zelle durch den Kotransport mit Glutamat. Daher sollte ebenfalls der Abfall des FRET/CFP-Verhältnisses vom Ausgangsniveau bei Blockade der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase durch Ouabain und Zugabe von 100 µM Glutamat mit dem Abfall ohne Blockade verglichen werden. Hierfür erfolgte die Auswertung analog zum TBOA-Experiment mit Hilfe einer Regressionsgeraden durch die Ouabain-Phase, welche das Ausgangsniveau für die Berechnung des ATP-Abfalls darstellte.

Da sich bereits bei alleiniger Zugabe von Ouabain eine starke Änderung des Signals zeigte und die Zugabe von 1 µM Glutamat in den vorangehenden Experimenten nur zu sehr geringen Änderungen führte, wurde auf diese Phase im vorliegenden Experiment verzichtet.

Bereits bei alleiniger Zugabe von Ouabain erfolgt ein sofortiger Abfall des FRET/CFP-Verhältnisses, d.h. die Blockade der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, welche einen Großteil des ATP in Astrozyten verbraucht, führt wider Erwarten zu einem Abfall des ATP-Gehalts. Weiterhin ist zu erkennen, dass dieser bei Zugabe von 100 µM Glutamat zunächst etwas steiler abfällt, um anschließend zu stagnieren (Abb. 18A). Dieser Abfall ist jedoch, gemessen an der Ouabain-Phase als Ausgangsniveau, deutlich geringer als ohne Blockade der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase (Abb. 18B). Bei dem Wechsel auf Ouabain-freien Puffer erholt sich das Signal deutlich langsamer als bei den vorangehenden Experimenten.



**Abb. 18 Die Hemmung der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase bewirkt einen ATP-Abfall und verringert den glutamatbedingten ATP-Abfall. A** zeigt den zeitlichen Verlauf des FRET/CFP Verhältnisses der ersten 45 min des Ouabain-Experiments (n=10 Zellen aus 3 unabhängigen Experimenten). Zusätzlich wurde für jede Zelle analog zum TBOA-Experiment eine Regressionsgerade durch die Ouabain-Phase gelegt. Dargestellt ist der Mittelwert aller Regressionsgraden. Ausgehend von dieser Geraden wurde die Differenz zur Kurve bei Zugabe von 100 μM Glutamat (weiterhin unter Anwesenheit von Ouabain) über 2 min (Minute 23-25, grauer Balken) für jede Zelle einzeln berechnet. Ebenso wurde für einen Abschnitt des Glutamatexperiments bei Stimulation mit 100 μM Glutamat (Minute 29-31) verfahren, ausgehend von einer Regressionslinie durch die ersten 10 min des Experiments (nicht dargestellt). In **B** sind die Differenzen des FRET/CFP-Verhältnisses zur Regressionsgeraden (entspricht dem Abfall des Signals vom Ausgangsniveau) mit Standardabweichung dargestellt. Bei Blockade der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase zeigt sich unter Zugabe von 100 μM Glutamat eine geringere Abweichung, während die Differenz bei alleiniger Zugabe von 100 μM Glutamat signifikant höher ist (\*\*\*: p<0,001).

## 5 Diskussion

Die zelltypspezifische Analyse metabolischer Prozesse ist eine wichtige Voraussetzung zum besseren Verständnis physiologischer und pathologischer Prozesse in Astrozyten. ATP nimmt dabei als unentbehrlicher Energieträger sowie als intra- und interzellulärer Botenstoff eine besondere Rolle ein. In der vorliegenden Arbeit wurde mit dem FRET-basierten Sensor ATeam, welcher eine Messung der zytosolischen ATP-Konzentration in Echtzeit erlaubt, die Auswirkung der Stimulation mit den Neurotransmittern Glutamat und Dopamin auf den ATP-Gehalt von Astrozyten beobachtet.

### 5.1 Etablierung der ATP-Messung mit ATeam in kultivierten Astrozyten

Um eine zellspezifische Untersuchung ohne Einflüsse anderer Zelltypen zu ermöglichen, wurden Astroglia-reiche Primärkulturen (APK) verwendet. Die Gewinnung dieser Kulturen war bereits vor dieser Studie in der Arbeitsgruppe etabliert und durch GFAP-Immunfärbung konnte erneut ein Anteil von >90 % Astrozyten nachgewiesen werden. Zur ATP-Messung wurden die gewonnenen APKs mit dem Sensor „ATeam1.03<sup>YEMK</sup>“, einem FRET-basierten Sensor für ATP, transfiziert (Imamura et al. 2009). Fast alle der mit ATeam transfizierten Zellen waren auch GFAP-positiv, sodass sich dieses Modellsystem eignete, Astrozyten-spezifische Messungen mit dem ATeam-Sensor durchzuführen.

Anschließend wurde geprüft, ob Veränderungen des FRET/CFP-Verhältnisses als Maß für den ATP-Gehalt tatsächlich spezifisch auf Änderungen des ATPs der Zellen zurückzuführen sind. Dazu erfolgte zunächst eine Hemmung von Glykolyse und Atmungskette, wodurch ein deutlicher Abfall der ATP-Konzentration anzunehmen ist. Wie erwartet konnte dabei ein starker Abfall des FRET/CFP-Verhältnisses gemessen werden. Vergleichbare Beobachtungen wurden für den ATeam-Sensor in HeLa Zellkulturen beschrieben (Imamura et al. 2009). Hier wird zudem eine partielle Erholung des ATP-Spiegels beobachtet, welche vermutlich eine zelluläre Antwort auf den starken ATP-Abfall darstellt. Dieser erneute Anstieg konnte in Astrozyten nicht beobachtet werden, wofür diverse Unterschiede im Experimentaufbau verantwortlich sein können. Zunächst handelt es sich bei HeLa-

Zellen um eine onkogene Zellreihe, welche vorwiegend Glykolyse zur Energiegewinnung verwendet, während in Astrozyten die ATP-Gewinnung mittels Atmungskette ebenfalls eine große Rolle spielt (San Martín et al. 2013). Des Weiteren kann aufgrund der unterschiedlichen Wirkweise der verwendeten Hemmstoffe (2DG hemmt die Glykolyse reversibel während die Applikation von Iodacetat durch eine kovalente Alkylierung der GAPDH zu einer irreversiblen Hemmung führt) eine mögliche, teilweise Kompensation unterschiedlich ausgeprägt sein. Ebenso ist nicht auszuschließen, dass das Phänomen auf Grund der kürzeren Messzeit nicht beobachtet wurde (die eigene Messung beträgt 25 min, der Anstieg wurde bei Imamura ab ca. 18 min beobachtet).

Parameter wie pH-Veränderungen, Konformationsänderungen eines FP's durch direkte Ligandenbindung oder der Expressionsgrad des Sensors sind Faktoren, welche neben dem gewünschten FRET-Effekt die absolute Fluoreszenz des Sensors in den einzelnen Kanälen beeinflussen können. Durch die Bildung des FRET/CFP-Verhältnisses konnte das beobachtete Signal (weitestgehend) für diese Störfaktoren korrigiert werden. Dies wird anhand der Kontrollexperimente mit dem mutanten, ATP-bindungsdefizienten Sensor deutlich. Hier zeigen sich unter allen in dieser Arbeit untersuchten Bedingungen Veränderungen der absoluten Fluoreszenz, jedoch keine Änderung des FRET/CFP-Verhältnisses. Daher kann davon ausgegangen werden, dass das im vorliegenden System gemessene FRET/CFP-Verhältnis den relativen ATP-Gehalt der Astrozyten anzeigt und nicht durch pH-Veränderungen oder Expressionsgrad verfälscht wird. Auch vorhergehende Arbeiten zeigten, dass das FRET/CFP-Verhältnis des Sensors im physiologischen pH-Bereich nahezu unveränderlich ist, sodass eine Beeinflussung des Signals durch geringe pH-Fluktuationen unwahrscheinlich ist (Imamura et al. 2009; Surin et al. 2013). Für das tatsächliche Auftreten eines FRET-Effekts spricht außerdem der gegensätzliche Verlauf von CFP- und FRET-Signal bei Veränderungen der ATP-Konzentration, während z.B. bei pH-Veränderungen beide Signale (wie bei der Negativkontrolle) gleichsinnig verlaufen.

Bei direkter Anregung und Messung von YFP spielt der FRET-Effekt theoretisch keine Rolle, sodass hierbei ein konstantes Signal zu erwarten wäre. Es wurden jedoch leichte Veränderungen beobachtet, für welche verschiedene Ursachen in Betracht kommen. Es ist bekannt, dass YFP im physiologischen Bereich

pH-bedingte Fluoreszenzänderungen zeigt, welche jedoch durch Bildung des Verhältnisses korrigiert werden können (Nagai et al. 2004; Zhao et al. 2011). Auch ist YFP konformationssensitiv, sodass die Bindung von ATP möglicherweise zu direkten Änderungen der YFP-Fluoreszenz führt. Ein direkter Einfluss von ATP auf die Fluoreszenz der FPs, wie er z.B. für CFP beschrieben wurde (Borst et al. 2010), wird jedoch (falls vorhanden) ebenfalls durch die Bildung des Verhältnisses korrigiert (Liemburg-Apers et al. 2011). Des Weiteren kann sog. „*spectral bleed-through*“ (SBT) zu den beobachteten Veränderungen im YFP-Signal beitragen (Hou et al. 2011). Hierbei entstehen auf Grund der sich überschneidenden Anregungs- und Emissionsspektren folgende Artefakte: (i) bei direkter YFP-Anregung kommt es ebenfalls zu geringer CFP-Anregung, dessen Emission teilweise im YFP-Emissionsspektrum miterfasst wird; (ii) ebenfalls tritt durch die CFP-Anregung ein geringer FRET-Effekt auf, welcher das YFP-Signal beeinflusst. Auch das FRET-Signal wird durch SBT beeinflusst: (i) aufgrund des breiten Emissionsspektrums von CFP wird ebenfalls CFP-Emission im FRET-Kanal miterfasst; (ii) bei der Anregung von CFP erfolgt auch eine geringe direkte YFP-Anregung. Die Korrektur des SBT erfordert umfangreiche zusätzliche Messungen und wird im Allgemeinen nicht durchgeführt, da die Verwendung des FRET/CFP-Verhältnis i.d.R. eine ausreichend genaue Methode darstellt (Imamura et al. 2009; Frommer et al. 2009; Bermejo et al. 2010).

Während geringe Artefakte der Signale nicht vollständig ausgeschlossen werden können, kann auf Grund der Beobachtungen sowie der Negativkontrolle dennoch davon ausgegangen werden, dass bei Betrachtung des FRET/CFP-Verhältnisses überwiegend ATP-Veränderungen dargestellt werden.

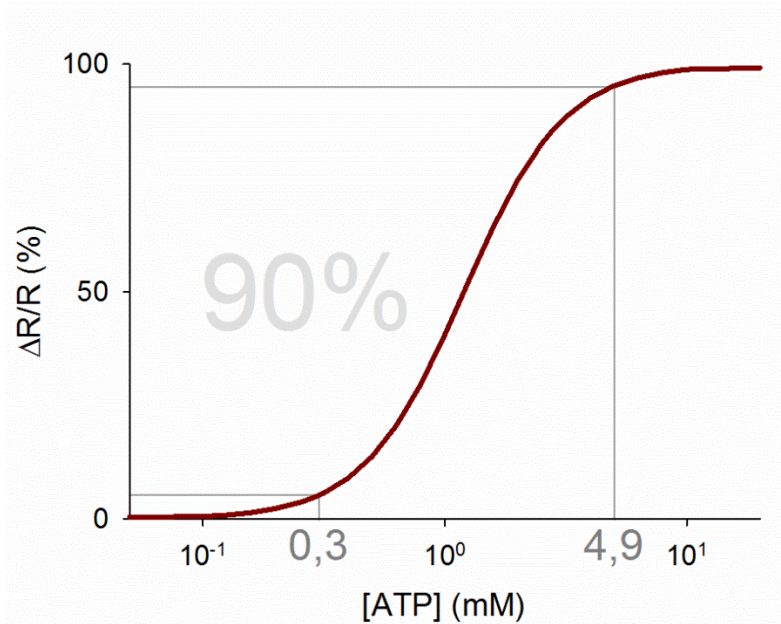
Die Verwendung des FRET/CFP-Verhältnisses erlaubt eine quantitative Messung des FRET-Effekts und einen Vergleich der relativen ATP-Konzentration innerhalb des gleichen Experimentsetups. Für die Umrechnung des Verhältnisses in absolute ATP-Konzentrationen ist jedoch eine Kalibrierung nötig, welche eine Permeabilisierung der Plasmamembran und Inkubation mit unterschiedlichen ATP-Konzentrationen erfordert (Liemburg-Apers et al. 2011). Dies konnte bisher nicht erfolgreich durchgeführt werden. Um den Bereich der absoluten ATP-Konzentration abzuschätzen, in dem der Sensor sinnvollerweise genutzt werden kann, wurde mit Hilfe der in Imamura et al. (2009) für den ATeam-Sensor AT1.03<sup>YEMK</sup> beschriebenen



Dissoziationskonstante ( $K_d=1,2$  mM) und des Hillkoeffizienten ( $n=2,1$ ) sowie der Hillischen Gleichung

$$\frac{\Delta R}{R} = \frac{R \times [ATP]^n}{[ATP]^n + K_d^n}$$

die theoretische, relative Änderung des Sensorsignals ( $\Delta R/R$ ) in Abhängigkeit von der ATP-Konzentration dargestellt (Abb. 19;  $\Delta R$  entspricht hierbei den experimentell beobachteten Änderungen des FRET/CFP-Verhältnisses). Hieraus ist zu entnehmen, dass 90 % des dynamischen Bereichs des Signals zwischen ATP-Konzentrationen von 0,3 mM und 4,9 mM liegen. Da in den vorliegenden Experimenten klare Signaländerungen gemessen werden konnten, ist anzunehmen, dass die absoluten ATP-Konzentrationen (mit Ausnahme der Hemmung von Glykolyse und Atmungskette) ebenfalls in diesem Bereich liegen. Dies steht auch im Einklang mit den in der Literatur angegebenen Daten zur intrazellulären ATP-Konzentrationen in Astrozyten, die mit 3 mM bis 7,5 mM im annähernd gleichen Bereich liegen (Silver und Erecinska 1997). Diese Werte wurden jedoch durch Zelllysierung erhoben und messen somit nicht nur freies zytosolisches ATP. Daher ist anzunehmen, dass sie eher zu hoch ausfallen und die reale Konzentration an freiem zytosolischem ATP, das durch den ATP-Sensor gemessen wird, niedriger und damit vollständig im Meßbereich des Sensors liegt. Dies spricht für eine grundsätzliche Eignung dieses Sensors für zytosolische ATP-Messungen in Astrozyten sowie die Möglichkeit einer Kalibrierung und Umrechnung in absolute ATP-Konzentrationen.



**Abb. 19** Theoretischer Verlauf des Sensorsignals in Abhängigkeit von der ATP-Konzentration. Dargestellt ist die Änderung des Sensorsignals  $\Delta R$  bezogen auf die maximale Änderung des Signals ( $R$ ). Die Darstellung erfolgte mit Hilfe der Hillschen Gleichung  $\frac{\Delta R}{R} = \frac{R \times [ATP]^n}{[ATP]^n + K_d^n}$  unter Verwendung der Dissoziationskonstante  $K_d = 1,2$  mM und des Hillkoeffizienten  $n = 2,1$  (Imamura et al. 2009). 90 % des dynamischen Bereichs von  $AT1.03^{YEMK}$  liegen bei ATP-Konzentrationen zwischen 0,3 mM und 4,9 mM.

## 5.2 Stimulation mit Glutamat und Einordnung der Effekte in die Physiologie des Gehirns

Glutamat erfüllt im Gehirn eine Vielzahl an Funktionen und nimmt damit eine zentrale Rolle bei physiologischen und pathologischen Vorgängen ein. Es fungiert als Neurotransmitter, Energiequelle und Substrat für die Synthese von Proteinen und anderen Substanzen wie Glutamin, GABA oder Glutathion (Danbolt 2001; Dringen und Hirrlinger 2003; McKenna 2007). In Bezug auf Astrozyten zeigten bisherige Studien u.a. Auswirkungen von Glutamat auf die intrazelluläre  $Ca^{2+}$ - und  $Na^+$ -Konzentration, die Glykolyseaktivität und die Ausschüttung von Laktat (Cornell-Bell et al. 1990; Pellerin und Magistretti 1994; Chatton et al. 2000; Bernardinelli et al. 2004; Bernardinelli et al. 2006). Eine Wirkung von Glutamat auf den ATP-Gehalt wurde bisher lediglich indirekt mit Hilfe von  $Mg^{2+}$ -sensitiven Färbungen untersucht (Magistretti und Chatton 2005). Allerdings bindet der verwendete Farbstoff Magnesium Green auch Calcium, so dass eine Beeinflussung des „ATP-Signals“ durch Calcium nicht ausgeschlossen werden kann (Li et al. 2003). Die direkte

Untersuchung mit ATeam dient der Überprüfung der Beobachtungen und soll durch Verwendung weiterer Substanzen zum besseren Verständnis der ablaufenden Signal- bzw. Stoffwechselwege beitragen.

Die vorliegenden Untersuchungen zeigen einen reversiblen, konzentrationsabhängigen Abfall des ATP-Gehalts in Astrozyten bei Stimulation mit Glutamat. Der Abfall des FRET/CFP-Signals beträgt bei 100  $\mu\text{M}$  Glutamat  $13 \pm 6 \%$  des Ausgangsniveaus.  $\text{Mg}^{2+}$ -basierte Untersuchungen zeigten unter 200  $\mu\text{M}$  Glutamat ebenfalls eine Verminderung der ATP-Konzentration, welche auf 1 mM (bei einer angenommenen Ausgangskonzentration von 6 mM ATP) geschätzt wurde (Magistretti und Chatton 2005). Folglich galt es einzugrenzen, durch welchen Prozess der ATP-Abfall bedingt ist. Dabei standen mögliche rezeptorvermittelte oder durch die Aufnahme von Glutamat bedingte Ursachen im Fokus. An (kultivierten) Astrozyten kann Glutamat über AMPA- oder Kainat-Rezeptoren wirken oder durch die Transporter GLAST und GLT-1 aufgenommen werden. Nach Aufnahme kann es unter ATP-Verbrauch zu Glutamin umgewandelt und erneut an die Neurone abgegeben werden oder über den Zitratzyklus in andere Stoffwechselprozesse einfließen (Verkhatsky und Steinhäuser 2000; Danbolt 2001; Bak et al. 2006).

Für die selektive Darstellung rezeptorvermittelter Effekte auf den ATP-Gehalt wurden Experimente mit dem Rezeptoragonisten AMPA durchgeführt. Hierbei waren keine signifikanten Veränderungen zu beobachten, sodass eine Beteiligung von AMPA-Rezeptoren am glutamatvermittelten ATP-Abfall sehr unwahrscheinlich ist.

Hingegen zeigte die Stimulation mit D-Aspartat, welches wie Glutamat über Glutamat/ $\text{Na}^+$  Symporter aufgenommen wird, vergleichbare Änderungen des relativen ATP-Gehalts. Auch konnte der glutamatbedingte ATP-Abfall durch Blockade der Glutamattransporter mit TBOA signifikant verringert werden. Diese Beobachtungen sind gut mit vorhergehenden Untersuchungen vereinbar, welche ebenfalls einen eingeschränkten ATP-Abfall unter TBOA zeigen (Magistretti und Chatton 2005). Die Ergebnisse sprechen für eine transportervermittelte Ursache des glutamatbedingten ATP-Abfalls.

Die Aufnahme von Glutamat durch Astrozyten kann theoretisch auf zwei bekannten Wegen zum ATP-Verbrauch führen: (1) Da die Aufnahme im Symport mit  $\text{Na}^+$  und Antiport mit  $\text{K}^+$  erfolgt, muss die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase im Anschluss unter Energieverbrauch den Ionengradienten wiederherstellen (Chatton et al. 2000; Rose

und Karus 2013); (2) die Umwandlung von Glutamat zu Glutamin durch die Glutaminsynthetase erfolgt unter ATP-Verbrauch (Martinez-Hernandez et al. 1977). Da der Effekt auch bei D-Aspartat auftritt, welches nicht zu Glutamin umgesetzt wird, ist letztere Möglichkeit unwahrscheinlich. Somit ist eine transportervermittelte Aktivitätssteigerung der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase am wahrscheinlichsten für den ATP-Abfall verantwortlich. Diese Möglichkeit ist mit anderen Studien gut vereinbar, welche eine am ehesten durch den begleitenden  $\text{Na}^+$  Einstrom bedingte Aktivitätserhöhung der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase bei Stimulation mit Glutamat zeigten (Pellerin und Magistretti 1997; Chatton et al. 2000; Rose und Karus 2013). Neben der Erhöhung der intrazellulären  $\text{Na}^+$ -Konzentration (und somit einer indirekten Kopplung) scheinen auch Kollokalisierungen und direkte Interaktionen zwischen der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, den Transporterproteinen GLAST und GLT-1, Enzymen des Glykolysestoffwechsels und den Mitochondrien eine Rolle zu spielen (Pellerin und Magistretti 1997; Rose et al. 2009; Genda et al. 2011; Bauer et al. 2012; Robinson und Jackson 2016). Diese dienen der lokalen Kopplung und Regulierung beteiligter Systeme: So werden durch den Glutamattransport sowohl die Glykolyse und Atmungskette stimuliert (was zur Bereitstellung von ATP für die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase führt), als auch die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase selbst, welche den notwendigen  $\text{Na}^+$ -Gradienten für den Glutamattransport aufrecht erhält (Bauer et al. 2012). Ebenso stimuliert Glutamat die Aufnahme von Glukose und führt zu einer erhöhten Ausschüttung von Laktat welches von Neuronen aufgenommen wird, sodass eine Anpassung von neuronaler Aktivität an die Nährstoffversorgung gewährleistet ist (Astrozyten-Neuronen-Laktatshuttle; Pellerin und Magistretti 1994; Pellerin et al. 1998; Loaiza et al. 2003). Somit ist der Glutamattransport nicht nur für die Beendigung der Signalübertragung, sondern ebenfalls für die Regulierung des Energiehaushalts essentiell (Robinson und Jackson 2016). Der ATP-Abfall ist daher primär als Effekt der gesteigerten Aktivität der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase auf Grund des Zusammenspiels von Glutamattransportern,  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, Enzymen der Glykolyse und den Mitochondrien bei erhöhtem Energiebedarf durch die Glutamataufnahme zu sehen.

Da die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase eine zentrale Rolle in der Vermittlung des beobachteten Effekts einzunehmen scheint, wurde Ouabain, ein Blocker der Ionenpumpe, angewendet. Es wurde zunächst der alleinige Effekt auf den ATP-Gehalt und anschließend der Effekt von Glutamat bei gleichzeitiger Blockade der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -

ATPase untersucht. Der zuvor beobachtete glutamatbedingte ATP-Abfall fiel bei Blockade wie erwartet signifikant geringer aus. Dies ist gut mit der Hypothese vereinbar, dass die Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase für den ATP-Verbrauch bei Glutamataufnahme verantwortlich ist. Magistretti und Chatton (2005) zeigten ebenfalls einen verminderten ATP-Verbrauch unter Glutamat und Ouabain, jedoch wurde der alleinige Effekt der Blockade der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase nicht untersucht. Hierbei konnte im vorliegenden Setting ein sofortiger kontinuierlicher Abfall des ATP-Gehalts beobachtet werden, welcher widersprüchlich erscheint: Die Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase verbraucht unter Ruhebedingungen 40-60 % des ATP in Astrozyten (Hevner et al. 1992; Chatton et al. 2000), sodass theoretisch bei ihrer Blockade ein – zumindest kurzfristiger – ATP-Anstieg zu erwarten wäre. Eine mögliche Ursache für den beobachteten Abfall könnten die bidirektionalen Interaktionen der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase mit Glutamattransportern, Enzymen der Glykolyse und der Atmungskette darstellen, welche z.B. bei Hemmung der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase durch Ouabain zur teilweisen Hemmung des Glutamattransportes führen (Robinson und Jackson 2016), sodass auch eine sofortige Reduktion der ATP-Produktion auf diesem Wege vermittelt werden könnte. Weiterhin kommt eine gedrosselte Aufnahme von Energie liefernden Metaboliten, welche auf den Na<sup>+</sup>-Gradienten angewiesen sind, in Betracht. Möglicherweise wird ein sehr kurzzeitiger ATP-Anstieg auf Grund der Zeitauflösung (alle 15 s) nicht miterfasst. Für die genaue Aufklärung dieser Diskrepanz sind jedoch weitere Experimente nötig.

Insgesamt demonstriert der beobachtete ATP-Abfall die enge Verknüpfung zwischen Glutamattransport und Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase-vermitteltem Energieverbrauch. Dies bestätigt vorhergehende Publikationen und verdeutlicht den großen Anteil der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase am Energiestatus in Astrozyten, welche Schätzungen zufolge ihre Aktivität in Anwesenheit physiologischer extrazellulärer Glutamatkonzentrationen mehr als verdoppelt (Magistretti und Chatton 2005). Ein entsprechend gesteigerter ATP-Verbrauch mit Auswirkungen auf den ATP-Gehalt ist zu erwarten. Bei der Applikation von 100 µM Glutamat kommt es weiterhin im Anschluss an den schnellen Abfall des ATP-Signals zur Etablierung eines niedrigeren ATP-Plateaus, welches darauf hindeutet, dass ein neues Gleichgewicht zwischen ATP-Verbrauch und -Produktion erreicht wurde. Da durch die anhaltende Glutamataufnahme weiterhin ein erhöhter ATP-Verbrauch besteht, muss somit die ATP-Produktion ebenfalls

beschleunigt werden, um eine konstante Konzentration zu erhalten. Hieran können folgende Mechanismen beteiligt sein: (i) Bei dem Verbrauch von ATP entsteht ADP, welches als Substrat für ATP bei erhöhter Verfügbarkeit zu schnellerer ATP-Synthese führen könnte. (ii) Glutamataufnahme führt sowohl zu einer erhöhten  $\text{Na}^+$ -Konzentration als auch zu einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg in Astrozyten (Chatton et al. 2000; Bernardinelli et al. 2006; Verkhratsky 2010). Diese Signale sind wahrscheinlich an der Anpassung des Energiemetabolismus und Steigerung der ATP-Produktion beteiligt (Wu et al. 2007; Chatton et al. 2016). (iii) Astrozytäre Fortsätze besitzen Mitochondrien, welche sich somit in direkter Nähe zur Glutamataufnahme befinden und wahrscheinlich zur lokalen ATP-Produktion beitragen (Bauer et al. 2012; Robinson und Jackson 2016). (iv) Es ist bekannt, dass Glutamat die Aufnahme von Glukose steigert und die Glykolyse anregt (Pellerin und Magistretti 1994; Loaiza et al. 2003). (v) Aufgenommenes Glutamat kann über den Zitratzyklus für die ATP-Produktion verwendet werden (McKenna 2007). (vi) Möglicherweise wirkt die erniedrigte ATP-Konzentration ihrerseits als intrazelluläres Signal oder regulierender Faktor und ist an der Kopplung zwischen Glutamataufnahme und gesteigerter Glukoseaufnahme bzw. Glykolyse zur Erfüllung des erhöhten Energiebedarfs beteiligt. All diese Mechanismen können potentiell zur gesteigerten ATP-Produktion während der Glutamataufnahme in Astrozyten beitragen, ihr genauer Beitrag zur Erhaltung des beobachteten Gleichgewichts bleibt jedoch weiteren Untersuchungen vorbehalten.

Eine Möglichkeit des ATP-Abfalls, auf die in dieser Arbeit nicht näher eingegangen wurde, ist die Ausschüttung von ATP. Vorhergehende Arbeiten identifizieren ATP als wichtigsten externen Messenger bei der Ausbreitung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Wellen und beschreiben eine durch Glutamat induzierte vesikuläre Ausschüttung von ATP (Guthrie et al. 1999; Pangršič et al. 2007). Da sich der Sensor ausschließlich intrazellulär befindet, ist dieser Weg mit dem vorliegenden System nicht messbar, sodass dessen Bedeutung weiteren Untersuchungen vorbehalten bleibt. Da jedoch das für die Freisetzung bestimmte ATP vesikulär gespeichert wird wohingegen der Sensor im Zytosol vorliegt und die Anzahl und Größe der ATP-Vesikel in Astrozyten gering ist, wird von keinem quantitativ relevanten Einfluss auf die gemessene intrazelluläre ATP-Konzentration ausgegangen (Coco et al. 2003; Pangršič et al. 2007).

### 5.3 Stimulation mit Dopamin

Im Gegensatz zu Glutamat zeigte die Stimulation mit Dopamin keine messbaren Auswirkungen auf den ATP-Gehalt in Astrozyten. Dopamin wirkt an Astrozyten über G-Protein-gekoppelte D1- und D2-Rezeptoren (Khan et al. 2001; Liu et al. 2009; Mladinov et al. 2010; Requardt et al. 2012; Requardt et al. 2010) und kann über den Na<sup>+</sup>-abhängigen Norepinephrintransporter (NET) sowie den Na<sup>+</sup>-unabhängigen organischen Kationentransporter 3 (OCT3) von Astrozyten aufgenommen werden (Takeda et al. 2002). Vorhergehende Studien zeigten jedoch, dass die Aufnahme von Dopamin in Astroglia-reichen Primärkulturen ausschließlich Na<sup>+</sup>-unabhängig und verhältnismäßig langsam (10-15 min) stattfindet (Hösli und Hösli 1997). Dies könnte erklären, warum eine Na<sup>+</sup>-vermittelte Aktivitätserhöhung der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase und somit ein ATP-Abfall ausbleiben.

Eine Stimulation mit Dopamin zeigt in anderen Studien jedoch durchaus Wirkungen auf den Metabolismus in Astrozyten: Es führt rezeptorvermittelt zu einer biphasischen Veränderung des NAD(P)H-Signals im Sinne eines frühen Abfalls gefolgt von einem Anstieg über das Ausgangsniveau. Dies ist am ehesten durch eine schnelle Oxidation von NADH in der Atmungskette, gefolgt von der Reduktion von NAD<sup>+</sup> in der Glykolyse bedingt (Requardt et al. 2010). Obwohl hier ATP-liefernde Prozesse induziert werden, scheint dies lediglich den gleichzeitig ablaufenden ATP-Verbrauch (z.B. durch die Signaltransduktion) zu kompensieren, sodass es im vorliegenden System zu keinen messbaren ATP-Änderungen kommt.

### 5.4 Einschränkungen des Systems und Ausblick

Während Zellkulturen ein beliebtes Modell zur Untersuchung einzelner Zelltypen ohne den Einfluss anderer Zellpopulationen darstellen, lassen sich die hierdurch gewonnenen Ergebnisse keinesfalls direkt auf *in vivo* Verhältnisse übertragen. Kultivierte Astrozyten unterscheiden sich von ihren *in vivo* Korrelaten sowohl morphologisch als auch teilweise in ihrer Expression von Genen, Rezeptoren und Transportern (Cahoy et al. 2008). Die hohe Glutamatexposition findet z.B. *in vivo* auf Grund der stärkeren Verzweigung deutlich lokaler in den feinen Fortsätzen nahe der Synapse statt und es ist denkbar, dass auch die hier beobachteten Effekte auf den ATP-Gehalt *in vivo* lediglich in Mikrodomänen ablaufen. Auch erfolgt die Glutamataufnahme in kultivierten Astrozyten v.a. über GLAST, während *in vivo* im

Großhirn GLT-1 dominiert (Lehre et al. 1995; Robinson und Jackson 2016). Nicht auszuschließen ist ebenfalls, dass kultivierte Astrozyten in ihren Stoffwechselwegen leicht von *in vivo* Astrozyten abweichen. Der genetisch kodierte Sensor ATeam wird jedoch in Kombination mit hochauflösender Mikroskopie die Möglichkeit bieten, diese Vorgänge *in situ* und *in vivo* unter Einfluss der physiologischen Verhältnisse und zahlreichen Zellkontakte zu überprüfen, wobei eine Expression des Sensors entweder durch die Generierung geeigneter transgener Mauslinien oder durch viral vermittelten Gentransfer erzielt werden könnte. Vergleichbare genetisch codierte Sensoren für Laktat und Glucose wurden hierbei kürzlich erfolgreich *in vivo* eingesetzt (Mächler et al. 2016).

Die vorliegende Arbeit beschreibt die relative ATP-Konzentration als relative Veränderung des Signals des ATeam-Sensors. Weitere Experimente sollten auf eine Kalibrierung des Sensorsignals auf die ATP Konzentration abzielen. Diese wird jedoch u.a. dadurch erschwert, dass die erforderliche Permeabilisierung der Zellmembran die Zellfunktionen erheblich beeinträchtigt und ATP weiterhin in der Zelle verbraucht wird.

Die dargestellten Ergebnisse, welche gut mit vorhergehenden Studien zum astrozytären Stoffwechsel und Astrozyten-Neuronen-Interaktionen vereinbar sind, erlauben somit keine direkten Rückschlüsse auf *in vivo* Prozesse. Dennoch stellen sie einen wichtigen Schritt auf dem Weg zur Charakterisierung des ATP-Haushalts in Astrozyten *in vivo* dar, dessen Untersuchung und Quantifizierung weiteren Experimenten vorbehalten bleibt.



## 6 Zusammenfassung

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades Dr. med.

### **Auswirkung von Glutamat und Dopamin auf den Energiestoffwechsel in Astrozyten: Untersuchung mittels genetisch kodierter fluoreszenter Sensoren für ATP**

eingereicht von:

Pauline Seim

angefertigt an der:

Universität Leipzig, Medizinische Fakultät

Carl-Ludwig-Institut für Physiologie

betreut von:

Prof. Dr. Johannes Hirrlinger

Dezember 2016

Astrozyten spielen eine essentielle Rolle für den reibungslosen Ablauf der Hirnfunktionen indem sie u.a. Neurone in Abhängigkeit von der synaptischen Aktivität mit Energie in Form von Laktat versorgen. An der Kopplung dieser Prozesse scheinen die Aufnahme von Glutamat, einhergehend mit einer Aktivierung der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase und dem Verbrauch von ATP, beteiligt zu sein (Magistretti und Chatton 2005). Ziel der vorliegenden Arbeit ist die direkte Überprüfung des ATP-Gehalts in einzelnen Astrozyten während der Stimulation mit den Neurotransmittern Glutamat und Dopamin.

Hierfür wurden als Modellsystem Astroglia-reiche Primärkulturen (APK) aus dem Cortex neugeborener Mäuse angelegt. Immunhistochemische Färbungen mit dem astrozytären Marker GFAP zeigten, dass es sich bei ca. 98 % der Zellen der APKs um Astrozyten handelte. Mit Hilfe des genetisch kodierten FRET-basierten ATP-Sensors „ATeam“ (Imamura et al. 2009) wurde der relative ATP-Gehalt im Zytosol einzelner Zellen über einen vorgegebenen Zeitraum bei gleichzeitiger Perfusion mit den entsprechenden Lösungen gemessen.

Zur Überprüfung der Funktionalität des Sensors im neu etablierten Versuchsaufbau wurden Iodacetat und Natriumazid eingesetzt, welche die Glykolyse bzw. Atmungskette hemmen und dadurch zu einer ATP-Depletion in den Zellen führen. Der gemessene relative ATP-Gehalt zeigte wie erwartet einen starken Abfall. Als Negativkontrolle wurde der Versuch mit einer ATP-bindungsdefiziente Mutante des ATeam-Sensors wiederholt, wobei das erhaltene Signal nahezu konstant blieb. Dieses Ergebnis spricht für ein ATP-spezifisches Signal, welches keinen relevanten Änderungen durch Expressionsgrad oder pH unterliegt.

Glutamat fungiert an ca. 80 % der Synapsen des Gehirns als Neurotransmitter und wird über die Na<sup>+</sup>-abhängigen Transporter GLT-1 und GLAST von Astrozyten wiederaufgenommen, um die Signalübertragung zu beenden und Exzitotoxizität zu verhindern. Da der Na<sup>+</sup>-Gradient durch die Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase wiederhergestellt werden muss, ist dieser Schritt energieaufwändig. Außerdem signalisiert die Glutamatfreisetzung einen erhöhten Energiebedarf der Neurone, auf welchen Astrozyten reagieren müssen. Die hier durchgeführten Experimente in Astrozyten zeigen unter 1 µM Glutamat bereits einen leichten ATP-Abfall, welcher unter 100 µM Glutamat stark zunimmt und in eine Plateauphase übergeht. Dieser ATP-Abfall ist sehr wahrscheinlich transportervermittelt, da unter dem Transporteragonisten D-Aspartat ein ähnlicher sowie bei Blockade der Transporter mit TBOA ein verringerter ATP-Abfall auftraten. Die Beteiligung der Glutamatrezeptoren erscheint auf Grund der Untersuchungen mit dem selektiven Rezeptoragonisten AMPA, welche keine signifikanten Veränderungen des ATP-Gehalts zeigten, unwahrscheinlich. Weiterhin zeigte die Stimulation mit Glutamat bei Blockade der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase mit Ouabain einen eingeschränkten ATP-Abfall.

Die Beobachtungen lassen sich sehr gut mit vorhergehenden Studien vereinbaren, welche ebenfalls bei Stimulation mit Glutamat einen am ehesten durch

die Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase bedingten ATP-Abfall in Astrozyten postulierten (Magistretti und Chatton 2005). Die gesteigerte Aktivität der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase scheint sowohl durch den begleitenden Na<sup>+</sup>-Einstrom als auch durch direkte Interaktionen mit den Glutamattransportern bedingt zu sein (Chatton et al. 2000; Bauer et al. 2012; Robinson und Jackson 2016). Des Weiteren ist bekannt, dass Glutamat in Astrozyten u.a. zu einer Steigerung der Glukoseaufnahme, Glykolyse und Laktatausschüttung führt (Pellerin und Magistretti 1994). Dieser Mechanismus gewährleistet die aktivitätsabhängige Bereitstellung von Energie in Form von Laktat und wird als Astrozyten-Neuronen-Laktatshuttle bezeichnet. Neben der erhöhten intrazellulären Na<sup>+</sup>-Konzentration sowie Interaktionen zwischen Glutamattransportern, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase und Enzymen des Glykolysestoffwechsels ist es wahrscheinlich, dass der beobachtete ATP-Abfall unter Glutamat ein weiteres intrazelluläres Signal zur Kopplung dieser Prozesse darstellt.

Die Untersuchungen wurden ebenfalls mit dem Neurotransmitter Dopamin durchgeführt, wobei jedoch keine messbaren ATP-Veränderungen auftraten.

Zusammenfassend wurde erfolgreich ein ATP-Monitoring in Astrozyten in Echtzeit durchgeführt, welches die mit der Glutamataufnahme verbundene energetische Herausforderung anhand des ATP-Abfalls bestätigen und veranschaulichen konnte. Die Ergebnisse sind gut mit bisherigen Studien vereinbar, jedoch werden Untersuchungen *in situ* und *in vivo* notwendig sein, um die Vorgänge unter Einbeziehung der zahlreichen Zellkontakte sowie physiologischen und morphologischen Besonderheiten zu untersuchen. Hierfür bietet der genetisch kodierte Sensor ATeam eine geeignete Grundlage.

## 7 Literaturverzeichnis

- Abbott, N. Joan; Rönnbäck, Lars; Hansson, Elisabeth (2006): Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. In: *Nature Reviews Neuroscience* 7 (1), S. 41–53. DOI: 10.1038/nrn1824.
- Allen, Nicola J.; Barres, Ben A. (2009): Neuroscience: Glia - more than just brain glue. In: *Nature* 457 (7230), S. 675–677. DOI: 10.1038/457675a.
- Andriezen, W. L. (1893): The Neuroglia Elements in the Human Brain. In: *British medical journal* 2 (1700), S. 227–230.
- Apell, Hans-Jürgen (1997): Kinetic and Energetic Aspects of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-Transport Cycle Steps. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 834 (1), S. 221–230. DOI: 10.1111/j.1749-6632.1997.tb52253.x.
- Araque, Alfonso; Parpura, Vladimir; Sanzgiri, Rita P.; Haydon, Philip G. (1999): Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. In: *Trends in neurosciences* 22 (5), S. 208–215. DOI: 10.1016/S0166-2236(98)01349-6.
- Azevedo, Frederico A.C.; Carvalho, Ludmila R.B.; Grinberg, Lea T.; Farfel, José Marcelo; Ferretti, Renata E.L.; Leite, Renata E.P. et al. (2009): Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain. In: *Journal of Comparative Neurology* 513 (5), S. 532–541. DOI: 10.1002/cne.21974.
- Bak, Lasse K.; Schousboe, Arne; Waagepetersen, Helle S. (2006): The glutamate/GABA-glutamine cycle: aspects of transport, neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer. In: *J Neurochem* 98 (3), S. 641–653. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2006.03913.x.
- Bauer, Deborah E.; Jackson, Joshua G.; Genda, Elizabeth N.; Montoya, Misty M.; Yudkoff, Marc; Robinson, Michael B. (2012): The glutamate transporter, GLAST, participates in a macromolecular complex that supports glutamate metabolism. In: *The Glutamatergic Synapse* 61 (4), S. 566–574. DOI: 10.1016/j.neuint.2012.01.013.
- Baumann, Nicole; Pham-Dinh, Danielle (2001): Biology of Oligodendrocyte and Myelin in the Mammalian Central Nervous System. In: *Physiological Reviews* 81 (2), S. 871–927. Online verfügbar unter <http://physrev.physiology.org/content/physrev/81/2/871.full.pdf>.
- Beaulieu, Jean-Martin; Gainetdinov, Raul R. (2011): The Physiology, Signaling, and Pharmacology of Dopamine Receptors. In: *Pharmacol Rev* 63 (1), S. 182–217. DOI: 10.1124/pr.110.002642.
- Belachew, S.; Chittajallu, R.; Aguirre, A. A.; Yuan, X.; Kirby, M.; Anderson, S.; Gallo, V. (2003): Postnatal NG2 proteoglycan-expressing progenitor cells are intrinsically multipotent and generate functional neurons. In: *The Journal of Cell Biology* 161 (1), S. 169–186. DOI: 10.1083/jcb.200210110.

- Bermejo, C.; Haerizadeh, F.; Takanaga, H.; Chermak, D.; Frommer, W. B. (2010): Dynamic analysis of cytosolic glucose and ATP levels in yeast using optical sensors. In: *The Biochemical journal* 432 (2), S. 399–406. DOI: 10.1042/BJ20100946.
- Bernardinelli, Y.; Magistretti, P. J.; Chatton, J. Y. (2004): Astrocytes generate Na<sup>+</sup>-mediated metabolic waves. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (41), S. 14937–14942. DOI: 10.1073/pnas.0405315101.
- Bernardinelli, Yann; Azarias, Guillaume; Chatton, Jean-Yves (2006): In situ fluorescence imaging of glutamate-evoked mitochondrial Na<sup>+</sup> responses in astrocytes. In: *Glia* 54 (5), S. 460–470. DOI: 10.1002/glia.20387.
- Bezzi, P.; Carmignoto, G.; Pasti, L.; Vesce, S.; Rossi, D.; Rizzini, B. L. et al. (1998): Prostaglandins stimulate calcium-dependent glutamate release in astrocytes. In: *Nature* 391 (6664), S. 281–285. DOI: 10.1038/34651.
- Bignami, A.; Eng, L. F.; Dahl, D.; Uyeda, C. T. (1972): Localization of the glial fibrillary acidic protein in astrocytes by immunofluorescence. In: *Brain Research* 43 (2), S. 429–435. DOI: 10.1016/0006-8993(72)90398-8.
- Bittner, Carla X.; Loaiza, Anitsi; Ruminot, Ivan; Larenas, Valeria; Sotelo-Hitschfeld, Tamara; Gutierrez, Robin et al. (2010): High resolution measurement of the glycolytic rate. In: *Front Neuroenergetics* 2. DOI: 10.3389/fnene.2010.00026.
- Björklund, Anders; Dunnett, Stephen B. (2007): Dopamine neuron systems in the brain: an update. In: *Fifty years of dopamine research* 30 (5), S. 194–202. DOI: 10.1016/j.tins.2007.03.006.
- Borst, J. W.; Willemse, M.; Slijkhuis, R.; van der Krogt, G.; Laptinok, S. P.; Jalink, K. et al. (2010): ATP Changes the Fluorescence Lifetime of Cyan Fluorescent Protein via an Interaction with His148. In: *PLoS ONE* 5 (11). DOI: 10.1371/journal.pone.0013862.
- Bribián, A.; Figueres-Oñate, M.; Martín-López, E.; López-Mascaraque, L. (2016): Decoding astrocyte heterogeneity: New tools for clonal analysis. In: *Dynamic and metabolic astrocyte-neuron interactions in healthy and diseased brain* 323, S. 10–19. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2015.04.036.
- Bröer, Stefan; Rahman, Basim; Pellegrini, Gioranni; Pellerin, Luc; Martin, Jean-Luc; Verleysdonk, Stephan et al. (1997): Comparison of Lactate Transport in Astroglial Cells and Monocarboxylate Transporter 1 (MCT 1) Expressing *Xenopus laevis* Oocytes EXPRESSION OF TWO DIFFERENT MONOCARBOXYLATE TRANSPORTERS IN ASTROGLIAL CELLS AND NEURONS. In: *J. Biol. Chem.* 272 (48), S. 30096–30102. DOI: 10.1074/jbc.272.48.30096.
- Bushong, Eric A.; Martone, Maryann E.; Jones, Ying Z.; Ellisman, Mark H. (2002): Protoplasmic Astrocytes in CA1 Stratum Radiatum Occupy Separate Anatomical Domains. In: *J. Neurosci.* 22 (1), S. 183–192. Online verfügbar unter <http://www.jneurosci.org/content/22/1/183.full>.

- Cahoy, John D.; Emery, Ben; Kaushal, Amit; Foo, Lynette C.; Zamanian, Jennifer L.; Christopherson, Karen S. et al. (2008): A Transcriptome Database for Astrocytes, Neurons, and Oligodendrocytes: A New Resource for Understanding Brain Development and Function. In: *J. Neurosci.* 28 (1), S. 264–278. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4178-07.2008.
- Chatton, Jean-Yves; Magistretti, Pierre J.; Barros, L. Felipe (2016): Sodium signaling and astrocyte energy metabolism. In: *Glia* 64 (10), S. 1667–1676. DOI: 10.1002/glia.22971.
- Chatton, Jean-Yves; Marquet, Pierre; Magistretti, Pierre J. (2000): A quantitative analysis of l-glutamate-regulated Na<sup>+</sup> dynamics in mouse cortical astrocytes: implications for cellular bioenergetics. In: *European Journal of Neuroscience* 12 (11), S. 3843–3853. DOI: 10.1046/j.1460-9568.2000.00269.x.
- Chaudhry, Farrukh A.; Reimer, Richard J.; Edwards, Robert H. (2002): The glutamine commute take the N line and transfer to the A. In: *J Cell Biol* 157 (3), S. 349–355. DOI: 10.1083/jcb.200201070.
- Chen, Nancy N.H; Lai, Yu-Jun; Pan, Wynn H.T (1997): Effects of different perfusion medium on the extracellular basal concentration of dopamine in striatum and medial prefrontal cortex: a zero-net flux microdialysis study. In: *Neuroscience Letters* 225 (3), S. 197–200. DOI: 10.1016/S0304-3940(97)00222-X.
- Chiu, Fung-Chow; Norton, William T.; Fields, Kay L. (1981): The Cytoskeleton of Primary Astrocytes in Culture Contains Actin, Glial Fibrillary Acidic Protein, and the Fibroblast-Type Filament Protein, Vimentin. In: *Journal of neurochemistry* 37 (1), S. 147–155. DOI: 10.1111/j.1471-4159.1981.tb05302.x.
- Coco, Silvia; Calegari, Federico; Pravettoni, Elena; Pozzi, Davide; Taverna, Elena; Rosa, Patrizia et al. (2003): Storage and Release of ATP from Astrocytes in Culture. In: *J. Biol. Chem.* 278 (2), S. 1354–1362. DOI: 10.1074/jbc.M209454200.
- Cornell-Bell, Ah; Finkbeiner, Sm; Cooper, Ms; Smith, Sj (1990): Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: long-range glial signaling. In: *Science* 247 (4941), S. 470–473. DOI: 10.1126/science.1967852.
- D’Antoni, Simona; Berretta, Antonio; Bonaccorso, Carmela Maria; Bruno, Valeria; Aronica, Eleonora; Nicoletti, Ferdinando; Catania, Maria Vincenza (2008): Metabotropic Glutamate Receptors in Glial Cells. In: *Neurochem Res* 33 (12), S. 2436–2443. DOI: 10.1007/s11064-008-9694-9.
- Dahlstroem, A.; Fuxe, K. (1964): evidence for the existence of monoamine neurons in the central nervous system. iii. the monoamine nerve terminal. In: *Acta physiologica Scandinavica. Supplementum*, SUPPL 232:1-55.
- Danbolt, N. C. (2001): Glutamate uptake. In: *Prog Neurobiol* 65 (1), S. 1–105.
- Deitmer, Joachim W.; McCarthy, Ken D.; Scemes, Eliana; Giaume, Christian (2006): Information processing and transmission in glia: Calcium signaling and transmitter release. In: *Glia* 54 (7), S. 639–641. DOI: 10.1002/glia.20428.

- del Rio-Hortega, P. (1921): Estudios sobre la Neuroglia. La glia de escasa radiaciones (Oligodendroglia). Online verfügbar unter [http://www.networkglia.eu/sites/networkglia.eu/files/downloads/Hortega-1921\\_espanol.pdf](http://www.networkglia.eu/sites/networkglia.eu/files/downloads/Hortega-1921_espanol.pdf).
- Derouiche, Amin; Haseleu, Julia; Korf, Horst-Werner (2015): Fine Astrocyte Processes Contain Very Small Mitochondria: Glial Oxidative Capability May Fuel Transmitter Metabolism. In: *Neurochem Res* 40 (12), S. 2402–2413. DOI: 10.1007/s11064-015-1563-8.
- Dienel, G. A. (2012): Brain lactate metabolism: the discoveries and the controversies. In: *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 32 (7), S. 1107–1138. DOI: 10.1038/jcbfm.2011.175.
- Dringen, R.; Hirrlinger, J. (2003): Glutathione Pathways in the Brain. In: *Biological Chemistry* 384 (4), S. 505–516. DOI: 10.1515/BC.2003.059.
- Eisenhofer, Graeme (2001): The role of neuronal and extraneuronal plasma membrane transporters in the inactivation of peripheral catecholamines. In: *Pharmacology & Therapeutics* 91 (1), S. 35–62. DOI: 10.1016/S0163-7258(01)00144-9.
- Emsley, J. G.; Macklis, J. D. (2006): Astroglial heterogeneity closely reflects the neuronal-defined anatomy of the adult murine CNS. In: *Neuron glia biology* 2 (3), S. 175–186. DOI: 10.1017/S1740925X06000202.
- Eng, L. F.; Vanderhaeghen, J. J.; Bignami, A.; Gerstl, B. (1971): An acidic protein isolated from fibrous astrocytes. In: *Brain Res* 28 (2), S. 351–354.
- Fawcett, James W.; Asher, Richard.A (1999): The glial scar and central nervous system repair. In: *Brain Research Bulletin* 49 (6), S. 377–391. DOI: 10.1016/S0361-9230(99)00072-6.
- Fiacco, Todd A.; McCarthy, Ken D. (2006): Astrocyte calcium elevations: Properties, propagation, and effects on brain signaling. In: *Glia* 54 (7), S. 676–690. DOI: 10.1002/glia.20396.
- Förster, Th. (1948): Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. In: *Annalen der Physik* 437 (1-2), S. 55–75. DOI: 10.1002/andp.19484370105.
- Frommer, W. B.; Davidson, M. W.; Campbell, R. E. (2009): Genetically encoded biosensors based on engineered fluorescent proteins†‡. In: *Chemical Society reviews* 38 (10), S. 2833–2841. DOI: 10.1039/b907749a.
- Gegelashvili, Georgi; Schousboe, Arne (1998): Cellular Distribution and Kinetic Properties of High-Affinity Glutamate Transporters. In: *Brain Research Bulletin* 45 (3), S. 233–238. DOI: 10.1016/S0361-9230(97)00417-6.
- Genda, Elizabeth N.; Jackson, Joshua G.; Sheldon, Amanda L.; Locke, Susannah F.; Greco, Todd M.; O'Donnell, John C. et al. (2011): Co-compartmentalization of the Astroglial Glutamate Transporter, GLT-1, with Glycolytic Enzymes and Mitochondria. In: *J. Neurosci.* 31 (50), S. 18275–18288. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3305-11.2011.

- Giaume, C.; Kirchhoff, F.; Matute, C.; Reichenbach, A.; Verkhratsky, A. (2007): Glia: the fulcrum of brain diseases. In: *Cell Death Differ* 14 (7), S. 1324–1335. DOI: 10.1038/sj.cdd.4402144.
- Giulian, D. (1987): Ameboid microglia as effectors of inflammation in the central nervous system. In: *Journal of Neuroscience Research* 18 (1), 155-71, 132-3.
- Grosche, Jens; Matyash, Vitali; Möller, Thomas; Verkhratsky, Alexej; Reichenbach, Andreas; Kettenmann, Helmut (1999): Microdomains for neuron-glia interaction: parallel fiber signaling to Bergmann glial cells. In: *Nature Neuroscience* 2 (2), S. 139–143. DOI: 10.1038/5692.
- Guthrie, Peter B.; Knappenberger, Joshua; Segal, Menahem; Bennett, Michael V. L.; Charles, Andrew C.; Kater, S. B. (1999): ATP Released from Astrocytes Mediates Glial Calcium Waves. In: *J. Neurosci.* 19 (2), S. 520–528. Online verfügbar unter <http://www.jneurosci.org/content/19/2/520.full>.
- Haber, Michael; Zhou, Lei; Murai, Keith K. (2006): Cooperative Astrocyte and Dendritic Spine Dynamics at Hippocampal Excitatory Synapses. In: *J. Neurosci.* 26 (35), S. 8881–8891. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1302-06.2006.
- Halassa, M. M.; Haydon, P. G. (2010): Integrated Brain Circuits: Astrocytic Networks Modulate Neuronal Activity and Behavior. In: *Annual review of physiology* 72, S. 335–355. DOI: 10.1146/annurev-physiol-021909-135843.
- Hamprecht, Bernd; Löffler, Fridolin (1985): [27] Primary glial cultures as a model for studying hormone action. In: Lutz Birnbaumer (Hg.): Peptide hormones, Bd. 109. New York, NY: Academic Press (Methods in Enzymology, 109), S. 341–345.
- Harada, K.; Kamiya, T.; Tsuboi, T. (2015): Gliotransmitter Release from Astrocytes: Functional, Developmental, and Pathological Implications in the Brain. In: *Frontiers in Neuroscience* 9. DOI: 10.3389/fnins.2015.00499.
- Heckmann, Manfred; Lang, Florian; Schmidt, Robert F. (Hg.) (2011): Physiologie des Menschen. Mit Pathophysiologie. 31., überarbeitete und aktualisierte Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Heinrich, Peter C.; Müller, Matthias; Graeve, Lutz; Löffler, Georg; Petrides, Petro E. (Hg.) (2014): Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie. 9., vollst. überarb. Aufl. Berlin: Springer (Springer-Lehrbuch).
- Heneka, Michael T.; Rodríguez, José J.; Verkhratsky, Alexei (2010): Neuroglia in neurodegeneration. In: *Synaptic Processes - the role of glial cells* 63 (1–2), S. 189–211. DOI: 10.1016/j.brainresrev.2009.11.004.
- Hevner, R. F.; Duff, R. S.; Wong-Riley, M.T.T. (1992): Coordination of ATP production and consumption in brain: Parallel regulation of cytochrome oxidase and Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase. In: *Neuroscience Letters* 138 (1), S. 188–192. DOI: 10.1016/0304-3940(92)90502-X.



- Hirrlinger, Johannes; Hülsmann, Swen; Kirchhoff, Frank (2004): Astroglial processes show spontaneous motility at active synaptic terminals in situ. In: *European Journal of Neuroscience* 20 (8), S. 2235–2239. DOI: 10.1111/j.1460-9568.2004.03689.x.
- Hirrlinger, Johannes; Nave, Klaus-Armin (2014): Adapting brain metabolism to myelination and long-range signal transduction. In: *Glia* 62 (11), S. 1749–1761. DOI: 10.1002/glia.22737.
- Hochreiter, B.; Pardo, Garcia A.; Schmid, J. A. (2015): Fluorescent Proteins as Genetically Encoded FRET Biosensors in Life Sciences. In: *Sensors (Basel, Switzerland)* 15 (10), S. 26281–26314. DOI: 10.3390/s151026281.
- Höft, S.; Griemsmann, S.; Seifert, G.; Steinhäuser, C. (2014): Heterogeneity in expression of functional ionotropic glutamate and GABA receptors in astrocytes across brain regions: insights from the thalamus. In: *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 369 (1654). DOI: 10.1098/rstb.2013.0602.
- Hösli, Elisabeth; Hösli, L. (1997): Autoradiographic studies on the uptake of 3H-dopamine by neurons and astrocytes in explant and primary cultures of rat CNS: effects of uptake inhibitors. In: *International Journal of Developmental Neuroscience* 15 (1), S. 45–53. DOI: 10.1016/S0736-5748(96)00070-6.
- Hou, Bi-Huei; Takanaga, Hitomi; Grossmann, Guido; Chen, Li-Qing; Qu, Xiao-Qing; Jones, Alexander M. et al. (2011): Optical sensors for monitoring dynamic changes of intracellular metabolite levels in mammalian cells. In: *Nat Protoc* 6 (11), S. 1818–1833. DOI: 10.1038/nprot.2011.392.
- Houades, Vanessa; Koulakoff, Annette; Ezan, Pascal; Seif, Isabelle; Giaume, Christian (2008): Gap Junction-Mediated Astrocytic Networks in the Mouse Barrel Cortex. In: *J. Neurosci.* 28 (20), S. 5207–5217. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.5100-07.2008.
- Hu, Xin; Yuan, Yimin; Wang, Dan; Su, Zhida (2016): Heterogeneous astrocytes: Active players in CNS. In: *Brain Research Bulletin* 125, S. 1–18. DOI: 10.1016/j.brainresbull.2016.03.017.
- Imamura, Hiromi; Nhat, Kim P. Huynh; Togawa, Hiroko; Saito, Kenta; Iino, Ryota; Kato-Yamada, Yasuyuki et al. (2009): Visualization of ATP levels inside single living cells with fluorescence resonance energy transfer-based genetically encoded indicators. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 106 (37), S. 15651–15656. DOI: 10.1073/pnas.0904764106.
- Inazu, M.; Kubota, N.; Takeda, H.; Zhang, J.; Kiuchi, Y.; Oguchi, K.; Matsumiya, T. (1999): Pharmacological characterization of dopamine transport in cultured rat astrocytes. In: *Life sciences* 64 (24), S. 2239–2245.
- Kanai, Y.; Smith, C. P.; Hediger, M. A. (1993): A new family of neurotransmitter transporters: the high-affinity glutamate transporters. In: *FASEB J* 7 (15), S. 1450–1459.
- Kettenmann, H.; Verkhratsky, A. (2011): Neuroglia, der lebende Nerven Kitt. In: *Fortschritte der Neurologie-Psychiatrie* 79 (10), S. 588–597. DOI: 10.1055/s-0031-1281704.

- Kettenmann, Helmut; Ransom, Bruce R. (Hg.) (2013): *Neuroglia*. 3rd ed. New York [etc.]: Oxford University Press.
- Khakh, Baljit S.; Sofroniew, Michael V. (2015): Diversity of astrocyte functions and phenotypes in neural circuits. In: *Nature Neuroscience* 18 (7), S. 942–952. DOI: 10.1038/nn.4043.
- Khan, Z. U.; Koulen, P.; Rubinstein, M.; Grandy, D. K.; Goldman-Rakic, P. S. (2001): An astroglia-linked dopamine D2-receptor action in prefrontal cortex. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98 (4), S. 1964–1969. DOI: 10.1073/pnas.98.4.1964.
- Kimelberg, H. K. (1983): Primary astrocyte cultures--a key to astrocyte function. In: *Cellular and molecular neurobiology* 3 (1), S. 1–16.
- Kredel, S.; Oswald, F.; Nienhaus, K.; Deuschle, K.; Röcker, C.; Wolff, M. et al. (2009): mRuby, a Bright Monomeric Red Fluorescent Protein for Labeling of Subcellular Structures. In: *PLoS ONE* 4 (2). DOI: 10.1371/journal.pone.0004391.
- Kroener, S.; Chandler, L. J.; Phillips, P. E.M.; Seamans, J. K. (2009): Dopamine Modulates Persistent Synaptic Activity and Enhances the Signal-to-Noise Ratio in the Prefrontal Cortex. In: *PLoS ONE* 4 (8). DOI: 10.1371/journal.pone.0006507.
- Kuffler, S. W.; Nicholls, J. G. (1966): The physiology of neuroglial cells. In: *Ergebnisse der Physiologie, biologischen Chemie und experimentellen Pharmakologie* 57, S. 1–90.
- Kuga, Nahoko; Sasaki, Takuya; Takahara, Yuji; Matsuki, Norio; Ikegaya, Yuji (2011): Large-Scale Calcium Waves Traveling through Astrocytic Networks In Vivo. In: *J. Neurosci.* 31 (7), S. 2607–2614. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.5319-10.2011.
- Kvamme, Elling; Torgner, Ingeborg Aa.; Roberg, Bjørg (2001): Kinetics and localization of brain phosphate activated glutaminase. In: *Journal of Neuroscience Research* 66 (5), S. 951–958. DOI: 10.1002/jnr.10041.
- Lalo, Ulyana; Pankratov, Yuri; Kirchhoff, Frank; North, R. Alan; Verkhratsky, Alexei (2006): NMDA Receptors Mediate Neuron-to-Glia Signaling in Mouse Cortical Astrocytes. In: *J. Neurosci.* 26 (10), S. 2673–2683. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4689-05.2006.
- Lan, Yu-Long; Fang, Deng-Yang; Zhao, Jie; Ma, Tong-Hui; Li, Shao (2015): A research update on the potential roles of aquaporin 4 in neuroinflammation. In: *Acta Neurol Belg* 116 (2), S. 127–134. DOI: 10.1007/s13760-015-0520-2.
- Langer, Julia; Stephan, Jonathan; Theis, Martin; Rose, Christine R. (2012): Gap junctions mediate intercellular spread of sodium between hippocampal astrocytes in situ. In: *Glia* 60 (2), S. 239–252. DOI: 10.1002/glia.21259.
- Lehre, K. P.; Levy, L. M.; Ottersen, O. P.; Storm-Mathisen, J.; Danbolt, N. C. (1995): Differential expression of two glial glutamate transporters in the rat brain: quantitative and

- immunocytochemical observations. In: *J. Neurosci.* 15 (3), S. 1835–1853. Online verfügbar unter <http://jneurosci.org/content/jneuro/15/3/1835.full.pdf>.
- Lenhossék, M. (1895): *Der feinere Bau des Nervensystems im Lichte neuester Forschungen*: Fischer. Online verfügbar unter <https://books.google.de/books?id=s5h810OFLhkC>.
- Li, Nianzhen; Sul, Jai-Yoon; Haydon, Philip G. (2003): A Calcium-Induced Calcium Influx Factor, Nitric Oxide, Modulates the Refilling of Calcium Stores in Astrocytes. In: *J. Neurosci.* 23 (32), S. 10302–10310. Online verfügbar unter <http://www.jneurosci.org/content/jneuro/23/32/10302.full.pdf>.
- Liemburg-Apers, Dania C.; Imamura, Hiromi; Forkink, Marleen; Nootboom, Marco; Swarts, Herman G.; Brock, Roland et al. (2011): Quantitative Glucose and ATP Sensing in Mammalian Cells. In: *Pharm Res* 28 (11), S. 2745. DOI: 10.1007/s11095-011-0492-8.
- Lipton, P.; Robacker, K. (1983): Glycolysis and brain function: K<sup>+</sup> stimulation of protein synthesis and K<sup>+</sup> uptake require glycolysis. In: *Federation proceedings* 42 (12), S. 2875–2880.
- Liu, Jue; Wang, Fang; Huang, Chao; Long, Li-Hong; Wu, Wen-Ning; Cai, Fei et al. (2009): Activation of Phosphatidylinositol-linked Novel D1 Dopamine Receptor Contributes to the Calcium Mobilization in Cultured Rat Prefrontal Cortical Astrocytes. In: *Cell Mol Neurobiol* 29 (3), S. 317–328. DOI: 10.1007/s10571-008-9323-9.
- Liu, Xiuxin; Bolteus, Anna J.; Balkin, Daniel M.; Henschel, Oliver; Bordey, Angélique (2006): GFAP-expressing cells in the postnatal subventricular zone display a unique glial phenotype intermediate between radial glia and astrocytes. In: *Glia* 54 (5), S. 394–410. DOI: 10.1002/glia.20392.
- Loaiza, Anitsi; Porras, Omar H.; Barros, Luis Felipe (2003): Glutamate triggers rapid glucose transport stimulation in astrocytes as evidenced by real-time confocal microscopy. In: *J Neurosci* 23 (19), S. 7337–7342.
- Mächler, Philipp; Wyss, Matthias T.; Elsayed, Maha; Stobart, Jillian; Gutierrez, Robin; Faber-Castell, Alexandra von et al. (2016): In Vivo Evidence for a Lactate Gradient from Astrocytes to Neurons. In: *Cell Metabolism* 23 (1), S. 94–102. DOI: 10.1016/j.cmet.2015.10.010.
- Magistretti, P. J.; Chatton, J.-Y. (2005): Relationship between L-glutamate-regulated intracellular Na<sup>+</sup> dynamics and ATP hydrolysis in astrocytes. In: *J Neural Transm* 112 (1), S. 77–85. DOI: 10.1007/s00702-004-0171-6.
- Magistretti, P. J.; Pellerin, L. (1999): Cellular mechanisms of brain energy metabolism and their relevance to functional brain imaging. In: *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 354 (1387), S. 1155–1163.
- Magistretti, Pierre J.; Ransom, Bruce R. (2002): Astrocytes. In: *Neuropsychopharmacology: the fifth generation of progress* (Hrsg. Davis K. L., Charney D., Coyle J. T. und Nemeroff C.), S. 133–145.

- Malatesta, Paolo; Appolloni, Irene; Calzolari, Filippo (2008): Radial glia and neural stem cells. In: *Cell Tissue Res* 331 (1), S. 165–178. DOI: 10.1007/s00441-007-0481-8.
- Martinez-Hernandez, A.; Bell, Kp; Norenberg, Md (1977): Glutamine synthetase: glial localization in brain. In: *Science* 195 (4284), S. 1356–1358. DOI: 10.1126/science.14400.
- Matsuda, Tomoki; Miyawaki, Atsushi; Nagai, Takeharu (2008): Direct measurement of protein dynamics inside cells using a rationally designed photoconvertible protein. In: *Nature Methods* 5 (4), S. 339–345. DOI: 10.1038/nmeth.1193.
- Matyash, Vitali; Kettenmann, Helmut (2010): Heterogeneity in astrocyte morphology and physiology. In: *Brain Res Rev* 63 (1-2), S. 2–10. DOI: 10.1016/j.brainresrev.2009.12.001.
- McKenna, Mary C. (2007): The glutamate-glutamine cycle is not stoichiometric: Fates of glutamate in brain. In: *Journal of Neuroscience Research* 85 (15), S. 3347–3358. DOI: 10.1002/jnr.21444.
- Mladinov, Mihovil; Mayer, Davor; Brčić, Luka; Wolstencroft, Elizabeth; Man, Nguyen Thi; Holt, Ian et al. (2010): Astrocyte expression of D2-like dopamine receptors in the prefrontal cortex. In: *Translat.Neurosci.* 1 (3), S. 238–243. DOI: 10.2478/v10134-010-0035-6.
- Morgello, Susan; Uson, Ronald R.; Schwartz, Elissa J.; Haber, Richard S. (1995): The human blood-brain barrier glucose transporter (GLUT1) is a glucose transporter of gray matter astrocytes. In: *Glia* 14 (1), S. 43–54. DOI: 10.1002/glia.440140107.
- Mothet, J. P.; Pollegioni, L.; Ouanounou, G.; Martineau, M.; Fossier, P.; Baux, G. (2005): Glutamate receptor activation triggers a calcium-dependent and SNARE protein-dependent release of the gliotransmitter D-serine. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (15), S. 5606–5611. DOI: 10.1073/pnas.0408483102.
- Nagai, Takeharu; Ibata, Keiji; Park, Eun Sun; Kubota, Mie; Mikoshiba, Katsuhiko; Miyawaki, Atsushi (2002): A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. In: *Nature Biotechnology* 20 (1), S. 87–90. DOI: 10.1038/nbt0102-87.
- Nagai, Takeharu; Yamada, Shuichi; Tominaga, Takashi; Ichikawa, Michinori; Miyawaki, Atsushi (2004): Expanded dynamic range of fluorescent indicators for Ca<sup>2+</sup> by circularly permuted yellow fluorescent proteins. In: *PNAS* 101 (29), S. 10554–10559. DOI: 10.1073/pnas.0400417101.
- Nave, Klaus-Armin (2010): Myelination and the trophic support of long axons. In: *Nature Reviews Neuroscience* 11 (4), S. 275–283. DOI: 10.1038/nrn2797.
- Oberheim, N. A.; Goldman, S. A.; Nedergaard, M. (2012): Heterogeneity of Astrocytic Form and Function. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 814, S. 23–45. DOI: 10.1007/978-1-61779-452-0\_3.
- Oberheim, Nancy Ann; Wang, Xiaohai; Goldman, Steven; Nedergaard, Maiken (2006): Astrocytic complexity distinguishes the human brain. In: *Trends in neurosciences* 29 (10), S. 547–553. DOI: 10.1016/j.tins.2006.08.004.

- Oheim, Martin; Kirchhoff, Frank; Stühmer, Walter (2006): Calcium microdomains in regulated exocytosis. In: *Calcium microdomains and the fine control of cell function* 40 (5–6), S. 423–439. DOI: 10.1016/j.ceca.2006.08.007.
- Orr, A. G.; Hsiao, E. C.; Wang, M. M.; Ho, K.; Kim, D. H.; Wang, X. et al. (2015): Astrocytic adenosine receptor A2A and Gs-coupled signaling regulate memory. In: *Nature Neuroscience* 18 (3), S. 423–434. DOI: 10.1038/nn.3930.
- Osborn, Lana M.; Kamphuis, Willem; Wadman, Wytse J.; Hol, Elly M. (2016): Astrogliosis: An integral player in the pathogenesis of Alzheimer's disease. In: *Progress in Neurobiology*. DOI: 10.1016/j.pneurobio.2016.01.001.
- Pangršič, Tina; Potokar, Maja; Stenovec, Matjaž; Kreft, Marko; Fabbretti, Elsa; Nistri, Andrea et al. (2007): Exocytotic Release of ATP from Cultured Astrocytes. In: *J. Biol. Chem.* 282 (39), S. 28749–28758. DOI: 10.1074/jbc.M700290200.
- Parpura, Vladimir; Haydon, Philip G. (Hg.) (2009): Astrocytes in (patho)physiology of the nervous system. New York: Springer.
- Pekny, Milos; Nilsson, Michael (2005): Astrocyte activation and reactive gliosis. In: *Glia* 50 (4), S. 427–434. DOI: 10.1002/glia.20207.
- Pekny, Milos; Pekna, Marcela; Messing, Albee; Steinhäuser, Christian; Lee, Jin-Moo; Parpura, Vladimir et al. (2015): Astrocytes: a central element in neurological diseases. In: *Acta Neuropathol* 131 (3), S. 323–345. DOI: 10.1007/s00401-015-1513-1.
- Pellerin, L.; Magistretti, P. J. (1994): Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 91 (22), S. 10625–10629.
- Pellerin, L.; Magistretti, P. J. (2012): Sweet sixteen for ANLS. In: *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 32 (7), S. 1152–1166. DOI: 10.1038/jcbfm.2011.149.
- Pellerin, L.; Pellegrini, G.; Bittar, P. G.; Charnay, Y.; Bouras, C.; Martin, J. L. et al. (1998): Evidence supporting the existence of an activity-dependent astrocyte-neuron lactate shuttle. In: *Developmental neuroscience* 20 (4-5), S. 291–299.
- Pellerin, Luc; Magistretti, Pierre J. (1997): Glutamate Uptake Stimulates Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase Activity in Astrocytes via Activation of a Distinct Subunit Highly Sensitive to Ouabain. In: *Journal of neurochemistry* 69 (5), S. 2132–2137. DOI: 10.1046/j.1471-4159.1997.69052132.x.
- Pellerin, Luc; Magistretti, Pierre J. (2003): How to balance the brain energy budget while spending glucose differently. In: *J Physiol* 546 (Pt 2), S. 325.
- Perea, Gertrudis; Araque, Alfonso (2010): GLIA modulates synaptic transmission. In: *Synaptic Processes - the role of glial cells* 63 (1–2), S. 93–102. DOI: 10.1016/j.brainresrev.2009.10.005.

- Pfriege, Frank W.; Barres, Barbara A. (1997): Synaptic Efficacy Enhanced by Glial Cells in Vitro. In: *Science* 277 (5332), S. 1684–1687. DOI: 10.1126/science.277.5332.1684.
- Porter, James T.; McCarthy, Ken D. (1996): Hippocampal Astrocytes In Situ Respond to Glutamate Released from Synaptic Terminals. In: *J. Neurosci.* 16 (16), S. 5073–5081. Online verfügbar unter <http://www.jneurosci.org/content/16/16/5073.full>.
- Porter, James T.; McCarthy, Ken D. (1997): Astrocytic Neurotransmitter Receptors in situ and in vivo. In: *Progress in Neurobiology* 51 (4), S. 439–455. DOI: 10.1016/S0301-0082(96)00068-8.
- Requardt, Robert P.; Hirrlinger, Petra G.; Wilhelm, Franziska; Winkler, Ulrike; Besser, Stefanie; Hirrlinger, Johannes (2012): Ca<sup>2+</sup> signals of astrocytes are modulated by the NAD<sup>+</sup>/NADH redox state. In: *Journal of neurochemistry* 120 (6), S. 1014–1025. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2012.07645.x.
- Requardt, Robert P.; Wilhelm, Franziska; Rillich, Jan; Winkler, Ulrike; Hirrlinger, Johannes (2010): The biphasic NAD(P)H fluorescence response of astrocytes to dopamine reflects the metabolic actions of oxidative phosphorylation and glycolysis. In: *Journal of neurochemistry* 115 (2), S. 483–492. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2010.06940.x.
- Ridet, J. L.; Privat, A.; Malhotra, S. K.; Gage, F. H. (1997): Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function. In: *Trends in neurosciences* 20 (12), S. 570–577. DOI: 10.1016/S0166-2236(97)01139-9.
- Robinson, Michael B.; Jackson, Joshua G. (2016): Astroglial glutamate transporters coordinate excitatory signaling and brain energetics. In: *Neurochemistry International*. DOI: 10.1016/j.neuint.2016.03.014.
- Rose, Christine R.; Karus, Claudia (2013): Two sides of the same coin: Sodium homeostasis and signaling in astrocytes under physiological and pathophysiological conditions. In: *Glia* 61 (8), S. 1191–1205. DOI: 10.1002/glia.22492.
- Rose, Christine R.; Verkhratsky, Alexei (2016): Principles of sodium homeostasis and sodium signalling in astroglia. In: *Glia* 64 (10), S. 1611–1627. DOI: 10.1002/glia.22964.
- Rose, Erin M.; Koo, Joseph C. P.; Antflick, Jordan E.; Ahmed, Syed M.; Angers, Stephane; Hampson, David R. (2009): Glutamate Transporter Coupling to Na,K-ATPase. In: *J. Neurosci.* 29 (25), S. 8143–8155. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1081-09.2009.
- Saab, Aiman S.; Tzvetavona, Iva D.; Trevisiol, Andrea; Baltan, Selva; Dibaj, Payam; Kusch, Kathrin et al. (2016): Oligodendroglial NMDA Receptors Regulate Glucose Import and Axonal Energy Metabolism. In: *Neuron* 91 (1), S. 119–132. DOI: 10.1016/j.neuron.2016.05.016.
- San Martín A.; Ceballo, S.; Ruminot, I.; Lerchundi, R.; Frommer, W. B.; Barros, L. F. (2013): A Genetically Encoded FRET Lactate Sensor and Its Use To Detect the Warburg Effect in Single Cancer Cells. In: *PLoS ONE* 8 (2). DOI: 10.1371/journal.pone.0057712.

- Scemes, Eliana; Giaume, Christian (2006): Astrocyte calcium waves: What they are and what they do. In: *Glia* 54 (7), S. 716–725. DOI: 10.1002/glia.20374.
- Schneider, Caroline A.; Rasband, Wayne S.; Eliceiri, Kevin W. (2012): NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. In: *Nature Methods* 9 (7), S. 671–675. DOI: 10.1038/nmeth.2089.
- Schousboe, A.; Sarup, A.; Bak, L. K.; Waagepetersen, H. S.; Larsson, O. M. (2004): Role of astrocytic transport processes in glutamatergic and GABAergic neurotransmission. In: *Role of Non-synaptic Communication in Information Processing* 45 (4), S. 521–527. DOI: 10.1016/j.neuint.2003.11.001.
- Schousboe, Arne; Bak, Lasse K.; Sickmann, Helle M.; Sonnewald, Ursula; Waagepetersen, Helle S. (2007): Energy substrates to support glutamatergic and GABAergic synaptic function: Role of glycogen, glucose and lactate. In: *neurotox res* 12 (4), S. 263–268. DOI: 10.1007/BF03033909.
- Shigetomi, E.; Bushong, E. A.; Hausteiner, M. D.; Tong, X.; Jackson-Weaver, O.; Kracun, S. et al. (2013): Imaging calcium microdomains within entire astrocyte territories and endfeet with GCaMPs expressed using adeno-associated viruses. In: *The Journal of General Physiology* 141 (5), S. 633–647. DOI: 10.1085/jgp.201210949.
- Shimomura, Osamu; Johnson, Frank H.; Saiga, Yo (1962): Extraction, Purification and Properties of Aequorin, a Bioluminescent Protein from the Luminous Hydromedusa, Aequorea. In: *Journal of Cellular and Comparative Physiology* 59 (3), S. 223–239. DOI: 10.1002/jcp.1030590302.
- Shiraishi, Masaharu; Kamiyama, Yoishiro; Hüttemeier, Peter Christian; Benveniste, Helene (1997): Extracellular glutamate and dopamine measured by microdialysis in the rat striatum during blockade of synaptic transmission in anesthetized and awake rats. In: *Brain Research* 759 (2), S. 221–227. DOI: 10.1016/S0006-8993(97)00258-8.
- Shrestha, D.; Jenei, A.; Nagy, P.; Vereb, G.; Szöllösi, J. (2015): Understanding FRET as a Research Tool for Cellular Studies. In: *International Journal of Molecular Sciences* 16 (4), S. 6718–6756. DOI: 10.3390/ijms16046718.
- Silver, I. A.; Erecinska, M. (1997): Energetic demands of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase in mammalian astrocytes. In: *Glia* 21 (1), S. 35–45.
- Sloan, Steven A.; Barres, Ben A. (2014): Mechanisms of astrocyte development and their contributions to neurodevelopmental disorders. In: *SI: Development and regeneration* 27, S. 75–81. DOI: 10.1016/j.conb.2014.03.005.
- Sofroniew, Michael V. (2009): Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. In: *Trends in neurosciences* 32 (12), S. 638–647. DOI: 10.1016/j.tins.2009.08.002.
- Somjen, G. G. (1988): Nervenkitz: notes on the history of the concept of neuroglia. In: *Glia* 1 (1), S. 2–9. DOI: 10.1002/glia.440010103.

- Sotnikova, T. D.; Beaulieu, J. M.; Gainetdinov, R. R.; Caron, M. G. (2006): Molecular biology, pharmacology and functional role of the plasma membrane dopamine transporter. In: *CNS & neurological disorders drug targets* 5 (1), S. 45–56.
- Steiner, J.; Bernstein, H. G.; Biela, H.; Berndt, A.; Brisch, R.; Mawrin, C. et al. (2007): Evidence for a wide extra-astrocytic distribution of S100B in human brain. In: *BMC Neuroscience* 8, S. 2. DOI: 10.1186/1471-2202-8-2.
- Surin, A. M.; Gorbacheva, L. R.; Savinkova, I. G.; Sharipov, R. R.; Khodorov, B. I.; Pinelis, V. G. (2013): Study on ATP concentration changes in cytosol of individual cultured neurons during glutamate-induced deregulation of calcium homeostasis. In: *Biochemistry Moscow* 79 (2), S. 146–157. DOI: 10.1134/S0006297914020084.
- Syková, Eva (1997): The Extracellular Space in the CNS: Its Regulation, Volume and Geometry in Normal and Pathological Neuronal Function. In: *Neuroscientist* 3 (1), S. 28–41. DOI: 10.1177/107385849700300113.
- Takeda, Hiroshi; Inazu, Masato; Matsumiya, Teruhiko (2002): Astroglial dopamine transport is mediated by norepinephrine transporter. In: *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 366 (6), S. 620–623. DOI: 10.1007/s00210-002-0640-0.
- Theodosios, D.T.; Poulain, D.A.; Oliet, S.H. (2008): Activity-dependent structural and functional plasticity of astrocyte-neuron interactions. DOI: 10.1152/physrev.00036.2007.
- Trotter, J.; Karram, K.; Nishiyama, A. (2010): NG2 cells: properties, progeny and origin. In: *Brain research reviews* 63 (1-2), S. 72–82. DOI: 10.1016/j.brainresrev.2009.12.006.
- Tsien, R. Y. (1998): The green fluorescent protein. In: *Annual review of biochemistry* 67, S. 509–544. DOI: 10.1146/annurev.biochem.67.1.509.
- Ullian, Erik M.; Christopherson, Karen S.; Barres, Ben A. (2004): Role for glia in synaptogenesis. In: *Glia* 47 (3), S. 209–216. DOI: 10.1002/glia.20082.
- Uyeda, C. T.; Eng, L. F.; Bignami, A. (1972): Immunological study of the glial fibrillary acidic protein. In: *Brain Research* 37 (1), S. 81–89. DOI: 10.1016/0006-8993(72)90347-2.
- Verkhatsky, Alexei (2010): Physiology of neuronal–glial networking. In: *Glia as Neurotransmitter Sources and Sensors* 57 (4), S. 332–343. DOI: 10.1016/j.neuint.2010.02.002.
- Verkhatsky, Alexej; Steinhäuser, Christian (2000): Ion channels in glial cells. In: *Brain research reviews* 32 (2–3), S. 380–412. DOI: 10.1016/S0165-0173(99)00093-4.
- Virchow, R. (1858): Die Cellularpathologie in ihrer Begründung auf physiologische und pathologische Gewebelehre. Zwanzig Vorlesungen, gehalten während der Monate Februar, März und April 1858 im pathologischen Institute zu Berlin. 1 Band. Berlin: Verlag von August Hirschwald. Online verfügbar unter <http://www.networkglia.eu/sites/networkglia.eu/files/downloads/Cellularpathologie.pdf>.



- Walz, Wolfgang; Lang, Melody K. (1998): Immunocytochemical evidence for a distinct GFAP-negative subpopulation of astrocytes in the adult rat hippocampus. In: *Neuroscience Letters* 257 (3), S. 127–130. DOI: 10.1016/S0304-3940(98)00813-1.
- Walz, Wolfgang; Mukerji, Srimathie (1988): Lactate release from cultured astrocytes and neurons: A comparison. In: *Glia* 1 (6), S. 366–370. DOI: 10.1002/glia.440010603.
- Wang, D. D.; Bordey, A. (2008): The Astrocyte Odyssey. In: *Progress in Neurobiology* 86 (4), S. 342–367. DOI: 10.1016/j.pneurobio.2008.09.015.
- Warburg, O.; Wind, F.; Negelein, E. (1926): Über den Stoffwechsel von Tumoren im Körper, zuletzt geprüft am 04.05.2016.
- Wasseff, Sameh K.; Scherer, Steven S. (2011): Cx32 and Cx47 mediate oligodendrocyte:astrocyte and oligodendrocyte:oligodendrocyte gap junction coupling. In: *Neurobiology of Disease* 42 (3), S. 506–513. DOI: 10.1016/j.nbd.2011.03.003.
- Wilhelm, Franziska (2010): Der astrogliale NAD<sup>+</sup>/NADH-Redoxzustand: Modulation in vitro und in vivo. Dissertation. Universität Leipzig. Fakultät für Biowissenschaften, Pharmazie und Psychologie.
- Wolburg, Hartwig; Noell, Susan; MacK, Andreas; Wolburg-Buchholz, Karen; Fallier-Becker, Petra (2008): Brain endothelial cells and the glio-vascular complex. In: *Cell Tissue Res* 335 (1), S. 75–96. DOI: 10.1007/s00441-008-0658-9.
- Wu, Jun; Holstein, J. Deborah; Upadhyay, Geeta; Lin, Da-Ting; Conway, Stuart; Muller, Elizabeth; Lechleiter, James D. (2007): Purinergic Receptor-Stimulated IP<sub>3</sub>-Mediated Ca<sup>2+</sup> Release Enhances Neuroprotection by Increasing Astrocyte Mitochondrial Metabolism during Aging. In: *J. Neurosci.* 27 (24), S. 6510–6520. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1256-07.2007.
- Xu, Guangjin; Wang, Wei; Kimelberg, Harold K.; Zhou, Min (2010): Electrical coupling of astrocytes in rat hippocampal slices under physiological and simulated ischemic conditions. In: *Glia* 58 (4), S. 481–493. DOI: 10.1002/glia.20939.
- Yamasaki, Miwako; Yamada, Keiko; Furuya, Shigeki; Mitoma, Junya; Hirabayashi, Yoshio; Watanabe, Masahiko (2001): 3-Phosphoglycerate Dehydrogenase, a Key Enzyme for L-Serine Biosynthesis, Is Preferentially Expressed in the Radial Glia/Astrocyte Lineage and Olfactory Ensheathing Glia in the Mouse Brain. In: *J. Neurosci.* 21 (19), S. 7691–7704. Online verfügbar unter <http://www.jneurosci.org/content/21/19/7691.full>.
- Zanassi, Patrizia; Paolillo, Mayra; Montecucco, Alessandra; Avvedimento, Enrico V.; Schinelli, Sergio (1999): Pharmacological and molecular evidence for dopamine D1 receptor expression by striatal astrocytes in culture. In: *Journal of Neuroscience Research* 58 (4), S. 544–552. DOI: 10.1002/(SICI)1097-4547(19991115)58:4<544::AID-JNR7>3.0.CO;2-9.
- Zerangue, Noa; Kavanaugh, Michael P. (1996): Flux coupling in a neuronal glutamate transporter 383 (6601), S. 634–637. DOI: 10.1038/383634a0.

- Zhang, Ye; Barres, Ben A. (2010): Astrocyte heterogeneity: an underappreciated topic in neurobiology. In: *Neuronal and glial cell biology – New technologies* 20 (5), S. 588–594. DOI: 10.1016/j.conb.2010.06.005.
- Zhao, Y.; Jin, J.; Hu, Q.; Zhou, H. M.; Yi, J.; Yu, Z. et al. (2011): Genetically Encoded Fluorescent Sensors for Intracellular NADH Detection. In: *Cell Metabolism* 14 (4), S. 555–566. DOI: 10.1016/j.cmet.2011.09.004.

## 8 Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar eine Vergütung oder geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Die aktuellen gesetzlichen Vorgaben in Bezug auf die Zulassung der klinischen Studien, die Bestimmungen des Tierschutzgesetzes, die Bestimmungen des Gentechnikgesetzes und die allgemeinen Datenschutzbestimmungen wurden eingehalten. Ich versichere, dass ich die Regelungen der Satzung der Universität Leipzig zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis kenne und eingehalten habe.

.....  
Datum

.....  
Unterschrift