Aus dem Institut für Experimentelle Neurologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

A possible role of the Na^+/K^+-ATPase in the pathomechanism of spreading ischemia.

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Stoigniew Sebastian Major

aus Bendzin/Polen

Datum der Promotion: 10.03.2017

Table of contents

Abstract

Spreading depolarization (SD) is characterized by a sustained neuronal depolarization and near-complete breakdown of the ion gradients across the cellular membranes. The recovery from SD is energy-dependent. Accordingly the local parenchymal ATP concentration falls by 45%. In healthy tissue the increased energy demand is satisfied by a marked rise in cerebral blood flow (CBF), but this hemodynamic response can become inverted under pathologic conditions like subarachnoid hemorrhage, cerebral ischemia or traumatic brain injury. Under this condition SD induces long-lasting vasoconstriction, which spreads together with the depolarization wave in the tissue. In an experimental animal model the resulting spreading ischemia (SI) led to cortical infarcts. SI occurs when SD runs in tissue with increased baseline extracellular potassium ($[K^+]_o$) and depletion of nitric oxide (NO).

In cell culture chronically increased $[K^+]_o$ reduces the activity of the sodium-potassium ATPase (NaKA). Therefore, we tested *in vivo* if direct inhibition of NaKA with ouabain induces SI in rats when the NO concentration is simultaneously decreased.
First we confirmed that chronically increased $[K^+]_o$ also reduces NaKA activity *in vivo*. Notably the α_2/α_3 isoforms were selectively affected. We then found that ouabain, in a concentration selectively inhibiting the α_2/α_3 isoforms, induced SI when NO was simultaneously depleted.

What could be the mechanism underlying this effect of α_2/α_3 NaKA inhibition? The α_2/α_3 isoforms are colocalized with the Na^+/Ca^{2+}-exchanger (NCX) at cell membrane sites adjacent to the (sarco-)endoplasmic reticulum (SER). Inhibition of the α_2/α_3 isoforms decreases the local sodium gradient across the cell membrane, which consequently reduces the amount of Ca^{2+} transported out of the cell by the NCX. The surplus Ca^{2+} is then stored in the SER and might directly increase calcium dependent contractility of vascular smooth muscle cells and pericytes. Their contractility is additionally enhanced by increased Ca^{2+} release from astrocytic SER and consequent release of vasoconstrictive substances from astrocytes. These processes appear to play a specific role for the duration of SI because thapsigargin, depleting Ca^{2+} from the SER, significantly shortened SI.

These results are clinically relevant because we and others showed that SD and SI occur in patients with the above-mentioned diseases and are associated with unfavorable outcome. Better understanding of the pathomechanisms underlying SI may lead to the development of new diagnostic and therapeutic strategies for clinical conditions associated with SD and SI.

Abstract (German)

Spreading Depolarization (SD) zeichnet sich durch einen fast vollständigen Zusammenbruch des neuronalen Membranpotentials aus, der durch massive Ionenverschiebungen zwischen Intra- und Extrazellulärraum verursacht wird. Die Wiederherstellung der physiologischen Ionenkonzentrationen führt bereits nach einer einzigen SD zur Reduktion der ATP-Konzentration im betroffenen Hirngewebe auf etwa 55% des Ausgangsniveaus. Dieser erhöhte Energiebedarf wird im gesunden Hirngewebe durch einen Blutflussanstieg ausgeglichen.

Unter pathologischen Umständen, z.B. nach einer Subarachnoidalblutung, einem Hirninfarkt, oder -trauma, kann es zur Umkehr dieser Blutflussantwort kommen. Dann induziert SD eine anhaltende Vasokonstriktion, die zu einer wandernden Mangeldurchblutung führt (englisch = Spreading Ischemia (SI)) und im Tiermodell kortikale Infarkte verursacht. Experimentell wird SI beobachtet, wenn die extrazelluläre Basis-K^+-Konzentration ($[K^+]_o$) vor der SD erhöht und gleichzeitig die NO-Konzentration ([NO]) erniedrigt ist.

In der Zellkultur reduziert chronische Erhöhung der $[K^+]_o$ die Aktivität der Natrium-Kalium-ATPase (NaKA). Daher haben wir in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob eine direkte Hemmung der NaKA mit Ouabain in Kombination mit [NO]-Erniedrigung bei Ratten zu SI führt.
Zunächst konnten wir auch *in-vivo* bestätigen, dass chronisch erhöhte $[K^+]_o$ die Aktivität der NaKA reduziert, und zwar vorrangig die der α_2/α_3 Isoformen. Dass dieser Mechanismus zur SI beitragen könnte, belegten wir dadurch, dass wir SI auch durch direkte Inhibition der α_2/α_3 Isoformen mit Ouabain bei gleichzeitiger [NO]-Verminderung induzieren konnten.

Auf welche Weise führt eine Hemmung der α_2/α_3 NaKA zu verstärkter SD-induzierter Vasokonstriktion während SI? Die α_2/α_3 Isoformen der NaKA werden gemeinsam mit dem Na^+/Ca^{2+}-Austauscher (NCX) in Bereichen der Plasmamembran exprimiert, die in unmittelbarer Nachbarschaft zum (sarco-)endoplasmatischen Reticulum (SER) liegen. Inhibition der α_2/α_3 Isoformen führt zum Abfall des lokalen Na^+-Gradienten über die Zellmembran. Dadurch kann der NCX weniger Ca^{2+} aus der Zelle heraustransportieren, welches stattdessen vermehrt in das SER gepumpt wird. Daraus resultiert eine direkt verstärkte Ca^{2+}-abhängige Kontraktilität von glatten Gefäßmuskelzellen und Perizyten. Außerdem nimmt ihre Kontraktilität auch indirekt als Folge verstärkter Ca^{2+}-Ausschüttung aus dem astrozytären SER mit nachfolgender Freisetzung vasokonstriktiver Substanzen aus Astrozyten zu. Diese Prozesse scheinen in besonderer Weise eine Rolle für die Dauer der SI zu spielen. So konnten wir SI deutlich verkürzen, indem wir mit Thapsigargin die Ca^{2+}-Konzentration im SER vor der SI-Induktion reduziert haben.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind klinisch relevant, da wir und andere zeigen konnten, dass SD und SI bei den oben erwähnten neurologischen Krankheitsbildern im Patienten auftreten und mit schlechterem Outcome assoziiert sind. Die Entschlüsselung der zugrundeliegenden Pathomechanismen kann zum besseren Verständnis dieser Krankheiten und zur Entwicklung neuer diagnostischer und therapeutischer Strategien beitragen.

Affidavit

I, Stoigniew Sebastian Major certify under penalty of perjury by my own signature that I have submitted the thesis on the topic "A possible role of the Na^+/K^+-ATPase in the pathomechanism of spreading ischemia". I wrote this thesis independently and without assistance from third parties, I used no other aids than the listed sources and resources.

All points based literally or in spirit on publications or presentations of other authors are, as such, in proper citations (see "uniform requirements for manuscripts (URM)" the ICMJE www.icmje.org) indicated. The section on methodology (in particular practical work, laboratory requirements, statistical processing) and results (in particular images, graphics and tables) corresponds to the URM (s.o) and are answered by me. My contribution in the selected publication for this dissertation corresponds to those that are specified in the following joint declaration with the responsible person and supervisor.

The importance of this affidavit and the criminal consequences of a false affidavit (section 156,161 of the Criminal Code) are known to me and I understand the rights and responsibilities stated therein.

Date _____ Signature

Detailed Declaration of Contribution

Sebastian Major had the following share in the following publication:

> Publication: Sebastian Major, Gabor C. Petzold, Clemens Reiffurth, Olaf Windmüller, Marco Foddis, Ute Lindauer, Eun-Jeung Kang and Jens P Dreier, **A role of the sodium pump in spreading ischemia in rats**, Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism, 2016. http://dx.doi.org/10.1177/0271678X16639059.
> Contribution in detail: Sebastian Major worked on design, performed and analyzed all experiments in groups 4-10, 12-15, 23 and 24 (all together 89 *in-vivo* experiments). Further, he analysed the experiments in groups 21 and 22, interpreted the data, wrote the initial version of the manuscript, prepared the manuscript for submission and took part in revising the study according to the reviewer's comments.

Signature, date and stamp of the supervising University teacher

_____

Signature of the doctoral candidate

_____

ISI Web of Knowledge

Journal Citation Reports®

WELCOME HELP

2014 JCR Science Edition

Journal Summary List

Journal Title Changes

Journals from: subject categories NEUROSCIENCES VIEW CATEGORY SUMMARY LIST

Sorted by: Impact Factor SORT AGAIN

Journals 1 - 20 (of 252) [*1* | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10] **Page 1 of 13**

MARK ALL UPDATE MARKED LIST

Ranking is based on your journal and sort selections.

Mark	Rank	Abbreviated Journal Title *(linked to journal information)*	ISSN	JCR Data						*Eigenfactor*® Metrics	
				Total Cites	Impact Factor	5-Year Impact Factor	Immediacy Index	Articles	Cited Half-life	*Eigenfactor*® Score	*Article Influence*® Score
	1	NAT REV NEUROSCI	1471-003X	32989	31.427	38.997	3.712	59	7.4	0.08289	16.894
	2	TRENDS COGN SCI	1364-6613	20396	21.965	22.500	3.150	60	8.3	0.04585	9.498
	3	BEHAV BRAIN SCI	0140-525X	7562	20.771	24.308	2.750	20	>10.0	0.01103	10.686
	4	ANNU REV NEUROSCI	0147-006X	13226	19.320	25.920	1.320	25	>10.0	0.02423	13.624
	5	NAT NEUROSCI	1097-6256	50204	16.095	17.154	4.276	221	7.7	0.15492	8.821
	6	NEURON	0896-6273	77446	15.054	16.839	3.221	399	8.2	0.22320	8.682
	7	MOL PSYCHIATR	1359-4184	14510	14.496	13.834	3.152	151	5.4	0.04317	5.007
	8	TRENDS NEUROSCI	0166-2236	19082	13.555	14.695	2.441	68	>10.0	0.03363	6.266
	9	ACTA NEUROPATHOL	0001-6322	13098	10.762	9.762	2.500	116	6.7	0.03329	3.483
	10	BIOL PSYCHIAT	0006-3223	40812	10.255	10.359	2.667	210	7.7	0.07948	3.553
	11	PROG NEUROBIOL	0301-0082	11430	9.992	10.487	2.839	62	9.4	0.02014	3.553
	12	ANN NEUROL	0364-5134	32934	9.977	10.792	1.970	167	9.9	0.06054	4.176
	13	J PINEAL RES	0742-3098	6906	9.600	7.227	1.862	87	5.9	0.00816	1.120
	14	BRAIN	0006-8950	44379	9.196	10.418	2.422	244	8.5	0.08489	3.846
	15	NEUROSCI BIOBEHAV R	0149-7634	16868	8.802	10.528	1.657	198	6.4	0.04123	3.596
	16	CEREB CORTEX	1047-3211	26191	8.665	8.335	2.043	282	6.7	0.06927	3.290
	17	SLEEP MED REV	1087-0792	3919	8.513	9.258	2.062	48	6.6	0.00959	3.247
	18	SOC COGN AFFECT NEUR	1749-5016	3937	7.372	7.332	0.888	250	3.3	0.01563	2.590
	19	NEUROPSYCHOPHARMACOL	0893-133X	22005	7.048	8.168	1.582	292	6.4	0.05006	2.643
	20	FRONT NEUROENDOCRIN	0091-3022	3146	7.037	9.656	2.556	36	5.9	0.00801	3.212

MARK ALL UPDATE MARKED LIST

Journals 1 - 20 (of 252) [*1* | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10] **Page 1 of 13**

Journal Summary List

Journal Title Changes

Journals from: subject categories NEUROSCIENCES VIEW CATEGORY SUMMARY LIST

Sorted by: Impact Factor SORT AGAIN

Journals 21 - 40 (of 252) [1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10] **Page 2 of 13**

MARK ALL UPDATE MARKED LIST

Ranking is based on your journal and sort selections.

Mark	Rank	Abbreviated Journal Title (linked to journal information)	ISSN	JCR Data						*Eigenfactor*® Metrics	
				Total Cites	Impact Factor	5-Year Impact Factor	Immediacy Index	Articles	Cited Half-life	*Eigenfactor*® Score	*Article Influence*® Score
☐	21	NEUROSCIENTIST	1073-8584	3821	6.837	6.675	1.708	48	7.1	0.00882	2.404
☐	22	CURR OPIN NEUROBIOL	0959-4388	12732	6.628	7.284	1.604	164	8.2	0.03380	3.559
☐	23	MOL NEURODEGENER	1750-1326	2058	6.563	5.709	0.672	58	3.7	0.00873	1.797
☐	24	NEUROIMAGE	1053-8119	78028	6.357	7.289	1.500	1033	6.5	0.17239	2.257
☐	25	J NEUROSCI	0270-6474	173265	6.344	7.348	1.188	1486	8.0	0.38326	2.862
☐	26	GLIA	0894-1491	11659	6.031	5.511	1.980	147	7.4	0.02283	1.782
☐	27	HUM BRAIN MAPP	1065-9471	16505	5.969	6.687	1.176	454	6.0	0.04232	2.288
☐	28	BRAIN BEHAV IMMUN	0889-1591	8218	5.889	5.895	1.278	205	4.7	0.02239	1.728
☐	29	J PSYCHIATR NEUROSCI	1180-4882	2491	5.861	6.789	0.902	41	6.0	0.00622	2.175
☐	30	BRAIN STRUCT FUNCT	1863-2653	2478	5.618	6.935	1.354	147	3.8	0.01071	2.435
☐	31	MOL AUTISM	2040-2392	577	5.413	5.821	0.442	52	2.4	0.00308	2.045
☐	32	J NEUROINFLAMM	1742-2094	5318	5.408	5.632	0.605	215	3.2	0.01820	1.524
☑	33	J CEREBR BLOOD F MET	0271-678X	15903	5.407	5.455	0.974	232	8.0	0.02926	1.785
☐	34	CURR OPIN NEUROL	1350-7540	4789	5.307	5.004	0.828	87	6.0	0.01265	1.732
☐	35	PAIN	0304-3959	31705	5.213	6.241	1.239	284	9.6	0.05060	2.160
☐	36	MOL NEUROBIOL	0893-7648	4012	5.137	5.460	1.209	206	4.0	0.01026	1.509
☐	37	CORTEX	0010-9452	6768	5.128	5.014	0.966	178	5.8	0.01690	1.623
☐	38	NEUROPHARMACOLOGY	0028-3908	16524	5.106	4.823	1.182	417	6.0	0.03722	1.454
☐	39	NEUROBIOL DIS	0969-9961	12714	5.078	5.298	1.142	275	5.4	0.03304	1.662
☐	40	NEUROTHERAPEUTICS	1933-7213	2584	5.054	5.821	1.319	72	4.5	0.00909	1.829

MARK ALL UPDATE MARKED LIST

Journals 21 - 40 (of 252) [1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10] **Page 2 of 13**

A role of the sodium pump in spreading ischemia in rats

Sebastian Major, Gabor C. Petzold, Clemens Reiffurth, Olaf Windmüller, Marco Foddis, Ute Lindauer, Eun-Jeung Kang, Jens P. Dreier

Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism

First published date: March-18-2016

http://dx.doi.org/10.1177/0271678X16639059