

Aus dem Institut Neurowissenschaftliches Forschungszentrum
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Verbesserte Methoden zur Erfassung mikrofluorimetrischer
Signale am Beispiel der Autofluoreszenz von FAD und
NAD(P)H zur Analyse des Energiebedarfs hippokampaler
neuronaler Funktionen

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum medicinalium (Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Jörg Rösner

aus Königs Wusterhausen

Datum der Promotion: 22.09.2017

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	3
Eidesstattliche Versicherung mit Anteilserklärung	22
Druckexemplare der ausgewählten Publikationen	
1. Publikation	24
2. Publikation	30
3. Publikation	39
Lebenslauf	50
Komplette Publikationsliste	51
Danksagung	52

Zusammenfassung

Abstrakt

Die „Light Emitting Diode“ (LED) als Beleuchtungseinheit in der Mikroskopie hat in den letzten Jahren einen festen Platz eingenommen. Dies betrifft nicht nur die Durchlichtmikroskopie sondern auch weite Bereiche in der Fluoreszenzmessung und Optogenetik. Ihre Vorteile liegen u.a. in der Lebensdauer, stufenlosen Regulierbarkeit der Intensität und einer periodischen Ansteuerbarkeit im μs Bereich. Gleichzeitig gab es auf dem Gebiet der Fotodetektion mit dem Einzug der „Avalanche Photodiode“ (APD) und weiterentwickelten Hybriddetektoren eine Verbesserung in der Quanteneffizienz (QE) im Vergleich zum „Photomultiplier Tube“ (PMT).

Begründet aus dieser Entwicklung ergab sich die Frage, ob eine Verbesserung in Bezug auf Fotobleichen in biologischen Experimenten bei einer kombinierten Anwendung von LED und APD erreicht werden kann. Im Mittelpunkt der Arbeit stand die Entwicklung und Erprobung von optischen, elektronischen und mechanischen Komponenten an einem Mikroskopsystem. Mit den neuen Aufbauten wurde eine Reihe von biologischen Experimenten durchgeführt. So konnten die intrinsischen Fluoreszenzen von Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat und Flavin-Adenine-Dinucleotid (NAD(P)H und FAD) parallel untersucht und kombiniert werden mit einem Vergleich von Fotodetektoren bezüglich Sensitivität und Signal-Rausch Verhältnis in Human Embryonic Kidney (HEK) 293 Zellen und akuten Hirnschnitten der Ratte. Zu Beginn wurde die Erholung nach dem Bleichen von NAD(P)H in HEK293 Zellen in Abhängigkeit des Substrates (Glukose, 2-deoxy-D-Glukose, Laktat) aufgezeichnet. Um die Beteiligung astrozytärer Laktatzufuhr im Energiemetabolismus der Nervenzellen zu testen, haben wir Stimulus induzierte Veränderungen der NAD(P)H/FAD Fluoreszenz in hippokampalen Gehirnschnitten mit und ohne Blockade der Laktattransporter aufgezeichnet.

Wir konnten zeigen, dass eine mit Pulsen angesteuerte LED im Vergleich zur kontinuierlichen Beleuchtung mit einer LED zu weniger Fotobleichen ohne Verluste an Fluoreszenzintensität bei der Aufzeichnung von FAD führte. Die empirisch ermittelten Parameter an Belichtungszeit und Frequenz sind 5 Hz und 5 ms.

Bei allen Experimenten konnte die Überlegenheit der LED gegenüber Quecksilberdampflampen aufgezeigt und genutzt werden. Insbesondere bei der parallelen Aufzeichnung von NAD(P)H und FAD bei Untersuchungen zum Zellmetabolismus kamen die Vorteile der LED zum Tragen.

Abstract

In recent years Light Emitting Diodes (LEDs) became a preferred component for use in microscopy applications. Not only as light sources for transmitted light microscopy but also as excitation light sources for fluorescent microscopy and optogenetics. The advantages of LEDs are the enhanced life-span, the stepless intensity regulation and their switching capability in the μ s range. At the same time, semiconductor-based photodetectors gained a foothold by the introduction of avalanche photodiodes (APDs) and different forms of 'hybrid' detectors with improved quantum efficiency (QE) as compared to conventional photomultiplier tubes (PMTs). Due to these developments it was plausible to ask whether a replacement of the fluorescent light source and detector by an LED and APD combination would decrease the photo-bleaching in experiments with sensitive biological preparations. The central aim of the study was the design and technological development of the optical, electrical and mechanical components for such a replacement on a commercially available microscope system. By using the novel system we made parallel recordings of the intrinsic fluorescence of Nicotinicacid-Adenine-Dinucleotide-Phosphate und Flavin-Adenine-Dinucleotide (NAD(P)H and FAD), in combination with the comparison of different photo-detectors with respect to their sensitivity and signal-to-noise ratio in Human Embryonic Kidney (HEK) 293 cells and in rat brain slices.

First, we monitored photo-bleaching and metabolism dependent recovery of NAD(P)H fluorescence in HEK293 cells in dependence of available substrates (glucose, 2-deoxy-glucose and lactate). In order to identify the contribution of astrocytic-neuronal lactate shuttle to energy metabolism, we measured stimulus induced changes in NAD(P)H / FAD fluorescence in hippocampal slices in the presence and absence of lactate transport inhibitors.

We have shown that a pulsed LED illumination protocol achieved reduced photobleaching with the same fluorescence yield of FAD as compared to continuous illumination. The empirical optimum of the illumination parameters with our system were 5 Hz and 5 ms with respect to pulse duration and frequency.

In all of these experiments LEDs demonstrated a clear benefit in comparison with conventional Mercury arc lamps. LED excitation was of particular advantage for parallel recordings of NAD(P)H and FAD fluorescence in studies of energy metabolism.

1. Einleitung	7
1.1. Bedeutung der Autofluoreszenzen NAD(P)H und FAD im Zellmetabolismus	7
1.2. Anwendung von Lichtquellen in biologischen Systemen	7
1.3. Hochleistungs-LEDs und APDs mit hoher Quanteneffizienz	8
1.4. Zielsetzung	10
2. Methodik	11
2.1. Die verwendeten Nährlösungen und biologischen Präparate	11
2.2. Pharmaka	11
2.3. Perfusionskammer	11
2.4. Stimulations-, Messelektroden und ihre Verstärker	11
2.5. Datenanalyse	12
3. Ergebnisse	12
3.1. Optischer und mechanischer Aufbau zur Aufzeichnung von NAD(P)H und FAD	12
3.2. Aufzeichnung beider Autofluoreszenzen im Multiplexbetrieb	13
3.3. Vergleich des Fotobleichen von LED und HBO-Lampe in HEK293 Zellen	14
3.4. Messung von NAD(P)H mit unterschiedlichen Fotodetektoren	14
3.5. Fotobleichen der HEK293 Zellen unter Zugabe von 2-deoxy-D-Glukose und Laktat	15
3.6. Optimierung des Fotobleichen von FAD durch gepulste LED Beleuchtungsprotokolle	15
3.7. Veränderungen des FAD und NAD(P)H bei aufeinanderfolgender Blockade des Energietransportes	17
4. Diskussion	18
4.1. Zusammenfassung	18
4.2. Vergleich von LED und Quecksilberdampf Lampe	18
4.3. Vergleich der Fotodetektoren	19
4.4. Parallele Messung der Emissionsspektren von NAD(P)H und FAD	19
4.5. Erfahrungen beim Arbeiten mit der Clark Elektrode	19
4.6. Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität vom Beleuchtungsprotokoll	19
4.7. Ausblicke	20

Abkürzungen:

4CIN	4- α -cyano- hydroxycinnamate
ACSF	Artificial cerebrospinal fluid
APD	Avalanche-Photodiode bzw. Lawinenphotodiode
CA1 und 3	Cornu Ammonis 1 und 3
CCD	Charge-coupled Device
FAD	Flavin-Adenine-Dinucleotid
FLIM	Fluorescence lifetime imaging
FRAP	Fluorescence recovery after photobleaching
GaAsP Detektor	Gallium Arsenid Phosphid Detektor
HBO/HXP Lampe	Quecksilberdampf Lampe
HEK	Human Embryonic Kidney
LED	Light-Emitting Diode
MCT 1/2	Monocarboxylate Transporter 1/2
MPPC	Multi-Pixel Photon Counter
NAD(P)H	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
PMT	Photomultiplier Tube
pO ₂	Sauerstoff-Partialdruck
QE	Quanteneffizienz

1. Einleitung

1.1. Bedeutung der Autofluoreszenzen NAD(P)H und FAD im Zellmetabolismus

NAD(P)H besitzt autofluoreszierende Eigenschaften (Mayevsky A. und Chance B. 1975). Seine Schreibweise steht für die Nukleotide NADPH und NADH. Ihre Anregungs- und Emissionsspektren sind identisch, ihre Entstehungsorte jedoch nicht. NADPH ist ein Produkt des im Zytosol der Zelle ablaufenden Pentosephosphatweges und des Malat Enzyms. NADH entsteht durch den Citratzyklus und der β -Oxidation in den Mitochondrien sowie durch Glykolyse. Mit der Messung dieser Autofluoreszenz erhalten wir Aufschluss über oxidative und reduktive Veränderungen im Zellmetabolismus (Chance B. et al., 1962) und zusammen mit Messungen der Sauerstoffkonzentration einen Einblick in die Energiebilanz des Nervengewebes.

FAD besitzt ebenfalls autofluoreszierende Eigenschaften. Es gehört zur Gruppe der Flavine. Die Intensität seiner Fluoreszenz ist geringer und das Emissionsspektrum langwelliger im Vergleich zu NAD(P)H. NAD(P)H und FADH₂ werden in der Zelle als Reduktionsmittel genutzt, wobei sie Elektronen abgeben und so Sauerstoff zu Wasser reduzieren. FAD und NAD⁺ werden in der Zelle als Oxidationsmittel genutzt, sie werden dabei selbst reduziert und nehmen Elektronen auf. Die in Abb. 1 dargestellte

Grafik zeigt die parallel aufgenommenen Veränderungen von FAD und NAD(P)H nach elektrischer Stimulation in der CA1 Region des Hippocampus einer Ratte mit einem dafür selbst aufgebauten Mikroskopsystem. „Peak“ und „overshoot“ bedeuten dabei eine Zunahme von FAD und NAD(P)H Fluoreszenz und einer Abnahme von FADH₂ und NAD⁺, „dip“ und „undershoot“ ist der gegenläufige Prozess beider Vorgänge.

1.2. Anwendung von Lichtquellen in biologischen Systemen

Die Anregungswellenlänge von NAD(P)H liegt im UV Bereich des Lichtes (360 nm). Licht dieser Wellenlänge ist energiereicher als elektromagnetische Wellen im sichtbaren Bereich. Daraus resultieren mehr Fotobleicheffekte bei biologischen Experimenten.

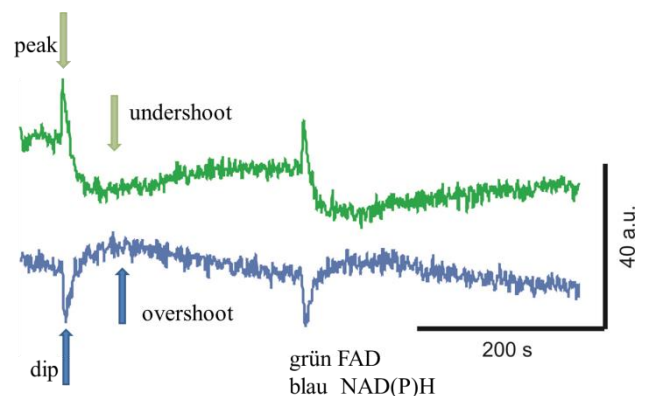


Abbildung 1 Typische Signalantwort von NAD(P)H und FAD nach zweimaliger elektrischer Stimulation in der CA1 des Hippocampus (FENS 2016)

Die Anregungswellenlänge von FAD liegt im blauen Bereich des Lichtes (450 nm). Dieses Licht ist ärmer an Energie als UV Licht, wodurch toxische- und Fotobleicheffekte geringer ausfallen. Ein weiterer Vorteil bei der Aufzeichnung von FAD liegt darin, dass deren Redoxreaktion hauptsächlich im Mitochondrium durch β -Oxidation und im Citratzyklus stattfindet (Kunz WS. und Kunz W. 1985). Eine Trennung von Anteilen aus der Glykolyse wie beim NAD(P)H entfällt und ein direkter Einblick in den Energiehaushalt der Mitochondrien ist gegeben. Unterschiedliches Verhalten der beiden Autofluoreszenzen erlaubt möglicherweise einen Einblick in extramitochondriale Vorgänge.

Durch Lichtzufuhr werden zusätzlich zum Metabolismus FAD Moleküle in FADH₂ in einem mehrstufigen Prozess (Fotoreduktion) umgewandelt. Da die Fluoreszenzintensität des FADH₂ in dem blauen Bereich geringer ist, kann Fotoreduktion zum Bleichen beitragen. Fotobleichen beinhaltet reversible und irreversible Komponenten. Fotodekomposition als irreversibler Bestandteil des Fotobleichens zerstört bei diesem Kreislauf Moleküle und verhindert deren Rückkehr in den erregbaren Ausgangszustand, während fotoreduziertes FADH₂ im Metabolismus wieder oxidiert werden kann. Fotodekomposition hat wesentlichen Einfluss auf den Energiemetabolismus und dadurch auch auf die Lebensfähigkeit biologischer Proben.

Die Anregung der Autofluoreszenzen NAD(P)H und FAD erfolgt in der bisherigen Praxis über HBO/HXP Lampen oder mit einem Titan Saphir Laser in der 2 Photonen Mikroskopie. Nachteile der HBO/HXP Lampen sind ihre hohe Erwärmung, die schlechte Regulierbarkeit ihrer Lichtleistung, die nur über Filter möglich ist und damit nicht stufenlos, die geringe Stundenleistung (200-300 h für HBO und ca. 1000 h für HXP) im Vergleich zur LED und ihr breites Lichtspektrum, was unter Umständen mit einer erhöhten Fototoxizität einhergeht.

Die Installation eines 2 Photonen Mikroskops hat die Vorteile von hohen Eindringtiefen in das biologische Gewebe durch den Laser und eines konfokalen Effektes in der Fokusebene, ist aber aufwendig, kosten- und wartungsintensiv im Vergleich zum Einsatz von HBO/HXP Lampen und LEDs.

1.3. Hochleistungs-LEDs und APDs mit hoher Quanteneffizienz

LEDs besitzen eine hohe Lichtausbeute bei geringer Erwärmung, ein schmales Emissionsspektrum, eine hohe Lebensdauer von bis zu 100.000 Stunden, eine kleine Baugröße und die Möglichkeit einer direkten Ansteuerung mit einer Frequenz bis in den MHz-Bereich. LEDs können eine einzelne, mehrere fixe Wellenlängen oder ein Spektrum unterschiedlicher Breiten an Licht emittieren. In der Fluoreszenzmikroskopie finden LEDs mit einer festen Wellenlänge die häufigste Anwendung. Für die Detektion unterschiedlicher Fluoreszenzbereiche erfolgt ein

optischer Aufbau aus mehreren Filtern und Strahlenteilern. Obwohl dieser Aufbau technisch aufwendiger ist als der Einsatz einer Weißlicht-LED, bleibt der Vorteil des schmalen (ca. 10 nm) Emissionsspektrums erhalten. Der Einsatz von Weißlicht-LEDs beschränkt sich häufig auf die Durchlichtmikroskopie. Ihr technologischer Schwachpunkt liegt beim Emittieren im Bereich um 500 nm (Reynolds U., 2015). Anwendungen in der Fluoreszenzmikroskopie sind bei weit auseinanderliegenden Spektren der Farbstoffe denkbar.

Zur Aufnahme von Fluoreszenzen eignen sich u.a. CCD Kameras, Fotodioden, PMTs und APDs, sowie Kombinationen in Hybridtechnologie. CCD Sensoren bestehen aus einer Zeile oder häufiger aus einer Matrix lichtempfindlicher Zellen, deren Basis eine Fotodiode ist. Sie besitzen eine räumliche Auflösung. Ihre QE liegt bei ca. 50-80 %, bei Back-Illuminated CCDs bei 90 %. Deren Anschaffungskosten sind sehr hoch. Abb. 2 zeigt die Leistungsfähigkeit von Back Illuminated CCDs und unserer LED an einem Spinning Disk System (Yokogawa, Japan).

Beim PMT setzen auftreffende Photonen auf der Fotokathode Elektronen frei, die in einem elektrischen Feld beschleunigt werden und über eine kaskadenförmige Anordnung der Dynoden des PMTs

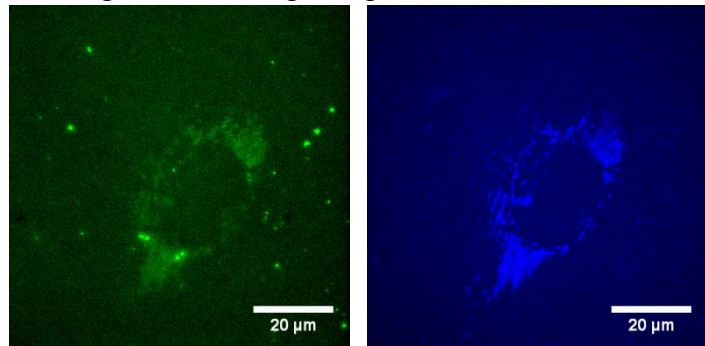


Abbildung 2 FAD (grün) und NAD(P)H (blau) von Astrozyten durch Anregung mit LEDs (60x0.9W Olympus), (noch nicht publiziert)

verstärkt werden. Die hohe Verstärkung von 10^6 – 10^7 ergibt einen messbaren Strom. Der PMT besitzt eine hohe zeitliche Auflösung im ns Bereich, aber keine räumliche Erfassung. Die QE von PMTs liegt je nach Beschichtung der Fotokathode und des zu messenden Spektralbereiches bei ca. 0,1 %-30 %.

Fotodioden sind eine in Sperrichtung betriebene Halbleiterdiode und gehören demzufolge zu den Halbleiterdetektoren. Sie benötigen für eine effiziente Messung geringer Fluoreszenzen eine nachgeschaltete hohe Verstärkung. Ein spezieller Typ der Fotodiode ist die APD, von denen einige sich in einem besonders sensitiven Arbeitsbereich betreiben lassen – dem Geigermodus: Dioden leiten im normalen Fall den Strom nur in einer Richtung. Wird aber diese spezielle APD im Bereich ihrer Durchbruchspannung betrieben, wird ein starkes elektrisches Feld erzeugt. Das Auftreffen eines Photons auf die APD Fläche führt zu kurzzeitig elektrisch leitenden Eigenschaften in Sperrichtung und damit erfolgt die Abgabe eines Pulses. Danach wird die Diode zurückgesetzt. Diese Methode ermöglicht die Detektion von Einzelphotonen oder schwachen Fluoreszenzen bei Anregung mit geringer Lichtleistung. Die QE dieser speziellen APDs liegt bei ca. 50-80 %. Sie

besitzt eine hohe zeitliche Auflösung im ps Bereich, aber keine räumliche. Der Nachteil dieser APDs liegt in der hohen Anzahl von „dark counts“, das im Rauschen ersichtlich ist, und dem geringen dynamischen Arbeitsbereich.

Eine weitere Entwicklung auf dem Gebiet von Detektoren mit verbesserter QE stellen für den sichtbaren Bereich des Lichtes Gallium Arsenid Phosphid (GaAsP) Detektoren dar. Sie zeichnen sich durch eine höhere QE im Vergleich zu PMTs aus (<http://cam.facilities.northwestern.edu/588-2/gaasp-detectors/>).

1.4. Zielsetzung

Wir werden ein Mikroskop-System der Firma Leica Microsystems konstruktiv so verändern, dass mit einer UV LED und im weiteren Verlauf mit zwei LEDs (blau und UV) gearbeitet werden kann. Ziel ist dabei die parallele Messung von NAD(P)H und FAD bei einer korrekten Trennung beider Emissionskanäle. Da sich beide Spektren überlagern (Egly D. et al., 2012), werden wir optische und elektronische Komponenten entwickeln, die ein Übersprechen der Kanäle vermeiden. Für eine weitere Verbesserung der Trennung der Spektren und einer zeitnahen Aufnahme erfolgt eine Aufteilung auf zwei separate Detektoren.

Die dazu begleitenden Experimente werden ein breites biologisches Spektrum umfassen. Wir werden Bleich- und Erholungseffekte mit unterschiedlichen Lichtquellen an HEK293 Zellen anhand der Fluoreszenzintensität von NAD(P)H analysieren. Dabei wird auch eine getrennte Analyse des NAD(P)H Signals aus den Mitochondrien und der Glykolyse durchgeführt. Über die Aufzeichnung der Intensität von NAD(P)H durch elektrische Stimulation in den Schaffer-Kollateralen und Aufzeichnung in der CA1 Region des Hippocampus der Ratte, wird die Sensitivität verschiedener Fotodetektoren untersucht. Wichtig dabei ist eine Optimierung zwischen Anregungsleistung durch die LED und Verstärkung des Detektors zu finden, um ein Optimum zwischen Bleichen und Rauschen zu erreichen.

Um das Fotobleichen weiter zu reduzieren, werden wir eine optimale Belichtungszeit und Frequenz zur Ansteuerung der LED ermitteln. Es erfolgt ein Vergleich zwischen gepulster und kontinuierlicher Beleuchtung bei der Aufzeichnung von FAD.

Mit einer parallelen Aufzeichnung der Autofluoreszenzen NAD(P)H und FAD über eine elektronische Triggerbox wird der Einfluss der Gliazellen bei der Bereitstellung von Laktat für Neurone untersucht.

Mit Hochleistungs-LEDs und aus neuen Technologien hervorgegangene Detektoren werden wir Vorteile in Bezug auf Fotobleichen bei der Aufzeichnung der Autofluoreszenzen NAD(P)H und

FAD an ausgewählten Experimenten in HEK293 Zellen und akuten Hirnschnitten der Ratte nachweisen.

2. Methodik

2.1. Die verwendeten Nährlösungen und biologischen Präparate

Die Zusammensetzung der Lösungen zum Aufbewahren und Experimentieren mit den HEK293 Zellen und akuten Hirnschnitten der Ratte sind in den Publikationen, die Gegenstand meiner Arbeit sind, dargelegt. Ebenfalls beinhalten die Publikationen eine Beschreibung zur Präparation von Hirnschnitten und dem vorbereitenden Arbeiten für die Experimente mit HEK293 Zellen.

2.2. Pharmaka

Bei den Experimenten in den HEK293 Zellen kamen 2-deoxy-D-Glukose (10 mM) und Laktat (1 mM), (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) zum Einsatz. Bei der Aufzeichnung von FAD unter Blockade des Transportes von Laktat und Pyruvat wurde 4- α -cyano- hydroxycinnamate (4CIN, 200 μ M) verwendet (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland).

2.3. Perfusionskammer

An dem Zeiss Mikroskop-System kam eine Kammer aus den konstruktiven Vorgaben von Hill M.R.H. und Greenfield S.A., 2011 zum Einsatz. Sie erlaubte eine bessere Begasung mit Carbogen auf der Unter- und Oberseite des Hirnschnittes. Ein weiterer Vorteil liegt im Erzeugen eines Unterdrucks (Bernoulli-Effekt) auf den Schnitt und damit ein Ansaugen an die Kammeroberfläche. Die autofluoreszierende Eigenschaft der aus Acryl bestehenden Kammer erschwerte die Messung von NAD(P)H und FAD. Wir ersetzten das Kammermaterial durch PVC.

2.4. Stimulations-, Messelektroden und ihre Verstärker

Es wurden mit Platindraht-Elektroden im Stratum radiatum die Schaffer-Kollateralen stimuliert und Reizantworten in der CA1 und CA3 aufgenommen. In Abhängigkeit der durchgeführten Experimente veränderten sich die Stimulationsparameter (100 Hz oder 20 Hz, 2 s oder 5 s, 40 V oder 20 V). Als Funktionsgenerator diente ein Master 8 (A.M.P.I., Israel). Die Sauerstoffmessung erfolgte über eine drei-Punkte-Kalibration (0 %, 20 % oder 95 % O₂) mit einer Clark Elektrode, mit einer Platinkathode und Silberanode (Spitze 10 μ m, Unisense, Aarhus, Dänemark). Verwendet wurde ein Polarographic Verstärker (Chemical Microsensor II, Diamond General Development, Carlsborg, USA). Die Sauerstoffsignale konnten parallel zu anderen Signalen aufgezeichnet werden. Die Aufnahme der Detektorsignale erfolgte am Leica-System durch Einkopplung über

das analog/digital (A/D) Bord, am Zeiss-System über einen separaten A/D Wandler (1401, CED Großbritannien). Alle drei Detektoren waren von Hamamatsu, Japan (PMT R6357, MPPC S10362-11-100, Fotodiode S1227-66BR) und wurden an die gleiche Position des Leica-Systems positioniert. Der PMT (Seefelder Messtechnik, Seefeld, Deutschland) am Zeiss-System hatte einen externen Verstärker derselben Firma.

2.5. Datenanalyse

Zum Aufzeichnen und zur Analyse der Fluoreszenzdaten wurde die Software eines modifizierten konfokalen Lasermikroskops (SP2, Leica Microsystems, Mannheim, Deutschland) verwendet. Aufzeichnungen in Verbindung mit der Datenaufnahme von Sauerstoffkonzentrationen und NAD(P)H/FAD erfolgte mit der Software Spike 2 (Cambridge Electronic Design, Cambridge, Großbritannien). Zur Auswertung der Experimente mit den HEK293 Zellen stand MATLAB 7.1 (The MathWorks Inc. Natick, MA, USA) zur Verfügung. Die Auswertung von Experimenten bei der Messung von NAD(P)H und FAD allein und in Verbindungen mit Veränderungen in der Sauerstoffkonzentration an akuten Hirnschnitten erfolgte über Microsoft Excel sowie IBM SPSS Statistics, USA. Die Konstruktion der elektronischen Schaltung für die Triggerbox erfolgte rechnerorientiert (Protel 99 SE, Atlium, USA).

Die Absorptionsspektren von FAD, NAD(P)H und 4CIN wurden mit einem Fotospektrometer (NanoDrop 1000, Thermo Scientific, USA) aufgenommen. Die Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler dargestellt. Die Anzahl der Experimente beliefen sich zwischen $n=7$ bis $n=11$.

3. Ergebnisse

3.1. Optischer und mechanischer Aufbau zur Aufzeichnung von NAD(P)H und FAD

Für die meisten Experimente kam ein konfokales Lasermikroskop (SP2 Leica Microsystems, Mannheim) zur Anwendung. Daran wurden Veränderungen und Ergänzungen in optischen, mechanischen und elektronischen Aufbauten vorgenommen. Die Einkopplung einer auf einen Kühlkörper montierten UV LED (365 ± 10 nm NCSU 0 33A, Nichia, Japan) erfolgte mit Hilfe eines xyz-Tisches (MT3/M, Thorlabs, USA) an der Auflichtachse des Mikroskops (LFSA, Leica, Wetzlar, Deutschland). Unmittelbar hinter der LED befand sich ein Reflektor, der den Abstrahlwinkel der LED parallelisierte (Abb. 3). Der sonst übliche Einsatz eines Kollimators war nicht möglich. Kollimatoren bestehen im Regelfall aus Acryl und dieses Material besitzt eine hohe UV Absorption. Die Strombegrenzung der LED erfolgte an einem handelsüblichen Stromversorgungsgerät. Die zum Vergleich dienende HBO Lampe wurde an gleicher Stelle über eine Faser eingekoppelt. Die Belichtungszeit regelte ein Shutter. Der Aufbau wurde eingesetzt bei

der Messung von NAD(P)H. Für die Messung von FAD erfolgte eine Erweiterung im optischen Strahlengang durch den Einsatz einer blauen LED (460 ± 5 nm, Z-power LED X32380, Seoul Semiconductor, Korea). Eine detaillierte Angabe aller verwendeten Filter und Strahlenteiler sowie eine schematische Darstellung des Strahlengangs sind publiziert in Rösner J. et al., 2013.

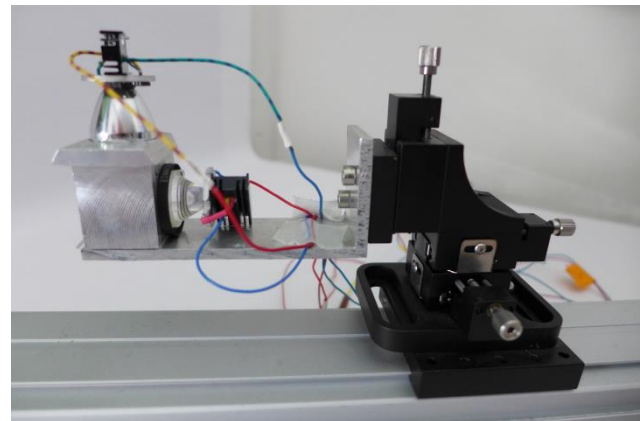


Abbildung 3 Konstruktiver Aufbau der LEDs am xyz Tisch (FENS 2016)

Der Schwachpunkt der an konfokalen Systemen eingesetzten PMTs liegt in der QE. Obwohl der am Leica-System eingebaute PMT (R6357, Hamamatsu, Japan) als hoch sensitiv eingestuft wird, beträgt seine QE bei

$500 \text{ nm} < 30 \%$. Der zum Vergleich ausgewählte Multi-Pixel Photon Counter (MPPC S10362-11-100U) hat dagegen eine QE bei 500 nm von 45% (Datenblätter, Hamamatsu, Japan). Das Signal der Fotodiode (S1227-66BR Hamamatsu, Japan) ist nur über einen separaten Verstärker vergleichbar. Bei der Auswahl der zum Vergleich dienenden Detektoren wurde auf ähnliche Parameter in Bezug auf Anschaffungskosten sowie zeitliche und räumliche Auflösung geachtet.

3.2. Aufzeichnung beider Autofluoreszenzen im Multiplexbetrieb

Um NAD(P)H und FAD Fluoreszenz zeitgleich oder zumindest nahe zeitgleich aufzeichnen zu können, war der Einsatz neuer LEDs (UV 385 nm, blau 470 nm beide THORLABS, USA) vorgesehen. Ihre Veränderung war notwendig, um die optischen Parameter der neu benötigten Filter zu erfüllen. Die neuen Komponenten sind in Abb. 4 ersichtlich. Zum Einsatz kamen Filter und Strahlenteiler, die beide Anregungs- und Emissionsspektren der Autofluoreszenzen passieren ließen. Trotz ihrer hohen Reflexion

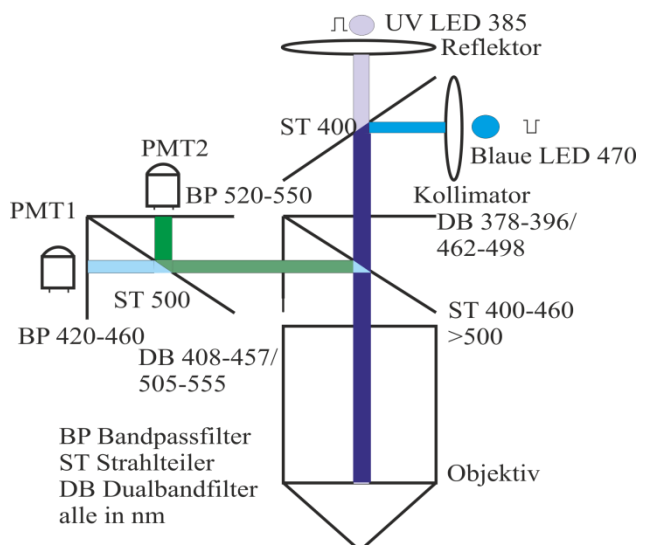


Abbildung 4 Optischer Aufbau zur parallelen Messung von NAD(P)H und FAD, (FENS 2016)

von bis zu 95% kam es aufgrund der eng beieinanderliegenden Emissionsspektren zu ihrer Überlagerung (crosstalk) und damit zu keiner exakten Trennung von NAD(P)H und FAD (Egly D. et al., 2012). Abhilfe schaffte eine entwickelte elektronische Triggerbox. Sie setzte ein aus dem

Leica-System kommendes Signal so um, dass eine wechselseitige Ansteuerung beider LEDs mit 4 Hz möglich war. Die Grenzfrequenz von 4 Hz entsprach den technischen Gegebenheiten des Leica-Systems. Sie war aber ausreichend für die zeitliche Auflösung der geplanten Experimente.

3.3. Vergleich des Fotobleichens von LED und HBO-Lampe in HEK293 Zellen

Bei den durchgeführten Experimenten wurde eine deutliche Überlegenheit der LED gegenüber der HBO Lampe im Bleichverhalten von HEK293 Zellen deutlich (Rösner et al., 2013). Die Intensität der HBO Lampe wurde über Graufilter reguliert. Filterposition 1 (Lichtleistung 70 % ausgemessen 161 μ W) ergab eine annähernd gleiche Intensität von NAD(P)H beim Start der Experimente, Filterposition 2 (Lichtleistung 15 % ausgemessen 39 μ W) ein ähnliches Bleichverhalten wie bei der Messung mit der LED. Die Lichtleistung der LED wurde mit 34 μ W gemessen (alle Lichtleistungen gemessen mit Powermeter Model 840, Newport, USA).

3.4. Messung von NAD(P)H mit unterschiedlichen Fotodetektoren

Fotodetektoren werden in ihrer Sensitivität, zeitlichen Auflösung und dem Signal/Rausch-Verhältnis bewertet. Die höhere QE des MPPC gegenüber den verwendeten PMT in dem interessierenden Emissionsbereich machten einen Vergleich sinnvoll. Das Signal der Fotodiode wurde über eine externe hochverstärkende elektronische Schaltung geführt. Der Vergleich der technischen Parameter der drei Fotodetektoren erfolgte mit Hilfe von Messungen der NAD(P)H Autofluoreszenz in akuten Hirnschnitten der Ratte. Die Experimente erfolgten in der CA1 Region des Hippocampus von Ratten durch elektrische Stimulation der Schaffer-Kollateralen. Sie führt zur Depolarisation des Membranpotentials und zur Auslösung eines Aktionspotentials. Der damit verbundene Energieverbrauch in der Zelle wird nachreguliert und hat damit eine Veränderung der NAD(P)H Intensität zur Folge. Das resultierende Signal ist zweiphasig. Dem initialen „dip“ folgt ein „overshoot“ (Liotta et al., 2012).

Die UV LED diente als Anregungslichtquelle. Ihre Lichtintensität hatte einen festen Wert von 47 μ W (40x0.8 W Objektiv).

Zum Vergleich der Detektoren wurde die Amplitude zwischen „dip“ und „overshoot“ des NAD(P)H Signals bewertet (Rösner et al., 2013). Die höchste Sensitivität zeigte der MPPC beim Vergleich der „overshoots“. Er hatte aber auch das höchste Rauschen, was sich insbesondere bei der Auswertung der „dips“ als nachteilig erwies. PMT und Fotodiode waren als gleichwertig zu betrachten.

3.5. Fotobleichen der HEK293 Zellen unter Zugabe von 2-deoxy-D-Glukose und Laktat

Mit der bewährten UV LED wurden die in Abb. 5 dargestellten Experimente durchgeführt. Dabei stand das Fotobleichen, eine „Fluorescence recovery after photobleaching“ (FRAP) ähnlichen Analyse von HEK293 Zellen im Mittelpunkt. Es galt zu unterscheiden zwischen drei unterschiedlichen Lösungen, in denen sich die Zellen befanden (Nährlösung (Glukose), 2-deoxy-D-Glukose, 2-deoxy-D-Glukose/Laktat). Es wurde für 20 s mit 96 μ W LED Lichtleistung gebleicht und eine Erholung abgewartet.

Befanden sich die Zellen in Nährlösung (schwarz dargestellt), ist die Drift in der Basislinie klein, der durch Bleichen verursachte Abfall des NAD(P)H Signals gering und der Erholungseffekt nahezu vollständig. Wird Glukose durch 2-deoxy-D-Glukose ersetzt (grün dargestellt), wird die Glykolyse in den Zellen unterbunden, es erfolgt keine Produktion von

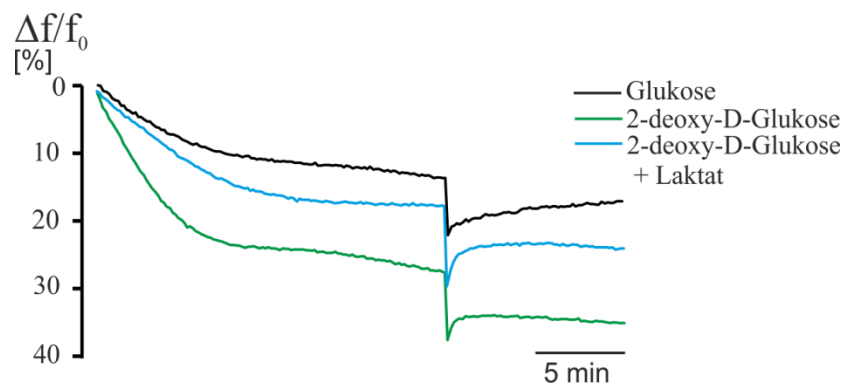


Abbildung 5 Bleichverhalten von HEK293 Zellen in drei unterschiedlichen Lösungen

Pyruvat (aerob) oder Laktat (anaerob). Das Fehlen dieser Komponenten verringert die Reduktion von NAD(P)H. Daraus resultiert die große Drift in der Basislinie, ein deutlich stärkerer Abfall der NAD(P)H Intensität während des Bleichens und ein geringer bzw. nicht vollständiger Erholungseffekt. Durch Zugabe von Laktat (blau dargestellt) in dieses Medium wird den Mitochondrien die Produktion von NAD(P)H ermöglicht. Die Drift in der Basislinie ist kleiner und der Erholungseffekt ausgeprägter, aber auch geringer als im glukosehaltigen Medium. Durch diese Vergleiche ist eine verbesserte, getrennte Betrachtung von Anteilen des NADH möglich, die anaerob in der Glykolyse oder aerob in den Mitochondrien entstehen.

3.6. Optimierung des Fotobleichen von FAD durch gepulste LED Beleuchtungsprotokolle

Für die Durchführung von Langzeitexperimenten in akuten Hirnschnitten, die Messungen von Autofluoreszenzen mit beinhalten, ist ein geringes Fotobleichen und der mit ihr verbundene Fotodekomposition von hohem Stellenwert. Das zu messende FAD ist eingebettet im metabolischen Netzwerk von Zellen. Fotodekomposition hat einen negativen Effekt auf den metabolischen Fluss von Elektronen sowie auf andere enzymatische Prozesse, die Flavin Kofaktoren benötigen.

Basierend auf den guten Ergebnissen in Bezug auf Fotobleichen bei der Aufzeichnung von NAD(P)H Fluoreszenz mit einer UV LED trat die Frage auf, ob eine mit Pulsen angesteuerte LED eine weitere Reduzierung des Fotobleichens bringen würde ohne Einbußen an Fluoreszenzintensität. Dabei stand die Aufzeichnung von FAD Autofluoreszenz im Mittelpunkt. Die Vorteile dieser Methode wurden im Abschnitt 1.2. beschrieben. Die Emission von FAD ist

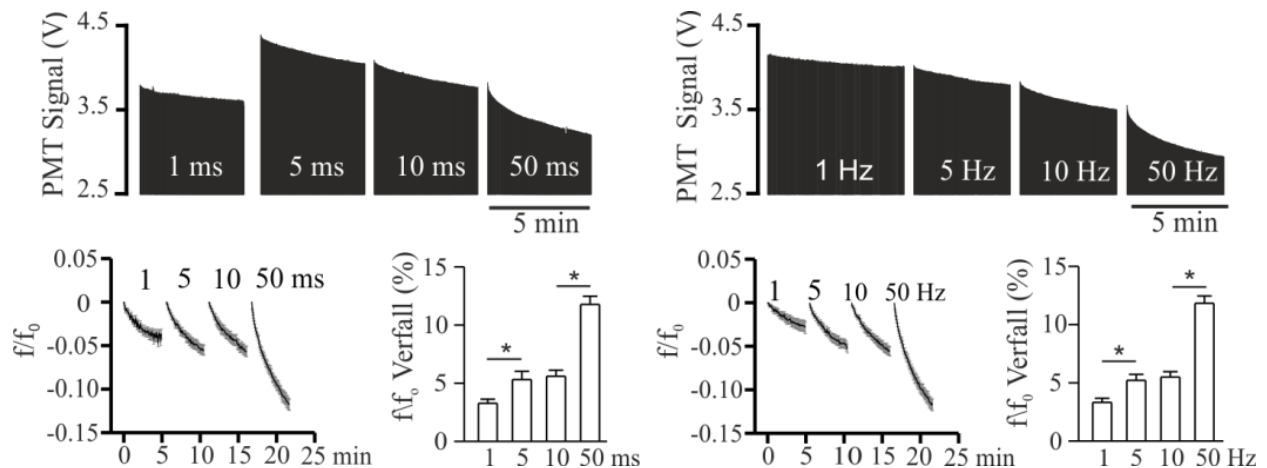


Abbildung 6 Ermittlung der Anregungszeit und Frequenz mit gepulster LED

aber an Intensität geringer als die von NAD(P)H. Damit ist eine höhere Anregungsenergie an Licht notwendig oder eine höhere Sensitivität der Detektoren, um auswertbare Signale zu erzielen. Erste Pilotexperimente zeigten bei kontinuierlicher Beleuchtung mit einer blauen LED bei der Aufzeichnung von FAD dem zu Folge hohe Bleicheffekte. Um das Fotobleichen nochmals zu reduzieren, war es notwendig ein optimales Verhältnis von Anregungszeit und Frequenz für die LED empirisch zu ermitteln.

Durch Veränderung der Ansteuersoftware für die LEDs und Integrierung von Hardwarekomponenten ließen sich Pulslänge und Pulsfrequenz für die LEDs frei wählen. Es wurde jeweils 5 min in der CA1 Region des Hippocampus von akuten Hirnschnitten der Ratte die Veränderung von FAD Autofluoreszenz aufgezeichnet. Das Fotobleichen in diesem Zeitraum war entscheidend für die Wahl der Parameter. Zwischen den Experimenten erfolgte eine Pause von 30 s. Mit 1 Hz Pulsen erzielten wir minimalstes Fotobleichen und damit wahrscheinlich den geringsten Effekt auf den Energiemetabolismus. Jedoch erschien uns eine Frequenz von 5 Hz und eine Anregungszeit von 5 ms als vernünftiger Kompromiss von zeitlicher Auflösung, reduziertem Bleichen und der Funktionsfähigkeit der untersuchten Hirnschnitte zu sein (Rösner et al, 2016). Sowohl die Erhöhung der Frequenz als auch der Belichtungszeit brachte größeres Fotobleichen. Mit 50 Hz bzw. 50 ms war das Fotobleichen signifikant stärker (Abb. 6). Eine geringere Belichtungszeit als 2 ms führte auf Grund des Tiefpassverhaltens der PMT Elektronik zu kleineren

Messwerten. Mit den ermittelten Werten von 5 Hz und 5 ms wurden elektrophysiologische Experimente durchgeführt und deren Ergebnisse mit kontinuierlicher Beleuchtung verglichen. Die Messungen hatten eine Zeitdauer von 20 min. Zu Beginn und am Ende des Experiments wurden vitale Parameter, wie die mit einem Stimulus induzierten Veränderungen von extrazellulären Kalium Konzentrationen (K^+), dem Feldpotential und dem Sauerstoffpartialdruck (pO_2) bei gepulster und kontinuierlicher Beleuchtung aufgezeichnet. Während die aufgenommenen Parameter mit gepulster LED innerhalb des gemessenen Zeitraumes keinen signifikanten Verfall zeigen, veränderten sie sich markant bei kontinuierlicher Beleuchtung. Damit konnte die deutliche Überlegenheit der gepulsten LED bezüglich des Erhaltens der Lebensfähigkeit des Hirnschnittpräparats gezeigt werden (Rösner et al, 2016).

3.7. Veränderungen des FAD und NAD(P)H bei aufeinanderfolgender Blockade des Energietransportes

Die unterschiedlichen Isoformen von Laktat Dehydrogenase bevorzugen die Synthese von Laktat in Gliazellen und Pyruvat in Nervenzellen. Zusammen mit dem aktivitätsabhängigen Laktat-Anstieg im Gehirn führte dieser Befund zu der Hypothese, dass der Energiebedarf der Nervenzellen partiell durch gliale Laktatfreisetzung bewerkstelligt wird. Für den Transport von Laktat sind vorwiegend die Proteine Monocarboxylate Transporter (MCT1 und MCT2) verantwortlich (Galeffi F. et al., 2007). MCT1 ist in den Gliazellen lokalisiert und überträgt das Laktat zu den Nervenzellen, die dort befindlichen MCT2 Proteine sind für die Aufnahme der Energieträger verantwortlich. 4CIN blockiert vorwiegend diese Aufnahme durch die MCT2 Proteine, erst in höheren

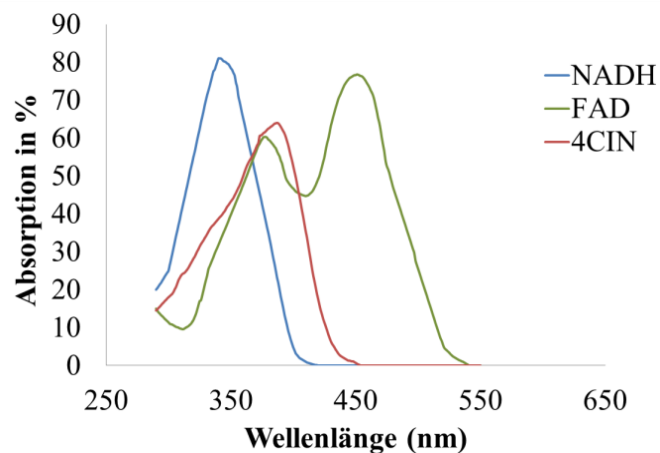


Abbildung 7 Absorptionsspektren von FAD, NAD(P)H und 4CIN

Konzentrationen den Transport durch die MCT1 Proteine. Die durchgeführten Experimente mit 4CIN erfolgten in drei Abschnitten, wobei jeweils eine elektrische Stimulation der Schaffer-Kollateralen stattfand, im ersten Abschnitt ohne Blocker, im zweiten Abschnitt nach dem Einwaschen des Blockers und im dritten Abschnitt nach dem Auswaschen des Blockers. Es wurde in der CA1 oder CA3 Region des Hippocampus der Ratte parallel NAD(P)H und FAD gemessen. Dabei stellte sich eine Absorption (ca. 50% bei 385 nm) von UV Licht durch 4CIN heraus (Abb.

7), was zu einer Fehlmessung von NAD(P)H Fluoreszenz führte und in früheren Arbeiten unbeachtet blieb (Galeffi et al., 2007). Damit war trotz technischer Voraussetzung ein gleichzeitiges Aufzeichnen von NAD(P)H und FAD mit diesen Blockern nicht möglich.

Die Experimente beschränkten sich damit nur auf die Autofluoreszenz FAD. Nach dem Einwaschen des Blockers stieg die FAD Fluoreszenz in beiden Regionen (CA1 und CA3 des Hippocampus) an und elektrische Stimulation löste einen deutlich überproportionalen „peak“ aus (Angamo E. et al., 2016). Die Ergebnisse zeigten eindeutig, dass Laktattransport einen wichtigen Beitrag zum Energiemetabolismus leistet.

4. Diskussion

4.1. Zusammenfassung

Im Mittelpunkt der Arbeit stand die Entwicklung neuer Methoden zur Messung der Autofluoreszenzen NAD(P)H und FAD. Dabei wurde ein Mikroskopsystem konstruktiv so verändert, dass Hochleistungs-LEDs und verschiedene Fotodetektoren in ihm eingefügt werden konnten. An biologischen Experimenten in HEK293 Zellen und akuten Hirnschnitten der Ratte wurde die verbesserte Leistungsfähigkeit des veränderten Systems dargestellt. Besonderes Augenmerk wurde dabei auf eine Verminderung des Fotobleichens bei Langzeitaufzeichnungen von NAD(P)H und FAD Fluoreszenz gelegt.

4.2. Vergleich von LED und Quecksilberdampfampe

Die Vorteile der LEDs gegenüber HBO/HXP Lampen wurden während der Experimente nachgewiesen. Zwar ist ein komplexer optischer Aufbau bei Anwendung von mehreren LEDs notwendig, aber die im Abschnitt 1.3. genannten Vorteile rechtfertigen diesen Aufwand. HBO/HXP Lampen besitzen ein breites Lichtspektrum. Abb. 8 zeigt

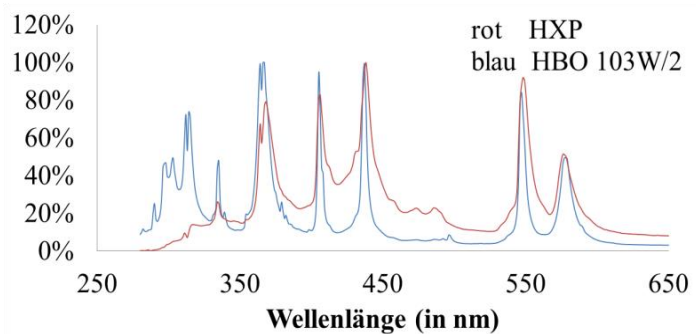


Abbildung 8 Emissionsspektren von HXP und HBO Quecksilberdampfampfen

die Spektren beider Lampen (Osram, München, Deutschland). Filter hoher optischer Vergütung haben eine verbleibende Transmission von $\geq 5\%$ (Chroma Technology Corp., USA). Somit gelangen Restlichtanteile aus dem außerhalb des Filterbereiches liegenden Spektrum mit in den Strahlengang. Dieses Licht führt zu erhöhter Toxizität und Fotobleicheffekten.

4.3. Vergleich der Fotodetektoren

Begründet in seiner hohen QE konnte der MPPC geringe Vorteile in der Verstärkung der Signale beim Vergleich von „dip“ und „overshoot“ am NAD(P)H Signal erzielen. Dies war aber nur mit dem größten Rauschen aller verglichenen Detektoren zu erreichen. Eine zusätzliche Peltierkühlung hätte bei allen drei Detektoren das Signal-Rausch Verhältnis verbessert.

4.4. Parallele Messung der Emissionsspektren von NAD(P)H und FAD

Das schmalbandige Anregungsspektrum (ca. 10 nm) von LEDs und der Einsatz von optischen Filtern mit hoher Absorption garantierten keine korrekte Trennung der dicht beieinander liegenden Emissionsspektren von NAD(P)H und FAD. Erste Versuche ohne Triggerbox zeigten ein Überlappen beider Emissionsspektren. Der Einsatz der Triggerbox ermöglichte eine sequentielle, zeitnahe Aufzeichnung beider Fluoreszenzen mit der durch das Leica System vorgegebenen Frequenz. Eine höhere zeitliche Auflösung hätte oxidative und reduktive Veränderungen des NAD(P)H und FAD Signals besser angezeigt.

4.5. Erfahrungen beim Arbeiten mit der Clark Elektrode

Mit der Positionierung der Clark-Elektrode im akuten Hirnschnitt erfolgte eine Beleuchtung durch die LED auf ihre Elektrodenoberfläche. Dies führte zu einer scheinbaren Erhöhung der Sauerstoffkonzentration, begründet sich aber in der Lichtempfindlichkeit der Elektrode (Spors J., 2001). Der Fehler von < 1 % ist in der Basislinie und dem dynamischen Anteil gleichermaßen vorhanden und beeinflusste die Messung von NAD(P)H und FAD nicht. Alternativ ist eine optische Sauerstoffmessung basierend auf Phosphoreszenzlöschung möglich (Schmälzin E. et al., 2014). Sie hätte auch den Vorteil einer nicht invasiven Messung. Jedoch ist diese Methode mit hohen Anschaffungskosten verbunden.

4.6. Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität vom Beleuchtungsprotokoll

Das aufgezeigte Protokoll mit einer gepulsten LED gilt für Messungen von FAD in akuten Hirnschnitten. Der Aufbau ermöglicht Langzeitexperimente mit minimalem Fotobleichen. Die unterschiedlichen Erholungseffekte zwischen gepulster und kontinuierlicher Beleuchtung lassen sich weitgehend auf ein unterschiedliches Ausmaß an Fotoreduktion und Fotodekomposition zurückführen. Möglicherweise findet bei kontinuierlicher Beleuchtung eine höhere Mehrfachabsorption von Photonen durch die FAD Moleküle statt, die sich dadurch aus dem schon angeregten Zustand in das nächst höher gelegene Energieniveau (S1 zu S2 im Jablonski Diagramm) bewegen (Brabant J. 2006). Diese Moleküle stehen für den nächsten

Fluoreszenzanregungszyklus nicht zur Verfügung, was zu der geringeren Intensität der Fluoreszenz bei kontinuierlicher Beleuchtung beiträgt. Hingegen können diese Moleküle bei gepulster Anregung in der Belichtungspause re-oxidiert werden (mit Ausnahme von Fotodekomposition, die auch hier nicht ganz ausgeschlossen ist) und bleiben für weitere Fluoreszenzzyklen erhalten.

Die Abhängigkeit der Lebensdauer von FAD von Pulsdauer und Wiederholfrequenz ist eine wertvolle Information über die Synthese und Regeneration dieser Fluorochrome.

Fototoxische Effekte z.B. durch Überbelichtung und damit die mögliche Bildung freier Radikaler wurde durch die stufenlose Regulierbarkeit der LED und gepulster Beleuchtung weitgehend vermieden.

4.7. Ausblicke

Das aufgestellte Protokoll zur Aufzeichnung von FAD mit einer gepulsten LED kann auch bei anderen Fluoreszenzmessungen angewendet werden. Jedoch werden die Parameter zur Ansteuerung der LED wie Anregungszeit, Frequenz, Intensität und Verstärkung nicht gleich sein. Trotzdem könnte es Vorteile bei der Aufzeichnung von NAD(P)H Fluoreszenz geben oder bei anderen biologischen Fragestellungen wie z.B. in Zellkulturen. Die Variabilität der Parameter begründet sich z.B. in der unterschiedlichen Anregungswellenlänge beider Autofluoreszenzen und ihrer unterschiedlichen Intensitäten. Auch könnte eine getriggerte LED bei der Fluoreszenzaufzeichnung von anderen Vitalfarbstoffen (Alexa oder CY Reihe) oder von Fluoreszenz Proteinen (GFP, YFP, CFP) von Vorteil sein.

Die niedrigen Anschaffungskosten einer Hochleistungs-LED im Vergleich zum Laser lässt auch die Möglichkeit zu, solch eine LED als konfokale Einheit über einen Lichtleiter zu erproben. Die einfache Leistungsregelung und problemlose Ansteuerung mit einer beliebigen Frequenz wären Vorteile gegenüber einem Laser.

Eine getrennte Betrachtung des NAD(P)H Signals in seine NADH und NADPH Anteile über ein FLIM Experiment (Blacker T.S. et al., 2014) geben weitere Aufschlüsse über den anabolen und katabolen Stoffwechsel der Zellen. Durch eine Weiterentwicklung des Mikroskop-Systems wird die Grundlage für die Messung der unterschiedlichen Abklingzeiten der Fluoreszenzintensitäten von NADH und NADPH geschaffen.

Literatur:

- 1 Mayevsky A, Chance B. Metabolic responses of the awake cerebral cortex to anoxia hypoxia spreading depression and epileptiform activity. *Brain research*. 1975. 98, 149-165.
- 2 Chance B, Cohen P, Jobsis F, Schoener B. Intracellular oxidation-reduction states in vivo. *Science*. 1962. 137, 499-508.
- 3 Kunz WS, Kunz W. Contribution of different enzymes to flavoprotein fluorescence of isolated rat liver mitochondria. *Biochimica et biophysica acta*. 1985. 841, 237-246.
- 4 Reynolds K. LED-Based Sun-Simulator Design: Technical and Commercial Considerations. *Photonics Spectra*. 2015. 49, 54-58.
- 5 Egly D, Geörg D, Rädle M, Beuermann T. A compact multi-channel fluorescence sensor with ambient light suppression. *Measurement Science and Technology*. 2012. 23, 035702.
- 6 Hill MR, Greenfield SA. The membrane chamber: a new type of in vitro recording chamber. *Journal of neuroscience methods*. 2011. 195, 15-23.
- 7 Rösner J, Liotta A, Schmitz D, Heinemann U, Kovacs R. A LED-based method for monitoring NAD(P)H and FAD fluorescence in cell cultures and brain slices. *Journal of neuroscience methods*. 2013. 212, 222-227.
- 8 Liotta A, Rösner J, Huchzermeyer C, Wojtowicz A, Kann O, Schmitz D, Heinemann U, Kovacs R. Energy demand of synaptic transmission at the hippocampal Schaffer-collateral synapse. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2012. 32, 2076-2083.
- 9 Rösner J, Liotta A, Angamo EA, Spies C, Heinemann U, Kovacs R. Minimizing photodecomposition of flavin adenine dinucleotide fluorescence by the use of pulsed LEDs. *Journal of microscopy*. 2016. 264, 215-223.
- 10 Galeffi F, Foster KA, Sadgrove MP, Beaver CJ, Turner DA. Lactate uptake contributes to the NAD(P)H biphasic response and tissue oxygen response during synaptic stimulation in area CA1 of rat hippocampal slices. *Journal of neurochemistry*. 2007. 103, 2449-2461.
- 11 Angamo EA, Roesner J, Liotta A, Kovacs R, Heinemann U. A neuronal lactate uptake inhibitor slows recovery of extracellular ion concentration changes in the hippocampal CA3 region by affecting energy metabolism. *Journal of neurophysiology*. 2016. jn.00327.02016.
- 12 Spors J., Vergleich von Messmethoden für photosynthetische Gasflüsse und Entwicklung eines neuen ortsauflösenden Verfahrens mit dem Massenspektrometer, Diplomarbeit, Christians Albrecht Uni Kiel 2001.
- 13 Schmälzin E., Friedmann L., Horn E., Zantl R., Ortsaufgelöste Sauerstoffmessung in biologischen Proben, *BioPhotonik* 2/2014.
- 14 Brabandt J. Reversibles und irreversibles Photobleichen an einzelnen Molekülen und im Ensemble Diplom Arbeit TU Chemnitz 2006.
- 15 Blacker TS, Mann ZF, Gale JE, Ziegler M, Bain AJ, Szabadkai G, Duchen MR. Separating NADH and NADPH fluorescence in live cells and tissues using FLIM. *Nat Commun*. 2014. 5, 3936.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Jörg Rösner, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Verbesserte Methoden zur Erfassung mikrofluorimetrischer Signale am Beispiel der Autofluoreszenz von FAD und NAD(P)H zur Analyse des Energiebedarf hippokampaler neuronaler Funktionen“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an den ausgewählten Publikationen entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.

Datum

Unterschrift

Anteilerklärung an den erfolgten Publikationen

Herr Jörg Rösner hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1: Rösner J., Liotta A., Schmitz D., Heinemann U., Kovács R., A LED-based method for monitoring NAD(P)H and FAD fluorescence in cellcultures and brain slices Journal of Neuroscience Methods 212 (2013) 222–227

Planung der Experimente:

- Entwicklung optischer und mechanischer Komponenten am Mikroskop System Rösner J.
- Experimente mit HEK Zellen Kovács R.
- Vergleich von LED/HBO und Detektoren mit akuten Hirnschnitten Rösner J.

Durchführung der Experimente:

- NAD(P)H Messungen in HEK Zellen Rösner J.
- NAD(P)H und FAD Aufzeichnungen Liotta A. und Rösner J.

Auswertung der Experimente:

Die Auswertung erfolgte durch Kovács R., Rösner J. und Liotta A.

Schreiben und Bearbeiten der Publikation:

Die Publikation wurde von Kovács R. und Rösner J. geschrieben. Überarbeitet von Heinemann U. und Schmitz D.

Publikation 2: Rösner J., Liotta A., Angamo E.A., Spies C., Heinemann U., Kovács R., Minimizing photodecomposition of flavin adenine dinucleotide fluorescence by the use of pulsed LEDs Journal of Microscopy 2016 Jul 1. doi: 10.1111/jmi.12436. PMID: 27368071

Planung der Experimente:

- Idee der gepulsten Messung mit einer LED Kovács R. und Rösner J.
- Entwicklung optischer Komponenten sowie Softwareeinbindung Rösner J.

Durchführung der Experimente:

Die Aufzeichnungen von FAD zur Ermittlung des optimalen Verhältnis von Anregungszeit und Frequenz wurden von Liotta A., Angamo E.A. und Rösner J. durchgeführt.

Auswertung der Experimente:

Die Auswertung erfolgte durch Kovács R., Rösner J. und Liotta A.

Schreiben und Bearbeiten der Publikation:

Die Publikation wurde im Wesentlichen von Kovács R. geschrieben. Überarbeitet von Heinemann U., Liotta A. und Rösner J.

Publikation 3: Angamo E.A., Roesner J., Liotta A., Kovács R., Heinemann U., A neuronal lactate uptake inhibitor slows recovery of extracellular ion concentration changes in the hippocampal CA3 region by affecting energy metabolism J Neurophysiol (August 24, 2016). doi:10.1152/jn.00327.2016

Planung der Experimente:

Idee und Ausarbeitung Heinemann U.

Durchführung der Experimente:

- Der Hauptanteil an Experimenten wurde durch Angamo E.A. ausgeführt
- Einige FAD Messungen und die Aufnahme der Absorptionsspektren von NAD(P)H, FAD und 4CIN wurden durch Rösner J. absolviert

Auswertung der Experimente:

Die Auswertung erfolgte durch Angamo E.A., Heinemann U., Liotta A. und Rösner J.

Schreiben und Bearbeiten der Publikation:

Die Publikation wurde von Heinemann U., Kovács R. und Angamo E.A. geschrieben. Sie fanden Unterstützung in der Überarbeitung von Rösner J. und Liotta A.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers

Unterschrift des Doktoranden

<https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2012.11.001>

<http://dx.doi.org/10.1111/jmi.12436>

<http://dx.doi.org/10.1152/jn.00327.2016>

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Publikationsliste:

A neuronal lactate uptake inhibitor slows recovery 1 of extracellular ion concentration changes in the hippocampal CA3 region by affecting energy metabolism

Angamo E.A., Roesner J., Liotta A., Kovács R., Heinemann U.

Journal of Neurophysiology doi:10.1152/jn.00327.2016 August 24 2016

Minimizing photodecomposition of flavin adenine dinucleotide fluorescence by the use of pulsed LEDs

Rösner J., Liotta A., Angamo E.A., Spies C., Heinemann U., Kovács R.

Journal of Microscopy doi: 10.1111/jmi.12436. PMID: 27368071 Jul 1 2016

A LED-based method for monitoring NAD(P)H and FAD fluorescence in cell cultures and brain slices

Rösner J., Liotta A., Schmitz D., Heinemann U., Kovács R.

Journal of Neuroscience Methods 212 222-227 2013

Energy demand of synaptic transmission at the hippocampal Schaffer-collateral synapse

Liotta A., Rösner J., Huchzermeyer C., Wojtowicz A.; Kann O., Schmitz D., Heinemann U., Kovács R.

Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism 1-8 2012

Poster:

Pulsed LEDs minimize the flavin-adenine-dinucleotide (FAD) photobleaching and photodecomposition in vitro

Rösner J., Liotta A., Angamo E.A., Heinemann U., Kovács R. Poster (2509) FENS Kopenhagen vom 02.07.-06.07.2016

Astrocytic Neuronal Lactate Shuttle: Fuel Substrate for Maintenance of Ionic Homeostasis in Rat Hippocampus

Angamo E.A., Rösner J., Heinemann U., Kovács R. Poster zur Eröffnung des Advances in Medical Bioimaging (AMBIO) an der Charite Universitaetsmedizin Berlin 2015

Developmental differences in pH regulations and influence of pH on neuronal excitability

Salmen B., Rösner J., Schmitz D.

Proceedings of the 10th Göttingen Meeting of the German Neuroscience Society Epilepsia 52: 104-114. 2013

Free Radical Mediated Dysfunction of the Neurovascular Unit in Experimental Status Epilepticus

Kovács R., Liotta A., Rösner J., Swolinsky J., Huchzermeyer C., Heinemann U., Kann O.

Erschienen als Poster SFB TR3 Symposium, (Bonn) 2012

Ion fluxes and energy metabolism changes associated with signal transmission at the Schaffer-collateral synapses

Liotta A., Rösner J., Kann O., Heinemann U., Kovács R.

Erschienen als SFN Poster (656.09/C21) New York 2011

Danksagung

Ein seit vielen Jahren in mir getragener Gedanke wird mit dieser Arbeit Realität. Dabei eröffnete sich für mich ein neues Fenster der Naturwissenschaft. Als Ingenieur bisher mehr mit physikalisch-technischen Problemen vertraut, bekam ich nun einen kleinen Einblick in biochemische Prozesse von Nervenzellen. Dabei fand ich die Unterstützung vieler Menschen. Einige von ihnen möchte ich hier noch einmal hervorheben.

Uwe Heinemann gebührt mein besonderer Dank für das Vertrauen in meine Arbeit und bei der Finalisierung meiner Ideen. Insbesondere, da diese Ideen oft technischer Art waren. Mein Dank gilt auch Dietmar Schmitz für die weiterführende Betreuung nach Uwe und die Bereitstellung des Mikroskop-Systems an seinem Institut.

Ohne die Hilfsbereitschaft von Sebastian Schuchmann und Richard Kovács wäre meine Arbeit nicht möglich gewesen. Ihre Geduld bei der Vermittlung des notwendigen biologisch-medizinischen Grundwissens und ihr technisches Verständnis auf dem Gebiet von Mikroskopie und Lasern, gaben mir den notwendigen Rückhalt für meine Arbeit.

Die zum Teil gemeinsam durchgeführten Experimente mit Eskedar Angamo und Agustin Liotta zeigten mir so manchen Trick im Umgang mit biologischen Präparaten und insbesondere das Positionieren von verschiedensten Elektroden. Auch lernte ich, dass man die Freitagabende und Wochenenden nicht nur mit Segeln verbringen kann.

Anleitung zum selbstständigen Arbeiten mit Zellkulturen erhielt ich von Anke Schönherr. Mit Ausdauer und Geduld brachte sie mir die notwendigen Schritte bei, die ein erfolgreiches Experimentieren ermöglichten. Die mit größter Sorgfalt vorbereiteten akuten Hirnschnitte erhielt ich von Susanne Rieckmann. Der Bau optomechanischer Vorrichtungen und die Entwicklung elektronischer Komponenten wäre ohne die Werkstatt vertreten durch Janine Tyra, Bernd Schacht und Andreas von Garnier nicht denkbar gewesen.

Einen lieben Dank auch an Jörg Breustedt für die Unterstützung bei der Antragstellung an das Promotionsbüro und allen nützlichen Hinweisen bei der Erstellung meiner Arbeit und an Sonja Frosinski und Luisa Hasam Henderson für das Korrekturlesen und Bearbeiten von Bildern.

Und ein letzter aber dafür umso hochwertigerer Dank an meine Frau für ihre liebevolle Anteilnahme und Geduld bei der Umsetzung meiner vielleicht etwas außergewöhnlichen Idee. In euphorischer oder in zweifelnder Stimmung – sie war immer da für mich.