

Aus dem Fachbereich Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

Dr. Senckenbergische Anatomie
Institut für Anatomie II (Experimentelle Neurobiologie)
Komm. Direktor: Prof. Dr. Thomas Deller

**Zur Regulation des oxidativen Energiemetabolismus in
Astrozyten: Darstellung einer mGluR5 / PKC δ – vermittelten
Aktivierung von Mitochondrien *in vitro***

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

vorgelegt von
Kiavasch Mohammad Nejad Farid

aus Darmstadt

Frankfurt am Main, 2022

Dekan:	Prof. Dr. Stefan Zeuzem
Referent:	Prof. Dr. Amin Derouiche
Korreferent:	Prof. Dr. David Anthony Slattery
Tag der mündlichen Prüfung:	27.01.2023

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	6
2	Abstract.....	8
3	Einleitung.....	10
3.1	Astrozyten	10
3.1.1	Morphologie und Entwicklung.....	10
3.1.2	Ionenhomöostase und Wasserhaushalt.....	11
3.1.3	Gliotransmission	11
3.1.4	Vaskuläre Kopplung.....	12
3.1.5	Astrozyten und Glykogen.....	13
3.2	Die dreiteilige Synapse.....	13
3.3	Energie- und Transmittermetabolismus im ZNS.....	14
3.3.1	Wechselwirkung zwischen Astrozyten und Neuronen und die Rolle des astrozytären mitochondrialen Kompartiments	14
3.3.2	Glutamatmetabolismus in Astrozyten	15
3.4	Proteinkinase C δ	17
3.4.1	Zur (mitochondrialen) Translokation der PKC δ	18
3.5	Funktion und Regulation des Pyruvatdehydrogenasekomplexes	19
3.6	Fragestellung	20
4	Material und Methoden	23
4.1	Zellkultur.....	23
4.2	Experimentelle Inkubationen	24
4.2.1	ACPD.....	26
4.2.2	MCPG.....	26
4.2.3	MPEP	27
4.2.4	Rottlerin	27
4.2.5	Gö6976 und Gö6983	27

4.3	Immunzytochemie (Immunfluoreszenz).....	29
4.3.1	Genutzte Antikörper.....	29
4.3.2	Doppelfärbung PKC δ /COXIV.....	29
4.3.3	Doppelfärbung phospho-PDH/PDH.....	30
4.4	Aufnahmen.....	31
4.5	Auswertungsalgorithmen.....	32
4.5.1	PKC δ /COXIV.....	32
4.5.2	phospho-PDH/PDH.....	41
4.6	Luminometrische ATP-Messung.....	43
4.7	Statistik.....	46
5	Ergebnisse.....	47
5.1	Zum Vorkommen der PDP1 in Astroglia.....	47
5.2	Zur (subzellulären) Verteilung der PKC δ in Astrozyten.....	47
5.2.1	In Zellkultur.....	47
5.2.2	Im Gewebe.....	50
5.3	Zur Verteilung der PKC δ in Neuronen.....	52
5.4	Zum Einfluss verschiedener Stimuli auf die subzelluläre Lokalisation der PKC δ in Astrozyten.....	52
5.5	Zum Einfluss verschiedener Stimuli auf den Phosphorylierungsgrad der PDH in Astrozyten.....	59
5.6	Ausschluss eines Einflusses durch Gö6983 auf die Translokationsfähigkeit der PKC δ	66
5.7	Luminometrische Messung der ATP-Konzentrationen im Zelllysat.....	68
6	Diskussion.....	73
6.1	Diskussion der Methoden und ihrer Validität.....	73
6.1.1	Experimente an primären Astrozyten in Kultur.....	73
6.1.2	Auswahl experimenteller Bedingungen.....	73

6.1.3	Etablierung der Auswertungsalgorithmen	75
6.1.4	Luminometrische Messung	77
6.1.5	Potentielle Störfaktoren und Fehlerquellen	77
6.1.6	Beantwortung von biochemischen Fragestellungen mit neuroanatomischen Methoden	78
6.2	Die Rolle des mGluR5 bei der Translokation der PKC δ	78
6.3	Kausale Verknüpfung zwischen PKC δ -Translokation und PDH- Aktivierung und ihr Beitrag zur mitochondrialen Aktivität	82
6.4	Überlegungen zur Einordnung der PKC δ /PDH-vermittelten Mitochondrienaktivierung in einen zeitlichen Kontext.....	83
6.5	Transmitter-Glutamat als Substrat des Energiestoffwechsels	85
6.6	Mögliche medizinische Bedeutung der Ergebnisse	90
6.7	Intrazelluläres ATP in Astrozyten als globaler Marker des Energiestoffwechsels	93
6.7.1	Dynamik der intrazellulären ATP-Spiegel in Astrozyten.....	94
6.8	Einordnung in das Gesamtkonzept der metabolischen Kopplung von Neuron und Glia und potentielle physiologische Relevanz	95
6.9	Ausblick.....	98
7	Verzeichnis der Abbildungen, Tabellen und Diagramme	100
8	Abkürzungsverzeichnis	102
9	Literaturverzeichnis.....	105
10	Publikationen	118
11	Schriftliche Erklärung.....	119
12	Danksagungen	120

1 Zusammenfassung

Astrozyten sind außerordentlich vielseitige Zellen, die im Gefüge des zentralen Nervensystems wichtige Rollen in der synaptischen Signalübertragung, im Neurotransmitterstoffwechsel sowie unter anderem in der Regulation der Energiesubstrataufnahme und der lokalen Durchblutung spielen. Die genannten Prozesse weisen eine ausgeprägte Abhängigkeit von lokal verfügbaren Energieäquivalenten auf. Astrozyten können als Reaktion auf verstärkte, umliegende synaptische Aktivität nicht nur anaerobe Stoffwechselwege wie z.B. Glykolyse hochregulieren, sondern weisen auch eine enorme oxidative Verstoffwechslungskapazität auf. Die Mechanismen zur Regulation des oxidativen Stoffwechsels sind z.B. in Hepatozyten oder Muskelzellen genauer beschrieben, wie vieles andere jedoch in Glia untererforscht. Einer der Signalwege zur Aktivierung des obligat aeroben Citratzyklus über das Schlüsselenzym Pyruvatdehydrogenase-Komplex (PDC) führt in Hepatozyten über die Proteinkinase C δ (PKC δ). Diese bewerkstelligt die Aktivierung der PDC über eine Dephosphorylierung der Pyruvatdehydrogenase (PDH) durch die PDH-Phosphatase 1 (PDP1).

Die selbst in peripheren Astrozytenfortsätzen zahlreich vorhandenen Mitochondrien sind bislang in ihrer Funktion und Regulation nur unzureichend untersucht worden. Daher stellte sich die Frage, ob ein solcher PKC δ -vermittelter Signalweg auch in Astrozyten (über die Aktivierung der PDH) zur Aktivierung des mitochondrialen Stoffwechsels führen könnte, insbesondere um auf einen höheren Energiebedarf reagieren zu können.

Nach zahlreichen Versuchen zum Nachweis des Vorliegens der beteiligten Enzyme in der postulierten Signalkaskade wurden primäre Astrozyten mit Glutamat stimuliert, wodurch eine erhöhte synaptische Aktivität in unmittelbarer Umgebung simuliert wurde. Mithilfe von anti-PKC δ -, anti-PDC- und phosphospezifischen anti-phospho-PDC-Antikörpern sowie der Nutzung Objekt-orientierter Bildverarbeitungsmethoden konnte eine Glutamat-induzierte, mitochondriale Translokation der PKC δ mit nachfolgender Dephosphorylierung des PDC (und damit dessen Aktivierung) gezeigt werden. Beide Prozesse, PKC δ -Translokation und PDH-Dephosphorylierung, werden durch den

metabotropen Glutamatrezeptor 5 (mGluR5) vermittelt, wie sich durch dessen pharmakologische Inhibition zeigen lässt. Die mitochondriale Translokation der PKC δ und ihre Kinaseaktivität tragen dabei maßgeblich zur Aktivierung des PDC bei, sodass durch das Einwirken von Glutamat eine lokale Modulation des glialen oxidativen Stoffwechsels und der damit verbundenen Produktion von Adenosintriphosphat (ATP) ermöglicht wird. Da Astrozyten (v.a. mit ihren feinen peripheren Fortsätzen) besonders in der Nähe von Synapsen für die Funktionalität von Neuronen essentielle, ATP-verbrauchende Prozesse wie z.B. Glutamattransport aufrechterhalten müssen, ist eine solche Regulation durch Glutamat selbst als Indikator vermehrter synaptischer Aktivität naheliegend. Dabei scheint Glutamat in dualer Funktion sowohl signalgebend die Aktivität des Citratzyklus zu beeinflussen als auch nach Aufnahme in die Zelle selbst als Substrat zum anaplerotischen Einschleusen in den Citratzyklus zur Verfügung zu stehen. Mithilfe von luminometrischen ATP-Assays sowie mGluR- und isoformspezifischen PKC-Inhibitoren konnte gezeigt werden, dass einem durch Glutamat verursachten Abfall der intrazellulären ATP-Spiegel (aufgrund der damit einhergehenden Mehrbelastung der Zelle für Transportprozesse und z.B. Ionenhomöostase) durch die mGluR5/PKC δ -vermittelte Aktivierung der PDH entgegengewirkt werden könnte.

In Zusammenschau könnte der mGluR5/PKC δ /PDH-vermittelte Signalweg gewissermaßen eine Bereitschaft bieten, um für gliale Stoffwechselprozesse die Deckung des Energiebedarfs in Astrozytenfortsätzen bei Aktivität angrenzender Synapsen (im Rahmen des Modells der dreiteiligen Synapse) zu ermöglichen. Eine mögliche pathophysiologische Rolle dieses Mechanismus bei zahlreichen neurodegenerativen Erkrankungen (bei denen häufig ein gestörter Energiestoffwechsel und/oder gliale Dysfunktion vermutet wird) müsste in weiterführenden Studien untersucht werden.

2 Abstract

As part of the tripartite synapse, astrocytes play important roles in synaptic signaling, neurotransmitter synthesis and recycling; they are also involved in control of nutrient uptake and local blood flow. Many of these processes depend strongly on local energy utilization. In response to increased neuronal activity and energy demands astrocytes not only upregulate anaerobic glycolysis – they also possess significant capacity for oxidative mitochondrial metabolism. While mechanisms underlying the regulation of mitochondrial metabolism as well as their role in organismic physiology have been characterized in e.g. hepatocytes and muscle fibres, the role of glial oxidative metabolism and its regulation are less well understood. A known signaling pathway in hepatocytes is the regulation of the mitochondrial key enzyme pyruvate dehydrogenase complex (PDC) by protein kinase C δ (PKC δ). PKC δ is known to activate PDC via pyruvate dehydrogenase phosphatase 1 (PDP1) and therefore upregulate the rate of the TCA cycle by boosting its substrate influx.

To investigate a possible influence of synaptic activity on glial mitochondrial activity, primary astrocytes were stimulated with glutamate. Using fluorescent immunocytochemistry with anti-PKC δ , anti-PDC and anti-phospho-PDC antibodies and object oriented image analysis, glutamate-induced mitochondrial translocation of PKC δ and subsequent dephosphorylation of PDC could be demonstrated, indicating its activation. The metabotropic glutamate receptor 5 (mGluR5) is identified as the key receptor inducing mitochondrial PKC δ translocation, applying glutamate and/or mGluR ligands. Thus, the glutamate-induced translocation of PKC δ seems to mediate activation of PDC, which would allow local modulation of glial mitochondrial activity and production of adenosine triphosphate (ATP), by glutamate. Astrocytes, especially when in proximity of synaptic activity must maintain ATP-consuming processes such as fast glutamate uptake and recycling. It therefore can be postulated that glutamate serves both, as a metabolite for the TCA cycle and a signaling molecule to enhance TCA activity and concomitantly overall mitochondrial oxidative activity. Using luminometric ATP assay and subtype-specific inhibitors of PKC and mGluR5, it is demonstrated that the enormous initial drop in

intracellular ATP following glutamate application could be counteracted by the described mGluR5/PKC δ -dependent mitochondrial activation.

The postulated mechanism of mGluR5/PKC δ -induced activation of mitochondrial metabolism is therefore thought to be necessary for energy homeostasis in glial cells and could be of pathophysiologic significance in several neurodegenerative diseases with known impaired energy metabolism and glial dysfunction.

3 Einleitung

3.1 Astrozyten

Astrozyten sind die am häufigsten vorkommenden Gliazellen des zentralen Nervensystems von Säugetieren.¹ Sie erfüllen eine außerordentlich breite Palette an Aufgaben, die für die strukturelle und funktionelle Integrität des ZNS essentiell sind. Während sie lange Zeit irrtümlicherweise als reines Strukturelement des Gehirns angesehen wurden („Nervenkitt“), rücken sie immer mehr in den Fokus zahlreicher physiologischer und auch pathophysiologischer Prozesse. Ihre Aufgaben umfassen neben Strukturgebung, Ionen- und Neurotransmitterhomöostase, Regulation der zerebralen Durchblutung und Gliotransmission auch einen Metabolismus, welcher durch eine einzigartige Enzymausstattung sowohl der Bewerkstelligung der eigenen Aufgaben als auch der Unterstützung umliegender Neuronen dient. Unter den Astrozyten existieren Subpopulationen, welche sich durch ihre spezifische Lokalisation im ZNS und weiterer spezieller Funktionen auszeichnen. Dazu gehören die Müller-Zellen der Retina, die Bergmann-Glia im Cerebellum, Tanyzyten, Pituizyten, Ependymozyten oder auch perivaskuläre und marginale Astrozyten.

3.1.1 Morphologie und Entwicklung

Astrozyten stammen von den sogenannten Radialglia ab, die den gemeinsamen Vorläufer von Astroglia und Neuronen darstellen,² welche dem Neuralrohr entspringen und somit ektodermalen Ursprungs sind. Sie lassen sich hinsichtlich ihrer Morphologie in protoplasmatische Astrozyten und Faserastrozyten unterteilen. Die 30-60 µm großen protoplasmatischen Astrozyten von Nagetieren finden sich vorwiegend in der kortikalen grauen Substanz und weisen drei bis vier GFAP-positive Hauptfortsätze auf, die sich in der Peripherie stark verzweigen. Über diese feinen Fortsätze können sie z.B. mit Synapsen oder Blutgefäßen Kontakt aufnehmen und interagieren.³ Jeder Astrozyt versorgt mit seinen Endfüßchen ein eigenes Territorium von bis zu 140.000 Synapsen,⁴ welches nicht mit dem anderer Astrozyten überlappt.⁵ Humane Astrozyten hingegen erreichen ganz andere Ausmaße; dadurch, dass sie den 2,5-fachen Durchmesser, die vierfache Anzahl an Hauptfortsätzen und

das 16,5-fache Volumen der Astrozyten von Nagetieren erreichen, erstreckt sich ihr Territorium auf bis zu 2.000.000 Synapsen.^{3,6} Zusätzlich unterscheiden sich menschliche Astrozyten durch das gelegentliche Vorkommen sogenannter *Varicose projections*, welche bis zu einem Millimeter lang werden können und unverzweigt sind.⁶ Die außerordentliche Komplexität der Astrozytenarchitektur wird in der Literatur sogar als eine Voraussetzung des Zustandekommens der menschlichen Intelligenz angesehen.^{6,7} Faserastrozyten hingegen finden sich vorwiegend in der weißen Substanz, wo sie eher wenig verzweigte Fortsätze aussenden, die sich den Axonen anschmiegen. Darüber hinaus finden sie sich im Nervus opticus und in Teilen der Retina.⁸

3.1.2 Ionenhomöostase und Wasserhaushalt

Astrozyten bilden untereinander ein ausgedehntes strukturelles und funktionelles Netzwerk, indem sie durch Connexine miteinander in Verbindung stehen.⁹ An ihrer Oberfläche weisen sie zahlreiche Ionenkanäle, wie z.B. Kir4.1 oder Wasserkanäle wie Aquaporin 4 auf. Diese ermöglichen den Astrozyten, entstehende Ionen- und Flüssigkeitsverschiebungen durch neuronale Aktivität schnell aufzufangen, indem Ionen aufgenommen werden und innerhalb angrenzender Astrozyten rasch verteilt werden können. Dadurch wird eine Störung der empfindlich zu regulierenden Ionenkonzentrationen im Extrazellulärraum vermieden, sodass diese Aufgabe der Astrozyten essentiell für die Aufrechterhaltung der synaptischen Funktion ist.

3.1.3 Gliotransmission

Nicht nur Neuronen verfügen über die Fähigkeit, Neurotransmitter freizusetzen, sondern auch Gliazellen. Führend sind dabei Astrozyten, die bidirektional mit Neuronen und anderen Gliazellen über die sogenannte Gliotransmission kommunizieren können. Voraussetzung für eine solche bidirektionale Kommunikation ist das Vorhandensein von Neurotransmitterrezeptoren auf der Membranoberfläche von Astrozyten – so findet man beispielsweise glutamaterge, purinerge und cholinerge, aber auch Endocannabinoidrezeptoren auf Astrozyten. Als Gliotransmitter dienen allen voran Glutamat und ATP, jedoch auch D-Serin, Aspartat, Homozystein, Taurin

oder TNF- α , welche sowohl auf exozytotischem als auch auf nicht-exozytotischem Wege freigesetzt werden können. Diese haben kumulativ Auswirkungen auf die Informationsverarbeitung in neuronalen Netzwerken, sodass davon ausgegangen werden muss, dass auch höhere kognitive Funktionen von Gliotransmission beeinflusst werden. Die nicht-exozytotische Freisetzung von Transmittern über Transporter und Kanäle erfolgt hauptsächlich unter pathologischen Bedingungen und ist nicht calciumabhängig¹⁰ und spielt wahrscheinlich eine untergeordnete Rolle. Als wesentlicher Mechanismus der exozytotischen Gliotransmitterfreisetzung gilt wie auch in anderen Zelltypen ein intrazelluläres Ca²⁺-Signal,¹¹ welches auf verschiedenen Wegen in Astrozyten generiert werden kann. Für den Ablauf von Exozytose steht den Astrozyten die notwendige molekulare Maschinerie zur Verfügung. So finden sich Vesikel mit vesikulären Transmittertransportern und ein zum neuronalen SNARE-Komplex analoger Proteinkomplex, der die vesikuläre Freisetzung ermöglicht.¹²

3.1.4 Vaskuläre Kopplung

Astrozyten bilden unter anderem zusammen mit den Endothelzellen der Hirngefäße die Blut-Hirn-Schranke.^{13,14} Einerseits erfüllt diese eine Schutzfunktion für das Hirnparenchym, sodass nicht alle im Blut befindlichen Moleküle in das Hirngewebe eindringen können – andererseits ermöglicht sie gleichzeitig einen Austausch von essentiellen Substraten wie z.B. Glucose. Die Regulation der Perfusion über den vaskulären Tonus sowie das Bewerkstelligen vieler Transportprozesse obliegt dabei den Astrozyten. Dabei registrieren sie Informationen über die neuronale Aktivität in räumlicher Nähe und können als Antwort auf glutamaterge Stimulation vasoaktive Lipide und Kalium freisetzen, die lokal zu einer Vasodilatation führen. Dadurch wird der zerebrale Blutfluss gesteigert, sodass dem aktiven Areal vermehrt Sauerstoff und Energiesubstrate zur Verfügung gestellt werden können. Ein Mechanismus scheint dabei die Aktivierung von astrozytären Neurotransmitterrezeptoren zu sein, welche ein intrazelluläres Ca²⁺-Signal evozieren, welches wiederum die Phospholipase A₂ aktivieren kann. Dadurch werden schließlich Prostaglandine wie z.B. PGE₂ synthetisiert (aber auch vasokonstringierende Arachidonsäuremetabolite wie

z.B. 20-Hydroxyeicosatetraensäure), welche den Vasotonus regulieren.¹⁵ Ein weiterer Mechanismus scheint die Freisetzung von Kaliumionen durch Astrozyten zu sein, welche dilatierend an der Gefäßmuskulatur wirken. Diese scheinen wiederum durch neuronale Aktivität ausgelöst über calciumabhängige Kaliumkanäle freigesetzt zu werden.^{16,17} Auch werden bei vermehrter neuronaler Aktivität durch die Neuronen selbst verstärkt Kaliumionen in den Extrazellulärraum freigesetzt – eine weitere Hypothese ist ein dadurch verursachtes „*Feed-forward potassium siphoning*“, wodurch Astrozyten durch Depolarisation selbst zur weiteren Kaliumionenfreisetzung angeregt werden.¹⁸

3.1.5 Astrozyten und Glykogen

Vergleichbar mit der Speicherfunktion in Skelettmuskulatur und Leber weisen im ZNS ausschließlich Astrozyten Glykogenvorräte auf. Diese dienen vermutlich der raschen Bereitstellung von Glucosemetaboliten, welche glykolytisch zu Lactat abgebaut und wiederum Neuronen zur Verfügung gestellt werden können.¹⁹

3.2 Die dreiteilige Synapse

In den letzten Jahren wandelte sich das dogmatisch geprägte Bild der Synapse, bestehend aus Prä- und Postsynapse. Während Astrozyten Jahrzehnte lang eine funktionelle Bedeutung im Gesamtgefüge des ZNS abgesprochen wurde, erscheinen sie nun als ein gleichberechtigter Teil im neuen Modell der sogenannten dreiteiligen Synapse.²⁰ Dieses berücksichtigt neben den beiden neuronalen Anteilen der klassischen Synapse auch die peripheren Astrozytenfortsätze, welche nicht nur in räumlicher Nähe zum synaptischen Spalt stehen, sondern auch neuromodulatorische Effekte bewirken und homoöstatische Aufgaben wahrnehmen können (siehe Abbildung 1). So können Astrozyten auf synaptische Aktivität gezielt reagieren und die Prozessierung von Informationen und die neuronale Plastizität beeinflussen.²¹ mGluR5 konnte im Kontext der dreiteiligen Synapse als Sensor für synaptische Aktivität identifiziert werden.²²

In den folgenden Abschnitten wird explizit auf den Energiemetabolismus im ZNS eingegangen, der wesentlich durch die Funktion der Astrozyten mitbestimmt wird.

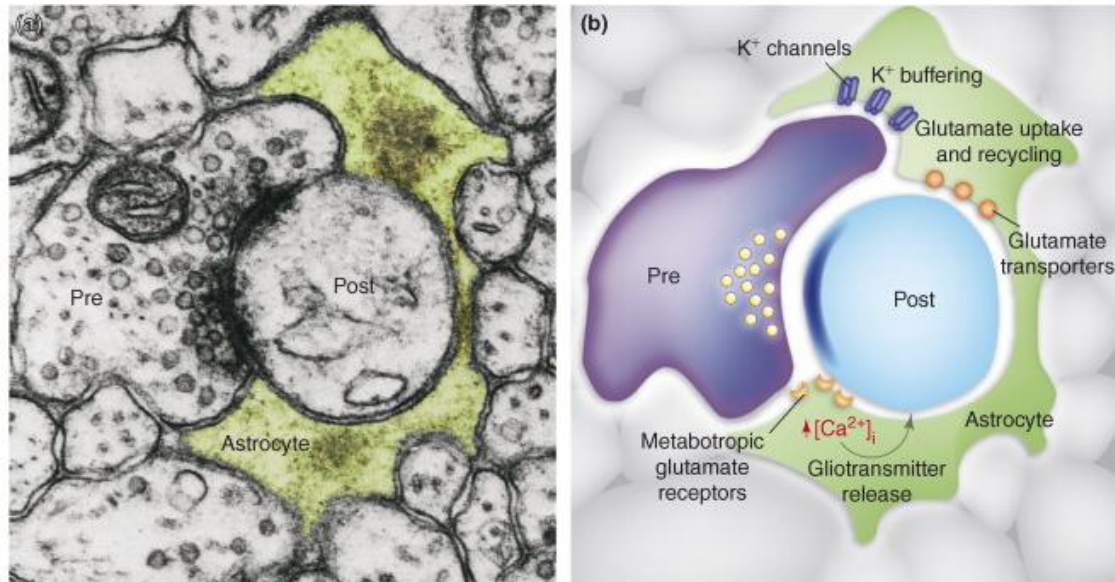


Abbildung 1 – Die dreiteilige Synapse, bestehend aus Präsynapse, Postsynapse und Astrozytenfortsatz

Links: elektronenmikroskopische Darstellung der dreiteiligen Synapse mit grün unterlegtem glialen Fortsatz, der sich der klassischen Synapse anschmiegt. Rechts: schematische Darstellung mit Kennzeichnung der funktionellen Strukturen auf der Astrozytenmembran, welche am synaptischen Signalgebungsprozess mitbeteiligt sind. Quelle: Abbildung 1 aus der Arbeit von Halassa et al.²³, übernommen und bearbeitet aus dem Original von Peters aus dem Jahre 1991.²⁴

3.3 Energie- und Transmittermetabolismus im ZNS

3.3.1 Wechselwirkung zwischen Astrozyten und Neuronen und die Rolle des astrozytären mitochondrialen Kompartiments

Es ist mittlerweile unbestreitbar, dass die Funktion der astrozytären Mitochondrien einen wichtigen Beitrag zur globalen Hirnfunktion liefert. So sind sie nicht nur Ort der ATP-Synthese und damit für den allgemeinen Energie-, sondern auch im Wesentlichen für den Transmittermetabolismus relevant. In

ihren metabolischen Zyklen findet das anaplerotische Hinzufießen von Substraten aus dem Transmitterstoffwechsel und die kataplerotische Entnahme von Vorläufermolekülen für deren Neubildung statt. Dass das Fehlen der oxidativen Phosphorylierung in Astrozyten durch direkte Inhibition der Atmungskettenkomplexe nicht essentiell für das Überleben der Zelle sei,²⁵ ist daher kritisch zu betrachten. Man muss dabei zwischen bloßem Überleben und einer adäquat erhaltenen Funktionsfähigkeit der Zellen unterscheiden. So führt beispielsweise die Hinzugabe von Fluorocitrat, welches die Aconitase und damit in Folge den gesamten Citratzyklus hemmt, in einer Astrozyt-Neuron-Cokultur zu einer gesteigerten Exzitotoxizität.²⁶ Dies unterstreicht die essentielle Funktion des astrozytären mitochondrialen Stoffwechsels für das Gewährleisten einer raschen Entfernung von Transmittern aus dem synaptischen Spalt. Die Aktivität zahlreicher mitochondrialer Enzyme trägt des Weiteren zur Regeneration von NAD(P)H/H⁺ bei. Aus den genannten Beispielen wird ersichtlich, dass gliale Mitochondrien hochspezialisierte Organellen sind, die vielfältige Aufgaben wahrnehmen. So könnte auch der in dieser Arbeit postulierte Mechanismus einer mGluR5/PKC δ -vermittelten Aktivierung der PDH nicht nur der bloßen Synthese von Energieäquivalenten dienen, sondern auch z.B. den Transmittermetabolismus unterstützen. So beschreiben Rose et al.²⁷ 2020 gliale Mitochondrien wie folgt:

“[...] this paints a unique picture for astrocyte mitochondria compared to the prototypical mammalian cell. It is a mitochondria specializing in synthesis at the expense of OXPHOS, while the neuronal mitochondria specializes in OXPHOS at the expense of synthesis.”

3.3.2 Glutamatmetabolismus in Astrozyten

Astrozyten sind hochspezialisiert für die Verstoffwechslung von Glutamat. Ihre Ausstattung mit zahlreichen Enzymen des Glutamatstoffwechsels wie z.B. Glutaminsynthetase (GS) oder Glutamatdehydrogenase (GLDH)²⁸ ermöglicht ihnen nicht nur die Wiederverwertung neuronalen Glutamats, sondern auch die De novo-Synthese des Transmitters, welcher an umliegende Neuronen weitergegeben oder selbst von den Astrozyten genutzt werden kann. Schon lange ist ein Kreislauf von Glutamat via Glutamin (Gln) bekannt: über

Glutamattransporter wie z.B. GLT-1 aufgenommenes Glutamat kann durch die Glutaminsynthetase unter ATP-Verbrauch in das strukturell verwandte Glutamin umgewandelt werden – eine Reaktion, bei der gleichzeitig eine Assimilation von Ammoniumionen stattfindet, die wesentlich zur Entgiftung von Ammoniak im ZNS beiträgt. Glutamin kann exportiert und sowohl glutamatergen als auch GABAergen Neuronen als Rohstoff für den jeweiligen Transmitter zur Verfügung gestellt werden.²⁹ Die Annahme, dass das gesamte von Astrozyten aufgenommene Glutamat zu Glutamin umgewandelt wird und innerhalb eines geschlossenen Zyklus zirkuliert,³⁰ gilt als veraltet. Vielmehr handelt es sich um einen offenen Zyklus, aus dem Metabolite in andere Stoffwechselwege gelangen können. Genauso kann der Zyklus auch aus anderen Stoffwechselwegen anaplerotisch gespeist werden.³¹ So können auch Kohlenhydrate zur De novo-Synthese von Glutamat herbeigezogen werden, deren Kohlenstoffgerüste in ca. 25-30% des zirkulierenden Glutamats in Astrozyten wiederzufinden sind.³² Hinzukommt die oxidative Verstoffwechslung von Glutamat, welche in Mitochondrien stattfindet. Zur raschen Verstoffwechslung sind Mitochondrien räumlich in der Nähe von Glutamattransportern positioniert.³³ Eine beträchtliche Menge des Glutamats wird über die GLDH zu α -Ketoglutarat umgewandelt,³⁴ welches im Citratzyklus weiterverstoffwechselt wird. Auf Ebene des Oxaloacetats werden in Form von Acetyl-CoA, von der PDH gebildet, zwei Kohlenstoffatome angefügt, welche nicht dem Glutamat entstammen müssen. Damit das vollständige Gerüst des Glutamats oxidativ abgebaut und verwertet werden kann, muss es über Zwischenprodukte aus dem Citratzyklus hinaus- und anschließend wiedereingeschleust werden. Das verbleibende Kohlenstoffgerüst eines Glutamatmoleküls kann entweder auf Höhe des Malats über das Malatenzym in Pyruvat überführt und über PDH in den Zyklus reintegriert werden, oder auf Höhe des Oxaloacetats. Dabei wird Oxaloacetat von der Phosphoenolpyruvatcarboxykinase (PEPCK) in Phosphoenolpyruvat und anschließend von der Pyruvatkinase in Pyruvat umgewandelt. Pyruvat kann nun wieder über die PDH in den Zyklus eingebracht werden. Auf diesem Wege kann aus Glutamat entstandenes Pyruvat theoretisch auch mit aus Glutamat entstandenem Oxaloacetat zusammengeführt werden, sodass sämtliche

Kohlenstoffatome der Glutamatmoleküle an irgendeinem Punkt des Citratzyklus vollständig zu CO₂ oxidiert werden können. Die PDH schleust Pyruvat unabhängig von seiner Abstammung in den Citratzyklus ein, und stellt damit einen allgemeinen Regulationspunkt für den oxidativen Abbau von Glutamat aber auch von anderen Substraten des Katabolismus dar.

Zusammenfassend lassen sich die Wege des Glutamats in Astrozyten in vier Hauptpfade untergliedern: (1) De novo-Synthese aus Kohlenhydraten zur Anaplerose, (2) Umwandlung von Glutamat zu Glutamin und Export für glutamaterge Neuronen, (3) Umwandlung von GABA zu Glutamat und Re-Export als Glutamin für GABAerge Neuronen und (4) Oxidation von Glutamat im Mitochondrium (siehe Abbildung 2).

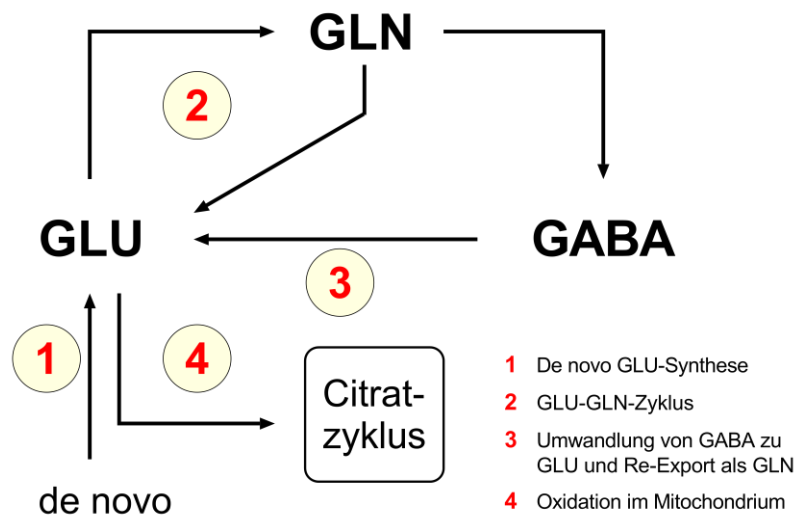


Abbildung 2 – Hauptstoffwechselfade des Glutamats in Astrozyten

3.4 Proteinkinase Cδ

Die Proteinkinase Cδ gehört zur Familie der Proteinkinase C-Enzyme, welche essentielle Schlüsselenzyme für die von Neurotransmittern und Hormonen ausgehende Signaltransduktion sind.³⁵ In Assoziation mit zahlreichen Rezeptoren erfüllen sie vielfältige Aufgaben in der Regulation metabolischer Prozesse, Zellproliferation und Apoptose.^{36,37} Bislang sind mindestens elf Subtypen beschrieben worden; α, βI, βII, γ, δ, ε, ζ, η, θ, λ und ι.³⁸ Diese unterscheiden sich jeweils in ihrer Expression in verschiedenen Gewebetypen,

ihren Aktivierungsmechanismen sowie in ihrer spezifischen intrazellulären Lokalisation. Die Isoenzyme lassen sich wiederum abhängig von ihren Aktivierungsmechanismen in drei Kategorien einteilen: in klassische (cPKC), neue (nPKC),³⁹ und atypische (aPKC)⁴⁰ Proteinkinase C. Während die cPKCs (α , β I, β II, γ) durch Calcium und Diacylglycerin (DAG) aktiviert werden, weisen die nPKCs (δ , ϵ , η , θ) einen DAG-abhängigen, aber Ca^{2+} -unabhängigen Aktivierungsmechanismus auf, wohingegen die aPKCs (ζ , λ , ι) gänzlich unabhängig von beiden Stimuli aktiviert werden können.

Die PKC δ ist ein ubiquitär exprimiertes Enzym,³⁵ welches im Fokus der Untersuchungen im Rahmen dieser Dissertationsarbeit steht. Sie ist in der Lage, ins Zytoplasma/an die Zellmembran⁴¹ aber auch in den Nucleus⁴² oder an das Mitochondrium^{43,44} zu translozieren. Auch in Astroglia liegt die PKC δ sowohl zytosolisch als auch überwiegend organellenassoziiert vor⁴⁵ und scheint dabei vielfältige Aufgaben wahrzunehmen. Zahlreiche Proliferations- und Differenzierungsprozesse sowie die Expression wichtiger astrozytärer Proteine (Glutaminsynthetase und GFAP) werden von ihr beeinflusst.⁴⁶

3.4.1 Zur (mitochondrialen) Translokation der PKC δ

Für die Vermittlung PKC δ -bedingter Effekte am Mitochondrium und in das Mitochondrium hinein wird neben der PKC δ ein Komplex aus Cytochrom c, dem Adapterprotein p66Shc und Retinol benötigt.⁴⁷ Die Aktivität dieses PKC δ -Signalosoms wird dabei über ihren Redoxzustand reguliert.^{47,48}

Die PKC δ scheint *in situ* sowohl mit astrozytären als auch neuronalen Strukturen assoziiert zu sein. Die Existenz der PKC δ konnte in verschiedenen Neuronenpopulationen, z.B. im Thalamus⁴⁹ oder auch in Purkinjezellen des Cerebellum,^{49,50} und auch in Mikroglia⁴⁵ und in Oligodendroglia⁵¹ gezeigt werden. Während über das Vorkommen der PKC δ in Astrozyten weitgehender Konsens herrscht, ist die Literatur zur Verteilung der verschiedenen PKC-Isoenzyme in Neuronen allerdings diskrepant. Die unterschiedlichen und teilweise gänzlich widersprüchlichen Ergebnisse könnten dabei darauf zurückzuführen sein, dass die PKC-Expression u.a. spezie- und altersabhängig und somit außerordentlich variabel ist.⁴⁵

Die PKC δ weist als einzige Isoform der PKC-Familie die Besonderheit auf, mit funktioneller Relevanz einer Regulation durch Tyrosinphosphorylierung zu unterliegen, welche sowohl die Translokation als auch die Kinaseaktivität der PKC δ beeinflussen kann.³⁷ So hat das menschliche Protein 20 Tyrosinreste (das der Maus 19 und das der Ratte 21), welche sich in den unterschiedlichen Domänen der Kinase befinden und eine Feinabstimmung der Proteinfunktion erlauben.³⁷ Der genaue Antwort der Kinase auf bestimmte Phosphorylierungsmuster scheint dabei zelltypspezifisch zu sein.⁵²

3.5 Funktion und Regulation des Pyruvatdehydrogenasekomplexes

Der Pyruvatdehydrogenasekomplex (PDC) mit dem Schlüsselenzym Pyruvatdehydrogenase ist ein in der inneren Mitochondrialenmembran eingebetteter Enzymkomplex, welcher dem Citratzyklus als obligat aerober Stoffwechselweg vorangestellt ist. Er besteht aus den drei Untereinheiten Pyruvatdehydrogenase (E1), Dihydrolipoamid-Acetyltransferase (E2) und Dihydrolipoamid-Dehydrogenase (E3).⁵³ PDC setzt ihr Substrat Pyruvat mithilfe des Cosubstrats Coenzym A und NAD⁺ und der Cofaktoren Thiamin und Liponamid zu Acetyl-CoA um, welches (neben der Verwendung in der Fettsäuresynthese) einen Baustein zur Bildung von Citrat im Citratzyklus darstellt. Die hierbei katalysierte Reaktion ist irreversibel und führt sekundär zu einer höheren Aktivität der Atmungskette, um die für den Citratzyklus notwendigen Reduktionsäquivalente durch Oxidation wieder zu regenerieren. Die Regulation des PDC erfolgt hauptsächlich über die Phosphorylierung der α -Untereinheit von E1 (E1 α), welche drei regulatorisch bedeutsame Serinreste aufweist.⁵⁴ Während die Phosphorylierung zur Inaktivierung des Enzymkomplexes führt, steigert die Dephosphorylierung seine Aktivität. Ser²⁹³, Ser³⁰⁰ und Ser²³² – auch Rest 1, Rest 2 und Rest 3 genannt – werden dabei von den PDH-Kinasen (PDK1-4) und PDH-Phosphorylasen (PDP1/2) kovalent modifiziert, welche selbst wiederum an regulatorischen Untereinheiten durch andere Proteine oder Signalmoleküle beeinflusst werden können. Die PDK2 und die PDP1 sind dabei die in Astrozyten vorherrschenden Formen⁵⁵; die PDK2 ist in der Lage, Rest 1 und 2 zu phosphorylieren während PDP1 alle Reste dephosphorylieren kann, jedoch mit unterschiedlicher Geschwindigkeit.⁵⁶

Phosphorylierungen an Rest 1 werden am schnellsten phosphoryliert und am zögerlichsten dephosphoryliert und tragen am meisten zur Inaktivierung des PDC bei.⁵⁷ Bis zu 97% der Aktivitätssteigerung kann abhängig von Rest 1 sein,⁵⁸ jedoch finden sich von Komplex zu Komplex Unterschiede der kinetischen Modulationsfähigkeit, welche möglicherweise auf Phänomene wie z.B. Halbseitenreaktivität oder Kooperativität der Untereinheiten zurückzuführen sind. Trotzdem nimmt Rest 1 insofern eine Sonderstellung ein, weil ihre Dephosphorylierungsgeschwindigkeit durch die PDP1 unempfindlich gegenüber vorausgehend bestehenden, unterschiedlichen Phosphorylierungsmustern ist, d.h. eine bereits bestehende Phosphorylierung von Rest 2 und 3 beeinflusst die Dephosphorylierungsgeschwindigkeit von Rest 1 nicht. Veränderungen an Ser²⁹³ waren daher für die Untersuchung der PDH-Aktivität in dieser Arbeit besonders interessant.

3.6 Fragestellung

Die zu untersuchende Ausgangshypothese dieser Arbeit basierte auf den Ergebnissen der nachfolgend aufgeführten Arbeiten. Derouiche et al. wiesen in peripheren Astrozytenforsätzen eine beträchtliche Anzahl an Mitochondrien nach, deren funktionelle Bedeutung noch unklar ist.⁵⁹ Es war naheliegend, dass sie für die aufwändigen Aufgaben der Astrozyten in Synapsennähe Energieäquivalente beisteuern könnten, was außerdem durch die Beobachtung einer strategischen Positionierung von Mitochondrien z.B. an energiezehrenden Glutamattransportern unterstützt wurde.³³ Winkler et al. zeigten, dass in Astrozyten, entgegen der verbreiteten Annahme einer rein anaeroben Energiegewinnung, ein basaler oxidativer Metabolismus vorhanden ist und die intrazellulären ATP-Spiegel dieser durch extrazelluläre Stimuli wie z.B. Glutamat beeinflusst werden könnten.⁶⁰ Caruso et al. demonstrierten in Hepatozyten einen PKC δ -abhängigen Aktivierungsmechanismus der PDH, welcher durch Insulin in Gang gesetzt wird.⁴⁴ In embryonalen Fibroblasten kann ebenfalls eine solche PDH-Aktivierung durch die PKC δ hervorgerufen werden, jedoch über die Aktivierung einer noch unidentifizierten hypothetischen Phosphatase, welche die auf die PDH inhibitorisch wirkende PDH-Kinase 2

(PDK2) hemmt.⁴⁷ Die PDH beliefert den Citratzyklus mit Kohlenstoffgerüsten in Form von Acetyl-CoA, sodass durch die Aktivierung der PDH vermehrt Reduktionsäquivalente generiert werden, welche wiederum der mitochondrialen Atmungskette zugeführt werden können. Die Aktivität der PKC δ könnte daher auch für Astrozyten einen Regulator des oxidativen Energiestoffwechsels darstellen. Da Astrozyten außerdem Neurotransmitterrezeptoren aufweisen, die mit PKC δ interagieren könnten, könnte synaptische Aktivität über diese Rezeptoren den oxidativen Metabolismus in Astrozyten beeinflussen. Die Grundhypothese dieser Arbeit beinhaltet daher im Wesentlichen, ob auch in Astrozyten eine PKC δ -vermittelte Aktivierung der PDH erfolgen könnte und wodurch eine solche Aktivierung des mitochondrialen Stoffwechsels hervorgerufen werden könnte.

Zunächst stellte sich die Frage, ob die für einen solchen Aktivierungsmechanismus notwendigen Proteine (z.B. PKC δ , PDP1) auch in Astrozyten vorhanden sind. Im Folgenden galt es zu untersuchen, ob die PKC δ auch in Astrozyten eine Translokation hin zu Mitochondrien vollführen könnte. Der Signalweg einer solchen Kaskade bis an das mitochondriale Enzym PDP1 sollte dabei ausgehend von Membranrezeptoren untersucht werden, die extrazelluläre Signale (und so auch die Information über umliegende synaptische Aktivität) in das Innere eines Astrozyten hinein vermitteln können. Beobachtet wurde anfangs bereits im Ruhezustand eine relativ hohe Assoziation der PKC δ mit Mitochondrien. Die ausgeprägte mitochondriale Assoziation der PKC δ findet sich auch in den Ergebnissen von Slepko et al.⁴⁵ wieder; *in vitro* ist der überwiegende Anteil der PKC δ in Astrozyten an die Zellorganellfraktion gebunden. Slepko et al. betonen jedoch, dass unter Zellkulturbedingungen die subzelluläre Verteilung des Enzyms von der *in vivo* abweichen könnte. Auch konnte beobachtet werden, dass nach einer zehnminütigen Inkubation mit Phorbol-12-myristat-13-acetat (einem Diacylglycerin-Struktur analogon und nPKC-Aktivator) eine verstärkte Assoziation besonders der PKC δ mit der Zellorganellfraktion (und somit auch den Mitochondrien) zustande kam. Diese Beobachtung unterstreicht die prinzipiell vorhandene Translokationsfähigkeit der PKC δ auch in Astrozyten. Auf diesen Erkenntnissen fußend, wurde in dieser Arbeit untersucht, durch welche

Stimuli eine Translokation induziert werden kann. Neben dem Erzeugen oszillierender Ca^{2+} -Konzentrationsänderungen kann der mGluR5 auch über DAG-Konzentrationsänderungen auf Lokalisation und Aktivität der PKC δ Einfluss nehmen,⁴¹ sodass besonders mGluR5 dahingehend näher untersucht wurde.

Zur Erfassung einer möglichen Bedeutung der PDH-Aktivierung für die intrazellulären ATP-Spiegel wurde untersucht, ob die hypothetisch Glutamat-induzierte, PKC δ -vermittelte Aktivierung der PDH gewissermaßen eine Schalterfunktion innehat, um bedarfsgerecht in Situationen mit vermehrtem ATP-Bedarf, wie z.B. synaptischer Aktivität in räumlicher Nähe, die mitochondriale ATP-Produktion in Astrozyten zu verstärken.

4 Material und Methoden

4.1 Zellkultur

Die Herstellung und Handhabung der Zellkulturen erfolgte unter sterilen Bedingungen an Präparations- und Sterilbänken. Primäre Astrozytenkulturen wurden aus präparierten Cortices von neonatalen Sprague Dawley-Ratten (max. 3 Tage alt) nach einer leicht abgewandelten Methode von McCarthy und De Vellis angelegt⁶¹. Die Ratten wurden mithilfe einer Schere dekapitiert und das Gehirn nach Entfernung von Kopfhaut und Schädelknorpel in eine Petrischale überführt. Es folgte unter dem Stereomikroskop das Freipräparieren der Cortex-Hemisphären, welche daraufhin in mit HEPES (1:40) gepuffertes, eisgekühltes DMEM gelegt wurden. Die Cortices von jeweils zwei Jungtieren wurden durch achtminütige Inkubation mit 0,05% Trypsin-EDTA bei 37 °C dissoziiert. Nach Absaugen der Trypsinlösung wurde der weitere Ablauf der enzymatischen Reaktion mit 10 ml 10% inaktiviertem fetalem Kälberserum (FKSi)-haltigem DMEM gestoppt und das Gewebe durch sechsmaliges Aufziehen durch einer 18 Gauge-Kanüle weiter homogenisiert. Die Zellsuspension wurde dann für 6 Minuten bei 1500 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 15 ml 10% FKSi-haltigem DMEM resuspendiert und zu jeweils 5 ml auf drei 75 cm² Zellkulturflaschen (canted Neck, Fa. Corning) ausplattiert. Deren Boden wurde dabei vorher mit 5 ml Poly-L-Lysin-Lösung (PLL) bedeckt für mindestens 2 Stunden belassen – vor Einfüllen der Zellsuspension wurde die Lösung verworfen und der Flaschenboden zweimalig mit DMEM nachgespült, um überschüssiges PLL zu entfernen. Die Zellen wurden in einem Brutschrank (HERACell, Fa. Heraeus) bei 37 °C, 100% Luftfeuchtigkeit und einem 10% CO₂/90% Luft-Gemisch kultiviert. Der erste Mediumwechsel erfolgte nach 5 Tagen. Nach 7 Tagen wurden die Kulturflaschen für 18 Stunden geschüttelt (bei 180 rpm), wobei sich die nicht-astrozytären Zellen sowie verbliebener Zelldetritus lösten, welche durch einen anschließenden Mediumwechsel entfernt werden konnten. Die nach McCarthy & De Vellis in diesem Schritt schon mit etwa 95-prozentiger Reinheit vorliegenden Astrozyten⁶¹ wurden zwischen dem 13.-15. Tag auf PLL-beschichtete Deckgläschen überführt. Bis dahin erfolgte ein Mediumwechsel drei Mal wöchentlich mit FKSi-freiem DMEM. Für das Umsetzen auf

Deckgläschen wurden zunächst jeweils 10 hitzesterilisierte Deckgläschen in eine Petrischale mit 100 mm Durchmesser gelegt. Die Zellkulturflaschen wurden zweimal mit 37°C-warmem PB gespült, welcher für insgesamt 10 Minuten belassen wurde. Nach Verwerfen des Puffers wurden die bodenständigen, adhären Astrozyten durch 90-sekündige Inkubation mit 5 ml 0,05% Trypsin-EDTA (bei 37 °C) unter starkem Beklopfen von der Flasche abgelöst und die weitere enzymatische Reaktion durch die Zugabe von 5 ml 20% FKS_i-haltigem DMEM gestoppt. Die Zellsuspension wurde dann für 6 Minuten bei 1500 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 10% FKS_i-haltigem DMEM resuspendiert und in einem Flaschen:Petrischalen-Verhältnis von 1:1 oder bei vormalig sehr dichtem Wuchsmuster in einem Verhältnis von 3:4 ausplattiert. Die 5 ml-zellsuspensionhaltigen Petrischalen wurden weiterhin bei 37°C, 100% Luftfeuchtigkeit und einem 10% CO₂/90% Luft-Gemisch kultiviert und das Medium (10% FKS_i-haltiges DMEM) dreimal wöchentlich gewechselt, bis lichtmikroskopisch ein (sub-)konfluentes Wuchsmuster zu beobachten war, i.d.R. zwischen Tag 17-21 ab Anlegen der Primärkultur.

4.2 Experimentelle Inkubationen

Grundsätzlich erfolgte die Inkubation der Zellen in einer Lösung, deren Basis aus dem Zellkulturmedium MEM (Sigma, M2414) bestand. MEM erwies sich nach Studium der Inhaltsstoffe als das Medium mit den wenigsten Zusätzen an nicht-essentiellen Substraten (wie z.B. Pyruvat, Lactat oder Glutamat), sodass ein störender Effekt des Mediums auf die untersuchten metabolischen Prozesse minimiert werden konnte (siehe Kapitel 6.1.5). Für die praktische Umsetzung der Inkubationen mussten die folgenden Sachverhalte beachtet werden. Für schwer wasserlösliche Substanzen mussten Lösungsmittel gewählt werden, die anschließend bei Überführung in das wässrige Medium in die gewünschte Konzentration keine Toxizität für die kultivierten Zellen aufweisen. Die meisten Versuchslösungen mussten, besonders wenn als Tropfen eingesetzt, aufgrund der kleinen Volumina mit relativ großer Oberfläche stets mit einem inerten Puffer versetzt sein und auch für kurze Inkubationszeiten zügig in den CO₂-

Inkubator überführt werden. Schwankungen des extrazellulären pH-Werts könnten sonst einen unkalkulierbaren Einfluss auf die Aktivität des Energiestoffwechsels in Zellen nehmen (siehe Kapitel 6.1.5). Abhängig vom Wirkort der eingesetzten pharmakologischen Substanzen unterschiedliche (Prä-)Inkubationszeiten eingehalten.

Für sämtliche Inkubationen mit einer Inkubationsdauer >30 Sekunden wurden zunächst auf einem kreisförmigen Parafilm-Zuschnitt auf den Boden einer Petrischale, in entsprechender Anzahl der Deckgläschen für einen experimentellen Ansatz, 80 µl große Tropfen der jeweiligen Versuchslösung gegeben. Die Petrischale wurde daraufhin für mindestens 30 Minuten bei 37°C in den CO₂-Inkubator gestellt, damit die Versuchslösung dieselbe Temperatur und denselben CO₂-Partialdruck erreicht wie das Kulturmedium. Nach der Akklimatisierung der Lösungen wurden die Deckgläschen mit den Zellkulturen aus dem Medium genommen, die noch haftenden Tropfen Nährmedium rasch aber vorsichtig mit einem fusselreien Einmal-Papier (Kimwipe) abgesaugt, diese mit der bewachsenen Kulturfläche nach unten auf die Tropfen gelegt und für die jeweilig angedachte Inkubationszeit belassen.

Für sämtliche Inkubationen mit einer Inkubationsdauer unter 30 Sekunden wurden in einem 37°C warmen Wasserbad kleine beschwerte Bechergläser aufgestellt, in die mehrere Milliliter der mit HEPES-gepufferten Versuchslösung gefüllt wurde. Die Versuchslösung wurde zuvor mit locker aufsitzendem Schraubdeckel aufgrund des großen Volumens über Nacht im CO₂-Inkubator zur Akklimatisierung gelagert. Unmittelbar vor den Experimenten wurden die Lösungen entnommen und vorsichtig, ohne große Verwirbelung an der Luft, in die Bechergläser umgefüllt und dort mit konstanter Temperatur für die Dauer des Experiments beibehalten. Die Behandlung der Deckgläschen erfolgte in diesem Fall durch das Eintunken des Deckgläschens in das relativ große Lösungsvolumen für die jeweils vorgesehene Anzahl an Sekunden. Danach wurden die Deckgläschen zunächst wenige Sekunden mit 37°C-warmem 0,1 M PB gespült und anschließend für 10 Minuten in 4% Paraformaldehyd in PB (pH 7,4) fixiert. Während die länger inkubierten Deckgläschen mit einer Pinzette vom Tropfen abgehoben und in PB gelegt wurden, wurden die kürzer

inkubierten Deckgläschen in einem Pinzettengriff von der Inkubationslösung kommend, direkt zwei Mal in PB eingetaucht und sofort in die Fixierlösung gegeben. Die unterschiedlichen Inkubationsmethoden in Abhängigkeit von der vorgesehenen Inkubationsdauer ermöglichten eine präzisere Einhaltung der teilweise nur wenige Sekunden andauernden Inkubationsdauer. Die Zeitverzögerung zwischen Inkubationsende und Proteindenaturierung durch Fixation, dem eigentlichem Reaktionsstopp, konnte dadurch minimiert werden.

4.2.1 ACPD

Der metabotrope Glutamatrezeptoragonist 1,3-trans-homo Aminodicarboxycyclopentan (ACPD; Fa. Alexis, Nr. ALX-550-006-M005) weist eine agonistische Aktivität gegen alle mGluRs (außer mGluR7) auf und hat keine ausgeprägte Selektivität unter diesen, während an ionotropen Glutamatrezeptoren selbst in hohen Konzentrationen keine Aktivität feststellbar ist.⁶² Da ein Racemat aus dem aktiven 1S,3R-ACPD-Stereoisomer und dem inaktiven 1R,3S-ACPD-Stereoisomer vorliegt, muss die Substanz für das Erzielen der gewünschten Zielkonzentration des wirksamen Enantiomers in doppelter Konzentration eingesetzt werden. ACPD wurde zunächst in 0,2 M Natronlauge auf eine 100 mM konzentrierte Vorratslösung gelöst, welche bei -20°C gelagert stabil bleibt. Zur Präparation der Versuchslösungen wurde ein Teil der Vorratslösung mit HEPES-gepuffertem MEM als Basis aller Versuchslösungen um den Faktor 500 auf das gewünschte Volumen auf eine Arbeitskonzentration von 200 µM, entsprechend 100 µM des aktiven Enantiomers, verdünnt.

4.2.2 MCPG

Der metabotrope Glutamatrezeptorantagonist α -Methyl-4-Carboxyphenylglycin (MCPG; Fa. Hello-bio, Nr. HB0038) weist eine nicht-selektive antagonistische Aktivität gegen alle ACPD-sensiblen Rezeptorsubtypen auf, weist jedoch für einzelne Typen IC_{50} -Werte von >1000 µM auf,⁶³ sodass statt der von Manzoni et al. vorgeschlagenen Konzentration von 500 µM⁶⁴ eine Versuchskonzentration von 10 mM verwendet wurde. Zunächst wurde das Natriumsalz auf eine Konzentration von 100 mM in bidestilliertem Wasser gelöst und erst unmittelbar

vor dem Versuch mit HEPES-gepuffertem MEM um den Faktor 10 verdünnt. Da es einen kompetitiven Inhibitor an den mGluRs darstellt, wurde es stets zusammen mit Glutamat in einer Konzentration von 100 μM angewendet. Die nicht-mGluR-vermittelten Wirkungen von Glutamat treten dadurch ungehindert ein, sodass isoliert der Effekt der ausbleibenden mGluR-vermittelten Prozesse beobachtet werden kann.

4.2.3 MPEP

Das wasserlösliche Hydrochlorid des hochselektiven mGluR5-Antagonisten 2-Methyl-6-(phenylethynyl)pyridin (MPEP; Fa. Hello-bio, Nr. HB0426) mit einem IC_{50} -Wert von 36 nM wurde mit HEPES-gepuffertem MEM ausgehend von einer 2 mM-Vorratslösung in bidestilliertem Wasser auf eine Arbeitskonzentration von 100 μM gebracht. Da er die Wirkung von Glutamat am mGluR5 aufhebt, wurde es stets zusammen mit Glutamat in einer Konzentration von 100 μM angewendet. Auch hier treten dadurch die nicht-mGluR5-vermittelten Wirkungen von Glutamat ungehindert ein, sodass isoliert der Effekt der ausbleibenden mGluR5-vermittelten Prozesse beobachtet werden kann.

4.2.4 Rottlerin

Rottlerin (Fa. Sigma-Aldrich, Nr. R5648) ist ein in der Literatur als PKC δ -spezifisch beschriebener Kinaseinhibitor. Die Reinsubstanz wurde aufgrund der schlechten Wasserlöslichkeit zunächst in 54°C warmem, analysenreinen Ethanol aufkonzentriert und dann etappenweise in HEPES-gepuffertem Medium gelöst, bis eine ausreichend geringe Ethanolrestkonzentration von <1‰ erreicht war, die bei kurzer Inkubationszeit als nicht toxisch für die kultivierten Zellen gilt, gleichzeitig aber noch eine ausreichend hohe Wirkkonzentration des Rottlerins von 3 μM (vgl. Caruso et al.⁴⁴) vorhanden war. Die resultierende Versuchslösung wurde bei einer Temperatur von 37°C eingesetzt.

4.2.5 Gö6976 und Gö6983

Gö6976 (G76; Fa. Abcam, Nr. Ab141413) ist ein selektiver Inhibitor von PKCs aus der Familie der cPKCs mit besonders hoher inhibitorischer Aktivität gegen PKC α (IC_{50} 2,3 nM) und PKC β (IC_{50} 6,2 nM), jedoch ohne jegliche Affinität zur

PKC δ . Gö6983 (G83; Fa. Abcam, Nr. Ab144414) ist ein Breitband-PKC-Inhibitor, der sowohl cPKCs als auch die meisten nPKCs inkl. PKC δ in nanomolaren Konzentrationen hemmt. Bzgl. der Selektivität des Inhibitionsspektrums der einzelnen PKC-Isoformen siehe Martiny-Baron et al.⁶⁵ für Gö6976 und Gschwendt et al.⁶⁶ für Gö6983. Beide Inhibitoren sind schlecht wasserlöslich und nur in DMSO gut löslich und stabil. Daher wurden Vorratslösungen für beide Inhibitoren in sterilem DMSO mit einer Konzentration von 10 mM des jeweiligen Gö-Inhibitors hergestellt. Dies ermöglichte es nun, die Vorratslösung um den Faktor 10.000 zu verdünnen, damit eine ausreichend geringe DMSO-Restkonzentration von <0,1‰ erreicht war, die bei kurzer Inkubationszeit als sicher nicht toxisch für kultivierte Zellen gilt.^{67,68} Gleichzeitig war dadurch eine ausreichend hohe Wirkkonzentration der Inhibitoren von 1 μ M und damit das >100fache der IC₅₀-Konzentration vorhanden. Auch hier wurde Glutamat in einer Konzentration von 100 μ M hinzugegeben, damit die nicht-PKC-vermittelten Wirkungen von Glutamat ungehindert eintreten können, sodass isoliert der Effekt der ausbleibenden, durch Glutamat stimulierten, PKC-vermittelten Prozesse beobachtet werden kann. Da der Wirkungsort dieser beiden PKC-Inhibitoren intrazellulär ist, müssen diese erst die Zellmembran der kultivierten Zellen penetrieren. Um dies zu gewährleisten, wurde vor der Behandlung mit der Kombinationslösung aus Glutamat und PKC-Inhibitor eine Präinkubation über 30 Minuten im CO₂-Inkubator nur mit dem jeweiligen PKC-Inhibitor vorgenommen (vgl. Li et al.⁶⁹) und die Präinkubationslösung dann sofort bei Beginn der Inkubationszeit durch die Kombinationslösung ausgetauscht.

4.3 Immunzytochemie (Immunfluoreszenz)

4.3.1 Genutzte Antikörper

Tabelle 1 – Genutzte Antikörper

Name des Antikörpers	Hersteller	Katalognummer	Genutzte Verdünnung
Primärantikörper			
Kaninchen anti-PKC δ	Cell Signaling Technology	9616	1:50
Maus anti-COXIV	Cell Signaling Technology	11967	1:500
Kaninchen anti-PDP1	MyBioSource	MBS2521181	1:100
Kaninchen anti-phospho-Ser ²⁹³ -PDH-E1 α	Millipore	AP1062	1:500
Maus anti-PDH-E1 α	Abcam	ab110330	1:1000
Maus anti-GFAP-Alexa Fluor 647	Cell Signaling Technology	3657	1:100
Sekundärantikörper			
Ziege anti-Kaninchen-biotinyliert	Vector Laboratories	BA-1000	1:217,4
Esel anti-Maus-Alexa Fluor 488	Jackson ImmunoResearch Laboratories	715-545-150	1:100
Esel anti-Maus-CY3	Jackson ImmunoResearch Laboratories	715-165-150	1:1000
Esel anti-Kaninchen-Alexa Fluor 488	Jackson ImmunoResearch Laboratories	711-545-152	1:100
Esel anti-Kaninchen-CY3	Jackson ImmunoResearch Laboratories	711-165-152	1:1000
Streptavidin-CY3	Vector Laboratories	SA-1300	1:1000

4.3.2 Doppelfärbung PKC δ /COXIV

Nach zweimaligem Spülen mit PB wurden die Zellen für die nachfolgende immunzytochemische Färbung intrazellulärer und mitochondrialer Antigene mit reinem, -20°C kaltem Methanol 10 Minuten lang bei -20°C fixiert und permeabilisiert. Nach kurzer Spülzeit erfolgte die Präinkubation der Zellen in einer 10%-NHS/NGS-PB-Lösung, um die unspezifische Bindung des

Sekundärantikörper zu reduzieren und freie Proteinbindungsstellen zu blockieren. Nach Absaugen der Serumlösung wurde die Lösung mit den Primärantikörpern (in den angegebenen Verdünnungen, siehe Tabelle 1) mit jeweils 1% NHS und 1% NGS in PB appliziert und es erfolgte die Inkubation bei +4 °C über Nacht. Nach dreimaligem Spülen über 20 Minuten in PB wurden die Deckgläschen mit der Lösung mit den Sekundärantikörpern (in den angegebenen Verdünnungen, siehe Tabelle 1) eine Stunde lang unter Lichtausschluss inkubiert. Zur Verstärkung des PKC δ -Signals wurde dabei ein biotinylierter Sekundärantikörper ohne Fluorochromkopplung gewählt. Nach erneutem dreimaligem Spülen über 20 Minuten in PB erfolgte schließlich die einstündige Behandlung der Zellen mit der Fluorochrom-gekoppelten-Streptavidinlösung. Abermals wurden die Deckgläschen dreimal über 30 Minuten in PB gespült und nach kurzem Eintunken in bidestilliertem Wasser auf einen auf einem Objektträger applizierten Tropfen Eindeckmittel gelegt. Diese trockneten über Nacht unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur und wurden ab dann bei +4°C im Dunkeln aufbewahrt.

Schnittpräparate wurden analog zu den Zellkulturpräparaten gefärbt. Frei flottierende Hirnschnitte wurden dafür in die jeweilige Antikörperlösungen gegeben. Zur Identifizierung der Astrozyten im Gewebe wurden die Schnitte am Ende zusätzlich mit einem fluorochromierten Primärantikörper gegen den astroglialen Marker GFAP über Nacht inkubiert. Für Immunfärbungen wurden 40 oder 100 μ m dicke Vibratomschnitte von Mäusegehirnen angefertigt. Die Perfusionsfixierung (4% Paraformaldehyd) und Präparation erfolgte im Zusammenhang anderer Versuchsserien im Institut, sie wurden durchgeführt im Rahmen der Versuche von Melzer.^{70,71}

4.3.3 Doppelfärbung phospho-PDH/PDH

Nach zweimaligem Spülen mit PB wurden die Zellen für die nachfolgende immunzytochemische Färbung intrazellulärer Antigene in 0,2-prozentiger Triton-X100-Lösung 3 Minuten lang bei Raumtemperatur permeabilisiert. Nach kurzer Spülzeit erfolgte die Präinkubation der Zellen in einer 10%-NHS-PB-Lösung, um die unspezifische Bindung des Sekundärantikörpers zu reduzieren und freie

Proteinbindungsstellen zu blockieren. Nach Absaugen der Serumlösung wurde die Lösung mit den Primärantikörpern (in den angegebenen Verdünnungen, siehe Tabelle 1) mit 1% NHS in PB appliziert und es erfolgte die Inkubation bei +4 °C über Nacht. Nach dreimaligem Spülen über 20 Minuten in PB wurden die Deckgläschen mit der Lösung mit den Sekundärantikörpern (in den angegebenen Verdünnungen, siehe Tabelle 1) eine Stunde lang unter Lichtausschluss inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Spülen über 30 Minuten in PB nach kurzem Eintunken in bidestilliertem Wasser wurden die Deckgläschen auf einem Objektträger applizierte Tropfen Eindeckmittel gelegt. Diese trockneten über Nacht unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur und wurden ab dann ebenfalls bei +4°C im Dunkeln aufbewahrt.

4.4 Aufnahmen

Alle Deckgläschen aus verschiedenen experimentellen Ansätzen wurden nach der Immunfluoreszenzfärbung von einer zweiten Person eingedeckt und der Objektträger mit einem Code versehen, sodass bereits die mikroskopischen Aufnahmen durch den Autor dieser Arbeit verblindet gemacht werden konnten. Erst nach Durchführung der gesamten quantitativen Auswertung erfolgte die Entblindung, sodass die Werte für die folgenden statistischen Tests den jeweiligen Gruppen zugeordnet werden konnten. Die mikroskopischen Aufnahmen wurden an einem Epifluoreszenzmikroskop der Fa. Zeiss mit einem 100x-Ölimmersionsobjektiv, n.A. 1,3 und einer 2048 x 2048-Pixel Monochromkamera (Spot Insight 4, Diagnostic Instruments, Sterling Heights, Michigan, USA) mit 7,45µm quadratischen Pixeln und 14-bit-Pixeltiefe (CCD Chip vom Typ KAI 4021) angefertigt und mithilfe des Programms SPOT 5.0 Advanced (SPOT Imaging Solutions, Diagnostic Instruments) in digitaler Form weiterverarbeitet und als TIFF-Datei abgespeichert.

Die einzelnen Farbkanäle wurden dabei getrennt aufgenommen und anschließend zusammengefügt, sodass ein dichromatisches Bild entstand. Diese Übereinanderlagerung wurde unter Berücksichtigung der natürlicherweise auftretenden chromatischen Abberation durchgeführt. Die

Einzelkanalaufnahmen wurden um die Anzahl Pixel rückversetzt übereinander gelegt, um den ein Objekt in einem Bild in den verschiedenen Farbkanälen ohne Korrektur verschoben zu liegen käme. Die Pixelzahl wurde in Vorversuchen bestimmt,⁷² die Durchführung erfolgte mithilfe des Programms Volocity (Quorum Technologies Inc., Puslinch, ON, Kanada).

4.5 Auswertungsalgorithmen

4.5.1 PKC δ /COXIV

Die Analyse der Bilddateien erfolgte objektorientiert mit dem Bildanalyseprogramm Volocity. Hierbei wurden zunächst für den gesamten Datensatz die oberen und unteren Intensitätsschwellwerte festgelegt, um die Autofluoreszenz des Hintergrundes von der eigentlichen Bildinformation zu eliminieren sowie singuläre, überbelichtete Pixelartefakte oder -defekte von der Analyse auszuschließen. Zunächst wurde dafür ein Areal ausgewählt, in dem sich die Randwalle der konzentrisch nach zentrifugal abnehmenden Intensität mehrerer Objekte überlappen. An dieser Stelle liegt zwischen den Intensitätsmaxima eine Art „Wolke“ mit niedriger Signalintensität vor. Der Intensitätswert in diesem Bereich plus 1 diente als unterer Schwellwert, damit bei der Erfassung einzelner Objekte durch die „Wolke“ fälschlicherweise aneinanderhängenden Punkte optisch als separate Objekte identifiziert werden konnten (siehe Abbildung 3).

Der obere Schwellwert wurde so festgelegt, dass die Intensität einzelner maximal heller Pixelartefakte bei der nachfolgenden Messungen unberücksichtigt bleibt. Bei 8-bit-Farbkanälen liegt der Schwellenwert dabei direkt unterhalb des Maximalwerts, da die Artefakte sonst fälschlicherweise der Gesamtintensität eines Farbkanals zugerechnet würden, obwohl sie nicht einem fluoreszenzmarkierten Antigen entstammen. Da die Fluoreszenz eines Farbkanals mit der Antigenmenge positiv korreliert, konnte mit der Bestimmung der Gesamtintensität einzelner definierter Objektpopulationen eine semiquantitative Analyse der Antigenmengen durchgeführt werden.

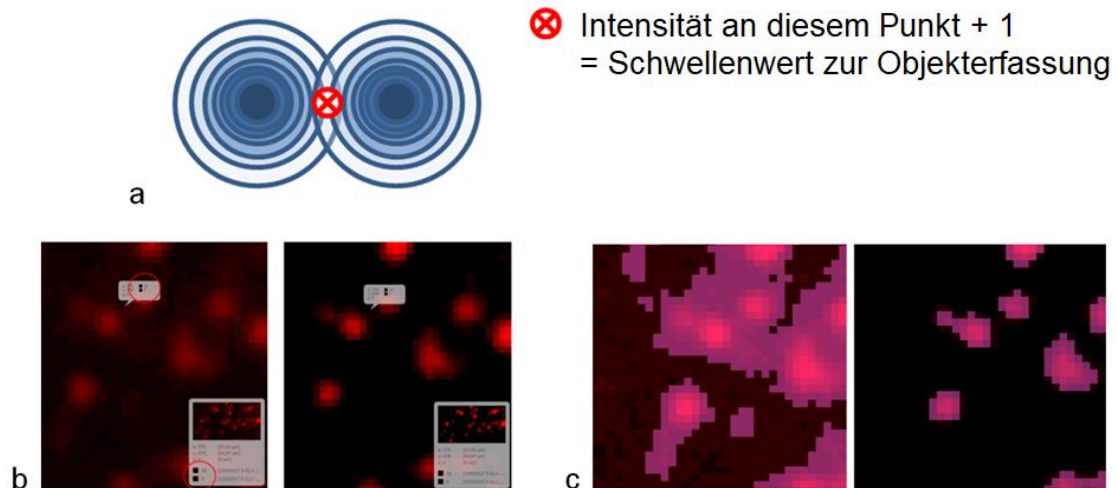


Abbildung 3 – Ermittlung des unteren Schwellwertes für die Objektdefinition

Ermittlung des unteren Schwellwertes für die Objektdefinition. a: schematische Darstellung der Messpunkte; b: Intensitätsmessung in der „Wolke“ zwischen zwei eindeutig als separate Puncta identifizierbaren Arealen (links) und Trennung der Punkte durch Subtraktion der Hintergrundintensität ab diesem Messwert + 1 (rechts); c: Einfluss der Hintergrundsubtraktion auf die Objekterfassung; große und verschmolzene Flächen (links) – korrekt erfasste, definierte Markierung der Areale (rechts).

Diese erlaubt Aussagen darüber, wie sich die Intensitäten einer Objektpopulation (~ Antigenmengen) zwischen verschiedenen experimentellen Behandlungen relativ zueinander verhalten. Aufgrund der fehlenden Proportionalität zwischen Signalintensität und Antigenmenge lassen sich allerdings keine absoluten Werte ermitteln, sondern lediglich ob die Antigenkonzentration relativ höher oder geringer ist. Zur Beurteilung der Translokation der PKC δ ist ein solches Messverfahren gut geeignet, da Anteile der PKC δ in verschiedenen Lokalisationen miteinander verglichen werden können. Um die Lokalisation der PKC δ in Mitochondrien-assoziiertem und nicht-Mitochondrien-assoziiertem Zustand zu bestimmen, wurden mit dem COXIV-Signal kolokalisierte PKC δ -Objekte identifiziert. Die einzelnen Objektpopulationen, in denen jeweils die summierte Fläche aller Objekte einer

Population sowie die summierte Intensität aller PKC δ -Signalpunkte dieser Population gemessen wurden, wurden dabei folgendermaßen definiert (vgl. Abbildung 6):

- **Population 1.** Gesamtheit aller PKC δ -Signale: Hier wird jeder Punkt und jede Fläche oberhalb der zuvor definierten Schwellenwerte innerhalb des roten Farbkanals erfasst. Dies wurde mit dem Befehl „*Find objects*“ erzielt.
- **Population 2.** Gesamtheit aller COXIV-Signale: Hier wird jeder Punkt und jede Fläche oberhalb der definierten Schwellenwerte innerhalb des grünen Farbkanals erfasst. Auch dies wurde mit dem Befehl „*Find objects*“ erzielt.
- **Population 3.** PKC δ -Signale, die gleichzeitig COXIV-Signale berühren: Hier werden alle Objekte der Population 1 als Ganzes erfasst, die Objekte der Population 2 auch nur streifen oder minimal überlappen, also mindestens einen gemeinsamen Bildpunkt aufweisen. Dies wurde mit dem Befehl „*Exclude non-touching*“ erzielt, um die die Population 2 nicht berührenden Objekte zu separieren.
- **Population 4.** PKC δ -Signale, die COXIV-Signale nicht berühren: Hier werden alle Objekte der Population 1 ebenfalls als Ganzes erfasst, die keinerlei Kontakt zu Objekten der Population 2 haben und damit keinen einzigen gemeinsamen Bildpunkt. Dies wurde mit dem Befehl „*Exclude touching*“ erzielt, um die die Population 2 berührenden Objekte zu separieren.
- **Population 5.** Nicht-mitochondriale PKC δ , die marginal an gehäufte PKC δ -Objekte, die COXIV-Objekte berühren, anliegend ist oder diese überragt: Hier werden alle Objektteile der Population 3, die nicht mit einer COXIV-positiven Fläche überlappen und damit nicht-mitochondrial sind, erfasst. Dies wurde mit dem Befehl „*Subtract*“ erzielt, um Population 2 von Population 3 zu subtrahieren, damit die überstehenden Ränder übrig bleiben (siehe Abbildung 5).
- **Population 6.** Definitive mitochondriale PKC δ : Hierin tauchen alle Objekte auf, die vollständig mit COXIV kolokalisiert sind und damit

eindeutige mitochondriale Lokalisation aufweisen. Dies wurde ebenfalls mit dem Befehl „*Subtract*“ erzielt, indem die überstehenden Ränder, (Population 5) von der Gesamtheit der PKC δ ⁺COXIV⁺-Objekte (Population 3) abgezogen wurde.

- **Population 7.** Definitive nicht-mitochondriale PKC δ : Hier werden die nicht-überlappenden Objektteile der Population 3 der Objektpopulation der gänzlich COXIV-negativen PKC δ -Signale zugeordnet. Dies wurde durch den Befehl „*Combine*“ erzielt, um Population 5 der Population 4 hinzu zu addieren.

Um das technisch bedingte Problem zu umgehen, dass offensichtlich nicht-mitochondriale Objekte, die nur marginal ein COXIV⁺-Objekt streifen, fälschlicherweise der mitochondrialen Objektpopulation zugeordnet werden, ist die Definition der Population 5 essentiell. Dabei werden die Areale der PKC δ , die nicht mit einem mitochondrialem Markersignal kolokalisiert sind, umverteilt. Die Areale werden von Population 3 abgezogen und zu Population 4 hinzugefügt, woraus die definitiv mitochondrialen und nicht-mitochondrialen Populationen 6 und 7 resultieren.

Für die Objekterfassung ist dabei die Wahl eines Bildausschnitts aus einem Zellkörper, der gleichmäßig belichtet ist und in dem gut sichtbar Mitochondrien liegen, essentiell. Die perinukleäre Region der Astrozyten besteht i.d.R. aus unüberschaubaren Aggregaten von fluoreszierenden Strukturen und ist deswegen zur Analyse feiner punktueller Strukturen (hinsichtlich der Morphologie des PKC δ -Signals, siehe 5.2.1) nicht geeignet. Hinzu kommt im Kernbereich oft eine Überlagerung mit Signalen des COXIV-Kanals, welche höchstwahrscheinlich durch über oder unter dem Kern liegenden Mitochondrien verursacht werden. Die im zweidimensionalen Bild auf diese Mitochondrien projizierten PKC δ -Signale würden in diesem Fall fälschlicherweise der mitochondrialen Objektpopulation zugeordnet werden. Daher wurden die Ausschnitte für die Analysen vorzugsweise aus flachen, nucleusferneren Somaabschnitten sowie aus Lamellipodien gewählt (siehe Abbildung 4).

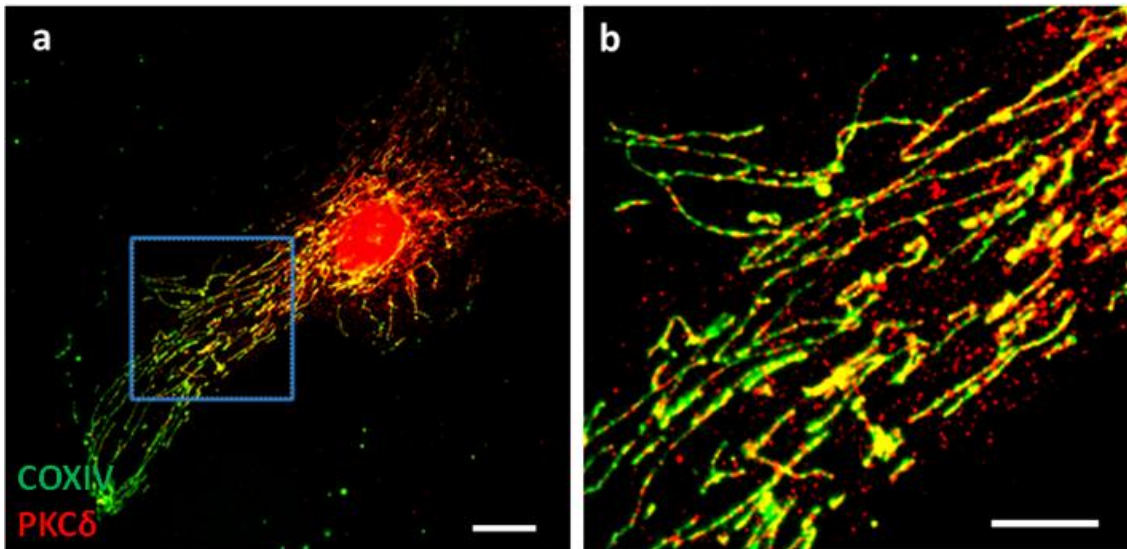


Abbildung 4 – Auswahl eines gut zu analysierenden Bildausschnitts

Auswahl eines gut zu analysierenden Bildausschnitts. a: Astrozyt mit angefärbten Mitochondrien (COXIV: grün) und PKC δ (rot); die perinukleäre Region und der Nucleus sind kaum zu beurteilen, da die Objekte durch die hohe Signaldichte nicht separat analysiert werden können. Maßstab 15 μ m. b: vergrößerter, in a markierter Ausschnitt mit deutlich erkennbaren Mitochondrien und klar abgrenzbaren PKC δ -Signalpunkten. Maßstab 5 μ m.

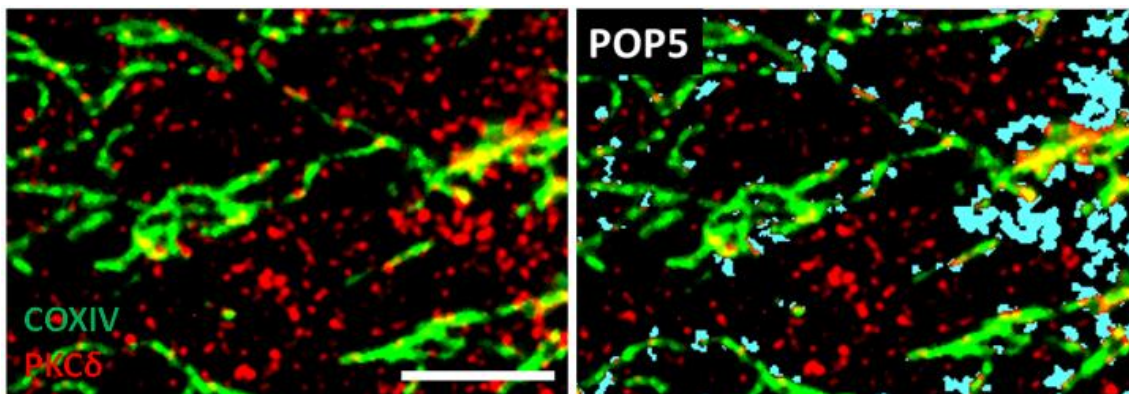


Abbildung 5 – Mikroskopische Darstellung der Objektpopulation 5

Identifikation der PKC δ -Objekte (rechts, blau markiert), die sonst als mitochondrial missklassifiziert würden, bedingt durch den Algorithmus wie im Text beschrieben. Beachte die Verteilung und „Annäherung“ rund um die Mitochondrien (grün). Gleicher Bildausschnitt wie in Abb. 6. POP = Population. Maßstab 5 μ m.

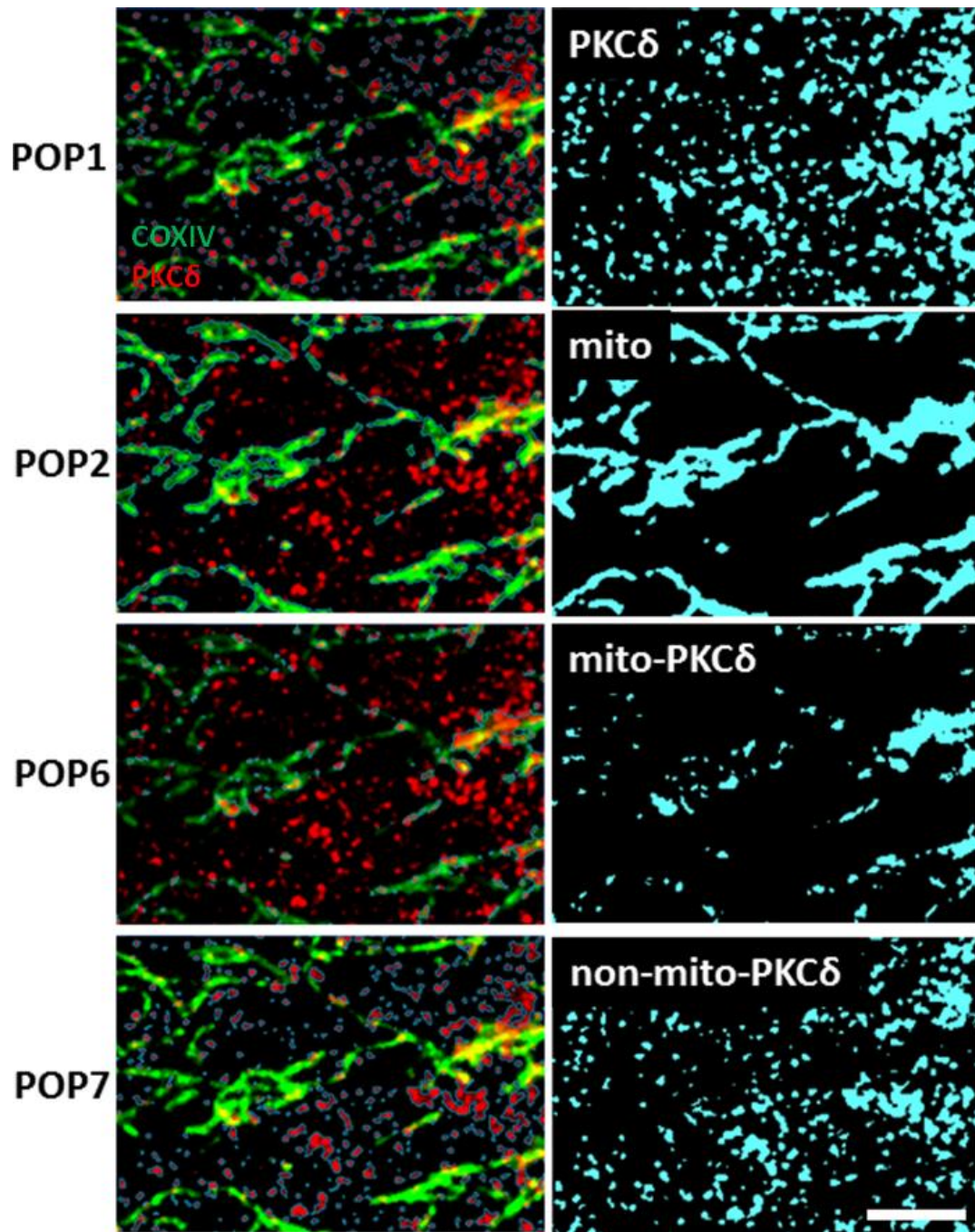


Abbildung 6 – Mikroskopische Darstellung der Objektpopulationen zur Identifikation der definitiv mitochondrialen und nicht-mitochondrialen PKC δ -Signale

Die einzelnen Objektpopulationen, erfasst durch den im Text beschriebenen Algorithmus. Linke Spalte: Bildausschnitte mit beiden Fluoreszenzkanälen (rot: PKC δ ; grün: COXIV) und der jeweilig erfassten Objektpopulation (blaue Unterlegung). Rechte Spalte: Isolierte Ansicht der Objekte in binärer Farbdarstellung. Maßstab 5 μ m.

Es wurden die kumulierte Intensität und die kumulierte Fläche aller Objekte eines Bildausschnitts der Objektpopulationen „Population 6“ (mitochondriale PKC δ) und „Population 7“ (nicht-mitochondriale PKC δ) ermittelt. Diese vier Rohdaten – kumulierte Intensität aus Population 6, kumulierte Fläche aus Population 6, kumulierte Intensität aus Population 7 und kumulierte Fläche aus Population 7 – stellen Eckdaten einer jeden Zelle hinsichtlich ihrer PKC δ -Verteilung dar. Aus diesen Rohdaten gelang es, Parameter zu berechnen, die Aufschluss über den Anteil der Mitochondrien-assoziierten PKC δ -Signale geben können.

Zum Vergleich der Populationen aus verschiedenen Bildausschnitten konnte aufgrund der unvermeidbar unterschiedlichen Ausschnittgröße sowie unterschiedlicher lokaler Mitochondriendichte nicht bloß die kumulierte Intensität oder die kumulierte Fläche der Population herangezogen werden. Diese sind selbst innerhalb einer Zelle variabel, je nach dem wie groß der gewählte Ausschnitt ist und wie viele Mitochondrien sich in diesem befinden. Um die durchschnittliche Intensitätsdichte zu ermitteln, die unabhängig von der Ausschnittgröße flächennormiert ist, muss der Quotient aus kumulierter Intensität und kumulierten Fläche derselben Objektpopulation gebildet werden. Dieser Parameter (der Intensitätsdichte) ist zwar geeigneter zur Beurteilung der relativen Antigenmenge, berücksichtigt aber nicht das Verhältnis einer PKC δ -Subpopulation zum Gesamtgehalt der PKC δ . Die in dieser Arbeit verwendete Analyseverfahren hat das Ziel, den relativen Anteil der PKC δ quantifizieren zu können, sodass die Intensitätsdichte beider Populationen 6 und 7 (mitochondriale und nicht-mitochondriale PKC δ) in die Rechnung miteinbezogen werden müssen. Der Quotient aus beiden Intensitätsdichten ermöglicht es, die Werte ins Verhältnis zu setzen. Das Ergebnis ist der Faktor, um den die Intensitätsdichte einer Population die Intensitätsdichte der anderen übersteigt oder unterschreitet – das sogenannte Intensitätsdichtenverhältnis (IDR). Die reine Betrachtung der Intensitätsdichten der mitochondrialen oder der nicht-mitochondrialen PKC δ -Population ist unzureichend, da die gleiche Intensitätsdichte einer Population bei verschiedenen Intensitätsdichten der jeweils anderen Population einen anderen Anteil an der Gesamtheit darstellen würde. Bei unterschiedlichen Intensitätsdichten der mitochondrialen PKC δ -

Objektpopulationen in zwei Bildausschnitten würden sonst morphologische Verteilungsunterschiede angenommen werden, selbst wenn keine sehr ausgeprägten Unterschiede vorhanden sind (Abbildung 7), da ihr Verhältnis zu den verbleibenden, nicht-mitochondrialen PKC δ -Populationen außer Acht gelassen wurde. So könnten auch bei gleichen Intensitätsdichten von mitochondrialen PKC δ -Objektpopulationen morphologische Verteilungsunterschiede zwischen zwei Ausschnitten fälschlicherweise abgelehnt werden können, selbst wenn mit bloßem Auge erkennbar welche vorhanden sind (Abbildung 8). Die Interpretation der Intensitätsdichten ist daher nur gemeinsam im Rahmen des Intensitätsdichtenverhältnisses zulässig. Dabei entspricht ein höherer Betrag dieser dimensionslosen Zahl einem höheren mitochondrialen Anteil der PKC δ -Signalintensitätsdichte. Eine proportionale Zuordnung zur absoluten Antigenmenge ist auch hier nicht möglich. Ein doppelt so hoher IDR-Wert entspricht weder der doppelten Gesamtintensität noch der doppelten Antigenmenge, sondern sagt aus, dass die mittlere Intensitätsdichte der Mitochondrien-assoziierten PKC δ -Population doppelt so hoch ist wie die der nicht-Mitochondrien-assoziierten PKC δ -Population. Ein höherer IDR-Wert korreliert letztendlich verlässlich mit einer messbar höheren, gelegentlich auch visuell erfassbar höheren Antigenmenge der Mitochondrien-assoziierten PKC δ (siehe Abbildungen Abbildung 7 und Abbildung 8; siehe Diskussion der Validität der IDR, 6.1.3.1). Die Analyseverfahren ist detailliert beschrieben in Farid und Derouiche.⁷³

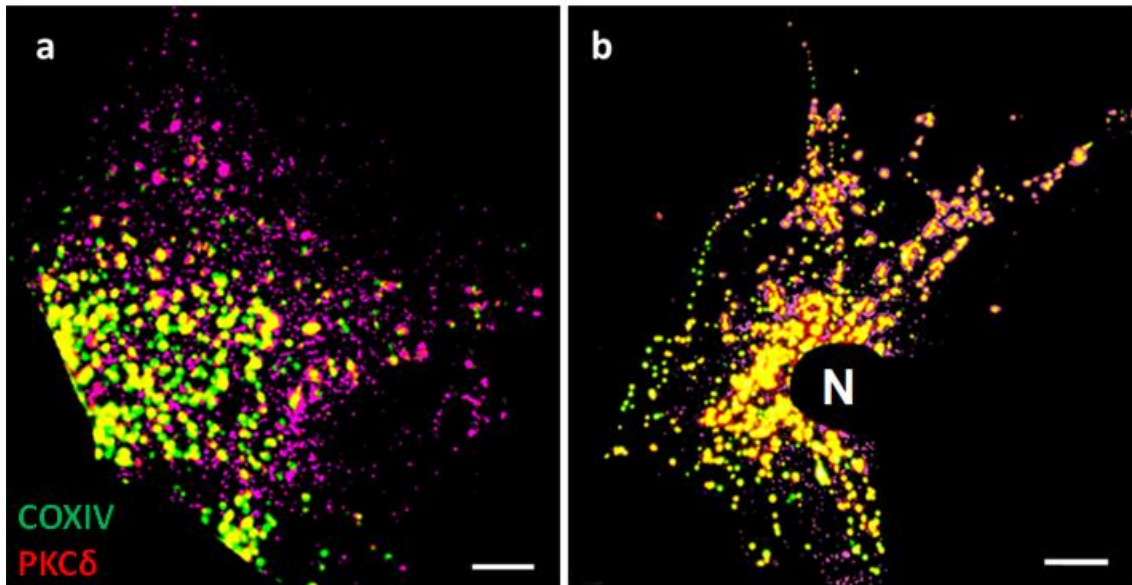


Abbildung 7 – Morphologisch ähnlich auf Mitochondrien verteilte PKC δ in zwei verschiedenen Zellen

*Mögliche Fehlerquelle: unterschiedliche Intensitätsdichten der einzelnen Populationen würden auf gänzlich unterschiedliche Verteilungsmuster hinweisen, was aber nicht der Fall ist. Violett unterlegt ist die Population der nicht-mitochondrialen PKC δ -Objekte. a: nicht-mitochondriale Intensitätsdichte **3970,41**/ μm^2 , mitochondriale Intensitätsdichte **5571**/ μm^2 , Intensitätsdichtenverhältnis **1,40**; Maßstab 7 μm . b: nicht-mitochondriale Intensitätsdichte **6957,60**/ μm^2 , mitochondriale Intensitätsdichte **10341,66**/ μm^2 , Intensitätsdichtenverhältnis trotzdem (ähnlich) bei **1,49**; Maßstab 10 μm , N = Nucleus. Das Intensitätsdichtenverhältnis ist trotz der sehr unterschiedlichen Intensitätsdichten der nicht-mitochondrialen Population fast gleich und spiegelt die wahren Zustände akkurater wider, wie grob visuell anhand der Bilder abgeschätzt werden kann – das PKC δ -Signal ist in beiden Bildern ähnlich verteilt.*

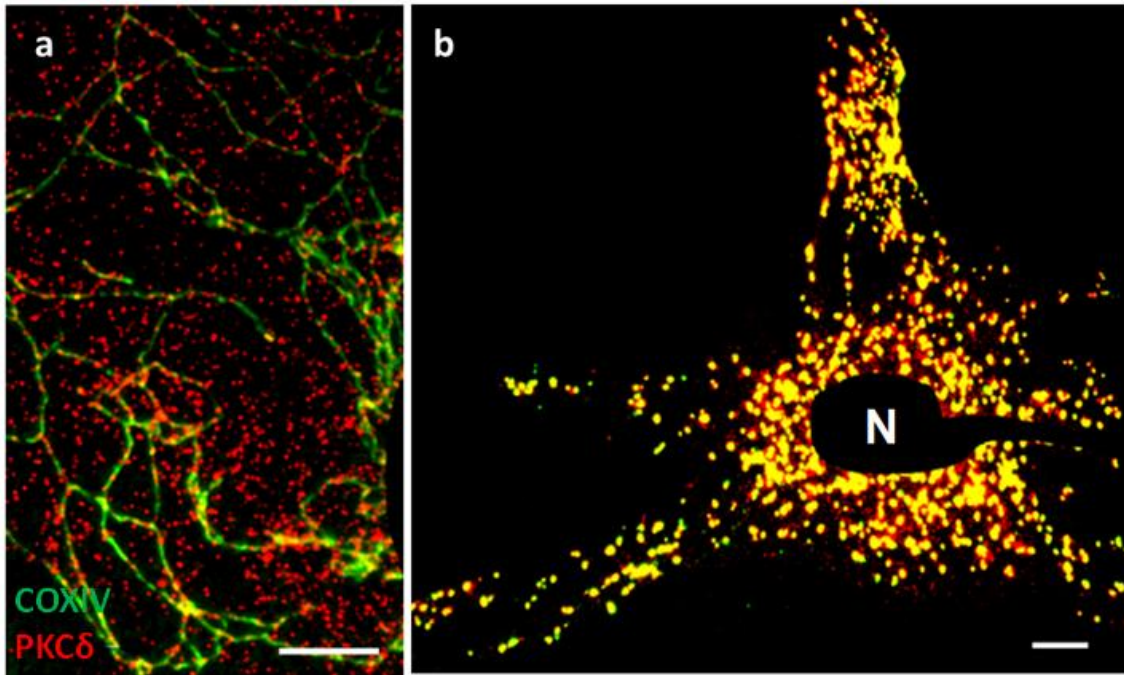


Abbildung 8 – Morphologisch sehr verschiedenartig auf Mitochondrien verteilte PKC δ in zwei verschiedenen Zellen

*Mögliche Fehlerquelle: gleiche Intensitätsdichten in derselben Population beider Ausschnitte würden auf ähnliche Verteilungsmuster hinweisen, was aber nicht der Fall ist. a: nicht-mitochondriale Intensitätsdichte **4120,85**/ μm^2 , mitochondriale Intensitätsdichte **5037,26**/ μm^2 , Intensitätsdichtenverhältnis **1,06**; Maßstab **7** μm . b: nicht-mitochondriale Intensitätsdichte bei ähnlichen **4374,10**/ μm^2 , mitochondriale Intensitätsdichte **14238,27**/ μm^2 , Intensitätsdichtenverhältnis allerdings bei **2,83**; Maßstab **10** μm , N = Nucleus. Auch hier spiegelt das Intensitätsdichtenverhältnis die Morphologie der Verteilung besser wider, obwohl die Intensitätsdichten derselben Population fast gleich sind.*

4.5.2 phospho-PDH/PDH

Die Aufnahmen für die Doppelfärbungen mit den Antikörpern gegen PDH-E1 α (in Grün) und gegen ihre phosphorylierte Form (pSer²⁹³-PDH-E1 α , in Rot) wurden technisch identisch mit den PKC δ /COXIV-Aufnahmen angefertigt (siehe Abbildung 9). Nach dem Zusammenfügen der getrennt aufgenommenen Farbkanäle im Programm Volocity wurden auch hier die Intensitätsschwellwerte festgelegt, die die Definition von einzelnen Objekten ermöglichten. Da diesmal

beide Antigenstrukturen denselben örtlichen Ursprung hatten und die PDH-E1 α universell auf Mitochondrien vorkommt, gab es zwei Möglichkeiten der Verteilung. Bei vorhandener PDH-Phosphorylierung konnte in Mitochondrien, eine Kolokalisation von roten und grünen Signalpunkten beobachtet werden, während bei fehlender PDH-Phosphorylierung Mitochondrien(segmente) ausschließlich grün angefärbt waren. Rote Signalpunkte ohne Kolokalisation mit einem grünen Objekt waren kaum zu beobachten und am ehesten auf unspezifische Bindung des Antikörpers zurückzuführen oder als Artefakte zu werten. Ohne das Protein selbst ist das Vorliegen seiner phosphorylierten Form nicht möglich, sodass falsch-positiv kolokalisierte Punkte dadurch quasi ausgeschlossen waren. Die Phosphorylierung aller vorhandenen PDH-Moleküle erfolgt außerdem nicht gleichzeitig und vollständig, sodass auch die Intensität des phospho-PDH-Signals von Mitochondrium zu Mitochondrium variieren kann. Bei Vorliegen einer Kolokalisation von PDH- und phospho-PDH-Objekten waren Abstufungen der Signalintensität der phospho-PDH zu beobachten. Da die Fluoreszenz eines Farbkanals mit der Antigenmenge positiv korreliert, wobei auch hier die exakte Abhängigkeit nicht ermittelt werden kann, gelingt über die Gesamtintensität definierter Objektpopulationen die Bestimmung des Phosphorylierungsgrades. Des Weiteren zeigen die unterschiedlichen Signalintensitäten der phospho-PDH auf verschiedenen Mitochondrien, dass Mitochondrien tatsächlich individuell reguliert werden könnten. Dies ist relevant für die Hypothese eines lokalen Regulationsmechanismus, welcher in dieser Arbeit postuliert wird. Die morphologisch-anatomische Darstellung von Phosphoproteinen scheint tatsächlich empfindlich genug zu sein, um Unterschiede zwischen verschiedenen Phosphorylierungsgraden zu erfassen (siehe Diskussion der Methoden, 6.1 und insbesondere 6.1.6).

Um den Phosphorylierungsgrad vergleichbar messen zu können, wurde auch in diesem Auswertungsalgorithmus eine Normierung der Intensitätswerte auf die Objektfläche vorgenommen. Dabei lassen sich zwei Parameter berechnen, die gemeinsam den PDH-Phosphorylierungsgrad einer Mitochondrienpopulation innerhalb eines Bildausschnittes widerspiegeln. Die Auswahl eines geeigneten Bildausschnittes erfolgte auch hier nach den selbigen Kriterien wie bei den PKC δ /COXIV-Aufnahmen. Der erste Parameter wird im Folgenden

Flächenquotient genannt, da er das Verhältnis zwischen der Fläche der immunocytochemisch dargestellten, „sichtbaren“ PDH und ihrer phosphorylierten Form aufzeigt. Mit diesem lässt sich bestimmen, wie viel Prozent der Mitochondrienfläche auch von phospho-PDH-Signal bedeckt ist. Da hierbei die Intensität des phospho-PDH-Signals nicht berücksichtigt wird, sondern lediglich ihre Fläche, lassen sich hierbei nur schwer und ungenau quantitative Rückschlüsse über die Phosphoantigenmenge treffen. Der Parameter ist daher relativ unempfindlich gegenüber kleinen Änderungen des Phosphorylierungsgrades, die nicht gleich auch eine Flächenänderung des betreffenden Signals zur Folge haben. Vielmehr zeigt er verlässlich, dass die Mitochondrienfläche gänzlich von roten Bildpunkten freigeräumt oder neu bedeckt werden kann, wenn sich der PDH-Phosphorylierungsgrad drastisch verändert. Um eine differenziertere Messung unter Berücksichtigung der Signalintensität, die schließlich eher mit der Antigenmenge korreliert als die bloße Fläche, zu ermöglichen, wurde der Quotient aus der kumulierten Intensität der phospho-PDH-Objekte und der kumulierten Fläche der PDH-Objekte bestimmt ($I_{\text{phospho-PDH}}/A_{\text{PDH}}$). Auch wenn zwei Mitochondrien gänzlich rot bedeckt wären, zeigt dieser Quotient an, ob sich die mittleren Intensitäten der phospho-PDH-Signale auf den beiden Mitochondrien unterscheiden, und somit auch ihre PDH-Phosphorylierungsgrade. Da dieser Unterschied vom Flächenquotienten nicht erfasst worden wäre, gilt es, Flächenquotient und $I_{\text{phospho-PDH}}/A_{\text{PDH}}$ stets zusammen zu betrachten, um Aussagen über den PDH-Phosphorylierungsgrad treffen zu können.

4.6 Luminometrische ATP-Messung

Zur Messung der ATP-Konzentration wurden die Zellen der Zellkultur auf eine 24-Loch-Platte mit einer Fläche von ca. 1,9 cm²/Loch umgesetzt. Um eine ausreichende Zelldichte zu erreichen und um eine vergleichbare Zelldichte in allen Löchern zu erzielen, wurden vorab zahlreiche Vorversuchsreihen durchgeführt, um eine geeignete Verdünnung des zellhaltigen Mediums und das geeignete Volumen in jedem Loch zu ermitteln.

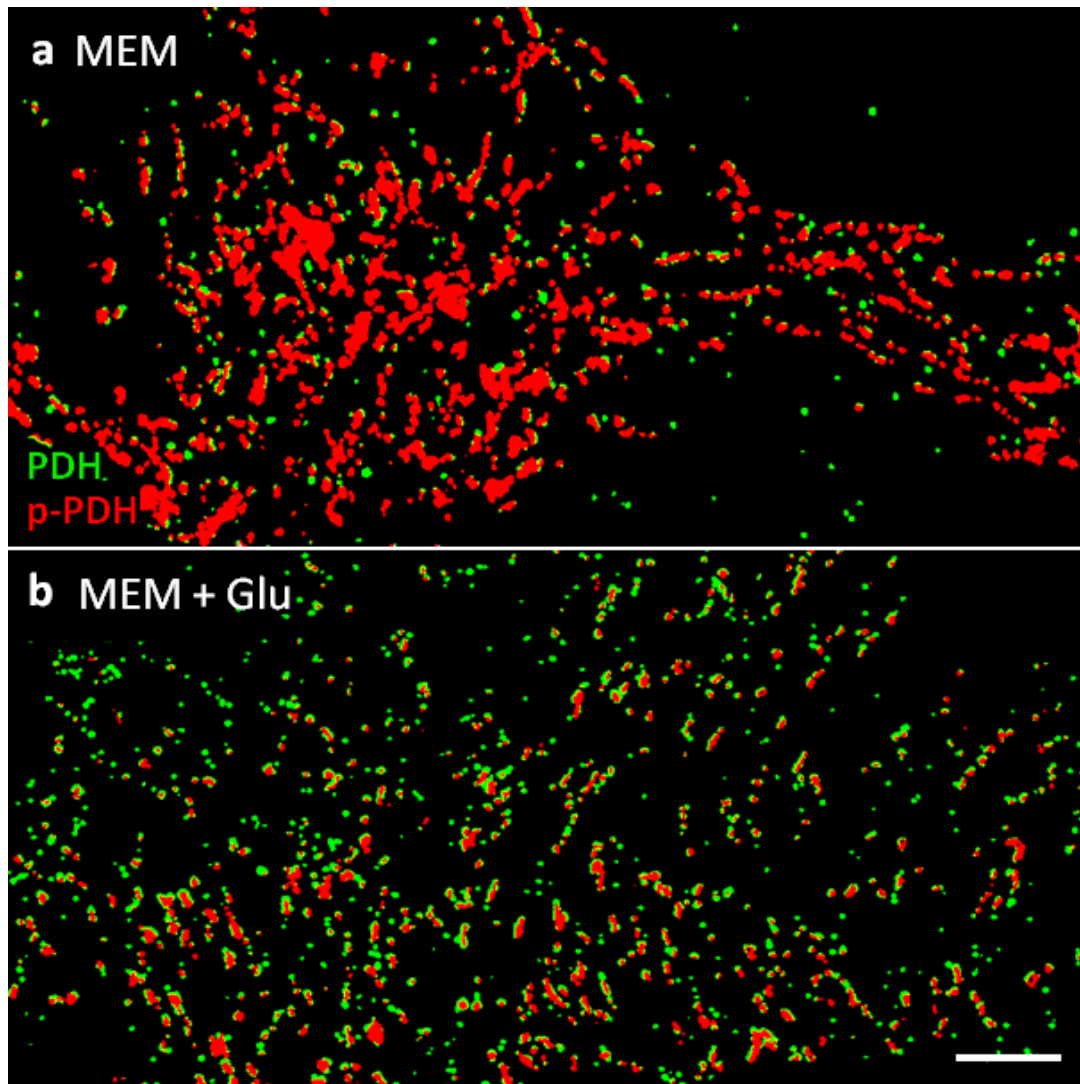


Abbildung 9 – Unterschiedliche Phosphorylierungsgrade der PDH auf Mitochondrien zweier unterschiedlich behandelter Astrozyten

Binäre Farbdarstellung in jedem Kanal. a: stark flächendeckendes p-PDH-Signal auf der Mehrheit der Mitochondrien; b: deutlich geringerer prozentualer Anteil an (komplett) bedeckten Mitochondrien. Maßstab 7 μm (b [für a und b]).

Auf jedes Loch wurden 250 μl 10% FKSi-haltige Zellsuspension mit einer Zellkonzentration von $1,0 \times 10^5$ Zellen/ml gegeben. Die resultierende ATP-Konzentration im später vorliegenden Zelllysate musste im linearen, zuverlässig detektierbaren Bereich der Messmethode liegen, sodass auch das Volumen des hinzuzugebenden Lysemittels probatorisch ermittelt werden musste. Zunächst wurden die Löcher mit den bereits oben genannten experimentellen Inkubationslösungen jeweils über eine bestimmte Zeitdauer hinweg behandelt.

Die durchschnittliche Abweichung bzw. zeitliche Verzögerung von der angegebenen Inkubationsdauer betrug ca. 18 Sekunden, welche durch die manuelle Durchführung der Applikationen bedingt war, jedoch durch einen optimierten Versuchsaufbau bereits minimiert worden war (siehe Diskussion der potentiellen Störfaktoren 6.1.5). Sofort nach Ende der Inkubationszeit wurde die Inkubationslösung verworfen und die Löcher der 24-Loch-Platte mit eiskaltem PB (0,1 M) gespült. Unmittelbar danach wurde die Platte auf Eis gestellt und zum Lysieren der adhärenen Zellen in jedes Loch 240 µl 0,5% Trichloressigsäure (0°C) gegeben und für sieben Minuten kontinuierlich geschwenkt. Zur Neutralisation wurden anschließend 35 µl 0,1 M NaOH und 2,75 µl HEPES hinzugegeben und das entstandene Zelllysate dann um den Faktor 5 in bidestilliertem Wasser verdünnt. Dieser Verdünnungsfaktor sowie die durchschnittliche Loch-zu-Loch-Variabilität zwischen gleich behandelten Löchern wurden vorher ermittelt und eine Anzahl von drei Löchern pro Zeitpunkt und Behandlung gewählt, da die Variabilität vertretbar gering war (lediglich 4,6% mittlere Abweichung vom Mittelwert der drei Messungen und damit relativ uniform). Für die luminometrische Messung wurde gemäß den Herstellerangaben des ATP-Bestimmungs-Sets (Molecular Probes/Invitrogen, Katalognr. A22066) die Luciferin/Luciferase-haltige Reaktionslösung zur Detektion steril hergestellt und lichtgeschützt bei 0°C bereitgestellt. Auch wurde aus einer mitgelieferten ATP-Standardlösung eine Verdünnungsreihe von 1 µM bis 390 pM ATP hergestellt, die parallel zu den Zelllysaten gemessen wurde und deren ermittelte Werte als Standardkurve dienten. Stets auf Eisblöcken um die Luciferasereaktion abzubremsen, wurden jeweils 300 µl der Reaktionslösung mit 30 µl Zelllysate oder (200 µl mit 20 µl) Standardlösung vorsichtig mit der Pipette vermengt, da die Luciferase erschütterungsempfindlich ist und rasch denaturiert. Daraus wurden jeweils 110 µl in ein Loch einer 96-Lochplatte gegeben. Nachdem die Lysate aller Zeitpunkte und Behandlungen der 24-Lochplatte samt Reaktionslösung auf jeweils 3 Löcher und die Standardlösungen samt Reaktionslösung auf jeweils 2 Löcher der 96-Lochplatte verteilt wurden, wurde die 96-Lochplatte in das auf 25°C vorgeheizte Luminometer (Lumistar, BMG LABTECH GmbH, Ortenberg, Deutschland) eingefügt und mit dem *Glow*-Modus im 5-Minuten-Takt

gemessen. Das Maximum der Lumineszenz wurde nach Erwärmen der kleinen Volumina des Reaktionsgemisches und in den meisten Fällen bereits nach der zweiten Messung erzielt. Die Lumineszenzwerte der Standardkurve wurden in doppeltlogarithmischer Kurvendarstellung zu einer linearen Funktion approximiert, sodass jede ATP-Konzentration einem logarithmischen Lumineszenzwert zugeordnet werden konnte. Mithilfe dieser linearen Gleichung und Umkehrung der logarithmischen Werte der Lysatlumineszenzen konnte so auf die ATP-Konzentration des Zellysats geschlossen werden (Für Näheres zur Validität der Methode siehe Kapitel 6.1.4)

4.7 Statistik

Die Datensätze wurden mithilfe des Programms BiAS 10.0 (epsilon-Verlag) ausgewertet. Da für die Gruppen der IDR-Werte und Parameter zur Beurteilung des PDH-Phosphorylierungsgrades nach Kolmogoroff-Smirnoff-Testung nicht (durchgehend) eine Normalverteilung angenommen werden konnte, wurden nicht-parametrische Tests verwendet. Als Zweistichprobenverfahren kamen der Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Test und für multiple Vergleiche der Kruskal-Wallis-Test mit anschließenden, Bonferroni-Holm-korrigierten Conover-Iman-Vergleichen zum Einsatz. Für den Vergleich der luminometrisch gemessenen, prozentualen ATP-Konzentrationsänderungen wurde nachfolgend eine bifaktorielle Rang-Varianzanalyse nach Kubinger durchgeführt. Ein p-Wert von (ggf. nach Korrektur) $\alpha \leq 0,05$ (*) wurde als signifikant gewertet, darüber hinaus wurden höhergradige Signifikanzen wie $\alpha \leq 0,01$ mit ** sowie $\alpha \leq 0,001$ mit *** dargestellt. Für die exzellente Beratung bei der Auswahl der geeigneten statistischen Tests danke ich an dieser Stelle Herrn Dr. Hanns Ackermann. Für die Erstellung der Diagramme wurde das Programm GraphPad Prism (Version 9.3.1, GraphPad Software, San Diego, California, USA) eingesetzt.

5 Ergebnisse

5.1 Zum Vorkommen der PDP1 in Astroglia

Voraussetzung für die Hypothese einer PKC δ -vermittelten Aktivierung der PDH durch PDP1 ist, die Existenz der beteiligten Proteine in Astrozyten nachzuweisen. In primären Astrozytenkulturen (Ratte) als auch in Vibratomschnitten (Maus) lässt sich die PDP1 immunzytochemisch ubiquitär in Astrozyten nachweisen (Abbildung 10). Ihr Fluoreszenzmuster weist zumeist morphologisch eine mitochondriale Konfiguration auf. Eine Kolokalisation mit dem Mitochondrienmarker COXIV ist ebenfalls zu beobachten, sodass von einer mitochondrialen Lokalisation auszugehen ist. In dieser Lokalisation ist es ihr prinzipiell möglich, die ebenfalls mitochondrial lokalisierte PDH zu dephosphorylieren. Die PDP1-Einfachmarkierung in Vibratomschnitten (Maus) ist kleinkörnig, diffus, im Einklang mit einer glialen, mitochondrialen Lokalisation, wobei das Vorkommen in anderen Zelltypen nicht ausgeschlossen werden kann.

5.2 Zur (subzellulären) Verteilung der PKC δ in Astrozyten

5.2.1 In Zellkultur

Die PKC δ als mobiles Enzym kann abhängig von vielen Faktoren, z.B. von externen Stimuli, dem Entwicklungszustand oder dem metabolischem Status der Zelle, in verschiedene Kompartimente translozieren.⁴¹⁻⁴⁴ In einer Momentaufnahme nach Fixierung und Immunfärbung kann die PKC δ daher subzellulär sehr unterschiedlich verteilt sein. Ihre Lokalisation, insbesondere ob mitochondrial oder nicht-mitochondrial, wurde in Abhängigkeit von rezeptorvermittelten Effekten untersucht, z.B. nach Stimulation durch Glutamat. Die Morphologie der PKC δ -Signale wies die folgenden Besonderheiten auf. Während ein mutmaßlich mitochondrial gebundener Anteil, wie erwartet, mit der COXIV kolokalisiert erschien und sich mit den mitochondrialen Konturen deckte, zeigte sich der nicht-mitochondriale Anteil nicht etwa diffus wolkig, sondern scharf abgrenzbar und punktförmig über die gesamte Zelle bis an die Zellgrenzen homogen verteilt (Abbildung 12a).

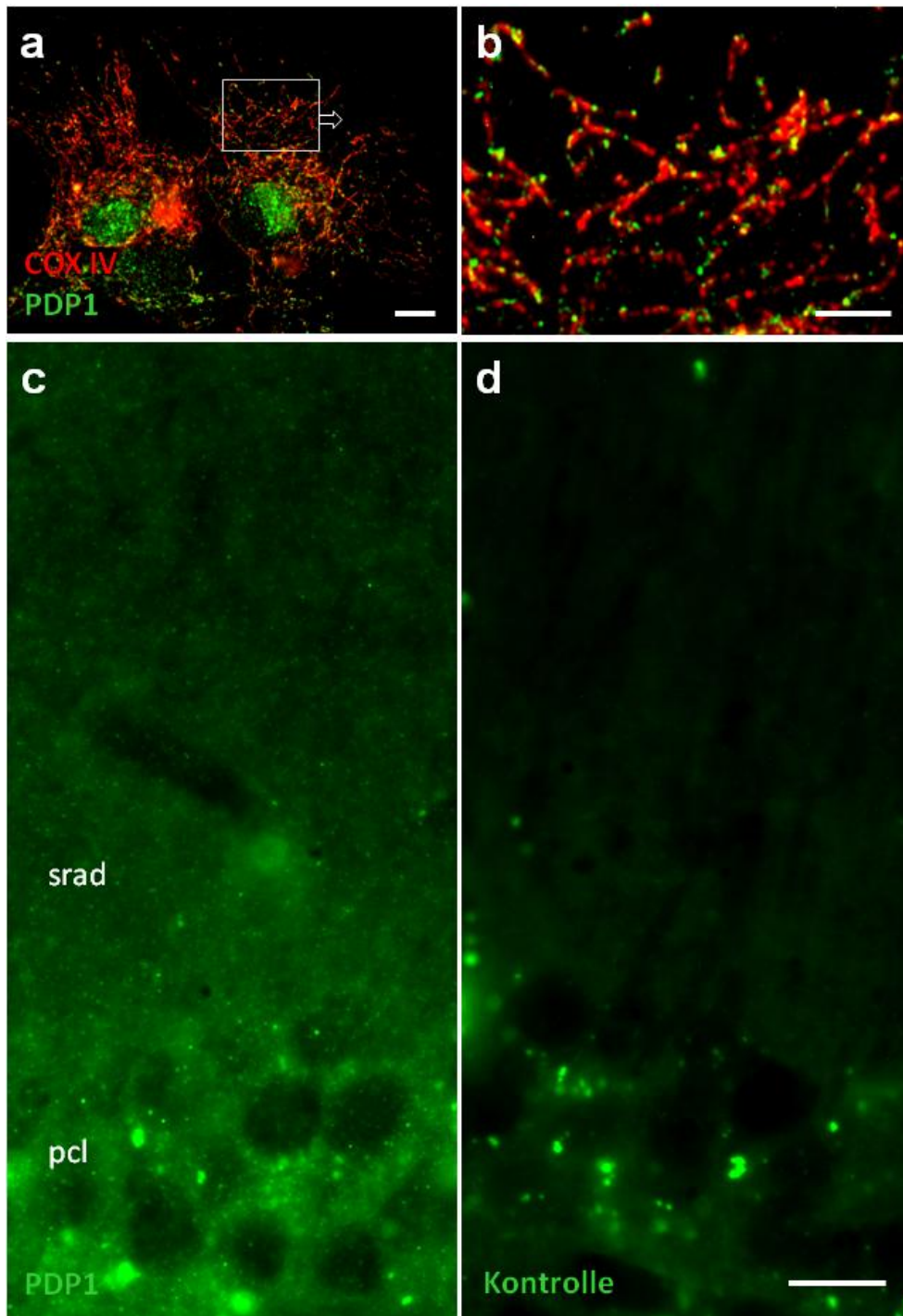


Abbildung 10 – Vorkommen der PDP1 in Astrozyten *in vitro* und *in situ*
 Immuncytochemische Darstellung der PDP1 in Astrozyten *in vitro* (a+b) und *in situ* (c+d). a+b: Darstellung der mitochondrialen Lokalisation der PDP1 mit Detailaufnahme (sowie aberranter nukleärer Lokalisation). c+d: Nachweis eines ubiquitären, diffusen PDP1-Fluoreszenzsignals im Stratum radiatum (srad) und in der Pyramidalzellschicht (pcl). Maßstäbe 10 μm (a), 4 μm (b) und 10 μm (d [für c und d]).

Mit den Befunden von Uchino et al.⁷⁴ einhergehend, lässt sich letzteres Verteilungsmuster womöglich auf eine Lokalisation an der Plasmamembran zurückführen, wo von einzelnen PKC δ -Molekülen oder Enzymkomplexen im Sinne von *Hotspots* Fluoreszenzsignale ausgehen. Auch wird ersichtlich, dass die punktförmigen PKC δ -Signale hinsichtlich Form, Fläche und durchschnittlicher Signalintensität sehr homogen sind. Die Gleichförmigkeit der rundlichen Objekte wird durch den sogenannten *Shape factor* dargestellt, wobei ein Wert von 1,0 einem perfekten Kreis entspricht. Die Streuung der Werte ausgehend von $n = 935$ Signalpunkten (aus 10 verschiedenen Zellen verschiedener Zellkulturen) ist sehr klein und ihre Verteilung der Werte sehr schmal, wie an den sehr gestauchten Boxplots ersichtlich wird (siehe Diagramm 1). Die ausgeprägte Gleichförmigkeit dieser Objekte spricht daher für die Uniformität der Signalquelle, dem Antigen PKC δ , das sich eventuell an diskreten „Lipidinseln“ auf der Plasmamembran aufhalten könnte.⁷⁴

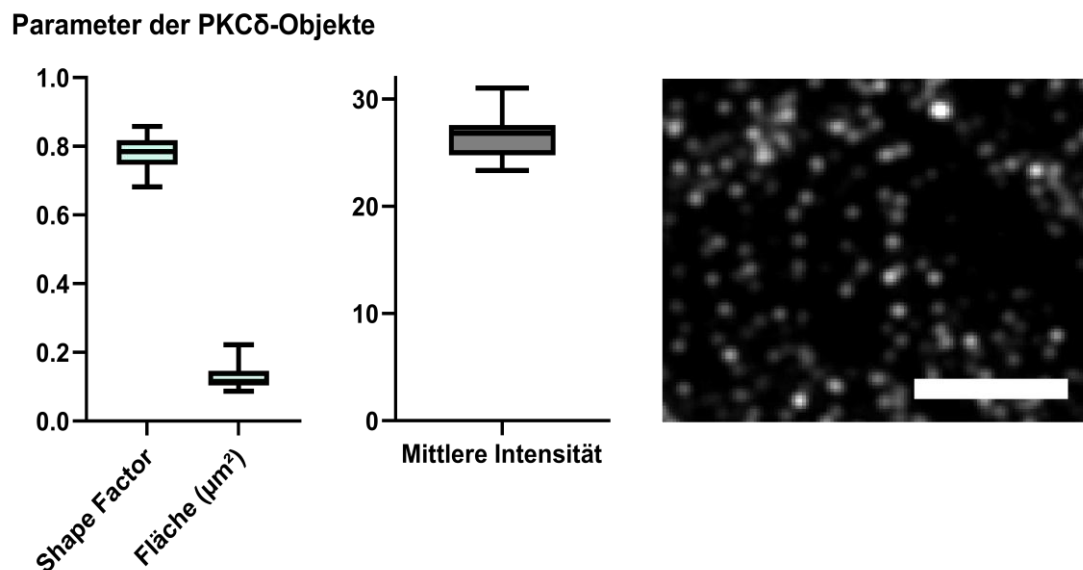


Diagramm 1 – Eigenschaften der PKC δ -Immunfluoreszenz in Astrozyten *in vitro*

Links und Mitte: Morphometrische Parameter der PKC δ -Objekte. Rechts: Typisches feinkörniges Verteilungsmuster der Fluoreszenzsignale. $n = 935$ Puncta aus 10 Astrozyten aus verschiedenen Zellkulturen. Maßstab 500 nm.

5.2.2 Im Gewebe

In den Kryoschnitten des Maushirns kommen die Astrozyten durch die GFAP-Färbung sehr deutlich zum Vorschein, sodass sowohl die Hauptfortsätze als auch zumindest gröbere periphere Fortsätze gut verfolgt und beurteilt werden können. Die COXIV als mitochondrialer Marker ist ubiquitär darstellbar und erlaubt keine Differenzierung zwischen den Mitochondrien einzelner Zelltypen im Hirngewebe. Die PKC δ scheint ebenfalls mit COXIV kolokalisiert zu sein (Abbildung 11 h), was eine Assoziation dieses Enzyms mit Mitochondrien nahelegt, einhergehend mit den Befunden in Zellkultur sowie der Literatur. Wie auch in Zellkultur ist eine diffuse, womöglich zytoplasmatische/membranständige Ausfüllung von astrozytären Strukturen mit PKC δ -Signalen erkennbar. Dieses COXIV-unabhängige Vorliegen scheint in den Fortsätzen stärker ausgeprägt zu sein als somanah und die nicht-mitochondriale Lokalisation insgesamt *in situ* stärker ausgeprägt zu sein als in Zellkultur. Da sich die Verteilung der PKC δ weitgehend mit den GFAP-gefärbten Arealen deckt (Abbildung 11 g), kann das Vorkommen der PKC δ in Astrozyten, wie auch in der Literatur beschrieben, auch *in situ* angenommen werden.^{45,46}

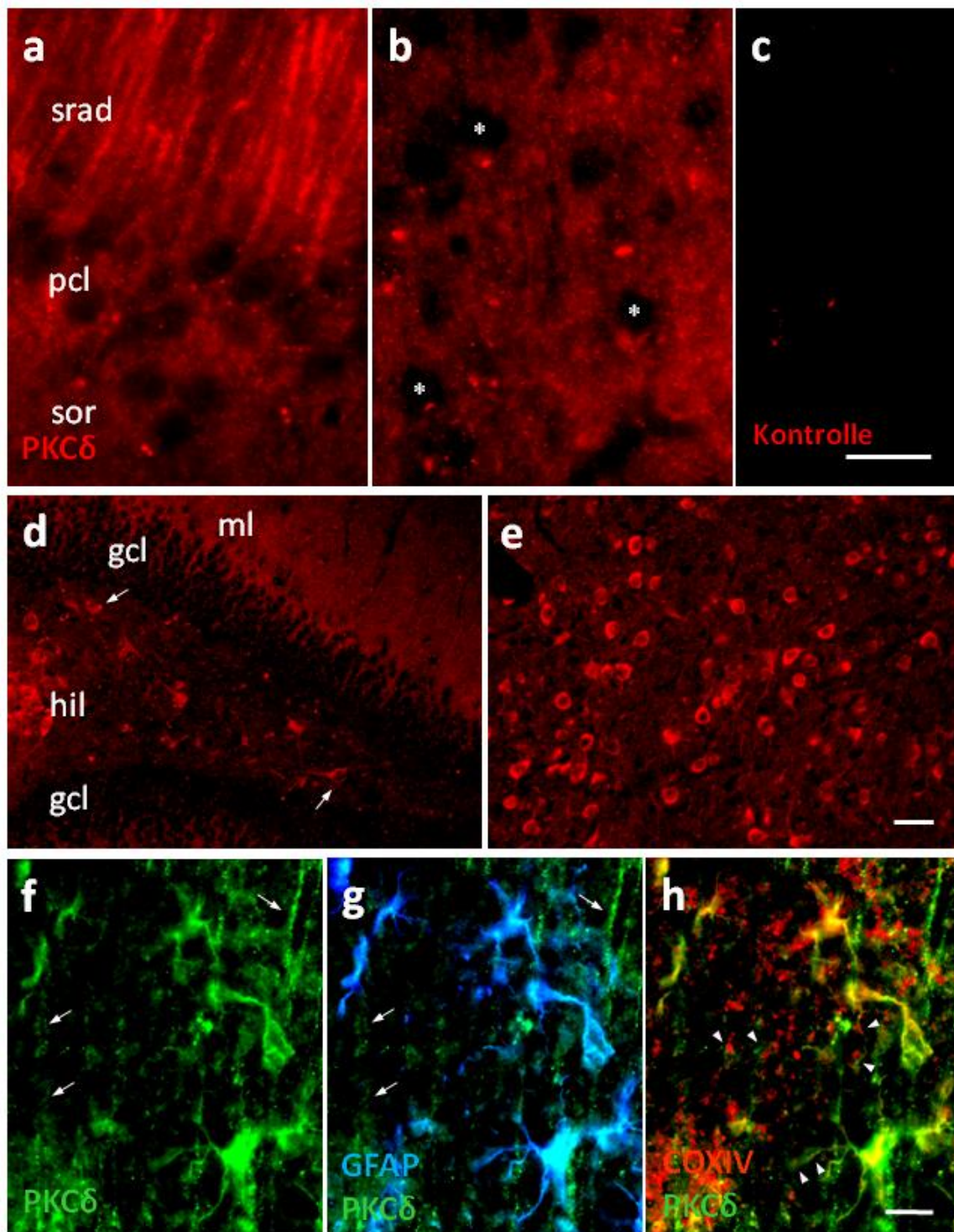


Abbildung 11 – Darstellung der PKC δ *in situ*

PKC δ ist sowohl in Neuronen als auch in Astrozyten deutlich nachweisbar. Somata der hippocampalen Pyramidenzellen der CA1 (a) und corticale Neurone (b, mit Sternchen markiert) bleiben gegenüber dem diffus angefärbten Neuropil negativ, im Gegensatz zu ihren Dendriten (a). Vollständig angefärbte Neurone finden sich außerdem in der Hilusregion (d, Pfeile) und im Thalamus (e).

f+g: GFAP⁺-Astrozyten zeigen sich vollständig PKC δ ⁺. Die Pfeile kennzeichnen PKC δ ⁺-Dendriten. h: außerdem scheinen die PKC δ -Puncta vermehrt mit COXIV⁺ (mitochondrialen Objekten, siehe Pfeilspitzen) kolokalisiert zu sein. Maßstäbe: 20 μ m (c [für a-c]), 50 μ m (e [für d und e]), 10 μ m (h [für f-h]).

5.3 Zur Verteilung der PKC δ in Neuronen

In verschiedenen Regionen lassen sich im Kyroschnitt des Maushirns PKC δ ⁺-neuronale Strukturen nachweisen, wobei das PKC δ -Signal teils entweder nur im Soma oder im Dendriten, teils im ganzen Neuron darstellbar ist. Während nach strengem Abzug des Hintergrundsignals das Neuropil stets von einer diffusen „Signalwolke“ bedeckt ist (Abbildung 11 a, b), lässt sich diese möglicherweise auch auf feinverwobene, astrozytäre Strukturen zurückführen. In dieser Signalwolke lassen sich auch fokale Intensitätssteigerungen beobachten, durch die sich möglicherweise gliale Zelleiber abzeichnen. Im Hilus der Fascia dentata erkennt man intensiv PKC δ ⁺-neuronale Somata und dendritische Strukturen, am ehesten Interneurone, während die Neuronen des Stratum granulare ausgespart bleiben. Auch die meisten Somata der corticalen Neuronen oder der Pyramidenzellen der CA1-Region bleiben ausgespart, während nur die Dendriten letzterer sich deutlich angefärbt darstellen (Abbildung 11 a, b, f, g). Im Thalamus lassen sich stark angefärbte Neuronen nachweisen, und auch hier findet man zwischen den Neuronen ein diffuses fadenförmiges Netzwerk, welche auf die Lokalisation der PKC δ u.a. in Astrozyten hinweist (Abbildung 11 e).

5.4 Zum Einfluss verschiedener Stimuli auf die subzelluläre Lokalisation der PKC δ in Astrozyten

Zunächst wurde der potentielle Einfluss von inaktiviertem fetalem Kälberserum (FKSi) auf die Verteilung der PKC δ in Astrozyten untersucht. Unter der Annahme, dass FKSi eine Vielzahl an Wachstumsfaktoren und anderen potentiell signalgebenden Molekülen beinhaltet, schien es zunächst naheliegend, dass die Zugabe von FKSi u.a. auch eine verstärkte Aktivierung und Translokation der PKC δ an Mitochondrien herbeiführen könnte. Der

Einfluss von FKSi auf die PKC δ -Lokalisation scheint jedoch insgesamt sehr schwach ausgeprägt zu sein (Daten nicht gezeigt). Diese Beobachtung ist insofern relevant, weil damit wiederum ausgeschlossen werden kann, dass die Hinzugabe von FKSi während der Kultivierung der Astrozyten die PKC δ -Translokation beeinflusst.

Weitere Versuche dienten der Untersuchung des Einflusses niedermolekularer Substanzen auf die PKC δ , die für den Energiestoffwechsel relevant sind. Medien mit unterschiedlichem Aminosäuregehalt, Pyruvat, Glucose in unterschiedlichen Konzentrationen, Glutamat, Astrozyten-konditioniertes Medium (ACM) sowie der in der Literatur als PKC δ -spezifisch geltende Kinaseinhibitor Rottlerin wurden getestet. Dabei zeigte keine der genannten Substanzen einen signifikanten Einfluss auf das Translokationsmuster der PKC δ , außer Glutamat (Diagramm 2). Glutamat zeigte eine paradox wirkende Tendenz, den mitochondrialen Anteil der PKC δ zu verringern. Der Unterschied des IDR-Wertes gegenüber der Kontrollbehandlung mit MEM war dabei signifikant (Diagramm 2, $p = 0,02708$, Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Test).

Um diesen Effekt näher zu untersuchen, wurden Experimente durchgeführt, die den Effekt des Glutamats bei verschiedenen Inkubationszeiten zeigen sollten. Der mitochondrial lokalisierte Anteil der PKC δ , welcher durch die Messung des Intensitätsdichtenverhältnisses ermittelt wurde (siehe Kapitel 4.5.1), nahm bei einer Inkubationszeit von 120 Minuten mit Glutamat (100 μ M) signifikant ab gegenüber der Behandlung mit MEM als Kontrolle (siehe Diskussion für Erklärungsansätze dieses Phänomens, Kapitel 6.1.2.1). Die IDR nahm durchschnittlich um 22,92% gegenüber MEM ab ($p < 0,0001$). Dieser Effekt konnte in drei unabhängigen Versuchen reproduziert werden, wobei dieser auch durch die Zugabe von ACPD inkonstant erzielt werden konnte (in zwei von drei Versuchen signifikanter Unterschied zwischen den IDR-Werten der MEM und ACPD-Gruppe mit $p = 0,0078$). Die Inkubation mit dem mGluR5-spezifischen Antagonisten MPEP (zusammen mit 100 μ M Glutamat) führte hingegen zu keiner Reduktion des mitochondrialen PKC δ -Anteils, sodass von einer Aufhebung der Glutamatwirkung auf Kontrollniveau ausgegangen wird.

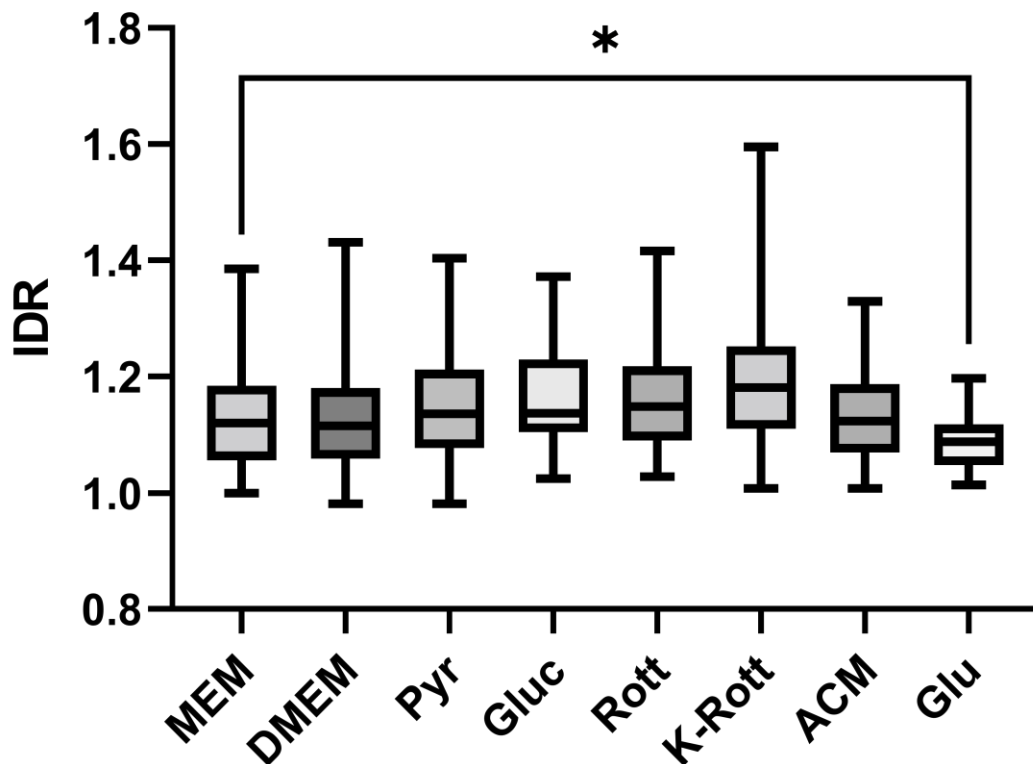


Diagramm 2 – Substanztestung über 120 Minuten und PKC δ -Lokalisation

Bestimmung der IDR nach Inkubation mit der jeweils aufgeführten Testsubstanz. Während verschiedene Medien oder andere Substrate des Energiestoffwechsels keinen signifikanten Einfluss auf die Lokalisation der PKC δ zu haben scheinen, zeigt sich eine auffällige Stauchung und Verschiebung des Glutamat-Boxplots hin zu niedrigeren IDR-Werten, die signifikant ist. MEM/Glu: $N = 250$ Zellen; $n = 3$ unabhängige Versuche; $p = 0,02708$; Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Test.

Der Antagonist MCPG (10 mM) konnte nicht im gleichen Ausmaß wie MPEP den Effekt aufheben, wobei MCPG kein sehr potenter Antagonist besonders an mGluR5 zu sein scheint und die Verwendung von hochkonzentrierten Versuchslösungen unspezifische Nebeneffekte verursachen könnte.⁷⁵ Weitere Behandlungen mit MCPG sind daher nicht weiter erfolgt. Für die graphische Darstellung der IDR-Ergebnisse bei einer Inkubation mit Glutamat über 120 Minuten siehe Diagramm 3.

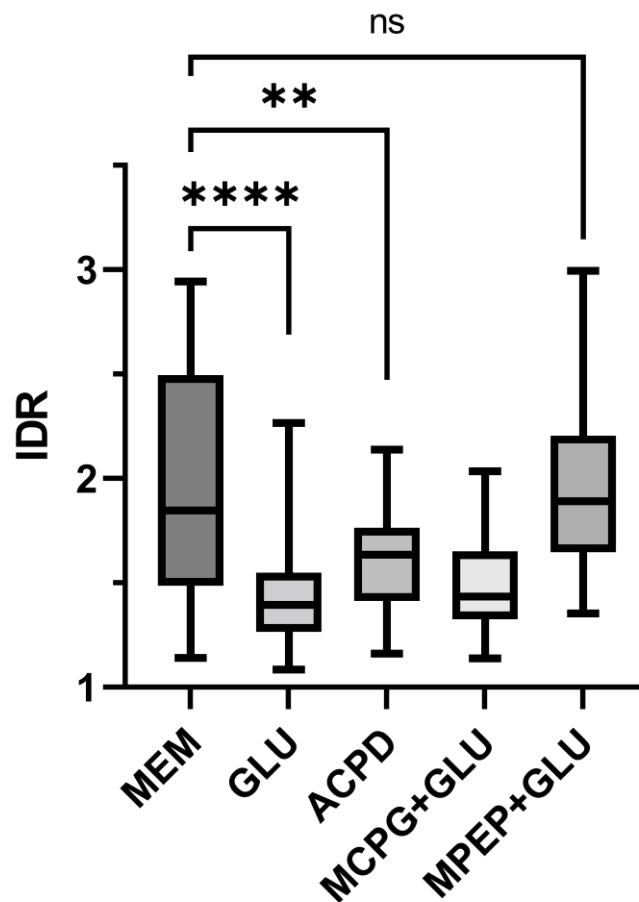


Diagramm 3 – Behandlung mit mGluR-Agonisten und Antagonisten über 120 Minuten und PKC δ -Lokalisation

Inkubation mit Glutamat oder einem mGluR-Agonisten (ACPD) führt zu einer Verringerung des IDR-Wertes. MPEP als spezifischer Antagonist des mGluR5 gelingt es, diesen Effekt vollständig aufzuheben, während dies bei MCPG (wie im Text näher erläutert) ausbleibt. N = 236 Zellen; n = 3 unabhängige Versuche; MEM/GLU: $p < 0,0001$; MEM/ACPD: $p = 0,0078$. Kruskal-Wallis-Test mit Bonferroni-Holm-Korrektur.

Nun folgten Experimentereihen, die sich zur Überprüfung einer in der Hypothese postulierten kurzfristigen Regulation des Stoffwechsels besser eigneten. Eine Inkubation mit Glutamat (100 μ M) von lediglich 3 Minuten Dauer führte nun zu einer signifikanten Zunahme der mitochondrialen Assoziation, welche durch die Messung des Intensitätsdichtenverhältnisses ermittelt wurde, gegenüber der Behandlung mit MEM als Kontrolle (siehe Diskussion für

Erklärungsansätze dieses Phänomens, Kapitel 6.1.2.1 und 6.2). Die IDR nahm durchschnittlich um 41,62% gegenüber MEM zu (Diagramm 4 und Abbildung 12; $p < 0,0001$). Dieser Effekt konnte in drei unabhängigen Versuchen reproduziert werden, wobei dieser ebenfalls durch die Inkubation mit dem mGluR5-spezifischen Antagonisten MPEP (simultan mit 100 μM Glutamat) vollständig nivelliert werden konnte.

Mitochondriale PKC δ -Translokation

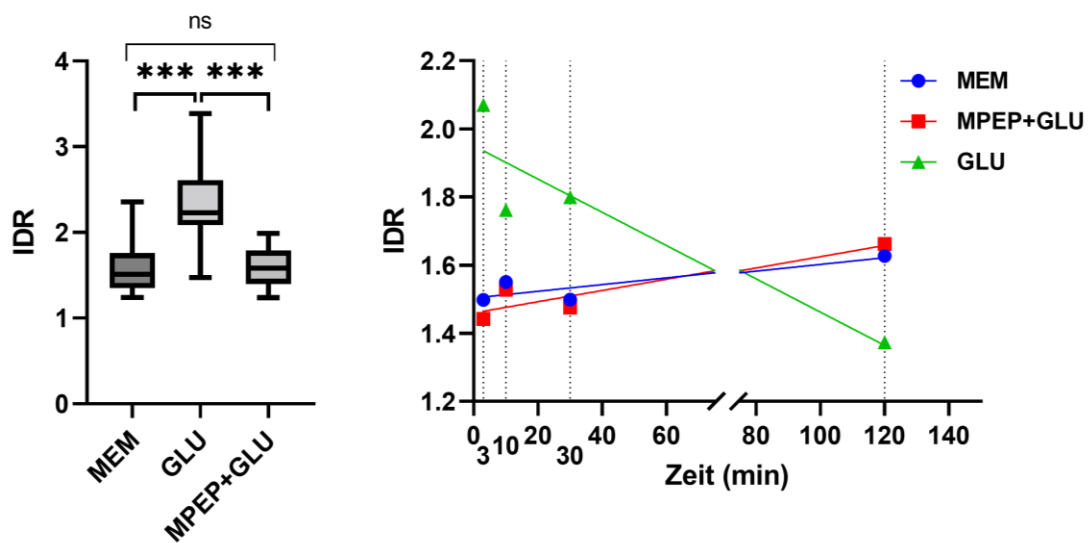


Diagramm 4 – mGluR5-abhängige mitochondriale PKC δ -Translokation und der Einfluss der Inkubationszeit

Links: hochsignifikante Steigerung der IDR durch 3-minütige Inkubation mit Glutamat, die bei mGluR5-Antagonisierung ausbleibt. Rechts: Darstellung der IDR bei verschiedenen Inkubationszeiten über 120 Minuten mit paradoxem Absinken der mitochondrialen Lokalisation bei andauernder Exposition gegenüber Glutamat. N = 210 Zellen; n = 3 unabhängige Versuche; MEM/GLU: $p < 0,0001$; MEM/MPEP+GLU: $p < 0,0001$. Kruskal-Wallis-Test mit Bonferroni-Holm-Korrektur.

Die Abhängigkeit des PKC δ -Translokationsverhaltens von der Inkubationsdauer mit Glutamat konnte daraufhin auch in einem Zeitreihenexperiment beobachtet werden. Während die IDR-Werte der Kontrollbehandlung (MEM) und der MPEP-Behandlung über die Zeit hinweg fast konstant blieben, nahm der initial

durch Glutamat relativ höhere IDR-Wert unter fortwährender Glutamateinwirkung tendenziell ab. Nach 120 Minuten war der Befund mit denen der vorangegangenen Experimente mit 120-minütiger Inkubationszeit vergleichbar, bei denen eine niedrigere mitochondriale Assoziation der PKC δ im Vergleich zur Kontrolle vorlag (siehe Diagramm 4 rechts und vergleiche mit Diagramm 2 und Diagramm 3).

Um den ersten Beginn der Translokation hin zu den Mitochondrien zu erfassen, wurden weitere Zeitreihenexperimente ($n = 3$) durchgeführt, bei denen Astrozyten engmaschiger für wenige Sekunden mit Glutamat stimuliert wurden. Die Stimulation erfolgte zum einen „phasisch“, mit einer kurzen Applikationsdauer <1 Sekunde und nachfolgendem Entzug des Stimulus durch Rücküberführung in glutamatfreies Medium. Zum anderen wurde „tonisch“, über die volle Dauer hinweg inkubiert. Zwischen beiden Stimulationsarten konnte kein signifikanter Unterschied beobachtet werden. Im Durchschnitt konnte das Translokationsmaximum, die maximale Steigung im Zeitverlauf der IDR-Werte, auf den Bereich zwischen 3 und 15 Sekunden nach Applikation der Glutamatlösung eingegrenzt werden. So zeigte sich nach 7 Sekunden ein signifikanter Unterschied gegenüber der IDR zum Zeitpunkt $t = 0$ s mit einem p-Wert von 0,02132. Nach 15 Sekunden war die Translokation auf stabilem Niveau mit hoher mitochondrialer Assoziation angelangt (IDR +29,54% gegenüber $t = 0$ s), welches ca. dem zuvor beobachteten Niveau nach 3 Minuten entsprach. Daher ist davon auszugehen, dass die Translokation bereits in den ersten Sekunden erfolgt und dann für einige Minuten anhält (Diagramm 6), bevor sie längerfristig betrachtet wieder rückläufig ist (Diagramm 4 rechts). Damit steht die Beobachtung im Einklang, dass auch schon die kurzzeitige, „phasische“ Stimulation zur vermehrten Translokation führt, die auch nach Entzug des Stimulus für unbestimmte Zeit erhalten bleibt und nicht augenblicklich auf das Ausgangsniveau zurückkehrt.

Es scheint, als ob Diagramm 5 und Diagramm 6 hinsichtlich des Translokationszeitraumes eine Abweichung aufweisen – diesbezüglich sind folgende Sachverhalte zu berücksichtigen. So ist in Diagramm 5 ein deutlicher Unterschied der IDR gegenüber dem Ausgangsniveau erst später zwischen 7 und 15 Sekunden zu verzeichnen, welcher sich mit dem Zeitraum der PDH-

Phosphorylierung deckt (siehe Diagramm 8). Dies steht jedoch weiterhin im Einklang mit der Hypothese einer PKC δ -vermittelten PDH-Aktivierung, da sich die zeitliche Abfolge beider Prozesse mit den genutzten Methoden nicht feiner auflösen lässt. Die Überlappung bzw. das Vorausgehen der PKC δ -Translokation gegenüber der PDH-Dephosphorylierung ist in diesem Fall nicht zweifelsfrei ersichtlich. Zur Untersuchung der Inkubationsmodi („phasisch“ versus „tonisch“) wurde außerdem nur ein einzelner Versuch orientierend durchgeführt, sodass seine Validität bei fehlender Replikation eingeschränkt ist. Die genauen Werte für die ersten Zeitpunkte im einstelligen Sekundenbereich sind daher bei eingeschränkter Aussagekraft nicht mit den Ergebnissen der mehrfach replizierten Sekundenreihen zur Erfassung der PKC δ -Translokation (Diagramm 6) vergleichbar. Die in Diagramm 5 visualisierten Ergebnisse zeigen lediglich eine evtl. vorliegende Tendenz, dass auch „phasische“ Stimulation wie „tonische“ zu einem ähnlichen Ausmaß an mitochondrialer Translokation führen könnte. Die genaue Dynamik der PKC δ -Translokation in den ersten Sekunden nach Glutamatstimulation ist hingegen dem Diagramm 6 zu entnehmen, dessen Werte mit hoher Reliabilität repliziert werden konnten.

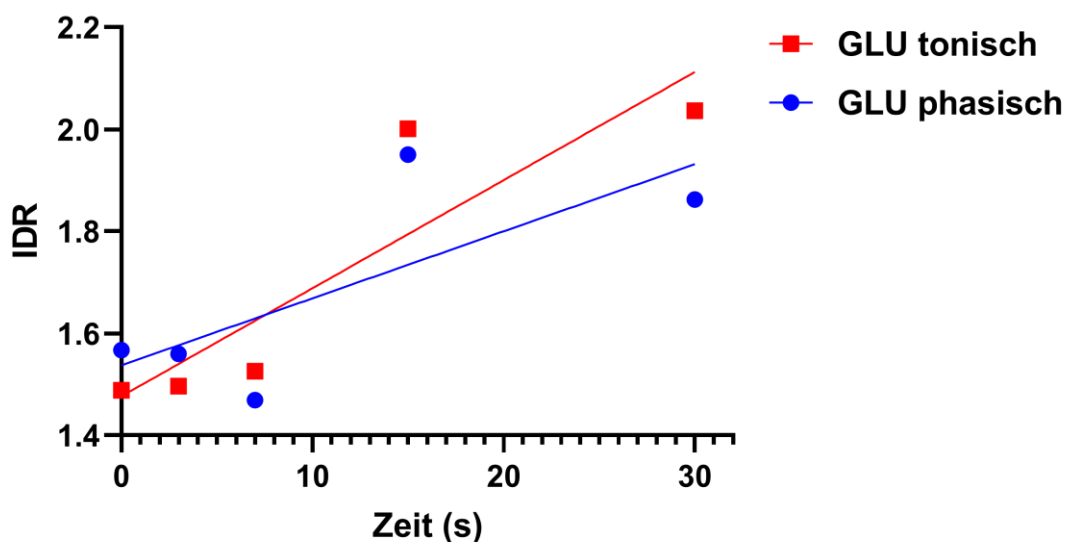


Diagramm 5 – Darstellung der mitochondrialen PKC δ -Translokation abhängig vom Inkubationsmodus

IDR-Werte nach kurzzeitiger Inkubation mit Glutamat. Rote Ausgleichsgerade: volle fortwährende Glutamatexposition über die auf der x-Achse aufgeführte

Zeitdauer. Blaue Ausgleichsgerade: Glutamatexposition <1 Sekunde, dann Abwarten der aufgeführten Zeitdauer in glutamatfreiem Medium. N = 150 Zellen; n = 1 unabhängiger Versuch.

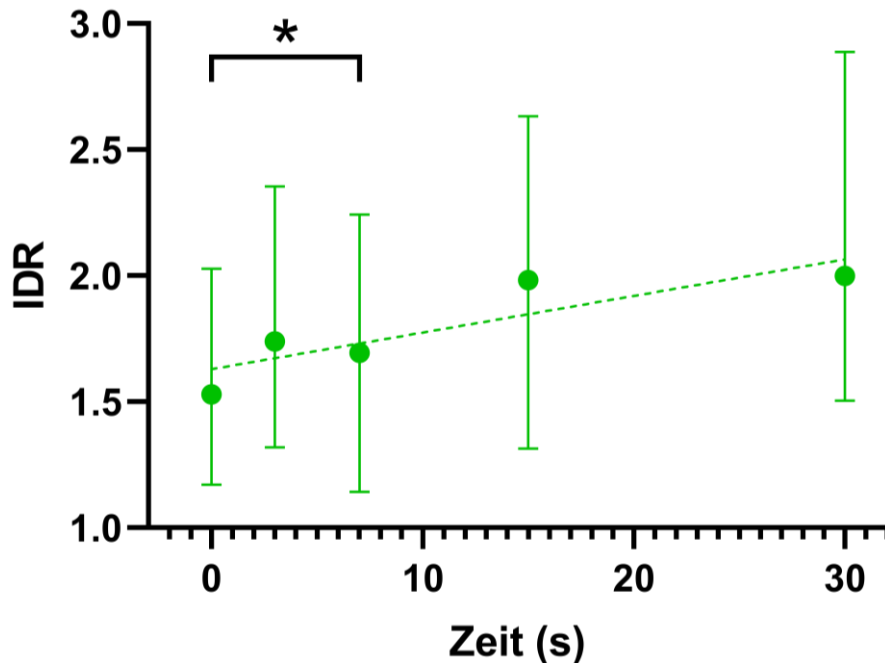


Diagramm 6 – Darstellung der mitochondrialen PKC δ -Translokation im Sekundenbereich

Stimulation mit Glutamat über die jeweils angegebene Zeitdauer. Zentraler Punkt = Mittelwert; die Antennen umfassen die Spannweite der IDR-Werte; die gestrichelte Ausgleichsgerade durch die Mittelwerte visualisiert die ansteigende Tendenz des IDRs. N = 175 Zellen; n = 3 unabhängige Versuche; 0 s/7 s: p = 0,02132. Kruskal-Wallis-Test mit Bonferroni-Holm-Korrektur.

5.5 Zum Einfluss verschiedener Stimuli auf den Phosphorylierungsgrad der PDH in Astrozyten

Nachdem die Kinetik der PKC δ -Translokation semiquantitativ analysiert wurde, wurde der Einfluss von Glutamat auf den Phosphorylierungsgrad der PDH untersucht. Hierbei zeigte sich nach dreiminütiger Glutamatstimulation ein reduzierter Phosphorylierungsgrad der PDH gegenüber der Kontrolle, abgebildet durch den Flächenquotienten $A_{\text{phospho-PDH}}/A_{\text{PDH}}$ und den Intensitätsquotienten $I_{\text{phospho-PDH}}/A_{\text{PDH}}$ um durchschnittlich -28,8% respektive -28,3% (Diagramm 7, p = 0,001564 und 0,003544). Dies lässt den Schluss zu,

dass durch Glutamat vermehrt PDH in einen aktiven, dephosphorylierten Zustand überführt wird. Um mechanistisch nachzuvollziehen, wie Glutamat als externer Ligand zur Aktivierung der PDH führt, wurde auch hier, analog zum Inhibierungsversuch der PKC δ -Translokation, der mGluR5-Antagonist MPEP eingesetzt. Dieser konnte die Dephosphorylierung der PDH nach Glutamatapplikation vollständig unterbinden. Daher ist davon auszugehen, dass auch der Effekt der PDH-Desphosphorylierung durch Glutamat mGluR5-vermittelt ist.

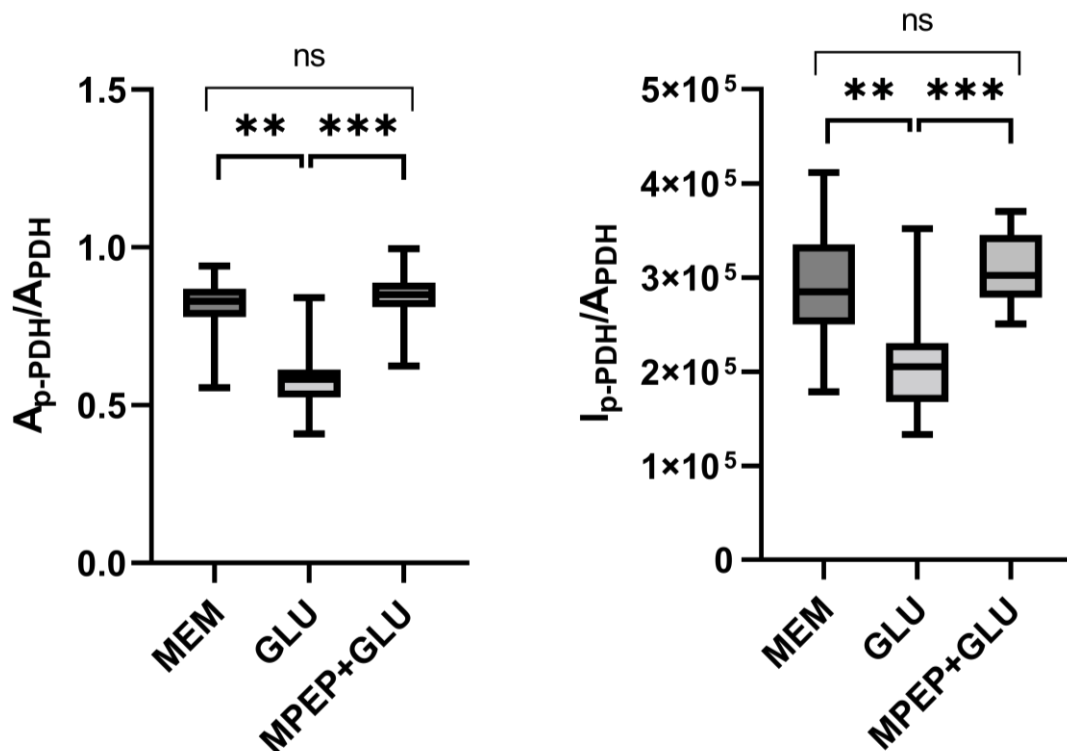
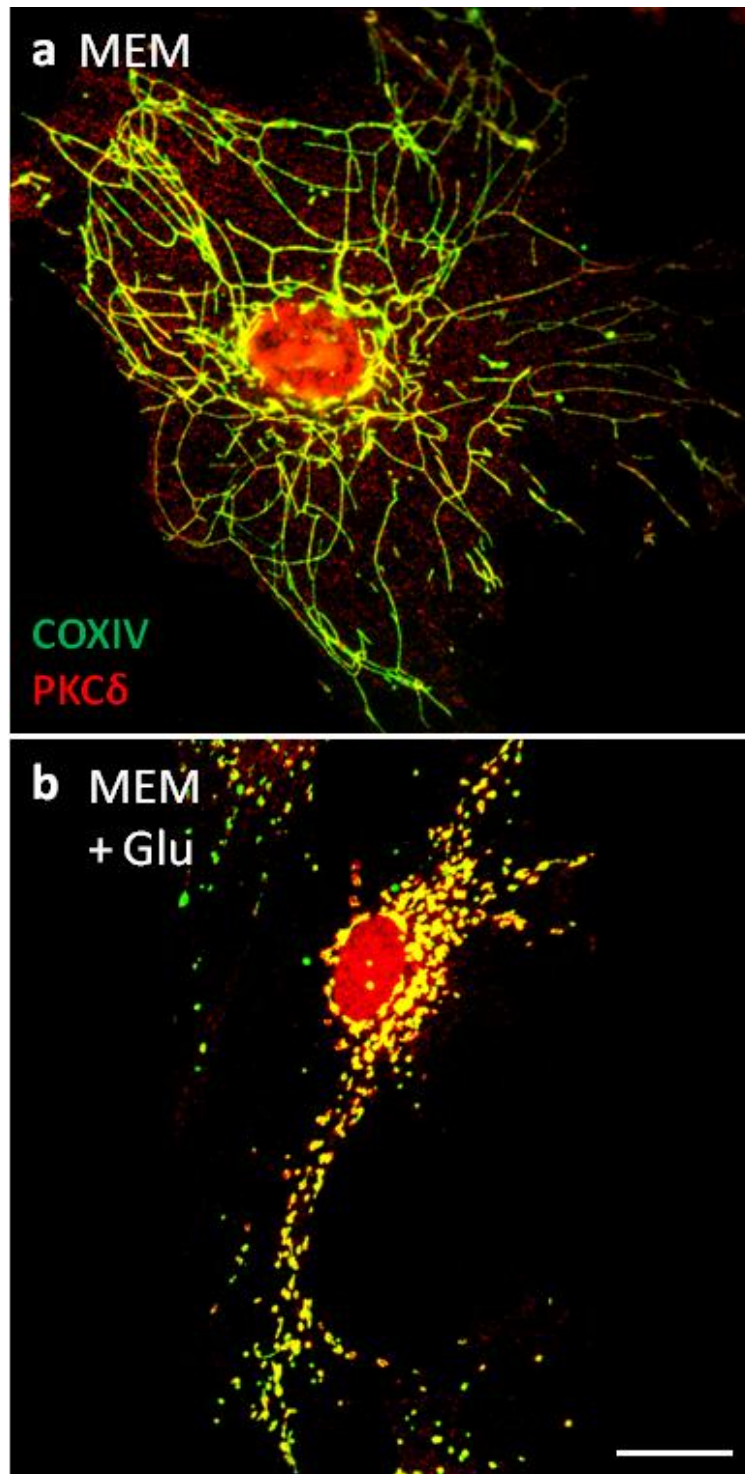


Diagramm 7 – mGluR5-vermittelte Dephosphorylierung der PDH

Links: Flächenquotient aus den kumulierten p -PDH- und Gesamt-PDH-Objektpopulationen mit signifikanter Reduktion (= Abnahme des Phosphorylierungsgrades) bei Glutamatapplikation über 3 Minuten, ausbleibend bei mGluR5-Antagonisierung. Rechts: Darstellung des gleichen Zusammenhanges mithilfe der kumulierten Intensität der p -PDH-Signale, welche sich auf der Gesamt-PDH-Fläche verteilen – auch hier zeigt sich eine mGluR5-abhängige signifikante Reduktion. $N = 163$ Zellen; $n = 3$ unabhängige Versuche; MEM/GLU: $p = 0,001564$ (Flächenquotient) und $p = 0,003544$ (Intensitätsquotient); GLU/MPEP+GLU: $p = 0,000248$ (Flächenquotient) und $p = 0,000752$. Kruskal-Wallis-Test mit Bonferroni-Holm-Korrektur.



**Abbildung 12 – Subzelluläre Lokalisation der PKCδ nach
Glutamatstimulation**

Darstellung der PKCδ-Verteilung in kultivierten Astrozyten mit a: MEM und b: 3-minütiger Inkubation mit Glutamat (100 μM). Umverteilung der diffus verteilten zytoplasmatischen (/ggf. membranständigen) PKCδ auf die zahlreichen COXIV⁺-Mitochondrien. Maßstab 20 μm (b [für a und b]).

Analog zur PKC δ -Translokation wurde auch die zeitliche Dynamik der PDH-Dephosphorylierung untersucht, um den Beginn der Abnahme des Phosphorylierungsgrades zu erfassen. Das Maximum des Dephosphorylierungsvorganges, die maximal negative Steigung im Zeitverlauf des Flächenquotienten und der $I_{\text{phospho-PDH}}/A_{\text{PDH}}$, konnte auf den Bereich zwischen 7 und 30 Sekunden nach Applikation der Glutamatlösung eingegrenzt werden (siehe Diagramm 8). So zeigten sich nach 15 Sekunden signifikante Unterschiede gegenüber dem Flächenquotienten oder dem $I_{\text{phospho-PDH}}/A_{\text{PDH}}$ zum Zeitpunkt $t = 0$ s mit einem p-Wert von 0,0003308 respektive 0,02765. Nach 30 Sekunden war der verringerte PDH-Phosphorylierungsgrad auf ein stabiles Niveau angelangt (-24,15% gegenüber $t = 0$ s gemessen am Flächenquotienten und -36,66% gemessen am $I_{\text{phospho-PDH}}/A_{\text{PDH}}$), welches (wie zuvor beobachtet) von der Größenordnung her ca. dem Niveau nach 3 Minuten entsprach (siehe Diagramm 7 und Abbildung 13).

Die Erkenntnis dieser zeitlichen Abfolge ist essentiell für die Hypothese einer PKC δ -vermittelter PDH-Aktivierung. Damit die PKC δ Einfluss auf die Phosphorylierung der PDH ausüben kann, muss ihre Translokation zum Mitochondrium hin zeitlich der Dephosphorylierung vorangeschaltet sein. PKC δ -Translokation und PDH-Dephosphorylierung beginnen zeitlich versetzt und überlappen sich in einer Sequenz, die mit dem postulierten Mechanismus im Einklang steht.

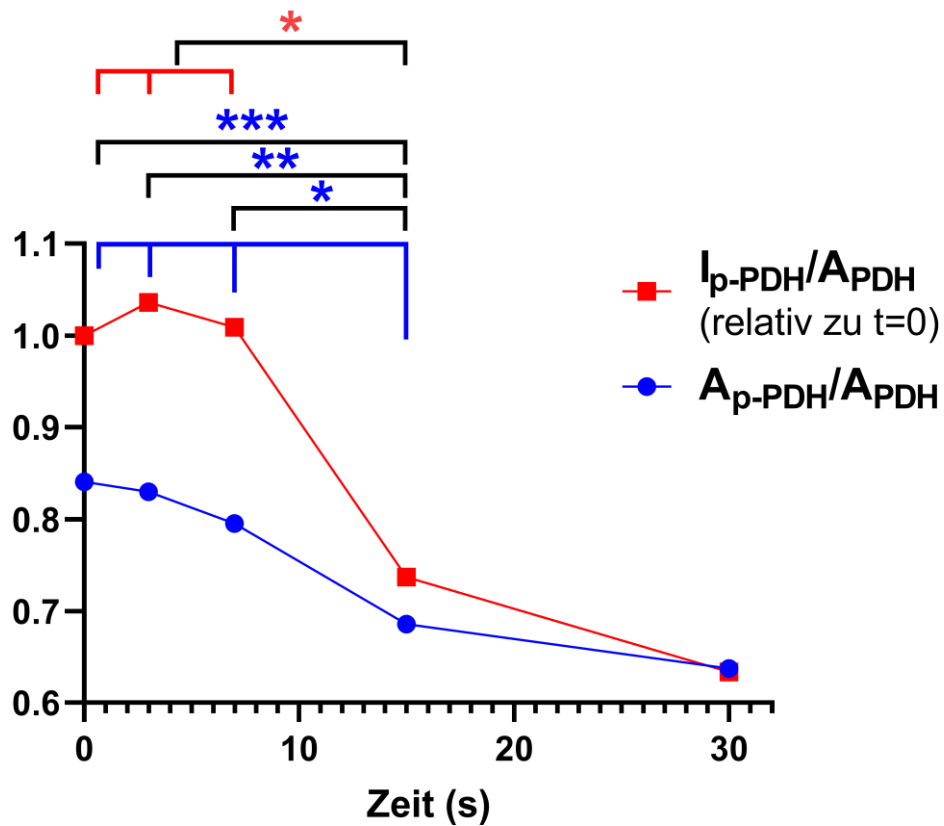


Diagramm 8 – Darstellung der PDH-Dephosphorylierung im Sekundenbereich

$I_{p\text{-PDH}}/A_{\text{PDH}}$ (hier relativ zum Betrag an $t = 0$, daher ebenfalls dimensionslos) und $A_{p\text{-PDH}}/A_{\text{PDH}}$ -Werte (wie auch in Diagramm 7 genutzt) nach kurzzeitiger Inkubation mit Glutamat. Eine signifikante Dephosphorylierung gegenüber Basalniveau wird bei der Messung nach 15-sekündiger Inkubation erstmals deutlich. $N = 173$ Zellen; $n = 3$ unabhängige Versuche; 0 s/15 s: $p = 0,02765$ (Intensitätsquotient) und $0,0003308$ (Flächenquotient); 3 s /15 s: $p = 0,006033$ (Flächenquotient); 7 s /15 s: $p = 0,0446$ (Flächenquotient). Kruskal-Wallis-Test mit Bonferroni-Holm-Korrektur.

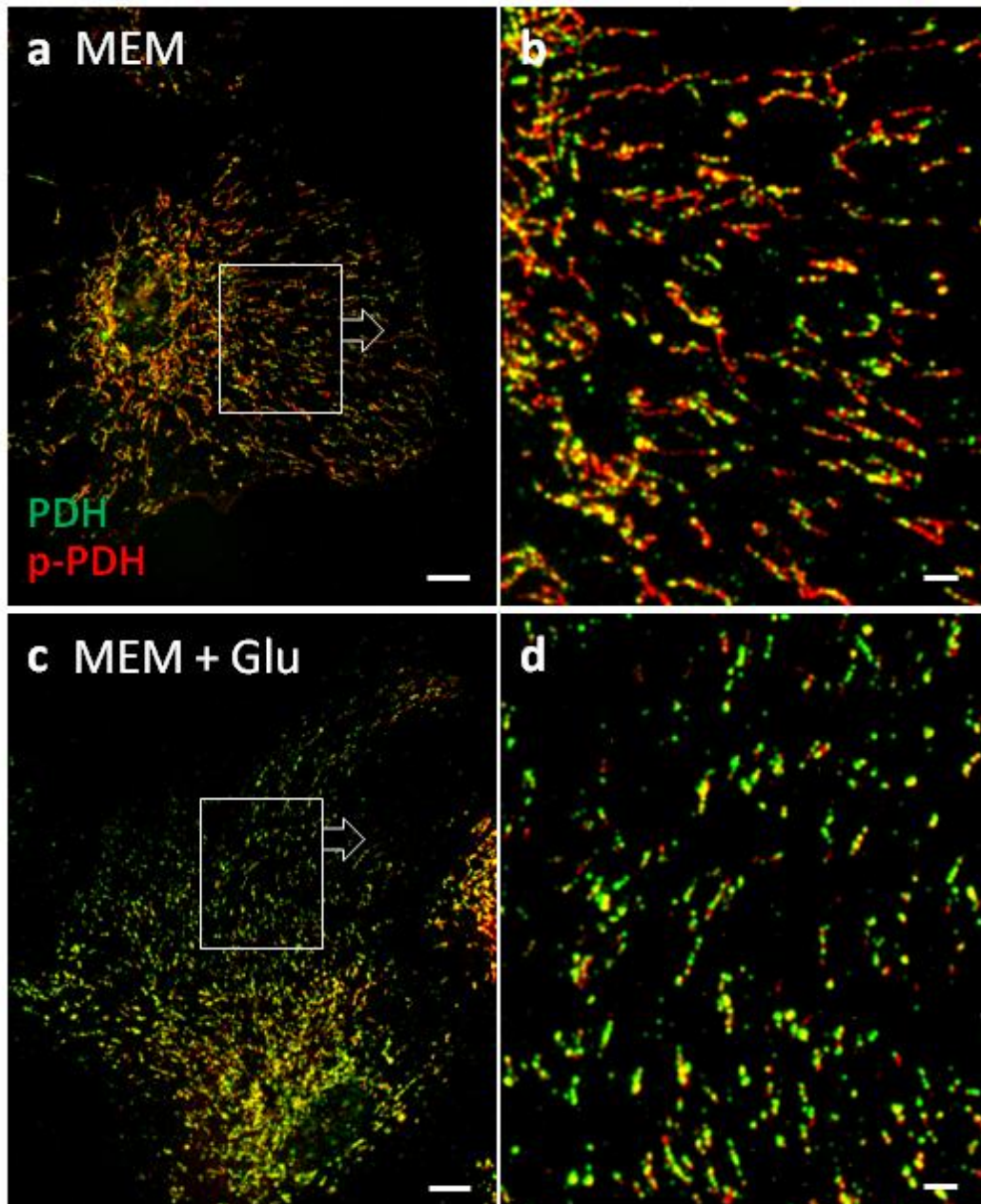


Abbildung 13 – Unterschiedliche Phosphorylierungsgrade der PDH auf Mitochondrien zweier unterschiedlich behandelter Astrozyten (2)

a+b: In MEM-behandelten Astrozyten ist der Großteil der Mitochondrienfläche (durch die Gesamt-PDH-Färbung dargestellt) auch mit phospho-PDH bedeckt, einem hohen Phosphorylierungsgrad und damit Inaktivität der PDH entsprechend. c+d: Nach Hinzugabe von Glutamat (3 Minuten, 100 μ M) erkennt man ein deutlich schwächeres Fluoreszenzsignal der phospho-PDH und damit eine gesteigerte Dephosphorylierung und Aktivierung der PDH. Maßstäbe: a+c 10 μ m; b+d 2 μ m.

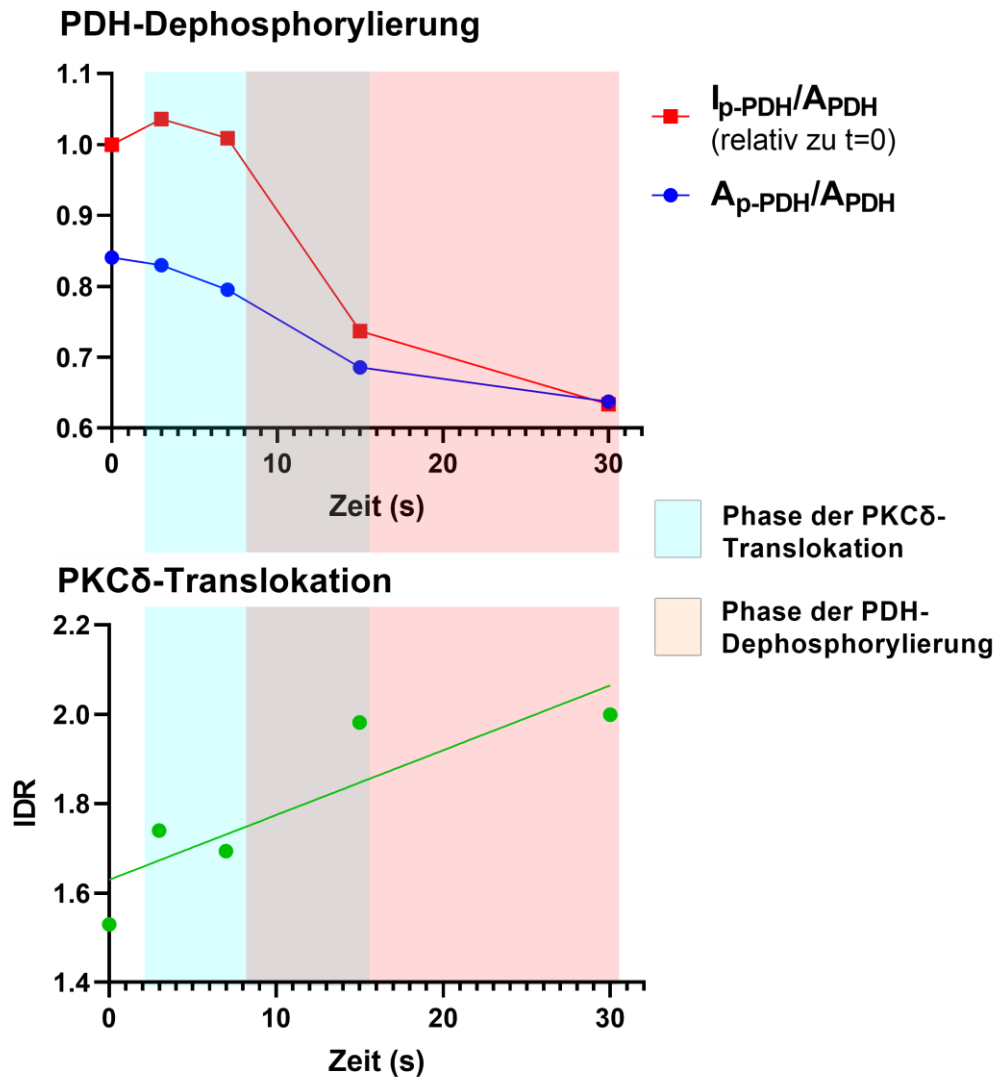


Diagramm 9 – Zeitliche Abfolge der Phasen von PKCδ-Translokation und PDH-Dephosphorylierung

Zusammengesetzt aus Diagramm 6 (modifiziert) und Diagramm 8. Die grünen Punkte entsprechen den IDR-Durchschnittswerten an den jeweiligen Zeitpunkten mit Ausgleichsgerade (untere Diagrammhälfte). Wie mechanistisch in der Hypothese vermutet, folgt die Phase der PDH-Dephosphorylierung überlappend auf die Phase der mitochondrialen PKCδ-Translokation.

PKCδ-Translokation und PDH-Dephosphorylierung haben als gemeinsamen Ausgangspunkt die Bindung von Glutamat an mGluR5. Im Folgenden wurde untersucht, ob die Translokation und Aktivität der PKCδ und die Dephosphorylierung der PDH kausal verknüpfte Ereignisse darstellen. Um die Aktivität der PKCδ zu hemmen, wurden PKC-Inhibitoren mit unterschiedlichen

Inhibitionsspektren eingesetzt. Auf den Einsatz des verbreiteten, angeblich selektiven Inhibitors Rottlerin wurde dabei diesmal verzichtet (siehe Kapitel 6.1.2.2). Der cPKC-affine Inhibitor Gö6976 (α , β , γ , aber nicht δ und wenige andere nPKCs/aPKCs inhibierend) und der pan-PKC-Inhibitor (inkl. δ) Gö6983 wurden eingesetzt, um möglichst differenziert die Wirkung der PKC δ unter Ausschaltung anderer PKCs zu untersuchen. Unter denselben experimentellen Bedingungen wie zur Bestimmung des PDH-Phosphorylierungsgrades nach Glutamatstimulation wurden zusätzliche Inkubationen mit einem Glutamat-Gö6976-Gemisch sowie Glutamat-Gö6983-Gemisch vorgenommen. Gö6976, welches die Aktivität der PKC δ unberührt lässt, beeinflusste den Glutamateffekt nicht, sodass eine signifikante Reduktion des PDH-Phosphorylierungsgrades eintrat. Gemessen als Flächenquotient zeigte sich eine Differenz von -33,23% ($p = 0,000006795$) und mit $I_{\text{phospho-PDH}}/A_{\text{PDH}}$ von -41,64% gegenüber MEM ($p = 0,000004225$; Diagramm 10). Diese Reduktion des PDH-Phosphorylierungsgrades ist vom Ausmaß vergleichbar mit der alleinigen Inkubation mit Glutamat. Hingegen konnte der Breitbandinhibitor Gö6983, welcher die PKC δ mit inhibierte, den Glutamateffekt auf die PDH-Dephosphorylierung auf Kontrollniveau aufheben. Diese Beobachtung lässt darauf schließen, dass andere Mitglieder der PKC-Familie nicht entscheidend an der Aktivierung der PDH beteiligt sind, sondern dies am ehesten spezifisch der PKC δ vorbehalten ist, deren Einfluss auf die PDH in anderen Zelltypen bereits beschrieben worden ist.^{44,47}

5.6 Ausschluss eines Einflusses durch Gö6983 auf die Translokationsfähigkeit der PKC δ

Für den postulierten Mechanismus der PDH-Aktivierung durch die PKC δ dürfte außerdem ihre Translokationsfähigkeit nicht eingeschränkt sein. Um den weiterhin fortbestehenden Erhalt der Translokationsfähigkeit der PKC δ unter Einfluss der PKC-Inhibitoren aufzuzeigen, wurde separat die PKC δ /COXIV-Färbung nach Glutamatstimulation und nach Einwirkung von Gö6983 durchgeführt. Die IDR-Werte (als Maß der Translokation) nach Inkubation mit Glutamat weichen von denen nach Inkubation mit Gö6983 nicht signifikant ab und sind vergleichbar ($p = 0,35867$; Diagramm 11).

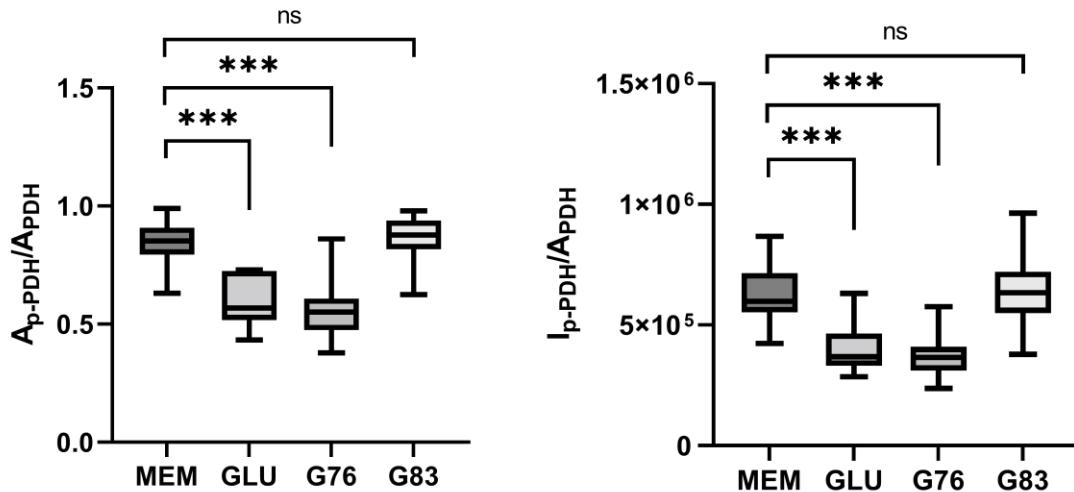


Diagramm 10 – Die PDH-Dephosphorylierung ist abhängig von der Kinasefunktion der PKC δ

Links: Flächenquotient aus den kumulierten p-PDH- und Gesamt-PDH-Objektpopulationen mit signifikanter Reduktion (= Abnahme des Phosphorylierungsgrades) bei Glutamatapplikation über 3 Minuten, ausbleibend bei pan-PKC- und damit auch PKC δ -Inhibition (+G83), nicht aber bei Inhibition der cPKCs (+G76). Rechts: Darstellung des gleichen Zusammenhanges mithilfe der kumulierten Intensität der p-PDH-Signale, welche sich auf der Gesamt-PDH-Fläche verteilen – auch hier zeigt sich eine Abhängigkeit von der Funktionsfähigkeit der Kinasedomäne der PKC δ . N = 245 Zellen; n = 3 unabhängige Versuche; MEM/GLU: $p = 0,000002602$ (Flächenquotient) und $p = 0,000002669$ (Intensitätsquotient); MEM/G76: $p = 0,000006795$ (Flächenquotient) und $p = 0,000004225$ (Intensitätsquotient). Kruskal-Wallis-Test mit Bonferroni-Holm-Korrektur.

Der pan-PKC-Inhibitor Gö6983 hat zwar auf die enzymatische Aktivität der PKC δ einen hemmenden Einfluss, nicht jedoch auf ihre Translokationsfähigkeit. Dieser Befund ist deswegen von Relevanz, weil das Translokationsverhalten der PKC δ bei der immunocytochemischen Beurteilung der PDH-Phosphorylierung aus technischen Gründen, da die genutzten Primärantikörper derselben Spezies entstammten, nicht gleichzeitig beobachtet werden konnte.

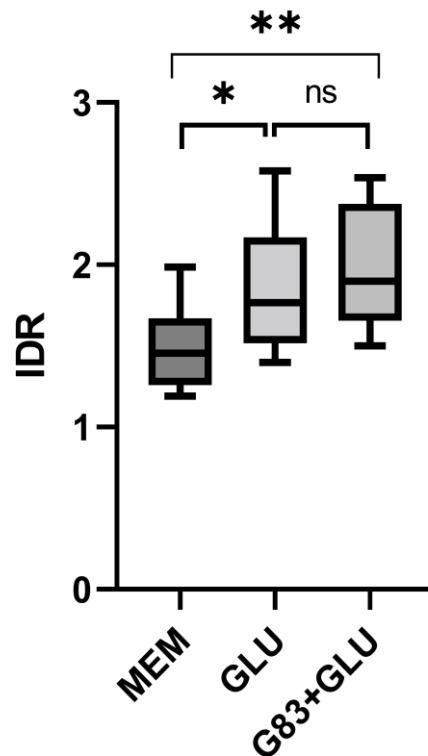


Diagramm 11 – Gö6983 hat keinen Einfluss auf die Translokationsfähigkeit der PKC δ

3-minütige Inkubation mit den aufgeführten Substanzen. Wie bereits für Glutamat dargestellt, bewirkt auch die Kombination von Glu mit Gö6983 eine Steigerung der IDR in vergleichbarem Ausmaß. $N = 36$ Zellen; $n = 1$ Experiment; MEM/GLU: $p = 0,03298$; MEM/G83+GLU: $p = 0,004564$; GLU/G83+GLU: $p = 0,35867$. Kruskal-Wallis-Test mit Bonferroni-Holm-Korrektur.

5.7 Luminometrische Messung der ATP-Konzentrationen im Zelllysat

Nachdem auch die Dynamik der PDH-Dephosphorylierung näher untersucht war und ein kausaler Zusammenhang zwischen mGluR5-Aktivierung, PKC δ -Translokation, PKC δ -Aktivität und der PDH-Aktivierung demonstriert werden konnte, sollte die Relevanz dieses Mechanismus für den Energiestoffwechsel von Astrozyten beurteilt werden. Dafür wurde die intrazelluläre ATP-Konzentration gemessen, welche als Indikator für das Energieniveau der Zelle

angesehen werden kann (siehe Diskussion, 6.1.4 und insbesondere 6.7). Der von Winkler et al.⁶⁰ beschriebene ATP-Abfall nach Glutamatstimulation wurde dafür hinsichtlich seiner Dynamik untersucht, während der mGluR5/PKC δ /PDH-Signalweg pharmakologisch beeinflusst wurde.

Ob die durch Glutamat induzierte Aktivierung der PDH schließlich eine relevante, fassbare Auswirkung auf die intrazellulären ATP-Spiegel hat, wurde durch luminometrische Messungen von Zelllysaten untersucht. In der Literatur ist eine Glutamat-induzierte Senkung der intrazellulären ATP-Konzentration in Astrozyten beschrieben, welche binnen 10 Minuten nach Inkubationsbeginn eintritt und sich bei fortwährender Glutamat-Einwirkung nach ca. 35 Minuten auf Ausgangswerte regeneriert. Die absoluten ATP-Werte unterliegen einer großen Zell-zu-Zell-Variabilität, und in 20% der untersuchten Astrozyten ist auch eine überschießende ATP-Regeneration über das Ausgangsniveau hinaus zu beobachten.⁶⁰ In den im Folgenden dargestellten Experimenten wurde durch die Inhibition von mGluR5 und verschiedenen PKC-Isoformen der Einfluss des mGluR5/PKC δ -vermittelten Signalwegs auf den Verlauf der ATP-Regeneration unter Glutamatstimulation analysiert.

Die Applikation einer 100 μ M Glutamatlösung führte bereits nach einer Minute Inkubationszeit zu einem steilen Abfall des der ATP-Konzentration im Zelllysat auf 49% gegenüber der Kontrolle ($p = 0,00028$; Diagramm 12). Den Ergebnissen der Zeitreihenexperimente (Kapitel 5.5; Diagramm 8) zufolge ist bereits innerhalb dieser Zeitspanne von einer Aktivierung der PDH auszugehen. Eine mGluR5-Inhibition sollte in der Theorie zu einem verstärkten ATP-Abfall durch den Wegfall der PDH-Aktivierung führen. Dies konnte jedoch nicht beobachtet werden – die Hinzugabe von MPEP führt mit einer Reduktion auf 54% gegenüber der Kontrolle zu einem ATP-Abfall vergleichbaren Ausmaßes ($p = 0,000595$; Diagramm 12). In Zeitreihenexperimenten ($n = 3$) konnte durch Glutamatapplikation ein ATP-Abfall innerhalb der ersten Minute auf ca. 50%, sowie bei andauernder Inkubation mit Glutamat eine langsame Regeneration auf 80% des Ausgangswertes nach 35 Minuten reproduziert werden. Die gleichzeitige Applikation von MPEP führt an den Zeitpunkten $t = 1$ min und $t = 3$ min zu einem vergleichbaren ATP-Abfall auf 61% respektive 52%, jedoch bleibt die Regeneration vollständig aus (Diagramme 13 und 14).

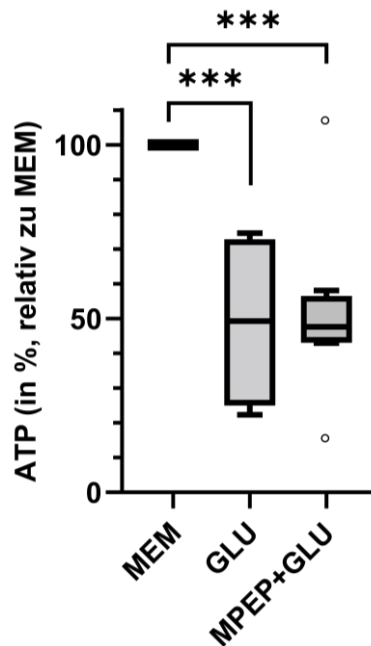


Diagramm 12 – ATP-Spiegel nach 1 Minute metabolischer Belastung durch Glutamat

Eine einminütige Stimulation mit den angegebenen Substanzen führt zu einer Reduktion der ATP-Spiegel gegenüber der Kontrolle. Die Inhibition von mGluR5 durch MPEP hat keinen Einfluss auf das Ausmaß des Abfalls. $n = 6$ unabhängige Versuche; MEM/GLU: $p = 0,00028$; MEM/MPEP+GLU: $p = 0,000595$. Bifaktorielle Rang-Varianzanalyse nach Kubinger.

Nach 35 Minuten mit MPEP sind bezogen auf die Kontrolle nur 46% der ATP-Konzentration vorhanden. Dieser deutlich erscheinende Unterschied zwischen den Behandlungen mit Glutamat und MPEP+Glutamat zum Zeitpunkt $t = 35$ min ist jedoch bei großer Variabilität der Absolutwerte und $n = 3$ unabhängigen Zeitreihenexperimenten statistisch nicht signifikant ($p > 0,05$; Diagramm 13).

Die Abhängigkeit der ATP-Neubildung und -Regeneration von der Kinaseaktivität der PKC δ wurde, wie bei den Experimenten zur Beurteilung der PDH-Phosphorylierung (Kapitel 5.5), mithilfe von PKC-Inhibitoren mit verschiedenen Inhibitionsspektren untersucht. Die Behandlung mit Gö6976 (die PKC δ nicht inhibierend) führte bei andauernder Inkubation mit Glutamat zu einer Regeneration des ATP-Spiegels auf knapp 60% des Kontrollwertes nach 35 Minuten. Damit ist das Ausmaß der Regeneration mit durchschnittlich +20% im Vergleich zu Glutamat allein (+38%) abgeschwächt, gemessen an der

prozentualen Differenz zum Minimalwert in den ersten Minuten. Die Tendenz zur Regeneration scheint jedoch im Vergleich zu MPEP erhalten zu sein, wo im Durchschnitt nur eine prozentuale Differenz von +1,2% beobachtet werden kann. Die Behandlung mit Gö6983 (die PKC δ mit inhibierend) führte bei andauernder Inkubation mit Glutamat über 35 Minuten zu einem ähnlichen Verlauf wie mit MPEP (Diagramm 14). Die dargestellten Ergebnisse sind prinzipiell mit der Hypothese einer mGluR5/PKC δ -vermittelten ATP-Produktion (vermutlich via PDH) zur Regeneration der intrazellulären Spiegel vereinbar, jedoch sind auch hier die Differenzen zwischen den einzelnen Behandlungen statistisch nicht signifikant ($p < 0,05$). Die Aussagekraft der ATP-Messungen sollte daher in größer angelegten Studien überprüft und erhärtet werden.

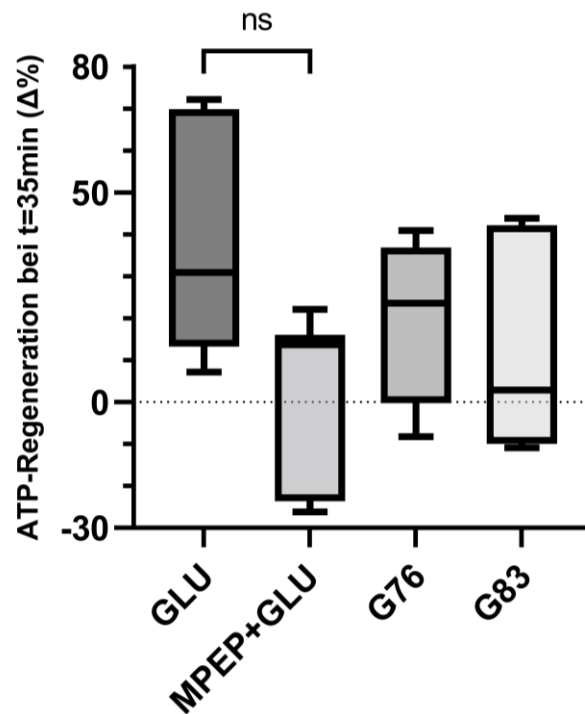


Diagramm 13 – ATP-Regeneration nach 35-minütiger Inkubation mit mGluR5- und PKC-Inhibitoren

Die Regeneration der ATP-Konzentration nach 35 Minuten unter alleiniger Glutamatstimulation erscheint deutlich stärker als unter Inhibition mit den genannten Substanzen. Der Unterschied ist jedoch, a.e. bedingt durch die geringe Stichprobengröße ($n = 3$ unabhängige Versuche), statistisch nicht signifikant. Bifaktorielle Rang-Varianzanalyse nach Kubinger.

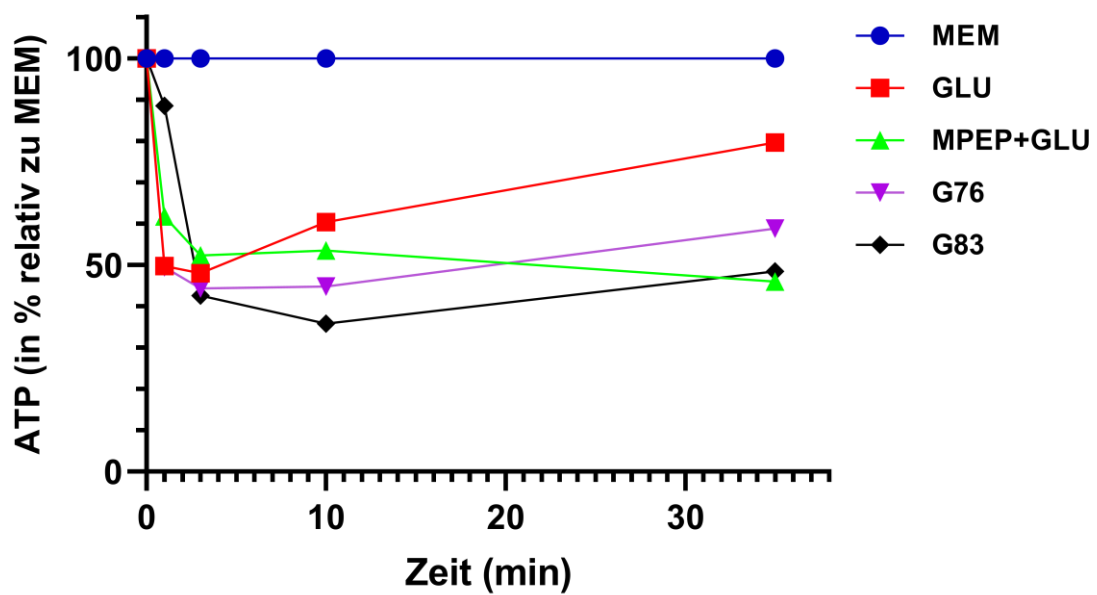


Diagramm 14 – Zeitlicher Verlauf der ATP-Konzentrationen unter Glutamatstimulation mit mGluR5- und PKC-Inhibitoren

Zeitlicher Verlauf der ATP-Regeneration bei kontinuierlicher Inkubation mit den dargestellten Substanzen. Messungen erfolgten nach dem steilen anfänglichen Abfall an den Zeitpunkten +1, +3, +10 und +35 Minuten. Nicht dargestellt ist außerdem eine äußerst inkonsistent in den Zeitreihenexperimenten aufgetretene ATP-Spitze zum Zeitpunkt $t = 5$ min, welche als Ausreißer gewertet und daher nicht abgebildet wurde. Eine potentielle, biologische Bedeutung einer solchen ATP-Spitze ist jedoch nicht sicher ausgeschlossen.

6 Diskussion

6.1 Diskussion der Methoden und ihrer Validität

6.1.1 Experimente an primären Astrozyten in Kultur

Das Proteom von kultivierten Astrozyten und Astrozyten *in vivo* scheint sehr ähnlich ausgeprägt zu sein, außer in Hinblick auf Proteine der extrazellulären Matrix und der Zell-Zell-Interaktion.⁷⁶ Viele Erkenntnisse zu astrozytären Funktionen wurden zunächst im Modell der Zellkultur erforscht und nachfolgend auch unter *in vivo*-Bedingungen entdeckt.⁷⁷ Daher scheint die Zellkultur ein geeignetes Modell zur Untersuchung von metabolischen Prozessen in Astrozyten zu sein.

6.1.2 Auswahl experimenteller Bedingungen

6.1.2.1 Inkubationszeiten

Die Auswahl verschiedener Inkubationszeiten für die pharmakologischen Testungen führte zum besseren Verständnis darüber, innerhalb welchen zeitlichen Rahmens der postulierte mGluR5/PKC δ -Mechanismus zu einer Beeinflussung des mitochondrialen Energiestoffwechsels führt. Bedingt durch die genutzten Methoden zur Visualisierung von Translokation, Dephosphorylierung und ATP-Gehalt sind lediglich Momentaufnahmen zu klar definierten Zeitpunkten möglich gewesen. Die anfangs gewählte Inkubationszeit von 120 Minuten für die pharmakologischen Testungen führte in Hinsicht auf die Ausgangshypothese zu einem scheinbar paradoxen Effekt (siehe Kapitel 5.4). Nach dem Studium der Literatur bzgl. der PKC δ -Aktivität und -Translokation in anderen Zelltypen wurden kürzere Inkubationszeiten im Sekunden und einstelligen Minutenbereich getestet, die zu Ergebnissen führten, die mit der Hypothese einer kurzfristigen metabolischen Regulation durch den mGluR5/PKC δ -Signalweg im Einklang stehen (siehe Kapitel 6.2).

6.1.2.2 Pharmakologische Testung

Zunächst mussten Substanzen identifiziert werden, welche überhaupt einen Einfluss auf die Lokalisation der PKC δ und dann nachfolgend einen Effekt auf

den Aktivitätsgrad der PDH haben könnten. Naheliegend war der Einsatz von Glucose oder auch Pyruvat, welche als Vorstufe oder direktes Enzymsubstrat der PDH Einfluss auf den Umsatz des jeweiligen Stoffwechselweges durch positive Rückkopplung nehmen könnten. Gleichzeitig mussten unspezifische Einflüsse auf die Aktivität der PKC δ , wie sie aus dem Medium stammen könnten (z.B. beim häufig eingesetzten DMEM), ausgeschlossen werden. Daher erfolgte auch die Testung von DMEM gegenüber einem MEM vor dessen Nutzung als Kulturmedium. Im Gegensatz zu DMEM weist MEM die Minimalkonzentration an Aminosäuren und Glucose auf und ist frei von weiteren, nicht-essentiellen Nährstoffen und Zusätzen. Die experimentellen Substanzen wurden vorsichtshalber stets in MEM gelöst, sodass etwaige Resteinflüsse durch substratreichere Medien eliminiert werden konnten. Der Einsatz von Puffersubstanzen wie HEPES beugte pH-Wert-Schwankungen bei der Handhabung der Kulturen in unvermeidbaren Phasen außerhalb des Brutschrankes während der Experimente vor, die ebenfalls Einfluss auf die Enzymaktivität (insbesondere bei Enzymen von Energiestoffwechselwegen) ausüben würden.

Zur Identifikation der am mGluR5/PKC δ -Signalweg beteiligten Rezeptoren und Effektorproteine wurden möglichst selektive Agonisten oder Inhibitoren der vermuteten Strukturen eingesetzt. Dadurch sollte eine potentielle Beteiligung etwaiger anderer Effektoren an der Zielstruktur PDH ausgeschlossen werden. Leider war dies für die PKC δ selbst nur schwer realisierbar, da der in der Literatur häufig angeführte Inhibitor Rottlerin aufgrund zahlreicher pleiotroper Effekte ungeeignet zu sein scheint.⁷⁸⁻⁸⁰ Daher kam es zum Einsatz von Gö6976, das zahlreiche, insbesondere cPKCs inhibiert, die δ -Isoform und nur wenige andere ausspart. Wie in Kapitel 6.1.5 erläutert, könnte die nicht vollständige Selektivität womöglich die Aussagekraft der Experimente, in denen das Gö6976 eingesetzt wurde, beeinträchtigen.

Die Entscheidung zur Präinkubation mit den jeweiligen Testsubstanzen erfolgte in Hinblick auf die Lokalisation und die Art der zu beeinflussenden Zielstruktur. Während MPEP nicht-kompetitiv von extrazellulär wie auch Glutamat selbst an mGluR5 andockt, wirken Gö6976 und Gö6983 intrazellulär an den jeweiligen

PKCs. Um die Diffusion nach intrazellulär zu gewährleisten, erfolgte daher vor Hinzugabe von Glutamat in den experimentellen Durchgängen eine Präinkubation mit einem der PKC-Inhibitoren über 30 Minuten. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Gö6983 durch die Inhibition der Kinaseaktivität und nicht etwa durch Inhibition der Translokationsfähigkeit der PKCs bewirkt, dass die PDH-Dephosphorylierung ausbleibt. Damit erfolgte hinsichtlich der Nutzung dieser Substanzen eine interne Validierung, da sie nicht auf andere Eigenschaften der untersuchten Proteine Einfluss zu nehmen scheinen. Eine kausale Verknüpfung zwischen PKC δ -Aktivität und PDH-Aktivierung scheint mit den genannten pharmakologischen Testungen gut demonstrierbar zu sein.

6.1.3 Etablierung der Auswertungsalgorithmen

Die im Folgenden näher beschriebenen Parameter, die zur Beurteilung von Kompartiment-spezifischer Translokation oder zur semiquantitativen Messung von Phosphoantigenen genutzt wurden, wurden zur Beantwortung der Fragestellungen gezielt für diese Analysen entwickelt. Die Etablierung der IDR-Berechnung ist beschrieben in Farid und Derouiche, 2019.⁷³

6.1.3.1 IDR

Das Intensitätsdichtenverhältnis (IDR) wird gebildet aus dem Quotienten der kumulierten Signalintensität und der kumulierten Objektfläche einer als mitochondrial identifizierten Objektpopulation und dem zugehörigen Quotienten der nicht-mitochondrialen Objektpopulation eines Bildausschnitts (siehe untenstehende Formel). Sie ist ein semiquantitatives Maß für die Kolo-kalisation von PKC δ - und COXIV-Signalen.

$$\text{Intensity Density Ratio [IDR]} = \frac{\sum I (\text{mitochondrial}) / \sum A (\text{mitochondrial})}{\sum I (\text{non-mitochondrial}) / \sum A (\text{non-mitochondrial})}$$

Der IDR-Quotient weist einige Vorteile aber auch Limitationen auf. Bezüglich der optimalen Präanalytik muss die jeweilige *region of interest* (ROI) so gewählt sein, dass einzeln liegende und nur wenig überlappende Objekte durch das Bildverarbeitungsprogramm zuverlässig erkannt werden können, d.h. die ROI wurde in die extrem dünnen Lamellipodien (<200 nm Dicke) der Astrozyten

gelegt. Die IDR-Werte von ausgewählten Bildausschnitten können nur zwischen Aufnahmen des gleichen experimentellen Durchgangs genutzt werden, für den die gleichen Kulturbedingungen herrschten und die gleichen Färbelösungen appliziert und mikroskopischen Aufnahmeparameter angewandt wurden. Des Weiteren kann sie keine absolute prozentuale Aussage bzgl. der Verteilung der einer Population zugeordneten Objekte treffen, sondern stellt einen Index dar, die den Vergleich von mitochondrialer Assoziation zwischen zwei Zellregionen erlaubt – unabhängig von und unempfindlich hinsichtlich Ausschnittsgröße, Mitochondriendichte und Mitochondrienmorphologie. Die IDR vereint als Quotient sowohl die die kumulierte Intensitätsdichte der Objekte der mitochondrialen als auch die der als nicht-mitochondrial zugeordneten Objektpopulation, was maßgeblich die geringe Störanfälligkeit dieser Größe ausmacht. Mit der Bestimmung des dimensionslosen IDR-Wertes können sowohl sehr sensitiv kleinste Veränderungen im Translokationsmuster als auch offensichtlich differente Verteilungen zuverlässig erkannt werden.

Die IDR steht nicht in einem linearen Zusammenhang zur Antigenmenge, da viele Faktoren, wie z.B. die Nicht-Linearität zwischen Fluoreszenzintensität und Epitopanzahl, die Nutzung von mehrfach-biotinylierten Sekundärantikörper zur Signalverstärkung und die Nutzung der Weitfeldmikroskopie mit der Konsequenz von extrafokal einwirkender Fluoreszenz den genauen Zusammenhang nur schwierig mathematisch modellierbar beeinflussen.

6.1.3.2 Quotienten zur Bestimmung des Phosphorylierungsgrades

Im Gegensatz zur Feststellung eines Kompartiment-spezifischen Anteils eines Proteins (wie bei der PKC δ -Translokation notwendig, siehe Kapitel 6.1.3.1) konnte im Fall der Phospho-PDH jeweils eine singuläre Größe wie z.B. Signalintensität oder die bloße Fläche des Objektes genutzt werden, da sich das Enzym nicht subzellulär umverteilt und diese Parameter die Phosphoantigenmenge ausreichend widerspiegeln. Zur Vergleichbarkeit verschiedener Bildausschnitte erfolgte die Normierung der Phospho-PDH-Intensität oder –fläche auf die Gesamtfläche der PDH-Signale (der gesamten zweidimensional visualisierbaren Mitochondrienfläche vermutlich entsprechend). Daraus kann der Phosphorylierungsgrad zweier unterschiedlich

behandelten Zellen semiquantitativ vergleichend beurteilt werden. Näheres zur genauen Umsetzung ist in Kapitel 4.5.2 beschrieben.

6.1.4 Luminometrische Messung

Bei den luminometrischen ATP-Messungen spricht die Linearität der Standardkurven für die Validität und Genauigkeit der Messungen. Die absoluten ATP-Konzentrationswerte lassen sich jedoch schlecht zwischen den einzelnen Experimentierdurchgängen miteinander vergleichen, da sie unterschiedlichen Zellkulturen entstammen und die Wachstumsbedingungen durch Unterschiede des Mikromilieus trotz gleich angesetzter Zelldichte nicht exakt gleich sind. Die ATP-Konzentrationen der Lysate aus voneinander unabhängigen Zellkulturen schwankten maximal um den Faktor 10, was eine einfache Mittelwertbildung der Absolutwerte verbieten würde. Vielmehr geht es bei der Darstellung und Interpretation der Werte um die relativen Konzentrationsänderungen zwischen den einzelnen pharmakologischen Testungen und über die Zeit. Daher wurden prozentuale Differenzen zwischen Kontroll- und Versuchsbehandlungen verglichen, sowie Prozentwerte (Regeneration) in Relation zum initialen ATP-Abfall. Um außerdem potentielle Schwankungen der luminometrischen Messungen selbst zu minimieren, wurde ein Lysat auf drei Löcher einer 96-Lochplatte verteilt und mit Luciferase versetzt. Die drei Lumineszenzwerte (technische Replikation) wurden gemittelt, bevor auf die ATP-Konzentration rückgerechnet wurde. Wie in Kapitel 4.6 dargestellt, war die Loch-zu-Loch-Variabilität der Lumineszenzwerte sehr gering. Damit wies die Messung mehrerer aus einem Lysat stammender Löcher eine hohe Reliabilität auf.

6.1.5 Potentielle Störfaktoren und Fehlerquellen

Essentiell ist eine aufmerksame Selbstreflexion zur Erkennung von unbeabsichtigten Fehlern und Eliminierung extrinsischer z.B. dem Versuchsaufbau geschuldeter und prinzipiell minimierbarer Störfaktoren. Da Störfaktoren von der Experimentplanung bis hin zur statistischen Analyse und auch bei Interpretation der Ergebnisse auftreten können, werden einige exemplarisch thematisiert. Die bereits genannte unvollständige Selektivität von Gö6976 bringt eine potentielle Unsicherheit in die Ergebnisse, da noch weitere,

insbesondere nPKC-Isoformen uninhibiert bleiben. So könnten auch diese, genauso wie für die PKC δ postuliert, potentiell translozieren,⁸¹ oder auch Einfluss auf die PDP1 und damit auf die PDH-Aktivität nehmen. Zusätzlich gab es bei der Durchführung der Zeitreihenexperimente für die ATP-Messungen trotz Optimierung des praktischen Versuchsaufbaus eine systematische, zeitliche Latenz von durchschnittlich 18 Sekunden beim Applizieren der experimentellen Inkubationslösungen. Diese Verzögerung ist bei 35-minütiger Gesamtinkubationsdauer weniger relevant als bei einminütiger. Auch das Übertragen der Lysate auf die 96-Loch-Platte und die konsekutive Hinzugabe der Luciferase-haltigen Reaktionslösung in die einzelnen Löcher führte zu zeitlichen Verzögerungen, welche mittels Kühlung auf Eis zu nivellieren versucht wurden. Schlussendlich nahmen auch während der mikroskopischen Aufnahmen physikalische Phänomene wie z.B. chromatische Abberation störenden Einfluss auf die subzelluläre, mitochondriale Kolo-kalisation, sodass auch diese vor der eigentlichen Bildanalyse ausgeglichen werden mussten.

6.1.6 Beantwortung von biochemischen Fragestellungen mit neuroanatomischen Methoden

Die Fragestellungen jenseits des bloßen Nachweises der beteiligten Proteine mittels Immunocytochemie und deren subzellulärer Lokalisation überschreiten das Gebiet der klassischen Neuroanatomie. Sie überschneiden sich mit der Neurobiologie und -Biochemie, in der beispielsweise der Phosphorylierungsgrad von Enzymen klassischerweise mit anderen Methoden wie dem Western Blot-Verfahren untersucht werden würde. In dieser Arbeit wurden biochemische Fragen weitgehend mit morphologischen Methoden beantwortet. Dabei waren die eigens entwickelten (semi)quantitativen Auswertungsalgorithmen für das Bildmaterial von großer Bedeutung, indem sie ermöglichten, aus der Morphologie Rückschlüsse auf biochemische Funktionen zu ziehen (relative Protein-Phosphorylierung, Enzymtranslokation u.a.).

6.2 Die Rolle des mGluR5 bei der Translokation der PKC δ

Zunächst wurden Experimente zur Untersuchung der PKC δ -Translokation mit zweistündiger Inkubationsdauer der Testsubstanzen durchgeführt. Das

Translokationsverhalten der PKC δ über die Zeit hinweg zeigt viele verschiedenartige und komplexe Muster, sodass die Berücksichtigung der Inkubationszeit bei der Interpretation der Ergebnisse essentiell ist. Die PKC δ wird außerdem stimulusabhängig durch verschiedene Enzyme kovalent modifiziert und funktionell moduliert, wodurch v.a. das Zielkompartiment dadurch bestimmt wird – es gibt ganze „Translokationsmuster“.^{81,82} Die Aktivierung der PKC δ durch die Stimulation von mGluR5 wurde in HEK-Zellen 2003 von Uchino et al.⁷⁴ beschrieben, bei der eine Translokation der PKC δ an die Plasmamembran zu beobachten war. Obwohl die Übertragbarkeit auf Astrozyten durch die Unterschiede der zelltypspezifischen Signalome eingeschränkt ist, könnten auch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit eine solche Deutung zulassen. Die Reduktion des mitochondrialen Anteils nach 120-minütiger Glutamatstimulation wird begleitet von einer vermehrt diffusen und punktförmigen Verteilung der PKC δ im immunocytochemischen Bild, welche auf eine membranständige Lokalisation hinweisen könnte. Alternativ ist jedoch zu bedenken, dass dieser beobachtete Effekt bei langandauernder, supraphysiologischer Glutamatkonzentration eventuell bereits Ausdruck einer exzitotoxischen Pathologie sein könnte. Das Phänomen einer PKC δ -Herunterregulation wurde jedoch bereits in Astrozyten und Mikroglia von Slepko et al. beschrieben.⁴⁵ Dabei ließ sich nach einer zehnminütiger Aktivierung der Proteinkinase C mittels Phorbol-12-myristat-13-acetat eine vermehrte Assoziation der PKC δ mit der Zellorganellfraktion nachweisen, die jedoch nach vierstündigen Stimulation deutlich abnahm.⁴⁵ Genaueres zu einem potentiellen Mechanismus dieses Befundes wurde dabei nicht diskutiert. Diese Befunde von Slepko et al.⁴⁵ sprechen gegen die Annahme eines artifiziellen bzw. toxischen Effekts der mehrstündigen Glutamatapplikation in der vorliegenden Arbeit. Vielmehr ist von einem spezifischen Translokationsmuster der PKC δ in Astrozyten auszugehen, das sowohl durch mGluR5- als auch durch direkte PKC-Aktivierung hervorgerufen werden kann.

An der Plasmamembran findet als Folge einer vermehrten PLC-Aktivität (so z.B. in Thrombozyten⁸³) die Aktivierung der PKC δ durch DAG statt. Als G_q-gekoppelter Rezeptor kann mGluR5 diesen Prozess in Gang setzen. Die PKC δ kann darüber hinaus an der Plasmamembran kovalente Modifikationen in Form

von Tyrosinphosphorylierungen erhalten, welche eine adressgebende Funktion⁴² (v.a. an Tyr⁶⁴ und Tyr¹⁵⁵) oder einen aktivierenden Effekt auf die Kinasefunktion⁸³ (v.a. an Tyr³¹¹ und Tyr⁵⁶⁵) innehaben. So erfolgt nach Thrombozytenstimulation mit Thrombin in Thrombozyten nach Tyrosinphosphorylierung eine Translokation der PKC δ zur Zellorganellfraktion, zu der auch die Mitochondrien gehören.⁸⁴ Diese Tyrosinphosphorylierung erfolgt bereits nach 30 Sekunden und erreicht ihr erstes Maximum nach drei Minuten, was mit der verstärkten Assoziation der PKC δ mit der Zellorganellenfraktion zeitlich einhergeht.⁸⁴ In Anlehnung an diese Erkenntnisse in Thrombozyten wurden daher auch in Astrozyten Experimente mit einer Inkubationsdauer der Testsubstanzen von drei Minuten durchgeführt. Murugappan et al. zeigten, dass die für die mitochondriale Translokation notwendige Tyrosinphosphorylierung durch Src-Kinasen, welche membranständig sind,⁸⁵ zustande kommen.⁸⁶ Die Stimulation von mGluR5 stellt einen Ausgangspunkt für die Aktivierung von Src-Kinasen dar. Zum einen können Src-Kinasen calciumabhängig⁸⁷ durch die G_q-Kopplung von mGluR5 aktiviert werden, zum anderen können mGluRs Src-Kinasen auch G-Protein-unabhängig aktivieren.⁸⁸ Sowohl die Aktivität der PLC als auch der Src-Kinasen ist daher für die Aktivierung der PKC δ ⁸⁹ und für die zielgerichtete Translokation zum mitochondrialen Kompartiment relevant (in Thrombozyten durch Murugappan et al. beschrieben⁹⁰). Die alleinige Stimulation von mGluR5 scheint potentiell beide Stimuli für die PKC δ evozieren zu können.

Für die Hypothese einer Src-vermittelten „Adressierung“ der PKC δ wäre die Inhibition der C-terminalen Src-Kinase (Csk) oder der mit ihr verwandten Csk-homologen Kinase (Chk) interessant. Diese sind ubiquitär exprimierte, Src-Kinase-inhibierende Tyrosinkinasen, welche im Hirngewebe und auch in Astrozyten exprimiert werden.^{91,92,93} Durch ihre Inhibition würde die Phosphorylierung der PKC δ an den adressgebenden Tyrosinresten ungebremst weiter erfolgen. Wenn die mitochondriale Lokalisation der PKC δ unter Glutamatstimulation dann jenseits von 120 Minuten erhalten bliebe, spräche das für einen relevanten Einfluss der Src-induzierten Modifikationen der PKC δ auf ihr Translokationsverhalten. In der Literatur ist Tyrphostin 23 als Inhibitor der Csk beschrieben.⁹⁴

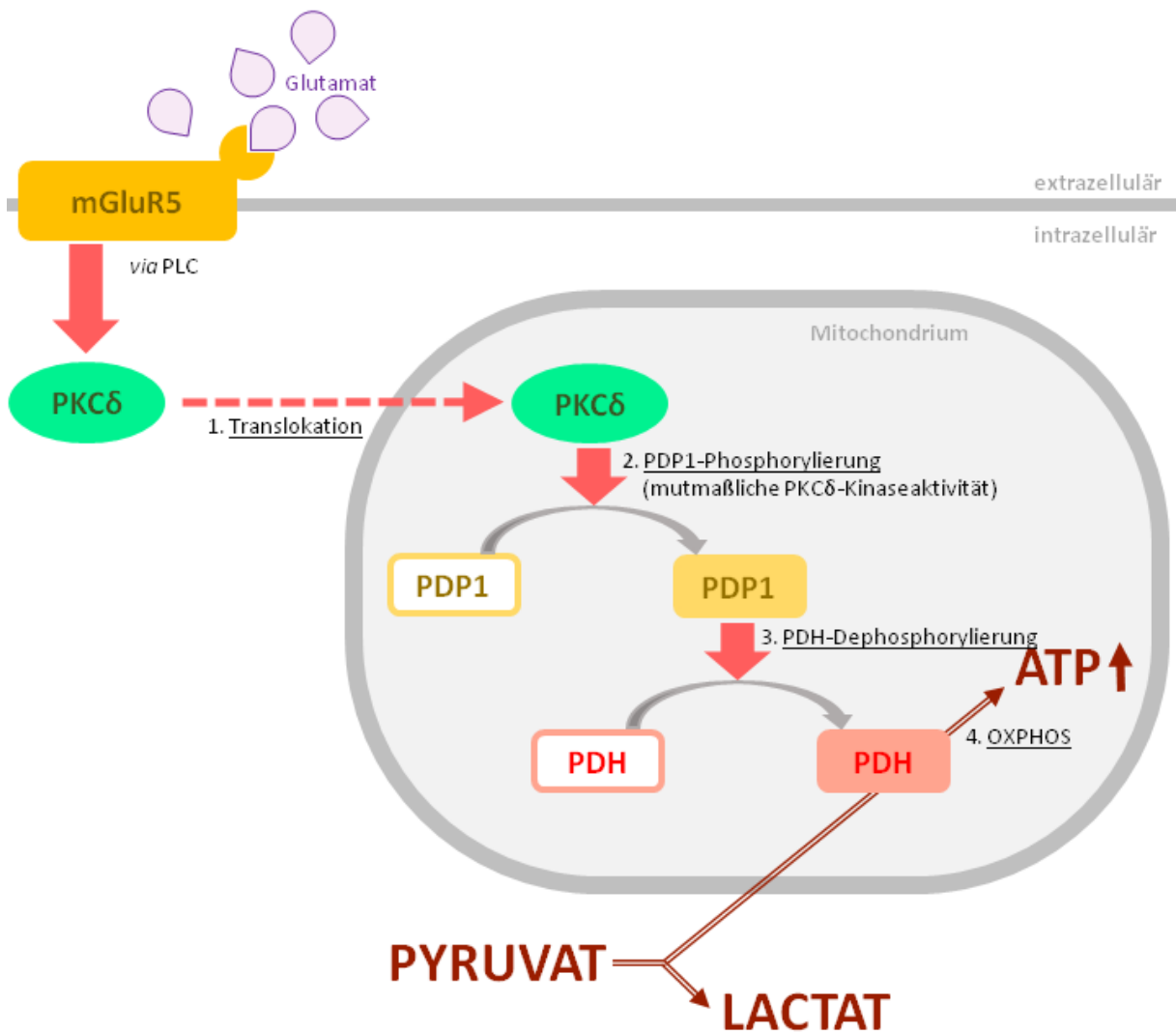


Abbildung 14 – Hypothetischer Pathway des mGluR5/PKCδ/PDH-Signalweges

Darstellung der Signaltransduktionskaskaden ausgehend von mGluR5.

Tatsächlich ließ sich zeigen, dass die Anwendung von Tyrphostin 23 auf Astrozyten *in vitro* mit einem enormen Anstieg des Umsatzes im Citratzyklus verbunden ist.⁹⁵ Insbesondere konnte gezeigt werden, dass die Aktivität der PDH und somit der Substratfluss in den Citratzyklus verstärkt wurde⁹⁵ – jedoch blieb bislang gänzlich ungeklärt, über welchen Mechanismus Tyrphostin 23 letztendlich zur Aktivierung der PDH führen könnte. Die Beobachtung, dass Tyrphostin 23 den mitochondrialen Metabolismus in Astrozyten fördert, steht mit der Annahme im Einklang, dass Astrozyten einen ausgeprägten oxidativen

Energiestoffwechsel betreiben und die Aktivität der Src-Kinase für die mitochondriale Translokation der PKC δ essentiell sein könnte.

6.3 Kausale Verknüpfung zwischen PKC δ -Translokation und PDH-Aktivierung und ihr Beitrag zur mitochondrialen Aktivität

Die Aktivität der Atmungskette bestimmt die Gesamtleistung der Mitochondrien ohne sie zu limitieren.^{96,97} Die Atmungskette verfügt über die notwendige Kapazität, eine durch die PDH-Aktivierung verstärkt anfallende Menge an Reduktionsäquivalenten zu oxidieren. Limitierend ist im Wesentlichen der Zufluss an oxidierbaren Substraten, welcher über die PDH als Stellglied beeinflusst werden kann. Die im obligat aeroben Citratzyklus so vermehrt oxidierten Substrate führen zwangsläufig zur vermehrten Bildung von Reduktionsäquivalenten, die anschließend der Atmungskette zugeführt werden können.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sprechen, wie auch in der Literatur beschrieben, für eine Kausalverknüpfung zwischen PKC δ -Translokation und PDH-Aktivierung in Astrozyten. Zum einen beschreiben Caruso et al.⁴⁴ bereits 2001 in Hepatozyten einen solchen Zusammenhang. Zum anderen zeigen die vorgelegten Ergebnisse, dass der Prozess der PKC δ -Translokation dem der PDH-Dephosphorylierung zeitlich vorausgeht. Diese Reihenfolge ist Voraussetzung für die Annahme einer PKC δ -bedingten PDH-Dephosphorylierung. Erwähnenswert ist, dass sich die beiden Prozesse zeitlich überlappen, da bereits translozierte PKC δ -Moleküle schon PDH-Komplexe über die PDP1 dephosphorylieren können, während andere PKC δ -Moleküle noch nicht transloziert sind. Ein weiteres, potentiellles Stellglied für die Aktivität der PDH wäre außerdem als Gegenspieler der PDP1 die Pyruvatdehydrogenase-Kinase (PDK).⁹⁸ Ihre Isoform PDK2 kommt dabei auch in Astrozyten vor, so auch die PDP1 unter den PDP-Isoformen.⁵⁵ Mechanistisch betrachtet, kann die PDK zumindest in Mitochondrien von Fibroblasten aus Mausembryonen (MEFs) auch von der PKC δ mit dem gleichen Effekt der PDH-Aktivierung angesteuert werden.⁴⁷ In den untersuchten Hepatozyten von Caruso et al.⁴⁴ kann die PDK2

nicht als Zielstruktur von PKC δ identifiziert werden, sodass der PDH-aktivierende Effekt dort hauptsächlich der PDP1-Aktivität zugeschrieben wird.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass es nach mGluR5-Stimulation zur mitochondrialen Translokation der PKC δ kommt (siehe Kapitel 5.4, Diagramm 4, Abbildung 12) sowie zur PDH-Dephosphorylierung (siehe Kapitel 5.5, Diagramm 7, Abbildung 13). Weiterhin konnte die PDP1 als eines der PDH-regulierenden Enzymen und gleichzeitig eine mögliche Zielstruktur der PKC δ (Caruso et al.³⁶), immunocytochemisch in Astrozyten nachgewiesen werden (siehe Abbildung 10). Damit lassen die vorgelegten Befunde vermuten, dass die mGluR5-stimulierte Translokation von PKC δ die PDH-Dephosphorylierung induziert.

Diese Hypothese wird unterstützt durch das hier gezeigte Ausbleiben der PDH-Dephosphorylierung bei Nutzung des δ -Isoform-aussparenden PKC-Inhibitors Gö6976 (Kapitel 5.5, Diagramm 10). Auch wenn die PDP1 in Astrozyten vorliegt, kann die Möglichkeit einer PDH-Regulation in Astrozyten durch PDK nicht ausgeschlossen werden, was durch weitergehende Experimente zu untersuchen ist.

6.4 Überlegungen zur Einordnung der PKC δ /PDH-vermittelten Mitochondrienaktivierung in einen zeitlichen Kontext

Eine Regulation des Energiemetabolismus im Sekunden- oder einstelligen Minutenbereich stellt verglichen mit den schnellen Prozessen auf synaptischer Ebene einen mittelschnellen und mittelfristigen Mechanismus dar. Die Translokation der PKC δ zur Aktivierung von PDH-Komplexen auf einzelnen Mitochondrien könnte außerdem auf das Mikromilieu des perisynaptischen Astrozytenfortsatzes räumlich begrenzt sein. Die peripheren und perisynaptischen Astrozytenfortsätze sind morphologisch typischerweise hoch verzweigt und arm an Zytoplasma. So könnte ausgehend von einem mGluR5-Molekül an einem perisynaptischen Astrozytenfortsatz die ATP-Produktion eben in jenem Fortsatz verstärkt werden (siehe Kapitel 6.5 für Details zur ATP-Produktion vor Ort und Konsequenzen der Regulation innerhalb eines Mikromilieus). Die meisten Funktionen des Gehirns wie z.B. anhaltende

visuelle, auditorische oder sensible Prozessierung, die Generierung von Bewegungsentwürfen oder auch Gedächtniskonsolidierung können eine Aktivierung zahlreicher Areale nicht nur über Millisekunden, sondern über Sekunden und viele Minuten hinweg involvieren. Dass in diesen aktiven Arealen ein veränderter Metabolismus vorliegt, der u.a. durch die neurovaskuläre Kopplung zu lokalen Veränderungen des Blutflusses in diesen Arealen führt, kann sogar methodisch in Form der funktionellen Magnetresonanztomographie (fMRT) genutzt werden.⁹⁹ In den Ergebnissen des Kapitel 5.4 konnte außerdem gezeigt werden, dass sowohl PKC δ -Translokation als auch PDH-Dephosphorylierung sowohl durch tonische als auch durch phasische Inkubation mit Glutamat anhaltend hervorgerufen werden konnten (siehe Diagramm 5). Oft kommt es binnen weniger Millisekunden zum wiederholten Auftreten von Aktionspotentialen an einer Synapse. Die wiederholte Freisetzung von Glutamat führt dabei aufgrund der energieaufwändigen Transportprozesse zu einer Belastung des Energiestoffwechsels in umliegenden Astrozytenfortsätzen. Dieser Belastung könnte wesentlich schneller und effizienter entgegengesteuert werden, wenn die Modifikation der Enzymaktivität der PDH in Form von anhaltender Dephosphorylierung erhalten bliebe, vergleichbar mit den Ergebnissen aus Diagramm 5. Astrozyten könnten dadurch darauf reagieren, dass eine Synapse in der unmittelbaren Umgebung nicht nur einmal, sondern potentiell in absehbar kurzer Zeit wiederholt feuern wird. Andernfalls müsste auch nach jeder kürzer andauernden synaptischen Aktivität die PDH-Aktivität in Astrozyten, beispielsweise zur Bewerkstelligung des Transmittertransportes, gänzlich hoch- und wieder herunterreguliert werden.

Weiterführende Experimente könnten klären, ob ein etwaiger Schwellenwert von synaptischer Glutamatausschüttung existiert, um im Falle vereinzelter, kurz andauernder Synapsenaktivität eine verfrühte Rekrutierung der mitochondrialen Maschinerie zu vermeiden. Ob hinsichtlich der Dauer der Glutamateinwirkung (bzw. Anzahl der aufeinanderfolgenden Aktionspotentiale) ein solcher Schwellenwert besteht, bei dessen Überschreitung der PKC δ /PDH-vermittelte

Mechanismus in Gang gesetzt wird, ist mit den hier genutzten Methoden nicht zu beantworten. Dafür bedürfte es Methoden mit höherer zeitlicher Auflösung.

Die Befunde der ATP-Messungen im zeitlichen Verlauf unterstützen die Hypothese weitgehend, dass bei Belastung durch Glutamat eine anhaltende Aktivierung der PDH der Regeneration von ATP innerhalb weniger Minuten dient (siehe 5.7). Diese Ergebnisse erleichtern es, Wirkungseintritt und -Dauer des PKC δ /PDH-Mechanismus enger einzuordnen.

In Zusammenschau könnte der mGluR5/PKC δ /PDH-vermittelte Signalweg gewissermaßen eine Bereitschaft bieten, um für gliale Stoffwechselprozesse die Deckung des Energiebedarfs in Astrozytenfortsätzen bei Aktivität angrenzender Synapsen (im Rahmen des Modells der dreiteiligen Synapse) zu ermöglichen.

6.5 Transmitter-Glutamat als Substrat des Energiestoffwechsels

Die Befunde dieser Arbeit legen nahe, dass Glutamat nicht nur wie bislang angenommen für die Transmitterregeneration astrozytär aufgenommen wird und teilweise auch als Substrat des Energiemetabolismus in den Citratzyklus eingeschleust werden kann, sondern auch für die lokale und kurzfristige Regulation des Stoffwechsels signalgebende Funktion aufweist. Die im synaptischen Spalt kurzfristig ansteigende Glutamatkonzentration führt nicht nur zur glialen Aufnahme des Glutamats über Transporter (wie z.B. GLAST oder GLT-1) über einen elektrochemischen Gradienten sondern auch zum Andocken des Glutamats an die metabotropen Glutamatrezeptoren (z.B. mGluR5) auf der Astrozytenmembran. Bisher wurde die Signalgebung durch diese Rezeptoren mit der Regulation der Glutamattransporterexpression, der Regulation des lokalen Blutflusses *in vivo* und der Gliotransmission in Verbindung gebracht,¹⁰⁰ nicht jedoch mit dem Energiestoffwechsel.

Die ANLS-Hypothese postuliert, dass Astrozyten auf eine Stimulation mit Glutamat mit einer Ausschüttung von Lactat reagieren, welches u.a. von den umliegenden Neuronen zur Energiegewinnung herangezogen werden kann.^{101,102} Diese Annahme führte dazu, dass über Jahre die oxidative Verstoffwechslungskapazität von Astrozyten nur wenig beachtet wurde. Angezweifelt wurde diese Hypothese jedoch rasch, da sich die Ergebnisse nicht

reproduzieren ließen,¹⁰³ sodass stets (und immer noch) eine große Debatte um die überwiegend vorherrschende Energiegewinnungsmethode der Astrozyten geführt wird. Durch die Arbeiten u.A. von Dienel und Cruz,¹⁰⁴ Dienel,¹⁰⁵ Hertz,¹⁰⁶ McKenna,¹⁰⁷ der Gruppe von Robinson^{33,108}, Lovatt et al.²⁸ und Derouiche et al.⁵⁹ rückte die Fähigkeit der Astrozyten zur oxidativen Energiegewinnung immer weiter in den Fokus der Forschung. Ungefähr 30% des gesamten oxidativen Metabolismus des ZNS *in vivo* findet in Astrozyten statt.^{107,109} Dabei ist nicht nur die Glucose als wichtigstes Substrat des ZNS von großer Relevanz, sondern auch das Glutamat, welches neben seiner Rolle als ubiquitär vorkommender Neurotransmitter für die Astrozyten ein wichtiges Energiesubstrat darstellt.^{109,110} Die Lactatproduktion der Astrozyten ist weitgehend unabhängig von der bereitstehenden Glutamatkonzentration und der daran verknüpften Aufnahme.¹⁰⁵

Bei vermehrter synaptischer Aktivität und damit einhergehend erhöhter Glutamatkonzentration um einen benachbarten Astrozytenfortsatz herum steigt auch der Energiebedarf des Astrozyten. Die an einer Membranregion ankommenden Glutamatmoleküle könnten lokal neben ihrer Funktion als Signalmolekül auch als Energiesubstrat fungieren. Da Glutamat ein effizienteres Verhältnis von Sauerstoffverbrauch und ATP-Ausbeute aufweist als Lactat,¹⁰⁵ scheint es lokal das geeignetere Energiesubstrat für den drastisch höheren ATP-Verbrauch in Belastungssituationen zu sein. Ein Teil des Glutamats wird vermutlich der Umwandlung zu Glutamin hin zugeführt (über die Glutaminsynthetase) und ein anderer Teil in den mitochondrialen Stoffwechsel eingeschleust. Aus Letzterem gewonnenes ATP dient u.a. der Deckung des ATP-Verbrauchs der Glutaminsynthetase sowie der Na⁺-K⁺-ATPase, welche den für den Glutamattransport notwendigen elektrochemischen Gradienten erzeugt. McKenna betitelt dieses Phänomen daher treffend als „*Glutamate pays its own way in astrocytes*“.¹⁰⁷ Die Forschungsgruppe um Robinson zeigte darüber hinaus,^{33,108} dass Glutamattransporter, Glutamatdehydrogenase (welche den essentiellen ersten Schritt zur Einschleusung des Glutamats in den Citratzyklus ermöglicht), glykolytische Enzyme und Mitochondrien in nächster räumlicher Nähe in einem Multiproteinkomplex zu liegen kommen. Naheliegender ist, dass die Existenz eines solchen Komplexes die direkte Zufuhr von Glutamat

in das Mitochondrium hinein erleichtern könnte. Die in Kapitel 5.5 beschriebene PKC δ -abhängige Dephosphorylierung der PDH könnte widerspiegeln, dass sich Glutamat vor Eintritt in Astrozyten mGluR5-vermittelt „ankündigt“. Durch den mGluR5/PKC δ /PDH-Weg könnte gewährleistet werden, dass die notwendigen Enzyme zur Energiegewinnung (inkl. der Glutamatoxidation innerhalb des Citratzyklus) in Bereitschaft versetzt werden.

Die Aktivierung der PDH führt zu einer insgesamt höheren Aktivität des Citratzyklus durch erhöhten Substratzufluss und verbessert damit das Abfließen von akkumuliertem Pyruvat (und auch Lactat) aus der vorgeschalteten Glykolyse. Damit außerdem das Kohlenstoffgerüst des Glutamats vollständig verstoffwechselt werden kann, muss es im Citratzyklus auf Stufe des Malats durch das Malatenzym (oder auf Stufe des Oxalacetats durch die PEPCK) in Pyruvat überführt werden, um dann durch die PDH wieder in den Zyklus eingeschleust zu werden. Erst dadurch werden alle Kohlenstoffatome, die ursprünglich dem Glutamat entstammen, oxidiert (siehe Kapitel 3.3.2). Damit könnte die beobachtete Aktivierung der PDH nicht nur zu einem erhöhten Umsatz von Pyruvat als Energiesubstrat beitragen, sondern ist essentieller Bestandteil der effizienten Verstoffwechslung von Glutamat als Energieträger. Da das Malatenzym neben der PDH ein Schlüsselenzym zur Generierung des vom Glutamat abstammenden Pyruvats darstellt, wäre es durchaus denkbar, dass es auch ein regulatorisches Ziel darstellt, das mGluR(5)/PKC(δ)-vermittelt angesteuert werden könnte. Eine hypothetische, gleichzeitige Aktivierung von Malatenzym und PDH (als in Reihe geschaltete Enzyme eines Stoffwechselweges) würde die vollständige Glutamatoxidation dadurch erheblich beschleunigen.

Bislang gab es keinen gemeinsamen Nenner von ANLS-Hypothese und dem Modell einer oxidativen Stoffwechselkapazität in Astrozyten. Die Existenz eines signifikant zur Energiebedarfsdeckung besteuernden oxidativen Metabolismus in Astrozyten wird von den Autoren der ANLS-Hypothese so vehement abgelehnt, dass selbst in ihren Schemazeichnungen der dreiteiligen Synapse nur die Neuronen, nicht jedoch die Astrozyten mit Mitochondrien versehen sind (siehe z.B. Abbildung 5 aus Pellerin und Magistretti, 1994¹⁰¹). Die hier

aufgestellte Hypothese, dass eine potentielle Aktivierung des oxidativen Metabolismus auch mit einer vermehrten Glutamatoxidation einhergeht, könnte erklären, warum Magistretti et al.¹¹¹ eine vermehrte Lactatproduktion in Astrozyten beobachten konnten. Denn auch das aus Glutamat gebildete Pyruvat kann durch die LDH in Lactat überführt werden. Diese Hypothese wird durch die Ergebnisse der Arbeit von Sonnewald et al.¹¹² weiter unterstützt; die Bildung von Pyruvat (und somit auch wahrscheinlich die konsekutive Bildung von Lactat) in Astrozyten scheint präferentiell aus mitochondrialen Metaboliten über das Malatenzym zu erfolgen.¹¹³ Die Aktivität der PDH ermöglicht damit nicht nur allgemein die Einschleusung von Glucosemetaboliten in den Citratzyklus, sondern auch die Einschleusung von Glutamatmetaboliten. Sie beeinflusst, ob Pyruvat vermehrt zu Lactat oder zu Acetyl-CoA umgesetzt wird. Ein vermehrter Umsatz des vom Glutamat abstammenden Pyruvats zu Acetyl-CoA muss jedoch nicht automatisch mit einer verminderten Lactatproduktion einhergehen, da der Substratzufluss aus der Glykolyse die Lactatproduktion weiter aufrechterhalten kann. Vielmehr handelt es sich bei der Verstoffwechslung von Glutamat gleichermaßen um einen Bonus an Energiesubstraten, wenn temporär einen erhöhter Energiebedarf gedeckt werden muss. Neuere Erkenntnisse gehen außerdem von der Existenz einer sogenannten aeroben Glykolyse aus, bei der trotz ausreichenden Sauerstoffangebots ein Teil des anfallenden Pyruvats zu Lactat verstoffwechselt wird. Auch bei aerober Glykolyse scheint ein beträchtlicher Teil des umgesetzten Pyruvats vom Kohlenstoffgerüst des Glutamats abzustammen.¹¹⁴ Der Anteil des in den Citratzyklus eingebrachten und oxidativ verstoffwechselten Glutamats ist zumindest über den Bereich zwischen 100 und 500 μM abhängig von der zugeführten extrazellulären Glutamatkonzentration.¹¹⁵ Damit einhergehend wäre auch die vom Glutamat abstammende Lactatproduktion abhängig von der extrazellulären Glutamatkonzentration. Der Anteil des Glutamats, welches in die Energiegewinnung mit einbezogen wird, korreliert wahrscheinlich mit den höheren energetischen Anforderungen bei vermehrter Belastung durch mehr extrazelluläres Glutamat. Die mit den hier erhobenen Befunden vorgestellte mGluR5-vermittelte Aktivierung der PDH über die PKC δ scheint einen wichtigen Mechanismus darzustellen, der die

Glutamatoxidation erst vollständig ermöglicht. Insgesamt ist die Wirkung des Glutamats quasi als parakrines Hormon für den astrozytären Stoffwechsel (bzgl. des Effektes auf die PKC δ) vergleichbar mit der Wirkung von Insulin auf Hepatozyten⁴⁴ oder von Thrombin auf Thrombozyten.⁸⁴

Zahlreiche Argumente stützen die Annahme, dass es sich beim extrazellulären Glutamat um einen lokal verfügbares Energiesubstrat für Astrozyten handelt. Die Existenz des zuvor beschriebenen Multiproteinkomplexes ist dafür beispielhaft, der die Aufnahme und Verstoffwechselung räumlich koppelt.^{33,108} Wie vorteilhaft außerdem die vollständige Oxidation von Glutamats (über die Bildung von Pyruvat und dessen Wiedereinschleusung in den Citratzyklus) ist, zeigt die folgende ATP-Bilanzierung.¹⁰⁷ Während die unvollständige Oxidation innerhalb des Citratzyklus eine Bilanz von 6 ATP-Molekülen pro Glutamatmolekül erzielt, steuert die Kombination mit der Wiedereinschleusung von Pyruvat (das aus Glutamat entstammt) weitere 18 ATP-Moleküle bei. Im Gegensatz zu Glucose oder Lactat als ubiquitär vorkommende Metaboliten, ist Glutamat nur auf sehr begrenztem Raum für die begrenzte Zeit synaptischer Aktivität vorhanden, sodass es nur im jeweiligen Mikromilieu seine Wirkungen als Transmitter aber auch als Energiesubstrat ausüben kann. Es scheint naheliegend, dass auch nur selektiv die Mitochondrien im Astrozytenfortsatz an der jeweils zuvor aktiven Synapse in ihrer Aktivität beeinflusst werden. In der Folge wäre es denkbar, dass sich Astrozyten (als hochverzweigte Zellen mit vergleichsweise großem Territorium und morphologischer Differenzierung) subzellulär in zahlreiche lokale Kompartimente aufteilen lassen, die hinsichtlich der Regulation ihres Energiestoffwechsels weitgehend autark sind. Im Gegensatz zu Glutamat können Neuromodulatoren (wie z.B. Noradrenalin) über *volume transmission* wirken, bei der der ganze Astrozyt global beeinflusst werden kann. Glutamat hingegen wirkt nur in einem Mikromilieu im Bereich von Synapsen. Dies würde eine fein abgestimmte Regulation von Substratflüssen und lokaler ATP-Produktion ermöglichen, was ökonomischer als die Anhebung des Umsatzniveaus aller Mitochondrien eines Astrozyten wäre.

6.6 Mögliche medizinische Bedeutung der Ergebnisse

Astrozyten geraten zunehmend in den Fokus der Forschung der Pathophysiologie diverser neurologischer Krankheitsbilder, wie z.B. Epilepsie oder Motoneuronenerkrankungen.¹¹⁶ Astrozytäre Dysfunktion und damit verbunden ein eingeschränkte Transmitterbeseitigung sowie unkontrollierte Schwankungen der extrazellulären Kaliumkonzentration führen zur Hyperexzitabilität von Neuronen, erhöhter Exzitotoxizität und konsequentem Verlust von Nervenzellen. Für die synaptische Homoöstase ist eine adäquate Energiebereitstellung in Astrozyten für die Bewerkstelligung ihrer energieaufwändigen Aufgaben daher essentiell. Beispielsweise kann im Tiermodell der amyotropher Lateralsklerose (ALS) beobachtet werden, dass es trotz mGluR5-Überexpression zur verstärkten Exzitotoxizität kommt, da die Hochregulation der Glutamattransporter ausbleibt und daraus eine verminderte Glutamataufnahme resultiert.^{117,118} Anhand der Befunde der vorliegenden Arbeit ist zusätzlich denkbar, dass durch eine mGluR5-Dysfunktion die oxidative Metabolisierung von Energiesubstraten inkl. Glutamat behindert wird. Dies könnte zu einem intrazellulären Abflusshindernis des Glutamats bis zu einem Rückstau nach extrazellulär führen, was ebenfalls zur gesteigerten Exzitotoxizität und zur inadäquaten intrazellulären Energieversorgung beitragen könnte. Falls sich diese Annahme in weitergehenden Untersuchungen als pathophysiologisch relevant zeigt, würde sie neue, potentielle pharmakologische Zielstrukturen denkbar machen. So könnte man versuchen, die PKC δ , das Malatenzym, die GLDH oder auch mGluR5 sowie damit assoziierte regulatorische Proteine dahingehend zu beeinflussen, dass die oxidative Verstoffwechslung von Glutamat erleichtert wird. Dadurch ließe sich erzielen, dass die Exzitotoxizität gemindert, die Glutamataufnahme beschleunigt und die energetische Bedarfsdeckung der Glia besser gewährleistet wird.

Auch die pathophysiologischen Prozesse bei Ischämie involvieren Gliazellen. Neben dem direkten Einfluss der Ischämie auf Gliazellen selbst ist die veränderte Funktionsfähigkeit der Glia beteiligt an den Folgeerscheinungen der Ischämieeinwirkung auf das ZNS-Gewebe.¹¹⁹ Der Funktionsverlust von

Astrozyten trägt zur Exzitotoxizität bei – gleichzeitig reagieren Astrozyten selbst empfindlich auf erhöhte extrazelluläre Glutamatkonzentrationen, die gliotoxisch wirken.¹²⁰ Als besonders vulnerabel gegenüber ischämieinduzierter Zytotoxizität gelten dabei Astrozyten der weißen Substanz.¹²¹ Es konnte dabei gezeigt werden, dass die Funktion von mGluRs, speziell mGluR5, zytoprotektiv auf Astrozyten wirkt. Dies konnte selbst morphologisch darstellbar in Astrozyten in Gewebekulturen des Nervus opticus von Mäusen gezeigt werden, in der die Stimulation von mGluR5 die ischämieinduzierte Veränderung der Astrozytenmorphologie verhindern konnte.¹²² Auch im Nagetiermodell der periventrikulären Leukomalazie des Frühgeborenen (PVL) erwies sich die Aktivität von mGluR5 als protektiv für die betroffene weiße Substanz.¹²³ Im Lichte der hier vorgelegten Ergebnisse könnte dieser protektive Effekt des mGluR5 womöglich u. a. durch eine gesteigerte metabolische Leistung der astrozytären Mitochondrien zustandekommen, was in der Literatur bislang nicht als potentieller Mechanismus diskutiert wurde. Bislang wurde in Betracht gezogen, dass die Aktivierung von mGluRs vermutlich zu einer Modulation der Astrozytenfunktion führt, welche zum Erhalt der axonalen Funktionalität und der Myelinisierung beiträgt;¹²⁴ außerdem würden die Kalium- und Glutamathomöostase (durch verstärkten Transport) unterstützt.¹²⁵ Weiterhin konnte eine mGluR5-vermittelte, ebenfalls PLC- und PKC-abhängige Verstärkung der Glutamataufnahme über GLT-1 beobachtet werden, die bereits 15 Sekunden nach Stimulation dieses Rezeptors eintritt.¹¹⁷ Diese Beobachtung steht im Einklang mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit hinsichtlich der zeitlichen Größenordnung der Effekte. Auch nach Hochfrequenzstimulation konnte in Astrozyten eine erhöhte Glutamataufnahme in muriner hippocampaler Schnittkultur gezeigt werden.¹²⁵

Nicht nur im Tiermodell der ALS ist mGluR5 überexprimiert, sondern auch im Hirngewebe bei tierexperimenteller Temporallappenepilepsie.¹²⁶ Dabei wirkt hochreguliertes mGluR5 in Astrozyten als positiver Regulator des Glutamattransportes,¹²⁷ welcher kompensatorisch aufgrund der erhöhten Glutamataufnahme bei epileptischer Aktivität gesteigert wird. Astrozytäre Dysfunktion trägt maßgeblich zur Entstehung epileptischer Krampfanfälle bei,¹²⁸ da das anfallende Transmitterglutamat nicht suffizient aufgenommen und

abgebaut werden kann, wodurch es sowohl zur verstärkten Erregung der Synapsen als auch zu einer erhöhten exzitotoxischen Wirkung kommt. Durch die vermehrte Aktivierung des mGluR5 könnte auch hier in Astrozyten der Energiebedarf für einen effizienten Neurotransmitterabbau leichter gedeckt werden. In Mangelsituationen wie z.B. ischämischen Insulten ist ebenfalls eine erhöhte astrozytäre mGluR5-Expression zu beobachten.¹²⁹ Zur pharmakologischen Beeinflussung von mGluR5 im Kontext einer ZNS-Schädigung (bei Ischämie, Trauma etc.) gibt es in der Literatur widersprüchliche Ergebnisse. So führt die intrathekale Applikation von CHPG, einem spezifischen mGluR5-Agonisten, zu einem verbesserten neurologischen Outcome im Rückenmarkskontusions-Modell der Ratte.¹³⁰ Hingegen gibt es auch Arbeiten, die die Antagonisierung von mGluR5 durch z.B. MPEP als neuroprotektiv bewerten. Bao et al. beschreiben, wie im Rattenhirn sowohl der mGluR5-Agonist CHPG als auch Antagonist MPEP einen ähnlich neuroprotektiven Effekt nach Arteria cerebri media-Verschluss-induzierter Ischämie zeigen.¹³¹ Dieses zunächst paradox erscheinende Phänomen ist jedoch dadurch zu erklären, dass der durch MPEP hervorgerufene, neuroprotektive Effekt nicht über seine Wirkung am mGluR5-Rezeptor vermittelt wird. Vielmehr scheint MPEP direkt in den NMDAR-Signalweg inhibitorisch einzugreifen und den darüber vermittelten, exzitotoxischen Effekt abzumildern. Diese Hypothese wird dadurch bestärkt, dass die Applikation von MPEP auch in mGluR5-defizienten Organismen zum selben neuroprotektiven Effekt führt wie in Wildtyp-Tieren.¹³²

Nicht nur bei neurologischen, sondern auch bei psychiatrischen Erkrankungen scheinen Astrozyten und ihr Glutamatstoffwechsel eine wichtige Rolle innezuhaben. Die Schizophrenie ist eine chronische psychische Erkrankung, die bis zu 1% der Bevölkerung betrifft¹³³ und sich außerordentlich einschränkend auf das Leben der Betroffenen auswirken kann. Sie kann mit erheblichen kognitiven Einbußen und sogenannten Positiv- (z.B. Halluzinationen) und Negativsymptomen (z.B. Sprachverarmung) einhergehen. Eine multifaktorielle Pathogenese wird für diese Erkrankung angenommen – neben strukturellen Veränderungen und genetischer Prädisposition stehen Ungleichgewichte verschiedener Neurotransmittersysteme im Fokus der

Forschung. Neben der Dopaminhypothese scheint auch das glutamaterge System involviert zu sein, besonders in Form einer NMDA-Rezeptor-Dysfunktion bzw. –Hypoaktivität.¹³⁴ Eine positive allosterische Modulation des auch in der vorliegenden Arbeit bedeutsamen mGluR5 bewirkt, dass PKC-abhängig die NMDA-Rezeptor-Aktivität potenziert wird.¹³⁵ Die als positive allosterische Modulatoren (PAMs) wirksamen Substanzen weisen eine antipsychotische Wirkung auf, die *in vivo* jedoch nicht auf die bloße Aktivierung des NMDAR zurückzuführen ist.¹³⁶ Daher stellt sich die Frage nach weiteren Mechanismen, die über mGluR5 beeinflusst werden und sich auf die Symptome einer Schizophrenie auswirken könnten. Metabolische Veränderungen, die auch Dysfunktion von Astrozyten miteinschließen, sind Teil der multifaktoriellen Pathogenese der Schizophrenie.¹³⁷ Dabei wurde auch eine verminderte Glutamataufnahme über gliale Glutamattransporter beobachtet, welche zu einer Akkumulation von Glutamat im synaptischen Spalt beitragen könnte.¹³⁸ Auch ein ZNS-spezifisches Abschalten des Gens für die Glutamatdehydrogenase, welche für die Einschleusung des aufgenommenen Glutamats in den Citratzyklus und damit für die mitochondriale Glutamatoxidation essentiell ist, führt im Mausmodell zu einem Schizophrenie-ähnlichen Phänotyp.¹³⁹ Des Weiteren ist bekannt, dass bei Schizophrenie zahlreiche am Citratzyklus und an der oxidativen Phosphorylierung beteiligte Proteine in ihrer Expression und/oder Aktivität alteriert sind.¹⁴⁰ Störungen des astrozytären Glutamat- und Energiestoffwechsels könnten daher eine wichtige Rolle in der Entstehung der Schizophrenie spielen. Die Ergebnisse dieser Arbeit könnten ebenfalls zum Verständnis der antipsychotischen Wirkung von PAMs des mGluR5 beitragen.

6.7 Intrazelluläres ATP in Astrozyten als globaler Marker des Energiestoffwechsels

Um die Relevanz von Glutamat als oxidativ verwertbares Energiesubstrat sowie die mGluR5/PKC δ -vermittelte Modulation der dafür notwendigen Enzyme zu erfassen, ist zur den durchgeführten Experimenten die zeitgleiche Messung einer Markersubstanz notwendig, die das globale Energieniveau einer Zelle widerspiegeln kann. Die Messung von Intermediaten der Glutamatoxidation (z.B. Pyruvat oder α -Ketoglutarat) würde lediglich Aufschluss darüber geben,

wie sich der Anteil der Glutamatoxidation am Substratzufluss in den Citratzyklus verändern würde und dabei auch nicht mögliche andere anaplerotische Zuflüsse aus anderen Stoffwechselwegen berücksichtigen, die möglicherweise durch Glutamatstimulation mitaktiviert werden könnten. ATP ist der universelle Energieträger der Zelle und Resultat der letzten Endstrecke des oxidativen Metabolismus, gleichgültig aus welchem Stoffwechselweg die Reduktionsäquivalente für die oxidative Phosphorylierung stammen. Durch die Messung des intrazellulären ATP-Spiegels ist es daher möglich, eine Aussage über das mitochondriale Aktivitätsniveau einer Zellpopulation zu treffen und die Veränderung dieses Niveaus nach Stimulation mit diversen Substanzen zu quantifizieren.

6.7.1 Dynamik der intrazellulären ATP-Spiegel in Astrozyten

Winkler et al.⁶⁰ zeigten, dass die Stimulation von Astrozyten mit Glutamat *in vitro* zu einer Abnahme des intrazellulären ATP-Spiegels führt. Diese Abnahme konnte dabei sowohl mithilfe eines intrazellulären ATP-Sensorkonstrukts als auch vergleichbar mit einer Luciferase-basierten Methode der ATP-Messung (wie auch in dieser Arbeit verwendet) nach Zellyse gezeigt werden. Der ATP-Abfall erfolgt langanhaltend für die Dauer der Stimulation mit Glutamat und ist vollständig reversibel. Winkler et al.⁶⁰ postulieren, dass sich dabei ein neues Gleichgewicht zwischen ATP-Produktion und -Verbrauch einstellt, welches nicht abhängig von ionotropen Glutamatrezeptoren, sondern abhängig von Glutamattransportern induziert wird. Der ATP-Abfall erreicht sein Minimum dabei binnen 1-2 Minuten, was im zeitlichen Kontext mit den Beobachtungen der vorliegenden Arbeit hinsichtlich der mGluR5/PKC δ -vermittelten Effekte im Einklang steht. Die Stimulation mit Glutamat stellt für Astrozyten gewissermaßen eine Belastungssituation dar. Wie bei synaptischer Aktivität in räumlicher Nähe *in vivo*, zehren dabei stark ATP-verbrauchende Prozesse wie z.B. Glutamataufnahme oder Glutaminsynthese an der vorhandenen ATP-Menge. Um die vermehrte ATP-Ausschöpfung vertretbar machen zu können und das neue Gleichgewicht einstellen zu können, ist eine metabolische Umstellung im Sinne einer kompensatorisch gesteigerten ATP-Produktion naheliegend. Eine PKC δ -vermittelte Aktivierung der PDH und damit des

Citratzyklus könnte ermöglichen, frühzeitig die ATP-Produktion entgegensteuernd zu erhöhen. Zwar sind die Ergebnisse der ATP-Messungen statistisch nicht signifikant, jedoch zeichnet sich eine Tendenz ab, die mit der Hypothese einer kompensatorisch gesteigerten ATP-Produktion im Einklang steht. Die Messwerte unterliegen einer sehr hohen Varianz und es wären mehr Versuchswiederholungen nötig, um verlässliche Signifikanzen zu erzielen. Die Erhöhung der ATP-Produktion durch Glutamat würde eher nicht zu einer Netto-Positivbilanz von neu generiertem ATP oder energiereichen Substraten führen (welche evtl. an Neurone exportiert werden könnten – analog zur ANLS-Hypothese), sondern zur Gegenregulation des erhöhten Verbrauchs.

6.8 Einordnung in das Gesamtkonzept der metabolischen Kopplung von Neuron und Glia und potentielle physiologische Relevanz

Der Energiemetabolismus von Astrozyten kann nicht auf wenige oder gar auf einzelne Mechanismen der Energiegewinnung (z.B. nur aerobe oder nur anaerobe Stoffwechselprozesse) reduziert werden. Genauso existieren nicht nur einzelne Schlüsselenzyme oder Regulationspunkte für ihren Energiestoffwechsel. Der in dieser Arbeit postulierte Signalweg zur Regulation des oxidativen Metabolismus ist keineswegs monokausal verantwortlich für die gesamte oxidative Verstoffwechslungskapazität von Astrozyten, vielmehr handelt sich um ein multifaktorielles Geschehen. Einen Schalter für die globale Aktivierung der Mitochondrien stellt die PKC δ nicht dar, da sehr viele andere Signale den mitochondrialen Metabolismus und auch die untersuchten Enzyme beeinflussen können.

Die ATP-Synthese ist zum Teil zelltypspezifisch (z.B. mGluR5/PKC δ -vermittelt) oder zelltypunspezifisch reguliert (z.B. durch ubiquitär vorkommende Regulation der Atmungskettenkomplexe durch $\text{NAD}^+:\text{NADH}/\text{H}^+$ - oder ATP:ADP-Verhältnisse). Einen quantitativen Anteil der PKC δ an der Regulation der ATP-Synthese zu benennen ist mit den Ergebnissen dieser Arbeit daher nicht möglich.

Astrozyten weisen unabhängig von Glutamatstimulation eine basale mitochondriale Aktivität auf, die einen gewissen ATP-Spiegel im ruhenden Astrozyten aufrechterhält. Die Existenz dieser basalen oxidativen Leistung wird dann ersichtlich, wenn die Atmungskette durch Inhibitoren des Komplex IV stillgelegt wird. So führt die Applikation von Azid-Anionen zu einer Abnahme des Ruhe-ATP-Spiegels in kultivierten Astrozyten.⁶⁰ Von dieser basalen Respiration ausgehend ist das Potential zur Steigerung des mitochondrialen ATP-Synthese gegeben, die für die Bewältigung der zahlreichen und energieaufwändigen Astrozytenfunktionen bedeutend ist. Zwar können Astrozyten auch unter Ausschaltung der oxidativen Energiegewinnung durch glykolytische Prozesse im Ruhezustand weiterleben,²⁵ jedoch kann die Glykolyse allein bei Belastung (z.B. durch benachbarte synaptische Aktivität) das Gleichgewicht aus ATP-Verbrauch und Bildung (stöchiometrisch betrachtet) nicht ausreichend gewährleisten.¹⁰⁵ Dabei wird den Astrozyten jegliche Bedeutung einer mitochondrialen Funktion abgesprochen, obwohl lediglich die zytomorphologische Intaktheit der Zellen zur Beurteilung des Überlebens berücksichtigt wurde.²⁵

Dementgegen wird beschrieben, dass ca. 20% (und sogar abhängig von der zur Verfügung stehenden Konzentration ca. zwischen 15 und 40%) der aufgenommenen Glutamatmoleküle der oxidativen Verstoffwechslung zur ATP-Gewinnung zugeführt werden.¹¹⁵ Diese Glutamatoxidation wird vermutlich durch die Aktivierung des hier gezeigten mGluR5/PKC δ -Signalwegs begünstigt, wodurch eine kompensatorische Steigerung der ATP-Synthese bei erhöhtem ATP-Verbrauch ermöglicht wird. Denkbar ist, dass Glutamat daher möglicherweise seine eigene oxidative Verstoffwechslung bahnen könnte. Wie in Kapitel 5.7 (Diagramm 13 und Diagramm 14) ersichtlich wird, könnte die Intaktheit des mGluR5/PKC δ -Signalwegs essentiell für die Regeneration der intrazellulären ATP-Spiegel sein. Eine rein anaerobe Energiegewinnung scheint im Widerspruch zum gemessenen Sauerstoffverbrauch, zur Stöchiometrie der Energieäquivalente und zu den umgesetzten Substratmengen in Astrozyten zu stehen.¹⁰⁵

In der Literatur wird von einer niedrigen Citratzyklus-Aktivität in Astrozyten ausgegangen, da die PDH hochgradig phosphoryliert und damit inaktiv vorliege,¹¹¹ sodass präferentiell Lactat gebildet würde. Der Befund des hohen Phosphorylierungsgrades (vorwiegend durch die hohe Aktivität der PDK4¹⁴¹) wurde auch in Abbildung 13 beobachtet, jedoch im Ruhezustand ohne Stimulation durch Glutamat. Phosphorylierungen stellen keine irreversiblen Modifikationen dar, sondern bieten vielmehr die Möglichkeit zur raschen und flexiblen Regulation. In das Konzept der ANLS-Hypothese hineinpassend beschreiben Mongeon et al. 2016, dass in Astrozyten ein hohes NADH/H⁺:NAD⁺-Verhältnis vorliegt, sodass in dieser Konstellation Pyruvat vermehrt zu Lactat abgebaut werden würde¹⁴² – die Quelle der Mengen an reduziertem NADH/H⁺ bleibt jedoch unbenannt. Für die NADH/H⁺-Bildung ist die PDH-Aktivität essentiell, die den Citratzyklus mit oxidierbaren Kohlenstoffgerüsten speist.¹⁰⁷ Daher lässt sich die Beobachtung eines hohen NADH/H⁺:NAD⁺-Verhältnisses auch gut mit der hier aufgestellten Hypothese eines Glutamat-regulierten oxidativen Metabolismus in Astrozyten vereinbaren, da bei der Glutamatoxidation ebenfalls große Mengen NADH/H⁺ gebildet würden.

Der basale Sauerstoffverbrauch in Astrozyten liegt unter den Kulturbedingungen von Juaristi et al. bei $4,8 \pm 0,5$ nmol O₂/min/mg Protein.¹⁴³ Damit wird in Astrozyten auch unter Ruhebedingungen eine oxidative Verstoffwechslungskapazität beobachtet, die ausgehend von diesem Niveau gesteigert werden kann. Glutamat (200 µM) erhöht den Sauerstoffverbrauch innerhalb der ersten Minuten auf über 150% des basalen Niveaus,¹⁴³ was die Annahme unterstützt, dass die Aufnahme und Weiterverarbeitung des Glutamats eine Belastung darstellt, die kompensiert werden muss. Juaristi et al.¹⁴³ schlussfolgern, dass Glutamat tatsächlich zwar calciumunabhängig zu einer Steigerung des Sauerstoffverbrauchs führe, jedoch eine solche Wirkung nicht über mGluRs entfaltet werde. Diese beobachtete Unabhängigkeit von Calciumionen¹⁴³ steht im Einklang mit der hier postulierten PKCδ-abhängigen PDH-Aktivierung, da die Aktivierung der PKCδ als nPKC ebenfalls calciumunabhängig erfolgt. Eriksson et al.¹⁴⁴ berichteten bereits 1995, dass die Applikation von 100 µM Glutamat den Sauerstoffverbrauch von kultivierten

Astrozyten innerhalb von 30 Sekunden um über 50% steigert. Unter Nutzung von NMDA- und AMPA-Rezeptor-Antagonisten kommen sie zu dem Schluss, dass ionotrope Glutamatrezeptoren an dieser Beobachtung nicht beteiligt zu sein scheinen. Da der mGluR-Agonist ACPD jedoch auch nicht den Effekt von Glutamat auslöste, schlussfolgerten sie ebenfalls, dass mGluRs ebenfalls nicht beteiligt seien.¹⁴⁴ Unberücksichtigt blieb, dass die Verstärkung des oxidativen Metabolismus wahrscheinlich nicht nur von der signalgebenden Wirkung von Glutamat an einem membranständigen Rezeptor, sondern auch von ihrer Funktion als oxidierbares Substrat, abhängig sein könnte. Letzteres ist bei der Nutzung von ACPD nicht gegeben, da es nicht wie Glutamat intrazellulär zur Energiegewinnung herangezogen werden kann.

Prinzipiell lässt sich die Hypothese einer mittelfristigen metabolischen Regulation im Bereich von Hunderten von Millisekunden bis hin zu einigen Minuten, wie sie in der vorliegenden Arbeit diskutiert wurde, gut mit den Begebenheiten im Modell der dreiteiligen Synapse vereinbaren. So lassen sich dort auch andere Mechanismen (z.B. Gliotransmission) nicht mit der Transmission durch neuronale Synapsen vergleichen, da sie in viel langsameren zeitlichen Dimensionen ablaufen.¹⁴⁵ Astrozyten ist durch ihre Vernetzung über *gap junctions* eine räumlich weitreichende Signaltransduktion möglich. Der Eintritt eines Gesamteffekts ist durch die Diffusion der Signalmoleküle zeitlich limitiert. Da der mGluR5-vermittelte Effekt der PKC δ jedoch vorrangig lokal von Bedeutung sein könnte, um innerhalb eines Mikromilieus durch die Aktivierung von Mitochondrien ATP bereitzustellen, wäre eine etwaige zeitliche Verzögerung durch größere Diffusionsstrecken nicht relevant für die Energieversorgung an der Synapse. Optimiert würde eine solche lokale Energieversorgung durch das Positionieren von Mitochondrien an Glutamattransportern.¹⁴⁶

6.9 Ausblick

Der jahrzehntelang untererforschte und irrtümlich als vernachlässigbar dargestellte Beitrag von Astrozyten zur Funktionsfähigkeit des Gehirns hinterließ bislang große Lücken im Verständnis von Gliazellen. Die Ergebnisse

dieser Arbeit helfen, den komplexen astrozytären Energiemetabolismus und auch die Rolle der Astrozyten im Gefüge des ZNS besser zu verstehen. Weitergehende Untersuchungen mit anderen Methoden sind jedoch zur Überprüfung der Validität der Hypothese einer PKC δ -vermittelten PDH-Aktivierung unabdingbar. So wäre z.B. eine entscheidende Untersuchung, die Translokation der PKC δ nicht nur in Form von Schnappschüssen zu einzelnen Zeitpunkten, sondern auch während ihres Ablaufs an lebenden Zellen mittels *Live-Cell-Imaging* zu beobachten. Darüber hinaus wären *in vivo*-Experimente notwendig, um eine physiologische Bedeutung des mGluR5/PKC δ -Signalwegs für das Gehirn zu überprüfen. So wäre besonders interessant, ob die Ausbildung eines pathologischen Phänotyps bei PKC δ -Defizienz hinsichtlich Motorik, Sinneswahrnehmung und/oder behavioraler/kognitiver Prozesse eintritt. Zu erwarten wäre dabei durch die beeinträchtigte Bereitstellung von Energieäquivalenten bei vermehrter Beanspruchung z.B. ein verringerter und qualitativ schlechterer Abtransport von Neurotransmittern aus dem synaptischen Spalt und damit eine erhöhte Neigung zu exzitotoxischen Auswirkungen. Sollte sich eine derartige phänotypische Auswirkung bestätigen, könnte der mGluR5/PKC δ -Signalweg wahrscheinlich auch von großer pathophysiologischer Relevanz bei diversen neurodegenerativen Erkrankungen sein. Gleichzeitig würden sich neue potentielle pharmakologische Zielstrukturen mit potentiell klinisch-therapeutischer Relevanz ergeben, um den Energiemetabolismus in Astrozyten bei eingetretenen Störungen zu unterstützen. Dies könnte ermöglichen, dass Astrozyten wieder besser ihre essentiellen Aufgaben zur Gewährleistung der Homoöstatie im ZNS und der Funktionsfähigkeit der Neurone wahrnehmen können. Grundlage für die Entwicklung solcher Therapien aus pathophysiologischen Modellen ist zunächst das genaue Verständnis der physiologischen Prozesse. Die Ergebnisse dieser Arbeit könnten erklären, wie es Astrozyten gelingt, ihre außerordentlich wichtigen Aufgaben am Ort und zum Zeitpunkt des Bedarfes zu erfüllen und dies auch energietechnisch zu bewältigen.

7 Verzeichnis der Abbildungen, Tabellen und Diagramme

Abbildung 1 – Die dreiteilige Synapse, bestehend aus Präsynapse, Postsynapse und Astrozytenfortsatz	14
Abbildung 2 – Hauptstoffwechselfade des Glutamats in Astrozyten.....	17
Abbildung 3 – Ermittlung des unteren Schwellwertes für die Objektdefinition ..	33
Abbildung 4 – Auswahl eines gut zu analysierenden Bildausschnitts.....	36
Abbildung 5 – Mikroskopische Darstellung der Objektpopulation 5.....	36
Abbildung 6 – Mikroskopische Darstellung der Objektpopulationen zur Identifikation der definitiv mitochondrialen und nicht-mitochondrialen PKC δ -Signale	37
Abbildung 7 – Morphologisch ähnlich auf Mitochondrien verteilte PKC δ in zwei verschiedenen Zellen	40
Abbildung 8 – Morphologisch sehr verschiedenartig auf Mitochondrien verteilte PKC δ in zwei verschiedenen Zellen	41
Abbildung 9 – Unterschiedliche Phosphorylierungsgrade der PDH auf Mitochondrien zweier unterschiedlich behandelter Astrozyten	44
Abbildung 10 – Vorkommen der PDP1 in Astrozyten <i>in vitro</i> und <i>in situ</i>	48
Abbildung 11 – Darstellung der PKC δ <i>in situ</i>	51
Abbildung 12 – Subzelluläre Lokalisation der PKC δ nach Glutamatstimulation	61
Abbildung 13 – Unterschiedliche Phosphorylierungsgrade der PDH auf Mitochondrien zweier unterschiedlich behandelter Astrozyten (2).....	64
Abbildung 14 – Hypothetischer Pathway des mGluR5/PKC δ /PDH-Signalweges	81
Diagramm 1 – Eigenschaften der PKC δ -Immunfluoreszenz in Astrozyten <i>in vitro</i>	49
Diagramm 2 – Substanztestung über 120 Minuten und PKC δ -Lokalisation	54
Diagramm 3 – Behandlung mit mGluR-Agonisten und Antagonisten über 120 Minuten und PKC δ -Lokalisation	55
Diagramm 4 – mGluR5-abhängige mitochondriale PKC δ -Translokation und der Einfluss der Inkubationszeit.....	56

Diagramm 5 – Darstellung der mitochondrialen PKC δ -Translokation abhängig vom Inkubationsmodus	58
Diagramm 6 – Darstellung der mitochondrialen PKC δ -Translokation im Sekundenbereich	59
Diagramm 7 – mGluR5-vermittelte Dephosphorylierung der PDH	60
Diagramm 8 – Darstellung der PDH-Dephosphorylierung im Sekundenbereich	63
Diagramm 9 – Zeitliche Abfolge der Phasen von PKC δ -Translokation und PDH-Dephosphorylierung	65
Diagramm 10 – Die PDH-Dephosphorylierung ist abhängig von der Kinasefunktion der PKC δ	67
Diagramm 11 – Gö6983 hat keinen Einfluss auf die Translokationsfähigkeit der PKC δ	68
Diagramm 12 – ATP-Spiegel nach 1 Minute metabolischer Belastung durch Glutamat.....	70
Diagramm 13 – ATP-Regeneration nach 35-minütiger Inkubation mit mGluR5- und PKC-Inhibitoren	71
Diagramm 14 – Zeitlicher Verlauf der ATP-Konzentrationen unter Glutamatstimulation mit mGluR5- und PKC-Inhibitoren	72
Tabelle 1 – Genutzte Antikörper.....	29

8 Abkürzungsverzeichnis

α -KGDH	α -Ketoglutaratdehydrogenase
(c-)Abl	Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1
(m)RNA	Messenger ribonucleic acid
ACM	Astrocyte conditioned medium
ACPD	1-Amino-1,3-dicarboxycyclopentane
ADP	Adenosindiphosphat
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
AMPA	α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid
ANLS(H)	Astrocyte-Neuron-Lactatshuttle (-Hypothese)
ATP	Adenosintriphosphat
Bax	Bcl2-assoziiertes X-Protein
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
cAMP	Cyclic adenosine monophosphate
Chk2	Csk-homologe Kinase
CHPG	Chlorohydroxyphenylglycin
(Acetyl-)CoA	(Acetyl-)Coenzym A
COX(IV)	Cytochrom-c-Oxidase (Untereinheit IV)
Csk	C-terminale Src-Kinase
DAG	Diacylglycerin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
FKS	Fetales Kälberserum
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer
G76	Gö6976
G83	Gö6983
GABA	γ -Aminobuttersäure
gcl	Körnerzellschicht
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
GLAST	Glutamat-Aspartat-Transporter
GLDH	Glutamatdehydrogenase

Gln	Glutamin
GLT(1)	Glutamattransporter (1)
Glu	Glutamat
GS	Glutaminsynthetase
HEK	Human embryonic kidney cells
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
hil	Hilusregion des Gyrus dentatus
IC ₅₀	Mittlere inhibitorische Konzentration
ID	Intensity density
IDR	Intensity density ratio
Kir(4.1)	Inwardly rectifying potassium channel (4.1)
Lck	Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase
LDH	Laktatdehydrogenase
MCPG	α -Methyl-4-Carboxyphenylglycin
MEF	Murine embryonic fibroblast
MEM	Minimal Essential Medium
mGluR(5)	Metabotroper Glutamatrezeptor (5)
ml	Molekularschicht (Hippocampus)
MPEP	2-Methyl-6-(phenylethynyl)pyridine
n.A.	Numerische Apertur
NAD ⁺	Nicotinamidadenindinucleotid
NADP ⁺	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat
NGS	Normal goat serum
NHS	Normal horse serum
NMDA(R)	N-Methyl-D-Aspartat (-Rezeptor)
OXPPOS	Oxidative Phosphorylierung
p66Shc	p66-Src homology 2 domain containing
PAM	Positiver allosterischer Modulator
PB	Phosphatpuffer
pcl	Pyramidalzellschicht (Hippocampus)
PDC	Pyruvate dehydrogenase complex
PDH	Pyruvatdehydrogenase
p-	Phospho-Ser ²⁹³ -

PDK(1)	Pyruvatdehydrogenase-Kinase (1)
PDP(1)	Pyruvatdehydrogenase-Phosphatase (1)
PEPCK	Phosphoenolpyruvatcarboxykinase
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PKA	Proteinkinase A
PKC(δ)	Proteinkinase C(δ)
c-	classical
n-	novel
a-	atypical
PLC	Phospholipase C
PLL	Poly-L-Lysin
PVL	Periventrikuläre Leukomalazie
QO ₂	Cell-specific oxygen consumption rate
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Revolutions per minute
Ser	Serin
sor	Stratum oriens
srad	Stratum radiatum
Src	<i>Sarcoma</i> -Tyrosinkinase
TCA	Tricarboxylic acid
Thr	Threonin
TNFα	Tumornekrosefaktor α
Tyr	Tyrosin
ZNS	Zentrales Nervensystem

9 Literaturverzeichnis

1. Herculano-Houzel S. The glia/neuron ratio: how it varies uniformly across brain structures and species and what that means for brain physiology and evolution. *Glia*. 2014;62(9):1377-91.
2. Galileo DS, Gray GE, Owens GC, Majors J, Sanes JR. Neurons and glia arise from a common progenitor in chicken optic tectum: demonstration with two retroviruses and cell type-specific antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87(1):458-62.
3. Oberheim NA, Wang X, Goldman S, Nedergaard M. Astrocytic complexity distinguishes the human brain. *Trends Neurosci*. 2006;29(10):547-53.
4. Bushong EA, Martone ME, Jones YZ, Ellisman MH. Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains. *J Neurosci*. 2002;22(1):183-92.
5. Halassa MM, Fellin T, Takano H, Dong JH, Haydon PG. Synaptic islands defined by the territory of a single astrocyte. *J Neurosci*. 2007;27(24):6473-7.
6. Oberheim NA, Takano T, Han X, et al. Uniquely hominid features of adult human astrocytes. *J Neurosci*. 2009;29(10):3276-87.
7. Han X, Chen M, Wang F, et al. Forebrain engraftment by human glial progenitor cells enhances synaptic plasticity and learning in adult mice. *Cell Stem Cell*. 2013;12(3):342-53.
8. Reichenbach A WH. Astrocytes and ependymal glia. In: Kettenmann H RB, ed. *Neuroglia*. 2005:19-35.
9. Mayorquin LC, Rodriguez AV, Sutachan JJ, Albarracin SL. Connexin-Mediated Functional and Metabolic Coupling Between Astrocytes and Neurons. *Front Mol Neurosci*. 2018;11:118.
10. Hamilton NB, Attwell D. Do astrocytes really exocytose neurotransmitters? *Nat Rev Neurosci*. 2010;11(4):227-38.
11. Parpura V, Basarsky TA, Liu F, Jęftinija K, Jęftinija S, Haydon PG. Glutamate-mediated astrocyte-neuron signalling. *Nature*. 1994;369(6483):744-7.

12. Savtchouk I, Volterra A. Gliotransmission: Beyond Black-and-White. *J Neurosci*. 2018;38(1):14-25.
13. Abbott NJ, Ronnback L, Hansson E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci*. 2006;7(1):41-53.
14. Heithoff BP, George KK, Phares AN, Zuidhoek IA, Munoz-Ballester C, Robel S. Astrocytes are necessary for blood-brain barrier maintenance in the adult mouse brain. *Glia*. 2021;69(2):436-472.
15. MacVicar BA, Newman EA. Astrocyte regulation of blood flow in the brain. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2015;7(5)
16. Filosa JA, Bonev AD, Straub SV, et al. Local potassium signaling couples neuronal activity to vasodilation in the brain. *Nat Neurosci*. 2006;9(11):1397-1403.
17. Girouard H, Bonev AD, Hannah RM, Meredith A, Aldrich RW, Nelson MT. Astrocytic endfoot Ca²⁺ and BK channels determine both arteriolar dilation and constriction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(8):3811-6.
18. Newman EA. Regional specialization of retinal glial cell membrane. *Nature*. 1984;309(5964):155-7.
19. Brown AM, Ransom BR. Astrocyte glycogen and brain energy metabolism. *Glia*. 2007;55(12):1263-71.
20. Perez-Alvarez A, Araque A. Astrocyte-neuron interaction at tripartite synapses. *Curr Drug Targets*. 2013;14(11):1220-4.
21. Perea G, Navarrete M, Araque A. Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends Neurosci*. 2009;32(8):421-31.
22. Panatier A, Robitaille R. Astrocytic mGluR5 and the tripartite synapse. *Neuroscience*. 2016;323:29-34.
23. Halassa MM, Fellin T, Haydon PG. The tripartite synapse: roles for gliotransmission in health and disease. *Trends Mol Med*. 2007;13(2):54-63.
24. Peters A, Palay SL, Palay SL, et al. *The Fine Structure of the Nervous System: Neurons and Their Supporting Cells*. Oxford University Press; 1991.
25. Supplie LM, Duking T, Campbell G, et al. Respiration-Deficient Astrocytes Survive As Glycolytic Cells In Vivo. *J Neurosci*. 2017;37(16):4231-4242.

26. Voloboueva LA, Suh SW, Swanson RA, Giffard RG. Inhibition of mitochondrial function in astrocytes: implications for neuroprotection. *J Neurochem*. 2007;102(4):1383-94.
27. Rose J, Brian C, Pappa A, Panayiotidis MI, Franco R. Mitochondrial Metabolism in Astrocytes Regulates Brain Bioenergetics, Neurotransmission and Redox Balance. *Front Neurosci*. 2020;14:536682.
28. Lovatt D, Sonnewald U, Waagepetersen HS, et al. The transcriptome and metabolic gene signature of protoplasmic astrocytes in the adult murine cortex. *J Neurosci*. 2007;27(45):12255-66.
29. Schousboe A, Scafidi S, Bak LK, Waagepetersen HS, McKenna MC. Glutamate metabolism in the brain focusing on astrocytes. *Adv Neurobiol*. 2014;11:13-30.
30. Cotman CW, Foster A, Lanthorn T. An overview of glutamate as a neurotransmitter. *Adv Biochem Psychopharmacol*. 1981;27:1-27.
31. Öz G, Okar DA, Henry P-G. Glutamate-Glutamine Cycle and Anaplerosis. In: Choi I-Y, Gruetter R, eds. *Neural Metabolism In Vivo*. Springer US; 2012:921-946.
32. McKenna M DG, Sonnewald U, Waagepetersen HS, Schousboe A. Energy metabolism of the brain. In: Brady ST SG, Albers RW, Price DI, ed. *Basic Neurochemistry*. Academic Press, Elsevier; 2012:200-231.
33. Genda EN, Jackson JG, Sheldon AL, et al. Co-compartmentalization of the astroglial glutamate transporter, GLT-1, with glycolytic enzymes and mitochondria. *J Neurosci*. 2011;31(50):18275-88.
34. Yu AC, Schousboe A, Hertz L. Metabolic fate of ¹⁴C-labeled glutamate in astrocytes in primary cultures. *J Neurochem*. 1982;39(4):954-60.
35. Tanaka C, Nishizuka Y. The protein kinase C family for neuronal signaling. *Annu Rev Neurosci*. 1994;17:551-67.
36. Newton AC. Protein kinase C: structure, function, and regulation. *J Biol Chem*. 1995;270(48):28495-8.
37. Steinberg SF. Distinctive activation mechanisms and functions for protein kinase Cdelta. *Biochem J*. 2004;384(Pt 3):449-59.
38. Steinberg SF. Structural basis of protein kinase C isoform function. *Physiol Rev*. 2008;88(4):1341-78.

39. Ono Y, Fujii T, Ogita K, Kikkawa U, Igarashi K, Nishizuka Y. The structure, expression, and properties of additional members of the protein kinase C family. *J Biol Chem*. 1988;263(14):6927-32.
40. Ono Y, Fujii T, Ogita K, Kikkawa U, Igarashi K, Nishizuka Y. Protein kinase C zeta subspecies from rat brain: its structure, expression, and properties. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989;86(9):3099-103.
41. Codazzi F, Teruel MN, Meyer T. Control of astrocyte Ca(2+) oscillations and waves by oscillating translocation and activation of protein kinase C. *Curr Biol*. 2001;11(14):1089-97.
42. Humphries MJ, Ohm AM, Schaack J, Adwan TS, Reyland ME. Tyrosine phosphorylation regulates nuclear translocation of PKCdelta. *Oncogene*. 2008;27(21):3045-53.
43. Majumder PK, Pandey P, Sun X, et al. Mitochondrial translocation of protein kinase C delta in phorbol ester-induced cytochrome c release and apoptosis. *J Biol Chem*. 2000;275(29):21793-6.
44. Caruso M, Maitan MA, Bifulco G, et al. Activation and mitochondrial translocation of protein kinase Cdelta are necessary for insulin stimulation of pyruvate dehydrogenase complex activity in muscle and liver cells. *J Biol Chem*. 2001;276(48):45088-97.
45. Slepko N, Patrizio M, Levi G. Expression and translocation of protein kinase C isoforms in rat microglial and astroglial cultures. *J Neurosci Res*. 1999;57(1):33-8.
46. Brodie C, Bogi K, Acs P, Lorenzo PS, Baskin L, Blumberg PM. Protein kinase C delta (PKCdelta) inhibits the expression of glutamine synthetase in glial cells via the PKCdelta regulatory domain and its tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem*. 1998;273(46):30713-8.
47. Acin-Perez R, Hoyos B, Gong J, et al. Regulation of intermediary metabolism by the PKCdelta signalosome in mitochondria. *FASEB J*. 2010;24(12):5033-42.
48. Hammerling U. Vitamin A as PKC Co-factor and Regulator of Mitochondrial Energetics. *Subcell Biochem*. 2016;81:201-230.

49. Wetsel WC, Khan WA, Merchenthaler I, et al. Tissue and cellular distribution of the extended family of protein kinase C isoenzymes. *J Cell Biol.* 1992;117(1):121-33.
50. Chen S, Hillman DE. Immunohistochemical localization of protein kinase C delta during postnatal development of the cerebellum. *Brain Res Dev Brain Res.* 1994;80(1-2):19-25.
51. Asotra K, Macklin WB. Developmental expression of protein kinase C isozymes in oligodendrocytes and their differential modulation by 4 beta-phorbol-12,13-dibutyrate. *J Neurosci Res.* 1994;39(3):273-89.
52. Yang Q, Langston JC, Tang Y, Kiani MF, Kilpatrick LE. The Role of Tyrosine Phosphorylation of Protein Kinase C Delta in Infection and Inflammation. *Int J Mol Sci.* 2019;20(6)
53. Patel MS, Nemeria NS, Furey W, Jordan F. The pyruvate dehydrogenase complexes: structure-based function and regulation. *J Biol Chem.* 2014;289(24):16615-23.
54. Rardin MJ, Wiley SE, Naviaux RK, Murphy AN, Dixon JE. Monitoring phosphorylation of the pyruvate dehydrogenase complex. *Anal Biochem.* 2009;389(2):157-64.
55. Halim ND, McFate T, Mohyeldin A, et al. Phosphorylation status of pyruvate dehydrogenase distinguishes metabolic phenotypes of cultured rat brain astrocytes and neurons. *Glia.* 2010;58(10):1168-76.
56. Karpova T, Danchuk S, Kolobova E, Popov KM. Characterization of the isozymes of pyruvate dehydrogenase phosphatase: implications for the regulation of pyruvate dehydrogenase activity. *Biochim Biophys Acta.* 2003;1652(2):126-35.
57. Yeaman SJ, Hutcheson ET, Roche TE, et al. Sites of phosphorylation on pyruvate dehydrogenase from bovine kidney and heart. *Biochemistry.* 1978;17(12):2364-70.
58. Patel MS, Korotchkina LG. Regulation of the pyruvate dehydrogenase complex. *Biochem Soc Trans.* 2006;34(Pt 2):217-22.
59. Derouiche A, Haseleu J, Korf HW. Fine Astrocyte Processes Contain Very Small Mitochondria: Glial Oxidative Capability May Fuel Transmitter Metabolism. *Neurochem Res.* 2015;40(12):2402-13.

60. Winkler U, Seim P, Enzbrenner Y, Kohler S, Sicker M, Hirrlinger J. Activity-dependent modulation of intracellular ATP in cultured cortical astrocytes. *J Neurosci Res.* 2017;95(11):2172-2181.
61. McCarthy KD, de Vellis J. Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue. *J Cell Biol.* 1980;85(3):890-902.
62. Schoepp DD, Jane DE, Monn JA. Pharmacological agents acting at subtypes of metabotropic glutamate receptors. *Neuropharmacology.* 1999;38(10):1431-76.
63. Conn PJ, Pin JP. Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1997;37:205-37.
64. Manzoni OJ, Weisskopf MG, Nicoll RA. MCPG antagonizes metabotropic glutamate receptors but not long-term potentiation in the hippocampus. *Eur J Neurosci.* 1994;6(6):1050-4.
65. Martiny-Baron G, Kazanietz MG, Mischak H, et al. Selective inhibition of protein kinase C isozymes by the indolocarbazole Go 6976. *J Biol Chem.* 1993;268(13):9194-7.
66. Gschwendt M, Dieterich S, Rennecke J, Kittstein W, Mueller HJ, Johannes FJ. Inhibition of protein kinase C mu by various inhibitors. Differentiation from protein kinase c isoenzymes. *FEBS Lett.* 1996;392(2):77-80.
67. Yuan C, Gao J, Guo J, et al. Dimethyl sulfoxide damages mitochondrial integrity and membrane potential in cultured astrocytes. *PLoS One.* 2014;9(9):e107447.
68. Zhang C, Deng Y, Dai H, et al. Effects of dimethyl sulfoxide on the morphology and viability of primary cultured neurons and astrocytes. *Brain Res Bull.* 2017;128:34-39.
69. Li YF, Lee KG, Ou X, Lam KP. Bruton's tyrosine kinase and protein kinase C micro are required for TLR7/9-induced IKKalpha and IRF-1 activation and interferon-beta production in conventional dendritic cells. *PLoS One.* 2014;9(8):e105420.

70. Melzer L. Rab6A Immunmarkierung im Gehirn von Maus und Mensch: Etablierung eines astrozytenspezifischen Markers [Dissertation]. Goethe-Universität Frankfurt am Main; 2021.
71. Melzer L, Freiman TM, Derouiche A. Rab6A as a Pan-Astrocytic Marker in Mouse and Human Brain, and Comparison with Other Glial Markers (GFAP, GS, Aldh1L1, SOX9). *Cells*. 2021;10(1)
72. Anlauf E, Derouiche A. A practical calibration procedure for fluorescence colocalization at the single organelle level. *J Microsc*. 2009;233(2):225-33.
73. Farid KMN, Derouiche A. Quantifying Compartment-Specific Protein Translocation in Astrocytes by Object-Oriented Image Analysis: Mitochondrial Translocation of PKCdelta. *Methods Mol Biol*. 2019;1938:169-186.
74. Uchino M, Sakai N, Kashiwagi K, et al. Isoform-specific phosphorylation of metabotropic glutamate receptor 5 by protein kinase C (PKC) blocks Ca²⁺ oscillation and oscillatory translocation of Ca²⁺-dependent PKC. *J Biol Chem*. 2004;279(3):2254-61.
75. Huber KM, Sawtell NB, Bear MF. Effects of the metabotropic glutamate receptor antagonist MCPG on phosphoinositide turnover and synaptic plasticity in visual cortex. *J Neurosci*. 1998;18(1):1-9.
76. Sharma K, Schmitt S, Bergner CG, et al. Cell type- and brain region-resolved mouse brain proteome. *Nat Neurosci*. 2015;18(12):1819-31.
77. Lange SC, Bak LK, Waagepetersen HS, Schousboe A, Norenberg MD. Primary cultures of astrocytes: their value in understanding astrocytes in health and disease. *Neurochem Res*. 2012;37(11):2569-88.
78. Soltoff SP. Rottlerin is a mitochondrial uncoupler that decreases cellular ATP levels and indirectly blocks protein kinase Cdelta tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem*. 2001;276(41):37986-92.
79. Soltoff SP. Rottlerin: an inappropriate and ineffective inhibitor of PKCdelta. *Trends Pharmacol Sci*. 2007;28(9):453-8.
80. Davies SP, Reddy H, Caivano M, Cohen P. Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem J*. 2000;351(Pt 1):95-105.

81. Ohmori S, Shirai Y, Sakai N, et al. Three distinct mechanisms for translocation and activation of the delta subspecies of protein kinase C. *Mol Cell Biol.* 1998;18(9):5263-71.
82. Kajimoto T, Sawamura S, Tohyama Y, Mori Y, Newton AC. Protein kinase C {delta}-specific activity reporter reveals agonist-evoked nuclear activity controlled by Src family of kinases. *J Biol Chem.* 2010;285(53):41896-910.
83. Hall KJ, Jones ML, Poole AW. Coincident regulation of PKCdelta in human platelets by phosphorylation of Tyr311 and Tyr565 and phospholipase C signalling. *Biochem J.* 2007;406(3):501-9.
84. Moussazadeh M, Haimovich B. Protein kinase C-delta activation and tyrosine phosphorylation in platelets. *FEBS Lett.* 1998;438(3):225-30.
85. Patwardhan P, Resh MD. Myristoylation and membrane binding regulate c-Src stability and kinase activity. *Mol Cell Biol.* 2010;30(17):4094-107.
86. Murugappan S, Shankar H, Bhamidipati S, Dorsam RT, Jin J, Kunapuli SP. Molecular mechanism and functional implications of thrombin-mediated tyrosine phosphorylation of PKCdelta in platelets. *Blood.* 2005;106(2):550-7.
87. Rangaswami H, Schwappacher R, Tran T, et al. Protein kinase G and focal adhesion kinase converge on Src/Akt/beta-catenin signaling module in osteoblast mechanotransduction. *J Biol Chem.* 2012;287(25):21509-19.
88. Heuss C, Scanziani M, Gahwiler BH, Gerber U. G-protein-independent signaling mediated by metabotropic glutamate receptors. *Nat Neurosci.* 1999;2(12):1070-7.
89. Konishi H, Yamauchi E, Taniguchi H, et al. Phosphorylation sites of protein kinase C delta in H2O2-treated cells and its activation by tyrosine kinase in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(12):6587-92.
90. Murugappan S, Chari R, Palli VM, Jin J, Kunapuli SP. Differential regulation of threonine and tyrosine phosphorylations on protein kinase Cdelta by G-protein-mediated pathways in platelets. *Biochem J.* 2009;417(1):113-20.
91. Gonzalez-Sanchez A, Jaraiz-Rodriguez M, Dominguez-Prieto M, Herrero-Gonzalez S, Medina JM, Taberero A. Connexin43 recruits PTEN and Csk to inhibit c-Src activity in glioma cells and astrocytes. *Oncotarget.* 2016;7(31):49819-49833.

92. Chong YP, Mulhern TD, Cheng HC. C-terminal Src kinase (CSK) and CSK-homologous kinase (CHK)--endogenous negative regulators of Src-family protein kinases. *Growth Factors*. 2005;23(3):233-44.
93. Chen J, Cohen ML, Lerner AJ, Yang Y, Herrup K. DNA damage and cell cycle events implicate cerebellar dentate nucleus neurons as targets of Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener*. 2010;5:60.
94. Ramdas L, Obeyesekere NU, McMurray JS, Gallick GE, Seifert WE, Jr., Budde RJ. A tyrphostin-derived inhibitor of protein tyrosine kinases: isolation and characterization. *Arch Biochem Biophys*. 1995;323(2):237-42.
95. Hohnholt MC, Blumrich EM, Waagepetersen HS, Dringen R. The tricarboxylic acid cycle activity in cultured primary astrocytes is strongly accelerated by the protein tyrosine kinase inhibitor tyrphostin 23. *Neurochem Int*. 2017;102:13-21.
96. Pflieger J, He M, Abdellatif M. Mitochondrial complex II is a source of the reserve respiratory capacity that is regulated by metabolic sensors and promotes cell survival. *Cell Death Dis*. 2015;6:e1835.
97. Sansbury BE, Jones SP, Riggs DW, Darley-Usmar VM, Hill BG. Bioenergetic function in cardiovascular cells: the importance of the reserve capacity and its biological regulation. *Chem Biol Interact*. 2011;191(1-3):288-95.
98. Jha MK, Lee IK, Suk K. Metabolic reprogramming by the pyruvate dehydrogenase kinase-lactic acid axis: Linking metabolism and diverse neuropathophysiology. *Neurosci Biobehav Rev*. 2016;68:1-19.
99. Gore JC. Principles and practice of functional MRI of the human brain. *J Clin Invest*. 2003;112(1):4-9.
100. Bradley SJ, Challiss RA. G protein-coupled receptor signalling in astrocytes in health and disease: a focus on metabotropic glutamate receptors. *Biochem Pharmacol*. 2012;84(3):249-59.
101. Pellerin L, Magistretti PJ. Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(22):10625-9.
102. Pellerin L, Magistretti PJ. Sweet sixteen for ANLS. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2012;32(7):1152-66.

103. Dienel GA, Hertz L. Glucose and lactate metabolism during brain activation. *J Neurosci Res.* 2001;66(5):824-38.
104. Dienel GA, Cruz NF. Aerobic glycolysis during brain activation: adrenergic regulation and influence of norepinephrine on astrocytic metabolism. *J Neurochem.* 2016;138(1):14-52.
105. Dienel GA. Lack of appropriate stoichiometry: Strong evidence against an energetically important astrocyte-neuron lactate shuttle in brain. *J Neurosci Res.* 2017;95(11):2103-2125.
106. Hertz L. Astrocytic energy metabolism and glutamate formation--relevance for ¹³C-NMR spectroscopy and importance of cytosolic/mitochondrial trafficking. *Magn Reson Imaging.* 2011;29(10):1319-29.
107. McKenna MC. Glutamate pays its own way in astrocytes. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2013;4:191.
108. Bauer DE, Jackson JG, Genda EN, Montoya MM, Yudkoff M, Robinson MB. The glutamate transporter, GLAST, participates in a macromolecular complex that supports glutamate metabolism. *Neurochem Int.* 2012;61(4):566-74.
109. McKenna MC. Substrate competition studies demonstrate oxidative metabolism of glucose, glutamate, glutamine, lactate and 3-hydroxybutyrate in cortical astrocytes from rat brain. *Neurochem Res.* 2012;37(11):2613-26.
110. Takahashi S, Mashima K. Neuroprotection and Disease Modification by Astrocytes and Microglia in Parkinson Disease. *Antioxidants (Basel).* 2022;11(1)
111. Magistretti PJ, Allaman I. Lactate in the brain: from metabolic end-product to signalling molecule. *Nat Rev Neurosci.* 2018;19(4):235-249.
112. Sonnewald U, Westergaard N, Petersen SB, Unsgard G, Schousboe A. Metabolism of [U-¹³C]glutamate in astrocytes studied by ¹³C NMR spectroscopy: incorporation of more label into lactate than into glutamine demonstrates the importance of the tricarboxylic acid cycle. *J Neurochem.* 1993;61(3):1179-82.
113. Alves PM, McKenna MC, Sonnewald U. Lactate metabolism in mouse brain astrocytes studied by [¹³C]NMR spectroscopy. *Neuroreport.* 1995;6(16):2201-4.

114. Sonnewald U. Glutamate synthesis has to be matched by its degradation - where do all the carbons go? *J Neurochem.* 2014;131(4):399-406.
115. McKenna MC, Sonnewald U, Huang X, Stevenson J, Zielke HR. Exogenous glutamate concentration regulates the metabolic fate of glutamate in astrocytes. *J Neurochem.* 1996;66(1):386-93.
116. Seifert G, Schilling K, Steinhauser C. Astrocyte dysfunction in neurological disorders: a molecular perspective. *Nat Rev Neurosci.* 2006;7(3):194-206.
117. Vermeiren C, Najimi M, Vanhoutte N, et al. Acute up-regulation of glutamate uptake mediated by mGluR5a in reactive astrocytes. *J Neurochem.* 2005;94(2):405-16.
118. Vermeiren C, Hemptinne I, Vanhoutte N, Tilleux S, Maloteaux JM, Hermans E. Loss of metabotropic glutamate receptor-mediated regulation of glutamate transport in chemically activated astrocytes in a rat model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem.* 2006;96(3):719-31.
119. Magaki SD, Williams CK, Vinters HV. Glial function (and dysfunction) in the normal & ischemic brain. *Neuropharmacology.* 2018;134(Pt B):218-225.
120. Chen CJ, Liao SL, Kuo JS. Gliotoxic action of glutamate on cultured astrocytes. *J Neurochem.* 2000;75(4):1557-65.
121. Shannon C, Salter M, Fern R. GFP imaging of live astrocytes: regional differences in the effects of ischaemia upon astrocytes. *J Anat.* 2007;210(6):684-92.
122. Vanzulli I, Butt AM. mGluR5 protect astrocytes from ischemic damage in postnatal CNS white matter. *Cell Calcium.* 2015;58(5):423-30.
123. Jantzie LL, Talos DM, Selip DB, et al. Developmental regulation of group I metabotropic glutamate receptors in the premature brain and their protective role in a rodent model of periventricular leukomalacia. *Neuron Glia Biol.* 2010;6(4):277-88.
124. Butt AM, Fern RF, Matute C. Neurotransmitter signaling in white matter. *Glia.* 2014;62(11):1762-79.
125. Devaraju P, Sun MY, Myers TL, Lauderdale K, Fiacco TA. Astrocytic group I mGluR-dependent potentiation of astrocytic glutamate and potassium uptake. *J Neurophysiol.* 2013;109(9):2404-14.

126. Aronica E, van Vliet EA, Mayboroda OA, Troost D, da Silva FH, Gorter JA. Upregulation of metabotropic glutamate receptor subtype mGluR3 and mGluR5 in reactive astrocytes in a rat model of mesial temporal lobe epilepsy. *Eur J Neurosci.* 2000;12(7):2333-44.
127. Umpierre AD, West PJ, White JA, Wilcox KS. Conditional Knock-out of mGluR5 from Astrocytes during Epilepsy Development Impairs High-Frequency Glutamate Uptake. *J Neurosci.* 2019;39(4):727-742.
128. Seifert G, Carmignoto G, Steinhauser C. Astrocyte dysfunction in epilepsy. *Brain Res Rev.* 2010;63(1-2):212-21.
129. Paquet M, Ribeiro FM, Guadagno J, Esseltine JL, Ferguson SS, Cregan SP. Role of metabotropic glutamate receptor 5 signaling and homer in oxygen glucose deprivation-mediated astrocyte apoptosis. *Mol Brain.* 2013;6:9.
130. Byrnes KR, Loane DJ, Faden AI. Metabotropic glutamate receptors as targets for multipotential treatment of neurological disorders. *Neurotherapeutics.* 2009;6(1):94-107.
131. Bao WL, Williams AJ, Faden AI, Tortella FC. Selective mGluR5 receptor antagonist or agonist provides neuroprotection in a rat model of focal cerebral ischemia. *Brain Res.* 2001;922(2):173-9.
132. Lea PMt, Movsesyan VA, Faden AI. Neuroprotective activity of the mGluR5 antagonists MPEP and MTEP against acute excitotoxicity differs and does not reflect actions at mGluR5 receptors. *Br J Pharmacol.* 2005;145(4):527-34.
133. Perala J, Suvisaari J, Saarni SI, et al. Lifetime prevalence of psychotic and bipolar I disorders in a general population. *Arch Gen Psychiatry.* 2007;64(1):19-28.
134. Javitt DC, Zukin SR. Recent advances in the phencyclidine model of schizophrenia. *Am J Psychiatry.* 1991;148(10):1301-8.
135. Chen HH, Liao PF, Chan MH. mGluR5 positive modulators both potentiate activation and restore inhibition in NMDA receptors by PKC dependent pathway. *J Biomed Sci.* 2011;18:19.
136. Rook JM, Xiang Z, Lv X, et al. Biased mGlu5-Positive Allosteric Modulators Provide In Vivo Efficacy without Potentiating mGlu5 Modulation of NMDAR Currents. *Neuron.* 2015;86(4):1029-1040.

137. Duarte JMN, Xin L. Magnetic Resonance Spectroscopy in Schizophrenia: Evidence for Glutamatergic Dysfunction and Impaired Energy Metabolism. *Neurochem Res.* 2019;44(1):102-116.
138. Sullivan CR, O'Donovan SM, McCullumsmith RE, Ramsey A. Defects in Bioenergetic Coupling in Schizophrenia. *Biol Psychiatry.* 2018;83(9):739-750.
139. Lander SS, Khan U, Lewandowski N, et al. Glutamate Dehydrogenase-Deficient Mice Display Schizophrenia-Like Behavioral Abnormalities and CA1-Specific Hippocampal Dysfunction. *Schizophr Bull.* 2019;45(1):127-137.
140. Goncalves VF, Andreazza AC, Kennedy JL. Mitochondrial dysfunction in schizophrenia: an evolutionary perspective. *Hum Genet.* 2015;134(1):13-21.
141. Oyarzabal A, Marin-Valencia I. Synaptic energy metabolism and neuronal excitability, in sickness and health. *J Inherit Metab Dis.* 2019;42(2):220-236.
142. Mongeon R, Venkatachalam V, Yellen G. Cytosolic NADH-NAD(+) Redox Visualized in Brain Slices by Two-Photon Fluorescence Lifetime Biosensor Imaging. *Antioxid Redox Signal.* 2016;25(10):553-63.
143. Juaristi I, Llorente-Folch I, Satrustegui J, Del Arco A. Extracellular ATP and glutamate drive pyruvate production and energy demand to regulate mitochondrial respiration in astrocytes. *Glia.* 2019;67(4):759-774.
144. Eriksson G, Peterson A, Iverfeldt K, Walum E. Sodium-dependent glutamate uptake as an activator of oxidative metabolism in primary astrocyte cultures from newborn rat. *Glia.* 1995;15(2):152-6.
145. Araque A, Carmignoto G, Haydon PG, Oliet SH, Robitaille R, Volterra A. Gliotransmitters travel in time and space. *Neuron.* 2014;81(4):728-39.
146. Jackson JG, O'Donnell JC, Takano H, Coulter DA, Robinson MB. Neuronal activity and glutamate uptake decrease mitochondrial mobility in astrocytes and position mitochondria near glutamate transporters. *J Neurosci.* 2014;34(5):1613-24.

10 Publikationen

Farid KMN, Derouiche A. Quantifying Compartment-Specific Protein Translocation in Astrocytes by Object-Oriented Image Analysis: Mitochondrial Translocation of PKC δ . *Methods Mol Biol.* 2019;1938:169-186.

Mohammad Nejad Farid K, Maronde E, Derouiche A. Regulation of mitochondrial metabolism in astrocytes at the level of PDC, by glutamate, mGluR5 and PKC δ . *Glia* 67, S1:E328. (Kongress-Abstract, XIV European Meeting on Glial Cells in Health and Disease, Porto, Portugal 2019)

11 Schriftliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel

Zur Regulation des oxidativen Energiemetabolismus in Astrozyten:

Darstellung einer mGluR5 / PKC δ – vermittelten Aktivierung von Mitochondrien
in vitro

in dem Institut für Anatomie II (Experimentelle Neurobiologie) der Dr. Senckenbergischen Anatomie unter Betreuung und Anleitung von Prof. Dr. Amin Derouiche ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Darüber hinaus versichere ich, nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht. Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht.

Vorliegende Ergebnisse der Arbeit wurden in folgendem Publikationsorgan veröffentlicht:

Farid KMN, Derouiche A. Quantifying Compartment-Specific Protein Translocation in Astrocytes by Object-Oriented Image Analysis: Mitochondrial Translocation of PKC δ . *Methods Mol Biol.* 2019;1938:169-186.

Mohammad Nejad Farid K, Maronde E, Derouiche A. Regulation of mitochondrial metabolism in astrocytes at the level of PDC, by glutamate, mGluR5 and PKC δ . *Glia* 67, S1:E328. (Kongress-Abstract, XIV European Meeting on Glial Cells in Health and Disease, Porto, Portugal 2019)

(Ort, Datum)

(Unterschrift)

12 Danksagungen

Meine Danksagung wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.