

Aus dem Institut für Integrative Neuroanatomie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Zelltypspezifische quantitative Analyse der neuronalen
Autophagosomenbildung in cerebellären hirnorganotypischen
Schnittkulturen aus der Maus

Cell type-specific quantitative analysis of neuronal autophagosome
formation in cerebellar organotypic slice cultures from mice

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

Vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Lennart Wilhelm Sannwald
Aus Bonn, Deutschland

Datum der Promotion: 04.03.2022

Meinen Eltern

Dr. med. Renate Sannwald

&

Dr. iur. Rüdiger Sannwald

In Dankbarkeit

lux in tenebris mihi fuistis

Inhaltsverzeichnis

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	7
Abkürzungsverzeichnis.....	11
1 Zusammenfassung.....	15
2 Abstract.....	16
3 Einleitung.....	17
3.1 Hirnorganotypische Schnittkulturen.....	18
3.2 Kleinhirn	21
3.2.1 Allgemeiner Aufbau des Kleinhirns	22
3.2.2 Purkinje-Zellen.....	26
3.2.3 Interneuronen.....	29
3.2.4 Funktionen und Pathologien des Kleinhirns.....	32
3.3 Autophagie.....	34
3.3.1 Molekulare Mechanismen der Autophagie.....	36
3.3.2 Neuronale Autophagie.....	42
3.3.3 Pharmakologische Manipulation.....	46
3.3.4 Neuropathologische und klinische Relevanz.....	49
3.4 Fragestellung.....	53
4 Materialien und Methoden	58
4.1 Chemikalien.....	58
4.2 Puffer und Lösungen.....	59
4.2.1 Zellkultur	59
4.2.2 Elektrophorese und Immunoblot.....	61
4.2.3 Immunfluoreszenz.....	63
4.3 Antikörper.....	64
4.3.1 Primäre Antikörper	64
4.3.2 Sekundäre Antikörper.....	65
4.4 Pharmaka.....	65
4.5 Geräte und Apparaturen.....	66
4.6 Methoden.....	68
4.6.1 Zellkulturarbeiten	68
4.6.2 Protein-Techniken	74
4.6.3 Immunfluoreszenzfärbung und konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie.....	79
4.6.4 Aufbereitung und Auswertung des Bildmaterials	81
4.6.5 Datenanalyse	83
5 Ergebnisse.....	86

5.1	Vergleich der Autophagosomendichte zwischen hirnormanotypischen Kleinhirnschnitten und Kleinhirnproben von altersentsprechenden Mäusen.....	87
5.2	Einfluss der Kulturdauer auf die Autophagosomenanzahl.....	91
5.3	Induzierbarkeit der Autophagosomenbildung im hirnormanotypischen Schnitt.....	93
5.4	Pharmakologische Manipulation mit Bafilomycin B1	95
5.5	Pharmakologische Manipulation mit 3-Methyladenin	99
5.6	Neuronentyp spezifische quantitative Unterschiede in der Autophagosomenbildung	101
5.6.1	Absolute Unterschiede in der Autophagosomenbildung zwischen verschiedenen Neuronentypen im gleichen organotypischen Mikromilieu	104
5.6.2	Relative Ähnlichkeit der Kinetik der Autophagosomenbildung unabhängig vom Neuronentyp im gleichen organotypischen Mikromilieu.....	108
6	Diskussion	111
6.1	Die cerebelläre hirnormanotypische Schnittkultur als experimentelles System für die vergleichende quantitative Autophagieforschung.....	111
6.2	Zelltypspezifische quantitative Unterschiede der Autophagosomenbildung in Neuronen	116
6.3	Fazit und Ausblick	119
7	Appendix.....	121
7.1	Die Bedeutung der statistischen Signifikanz.....	121
7.2	LC3B2/LC3B1-Quotient zu Kapitel 5.1.....	123
7.3	LC3B2/LC3B1-Quotient zu Kapitel 5.2.....	123
7.4	LC3B2/LC3B1-Quotient zu Kapitel 5.3.....	124
7.5	LC3B2/LC3B1-Quotient zu Kapitel 5.4.....	125
7.6	LC3B2/LC3B1-Quotient zu Kapitel 5.5.....	128
7.7	Ergänzend zu Kapitel 5.6.1 bestimmte Parameter.....	129
8	Literaturverzeichnis	132
9	Eidesstattliche Versicherung	142
10	Curriculum vitae.....	143
11	Danksagung	146
12	Bescheinigung Statistik	148

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungsnr.	Titel der Abbildung	Seite
1	Hirnorganotypischer Schnitt aus dem Cerebellum der Maus	19
2	Ansicht von superior auf Kleinhirn und davorliegenden Hirnstamm	21
3	Schematische Darstellung der aufgefalteten und ausgebreiteten Kleinhirnrinde mit der Nomenklatur nach Bolk (1906) für die Hemisphären und nach Larsell (1952) für den Vermis	23
4	Übersicht über Topographie und makroskopische Anatomie des Kleinhirns	25
5	Elemente des cerebellären Cortex aus Santiago Ramon Y Cajals Croonian Lecture	26
6	Übersicht über die homöostatische Rolle der Autophagie im Zellmetabolismus	35
7	Übersicht über die molekularen Mechanismen der Autophagosomenbildung	38
8	Lebensweg der Autophagosomen bis zur Verschmelzung mit Endosomen und/oder Lysosomen.	40
9	Zusammenfassung der zentralen regulatorischen Rolle von mTORC1	41
10	Lokalisation der neuronalen Autophagosomenbildung	44
11	Präparationsinstrumentarium bei Falsig et al.	69
12	Schritte der Schnittpräparation nach Falsig et al.	70
13	Repräsentatives Beispiel zweier Western Blot Filme	78
14	Cerebellärer hirnorganotypischer Schnitt aus der Maus mit Beschriftung des Vermis	80
15	Ablauf der Auswertung des Bildmaterials mit ImageJ	85
16	Vergleich des LC3B2/Actin-Wertes nach Western Blots von hirnorganotypischen Schnittkulturen und Proben aus Mäusen gleichen Alters	90
17	Gegenüberstellung der relativen Unterschiede der Mittelwerte der LC3B2/Actin-Quotienten zwischen cerebellärem hirnorganotypischem Schnitt und cerebellärem Homogenisat gleichaltriger Mäuse	91
18	Einfluss der Kultivierungsdauer von cerebellären hirnorganotypischen Schnittkulturen aus der Maus auf den gemessenen LC3B2/Actin-Quotienten im Rahmen von maximal 26 Kultivierungstagen	92
19	Induzierbarkeit der Autophagosomenbildung in cerebellären hirnorganotypischen Schnittkulturen aus der Maus	94
20	Bestimmung der Bafilomycinkonzentration	96
21	Einfluss der Behandlungsdauer mit 100 nM Bafilomycin B1 auf den LC3B2/Actin-Mittelwert mit Standardabweichung in hirnorganotypischen Schnittkulturen aus der Maus	98
22	LC3B2/Actin-Mittelwerte mit Standardabweichung in cerebellären hirnorganotypischen Schnittkulturen nach Behandlung mit 3 mM 3-Methyladenin für 1, 2 und 6 Stunden sowie Kontrollen	100
23	Parvalbuminfärbung des cerebellären Cortex in einem hirnorganotypischen Schnitt	102
24	Durchschnittliche Fläche pro Zelltyp und Behandlungsdauer in der hirnorganotypischen Schnittkultur in Pixeln	103
25	Zelltypabhängiger zeitlicher Verlauf der Anzahl LC3B-immunopositiver Partikel pro Zelle in absoluten (links) und relativen (rechts) Werten nach Behandlung mit 100 nM Bafilomycin	106
26	Zelltypabhängiger zeitlicher Verlauf der Anzahl der LC3B-immunopositiven Partikel pro Zelle und pro Zellfläche in absoluten (links) und relativen (rechts) Werten nach Behandlung mit 100 nM Bafilomycin	107

27	Summationsbilder aus der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie von PZs	109
28	Summationsbilder aus der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie von PVI	110
29	Gegenüberstellung der relativen Unterschiede der LC3B2/LC3B1-Quotienten zwischen cerebellärem hirnanatomischem Schnitt und cerebellärem Homogenisat gleichaltriger Mäuse	123
30	Einfluss der Kultivierungsdauer von cerebellären hirnanatomischen Schnittkulturen aus der Maus auf den gemessenen LC3B2/LC3B1-Quotienten im Rahmen von maximal 26 Kultivierungstagen	124
31	Induzierbarkeit der Autophagosomenbildung in cerebellären hirnanatomischen Schnittkulturen aus der Maus	124
32	Bestimmung der zu verwendenden Bafilomycinkonzentration	125
33	Einfluss der Behandlungsdauer mit 100 nM Bafilomycin B1 auf den LC3B2/LC3B1-Mittelwert mit Standardabweichung in hirnanatomischen Schnittkulturen aus der Maus	126
34	Darstellung der optischen Dichten der aus den Western Blot Banden ermittelten LC3B2- und LC3B1-Gehalte in cerebellären hirnanatomischen Schnittkulturen nach Behandlung mit 3 mM 3-Methyladenin für 1, 2 und 6 h sowie Kontrollen	128
35	Zelltypabhängiger zeitlicher Verlauf der LC3B-immunopositiven Fläche pro Zelle in absoluten (links) und relativen (rechts) Werten bei PZ vs. PVI nach Behandlung mit 100 nM Bafilomycin	129
36	Zelltypabhängiger zeitlicher Verlauf der LC3B-immunopositiven Fläche pro Zelle im Verhältnis zur Zellfläche in absoluten (links) und relativen Werten (rechts) bei PZ vs. PVI nach Behandlung mit 100 nM Bafilomycin	130
37	Zelltypabhängiger zeitlicher Verlauf der durchschnittlichen Fläche der LC3B-immunopositiven Partikel pro Zelle (oben) sowie zusätzlich im Verhältnis zur Zellfläche (unten) in absoluten (links) und relativen (rechts) Werten nach Behandlung mit 100 nM Bafilomycin bei PZ vs. PVI	131

Tabellennr.	Titel der Tabelle	Seite
1	Zusammensetzung der Trenngele mit unterschiedlichen Anteilen Acrylamid	62
2	Liste und Verdünnungen der verwendeten Primärantikörper	64
3	Liste und Verdünnungen der verwendeten Sekundärantikörper	65
4	Liste und Lösungsmittel der verwendeten Inhibitoren und Aktivatoren	65
5	Übersicht über die verwendeten Schnittkulturen.	71
6	Vergleich der Mittelwerte der LC3B2/Actin-Quotienten (mit Standardabweichungen) zwischen cerebellärem hirn-organotypischem Schnitt und cerebellärem Homogenisat aus gleichaltrigen Mäusen	89
7	Vergleich der Mittelwerte des LC3B2/Actin-Quotienten (mit Standardabweichungen) in cerebellären hirnorganotypischen Schnittkulturen nach unterschiedlicher Kultivierungsdauer	92
8	Mittelwerte und Standardabweichung des LC3B2/Actin-Quotienten nach Behandlung mit PBS und Bafilomycin (metabolische Induktion), Rapamycin und Bafilomycin (pharmakologische Induktion) sowie Kontrollen (nur Bafilomycin)	94
9	Mittelwerte und Standardabweichung des LC3B2/Actin-Quotienten nach Behandlung mit 100, 200 oder 400 nM Bafilomycin sowie Kontrollen	96
10	Wirkung von Bafilomycin über die Zeit auf die LC3B2/Actin-Quotienten. Errechnete Mittelwerte mit Standardabweichungen und relativen Veränderungen	97
11	Wirkung von 3-MA über die Zeit auf die LC3B2/Actin-Quotienten. Dargestellt sind die errechneten Mittelwerte mit Standardabweichungen und relativen Veränderungen (Behandlung vs. Kontrolle)	100
12	Liste der verwendeten Versuchstiere, Schnitte, Gesamtzahl der mikroskopierten Zellen und Anzahl der analysierten Zellen	101
13	Anzahl der LC3B-immunopositiven Signalpartikel pro Zelle bei PZ und PVI nach Behandlung mit 100 nM Bafilomycin angegeben in gerundeten Mittelwerten (mit 95%-Konfidenzintervall)	105
14	Anzahl der LC3B-immunopositiven Signalpartikel pro Zelle und pro Zellfläche bei PZ und PVI nach Behandlung mit 100 nM Bafilomycin angegeben in gerundeten Mittelwerten $\times 10^{-3}$ (mit 95%-Konfidenzintervall)	106
15	Ergebnisse der Signifikanzwerte nach multiplen Vergleichen der ermittelten Mittelwerte mittels des Tukey-HSD Post-Hoc-Tests für die Beziehungen zwischen den jeweiligen Behandlungszeitpunkten	107
16	Ergebnis der exploratorischen ONE-WAY-Anovas zur Bestimmung des Einflusses der unabhängigen Variablen „Behandlungsdauer“ auf die abhängige Variable für PZ und PVI, angegeben als P-Wert	111
17	Vergleich der Mittelwerte der LC3B2/LC3B1-Quotienten (mit Standardabweichungen) zwischen cerebellärem hirnorganotypischem Schnitt und cerebellärem Homogenisat aus gleichaltrigen Mäusen	123
18	Vergleich der Mittelwerte des LC3B2/LC3B1-Konversionsindex (mit Standardabweichung) in cerebellären hirnorganotypischen Schnittkulturen nach unterschiedlicher Kultivierungsdauer	123
19	Mittelwerte und Standardabweichung des LC3B2/LC3B1-Quotienten nach Behandlung mit PBS und Bafilomycin (metabolische Induktion), Rapamycin und Bafilomycin (pharmakologische Induktion) sowie Kontrollen (nur Bafilomycin)	124
20	Mittelwerte und Standardabweichung des LC3B2/LC3B1-Quotienten nach Behandlung mit 100, 200 oder 400 nM Bafilomycin sowie Kontrollen	125
21	Wirkung von Bafilomycin über die Zeit auf die LC3B2/LC3B1-Quotienten. Errechnete Mittelwerte mit Standardabweichungen und relativen	125

	Veränderungen	
22	Wirkung von Bafilomycin über die Zeit auf die LC3B2-Gehalte der behandelten Schnitte, angegeben in Mittelwerten und Standardabweichungen (StAbw) der Proteingehaltswerte, die durch die Multiplikation der optischen Dichte der Western Blot Banden mit ihrer Fläche entstehen	126
23	Wirkung von Bafilomycin über die Zeit auf die LC3B1-Gehalte der behandelten Schnitte, angegeben in Mittelwerten und Standardabweichungen (StAbw) der Proteingehaltswerte, die durch die Multiplikation der optischen Dichte der Western Blot Banden mit ihrer Fläche entstehen	127
24	Wirkung von Bafilomycin über die Zeit auf die Actin-Gehalte der behandelten Schnitte, angegeben in Mittelwerten und Standardabweichungen (StAbw) der Proteingehaltswerte, die durch die Multiplikation der optischen Dichte der Western Blot Banden mit ihrer Fläche entstehen	127
25	Wirkung von 3-MA über die Zeit auf die LC3B2/LC3B1-Quotienten. Dargestellt sind aufgrund einzelner Ausreißer bei niedriger Fallzahl die Medianwerte und relativen Veränderungen (Behandlung vs. Kontrolle)	128
26	Partikuläre Gesamtfläche des LC3B-immunopositiven Signals pro Zelle bei PZ und PVI in Image J Pixeln nach Behandlung mit 100 nM Bafilomycin, angegeben in gerundeten Mittelwerten (mit 95%-Konfidenzintervall)	129
27	Partikuläre Gesamtfläche des LC3B-immunopositiven Signals pro Zelle pro Zellfläche bei PZ und PVI nach Behandlung mit 100 nM Bafilomycin, angegeben in gerundeten Mittelwerten $\times 10^{-2}$ (mit 95%-Konfidenzintervall)	129
28	Durchschnittliche Partikelfläche pro Zelle (in Pixel) bei PZ und PVI nach Behandlung mit 100 nM Bafilomycin, angegeben in gerundeten Mittelwerten (mit 95%-Konfidenzintervall)	130
29	Durchschnittliche Partikelfläche pro Zelle im Verhältnis zur Zellfläche bei PZ und PVI nach Behandlung mit 100 nM Bafilomycin, angegeben in gerundeten Mittelwerten $\times 10^{-4}$ (mit 95%-Konfidenzintervall).	130

Abkürzungsverzeichnis

A

AK	Antikörper
AKT1S1	AKT substrate 1
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPK	AMP-Kinase
ANOVA	Analysis of Variance
ATG	Autophagy-related gene
ATM	Ataxia telangiectasia mutated
ATP	Adenosintriphosphat
AV	Autophagische Vakuolen

B

BCA	Bichinchoninsäure-4,4-dicarboxy-2,2-Bichinolin
BECN1	Beclin-1

C

CLSM	Confocal laser scanning microscopy
------	------------------------------------

D

DAT	Demenz vom Alzheimer-Typ
ddH ₂ O	Zweifach destilliertes H ₂ O
DEPTOR	DEP-domain-containing mTOR-interacting protein
DFCP1	Double FYVE-containing protein 1
DIV	Day in vivo

E

ECL	Enhanced Chemiluminescence
EEG	Elektroencephalographie
ER	Endoplasmatisches Reticulum

G

GADPH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
-------	--

GATOR1/2	GTPase activating protein for a heterodimeric family of GTP binding proteins termed RAG A-D
GFP	Green fluorescent protein
GTP	Guanosintriphosphat
H	
HKP	House keeping protein
HNK1	Human natural killer-1
HSP25	Heat shock protein 25
I	
ISG15	Interferon-stimulated gene 15
L	
LAMP1/2	Lysosome-associated membrane glycoprotein 1/2
LC3B	Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B
LTD	Long term depression
LTP	Long term potentiation
M	
3-MA	3-Methyladenin
MAPK	Mitogen-activated protein
MLI	Molecular layer interneuron
mTOR	Mammalian target of rapamycin
mTORC1	mTOR complex 1
MLST8	mTOR-associated protein LST8 homologue
MSA	Multisystematrophie
N	
Ncl.	Nucleus
Ncll.	Nuclei
P	
PE	Phosphatidylethanolamin

PI3P	Phosphatidylinositol-3-Phosphat
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PKA	Proteinkinase A
PV	Parvalbumin
PVI	Parvalbumin-positives Interneuron
PZ	Purkinje-Zelle
P X	Postnataler Tag X

R

RAPTOR	Regulatory-associated protein of mTOR
ROS	Reactive oxygen species

S

SCA	Spinocerebelläre Ataxie
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SERCA	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase
siRNA	Small interfering RNA
SNARE	Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor
SQSTM1/p62	Sequestosome-1/p62
StAbw	Standardabweichung

T

TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TFEB	Transkriptionsfaktor EB

U

UBC	Unipolar brush cell
ULK1	Unc-51-like kinase
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System

V

v-ATPase	Vakuoläre Adenosintriphosphatase
Vps34	Vacuolar protein sorting 34

W

WIPI WD-repeat protein Interacting with Phosphoinositides

Z

ZNS Zentralnervensystem

1 Zusammenfassung

Die Autophagie ist ein evolutionär konservierter zellulärer Wiederaufbereitungsmechanismus, der zelleigene Makromoleküle und Organellen in seine Grundbausteine zerlegt und dem Zellmetabolismus zur Wahrung der Zellhomöostase wieder zur Verfügung stellt. Dies geschieht durch Einschluss der Zielstrukturen in eine Doppelmembranstruktur, das Autophagosom, und mittels konsekutiver Fusion des Autophagosoms mit einem degradativen Lysosom.

Nervenzellen gehören aufgrund ihres postmitotischen Zustandes sowie hoher metabolischer Aktivität zu jenen Zelltypen, die besonders auf die Autophagie angewiesen sind. Deshalb lässt sich eine Neurodegeneration durch eine Ausschaltung der basalen neuronalen Autophagie auslösen.

Aus diesem Grund gerät die Autophagie im Kontext akuter und chronischer Stressreize zunehmend in den wissenschaftlichen Fokus. Gleichwohl sind die quantitativen Variationen der Autophagiekapazität verschiedener Nervenzelltypen bisher ein unbearbeitetes Gebiet in der Autophagieforschung. Diese Variationen sind von besonderem Interesse, weil viele Erkrankungen des Nervensystems zumindest initial einen selektiven Befall bestimmter Nervenzelltypen zeigen und Variationen in der Autophagiekapazität eine Grundlage für eine differenzielle Vulnerabilität verschiedener Neuronentypen darstellen können. Die hirnormanotypische Schnittkultur ist zur Untersuchung dieser Frage vorteilhaft, weil sie das organotypische Mikromilieu mit einer leichten Zugänglichkeit und einer Manipulierbarkeit der äußeren Umstände kombiniert.

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchung wurde die cerebelläre organotypische Schnittkultur als experimentelles System für den zelltypspezifischen quantitativen Vergleich neuronaler Autophagie etabliert und anhand eines Teils des Autophagieapparates getestet, der Autophagosomenformation. Hierzu wurden [1] ein Vergleich zwischen cerebellären Schnittkulturen und nativem Kleinhirngewebe aus altersentsprechenden Mäusen, [2] eine Untersuchung der Entwicklung des Autophagiestatus über die Kulturdauer hinweg sowie [3] eine Verifizierung der allgemeinen Responsivität der Schnittkulturen auf in der Autophagieforschung gängige Methoden der Manipulation des Autophagiestatus in orientierenden Western Blot-Untersuchungen durchgeführt.

Anschließend erfolgte ein zellspezifischer immunhistochemischer Vergleich zwischen Purkinje-Zellen und Parvalbumin-positiven Interneuronen jeweils nach Behandlungen mit

dem etablierten Pharmakon Bafilomycin, das die Degradation von Autophagosomen inhibiert. Die so entstandene Akkumulation von LC3B-positiven Autophagosomen wurde als Ausdruck der Autophagosomenformation gewertet und zwischen den Zelltypen verglichen. Die Ergebnisse zeigen dabei einen deutlichen absoluten Unterschied in der basalen Autophagosomenbildung zwischen den Zelltypen, der maßgeblich mit der Somagröße korreliert, sowie eine zelltypübergreifende relative Kinetik der Autophagosomenbildung der untersuchten Neuronen im gleichen organotypischen Mikromilieu.

2 Abstract

Autophagy is an evolutionarily highly conserved cellular recycling mechanism which degrades macromolecules and organelles in order to supply cell metabolism with nutrients and maintain cellular homeostasis. This is achieved by enclosing target structures in autophagosomes and their consecutive fusion with degradative lysosomes.

Postmitotic neurons are particularly dependent on autophagy due to their high metabolic activity. Additionally, neurons are not able to dilute damaged organelles or aggregated macromolecules by mitosis. Consequently, experimentally induced impairment of autophagy leads to neurodegeneration.

The basal role of autophagy in cellular homeostasis focuses scientific attention on autophagy as either risk factor or compensating mechanism for both acute and chronic cellular stress. However, knowledge about quantitative variations in autophagic capacities among cell types largely remain a "blind spot". Such variations may lead to a selective vulnerability of specific cell types and provide an explanation for the fact that a wide range of diseases of the central nervous system initially manifest in a distinct pattern of cell affliction. The brain organotypic slice culture assay provides a convenient model for investigation of cell type specific differences because it combines an organotypic micro-milieu with an easy accessibility and manipulability of external circumstances.

This study establishes a cerebellar organotypic slice assay as experimental model for quantitative cell type specific analysis of neuronal autophagy and applies this assay to the quantitative investigation of autophagosome formation. The following basic parameters were established using Western Blot assays: firstly, a comparison of cerebellar slices with samples directly obtained from mice was carried out; secondly, the influence of duration of

cultivation was investigated; thirdly, the responsivity of cerebellar slices to commonly used methods for manipulation of autophagy was confirmed. Afterwards, an immunohistochemical comparison of purkinje cells and parvalbumin-positive interneurons after treatment with bafilomycin, which inhibits autophagosome degradation, was conducted. The consecutive accumulation of LC3B-positive Autophagosomes was analyzed as measure for autophagosome formation and compared between cell types. Results showed a marked absolute difference in autophagosome formation between cell types as well as analogous kinetics in the same organotypic micro-milieu.

3 Einleitung

„Das Studium der Hirnanatomie ist per se eine lebensfüllende, hochinteressante Aufgabe“ (1). Dies gilt in noch stärkerem Maße für die seit Jahrhunderten voranschreitende Erforschung von Struktur und Funktion des Zentralnervensystems der Vertebraten auf makroskopischer, mikroskopischer und in den letzten Jahrzehnten auch auf zell- und molekularbiologischer Ebene.

Das in den Hirnwissenschaften lange und insbesondere von Größen wie Emil Du Bois-Reymond gepredigte Diktum „*Ignoramus et ignorabimus*“ (lat. „Wir wissen nicht und wir werden nicht wissen“) scheint zunehmend an Bedeutung zu verlieren. Ein zentraler Wandel trat gegen Ende des 19. Jahrhunderts ein, als Santiago Ramon y Cajal und Wilhelm von Waldeyer, der dem Neuron seinen Namen gab, der Neuronenhypothese zum Durchbruch verhelfen und das Neuron als kleinste eigenständige Funktions- und Struktureinheit des Nervensystems etablierten (2).

Seitdem ist das Verständnis der Hirnfunktionen wesentlich an die Erforschung zellulärer Eigenschaften gekoppelt - „one cell at a time“ (3). Die große Komplexität des Zentralnervensystems von Vertebraten verlangt dabei allerdings oft eine reduktionistische Herangehensweise und ist von der Entwicklung verschiedenster Methodiken und Techniken abhängig (4). Dabei nehmen hirnorganotypische Schnittkulturen seit ihrer erstmaligen Verbreitung in den 1960er und 1970er Jahren eine wichtige Rolle ein (5).

3.1 Hirnorganotypische Schnittkulturen

Zur Erforschung neuronaler Eigenschaften sind unterschiedlichste Techniken im Einsatz, von Magnetresonanz-basierter Bildgebung bis hin zur Elektronenmikroskopie. Einen wichtigen Beitrag zur Untersuchung zellulärer Prozesse isolierter Systeme leisten in der neurobiologischen Forschung *in vitro* Zellkulturen verschiedenster Art. Primäre Zellkulturen erlauben es, größere Mengen eines Zelltyps in einer homogenen Zellpopulation isoliert und in einer bestimmbareren Umgebung zu untersuchen. Die organotypische Schnittkultur hingegen ist eine Kulturform aus verschiedensten Zelltypen, die über eine grundlegend dreidimensionale Gewebearchitektur verfügt. Diese Schnittkulturen ermöglichen die *in vitro* Untersuchung zellulärer Prozesse in komplexeren, dem Ursprungsorgan ähnlicheren Zell- und Gewebeverbänden (5). Dabei gehörten Kulturen aus dem Cerebellum zu den ersten hirnorganotypischen Schnittkulturen, die beschrieben wurden (siehe Abb. 1) (6). Maßgeblich entwickelt wurde die Nutzung dieser Kulturen von Gähwiler und Stoppini. Gähwiler hat der hirnorganotypischen Kultur mit der Entwicklung der „Roller tube technique“ für neuronales Gewebe zum Durchbruch verholfen. Bei dieser Technik wird das Gewebe auf einem Objektträger innerhalb eines mit Kulturmedium befüllten Reagenzröhrchens in Plasma kultiviert (7). Stoppini entwickelte die Technik in den darauffolgenden Jahren zu der membranbasierten Vorgehensweise weiter. Diese wird im Folgenden beschrieben (8).

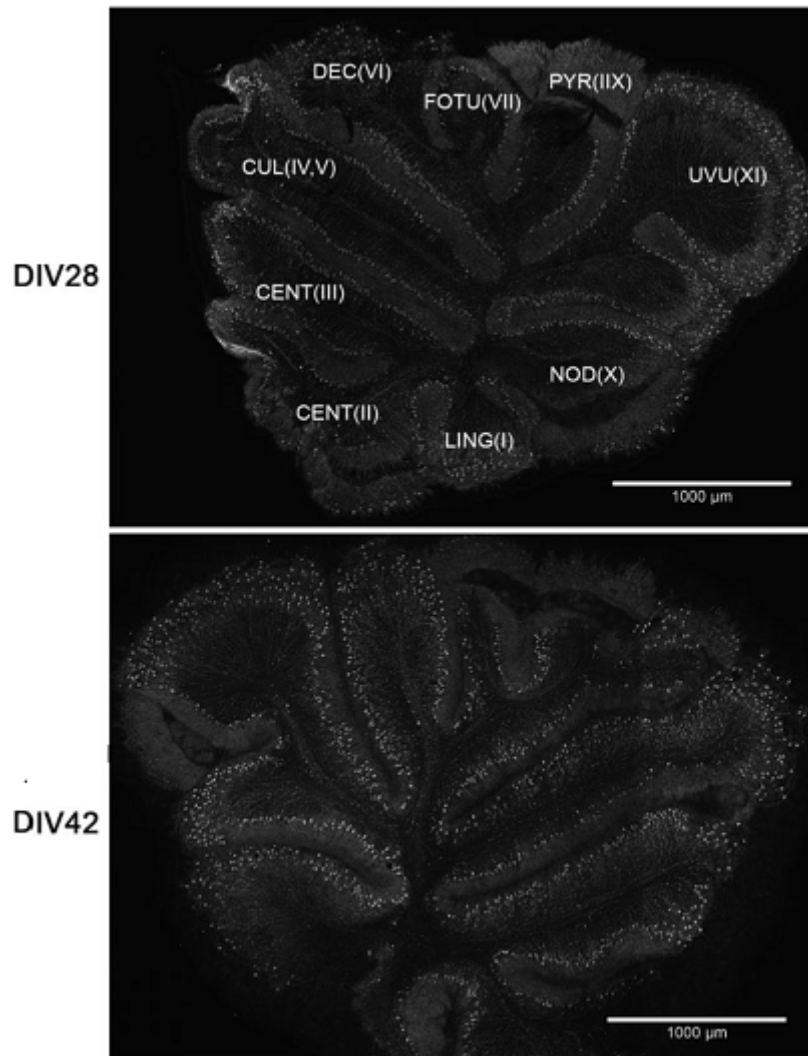


Abbildung 1. Hirnorganotypischer Schnitt aus dem Cerebellum der Maus. Das obere Bild zeigt einen Sagittalschnitt nach 28 Tagen in vitro und Anfärbung der Purkinje-Zellen mit einem anti-Calbindin D-28k-Antikörper. Da der Schnitt aus dem Cerebellum einer Maus am zehnten postnatalen Tag entnommen wurde, handelt es sich um den postnatalen Tag 38 (P38). Das untere Bild stellt einen entsprechenden Schnitt nach 42 Tagen in vitro (P52) dar. Die Somata der großen Purkinje-Zellen sind auch in einem solchem Übersichtsbild deutlich zu erkennen. Da der Schnitt im Laufe der Kulturdauer einen Anpassungsprozess durch Abflachung durchläuft, findet sich anders als in vivo eine mehrreihige Purkinje-Zell-Schicht. Das oberflächlichere Stratum moleculare ist aufgrund der hohen Dichte an Purkinje-Zell-Dendriten etwas heller als das sich unterhalb des Stratum purkinjense befindliche Stratum granulosum. Im oberen Bild wurden die verschiedenen Abschnitte des Vermis beschriftet: LING (Lingula), CENT (Lobulus centralis), CUL (Culmen), DEC (Declive), FOTU (Folium & Tuber), Pyr (Pyramis), UVU (Uvula), NOD (Nodulus). Abbildung entnommen aus: Marschalek N, Albert F, Meske V, Ohm TG. The natural history of cerebellar degeneration of Niemann-Pick C mice monitored in vitro. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2014;40(7):933-45 (9).

Bei dieser Vorgehensweise werden je nach Untersuchungsgegenstand sagittale oder koronare Schnitte des Zielorgans nach dessen Präparation hergestellt. Die Schnittdicke liegt im Bereich mehrerer hundert Mikrometer. Anschließend werden die Schnitte auf eine semipermeable Membran gelegt, unter der sich wiederum das Kulturmedium befindet und durch deren - in der Regel 0,4µm weite - Poren eine diffusionsbasierte Ernährung der Schnittkulturen stattfinden kann.

Im Gegensatz z.B. zu primären Neuronenkulturen, deren Zellen üblicherweise aus Spender-Embryonen gewonnen werden, empfiehlt sich bei hirnanatomischen Schnittkulturen des Cerebellums die Zellentnahme am postnatalen Tag zehn bis zwölf (P10 - P12), weil in diesem Alter eine ausgereifere Morphologie mit höherer Stabilität und einem optimalen Überleben der Schnittkultur zu erwarten ist. Eine ausführliche Darstellung zu dieser Kulturform findet sich bei Humpel (5).

Um zu verhindern, dass die Untersuchung kultivierter Schnitte durch im Rahmen der Präparation auto- oder parakrin freigesetzte Substanzen beeinflusst wird, und damit andererseits sicherzustellen, dass eine ausreichende Reorganisation und Vernarbung innerhalb der Schnittkultur stattgefunden hat, empfiehlt es sich, Schnitte mindestens 10 bis 14 Tage in Kultur zu halten, bevor mit ihnen gearbeitet wird. Die bei der Schnittpräparation stattfindende Axotomie und Deafferenzierung zumindest einiger Teile des Präparats sind dabei ein erheblicher Stressfaktor und induzieren einen Zelluntergang besonders bei sich noch entwickelnden Neuronen, die auf target-derived neurotrophic factors angewiesen sind. Allerdings zeigten Untersuchungen, dass Purkinje-Zellen im Rahmen von Axotomien eine außergewöhnliche Stressresistenz aufweisen (10). Ausgenommen von diesem Störfaktor der verzerrenden Anpassung nach einer Deafferenzierung sind akute Schnitte, die, wenn sie direkt im Anschluss an die Präparation zur Entfernung endogen freigesetzter Substanzen gespült und danach untersucht werden, noch Charakteristika einer *in vivo* Situation aufweisen können.

Im Rahmen der Reorganisation und Vernarbung wird bei hirnanatomischen Schnittkulturen außerdem eine deutliche Höhenreduktion und Transparenzzunahme beobachtet, vermutlich als überlebenssichernde Anpassung an die diffusionsbasierte Ernährung von der Seite unterhalb der semipermeablen Membran aus (5, 8, 11). Neben der sichtbaren dreidimensionalen Gewebearchitektur ermöglicht es die hirnanatomische Schnittkultur, unterschiedliche ausgereifte Neuronentypen im gleichen Mikromilieu, in der gleichen Phase des Zellzyklus und unter kontrollierbaren Außenbedingungen zu untersuchen, da sich Neurone als enddifferenzierte Zellen in der terminalen Go-Phase außerhalb des replikativen Zellzyklus befinden (12). Somit könnten solche Schnittkulturen im Gegensatz zu primären Neuronenkulturen vergleichende Untersuchungen verschiedener Zelltypen ermöglichen, bei denen lediglich der zu untersuchende Zelltyp - und nicht die Umgebungsbedingungen - variiert. Insbesondere hirnanatomische

Schnittkulturen des Kleinhirns böten sich für vergleichende Untersuchungen aufgrund seiner evolutionären Konservierung sowie seiner regelmäßigen und reproduzierbaren Struktur an.

3.2 Kleinhirn

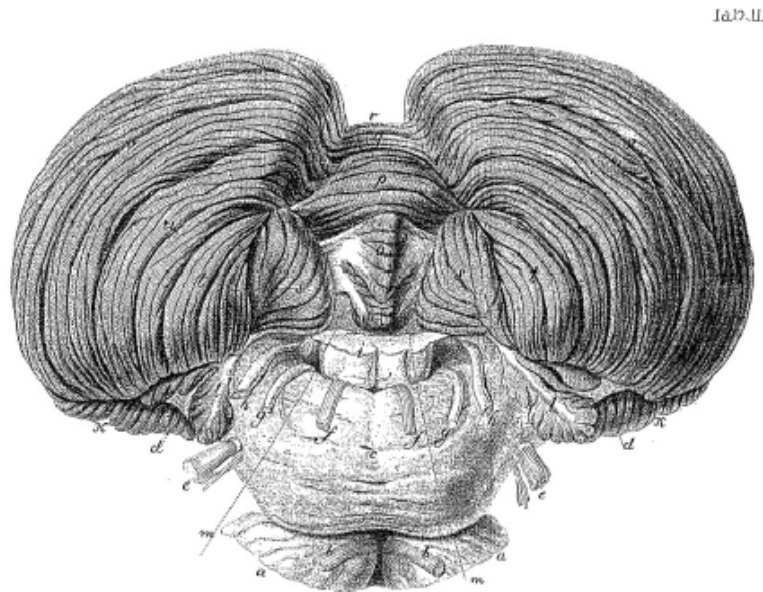


Abbildung 2. Ansicht von superior auf Kleinhirn und davorliegenden Hirnstamm. Gut zu erkennen sind die beiden seitlichen Hemisphären und der dazwischen liegende Vermis. Der Hirnstamm gliedert sich von kranial nach kaudal in Mesencephalon (Mittelhirn), Pons (Brücke) und Medulla oblongata (Verlängertes Mark). Abbildung entnommen aus: Reil JC. Fragmente über die Bildung des kleinen Gehirns im Menschen. Arch Physiol. 1807-1808;8:1-58 (13).

Die Forschungsarbeiten an Struktur und Funktion des Kleinhirns haben die Neurowissenschaften in vielerlei Hinsicht vorangebracht. Die histologische Beschreibung des cerebellären Cortex durch Jan Evangelista Purkyně in den 1830er Jahren gehörte zu den einflussreichen Argumentationen für die Neuronenhypothese. Darauf aufbauend veröffentlichte Santiago Ramon y Cajal nach Arbeiten mit der Golgi-Färbung am Kleinhirn von Vögeln seine ersten drei Publikationen, in denen er im Jahr 1888 erstmalig exakte Darstellungen des Verlaufs von Dendritenbäumen, Axonen und Kollateralen zeigte. Die Liste solcher wegweisenden Arbeiten ließe sich fortsetzen bis zur jüngeren Geschichte, in der der spätere Nobelpreisträger Sir John Eccles in den 1960er Jahren das Kleinhirn nutzte, um Nervenzellen genauer auf ihre elektrophysiologischen Eigenschaften hin zu untersuchen (vgl.(14)). Darüber hinaus zählen die GABAergen cerebellären Interneuronen zusammen mit der subventrikulären Zone des Frontalhorns der Seitenventrikel zu den am

meisten verbreiteten Beispielen dafür, dass im Rahmen der ontogenetischen Entwicklung des ZNS auch noch proliferierende Progenitor-Zellen von Neuronen in Migrationsbewegungen eintreten können (15).

Ein Aspekt unter anderen, der das Kleinhirn für Untersuchungen prädestiniert, ist seine sehr regelmäßig ausgeprägte, übersichtliche und evolutionär hoch konservierte Mikrostruktur (16). Eine weitere Eigenschaft, die das Cerebellum zu einem wichtigen Untersuchungsobjekt macht, ist die ungeheuer große Zahl an Neuronen, die sich dort befindet. Während der Cortex cerebri mit zunehmender Evolution des ZNS einen immer höheren relativen Anteil an der Gehirnmasse ausmacht - beim Menschen schließlich bis zu 80% - verfügt das Kleinhirn bei verschiedensten Wirbeltierarten relativ konstant nur über ca. 10% von deren Hirnmasse (17). Dafür sollen sich dort jedoch - je nach Art - bis zu 60% (Maus) oder 80% (Mensch) der Neuronen befinden (18, 19).

3.2.1 Allgemeiner Aufbau des Kleinhirns

Die Auseinandersetzung mit der cerebellären Anatomie führt unausweichlich in ein terminologisches Dickicht, das auf eine lange Geschichte von Namensgebungen durch verschiedene Anatomen zurückgeht und nur unter erheblichem Aufwand gelichtet werden kann. Aus diesem Grund reduziert sich das vorliegende Kapitel auf wesentliche Aspekte dieser Thematik.

Das Kleinhirn befindet sich in der hinteren Schädelgrube, wird durch den vierten Ventrikel und drei Fissurae vom Hirnstamm getrennt (Fissurae cerebellomesencephalicus, cerebellopontis, cerebellomedullaris), in denen sich die drei Kleinhirnarterien befinden. Es tritt mit diesem über drei paarig angelegte Kleinhirnstiele in Verbindung, Pedunculi cerebellares. Dabei beinhaltet der Pedunculus cerebellaris superior die Fasertrakte, die mit Cerebrum, Diencephalon und Mesencephalon kommunizieren, der Pedunculus cerebellaris medius diejenigen zur Pons und der Pedunculus cerebellaris inferior diejenigen zur Medulla oblongata (20).

Makroskopisch lässt sich das Kleinhirn einerseits in den Flocculus, der zusammen mit dem vermalen Nodus den Lobus flocculonodularis bildet, den Vermis und zwei

Hemisphären gliedern, deren Oberfläche vom histologisch dreischichtigen Cortex cerebelli bedeckt ist. Andererseits kann man einen phylogenetisch älteren Lobus anterior (vermaler Lobulus I - V und korrespondierende Hemisphären) vor der Fissura prima und einen in Teilen (Lobulus VI und VII und korrespondierende Hemisphären) vermutlich neueren Lobus posterior dahinter sowie den phylogenetisch ältesten Lobus flocculonodularis an der anteroinferioren Kleinhirnoberfläche unterscheiden. Der cerebelläre Cortex wiederum vertieft sich zur Oberflächenvergrößerung an zahlreichen Stellen zu den feinen Fissurae cerebellares, während sich die weiße Substanz im Inneren charakteristisch gewächsartig verzweigt und so den Arbor vitae bildet. Hierdurch ergibt sich der Eindruck, die gewellte cerebelläre Oberfläche hinge wie Blätter an Baumästen, weshalb der Begriff der Foliae cerebelli für diese Oberflächenstruktur geprägt wurde. Unterbrochen wird die weiße Substanz in ihrem Marklager alleine von den Nuclei (Ncl.) cerebellares, von dorsolateral nach ventromedial namentlich dem Nucleus (Ncl.) dentatus, dem Ncl. interpositus (entspricht den Ncll. globosus et emboliformis) und dem Ncl. fastigii, die jeweils bilateral symmetrisch angelegt sind.

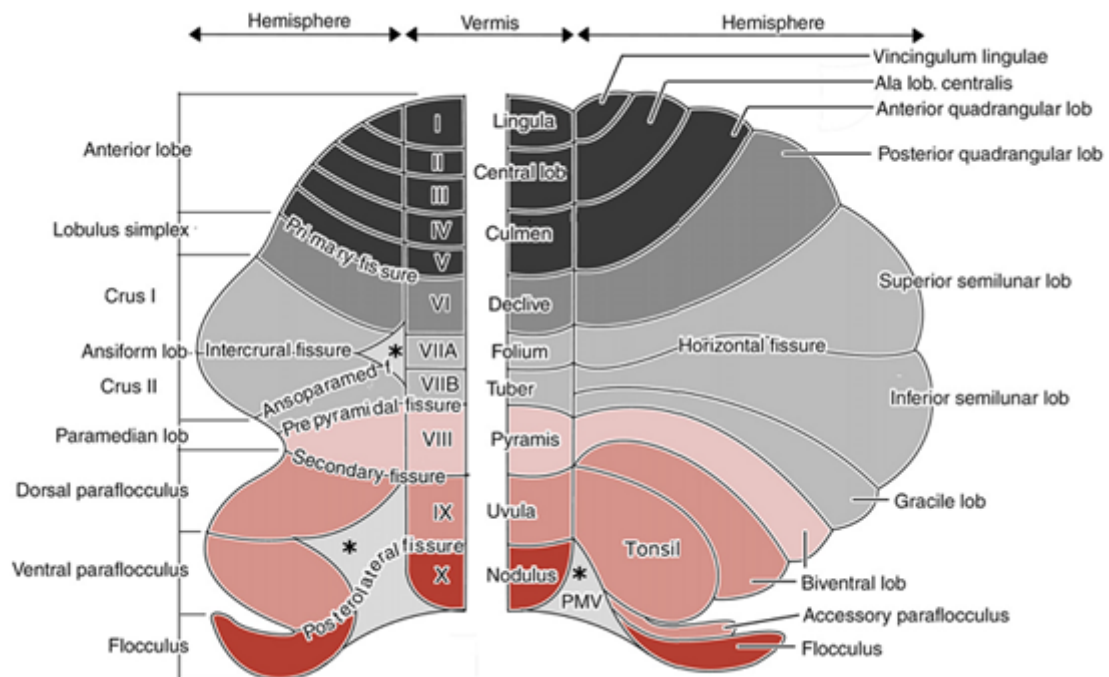
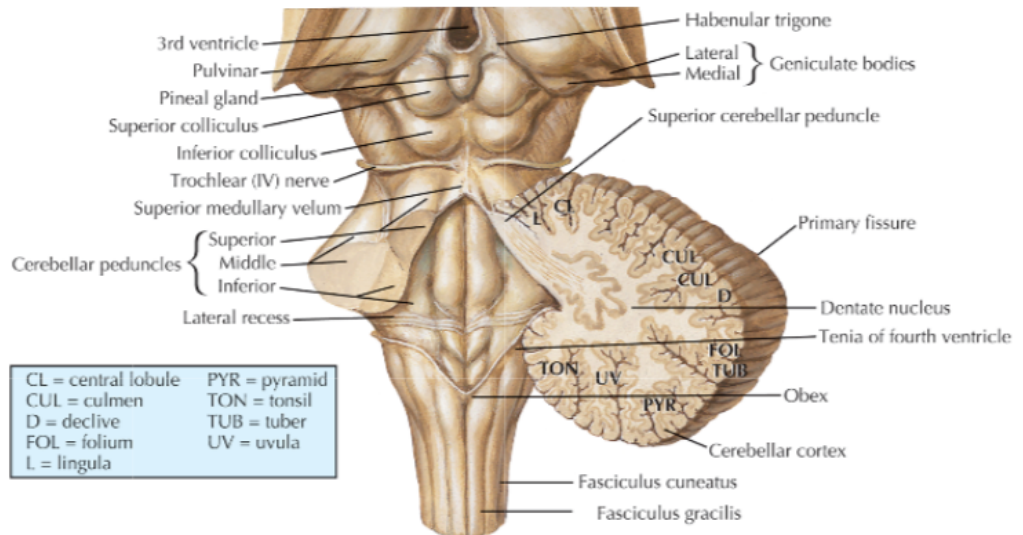


Abbildung 3. Schematische Darstellung der aufgefalteten und ausgebreiteten Kleinhirnrinde mit der Nomenklatur nach Bolk (1906) für die Hemisphären und nach Larsell (1952) für den Vermis (siehe Text). Die linke Hälfte entspricht der Kleinhirnrinde der Ratte, die rechte Hälfte der des Menschen. Die Sterne markieren Bereiche der Kleinhirnoberfläche ohne Rindenüberzug (PMV = paramedianer Vermis). Bereiche mit mutmaßlicher Homologie sind in den gleichen Farben dargestellt (Vgl. (14, 21)). Abbildung entnommen aus: Jan Voogd TJHR. Cerebellum and Precerebellar Nuclei. In: Mai P, editor. The Human Nervous System. London: Elsevier Inc.; 2012; 473 (21).

Makroskopisch lässt sich eine Lappchengliederung erkennen, bei der jedem Teil des Vermis ein Bereich der Hemisphären zugeordnet wird; dieser kann nach der anatomischen Nomenklatur nach Bolk benannt oder nach Larsell nummeriert werden (siehe Abb. 3) (22, 23). So korrespondieren auf der superioren Oberfläche die vermale Lingula (I) mit dem hemisphärischem Vincingulum lingulae (HI), der vermale Lobulus centralis (II und III) mit der Ala lobulus centralis (HII und HIII), Culmen (IV und V) mit dem Lobulus quadrangularis anterior (HIV und HV), Declive (VI) mit dem Lobulus quadrangularis posterior (HVI) und Folium (VII) mit dem Lobulus semilunaris superior (HVII). Auf der inferioren Oberfläche des Kleinhirns korrelieren Tuber (ebenfalls VII) mit den Lobuli semilunaris inferior et gracilis (HVII), Pyramis (VIII) mit dem Lobulus biventer (HVIII), Uvula (IX) mit der Tonsille (HIX) und Nodulus (X) mit dem Flocculus (HX). Flocculus und Nodulus bilden den phylogenetisch vermutlich ältesten Lobus flocculonodularis. Diese grundlegende Struktur ist zumindest über alle Säugetiere hochkonserviert, auch wenn die hemisphärischen Anteile häufig geringer ausgeprägt und anders benannt sind, so zum Beispiel bei Nagetieren (siehe auch (14, 16, 21)).

A. Posterior view



B. Lateral view

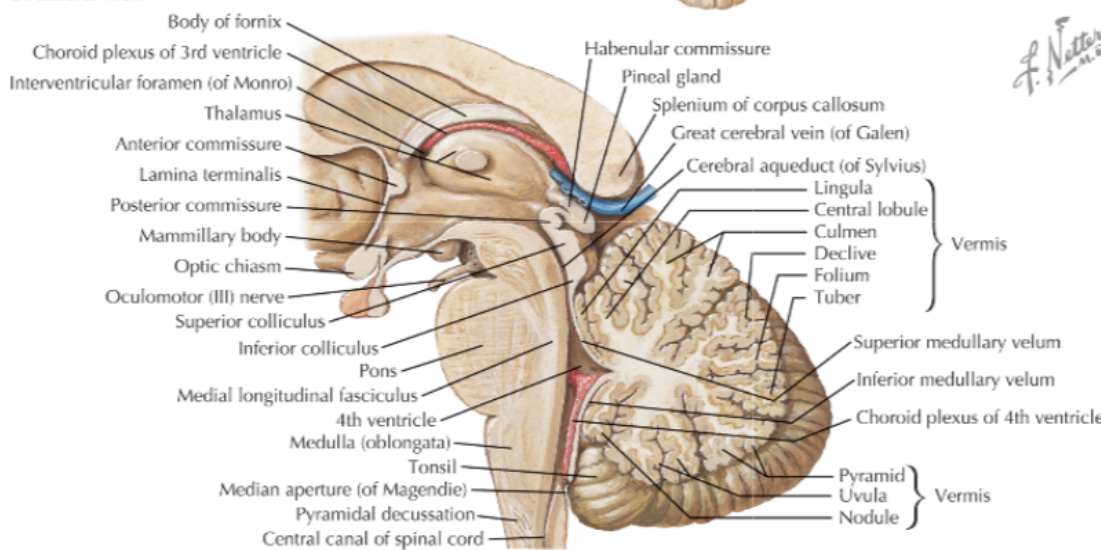


Abbildung 4. Übersicht über Topographie und makroskopische Anatomie des Kleinhirns. A: Blick von posterior. b: Sagittalschnitt mit dem charakteristischen Arbor vitae. Die Grube zwischen den Kleinhirnstielen und dem Lobulus flocculonodularis entspricht dem IV. Ventrikel. Abbildung entnommen aus: Felten DL, Kerry O'Banion M, Summo Maida M, Netter's Atlas of Neuroscience. Philadelphia: Elsevier; 2016; 286 (24).

Auf mikroskopischer Ebene sticht vor allem der dreischichtige Cortex cerebelli ins Auge (siehe Abb. 5). Er besteht von innen nach außen aus dem enorm zellhaltigen Stratum granulosum, dem mittleren Stratum purkinjense und dem äußeren zellarmen Stratum moleculare. Die als wichtigstes funktionelles Korrelat angesehenen großen Purkinje-Zellen liegen dabei zumeist einreihig im Stratum purkinjense, während sich die mit Abstand zellreichste Gruppe, die der Körnerzellen, im Stratum granulosum befindet. Die Körnerzellaxone strahlen als Parallelfasern in das Stratum moleculare aus, um dort auf die großen, fächerförmigen und zweidimensionalen Dendritenbäume der Purkinje-Zellen zu konvergieren. Diese grundlegende Beschreibung der histologischen Architektur des Cerebellums wurde im Rahmen der Diskussion um die Neuronenhypothese in der zweiten

Hälfte des 19. Jahrhunderts maßgeblich von dem Italiener Camillo Golgi und dem Spanier Santiago Ramon y Cajal geprägt (vgl. (25, 26)).



Abbildung 5. Die Elemente des cerebellären Cortex aus Santiago Ramon y Cajals Croonian Lecture. A: Purkinje-Zelle im Stratum purkinjense, B: Korbzelle im Stratum moleculare. Die Zelle oberhalb von B ist eine Sternzelle. Korb- und Sternzellen zusammen bilden die Interneurone der Molecularschicht (MLI: Molecular Layer Interneurons). C: Kletterfaser aus der kontralateralen Oliva inferior. D: Purkinje-Zell-Axon mit rekurrenten Kollateralen. E: Körnerzelle im Stratum granulosum. F: Parallelfaser (Axon der Körnerzelle). G: Rosette einer Moosfaser kurz bevor sie auf die Körnerzelle trifft. H: Axonaler Korb einer Korbzelle, der sich um den Zelleib einer Purkinje-Zelle und ihr proximales Axon legt. Vergleiche außerdem: (27). Abbildung entnommen aus: Ramon Y Cajal S. The Croonian Lecture: La Fine Structure des Centres Nerveux. Proceedings of the Royal Society of London. 1894;55:444-68 (28).

3.2.2 Purkinje-Zellen

Die Purkinje-Zellen wurden erstmals 1837 durch Jan Evangelista Purkyně ausführlich beschrieben, zwei Jahre vor Formulierung der Zellhypothese durch Theodor Schwann (27, 29). Sie wurden in Pionierarbeit durch Ito und Yoshida als GABAerge inhibitorische Neuronen charakterisiert (30) und von Sir John Eccles und Masao Ito elektrophysiologisch untersucht (31).

Die cerebellären Purkinje-Zellen haben wie alle GABAergen Neuronen des Kleinhirns, ihren Ursprung in der ventrikulären Zone der Flügelplatte des ersten Rhombomers (bspw.

(32-35), für weitere Referenzen vgl. (36)). Bei diesen großen Nervenzellen handelt es sich um die im Rahmen der ontogenetischen Entwicklung als erste entstehenden cerebellären Neuronen, um die herum sich die weitere Entwicklung organisiert. Außerdem sind sie der einzige Ausgang vom Kleinhirncortex durch Projektionen zu den Kleinhirnkernen und ein Beispiel der wenigen GABAergen Projektionsneuronen im ZNS (37, 38). Darüber hinaus sind sie die wichtigsten integrierenden funktionellen Einheiten des Kleinhirns, auf die alle Hauptgruppen cerebellärer Afferenzen konvergieren. Diese Hauptgruppen sind einerseits die Kletterfasern aus der kontralateralen Oliva inferior, die jeweils eine direkte Verbindung zum proximalen Dendritenbaum, insbesondere dem Soma der Purkinje-Zellen, aufnehmen und mit einer sehr geringen Zahl an Purkinje-Zellen eine enorm hohe Zahl an synaptischen Verbindungen eingehen. Auf diese Weise bildet eine Purkinje-Zelle nur Verbindungen mit einer Kletterfaser aus, eine Kletterfaser jedoch mit mehreren nebeneinanderliegenden Purkinje-Zellen. Dies ist eine Grundlage für die Definition der cerebellären Mikrozone.

Andererseits konvergieren beinahe die gesamten extraolivären Afferenzen, abgesehen von diffus terminierenden neuromodulatorischen Bahnen, in Form von Moosfasern zunächst an den zahllosen Körnerzellen des Stratum granulosum und über deren parallelfaserige Axone indirekt auf dem großen zweidimensionalen und fächerartigen Dendritenbaum der Purkinje-Zellen (siehe Abb. 5). Hierbei können sich die Parallelfasern bis zu 6 mm entlang der Längsachse der cerebellären Folia rechtwinklig zum Dendritenbaum der Purkinje-Zellen ausbreiten und bilden so eine jeweils geringere Menge an synaptischen Kontakten mit einer umso höheren Anzahl von Nervenzellen. Dies führt dazu, dass eine Purkinje-Zelle synaptische Kontakte zu ungefähr 80.000 Parallelfasern unterhält (21, 39).

Anders als früher vermutet, scheint das Cerebellum innerhalb dieser redundanten Architektur über den ganzen Cortex cerebelli und um das einschichtige Stratum purkinjense herum ein Maß an regelmäßiger Variabilität zu haben, das sich erst durch intensive Forschungsarbeit in den letzten Jahrzehnten zunehmend aufdecken ließ. So zeigen die Purkinje-Zellen ein regional unterschiedliches Genexpressionsmuster verschiedener Marker. An prominenter Stelle sei hier Zebrin-II (Aldolase C) genannt (weitere: HSP25, HNK1 uvm.), durch das der cerebelläre Cortex in Purkinje-Zell basierte Zebrin-II-positive und -negative alternierende ca. 100-300 µm breite longitudinale Mikrozonen eingeteilt

werden kann, die gleichzeitig mit distinkten rezeptiven Feldern der Kletterfasern und einer ähnlichen Repräsentation in der kontralateralen Oliva inferior korrespondieren (40-42). Die funktionelle Bedeutung dieser streifenartigen Architektur konnte noch nicht abschließend geklärt werden; sie bildet einen möglichen Anhaltspunkt für die Unterteilung der Purkinje-Zellen in Subgruppen.

Gleichzeitig weisen Purkinje-Zellen in Abhängigkeit von ihrer Lage innerhalb des Kleinhirns auch numerische und morphologische Unterschiede auf: vermale Purkinje-Zellen sind größer als hemisphärische; ihre Zelldichte ist im Lobus anterior größer als im Lobus posterior und im Apex foliae größer als an der Basis. Morphologische Unterschiede zeigen sich unter anderem darin, dass der proximale Dendritenbaum in den basalen Foliae regelhaft über zwei große Dendritenstämme verfügt, während man im apikalen Bereich der Foliae meistens nur einen vorfindet. Anhand dieser und weiterer regionaler anatomischer, physiologischer und molekulargenetischer Unterschiede innerhalb der Purkinje-Zellen lässt sich auch die Kleinhirnrinde in eine ganze Reihe von longitudinalen und transversalen Zonen, Modulen, Mikrozononen und Streifen einteilen, die an anderer Stelle genauer dargestellt werden (43, 44). Es bleibt aber festzuhalten, dass es sich selbst bei den anscheinend uniformen Purkinje-Zellen nach neueren Erkenntnissen nicht um eine einzige große gleichförmige Zellgruppe handelt, sondern dass diese noch in weitere Subgruppen unterteilt werden kann.

Elektrophysiologisch weisen die Purkinje-Zellen zwei unterschiedliche Aktionspotenzialmuster auf, die ebenfalls mit den beiden Hauptafferenzen korrespondieren, den Kletter- und den Moosfasern. Dabei zählen die meisten Entladungen zum „simple spike type“, weisen also in der elektrophysiologischen Untersuchung eine einfache Zacke durch schnelle gezielte Entladung bei einer relativ hohen Frequenz von 30-100 Hz auf, und werden über die Innervation durch die Parallelfasern der Körnerzellen induziert. Bei der zweiten Aktionspotenzialform handelt es sich um einen „complex spike“, der aus einer Kette von 2-5 kurzen Zacken innerhalb von 5-10 ms besteht, eine Frequenz von 1-10 Hz aufweist und durch die Aktivierung einer Purkinje-Zelle infolge der enormen Dichte der synaptischen Verbindungen einer Kletterfaser ausgelöst werden (31). Dabei sprechen Untersuchungen dafür, dass der bestimmende Faktor für die Purkinje-Zell-Aktivität im Wesentlichen die Koordination zwischen Kletterfaser- und Parallelfaserinput ist. Eine gleichzeitige starke Aktivierung durch Kletter- und Parallelfasern resultiert in einer

Langzeitdepression (LTD) im Sinne einer verminderten Sensitivität der Zelle für Parallelfaserstimulation (45-47). Umgekehrt führt eine repetitive Stimulation alleine durch Parallelfasern zum umgekehrten Fall einer Langzeitpotenzierung (LTP) (48-50).

Bei der Purkinje-Zelle handelt es sich also um ein großes, die innere Organisation des Cortex cerebelli bestimmendes Projektionsneuron, dessen Aktivität von den zwei wesentlichen Gruppen cerebellärer Afferenzen reguliert wird und deren Stimulation integriert. Sie dient in der kontemporären Wissenschaft als Mittel zur funktionellen Untergliederung des Kleinhirns im Sinne von redundant aufgebauten spinoolivär-cortico-nukleären Mikroschaltkreisen, die jedoch sowohl in morphologischer als auch in molekulargenetischer Hinsicht ein gewisses Maß an regelmäßiger regionaler Variabilität aufweisen. Purkinje-Zellen lassen sich immunhistochemisch mit dem calciumbindenden Protein Parvalbumin anfärben (s. Kapitel 3.2.3)

3.2.3 Interneuronen

Bereits Santiago Ramon y Cajal fiel im menschlichen Nervensystem die hohe Dichte an kleinen Nervenzellen mit kurzen Axonen auf, ein Faktor, auf den er die funktionelle Überlegenheit des menschlichen Gehirns gegenüber anderen Wirbeltieren zurückführte (51). Diese kleinen Nervenzellen mit kurzen, in der Regel in ihrem Ursprungsgebiet verbleibenden Axonen werden heutzutage als Interneuronen bezeichnet. Neocorticale Interneuronen machen dabei vermutlich etwa 10-20% aller Nervenzellen aus. Sie stehen zunehmend im Fokus der neurowissenschaftlichen Forschung aufgrund ihrer Fähigkeit, lange Projektionsneuronen und funktionelle Schaltkreise zu regulieren und untereinander zu verbinden. Diese Interneuronen lassen sich anhand der verwendeten Neurotransmitter, unter anderem Glutamat, Glyzin oder GABA, und der damit verbundenen exzitatorischen oder inhibitorischen Wirkung auf die Zielzelle unterscheiden. Hier ist anzumerken, dass prinzipiell auch ein inhibitorisches GABAerges Interneuron durch Hemmung anderer inhibitorischer Zielneuronen insgesamt exzitatorisch wirken kann. Daneben werden neocorticale Interneuronen zum Beispiel anhand [1] morphologischer, [2] elektrophysiologischer und schließlich [3] molekularbiologischer Eigenschaften in Subgruppen unterteilt. Ein Beispiel für diese Subgruppen ist die Unterteilung anhand anfärbbarer Markermoleküle wie dem evolutionär hoch konservierten calciumbindenden

Protein Parvalbumin, das als langsamer Puffer des cytosolischen Signalmoleküls Calcium dient und darüber vermutlich maßgeblich intrazelluläre Signalkaskaden beeinflusst, sowie dem Hormon Somatostatin und dem Serotonin-Rezeptor 5HT_{3a} (52). Anhand dieser Markermoleküle lassen sich die neocorticalen Interneuronen in grundlegende, sich in Funktion und Morphologie unterscheidende Gruppen gliedern. So handelt es sich bei Parvalbumin-positiven neocorticalen Interneuronen beispielsweise um schnellentladende GABAerge Interneuronen, die v.a. Soma und proximales Axon der Zielzelle innervieren und eine inhibitorische Wirkung an diesen entfalten. Diese Interneurongruppe wird mit einer Reihe neuropsychiatrischer Erkrankungen in Verbindung gebracht (53-56) und gilt unter anderem als entscheidend für die Erzeugung der 40-80Hz Gammaband-Oszillationen im EEG, die mit höheren kognitiven Leistungen assoziiert sind (52).

Inwiefern allerdings die neocorticalen Interneuronen zu den cerebellären Interneuronen in Beziehung stehen, ist noch nicht abschließend geklärt. Zu diesen werden die Golgi-, Lugaro-, Körner- und unipolaren Bürstenzellen (UBC) im Stratum granulosum sowie die Stern- und Korbzellen im Stratum moleculare gezählt (21). Abgesehen von den glutamatergen Körner- und UBCs, die aus einer eigenen embryologischen Ursprungszone hervorgehen (rhombic lip), handelt es sich dabei um GABAerge Neuronen, die wie die Purkinje-Zellen ebenfalls aus der ventrikulären Zone der Flügelplatte des ersten Rhombomers stammen. Im Gegensatz zu diesen entstehen jedoch die Stern-, Korb- und Golgi-Zellen erst postnatal aus bereits migrierten, noch teilungsfähigen Progenitorzellen. Diese Erkenntnis ist einer der prominentesten Hinweise darauf, dass auch noch mitosefähige Vorläuferzellen die Germinalzonen des ZNS verlassen und Migrationsbewegungen eingehen können (15, 38).

Bei den glutamatergen Körnerzellen handelt es sich um die zellreichste Neuronengruppe des ganzen Gehirns. Sie dienen als Ziel der cerebellären Afferenzen, die auch als Moosfasern bezeichnet werden, und als Ursprung von parallelfaserigen Axonen. Ausgehend von der innersten Schicht des cerebellären Cortex, dem Stratum granulosum, steigen diese in die äußerste Schicht auf, dem Stratum moleculare, um sich dort bis zu 6 mm lang - parallel zur transversalen Oberfläche und senkrecht zu den Dendritenbäumen der Purkinje-Zellen - auszubreiten. Auf diese Weise bilden sie jeweils relativ wenige synaptische Kontakte mit einer Vielzahl von Purkinje-Zellen aus, wirken an diesen erregend und vermitteln den Zusammenfluss der Informationen der cerebellären

Afferenzen auf die Purkinje-Zellen, die zentralen Integrationseinheiten. Bei den unipolaren Bürstenzellen handelt es sich ebenfalls um glutamaterge Interneuronen des Stratum granulosum, die nur in den ventralen cerebellären Lobuli vorkommen und deren Funktion an anderer Stelle ausführlicher behandelt wurde (57).

Zu der Gruppe GABAerger Interneuronen des Cerebellums zählen die Golgi-Zellen, die sich lokal im Stratum purkinjense ausbreiten, die Lugaro-Zellen und die Interneuronen des Stratum moleculare (Sternzellen und Korbzellen = MLI = Molecular layer interneurons). Dabei erzeugt das Zusammenspiel aus den Lugaro-Zellen des Stratum granulosum, die direkt von den Purkinje-Zellen innerviert werden, und den MLIs, die ihrerseits wiederum die Purkinje-Zellen innervieren, einen Rückkopplungsmechanismus, über den die Purkinje-Zellen sich selbst regulieren. Gleichzeitig sind die Lugaro-Zellen das Hauptziel der modulierenden diffusen serotonergen Afferenzen des Kleinhirns.

Bei den MLIs handelt es sich im Wesentlichen um zwei morphologisch unterschiedene schnellentladende Zelltypen, die auch untereinander durch elektrische Synapsen verbunden zu sein scheinen und Axonkollateralen sowohl von Purkinje-Zellen als auch von Parallelfasern erhalten. Zum einen gehören hierzu die oberflächlich liegenden axono-dendritischen Sternzellen, deren Zielgebiet insbesondere die Dendritenbäume der Purkinje-Zellen sind, an welchen auch die Parallelfasern ansetzen. Zum anderen zählen dazu die etwas tiefer gelegenen, axono-somatischen Korbzellen, deren Axone sich namensgebend wie ein Korb um das Soma der Purkinje-Zellen schlingen, an dem auch die Kletterfasern aus der kontralateralen Oliva inferior ansetzen. Da diese beiden Zelltypen eine deutliche Überlappung zeigen, gibt es eine anhaltende Kontroverse darüber, ob eine Unterteilung der MLIs in Subgruppen berechtigt ist (ausführlich von Sotelo behandelt in (15)). Genau wie Purkinje-Zellen lassen sich die MLIs über indirekte Immunfluoreszenz des calciumbindenden Proteins Parvalbumin darstellen. Wie bereits erwähnt, handelt es sich bei Parvalbumin um ein evolutionär hochkonserviertes Protein mit zwei Bindungsstellen für Calcium, das als langsamer Puffer des Second messengers Calcium fungiert. Es wird im Rahmen der cerebellären Entwicklung erst nach anderen calciumbindenden Proteinen - wie zum Beispiel dem Calbindin-D28K der Purkinje-Zellen - parallel zur ansteigenden elektrophysiologischen Aktivität exprimiert. Obwohl die genaue Funktion von Parvalbumin noch nicht vollständig geklärt ist, deuten Parvalbumin-Knockoutversuche mit Mäusen auf eine grundlegende Relevanz für die physiologische

Aktivität von Nervenzellen hin. So verwandeln sich ursprünglich inhibitorische Neurone durch den Knockout in fazilitierende Nervenzellen und kehren ihren Einfluss damit um (58-60). Es lassen sich im Kleinhirn also verschiedene Neuronentypen (Purkinje-Zellen und Parvalbumin-positive MLIs) mit dem gleichen Haupttransmitter, embryologischen Ursprung und in topographischer Nähe zueinander durch einen einzigen molekularen Marker darstellen. Gleichzeitig handelt es sich bei diesen Neuronentypen um Stellvertreter der Kategorien „Projektionsneuron“ (PZ) und „Interneuron“ (PVI).

3.2.4 Funktionen und Pathologien des Kleinhirns

Lange Zeit stammten die einzigen Erkenntnisse über die Funktion des Kleinhirns aus Einzelfällen, in denen die Betroffenen ein Trauma der hinteren Schädelgrube und dementsprechende Ausfälle erlitten hatten. Bereits Galenus von Pergamon verband das Kleinhirn mit motorischen Funktionen. Allerdings waren infolge der unspezifischen Natur des Schädel-Hirn-Traumas auch andere Traumafolgen zu beobachten - vom Ausfall der Gedächtnisfunktionen (Nikolaas Tulp, 1641) bis zum Ausfall der Vagusfunktionen (Thomas Willis, 1664), teilweise wegen der topographischen Nähe dem Hirnstamm zuzuordnen. Erst die Einführung von gezielten Läsionsstudien an Tieren durch Luigi Rolando und Pierre Flourens, deren Erfolg maßgeblich von Prinzipien der Asepsis und Blutstillung und damit der Überlebensdauer der Tiere abhing, führte im frühen 19. Jahrhundert zu einer genaueren Differenzierung. So wurde die motorische Koordination als Funktion des Kleinhirns der Säugetiere erkannt. Der französische Mediziner Joseph Babinski und der irische Arzt Gordon Holmes schließlich waren es, denen mit post-mortem Läsionsstudien am Menschen eine weitere Differenzierung in klassische Ausfallzeichen des Kleinhirns wie Dysdiadochokinese, Hypermetrie, Hypotonie und einen mangelnden Rebound gelang. Gordon Holmes konnte in den Nachwehen des ersten Weltkrieges viele britische Kriegsveteranen untersuchen, die aufgrund des charakteristischen britischen Tellerhelmes anfällig für Läsionen der hinteren Schädelgrube waren. Er führte den Finger-Finger-, den Finger-Nase- und den Knie-Hacke-Versuch sowie die Untersuchung alternierender Bewegungen und des Rebounds zur Diagnostik von Kleinhirnschäden ein (14).

Der Italiener Luigi Luciani bemerkte bereits gegen Ende des 19. Jahrhunderts, dass Kleinhirngeschädigte auch psychische Phänomene zeigen können. Heute ist in der

Neurochirurgie bekannt, dass ungefähr ein Viertel der Kinder mit cerebellärem Mittellinientumor nach Resektion temporär einen cerebellären Mutismus zeigen (61). Der aktuelle Trend, dem Kleinhirn zunehmend auch nichtmotorische Funktionen zuzusprechen, hat somit alte Wurzeln. Diese Entwicklung gipfelte zunächst in der Beschreibung des cerebellären kognitiv-affektiven Syndroms durch Jeremy D. Schmahmann, das zur Beeinträchtigung von Sprache, visuell-räumlichen und exekutiven Funktionen sowie affektiver Dysregulation führt (62). Wie genau die cerebellären Schaltkreise verschiedenste Funktionen auf physiologischer Ebene beeinflussen sollen, ist in extenso an anderer Stelle beschrieben (63).

Das ausgeprägte wissenschaftliche Interesse an Physiologie und Pathologie des Kleinhirns sind dadurch begründet, dass sowohl die Kerne als auch der Cortex des Cerebellums bei einer Vielzahl von Erkrankungen betroffen sind. Ein solcher Krankheitsbefall äußert sich häufig in ausgeprägten und die Lebensqualität deutlich einschränkenden Symptomen wie Dauerschwindel, Abasie, Astasie oder gestörter Zielmotorik. Neben inflammatorischen Systemerkrankungen des Nervensystems wie der Multiplen Sklerose befallen eine Reihe von neurodegenerativen Erkrankungen das Kleinhirn (64). Hierzu zählen die meistens sporadisch auftretende und durch Akkumulationen von α -Synuclein charakterisierte Multi-System-Atrophie (MSA) genauso wie die angeborenen und in der Regel autosomal-dominant über CAG-Repeat-Expansionen vererbten spinocerebellären Ataxien (SCA), die mittlerweile über 40 Subtypen zählen (65). Während diese beiden Krankheitsentitäten vorwiegend zu einer Degeneration der Purkinje-Zellen mit variabler Beteiligung des Nucleus dentatus führen, verhält es sich bei der am häufigsten vererbten Ataxie genau umgekehrt. Die Friedreich-Ataxie, regelhaft auftretend mit einer Affektion des Cerebellums, der spinalen Hinterstränge sowie einer peripheren axonalen Neuropathie, wird ebenfalls auf eine Trinukleotid-Repeat-Expansion innerhalb des FXN Gens mit einer gestörten Transkription des Proteins Frataxin zurückgeführt. Dabei fällt neuropathologisch zunächst ein Untergang der großen Neuronen des Nucleus dentatus auf, während die Purkinje-Zellen erst spät im Verlauf degenerieren (66).

Bemerkenswert ist zudem, dass der cerebelläre Cortex zwar eine ausgesprochene Resistenz selbst gegenüber schweren Hypoglykämien zeigt. Gleichzeitig wird jedoch ebenfalls eine ausgesprochene selektive (auch innerhalb des Nervensystems auffallend starke) Vulnerabilität der Kleinhirnrinde gegenüber Hypoxie und Ethanoltoxizität

beobachtet, was u.a. die frühen cerebellären Symptome im Rahmen von Alkoholintoxikationen sowie eine ausgeprägte Affektion des Kleinhirns bei chronischem Alkoholabusus erklären könnte (65).

Obwohl Purkinje-Zellen als außerordentlich stressresistente Zellen angesehen werden, die beispielsweise eine Axotomie stabil überleben können, gibt es also eine ganze Reihe von Pathologien, die die Kleinhirnrinde im Allgemeinen und die Purkinje-Zellen im Besonderen affizieren und deren pathologische Mechanismen (Hypoxie/Ischämie, Neurodegeneration, Nährstoffmangel, Substanztoxizität) zumindest in Verbindung stehen zu dem zentralen homöostatischen zellbiologischen Prozess, den die Autophagie darstellt und der im Weiteren ausgeführt werden wird (10, 66). Zur Beteiligung der cerebellären MLIs bei vorgenannten Pathologien oder einem Vergleich der Vulnerabilität zwischen MLIs und Purkinje-Zellen ist die zeitgenössische Literatur nach Recherchen des Autors allerdings wenig aufschlussreich.

3.3 Autophagie

*„[Ich bin] ein Teil von jener Kraft,
Die stets das Böse will und stets das Gute schafft.
Ich bin der Geist der stets verneint!
Und das mit Recht; denn alles, was entsteht,
Ist wert, dass es zugrunde geht;
Drum besser wär's, dass nichts entstünde.
So ist denn alles, was ihr Sünde,
Zerstörung, kurz das Böse nennt,
Mein eigentliches Element.“*

Mephistopheles in Johann Wolfgang von Goethe: Faust - Der Tragödie erster Teil

Wie Dichter und Philosophen schon seit Jahrhunderten betonte auch Johann Wolfgang von Goethe (1749 - 1832) Zerstörung und Verneinung als einen universalen Bestandteil des Kreislaufs des Lebens, der Wachstum und Schöpfung erst ermöglicht. Es war nur eine Frage der Zeit, bis dieses Prinzip auch bei höheren Eukaryoten als wesentlicher Aspekt zellulären Überlebens in den Fokus geriet. Obwohl Erwähnungen der *autophagia* (griech.:

selbst essen) im biologischen Kontext mindestens bis in die zweite Hälfte des 19. Jahrhunderts zurückverfolgt werden können, gilt die Prägung der Begriffe der *autophagic vacuole* genauso wie der *heterophagic* und *autophagic function* von Lysosomen im Jahr 1963 durch den Belgier Christian de Duve als Beginn der modernen naturwissenschaftlichen Forschung zum Thema der Autophagie (67, 68).

Dabei handelt es sich um einen von Pflanzen über Hefen bis zu Wirbeltieren feststellbaren Teil eines grundlegenden zellulären Wiederaufbereitungsmechanismus, der beschädigte Organellen und intrazelluläre Proteinaggregate in Doppelmembranvesikel einschließt und den Lysosomen zum Abbau zuführt (69). Diese wiederum zerlegen die Strukturen in ihre Grundbausteine, vor allem in Aminosäuren, stellen sie der Zelle erneut zur Verfügung und sichern so die zelluläre metabolische Homöostase sowie eine Qualitätskontrolle der Zellorganellen und –proteine (siehe Abb. 6). Hierbei überschneidet sich die Autophagie mit dem Ubiquitin-Proteasom-System, das besonders auf den Abbau kleinerer Proteine spezialisiert ist. Dabei scheinen diese beiden Systeme sich in gewissem Rahmen gegenseitig kompensieren zu können (70). Gleichzeitig mehren sich die Hinweise, dass die Autophagie kein Mechanismus ist, der nur vor Zelluntergang schützt, sondern auch die Apoptose vermitteln kann, den programmierten Zelltod (71).

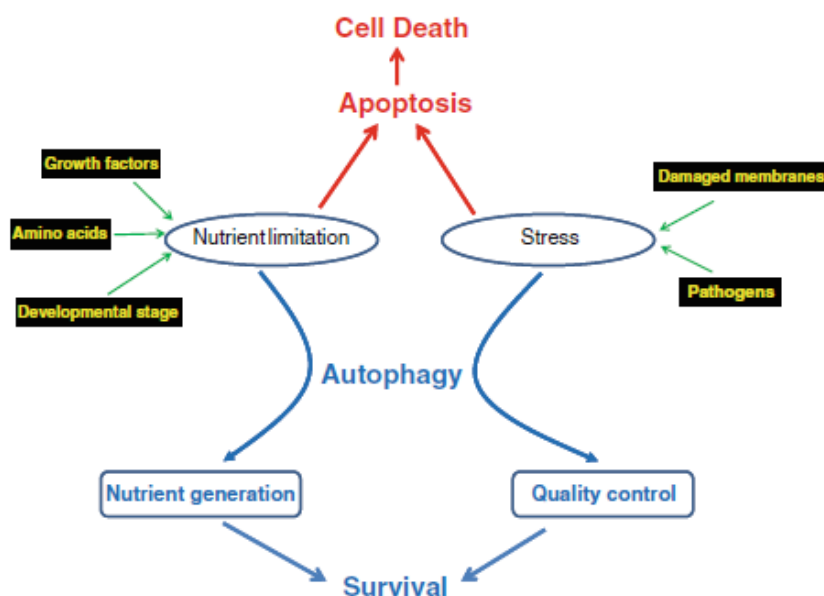


Abbildung 6. Übersicht über die homöostatische Rolle der Autophagie im Zellmetabolismus. Nach dem aktuellen Autophagiemodell befindet sich die Autophagie an der Schnittstelle zwischen Zellüberleben und -untergang. Klassischerweise wird sie als ein Mechanismus aufgefasst, der das Zellüberleben sichert. Allerdings mehren sich die Hinweise, dass die Autophagiemaschinerie die Apoptose unter bestimmten Umständen selbst einleiten kann (siehe Text). Abbildung entnommen aus: Burman C, Ktistakis NT. Autophagosome formation in mammalian cells. *Semin Immunopathol.* 2010;32(4):397-413 (72).

Aus der kontemporären wissenschaftlichen Perspektive wird die Autophagie je nach Zielstruktur allgemein in eine Makroautophagie (im Weiteren nur noch als Autophagie bezeichnet), eine Mikroautophagie und eine Chaperon-vermittelte Autophagie zum Abbau fehlgefalteter Proteine unterteilt. Gleichzeitig unterscheidet man eine basale, d.h. konstitutiv „im Hintergrund“ laufende Autophagie von einer durch besondere Umstände wie Nährstoffmangel oder den Zellmetabolismus beanspruchende Vorgänge wie Zellteilung und -differenzierung induzierten Autophagie. Das Grundprinzip aller Autophagieformen ist der Einschluss von Zielstrukturen in ein intrazelluläres Vesikel mit doppelter Phospholipidmembran, das Autophagosom, anschließender Fusion des Autophagosoms mit einem Lysosom zu einem Autophagolysosom und konsekutiver Spaltung des Inhalts durch saure Hydrolasen in seine Grundbestandteile im durch die v-ATPase, eine Protonenpumpe, angesäuerten Milieu des ehemaligen Lysosoms (73).

3.3.1 Molekulare Mechanismen der Autophagie

Obwohl die molekularen Mechanismen der Autophagie gerade erst im Begriff sind, detailliert erforscht zu werden, erweisen sie sich bereits aufgrund ihrer Interaktionen mit beinahe allen anderen Zellsystemen als außerordentlich komplex. Deshalb wird in der vorliegenden Arbeit der Schwerpunkt auf die für die nachfolgenden Untersuchungen relevanten Prozesse der Autophagosomenbildung und -maturation gelegt. Viele der an bei Säugetieren ablaufenden Vorgängen beteiligten Proteine (Ursprungsgene: ATG = Autophagy-related genes) wurden zunächst in Hefen entdeckt und später als analoge Mechanismen in Säugetierzellen identifiziert (69); für eine ausführliche Beschreibung der molekularen Mechanismen der Autophagie siehe (68).

3.3.1.1 Bildung von Autophagosomen

Die Strukturen, die an der Bildung von Autophagosomen beteiligt sind, lassen sich zunächst in drei Komplexe gliedern: den Induktionskomplex, den Nukleationskomplex und den Elongationskomplex (siehe Abb. 7) (74).

Der **Induktionskomplex** bildet sich um die Serin/Threonin-Kinase ULK1 (75). Unter normalen Bedingungen bindet sich mTORC1, vermutlich der Schlüsselregulator der Autophagie, an den ULK1-Induktionskomplex, phosphoryliert und inaktiviert diesen. Unter der Bedingung des Aminosäuremangels allerdings wird mTORC1 selbst inaktiviert und ermöglicht so die Translokation des ULK1-Komplexes zur Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER), bindet sich dort mit seinem C-terminalen Ende und kann nun den nachgelagerten Nukleationskomplex phosphorylieren und damit aktivieren. Gleichzeitig phosphoryliert der ULK1-Komplex selbst eine Untereinheit von mTORC1, RAPTOR, wodurch die Bindungswahrscheinlichkeit von mTORC1 an den ULK1-Komplex weiter gesenkt und damit eine positive Verstärkung dieses Prozesses erreicht wird.

Der **Nukleationskomplex** wiederum sammelt sich um die Lipidkinase Vps34 und das Protein Beclin-1 (BECN1) (76). Nach seiner Aktivierung synthetisiert dieser Vps34-Komplex Phosphatidylinositol-3-Phosphat (PI3P) (77). PI3P wiederum wird wesentlicher Bestandteil einer PI3P-reichen Membranplattform, die mit der Membran des ER in Verbindung steht, dem Omegasom. PI3P dient dabei mittelbar über weitere Proteine (DFCP1 und WIPI-Familie) der Rekrutierung des Elongationskomplexes an das Omegasom.

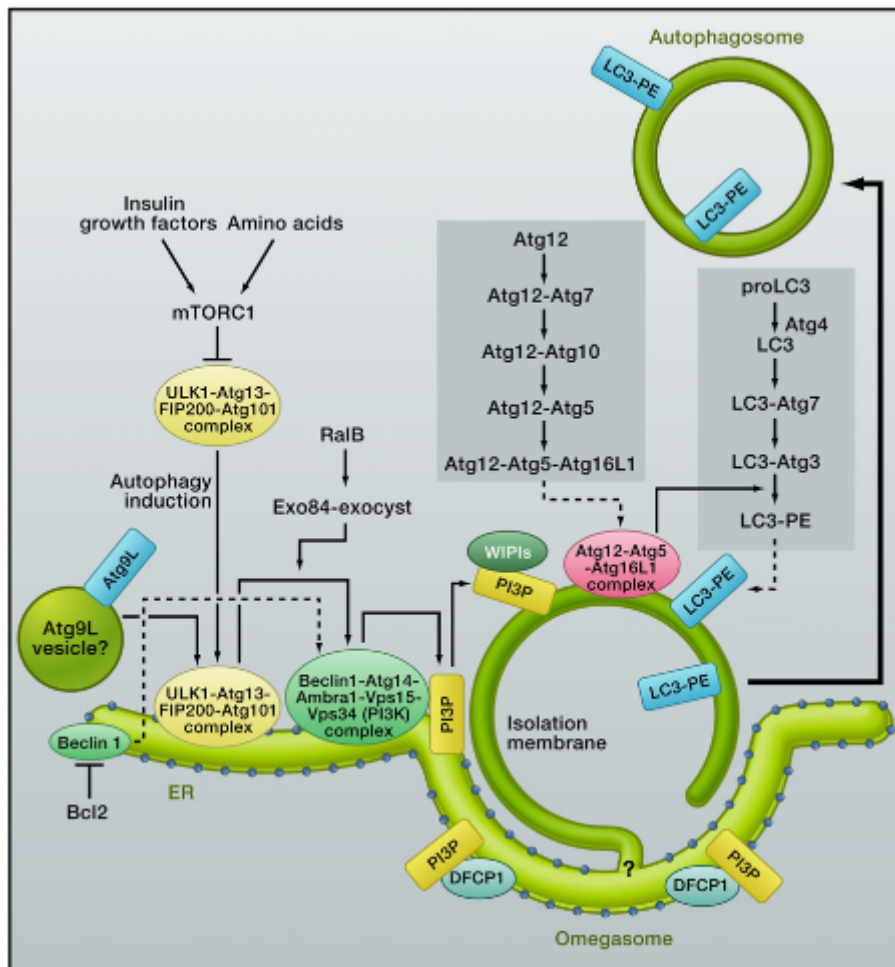


Abbildung 7. Übersicht über die molekularen Mechanismen der Autophagosomenbildung. Im Zentrum steht der Induktionskomplex um die Serin/Threonin-Kinase ULK1, der Nukleationskomplex um die Lipidkinase Vps34 und der Elongationskomplex aus den ATG12- und LC3-Systemen. Ein zentraler und konstitutiv inhibitorischer Regulator ist der Komplex um mTORC1, der wiederum durch Wachstumsfaktoren und Nährstoffmangel (insbesondere Aminosäuremangel) supprimiert werden kann (siehe Text). Abbildung entnommen aus: Mizushima N, Komatsu M. Autophagy: renovation of cells and tissues. Cell. 2011;147(4):728-41 (74).

Der **Elongationskomplex** schließlich besteht aus zwei Ubiquitin-ähnlichen Konjugationssystemen (ATG12-Konjugationssystem und LC3-Konjugationssystem), deren Funktion es ist, Mitglieder der LC3-Proteinfamilie an das Phospholipid Phosphatidylethanolamin (PE) in der Membran des Omegasoms zu binden (74). Mittlerweile wurden sieben Mitglieder dieser Proteinfamilie identifiziert, wobei das MAP1-Leichtketten-3-assoziierte LC3B am häufigsten vorkommt (neben LC3A und C sowie den vier Gammaaminobutyrat-Rezeptor-assoziierten Proteinen). Dabei wird LC3B (16 kDa) eine Mediatorenrolle in der Expansion und dem Membranschluss des entstehenden Autophagosoms zugeschrieben. Es verbleibt nach Konjugation mit Phosphatidylethanolamin als LC3B2 (14 kDa) an der Autophagosomenoberfläche (im Gegensatz zum vorwiegend cytosolischen LC3B1, 16 kDa), während der ATG12-Komplex kurz vor Fertigstellung des Autophagosoms von diesem dissoziiert (78, 79). Aus diesem

Grund kann die immunzytochemische Markierung mittels indirekter Immunfluoreszenz von LC3B zur mikroskopischen Darstellung von Autophagosomen genutzt werden. Außerdem dient das Autophagosom-gebundene LC3B2 als Rezeptorstruktur für substratbindende Proteine wie p62/SQSTM1, wodurch die spezifische Substratzufuhr in das Autophagosom reguliert wird (80). Als Membranquelle für die Synthese von Autophagosomen dienen eine Vielzahl unterschiedlichster Zellorganellen vom ER bis zu den Mitochondrien, wofür es in den letzten Jahren zahlreiche Hinweise gab (81, 82).

3.3.1.2 Maturation von Autophagosomen

In multizellulären Organismen folgt der Autophagosomenbildung die Maturation, die auf unterschiedliche Art und Weise stattfinden kann (in Hefen wiederum findet nach der Formation direkt eine Verschmelzung mit der Vakuole statt (vgl. (83))).

Zum ersten bezeichnet die Maturation die Progression zu einem Autolysosom durch Fusion mit einem präformierten Lysosom und konsekutiver Degradation des Inhalts. Während Autophagosomen sich vor allem in der Zellperipherie bilden, findet die Verschmelzung mit Lysosomen insbesondere perinukleär nach retrograder (Dynein-vermittelter) Wanderung der Autophagosomen statt; es gibt aber auch eine anterograde (Kinesin-vermittelte) Bewegung der Lysosomen (84, 85). Beim Transport durch Motorproteine sowie bei der Membranerkennung zur Fusion mit Lysosomen spielen spezifische, an die Autophagosomenmembran gebundene GTP-abhängige Rab-Proteine (Ras related protein in the brain) wie Rab 7 eine wichtige Rolle durch Bindung an Effektorproteine (86). Für die Fusion dieser beiden Membranvesikel macht man u.a. die SNARE-Proteine Qa, Qb, Qc und R verantwortlich, die auf gegenüberliegenden Membranen verankert sind und diese mittels Verdrillung ihrer Helixstrukturen zueinander ziehen (87). Diese Fusion des doppelmembranhaltigen Autophagosoms mit einem Lysosom aus einer einfachen Membran geht mit einem Kollaps der inneren Autophagosomenmembran einher. Allerdings wurde ebenfalls gezeigt, dass die Maturation von Autophagosomen in degradative Vesikel durch eine schrittweise Rekrutierung von lysosomalen Membranproteinen, Hydrolasen und Ansäuerung des Vesikellumens erreicht werden kann (88).

Zum zweiten kann ein Autophagosom auch mit einem Endosom verschmelzen und zur Entstehung eines sogenannten Amphisom führen, bevor dieses wiederum zur Degradation ebenfalls mit einem Lysosom verschmilzt (83). Hier zeigt sich eine Verbindung zwischen der Autophagiemaschinerie und der zellulären Endozytose, also der vesikulär vermittelten Aufnahme von extrazellulären Strukturen in die Zelle, und somit eine mögliche gemeinsame Endstrecke dieser Zellprozesse (siehe Abb. 8).

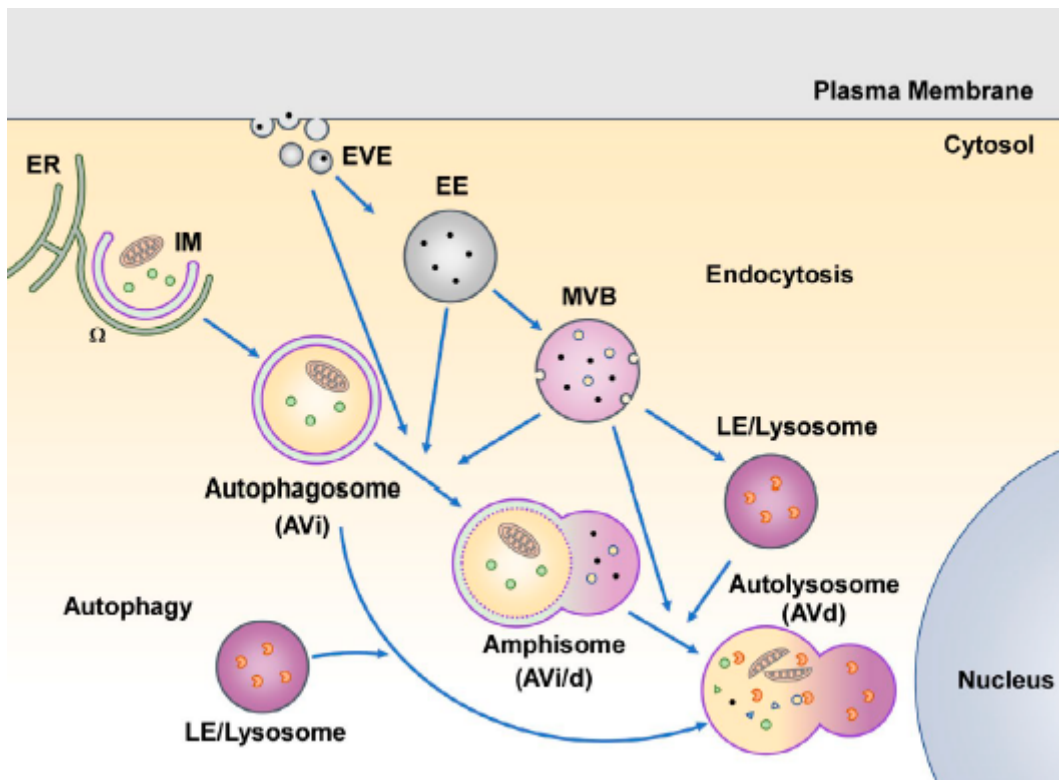


Abbildung 8. Lebensweg der Autophagosomen bis zur Verschmelzung mit Endosomen und/oder Lysosomen. Während Autophagosomen intrazelluläre Strukturen einschließen, bilden sich Endosomen durch die Aufnahme extrazellulärer Strukturen. Lysosomen dienen beiden Transportwegen als Endziel zum Abbau des jeweiligen Inhalts. EVE: earliest vesicular endocytic vesicles. EE: Early Endosomes. MVB: Multivesicular Bodies. LE: Late Endosomes. Abbildung entnommen aus: Zhao YG, Zhang H. Autophagosome maturation: An epic journey from the ER to lysosomes. *J Cell Biol.* 2019;218(3):757-70 (83).

Zum dritten schließlich wurde eine „kiss-and-run fusion“ beschrieben, bei der Autophagosomen kurzfristig mit Lysosomen verschmelzen, ihren Inhalt in diese transferieren und sich anschließend wieder vollständig lösen (84). Die molekularen Hintergründe dieses Verfahrens konnten bisher allerdings noch nicht vollständig ermittelt werden.

3.3.1.3 Regulation der Autophagie

Obwohl die Autophagie über eine Vielzahl von Wegen mit beinahe allen zellulären Prozessen interagiert, gibt es einen zentralen Regulator, der insbesondere von der Versorgungssituation der Zelle mit Nährstoffen bestimmt wird: mTORC1, ein Proteinkinasekomplex aus mehreren beteiligten Strukturen (vgl. (89, 90)) :

1. mTOR (mammalian target of rapamycin)
2. RAPTOR (regulatory associated protein of mTOR)
3. AKT1S1 (AKT1 substrate 1)
4. DEPTOR (DEP-domain-containing mTOR-interacting protein)
5. MLST8 (mTOR-associated protein LST8 homologue)

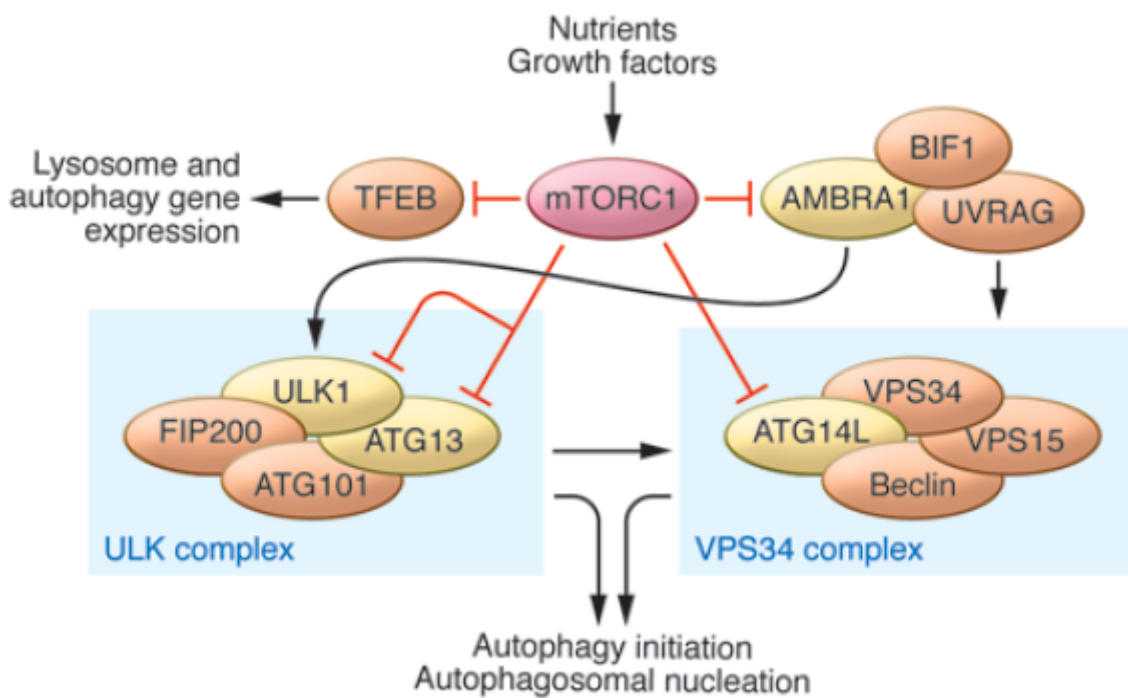


Abbildung 9. Zusammenfassung der zentralen regulatorischen Rolle von mTORC1 (siehe Text). Abbildung entnommen aus: Kim YC, Guan KL. mTOR: a pharmacologic target for autophagy regulation. J Clin Invest. 2015;125(1):25-32 (90).

In seiner aktiven Form fördert mTORC1 grundlegende Prozesse des Zellstoffwechsels wie Protein-, Lipid- und Nukleotidsynthese und auch die Glykolyse, während es die Induktion der Autophagie hemmt, indem es den Initiationskomplex inaktiviert (siehe Abb. 9). Kommt es innerhalb der von mTORC1 stimulierten Stoffwechselwege zu einer geringeren Produktion von Lipiden, Nukleotiden und ATP, dissoziiert mTORC1 vom

Initiationskomplex, ermöglicht die Steigerung der zellulären Wiederverwertung durch Autophagie und erhöht das Substrataufkommen für besagte Stoffwechselwege. Dabei scheint ein Aminosäuremangel grundsätzlich der stärkste Reiz für eine Induktion der Autophagie zu sein (91).

Nach dem vorherrschenden Modell ist die Regulation des an vielen Zellprozessen beteiligten mTORC1 sehr komplex. Vereinfacht dargestellt binden verschiedene Stoffwechselsubstrate an Proteine, die mit mTORC1 interferieren. Für die Aminosäure Leucin zum Beispiel konnte gezeigt werden, dass sie an das Protein Sestrin2 bindet, das in dieser Form nicht die weiterführenden Proteine GATOR 2 und 1 inaktivieren kann. In aktiver Form erhöht GATOR2 über GATOR1 die mTORC1-Aktivität. Ist also genug Leucin vorhanden, wird die Autophagie gehemmt. Kommt es zu einem Leucinmangel, so ist Sestrin2 frei, GATOR2 von der mTORC1-Aktivierung abzuhalten, und die Autophagie wird stimuliert (92). Ähnliche Mechanismen konnten für den stimulierenden Einfluss von zellulären Wachstumsfaktoren auf die Autophagie über die PI3-Kinase (PI3K) und die MAP-Kinase (MAPK) nachgewiesen werden (93).

Ein wichtiger Gegenspieler von mTORC1, das die Autophagie in aktivem Zustand vermindert, scheint die AMPK (AMP-dependent protein kinase) zu sein. Deren Aktivität ist abhängig von dem Verhältnis von AMP zu ATP in der Zelle. Eine Nährstoffunterversorgung, einhergehend mit einem hohen AMP-Spiegel, führt zur Autophagiesteigerung über mTORC1-Phosphorylierung und -inaktivierung einerseits und zur direkten Aktivierung des Initiationskomplexes über ULK1-Phosphorylierung andererseits (94).

3.3.2 Neuronale Autophagie

Da es sich bei Neuronen in der Regel um hochdifferenzierte, langlebige und postmitotische Zellen handelt, die auf eine effektive zelluläre Homöostase und Protektion gegen Stressoren wie z.B. Mangelzustände angewiesen sind, erfährt die neuronale Autophagie besondere wissenschaftliche Aufmerksamkeit (vgl. (95)). Dass ein Ausfall der basalen Autophagiemaschinerie unter anderem zur Neurodegeneration führt, macht die

Beschäftigung mit den Mechanismen der Autophagie in den Neurowissenschaften hoch relevant (96, 97).

Neuronen weisen eine klare Kompartimentierung bezüglich der Autophagosomenbildung und -maturation auf (siehe Abb. 10). Bisher wurden zwei unterschiedliche Populationen von Autophagosomen im Soma von Neuronen beschrieben, die aus unterschiedlichen Bereichen des Neurons stammen: eine axonale und eine somatodendritische Gruppe. Der Großteil der Autophagosomenbildung, die der bulk autophagy, der unselektiven Massenautophagie, zugeschrieben wird, findet im distalen Axon statt. Diese Autophagosomen werden retrograd in Richtung Soma transportiert, maturieren dabei, fusionieren schließlich mit dem lysosomalen Kompartiment im Zelleib und reichern sich im basalen Soma an. Daneben gibt es eine zweite Gruppe von größeren und lokal entstehenden Autophagosomen, die sich insbesondere im apikalen Soma anreichern und vermutlich der selektiven Autophagie (Mitophagie, ERphagie, Aggrephagie) der Organellen des Zellkörpers dienen (95, 98).

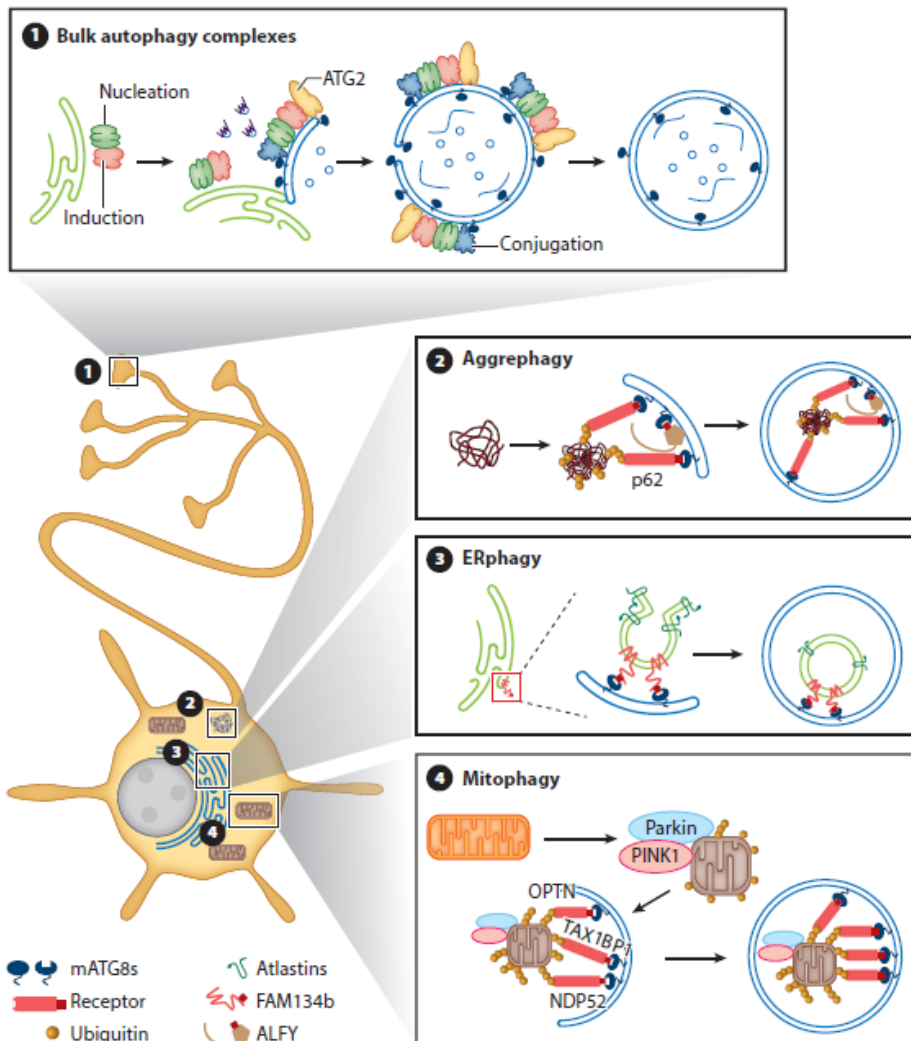


Abbildung 10. Lokalisation der neuronalen Autophagosomenbildung. Das Neuron ist mit seinem Zellkörper und langen Axon in gelb dargestellt. Während die unselektive Massenautophagie [1] vor allem im distalen Axon stattfindet, scheint selektivere Autophagie eher im Zelleib stattzufinden [2, 3, 4]. Beide Autophagosomentypen sammeln sich letztendlich jedoch im Soma (siehe Text). Abbildung entnommen aus: Stavoe AKH, Holzbaur ELF. Autophagy in Neurons. Annu Rev Cell Dev Biol. 2019;35:477-500 (95).

Nach bisherigen Erkenntnissen findet die axonale Autophagosomenbildung vor allem im distalen Axon mit einem starken Gefälle in Richtung des Soma statt. Dabei übersteigt die Menge an distal generierten Autophagosomen die Menge derjenigen, die im mittleren Axon generiert werden, um bis zu 2.000%. 70 bis 90% der untersuchten Neurone zeigen im mittleren und proximalen Axon gar keine Bildung Atg-5- oder Atg-13-positiver Autophagosomen (99).

Da diese Erkenntnisse vor allem an Neuronen des Spinalganglions gewonnen wurden, die in Kultur nicht zur Synapsenbildung neigen, und primäre hippocampale Neurone nach Synapsenbildung eine etwas geringere distale und stärkere proximale Autophagosomenbildung zeigen, bleibt jedoch abzuwarten, ob das Gefälle von distal nach

proximal grundsätzlich derart ausgeprägt ist. Nach initialer bidirektionaler Beweglichkeit begannen mit zunehmender Fracht fast 90% der axonalen Autophagosomen einen retrograden Transport in Richtung des Soma (99, 100). Gleichzeitig findet während der retrograden Reise der Autophagosomen eine zunehmende Fusion mit Lysosomen und Ansäuerung des vesikulären Lumens statt, wie anhand der von distal nach proximal zunehmenden Kolo-kalisation von LC3 (Autophagosomen) und LAMP1 (lysosomal-associated membrane protein 1, Lysosomen) verfolgt werden kann. Die distal gebildeten Autophagosomen sammeln sich schließlich im basalen Soma.

Im Gegensatz dazu zeigt die zweite Gruppe der im Soma generierten und sich apikal ansammelnden Autophagosomen eine wesentlich geringere Kolo-kalisation dieser beiden Marker. Darüber hinaus verfügen diese größeren Autophagosomen über eine wesentlich geringere Beweglichkeit und bleiben vor allem stationär im Soma.

Einige Untersuchungen werfen mittlerweile ein Licht auf potentielle Funktionen neuronaler Autophagie während der Entwicklung und auch bei ausgereiften Nervenzellen. So führt eine Ausschaltung von mTORC1 und damit einhergehender Autophagiesteigerung in Vorläuferzellen corticaler GABAerger Interneurone zu einer Proliferationssuppression (101). Außerdem lässt sich das Neuritenwachstum in primären embryonalen corticalen Neuronen über die autophagische Aktivität beeinflussen: eine pharmakologische Induktion der Autophagie mittels Rapamycin verringert das Neuritenwachstum und vice versa (102). Allerdings ist bisher noch nicht klar, wie diese Ergebnisse zu bewerten sind, weil sowohl mTORC1 als auch der Autophagieapparat in ein komplexes Netzwerk aus vielen miteinander interagierenden zellulären Stoffwechselschritten und Organellen eingebettet sind. Diese Tatsache erschwert eine einfache Beurteilung.

Da Neurone als Zellen mit einer außerordentlich schnellen und dadurch schwer zu untersuchenden Autophagosomenabbaurate bekannt sind, begrenzt sich die vorliegende Arbeit auf die Untersuchung des aufbauenden Schenkels, also der Autophagosomenformation (103). Zwar wird der Prozess des biologischen Alterns häufig auf einen defizitären lysosomalen Abbau der Autophagosomen zurückgeführt; jedoch konnten Muela et al. an retinalen organotypischen Schnittkulturen ebenfalls eine Abnahme der Autophagosomenformation als maßgebliche Ursache für den Rückgang der Autophagie im Alter zeigen (104). Daher bietet sich aus methodischen Gründen die

Durchführung eines quantitativen Vergleichs der Autophagosomenbildung in verschiedenen cerebellären Neuronentypen im gleichen organotypischen Mikromilieu als erster Schritt in der zelltypspezifischen vergleichenden quantitativen Autophagieforschung an.

3.3.3 Pharmakologische Manipulation

Die Mechanismen der Autophagie lassen sich an verschiedenen Stellen pharmakologisch beeinflussen. Hierzu zählen unter anderem die Inhibition des Abbaus von Autophagosomen durch **Bafilomycin** und auch durch **Chloroquin**, welche zu einem verringerten Abbau von Autophagosomen führen. Aber auch die Hemmung der Autophagosomenbildung durch den PI3K-Inhibitor **3-Methyladenin** oder die Induktion der Autophagosomenbildung durch den mTOR-Inhibitor **Rapamycin** gehören zu den gängig verwendeten Pharmaka zur Manipulation der Autophagie. Dabei hat Bafilomycin für die vorliegende Untersuchung die größte Relevanz.

Bei **Bafilomycin A1**, **B1** und **Concanamycin A** handelt es sich um Makrolidantibiotika, die aus grampositiven aeroben Streptomyces spp. gewonnen werden. Klassischerweise wird die Wirkung dieser Substanzen mit einer Inhibition der vakuolären v-ATPase erklärt, wodurch die Ansäuerung von Lysosomen gestört und die Fusion von Lysosomen mit Autophagosomen und deren konsekutive Degradation verhindert werden (105, 106). So lassen sich in verschiedenen Zellreihen bei Verwendung von 100 bis 400 nM Bafilomycin über eine Zeitdauer von bis zu 24 Stunden sowohl eine gestörte Ansäuerung von Lysosomen wie auch eine verminderte Kollokalisierung des Autophagosomenmarkers LC3 und des lysosomalen Markers LAMP1 beobachten. Nach diesem Erklärungsmodell ist ein saurer lysosomaler pH eine notwendige Voraussetzung für die Vereinigung mit Autophagosomen.

Dieser häufig postulierte kausale Zusammenhang zwischen lysosomaler Ansäuerung und gestörter Fusion infolge der Exposition mit Bafilomycin wird allerdings seit einigen Jahren angezweifelt (107). Weitere Nahrung erhielt die Kontroverse dadurch, dass ein Verlust von v-ATPase-Untereinheiten in der Fruchtfliege *Drosophila* zwar nachweislich die lysosomale Ansäuerung verhindert, aber trotzdem eine Fusion von Lysosomen mit Autophagosomen und Endosomen nachgewiesen werden kann, auch wenn die Autophagosomen durch die

gestörte lysosomale Funktion nicht abgebaut werden können (108). Es deutet sich an, dass ein Verlust der Calcium-ATPase des sarkoplasmatischen und endoplasmatischen Retikulums (SERCA), einem weiteren Angriffsort von Bafilomycin, zu dem gleichen zellulären Erscheinungsbild führt und einen weiteren Erklärungsansatz für dessen Wirkung darstellen könnte.

Gleichzeitig ist zu berücksichtigen, dass auch unspezifische Off-Target-Effekte besonders bei einer pharmakologischen Behandlung über 18 Stunden hinaus beschrieben wurden. Mit solchen Effekten ist prinzipiell bei allen hier aufgeführten Pharmaka in Abhängigkeit von Konzentration und Behandlungsdauer zu rechnen, da sie nicht hochselektiv nur den Autophagieapparat beeinflussen, sondern an diesem nur mittelbar über assoziierte Signalwege und Prozesse ansetzen (109). Angesichts solcher unspezifischen Off-target Effekte nicht nur durch Bafilomycin, sondern auch durch 3-MA und Rapamycin bietet sich der Einsatz von Mausmodellen mit verschiedenen genetischen Knockouts an, die die Autophagiemaschinerie spezifischer beeinträchtigen sollen. Diese wurden auch von Komatsu et al. und Hara et al. (ATG5 und ATG7-Knockout) bei ihren grundlegenden Arbeiten zur Neurodegeneration durch den Ausfall der basalen neuronalen Autophagie verwendet (96, 97). Ein solches Vorgehen würde zumindest bei einem kongenitalen genetischen Knockout in Mäuseembryonen allerdings zu einem konstitutiven Wandel der Autophagiemaschinerie von der Embryonalentwicklung an führen, Anpassungsvorgänge induzieren und eine Untersuchung der möglichst physiologischen Autophagie verzerren (110). Darüber hinaus ist anzunehmen, dass eine auf konstitutive Art und Weise gestörte Autophagie die Regeneration der Schnittkultur nach dem Trauma der Präparation beeinträchtigen würde. Eine möglichst unbeeinträchtigt verlaufende Regenerationszeit verhindert die Untersuchung der Autophagie bei Knockout-Mäusen, weil ein entsprechender Knockout von Autophagie-assoziierten Genen die Schnitte über ihre gesamte Kultivierungsdauer und Regenerationszeit beeinträchtigt. Der Knockout von ATG5 und ATG7 beispielsweise diente dem Nachweis der grundlegenden Bedeutung der basalen Autophagie, da ein ausgeprägter neuronaler Zelluntergang (insbesondere Pyramiden- und Purkinje-Zellen), neurologische Defizite und ein früher Tod der Versuchstiere nach wenigen Wochen beobachtet wurden (96, 97). Darüber hinaus ist auch bei einem genetischen Knockout zu berücksichtigen, dass die Produkte des ausgeschalteten Gens auf vielfältige Weise in den Zellmetabolismus eingreifen und ebenfalls unspezifische Off-Target-Effekte auslösen können (110).

Dies spricht für einen Rückgriff auf die Behandlung mit Pharmaka oder anspruchsvolleren target-siRNA nach Abschluss der Regeneration. Dabei ist unter diesen Umständen zu berücksichtigen, dass 3-MA als unselektiver PI3K-Inhibitor auch Lipidkinasen beeinflusst, die zur Regulation der PKA und DNA-Reparatur zum Beispiel nach Strahlenschäden benötigt werden. Somit muss der Einsatz solcher Pharmaka an den Kontext der Untersuchung angepasst werden (111, 112).

Die zweite verbreitete Substanzgruppe, die den Abbau von Autophagosomen inhibiert und auch im Rahmen klinischer Studien zur Behandlung von verschiedenen Tumoren Anwendung findet, besteht aus den ursprünglich als Malariamitteln entdeckten Substanzen **Chloroquin** und **Hydroxychloroquin**. Bei der gängig verwendeten Konzentration von 100 µM Chloroquin kommt es nach 5 bis 24 Stunden ebenfalls zu einer geringeren Fusion von Autophagosomen mit Lysosomen, einer Akkumulation von LC3B2 und einer verminderten Kolo-kalisation des autophagosomalen Substrats SQSTM1/p62 sowie des lysosomalen Markers LAMP2 (lysosomal-associated membrane protein 2). Diese Wirkung ist jedoch (wie der direkte Vergleich zeigt) geringer ausgeprägt als bei Bafilomycin und funktioniert über einen anderen Wirkmechanismus; bei gleichzeitiger Anwendung von Bafilomycin und Chloroquin kommt es zu einem additiven Effekt. Eine mögliche Erklärung für die Wirkung von Chloroquin könnte die Inhibition des autophagosomalen SNARE-Proteins STX-17 sein (113).

Während Bafilomycin und Chloroquin den Abbau von Autophagosomen hemmen und zu einer Akkumulation führen, wird bereits seit den 1980er Jahren **3-Methyladenin** in höheren Konzentrationen von 3-5 mM zur Inhibition der Autophagosomenbildung verwendet. Es konnte gezeigt werden, dass dies nicht nur zu einer signifikant verminderten Protein-degradation führt, sondern die elektronenmikroskopisch nachvollziehbare Autophagosomenbildung um ca. 80% verringert (114). Bei dem letzten Pharmakon, das hier beispielhaft aufgeführt werden soll, handelt es sich um den mTOR-Inhibitor **Rapamycin**, ein lipophiles Antibiotikum, das aus *Streptomyces hygroscopicus* gewonnen wird. Über eine Hemmung des Autophagiesuppressors mTOR führt Rapamycin zu einer deutlichen Autophagie-induktion (115).

3.3.4 Neuropathologische und klinische Relevanz

Auf eine grundlegende biologische Bedeutung der Autophagie deutet bereits hin, dass ein Knockout des Gens ATG5, dessen Produkt Teil des Elongationskomplexes ist, zu einem Entwicklungsarrest im Vier- bis Acht-Zell-Stadium und einem Verlust des Embryos nach der Fertilisation führt. In Bezug auf die Bedeutung der neuronalen Autophagie für die zelluläre Homöostase gibt es mittlerweile zahlreiche Hinweise auf Zusammenhänge mit verschiedensten pathologischen Vorgängen von traumatischen Hirnschäden bis hin zu Alterungsprozessen. Dazu zählt insbesondere die zunehmende Assoziation mit neurodegenerativen Erkrankungen.

Zum einen konnte gezeigt werden, dass eine defizitäre basale Autophagiemaschinerie direkt zum Untergang von Neuronen - insbesondere von cerebralen Pyramidenzellen und cerebellären Purkinje-Zellen - führt (96, 97). Zum anderen finden sich immer mehr Verbindungen zwischen wahrscheinlich pathogenetisch relevanten Genen und Proteinen sowie Teilschritten der Autophagie. Viele der häufigsten neurodegenerativen Erkrankungen wie die Demenz vom Alzheimer-Typ (DAT), der Morbus Parkinson und die Chorea Huntington zeigen eine cytosolische Akkumulation von Proteinen, die Aggregate bilden, und einen konsekutiven Synapsen- und Neuronenuntergang. Da es die zelluläre Aufgabe der Autophagie ist, gerade solche Proteinaggregate zu degradieren, findet man beispielsweise bei der DAT und der Chorea Huntington ebenfalls eine Akkumulation von Autophagosomen und anderen Formen autophagischer Vakuolen (AV), die am ehesten als Ausdruck der Gegenregulation angesehen werden kann (116, 117). Umgekehrt zeigt die Induktion der Autophagie einen neuroprotektiven Effekt gegen [1] toxische Stressoren sowie [2] Akkumulation des Tau-Proteins im Rahmen des A152-Tau-Allels, das mit einem besonders hohen Risiko für frontotemporale Demenzen und die Demenz vom Alzheimer-Typ assoziiert ist (118, 119).

Einer der Kernbereiche der Autophagieforschung befasst sich mit den zellbiologischen Mechanismen, die hinter dem Phänomen des Alterns biologischer Organismen stehen, welches von einem allmählichen Abfall der Aktivität proteolytischer Systeme wie dem Ubiquitin-Proteasom-System und der Autophagie begleitet wird (120). Zudem wurde beobachtet, dass eine gesteigerte Expression von Autophagie-assoziierten Genen mit einer um ungefähr 50% verlängerten Lebensspanne in *Drosophila* einhergeht und die Resistenz gegenüber ROS (Reactive oxygen species) erhöht (121).

Darüber hinaus interagieren Proteine, die in den pathogenetischen Modellen dieser Erkrankungen eine Schlüsselrolle spielen, ebenfalls mit der Autophagie. So hemmt etwa ein bei der familiären Alzheimer-Krankheit häufig mutiertes Presenilin-1 die lysosomale v-ATPase, was eine Fusion mit und konsekutive Degradation von Autophagosomen verhindert (122). Passend hierzu lässt sich in gut erhaltenen neocorticalen Biopsien betroffener Patienten eine Anhäufung von Autophagosomen und anderen autophagischen Strukturen finden (123). Darüber hinaus führen die Hemmung der Autophagosomendegradation mittels Chloroquin sowie die Inhibition der Autophagosomenbildung mittels 3-MA in einem Mausmodell mit transfiziertem humanem TAU zu einer deutlichen Aggregation und Neurotoxizität, während eine Induktion der Autophagie zu einer Verringerung der Tau- und A β -Aggregation sowie der Neurotoxizität führt (124-126).

Ähnliche Befunde finden sich nicht nur bei der weltweit häufigsten neurodegenerativen Erkrankung, der Demenz vom Alzheimer-Typ, sondern auch beim Morbus Parkinson, der zweithäufigsten neurodegenerativen Erkrankung. Eine mit dem Morbus Parkinson assoziierte Mutation der PINK1- und Parkin-Gene führt zu einer Inhibition der Mitophagie, der zelleigenen und Autophagosomen-vermittelten Qualitätskontrolle von Mitochondrien, einem Abfall der Autophagie-assoziierten Proteine BECN1 und LC3 sowie einer Verringerung des lysosomalen Markers LAMP-2 in Mäusen (127, 128). Gleichzeitig führt eine Stimulation der Autophagie mittels Rapamycin im Tiermodell auch hier zu einer Verringerung der α -Synuclein-Ablagerungen und einem höheren Überleben dopaminerger Neuronen (125).

Das für Chorea Huntington verantwortlich gemachte Huntingtin-Protein scheint die Autophagie in mutiertem Zustand ebenfalls über eine Interaktion mit dem Induktionskomplex zu supprimieren - eine Wirkung, die sich über eine Deletion der pathologischen Polyglutaminexpansion in diesem Protein rückgängig machen lässt, während eine Induktion der Autophagie mittels Rapamycin auch hier den Neuronenverlust *in vitro* verringert (129, 130).

Auch für das Cerebellum relevante Pathologien wurden bereits in Verbindung mit der Autophagie gebracht. Das nicht nur beim M. Parkinson sondern auch in der MSA

akkumulierende α -Synuclein wird in dopaminergen Neuronen des Mittelhirns in Abhängigkeit der autophagischen Aktivität, gesteuert durch die Regulatoren TFEB (induzierte Autophagie) und mTOR (supprimierte Autophagie), mehr bzw. weniger stark abgebaut (131). Zusätzlich finden sich in cerebellären Oligodendrozyten LC3-reiche cytoplasmatische Einschlusskörperchen, die eine gestörte autophagosomale Degradation andeuten (132). Obwohl die MSA betont die cerebellären Purkinje-Zellen befällt und sich in anderen Zellen und Bereichen des Nervensystems bereits ein Zusammenhang mit der Autophagie andeutet, bleibt ein solcher Zusammenhang bei cerebellären Neuronen noch spekulativ.

Im Gegensatz hierzu gibt es bezüglich der Stressfaktoren Hypoxie und Ischämie sowie des Zellgiftes Ethanol, auf die gerade die Purkinje-Zellen besonders vulnerabel reagieren, eindeutige Hinweise auf eine Bedeutung der Autophagie. Von Pla et al. wurde die Autophagie als neuroprotektiver Mechanismus gegen Ethanoltoxizität vorgeschlagen und beobachtet, dass Ethanol die Autophagosomenbildung in Neuronen supprimiert (mit umgekehrter Wirkung in Astrozyten) und die Zelltodrate erhöht – was sich über eine Induktion der Autophagie mittels Rapamycin umkehren lässt (133). Im Rahmen der Erforschung von zellulären Vorgängen während einer Ischämie bzw. Hypoxie gibt es allerdings eine noch andauernde Kontroverse hinsichtlich der Rolle der Autophagie als Schutzmechanismus oder „Brandbeschleuniger“, die von widersprüchlichen Forschungsergebnissen geprägt und von Hou et al. ausführlicher wiedergegeben wird (134). Zusammenfassend ist folgendes zu sagen: auf der einen Seite zeigen Untersuchungen, dass eine Hemmung der Autophagie mittels 3-MA oder Wortmannin das Infarktareal und –volumen vergrößern und das Neurodefizit in neonatalen Ratten verschlimmern sollen, während eine Induktion der Autophagie durch Rapamycin Neuronentod und Hirnschaden verringern soll. Daneben zeigt sich in der Infarktpenumbra eine gesteigerte autophagische Aktivität mit gleichzeitiger erhöhter Apoptoserate, was zu dem Vorschlag geführt hat, die Penumbra mittels einer Induktion der Autophagie und Hemmung der Apoptose zu retten. Auf der anderen Seite jedoch soll eine exzessiv gesteigerte Autophagieaktivität ebenfalls Infarktvolumen und pathologische Veränderungen steigern, wobei ein Knockout von ATG7 das Ausmaß neurologischer Defizite nach einem Ischämie-Reperfusion-Geschehen verringern soll (134).

Auch in der Hirntumorforschung hat die Autophagie als relevanter Mechanismus der Tumorphomöostase verstärkt Aufmerksamkeit erfahren. Hierzu trugen vor allem die Beobachtungen bei, dass BECN1 in Tumorstammzellen verstärkt exprimiert wird, die meisten Anti-Gliom-Therapien die Autophagie induzieren und sowohl Bestrahlung als auch das beim Glioblastoma multiforme regelhaft verwendete alkylierende Zytostatikum Temozolomid eine Autosis (ein durch die Autophagie-vermittelter Zelltod) induzieren (135).

Alle genannten neuropathologischen Beispiele für eine klinische Relevanz der neuronalen Autophagie demonstrieren aus hiesiger Sicht die grundlegende homöostatische Bedeutung der Autophagie, die naturgemäß zu einer zentralen oder zumindest tangentialen Beteiligung bei einer Vielzahl von Zellpathologien führen muss. Dabei fällt es momentan noch schwer, zu beurteilen, wann die Pathologie auf ein primäres Versagen der Autophagiemechanismen zurückzuführen ist und wann diese im Rahmen des allgemeinen Zellversagens lediglich mitbeteiligt sind. Es ist augenfällig, dass die Autophagie, die in vielen Situationen zugunsten des Zellüberlebens arbeitet, bei einer Vielzahl von Erkrankungen zumindest zeitweise kompensatorisch in Erscheinung tritt, auch wenn sie nicht direkt die Ursache des Zellschadens beheben kann. Angesichts der mutmaßlich ubiquitären Relevanz der Autophagie treten methodische Aspekte bei der Auswahl des zu untersuchenden ZNS-Kompartiments stärker in den Vordergrund.

Zudem fallen sowohl das normale Altern als auch viele neurologische und psychiatrische Erkrankungen teilweise bereits initial durch eine jeweils spezifische Alteration verschiedener Zelltypen oder Hirnareale auf, die auf eine selektive Vulnerabilität verschiedener Zelltypen und Hirnareale hindeuten könnte. Die Demenz vom Alzheimer-Typ und der Morbus Parkinson beispielsweise folgen einem einheitlichen sequenziellen Degenerationsmuster, das nach Braak entsprechend der befallenen Hirnareale in verschiedene Stadien eingeteilt werden kann (136, 137). Beim Altern verschiebt sich ebenso wie bei der Demenz vom Alzheimer-Typ die Relation zwischen großen corticalen Pyramidenzellen und kleinen nicht-pyramidalen Neuronen zugunsten der kleinen Neuronen (138). Auch im Bereich der psychiatrischen Forschung zur Schizophrenie und zunehmend auch zur Depression, zur bipolaren Störung und zum Autismus sammeln sich Hinweise auf eine selektive Dysfunktion kleiner Interneuronen (54-56).

3.4 Fragestellung

Aufgrund der für die zelluläre Homöostase und Überlebensfähigkeit bei Neuronen relevanten Rolle der Autophagie stellt sich die Frage, ob zelltypspezifische Unterschiede in den Kapazitäten der Autophagiemaschinerie eine selektive Vulnerabilität begründen könnten.

Eine Suche mit den Suchbegriffen ((interneuron) AND (projection neuron) AND (autophagy)) (PubMed [www.pubmed.gov], gesucht am 11.08.2021) ergab nur eine einzige Arbeit über Unterschiede zwischen Projektions- und Interneuronen mit Bezug zur Autophagie (139). Darin stellten Ruiz et al. Unterschiede in der autophagischen Aktivität zwischen Projektionsneuronen (u.a. Purkinje-Zellen) und Interneuronen nach Störung des ebenfalls proteolytisch aktiven Ubiquitin-Proteasom-Systems mittels einer Mutation des HERC1-Proteins im Mausmodell fest. Sie konnten jedoch nicht unterscheiden, ob dies auf eine unterschiedliche autophagische Kapazität der Zellen zurückzuführen ist oder durch einen unterschiedlichen Wirkungsgrad der Mutation bzw. des Ubiquitin-Proteasom-Systems in den verschiedenen Zellgruppen erklärbar ist.

Eine weitere Suche zur Autophagie cerebellärer Interneurone ((interneuron) AND (cerebellum) AND (autophagy), Pubmed [www.pubmed.gov], gesucht am 11.08.2021) ergab neben der oben aufgeführten Arbeit von Ruiz et al. lediglich drei weitere Veröffentlichungen: Sato et al. stellten fest, dass ein genetischer Knockout von LAMP2A, einem selektiven lysosomalen Rezeptor für Substrate der Chaperon-vermittelten Autophagie, mittels injizierter miRNA primär zu einer Degeneration von MLIs und Körnerzellen und erst sekundär von Purkinje-Zellen führten (140). Die unter diesen Schlagworten ebenfalls identifizierte Arbeit von He et al. beschrieb einen selektiven Verlust von retinalen Bipolar-Zellen und Purkinje-Zellen nach selektivem Vps-34-Knockout im Mausmodell, während Zanjani et al. keine Autophagie untersuchten (141, 142).

Unter 18 Veröffentlichungen, die mit den Suchbegriffen ((cell type-specific) AND (autophagy) AND (brain)) (PubMed [www.pubmed.gov], gesucht am 11.08.2021) identifiziert wurden, verglich keine einzige die autophagischen Kapazitäten verschiedener Nervenzelltypen auf Einzellzellniveau oder untersuchte den autophagischen Fluss. In der Regel handelte es sich um Untersuchungen einzelner Zelllinien im Hinblick auf die Pathogenese spezifischer Erkrankungen oder pathologischer Zustände (z.B. hippocampale Neuronenkultur (143), Motoneuronen des Hinterhorns (144), Gliomzellen (145) oder spinalen GABAergen Interneuronen (146)), gewebespezifische Vergleiche

(Enterozyten vs. Neuronen (147), Hepatozyten vs. Neuronen (148)) oder den Vergleich zwischen Astrozyten und Neuronen (149) (143-160).

Eine spezifischere Literaturrecherche über den autophagischen Fluss von Projektionsneuronen und Interneuronen ((Projection neuron) AND (interneuron) AND (autophagic flux)), Purkinje-Zellen und Interneuronen ((Purkinje cell) AND (interneuron) AND (autophagic flux)) oder cerebellären Interneuronen ((Interneuron) AND (cerebellum) AND (autophagic flux)) ergab keinen Treffer (alle: PubMed [www.pubmed.gov], gesucht am 11.08.2021).

Ebenso zeigt eine breitere Suche zum autophagischen Fluss cerebellärer Neuronen ((neuron) AND (cerebellum) AND (autophagic flux), PubMed [www.pubmed.gov], gesucht am 11.08.2021), dass es sich bei den auf ihren autophagischen Fluss hin untersuchten Proben vor allem um Western Blots von cerebellären Homogenisaten handelte. Immunhistologischen Untersuchungen dieser Arbeiten untersuchten insbesondere Purkinje-Zellen (9, 161-165), kultivierte Fibroblasten (166), Neuroblastomzelllinien (167-169), Glioblastomzelllinien (170) und neurale Stammzelllinien (171) zur Testung ihrer Hypothesen und führten keine vergleichenden Untersuchungen innerhalb eines organotypischen Mikromilieus durch. Bei einer Veröffentlichung handelte es sich um einen diskursiven Beitrag (172).

Alleine Oliva Trejo et al. verfolgen mittels eines Mausmodells, dessen LC3B mit einem Fluoreszenzmarker markiert wurde, einen vergleichenden Ansatz zwischen unterschiedlichen Gewebe- und Zelltypen (173). Dabei untersuchen Oliva Trejo et al. die Darstellung von Autophagosomen und Autophagolysosomen mittels eines neuen transgenen Mausmodells mit fluoreszierenden Markerproteinen in unterschiedlichen Gewebetypen. Es wurde die Visualisierung von Autophago- und Autophagolysosomen in cerebralem Cortex, Gyrus dentatus, Purkinje-Zellen, spinalen Motoneuronen, Hepatozyten, renalen Tubulusepithelien sowie Azinuszellen des Pankreas histologisch bestätigt. Darüber hinaus erfolgte eine Auszählung dargestellter Autophagosomen pro Purkinje-Zelle sowie ihrer Größe vor und nach Nährstoffentzug. Diese Auszählung beschränkte sich jedoch lediglich auf eine Zellzahl von jeweils drei bis vier Zellen. Zudem leistet diese Arbeit weder einen quantitativen Vergleich verschiedener Zelltypen über verschiedene Hirn- und Gewebetypen hinweg – es erfolgte eine Quantifizierung lediglich bei besagten Purkinje-Zellen – noch ein Vergleich mehrerer Zelltypen in einem gemeinsamen organotypischen Mikromilieu. Gerade letztere Bedingung ist eine wesentliche Voraussetzung dafür, dass die einzige Variable des Vergleichs der Zelltyp ist

und möglichen Störfaktoren durch unterschiedliche Umgebungen und Mikromilieus vorgebeugt wird.

Vor diesem Hintergrund ergab eine Literaturrecherche (PubMed [www.pubmed.gov], Suchbegriffe ((cerebellum) AND (organotypic slice) AND (autophagy)), gesucht am 06.08.2021) nur eine einzige Arbeit, in der Untersuchungen der Autophagie an hirnorganotypischen cerebellären Schnittkulturen vorgenommen wurden, jedoch ohne systematische Validierung der Schnittkultur als experimentelles System zur Untersuchung der Autophagie (174). Bei dieser Arbeit handelt es sich um eine Untersuchung des Zusammenhangs zwischen ISG15 (interferon-stimulated gene 15) sowie Proteinen des Ubiquitin-Proteasom-Systems und der Autophagie (LC3) in ATM-Wildtyp und –Knockout-Mäusen (Ataxia teleangiectasia mutated).

Eine kurze Schlagwortsuche zu Purkinje-Zellen ((Purkinje cell) AND (autophagy), PubMed [www.pubmed.gov], gesucht am 11.08.2021)) mit 114 Ergebnissen zeigt jedoch, dass die Autophagie von Purkinje-Zellen als isolierter Untersuchungsgegenstand im Kontext verschiedenster Modelle und Fragestellungen bereits eingehend beforscht wird. Die Untersuchung selektiver Vulnerabilitäten aufgrund unterschiedlicher autophagischer Kapazitäten bedarf jedoch einen Vergleich verschiedener Zelltypen unter möglichst ähnlichen Bedingungen – wie bereits erörtert.

Als Ergebnis dieser Literaturrecherche ist festzuhalten, dass es bisher nachweislich keine vergleichende quantitative Untersuchungen der neuronalen Autophagie zwischen unterschiedlichen Zelltypen, geschweige denn Projektions- und Interneuronen, in einem gleichen organotypischen Mikromilieu gibt. Darüber hinaus konnte nur eine einzige Arbeit zur Autophagie an hirnorganotypischen cerebellären Schnittkulturen identifiziert werden.

Eine Voraussetzung für die vergleichende Untersuchung neuronaler Autophagie verschiedener Zelltypen in gleichem Mikromilieu ist die hirnorganotypische Schnittkultur. Ein Ziel der vorliegenden Arbeit ist dementsprechend die Etablierung von in der Autophagieforschung gängigen Untersuchungstechniken in der cerebellären hirnorganotypischen Schnittkultur. Dies dient der Erweiterung des zur Autophagieuntersuchung anwendbaren Methodenspektrums.

Fünf aus der Einleitung hervorgehende Prämissen liegen dieser Arbeit zugrunde:

1. Die neuronale Autophagie spielt eine grundlegende Rolle in der zellulären Homöostase.
2. Zwar befallen viele Erkrankungen nicht isoliert einen Zelltyp, aber es werden unterschiedliche Zell- und Gewebstypen in Abhängigkeit von der zugrundeliegenden Pathologie in unterschiedlichem Ausmaß und in unterschiedlicher Abfolge befallen.
3. Die hirnormotypische Schnittkultur ermöglicht die vergleichende Untersuchung verschiedener Neuronentypen im gleichen Mikromilieu und organotypischer Umgebung unter kontrollierbaren Bedingungen.
4. Das Kleinhirn eignet sich für eine vergleichende Untersuchung besonders gut aufgrund seiner evolutionären Konservierung und, *cum grano salis*, seiner regelmäßigen und reproduzierbaren Struktur.
5. Die Bildungsrate neuer Autophagosomen und der Autophagosomenstatus pro Zelle lassen sich mittels der Behandlung durch Bafilomycin B1 (Inhibition des Abbaus) und indirekter Immunfluoreszenz von Autophagosomen-gebundenem LC3B Zelltypspezifisch bestimmen.

Es soll folgende Frage untersucht werden:

Finden sich neuronentypspezifische quantitative Unterschiede im Autophagosomenstatus oder der Autophagosomenbildung bei gleichem organotypischen Mikromilieu in cerebellären organotypischen Schnittkulturen?

Es gilt, folgende **Nullhypothese** zu widerlegen:

Es lassen sich zwischen verschiedenen Nervenzelltypen in demselben organotypischen Mikromilieu keine quantitativen Unterschiede in Autophagosomenstatus oder Autophagosomenbildung nachweisen.

Zum Screening auf solche zelltypspezifischen Unterschiede wurde die Methode der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie herangezogen. Zwar böte eine transmissionselektronenmikroskopische Untersuchung (TEM) der Autophagosomen nach Immunogoldfärbung des LC3 bei ansonsten gleichem experimentellem Ansatz

grundsätzlich eine höhere Auflösung und direkte Darstellung mit höherer Beweiskraft. Jedoch bedürfte eine solche Untersuchung der Anfertigung äquidistanter Ultradünnschnittserien (Durchmesser 50 nm), was einen enormen Anstieg der notwendigen Schnitte pro Zelle und des damit verbundenen Aufwandes bedeutete, um eine Purkinje-Zelle annäherungsweise repräsentativ abzubilden. Dieser Mehraufwand wäre erst dann sinnvoll, wenn es gute Hinweise auf zelltypspezifische Unterschiede der Autophagosomenbildung gäbe, d.h. wenn eine lichtmikroskopische Untersuchung solche statistisch signifikanten Unterschiede demonstrieren könnte und es zudem erlaubte, die notwendige Power für eine entsprechende TEM-Stichprobe zu kalkulieren. Dies ist das Ziel der vorliegenden Arbeit. Um die Validität der Arbeit zu erhöhen, wurde eine für die mikroskopische Einzelzellanalyse ausgesprochen große Stichprobengröße von insgesamt 1344 Zellen gewählt.

Da quantitative Analysen der Autophagie an hirnormotypischen Schnittkulturen des Kleinhirns nach hiesiger Sicht bisher kaum durchgeführt wurden, müssen zunächst die Rahmenbedingungen der cerebellären Schnittkultur charakterisiert werden.

Zur Bestimmung der Rahmenbedingungen und Validierung der experimentellen Versuche wurden folgende Fragen untersucht:

- a) Wie verhält sich die Menge der Autophagosomen im cerebellären hirnormotypischen Schnitt im Vergleich zu jener Dichte in einer Kleinhirnprobe einer Maus gleichen Alters? Als Surrogat für die Menge der Autophagosomen wird im nachfolgenden der Quotient aus mittels Western Blot bestimmten LC3B2- und Actin-Gehalten herangezogen.
- b) Wie beeinflusst das Alter des Schnittes die Menge an Autophagosomen? Spielt in der vorliegenden Untersuchung die exakte Kulturdauer eine maßgebliche Rolle?
- c) Ist die Autophagosomenbildung im cerebellären hirnormotypischen Schnitt noch induzierbar und supprimierbar?
- d) Lässt sich die Autophagie in der hirnormotypischen Schnittkultur mit ähnlichen Effekten pharmakologisch manipulieren wie in primären Neuronenkulturen?

4 Materialien und Methoden

4.1 Chemikalien

Acrylamid/Bisacrylamid (40%)	Roth (Karlsruhe)
Ammoniumpersulfat (10%)	Merck (Darmstadt)
Aqua steril	aus Millipore Bidest Anlage (Darmstadt)
Basal Medium Eagle	Gibco (Kalifornien, USA)
Bromphenolblau	Sigma Life Sciences (Missouri, USA)
Dinatriumhydrogenphosphat-Heptahydrat	Roth (Karlsruhe)
D-(+)-Glucose	Sigma Life Sciences (Missouri, USA)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	
ECL-Lösung Reagenz A	Perkin Elmer (Massachusetts, USA)
ECL-Lösung Reagenz B	Perkin Elmer (Massachusetts, USA)
Entwicklungslösung (X-Omat Ex11)	Kodak (New York, USA)
Ethanol AHD 2000	Lysoform (Berlin)
Fixierlösung (PP X-Omat Lo)	Kodak (New York, USA)
Glutamax	Gibco (Kalifornien, USA)
Glycerin	Roth (Karlsruhe)
Glycin	Serva (Heidelberg)
Histoacrykleber	Aesculap AG (Tuttlingen)
Horse serum	Gibco (Kalifornien, USA)
Immu-Mount	Thermo Scientific (Massachusetts, USA)
Kaliumchlorid	Merck (Darmstadt)
Kaliumdihydrogenphosphat	Riedel-de Haen (Seelze)
Kalziumchlorid-Dihydrat	Merck (Darmstadt)
Low melting agarose	PEGLAB (Erlangen)
Magermilchpulver	AppliChem (Darmstadt)

Magnesiumchlorid-hexahydrat	Roth (Karlsruhe)
Mercaptoethanol	Gibco (Kalifornien, USA)
Methanol	Serva (Heidelberg)
Minimum Essential Medium	Gibco (Kalifornien, USA)
Natriumazid	Merck (Darmstadt)
Natriumchlorid	Roth (Karlsruhe)
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	Merck (Darmstadt)
Natriumhydrogencarbonat	Riedel-de Haen (Seelze)
Natriumhydroxid	Roth (Karlsruhe)
Normal Goat Serum (NGS)	Vector Laboratories (Kalifornien, USA)
Paraformaldehyd	Merck (Darmstadt)
Phosphate buffered saline (PBS)	Gibco (Kalifornien, USA)
Salzsäure	Roth (Karlsruhe)
SDS (sodium dodecyl sulfate)	Roth (Karlsruhe)
Temed	Roth (Karlsruhe)
Tris-Base	Merck (Darmstadt)
10% Triton X-100	Merck (Darmstadt)
Tween 20	Sigma Life Sciences (Missouri, USA)

4.2 Puffer und Lösungen

4.2.1 Zellkultur

PBS

140 mM	NaCl
10 mM	KCl
6,4 mM	Na ₂ HPO ₄
2 mM	KH ₂ PO ₄
pH 7,4	

10x Krebslösung: 1 Liter, autoklavieren, 4°C

73,6 g	NaCl
1,87 g	KCl
1,66 g	NaH ₂ PO ₄
2,44 g	MgCl ₂ * 6 H ₂ O
3,68 g	CaCl ₂ * 6 H ₂ O

1x Krebslösung: 1 Liter, 4°C

100 ml	10x Krebslösung
2g	Glucose
2,1g	NaHCO ₃

Auffüllen auf 1l mit ddH₂O

Kulturmedium: 50ml, 4°C

12,5 ml	Horse serum
12,5 ml	2x MEM
12,5 ml	BME
10,4 ml	Aqua steril
1,6 ml	20% Glucoselösung
0,5 ml	Glutamin
222 µl	1N NaOH

pH 7,2

4% Low melting Agarose: 50ml, 4°C

2 g	low melting agarose
50 ml	1x Krebslösung

4x Probenpuffer: 8ml, 4°C

4 ml	ddH ₂ O
1 ml	0,5M Tris pH 6,8
0,8 ml	Glycerin
1,6 ml	10% SDS
0,2 ml	Bromphenolblau
400 µl	Mercaptoethanol

2x Probenpuffer: 1ml, 4°C

475 µl 4x Probenpuffer
500 µl ddH₂O
25 µl Mercaptoethanol

4% Paraformaldehyd in PBS: 200ml, 4°C

180 ml PBS
8 g Paraformaldehyd
pH 7,4
Auf 200ml auffüllen mit PBS

Lagerungslösung: 20ml

100 µl 10% NaN₃
19,9 ml PBS

4.2.2 Elektrophorese und Immunoblot

10x Elektrophorese Puffer ohne SDS: 1l

30,3 g Tris Base
144 g Glycin
Auf 1 Liter auffüllen mit ddH₂O

1x Elektrophorese Puffer mit SDS: 1l

100 ml 10x Elektrophoresepuffer
10 ml 10% SDS-Lösung
Auf 1 Liter auffüllen mit ddH₂O

Blotting Puffer: 1l

5,8 g Tris Base
2,9 g Glycin
3,7 ml 10% SDS-Lösung
200 ml Methanol
Auf 1 Liter auffüllen mit ddH₂O

10x TBST (Tris-buffered saline with Tween20): 1l

24,0 g Tris Base

87,0 g NaCl

10 ml Tween 20

Auf 1 Liter auffüllen mit ddH₂O**1x TBST (Tris-buffered saline with Tween 20): 1l**

100 ml 10x TBST

Auf 1 Liter auffüllen mit ddH₂O

pH 7,4

Gelpuffer 1 (Trenngel): 250 ml

45,41 g Tris Base

1 g SDS

Auf 250 ml auffüllen mit dH₂O

pH 8,8

Gelpuffer 2 (Sammelgel): 250 ml

15,14 g Tris Base

1 g SDS

Auffüllen auf 250 ml mit dH₂O

pH 6,8

Trenngel

Tabelle 1. Zusammensetzung der Trenngele mit unterschiedlichen Anteilen Acrylamid.

% Anteil Acrylamid/Bisacryl- amid	6%	7,5%	10%	12%	14%	18%
Gelpuffer 1	2,7 ml	2,7 ml	2,7 ml	2,7 ml	2,7 ml	2,7 ml
40 % Acrylamid/Bisacrylami d	1,62 ml	2,03 ml	2,7 ml	3,24 ml	3,8 ml	4,05 ml

10% Ammoniumpersulfat	100 – 200 µl	100 – 200 µl	100 – 200 µl	100 – 200 µl	100 – 200 µl	100 – 200 µl
Temed	5,4 µl	5,4 µl	5,4 µl	5,4 µl	5,4 µl	5,4 µl
ddH ₂ O	6,48 ml	6,07 ml	5,4 ml	4,86 ml	4,3 ml	4,05 ml

Sammelgel 4%

3,14 ml ddH₂O
 1,25 ml Gelpuffer 2
 0,56 ml 40% Acrylamid
 100 µl 10% Ammoniumpersulfat
 5 µl Temed

Blockierlösung mit 10% Milchpulver: 100ml

100 ml 1x TBST
 10 g Magermilchpulver
 pH 7,4

Antikörperlösung für den primären Antikörper: 10ml

0,3 g Magermilchpulver
 10 ml 1x TBST
 pH 7,4

4.2.3 Immunfluoreszenz

0,2M Phosphatpuffer: 1l

43,42 g Na₂HPO₄
 5,24 g NaH₂PO₄
 Auf 1 Liter auffüllen mit ddH₂O
 pH 7,4

0,1M Phosphatpuffer: 1l

500 ml 0,2M Phosphatpuffer
 Auf 1 Liter auffüllen mit ddH₂O

pH 7,4

Blocklösung: pro ml Gesamtlösung

850 µl 0,1M Phosphatpuffer
100 µl Normal Goat Serum (NGS)
50 µl 10% Triton X-100

Antikörperlösung: pro ml Gesamtlösung

980 µl 0,1M Phosphatpuffer
10 µl Normal Goat Serum (NGS)
10 µl 10% Triton X-100

4.3 Antikörper

4.3.1 Primäre Antikörper

Tabelle 2. Liste und Verdünnungen der verwendeten Primärantikörper.

Antikörper	Verdünnung	Hersteller	Artikelnummer	Verwendung
Anti-LC3B-Antikörper, Kaninchen	1:200 (Immunoblot) 1:300 (Immunfluoreszenz)	Cell signaling (Massachusetts, USA)	2775S	Immunoblot und Immunfluoreszenz
Anti-Parvalbumin-Antikörper, Maus	1:500	Swant (Marly, Schweiz)	235	Immunfluoreszenz
Anti-Actin-Antikörper, Kaninchen	1:2000	Sigma Life Sciences (Missouri, USA)	A-4700	Immunoblot

4.3.2 Sekundäre Antikörper

Tabelle 3. Liste und Verdünnungen der verwendeten Sekundärantikörper.

Antikörper	Verdünnung	Hersteller	Artikelnummer	Verwendung
Anti- Rabbit- Antikörper, Ziege, Peroxidase- labelled	1:3000	Vector Laboratories (Kalifornien, USA)	PI-1000	Immunoblot
Anti-Rabbit- Antikörper, Ziege, Alexa 488	1:500	Invitrogen by ThermoFisher Scientific (Massachusetts, USA)	A11008	Immunfluoreszenz
Anti-Mouse- Antikörper, Ziege, Alexa 594	1:500	Molecular Probes (Oregon, USA)	A11005	Immunfluoreszenz

4.4 Pharmaka

Tabelle 4. Liste und Lösungsmittel der verwendeten Inhibitoren und Aktivatoren.

Pharmakon	Lösung	Artikelnummer	Hersteller
Bafilomycin B1	Gelöst in DMSO	B-1185	AG Scientific (San Diego, USA)
3-Methyladenin	Gelöst in Kulturmedium	M9281-100mg	Sigma Life Sciences (Missouri, USA)
Rapamycin	Gelöst in Kulturmedium	MFCD00867594	Sigma Life Sciences (Missouri, USA)

4.5 Geräte und Apparaturen

Zellkultur

Brutschrank

Lichtmikroskop Olympus SZX9

Kaltlichtlampe KL1500

Lupe

Millicell Cell Culture Inserts PICM0RG50

Sechs-Well-Platten

Sterilwerkbank HP72

Vibratom Integraslice 7550 MM

Klingen aus rostfreiem Stahl

Präparationsinstrumente (steril)

Binder (Tuttlingen)

Olympus (Tokio, Japan)

Leica Biosystems (Wetzlar)

Carl Zeiss Jena (Jena)

Merck Millipore

(Massachusetts, USA)

Falcon (New York, USA)

Heraeus (Hanau)

Campden Instruments Ltd.

(Loughborough, UK)

Campden Instruments Ltd.

(Loughborough, UK)

Aesculap (Tuttlingen)

Elektrophorese und Western Blot

Mini Protean II Elektrophorese-Kammer

Power Pac 300 Spannungsgerät

Power Pac 200 Spannungsgerät

Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell

Immobilon-P Transfermembran PVDF

Filterpapier 1F

Overhead Folien

Belichtungskassette

Bio-Rad (California, USA)

Bio-Rad (California, USA)

Bio-Rad (California, USA)

Bio-Rad (California, USA)

Merck Millipore (Massachusetts, USA)

Munktell (Schweden)

Folex Imaging (Erlangen)

Du Pont (Wilmington, USA)

Zentrifugen, Schüttler, Magnetrührer etc.

Blockthermostat TCR 100

Magnetrührer KS 501 digital

Schüttler Swip

Rollschüttler RM5 (220V 50Hz)

Roth (Karlsruhe)

IKA (Staufen)

Edmund Bühler (Bodelshausen)

Assistent (Sondheim vor der Rhön)

Thermomixer compact	Eppendorf (Berlin)
Ultraschallprozessor UP100H	Hielscher (Teltow)
Autoklav 24	MELAG (Berlin)
Sterilisationsbeutel	Roeser (Essen)
Vortex Genie	Scientific Industries (New York, USA)
Mikrozentrifuge	Roth (Karlsruhe)
Zentrifuge 5417 C	Eppendorf (Berlin)

Mikroskope

Leica Microsystems konfokales Mikroskop SP8	Leica Microsystems (Wetzlar)
---	------------------------------

Immunfluoreszenz

Objektträger SuperFrost Plus (25x 75x 1.0mm)	VWR International (Leuven, Niederlande)
--	---

24-Well-Platten	Falcon (New York, USA)
-----------------	------------------------

Sonstige

Filme	Fujifilm (Tokio, Japan)
ImageJ - Bildanalyse	Open Source, Wayne Rasband
Microsoft Excel 2007 - Datenanalyse	Microsoft Corporation (Washington, USA)
SPSS - Datenanalyse	IBM (New York, USA)
Serologische Pipette (1ml/2ml/5ml/10ml/25ml)	Falcon (USA)
Falcon tubes (15ml und 50ml)	BD Bioscience (Kalifornien, USA)
Pasteurpipetten	Plastibrand Fisher Scientific (Schwerte)
Pipetus	Hirschmann Laborgeräte (Eberstadt)
Pipettenspitzen	Eppendorf (Berlin)
Gefrierschrank -20°C	Liebherr (Kirchdorf)
Gefrierschrank -80°C	Sanyo (Osaka, Japan)
Reaktionsgefäße (0,5/1/2ml)	Sarstedt (Sarstedt)

Waage	Sartorius (Göttingen)
Feinwaage Explorer	Ohaus (New Jersey, USA)
Vortex Genie 2	Scientific Industries (New York, USA)
Mikrowelle	Bosch (Gerlingen)
Wasserbad (GFL 1083)	Gesellschaft für Labortechnik (Burgwedel)
Gasprofi 2	WLD-TEC (Arenshausen)
pH211 Mikroprozessor pH Meter	HANNA Instruments (Rhode Island, USA)
Epson 1680 Scanner	Epson (Nagano, Japan)
Laborabzug	Köttermann (Uetze)
Trockenofen	Memmert (Schwabach)
Parafilm	American National Can (Connecticut, USA)

4.6 Methoden

4.6.1 Zellkulturarbeiten

4.6.1.1 Präparation

Die organotypischen Schnittkulturen wurden nach dem Protokoll von Falsig et al. (2008) angelegt (11). Das Präparationsinstrumentarium von Falsig et al., an dem sich orientiert wurde, ist in Abbildung 11 dargestellt. Hierfür wurden neun bzw. zehn Tage alte Mäuse (C57 Black 6/N) dekapitiert. Nach Ethanoldeinfektion des Kopfes wurde der Schädel auf der Sterilwerkbank in Lupenpräparation vom Fell befreit und in eine sterilen Petrischale auf einer Kühlplatte mit auf 4 °C gekühltem 1x Krebsmedium überführt (Abb. 12 a bis b). Die gesamte weitere Präparation fand unter diesen Kühlbedingungen statt.

Anschließend wurde die Calvaria entlang der Suturæ coronalis (d; c wurde anders als bei Falsig et al. durchgeführt), sagittalis (e) und lambdoidea (f) in Mikropräparation mit einer Federschere eröffnet, die Okzipitalschuppen über dem Kleinhirn entfernt und das Gehirn

unter Durchtrennung der Medulla spinalis aus der Schädelbasis gehoben. Es folgten die Trennung des Prosencephalons von Mes- und Rhombencephalon oberhalb der Vierhügelplatte (g). Abschließend wurde das Kleinhirn vom Hirnstamm getrennt, indem durch die Fissura cerebellomedullaris in den vierten Ventrikel eingegangen und sowohl die Pedunculi cerebellares als auch die Marksegel mit einer spitzen Pinzette abpräpariert wurden.

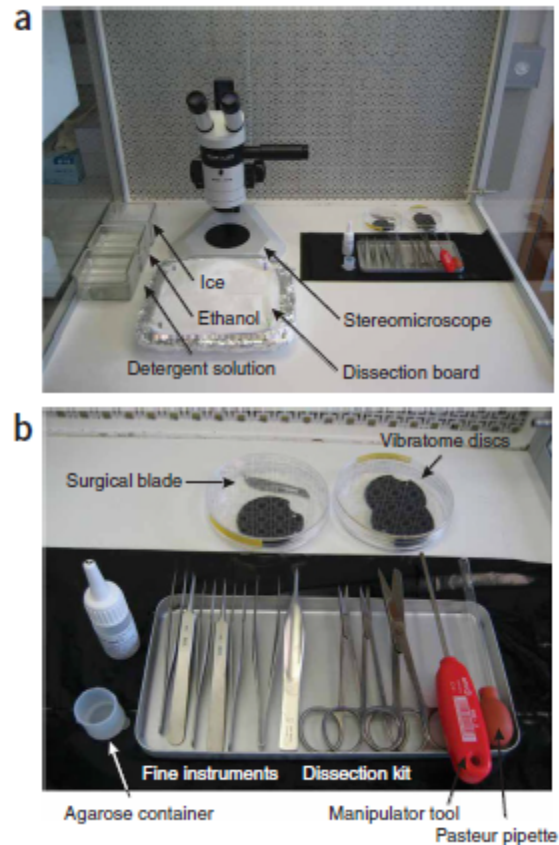


Abbildung 11. Präparationsinstrumentarium bei Falsig et al. Abbildung entnommen aus: Falsig J, Aguzzi A. The prion organotypic slice culture assay--POSCA. Nat Protoc. 2008;3(4):555-62. (11).

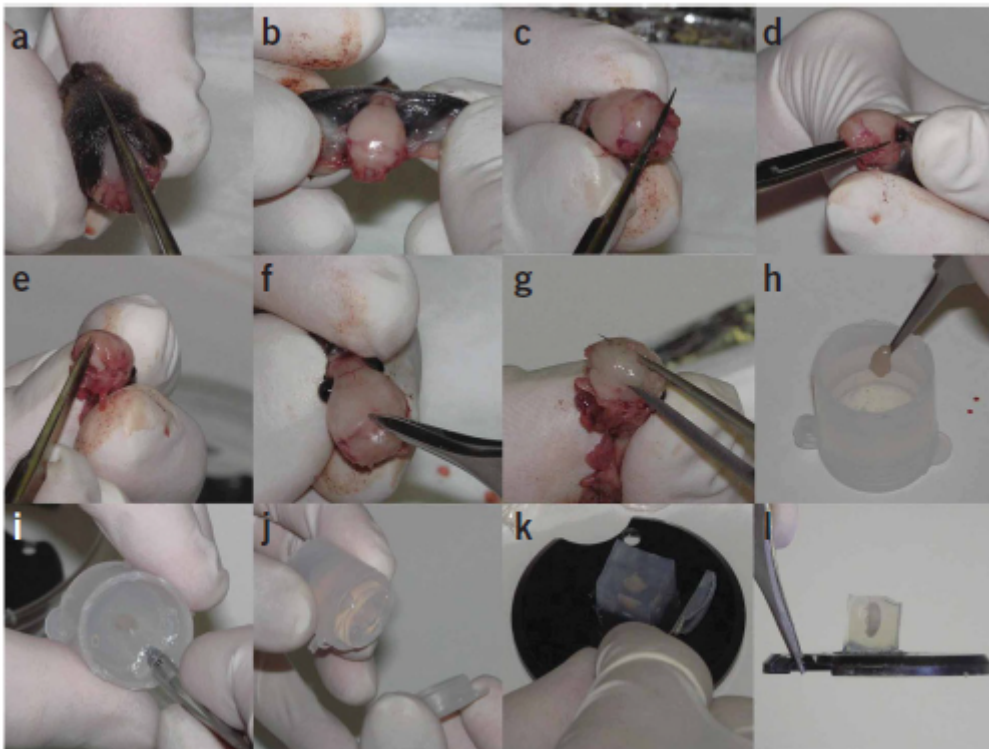


Abbildung 12. Einzelne Schritte der Schnittpräparation nach Falsig et al. a: Eröffnung des Kopffells in der Medianlinie; b: Abstreifen des Fells; c: Entfernung von Gewebsresten und des Rückenmarks. d: Eröffnung der Sutura coronalis von Orbita zu Orbita; e: mediane Eröffnung der Squama occipitalis von posterior; f: Eröffnung der Sutura lambdoidea von aurikulär her; g: Abtrennung des Prosencephalon von Mes- und Rhombencephalon mittels einer spitzen Pinzette; h bis j: Einlegen des herauspräparierten Kleinhirns in aufgewärmte und somit verflüssigte 4% low-melting Agarose; k: Ausschneiden des Kleinhirns in Form eines Agaroseblockes; l: Befestigung des Agaroseblockes mittels Histoacrykleber auf der Vorschubplattform des verwendeten Vibratoms in der Weise, dass die Vibratomklinge in der geplanten Schnittebene das Kleinhirn durchläuft. Anmerkung: bei der Präparation erfolgte in Schritt g die Abtrennung des Prosencephalons vom Mes- und Rhombencephalon, sodass anschließend noch das Kleinhirn (in der gleichen Technik wie sie in g dargestellt ist) herauspräpariert wurde. Die gesamte Präparation fand ab c in einer sterilen und gekühlten Petrischale statt, die mit 1x Krebsmedium gefüllt war (siehe Text). Abbildung entnommen aus: Falsig J, Aguzzi A. The prion organotypic slice culture assay--POSCA. Nat Protoc. 2008;3(4):555-62. (11).

Das so gewonnene Kleinhirn wurde zur besseren Handhabbarkeit in geschmolzener 4% low-melting Agarose (PEQLAB, Erlangen) aufgenommen (h bis j); diese wurde nach Aushärtung in gekühltem Krebsmedium in kleine Blöcke zugeschnitten (k). Hierbei wurde auf parallele bzw. rechtwinklige Ausrichtung der Blockkanten zur angestrebten sagittalen Schnittebene geachtet. Drei bis vier dieser Blöcke wurden mit Histoacrykleber (Aesculap AG, Tuttlingen) nebeneinander auf die Vorschubplattform des Vibratoms (Integraslice 7550MM, Campden Instruments Ltd., UK), geklebt (l) und, umspült von gekühltem Krebsmedium, unter einer Vorschubgeschwindigkeit von 0,2 mm/s in cerebellärem Gewebe in 350 µm dicke sagittale Schnitte zerlegt, von denen nur diejenigen auf der Ebene des Vermis verwendet wurden. Diese konnten anschließend in einer Petrischale, gefüllt mit 5 ml Präparationsmedium (Kulturmedium & 1x MEM, 2:3), auf einem auf 4°C gekühlten Aluminiumblock von Agaroseresten befreit und auf eine semipermeable Membran (Millicell Cell Culture Inserts PICM0RG50 Merck Millipore, Massachusetts,

USA) gelegt werden, wie von Stoppini et al. 1991 beschrieben. Diese wiederum wurde in einen mit 1,1 ml Kulturmedium befüllten Well einer Sechs-Well-Platte (Falcon) befördert und stand dort in dem Kulturmedium. Das Kulturmedium befand sich ausschließlich unterhalb der semipermeablen Membran, wodurch die Ernährung durch Diffusion von unten gewährleistet war. Durch Kapillarkräfte bildete sich ein dünner Flüssigkeitsfilm auf den Schnitten. Hierbei wurde darauf geachtet, dass sich nur Schnitte verschiedener Mäuse eine Membran bzw. einen Well teilten und sich nicht mehr als drei bzw. vier Schnitte in einem Well befanden.

Zur Gewinnung von Proben aus älteren Mäusen für die in 5.1 dargestellten Versuche wurden die gleichen Prinzipien verfolgt. Allerdings wurden die älteren Mäuse zunächst in eine CO₂-Narkose versetzt. Das daraufhin gewonnene Cerebellum wurden mit Probenpuffer versetzt und sonifiziert (siehe Kapitel 4.6.1.4).

Tabelle 5. Übersicht über die verwendeten Schnittkulturen.

Anzahl an Schnitten	Alter der Maus	Alter bei Behandlung/Verwendung	Verwendungszweck
18	P10	P23	Austesten der primären und sekundären Antikörper (LC3B, Pv, Anti-Kaninchen, Anti-Maus, LC3B+/Pv+, Sekundär-AK kombiniert)
24	P10	P22	AK-Testung nach Bafilomycinbehandlung für 0, 1, 2 und 6 h
18 (+ 18 Mausproben)	P10 (P22 / P29 / P36)	P22 / P29 / P36	Schnitt vs. Maus
18	P10	P22 / P29 / P36	Relevanz des Schnittalters
9	P10	P24	Induzierbarkeit mit Rapamycin/ PBS
18	P10	P25	Bafilomycin Konzentration
24	P9/10	P21/22	Bafilomycin

			Behandlungsdauer
18	P10	P22	3-Methyladenin Behandlungsdauer
6	P10	P22 – P28	Histologie 0 h
6	P10	P22 – P28	Histologie 3 h
6	P10	P22 – P28	Histologie 6 h
6	P10	P22 – P28	Histologie 12 h
Gesamt: 171			

Da das Herstellen der hirnormotypischen Schnittkulturen viele Versuchstiere erfordert und die Voruntersuchungen mittels Western Blots lediglich der Bestätigung bisher bekannter Tendenzen dienten, wurde zunächst eine niedrige Stichprobengröße gewählt, um Tierleben zu schonen (n = 3 bis 6). Da bereits diese kleinvolumigen Voruntersuchungen die erwarteten und aus anderen experimentellen Systemen bekannten Effekte bestätigten, war es nicht notwendig, die Fallzahl zu erhöhen oder bei so kleiner Fallzahl die Signifikanz der in den Western Blot-Untersuchungen ermittelten Mittelwertunterschiede zu testen.

4.6.1.2 Kulturbedingungen

Die Schnittkulturen wurden zur ausreichenden Regeneration und Vernarbung für 10 Tage bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Das Kulturmedium wurde alle zwei Tage unter sterilen Bedingungen gewechselt.

4.6.1.3 Pharmakologische Behandlung

Nach Abschluss der Regenerationszeit wurden die Schnittkulturen an DIV21 (soll heißen: day in vivo 21; entspricht day in vitro 11) bis 25 mit verschiedenen Pharmaka inkubiert, indem diese dem Kulturmedium beigefügt wurden. Alle Pharmaka wurden beim Wechsel des Kulturmediums immer zusammen mit diesem eingegeben, um den Einfluss eines möglicherweise verminderten Nährstoffangebots auf die Autophagiemaschinerie zu minimieren. Als Pharmaka kamen zum Einsatz:

- a) **Bafilomycin B1:** zur Inhibition der Autophagosomendegradation (s. Kapitel 3.3.3); initial zur Determinierung der Konzentration in 100 nM, 200 nM und 400 nM gelöst in DMSO über acht Stunden; anschließend 100 nM gelöst in DMSO über 3, 6, 12, und 24 Stunden. Bei der Western Blot-Untersuchung wurde jede Probe mit einer entsprechenden Kontrolle (nur DMSO) gepaart. Der Einsatz von Bafilomycin diente der besseren Nachweisbarkeit von autophagosomengebundenem LC3B2 durch Akkumulation der ansonsten in Neuronen rapide degradierten Autophagosomen. Da das Wirkmaximum von Bafilomycin in den Western Blot Untersuchungen bereits bei 12 Stunden lag und ab einer Behandlung über 18 Stunden von unspezifischen Off-Target-Effekten berichtet wurde (siehe Einleitung/Kapitel 3.3.3), wurde die Behandlung der Schnittkulturen mit Bafilomycin zur histologischen Untersuchung auf 12 Stunden begrenzt.
- b) **Rapamycin:** zur Induktion der Autophagosomenbildung (s. Kapitel 3.3.3); 500 nM Rapamycin (gelöst in Kulturmedium) über 2 Stunden unter Zusatz von 100 nM Bafilomycin B1; dieser Ansatz wurde jeweils über die Dauer von zwei Stunden mit einer reinen 100 nM Bafilomycin B1-Behandlung sowie einem Mangelmedium aus PBS und 100 nM Bafilomycin B1 gepaart. Der Einsatz von Rapamycin und Mangelmedium diente dem Nachweis, dass die Autophagosomenbildung in den Schnittkulturen noch induzierbar und somit nicht auf höchstmöglichem Niveau ist.
- c) **3-Methyladenin:** zur Inhibition der Autophagosomenbildung (s. Kapitel 3.3.3): 3 mM 3-MA gelöst in Kulturmedium über 1, 2 und 6 Stunden jeweils gepaart mit Kontrollen. Der Einsatz von 3-Methyladenin diente dem Nachweis, dass die Autophagosomenbildung in den Schnittkulturen noch supprimierbar und somit nicht auf dem niedrigstmöglichen Niveau ist.

4.6.1.4 Probengewinnung und Fixierung

Nach Abschluss der Inkubation wurden die Schnitte je nach dem weiteren Verwendungszweck unterschiedlich behandelt:

- a) **Immunoblot:** die Schnittkulturen wurden einzeln mit einem Skalpell aus der Membran herausgeschnitten. Es folgten: Auflösung in 200 µl auf 90°C erhitztem (Blockthermostat TCR 100, Roth, Karlsruhe) 2x Probenpuffer und Sonifizierung

(Ultraschallprozessor UP100H, Hielscher, Teltow) für 20 s; anschließend erneut drei minütige Inkubation bei 90°C und Lagerung bei -20°C bis zur Durchführung des Western Blots.

- b) **Immunfluoreszenz:** Fixierung der pharmakologisch behandelten oder nativen Schnittkulturen für 30 min bei Raumtemperatur in 4% Paraformaldehyd (1 ml unter und 1,5 ml auf der Membran), anschließend Lagerung in PBS/0,05% NaN₃ (aus 10% Stocklösung, 1 ml unter und 1,5 ml auf der Membran) über Nacht bei 4°C in der Kühlkammer.

4.6.2 Protein-Techniken

4.6.2.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Statt der Bestimmung der Proteinkonzentration mithilfe der BCA-Methode wurde für jede verwendete Probe zunächst die Actinkonzentration mittels SDS-PAGE (10% Polyacrylamidgel, Actin: 42 kDa) und Western-Blot (s. Kapitel 4.6.2.3) ermittelt. Hierfür wurden die entwickelten Filme eingescannt und sowohl Bandenfläche als auch mittlere Intensität der Grauwerte pro Fläche abzüglich des Hintergrundes der im Western Blot dargestellten Proteinbanden mittels ImageJ Version 1.52i ermittelt. Der Epson Scanner wurde dabei mit 8-bit Graustufen-Durchlichtscan und einer Auflösung von 600 dpi verwendet. Das Bild wurde im Bitmap-Format gespeichert. Die Aufnahme war weder im Grau- noch im Weißbereich im Sättigungsbereich. Dieses Verfahren wurde bei jeder Auswertung von Western Blots angewandt. Anschließend wurde für zu vergleichende Proben diejenige mit der höchsten Actinkonzentration in der Proteingelektrophorese (18% Polyacrylamidgel, LC3B1: 16 kDa, LC3B2: 14 kDa) mit 3 µl (falls ein Probenvolumen der zu vergleichenden Proben 10 µl überschritt) bzw. 5 µl standardisiert und anhand der gemessenen optischen Dichten der Actinbanden die Auftragungsvolumina der behandelten Proben an die Kontrollextrakte angepasst. Mit diesen korrigierten Auftragungsvolumina wurden die LC3B1- und LC3B2-Gehalte in den Proben im Western Blot gemessen. Nach jeder LC3B-Bestimmung wurden die Western Blots gestrippt und gegen Actin getestet, denn zur Auswertung und vergleichbaren Quantifizierung der errechneten LC3B2-Gehalte ist es notwendig, die entsprechenden Banden der Proben einheitlich zu normalisieren. Dies erfolgte durch eine Proben-interne Normalisierung,

indem in jeder Probe ein Quotient aus der ermittelten optischen Dichte von LC3B2 und der gemessenen optischen Dichte von Actin (möglich wären auch andere HKPs = housekeeping proteins wie Tubulin oder GADPH) gebildet wurde. Die Verwendung des ubiquitär exprimierten Actins ist hierbei eine gängige Methode und folgt den gültigen Leitlinien zur Autophagieforschung (109). Ein zweiter Quotient kann aus dem überwiegend Autophagosomen-gebundenen LC3B2 und dem vor allem cytosolisch vorliegenden LC3B1 gebildet werden. Dieser Quotient stellt einen Konversionsindex von cytosolischem zu autophagosomalem LC3B dar und könnte damit prinzipiell als Marker für die Autophagosomenbildung verwendet werden. Allerdings ist eine zuverlässige Bestimmung von LC3B1 angesichts der großen Unterschiede bei verschiedenen Zell- und Gewebstypen (insbesondere im Gehirn) methodisch schwierig, weil der LC3B2/LC3B-Quotient sehr zell- und gewebetyp-abhängig ist. Die vorliegende Arbeit richtet sich diesbezüglich nach den Leitlinien zur Messung der Autophagie von Klionsky et al. (109). Der LC3B2/LC3B1-Quotient wurde zu Beginn der Autophagiemessung im Western Blot als Maß verwendet. Es stellte sich jedoch heraus, dass LC3B1 eine starke Variabilität aufweist, die vermutlich teilweise auf eine Instabilität während der Probenlagerung beruht. Darüber hinaus verfügen die meisten LC3B-Antikörper über eine deutlich höhere Sensitivität gegenüber LC3B2 als LC3B1, was in der Regel zu einem stärkeren LC3B2- als LC3B1-Signal führt (109, 175). Daraus ergab sich in der vorliegenden Arbeit das Problem eines sehr geringen LC3B1-Signals bei starkem LC3B2-Signal, sodass die Expositionszeit des Filmes ein Problem darstellte und jeweils eines der beiden Proteine über- bzw. unterbelichtet wurde. Da die Signalstärke von Actin in einem ähnlichen Bereich wie die von LC3B2 liegt und zudem ein Haushaltsprotein ist, wurde der Quotient LC3B2/Actin als maßgeblicher Parameter zur Beurteilung des Autophagiestatus gewählt. Es erfolgten Belichtungsserien mit einer Dauer von zwei Sekunden bis zu drei Minuten, um sowohl Actin als auch LC3B2 zu ermitteln, während eine annähernd lineare Beziehung zwischen Belichtungszeit und Dichtenzunahme der Schwärzung auf dem Fotofilm bestand. Auf diese Weise wurde eine Über- bzw. Unterbelichtung vermieden. Die Auswertung und Interpretation der Western Blots erfolgte anhand der LC3B2/Actin-Quotienten. Die LC3B2/LC3B1-Quotienten wurden der Vollständigkeit halber ebenfalls errechnet; die Ergebnisse sind in der Appendix dargestellt.

Da es sich bei dem verwendeten LC3B-Antikörper um einen kommerziell erhältlichen Antikörper handelt, der seit Jahren bei entsprechenden Fragestellungen etabliert ist,

wurde auf eine eingehende Ermittlung der Spezifität und Sensitivität des Antikörpers verzichtet. In internationalen, dem peer-review unterzogenen Publikationen wurde dieser Antikörper zudem für die Verwendung in Western Blots und immunhistochemischen Darstellungen an primären Neuronenkulturen und cerebellären hirnanatomischen Schnittkulturen u.a. durch die hiesige Arbeitsgruppe validiert (9, 176-180). Dies wird durch die hohe Spezifität der Antikörper in den vorliegenden Western Blot Untersuchungen ohne Fremdbanden (s. Abb. 13) sowie das Vorliegen eines punktierten histologischen Signals (s. Abb. 27 und 28) – im Gegensatz zu einem diffusen – zusätzlich unterstrichen.

4.6.2.2 Proteingelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Proben wurden nach Versetzung mit 2x Probenpuffer, Sonifizierung und Inkubation bei 90°C (s.o.) auf Polyacrylamidgele aufgetragen (Actinbestimmung: 10%, LC3B2-Bestimmung: 18%). Als Referenzmarker wurde 5 µl Page Ruler (Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific, Massachusetts, USA) jeweils an einem Gelende aufgetragen. Bei 40-50 V (Sammegel) bzw. 80–120 V (Trenngel) erfolgte die Gelelektrophorese in einer Elektrophoresekammer (Bio-Rad, California, USA), gefüllt mit 1x Elektrophoresepuffer. Der Probenpuffer dient dabei der Verbesserung der LC3B-Detektionsrate auf PVDF-Membranen (109).

4.6.2.3 Western-Blot und Immunfärbung

Die PVDF-Membran (Immobilon-P Transfermembran PVDF, Merck Millipore, Massachusetts, USA) wurden in Methanol aktiviert, anschließend in ddH₂O gespült und in Blotting Puffer eingelegt. Gleichzeitig wurden Filterpapiere mit Blotting Puffer angefeuchtet. Die beladenen Gele wurden nun in einer Transferkammer (Bio-Rad, California, USA) auf die Membranen gelegt, mit Filterpapier umschlossen (Boden der Transferkammer – 2x Filterpapier – Membran – Gel – 2x Filterpapier) und luftfrei zusammengedrückt. Mit 15 V wurde für 50 min ein elektrisches Feld zum Transfer der Proteine auf die Nitrozellulosemembran erzeugt.

Es folgten eine einstündige Inkubation der Membranen mit 10% Blockierlösung und eine Beladung mit dem jeweiligen primären Antikörper über Nacht in entsprechender Verdünnung in Antikörperlösung bei 4°C in der Kühlkammer. Am nächsten Morgen wurden

die Membranen 3x 20 min in 1x TBST gewaschen, bevor sie für eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem jeweils vorgesehenen sekundären POD-labelled (Peroxidase-labelled) Antikörper in geeigneter Verdünnung in 1x TBST inkubiert wurden. Nach erneuter Waschung für 3x 20 min in 1x TBST wurden die Membranen zwischen zwei durchsichtige Folien aufgenommen und im Chemilumineszenzverfahren („enhanced chemiluminescence“ – ECL-Methode – Xu HJ et al., (181)) bearbeitet; damit wurden die durch Antikörper markierten Proteine als Banden auf Fotofilmen visualisiert. Hierzu wurden die Membranen für ca. 30 s mit ECL-A- und ECL-B-Lösung (3 ml : 3 ml) inkubiert, zwischen zwei Overhead-Folien gelegt, Luftblasen ausgewalzt und die Zielstrukturen über die Horse-raddish-Peroxidase-Reaktion durch Chemilumineszenz zum Leuchten gebracht. Die so aktivierten Membranen wurden zusammen mit einem Fotofilm in eine Belichtungskassette gelegt und in Abhängigkeit von Bildqualität, Hintergrundrauschen und Signalstärke unterschiedlich lange belichtet (Actin: 2 bis 10 s; LC3B: 30 s bis 3 min), bevor die Fotofilme in der Dunkelkammer unter Rotlicht manuell entwickelt wurden. Die hierfür verwendete Entwicklungsstraße gestaltete sich wie folgt: Entwickler – H₂O – Fixierer – H₂O. Auf eine gleichmäßige Benetzung der Filme mit allen verwendeten Reagenzien ist besonders geachtet worden. Aufgrund der unterschiedlichen Belichtungszeiten erfolgte die Visualisierung von LC3B und Actin auf unterschiedlichen Fotofilmen wie in Abbildung 13 gezeigt. Aus Gründen der Übersichtlichkeit und Platzersparnis erfolgt im Ergebnisteil eine zusammenfassende Darstellung zusammengesetzter Western Blots, bei denen die Schnittkanten eindeutig als solche markiert sind.

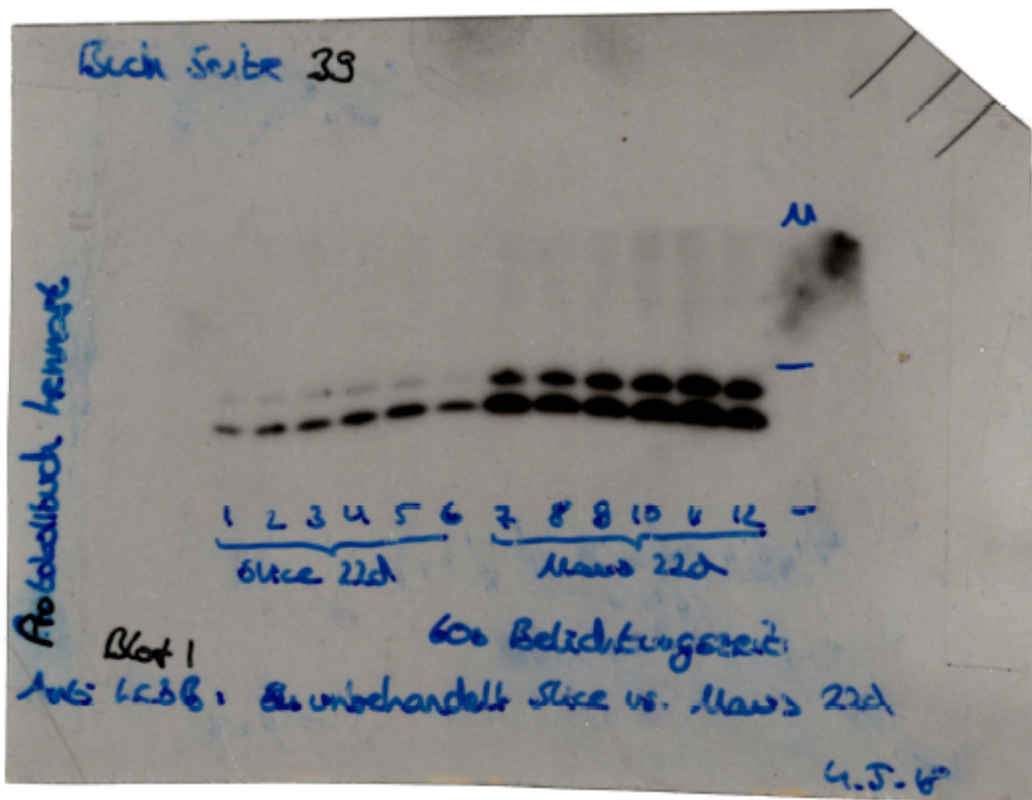
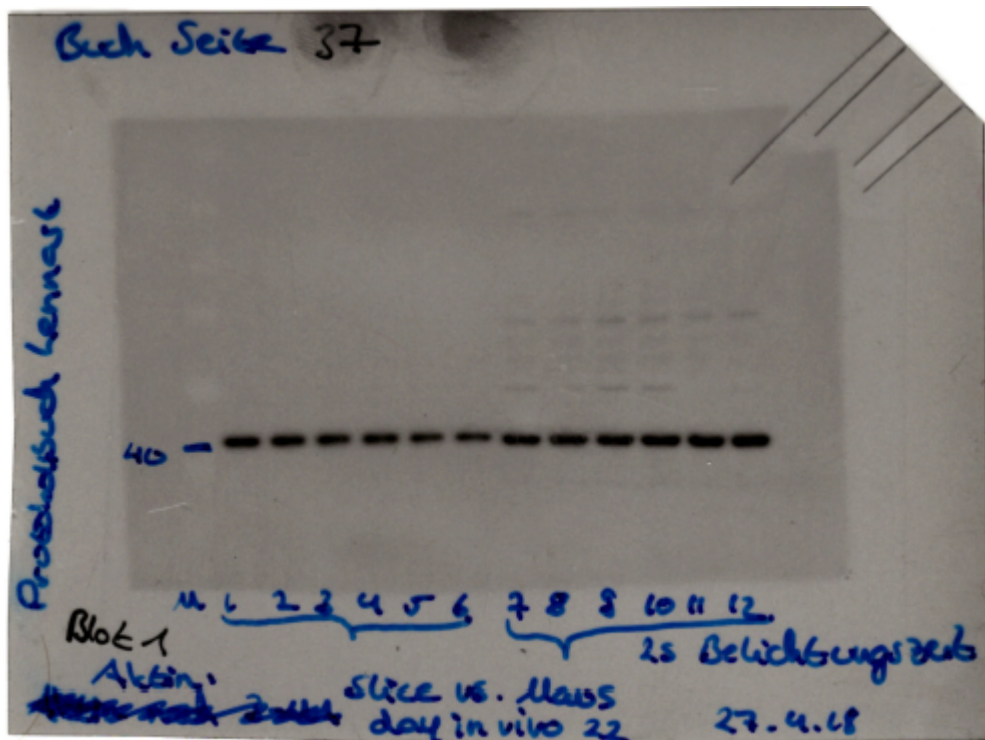


Abbildung 13. Repräsentatives Beispiel zweier Western Blot Filme. Oben: Visualisierung des Actingehalts (42 kDa) von Proben aus Maus und Schnittkultur, die zur Anpassung der Probenvolumina herangezogen. Unten: Visualisierung von LC3B1 (16 kDa) und LC3B2 (14 kDa) nach einer Belichtungszeit von 1 min wie in Kap. 4.6.2.3 beschrieben. Es sind keine signifikanten unspezifischen Banden bzw. Abbaubanden sichtbar. In den Ergebnissen werden LC3B- und Actinbanden (nach Anpassung der Probenvolumina, hier nicht aufgeführt) der Übersichtlichkeit wegen in einer zusammengesetzten Abbildung dargestellt.

4.6.3 Immunfluoreszenzfärbung und konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

Die theoretischen Grundlagen der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) wurden übersichtlich von Bayguinov et al. beschrieben und werden im nachfolgenden kurz zusammengefasst (182). Der Begriff der Konfokalität bezieht sich dabei auf die Objekt-, Pinhole- und Bildebenen, die sich gleichzeitig im Fokus befinden und somit konfokal sind. Die CLSM ist eine Technik innerhalb des Feldes der Lichtmikroskopie und dient der Reduktion des Streulichts, das bei der Beleuchtung einer Gewebeprobe entsteht und die mikroskopische Auflösung des zu untersuchenden Objektes limitiert. Dieses Streulicht ist bei der Mikroskopie von Gewebeproben mittels der Epifluoreszenz ein limitierender Faktor, der bis zur Etablierung der CLSM nur mit einer erheblichen Abflachung der zu untersuchenden Gewebeproben auf einige wenige Mikrometer angegangen werden konnte. Bei der CLSM wird das Untersuchungsobjekt mit einem konzentrierten Lichtkegel systematisch abgefahren, der in der Regel einem wellenlängenspezifischen Laser (angepasst an das Erregungsspektrum des Fluoreszenzantikörpers) entspricht. Zusätzlich wird dem Lichtdetektor eine kleine Öffnung (Pinhole) unterschiedlicher Form vorgeschaltet, deren Durchmesser auf die zu detektierenden Wellenlängen abgestimmt wird und somit den Anteil „irrelevanten“ Streulichts reduziert. Als Detektoren werden Photomultiplier tubes (PMT) verwendet, die emittierte Photonen mittels einer lichtsensitiven Kathode in Photoelektronen umwandeln, welche anschließend in ein digitales Signal umgewandelt werden können. Mit dieser Technik gelingt die Darstellung konfokaler Ebenen mit hoher optischer Auflösung. Die serielle Aufnahme der sich in den x- und y-Achsen ausdehnenden konfokalen Ebenen in der z-Achse bezeichnet man als z-Stack; diese ermöglicht die Sammlung dreidimensionaler Informationen über das Untersuchungsobjekt.

Vor Beginn der Immunfluoreszenzfärbung wurden die bereits fixierten Schnitte (s. Kap. 4.6.1.4) mit einem Skalpell aus der Membran herausgeschnitten, in 24-Loch-Titerplatten übertragen und für 90min mit 500 µl einer Blocklösung (0,1M PB Puffer, 10% NGS, 5% Triton X-100) pro Loch bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden sie mit Anti-Parvalbumin- (Maus, 1:500) und Anti-LC3B-Antikörpern (Kaninchen, 1:300) in Antikörperlösung versetzt und bei 4°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte eine Spülung mit 500 µl 0,1M PB-Puffer pro Loch für 3x 20 min bei Raumtemperatur, bevor die Inkubation mit sekundären Antikörpern erfolgen konnte. Hierfür wurden Anti-

Kaninchen- (Alexa 488) und Anti-Maus-Antikörper (Alexa 594) mit einer Inkubationszeit von einer Stunde bei Raumtemperatur unter Lichtschutz verwendet. Nach erneuter Spülung mit 500 µl 0,1M PB-Puffer pro Loch für 3x 20 min folgte schließlich die Eindeckelung auf Objektträgern mithilfe von Immu-Mount (Thermo Scientific, Massachusetts, USA) sowie die Lagerung bei 4°C in Dunkelheit.

Zeitnah wurden die Präparate mikroskopiert (Leica Microsystems konfokales Mikroskop SP8, Wetzlar). Hierbei wurde zunächst der vermale Lobulus VIII (auch: IIX, siehe Abb. 14) in Epifluoreszenz und 20x Vergrößerung lokalisiert. Dieser wurde im Anschluss in 63x Vergrößerung konfokal als z-Stack je nach Zelldichte in durchschnittlich vier Blickfeldern (3-5) des cerebellären Cortex fotografiert.

Zur Anregung der Alexa-488-markierten Antikörper wurde Wellenlängen von 500 - 525 nm, zur Anregung der Alexa-594-markierten Antikörper Wellenlängen von 560 - 640 nm angewandt. Dabei wurde stets ein Line Averaging von 5 (jedes Bild wird durch eine Mittelung von fünf Aufnahmen ermittelt), eine Geschwindigkeit von 400 Hz bei einer Auflösung von 1024x1024 verwendet. Im Z-Stack wurde der kleinstmögliche Schichtabstand von 0,33 µm genutzt, was eine Spanne von 13 bis 63 Schichten in der Z-Achse (Spannweite der Gesamtdicke der z-Stacks Z: 3,99 – 20,64 µM) ergab, die sich ausschließlich an den Ausmaßen des Stratum purkinjense orientierte und nicht an der Dicke des ganzen Schnittes. Der Gain (Verstärkung durch den Lichtdetektor) wurde vor allem für das LC3B-Signal so adjustiert, dass der prinzipiell LC3B-freie Zellkern signalfrei war, um das Hintergrundrauschen zu minimieren.

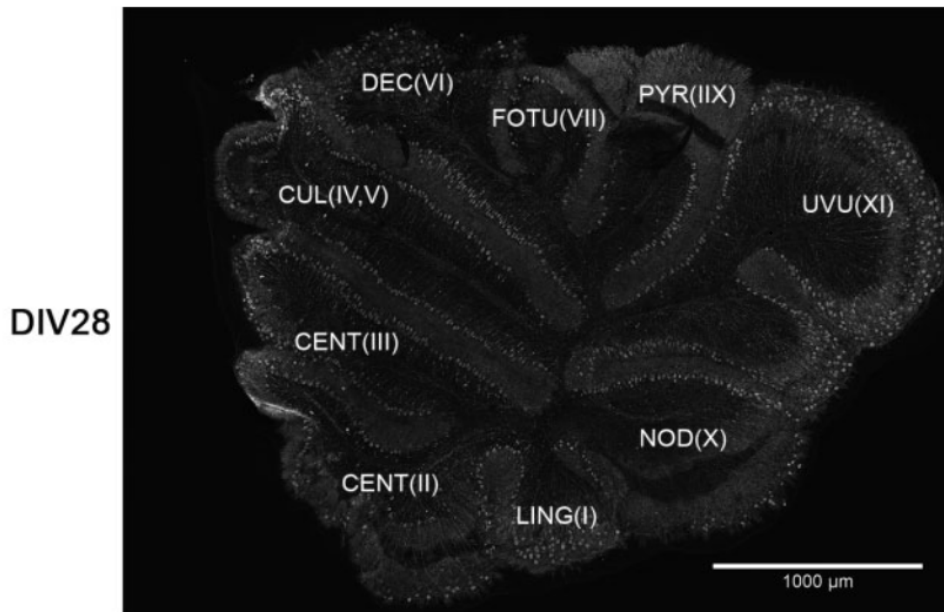


Abbildung 14. Cerebellärer hirnanatomischer Schnitt aus der Maus mit Beschriftung des Vermis. Das Bild zeigt einen Sagittalschnitt nach 28 Tagen *in vitro* und Anfärbung der Purkinje-Zellen mit einem anti-Calbindin D-28k-Antikörper. Da der Schnitt einer Maus am zehnten postnatalen Tag entnommen wurde, handelt es sich um den postnatalen Tag 38 Tage (P38). Gut zu erkennen sind die angefärbten großen Purkinje-Zellen im Stratum purkinjense und die helle Darstellung des oberflächlichen Stratum moleculare durch die Anfärbung der dichten Dendritenbäume der Purkinje-Zellen. Aufgrund des Anpassungsprozesses mit deutlicher Abflachung sieht man eine mehrreihige Anordnung der Purkinje-Zellen anstelle der klassischen einreihigen Topographie. Nach zentral folgen dem Stratum purkinjense das Stratum granulosum und das Marklager. Bei dem hier untersuchten Abschnitt handelt es sich um Lobulus VIII (hier IIX), die Pyramis. Beschriftung: LING (Lingula), CENT (Lobulus centralis), CUL (Culmen), DEC (Declive), FOTU (Folium & Tuber), Pyr (Pyramis), UVU (Uvula), NOD (Nodulus). Abbildung entnommen aus: Marschalek N, Albert F, Meske V, Ohm TG. The natural history of cerebellar degeneration of Niemann-Pick C mice monitored *in vitro*. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2014;40(7):933-45 (9).

4.6.4 Aufbereitung und Auswertung des Bildmaterials

Das gesamte Bildmaterial wurde als TIFF gespeichert und mit ImageJ aufbereitet (siehe Abb. 15). Da es sich um mehrere tausend aufgenommene Zellen mit vielen Einzelbildern pro Zelle handelte, wurde ein System zur besseren Durchführbarkeit der Untersuchung eingeführt. Hierzu wurde zunächst jede einzelne Zelle mit einer Nummer „verblindet“ (bei jedem neuen Blickfeld wurde erneut von 1 an gezählt). Anschließend wurden für jede nummerierte Zelle drei sich nebeneinander befindliche Schnittbilder auf Ebene der größten Zellkernausdehnung ausgesucht und diese zu einem Summationsbild für jede Zelle zusammengefasst.

Um die Validität der Arbeit zu erhöhen, wurde eine für die mikroskopische Einzelzellanalyse ausgesprochen große Stichprobengröße von 1344 Zellen gewählt. Bei durchschnittlich vier Blickfeldern (3-5) pro Objektträger wurden, sofern möglich, sieben Zellen (3-13) jedes zu untersuchenden Zelltyps pro Blickfeld verblindet ausschließlich nach Nummern ausgewählt. Diese Stichprobengröße ergab sich aus dem Schnitt mit der

geringsten Zelldichte, der über alle gemessenen Blickfelder über 28 PZs verfügte, was bei durchschnittlich vier Blickfeldern sieben Zellen pro Blickfeld ergab.

Die vorliegenden Untersuchungen wurden mittels indirekter Immunfluoreszenz von LC3B durchgeführt. Ein alleiniger Nachweis von Autophagosomen-gebundenem LC3B2 ist immunhistochemisch nicht möglich, auch wenn die gängigen Antikörper eine höhere Sensitivität für LC3B2 als für LC3B1 haben (175). Deshalb musste empirisch eine Messschwelle ermittelt werden, um das „Hintergrundrauschen“ der Färbung sowie LC3B1 herauszurechnen. Diese Messschwelle wurde bei 40 von 255 Graustufen (in einem Schwarzweißbild der Zelle) festgelegt. Ein signalpositiver Pixel musste eine Signalintensität haben, die diese Messschwelle überschritt ($>40/255$), damit er in die Messung einbezogen wurde. Die Messschwelle kann als konservativ angesehen werden, da die Signalintensitäten in den meisten Untersuchungsobjekten $60/255$ nicht überschritten. Diese Tatsache ist vor dem Hintergrund relevant, dass Hirngewebe zu den Gewebetypen gehört, die vermehrt LC3B1 exprimieren (109). Allerdings zeigte sich zumindest in den Western Blots der hirnormotypischen Schnittkulturen in der vorliegenden Untersuchung nur eine schwache Anfärbung des LC3B1. Darüber hinaus zeigt die indirekte Immunfluoreszenz trotz spezifischer Antikörper und des regelhaften Gebrauchs in der Autophagieforschung grundsätzlich ein „Hintergrundrauschen“, das mit GFP-Tagging oder transgenen Mäusen möglicherweise geringer ausgefallen wäre und am konfokalen Mikroskop korrigiert werden musste (173, 183, 184). Dies gelang, indem der Gain so eingestellt wurde, dass der Bereich des Zellnucleus frei von LC3B-Signal war. Dort befindet sich kein LC3B und ein dort gemessenes Signal war entweder auf die Sensibilität der Lichtsensoren des Mikroskops oder das „Hintergrundrauschen“ der Färbung zurückzuführen. Im Soma und, soweit sichtbar, in den proximalen Dendriten (bei Purkinje-Zellen) wurde nun die Zellfläche und sowohl die Gesamtfläche des LC3B-Signals als auch die Anzahl und Fläche der LC3B-Signalpartikel gemessen, sodass die Messung vor allem Partikel einbezog, die anhand einer Voranalyse als LC3B2-gebundene Autophagosomen identifiziert wurden.

4.6.5 Datenanalyse

Zur Datenanalyse und Diagrammerstellung wurden SPSS (Version 25, IBM, New York, USA) und Microsoft Excel 2007 (Microsoft Corporation, Washington, USA) in Zusammenarbeit mit dem Institut für Biometrie der Charité Universitätsmedizin Berlin verwendet. Die Berechnung der Signifikanz der Mittelwertunterschiede der Western Blot-Ergebnisse wurde unterlassen, da es [1] lediglich um die Bestätigung einer aus anderen Untersuchungsmodalitäten bekannten Tendenz ging, [2] die Wahrscheinlichkeit eines α -Fehlers damit steigen und eine α -Fehlerkorrektur nach sich ziehen würde, die wiederum das Risiko eines β -Fehlers bezüglich der Testung der Nullhypothese in der histologischen Untersuchung erhöhen würde, und außerdem [3] eine Signifikanztestung bei einer niedrigen Fallzahl ohnehin diskutabel wäre (weitere Erörterung in Kapitel 7.1). Als maßgeblicher Parameter wurde wie in der Literatur üblich die Anzahl LC3B-immunopositiver Partikel pro Zelle gewählt. Jedoch wurde zur Egalisierung von Unterschieden bezüglich der Zellfläche das gemessene LC3B-Signal auf die Zellfläche bezogen und somit ein LC3B-Zellflächen-Quotient [LC3B-Partikel pro Zelle/Zellfläche] und [LC3B-Fläche pro Zelle/Zellfläche] gebildet. Dieser LC3B-Flächenquotient sowie weitere Auswertungen bezüglich der durchschnittlichen Partikelgröße pro Zelle und pro Zellfläche finden sich in der Appendix.

Da die statistische Signifikanz nicht mit der Größe eines Effektes, seiner Kongruenz mit anderen bekannten Ergebnissen oder seiner Relevanz gleichzusetzen ist, sondern lediglich die Wahrscheinlichkeit darstellt, dass ein so extremer oder noch extremerer Wert unter Annahme der Nullhypothese auftritt, wird die Verwendung von Signifikanztestungen in der vorliegenden Arbeit auf das Testen der untersuchten Nullhypothese mit einer konfirmatorischen TWO-WAY-Anova beschränkt (zu weiteren Erläuterungen siehe Appendix „Die Bedeutung der statistischen Signifikanz“). Darüber hinaus wurden in eingeschränktem Maße exploratorische ONE-WAY-Anovas durchgeführt, die eindeutig als solche gekennzeichnet und deren Ergebnisse als suggestiv aufzufassen sind.

Zum Vergleich der untersuchten Purkinje-Zellen mit den Parvalbumin-positiven Interneuronen (PVI) wurde ein Quotient aus den LC3B-Partikel-Quotienten der einzelnen Zelltypen gebildet [LC3B-Partikel/Purkinje-Zelle / LC3B-Partikel/PVI]. Zur statistischen Analyse der Einflussnahme der Variablen „Zelltyp“ und „Behandlungsdauer“ wurde eine TWO-WAY-Analysis-of-Variations (ANOVA) zwecks Bestimmung des Einflusses von zwei

kategorialen unabhängigen Variablen (Zelltyp, Behandlungsdauer) auf eine kontinuierliche abhängige Variable verwendet und somit eine konfirmatorische Testung der Nullhypothese vorgenommen. Das Signifikanzniveau wurde auf $\alpha = 0,05$ festgelegt und die sich signifikant unterscheidenden Paare mittels des Tukey HSD Post Hoc Tests identifiziert (185, 186). Zusätzlich wurden mit dem Datensatz exploratorische ONE-WAY-Anovas gerechnet, um einen Eindruck zu bekommen, was der Datensatz jenseits der Testung der Nullhypothese an Informationen enthält (unabhängige Variable waren stets die Behandlungsdauer, abhängige Variable jeweils die Anzahl der LC3B-positiven Partikel pro Zelle bzw. pro Zellfläche). Hierbei wurden exploratorische ONE-WAY-Anovas im Gegensatz zu TWO-WAY-Anovas angewandt, da diese die Möglichkeit bieten, PZ und PVI separat auf den Einfluss der Behandlungsdauer zu testen, während sich mittels einer TWO-WAY-Anova nur der Einfluss der Behandlungsdauer auf die Gesamtheit der untersuchten Zellen testen lies. Da es sich hierbei jedoch lediglich um eine exploratorische Analyse ohne α -Fehlerkorrektur und Testung einer Nullhypothese handelt, sollten die Ergebnisse dieser Tests lediglich als Hinweise auf die dort gemachten Beobachtungen gewertet werden. Als letztes wurde eine einfache lineare Regressionsanalyse mit „Anzahl LC3B-immunopositiver Partikel pro Zelle“ als abhängige Variable und „Bafilomycinbehandlungsdauer“ als Einflussvariable separat für PZ und PVI berechnet.

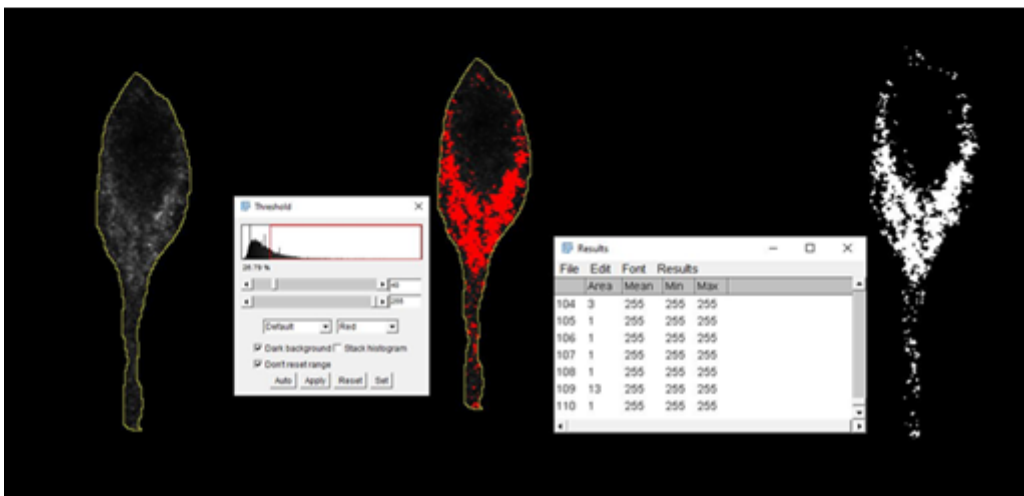
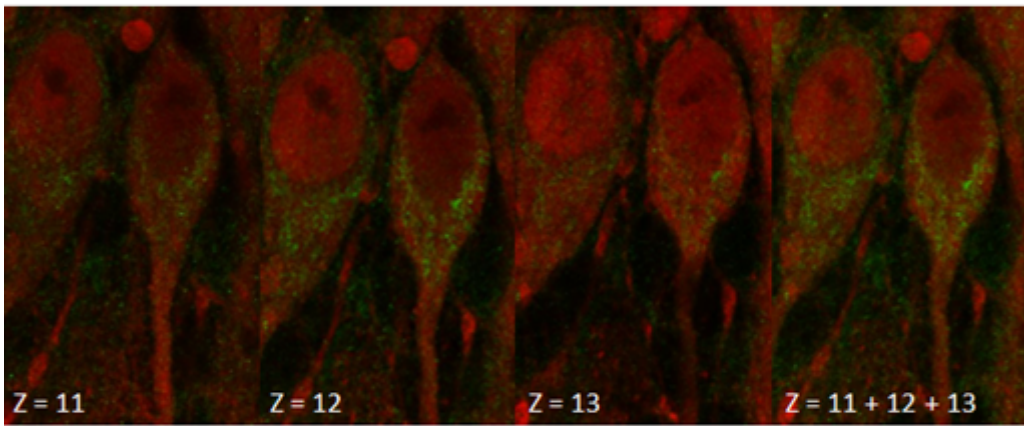
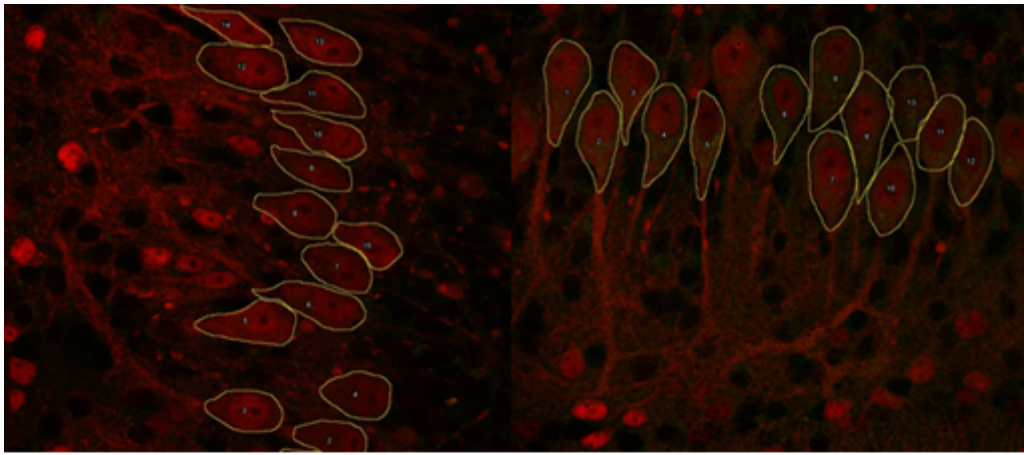


Abbildung 15. Ablauf der Auswertung des Bildmaterials mit ImageJ. Zunächst wurden alle Purkinje-Zellen bzw. Parvalbumin-positiven Interneuronen seriell nummeriert (oben). Anschließend wurden für alle nummerierten Zellen drei nebeneinanderliegende Bildebenen ausgewählt, auf denen der Zellkern zu sehen und zu einem Summationsbild zusammengefasst (Mitte) war. Als nächstes wurden 28 Purkinje Zellen und 28 Parvalbumin-positive Interneuronen aus jedem Schnitt blind (nur nach Nummer) ausgewählt und ausgewertet. Hierfür wurde die zu analysierende Zelle ausgeschnitten, die Zellfläche gemessen, eine Messschwelle für das LC3B-Signal (488nm Kanal) zum Ausschluss von Rauschsignal und diffus cytosolischem LC3B1 angelegt. Abschließend wurden Anzahl und Fläche der Signalpartikel gemessen (unten). Die hier abgebildeten Zellen wurden aufgrund des überdurchschnittlichen Signals und somit guter Visualisierung zu Vorführungszwecken ausgewählt und entsprechen nicht dem statistisch berechneten Mittel.

5 Ergebnisse

Wie bereits im Rahmen der Fragestellung erläutert, zielt die vorliegende Arbeit auf den ersten direkten quantitativen Vergleich der Autophagosomenbildung zweier unterschiedlicher Nervenzelltypen im gleichen organotypischen Mikromilieu ab. Da die Anzahl vergleichbarer Arbeiten zur Autophagie in cerebellären hirnanorganotypischen Schnittkulturen gering ist, gilt es zunächst, die Validität des Versuchsansatzes bzw. des experimentellen Systems zu testen, indem zur Feststellung von Abweichungen der experimentellen Variablen von bisher bekannten Verhältnissen getestet wird.

Hierzu erfolgt erstens eine quantitative Gegenüberstellung der gewählten Kulturform mit direkt aus einer dem Kulturalter entsprechenden Maus gewonnenen Proben zur Einschätzung der quantitativen Größenordnung der Autophagosomenzahl, in denen sich die Schnittkultur im Vergleich zur normal entwickelten Maus bewegt. Hierbei handelt es sich vereinfacht um die Frage, inwieweit eine aus Schnittkulturen erarbeitete quantitative Aussage über den Autophagosomenstatus und die Autophagosomenbildung auf Mäuse überhaupt übertragbar ist (5.1).

Darüber hinaus wird zweitens die Frage zu beantworten sein, inwieweit kleine Variationen der Kulturdauer von wenigen Tagen die Vergleichbarkeit der Schnittkulturen beeinflussen und wie stabil die Autophagie in cerebellären organotypischen Schnittkulturen über eine Dauer von zwei Wochen ist (5.2).

Angesichts der in der Einleitung vorgetragenen Unterscheidung zwischen basaler und induzierter Autophagie gilt es drittens, zu testen, ob die Kulturbedingungen *in vitro* schon Stressreiz genug sind, um die Autophagie so stark zu induzieren, dass man nicht mehr von einer Untersuchung der basalen Autophagosomenbildung ausgehen kann (5.3).

Viertens stellt sich die Frage, ob und ggf. in welchen Konzentrationen bzw. über welche Behandlungszeiten die Substanz Bafilomycin B1 verwendet werden muss, um einen ausreichenden Wirkungsgrad (im maximalen Bereich) für die Untersuchung zu erreichen und auch eine Aussage über das richtige Wirkungszeitfenster zu machen. Das Pharmakon Bafilomycin B1 soll in der vorliegenden Arbeit die Messung der Rate der Autophagosomenbildung bzw. des Autophagosomenstatus durch eine Blockade von deren Abbau ermöglichen (5.4).

Als fünfte Fragestellung soll die qualitative Wirkung eines zweiten Pharmakons, des PI3K-Hemmers 3-Methyladenin, untersucht werden. Hierdurch lässt sich zum einen weiter untersuchen, ob auch der Autophagosomenabbau im cerebellären organotypischen Schnitt den bisher bekannten Regeln folgt und ob in der Autophagieforschung verbreitete Pharmaka auch in dieser Modalität vergleichbare Wirkungen zeigen. Zum anderen lässt sich prüfen, ob die Kulturbedingungen die Autophagiemaschinerie im Schnitt so stark supprimieren, dass sie „auf niedrigster Flamme läuft“ und eine Untersuchung dadurch entweder unverhältnismäßig schwer oder aber wenig repräsentativ wäre (5.5).

Abschließend soll die eigentliche Fragestellung, nämlich neuronentypspezifische quantitative Unterschiede in der Autophagosomenbildung, experimentell geprüft werden (5.6).

Zwar werden die ebenfalls bestimmten LC3B2/LC3B1-Quotienten der Kapitel 5.1 bis 5.5 in den jeweiligen Kapiteln zusammenfassend erwähnt. Die ausführlichere Darstellung dieser Quotienten findet, wie im Methodenteil bereits beschrieben, zur Wahrung der Übersichtlichkeit und Verständlichkeit der Ergebnisdarstellung gesondert in einer Appendix statt (Kapitel 7).

5.1 Vergleich der Autophagosomendichte zwischen hirnormanotypischen Kleinhirnschnitten und Kleinhirnproben von altersentsprechenden Mäusen

Begonnen wurde mit einem Vergleich der Autophagosomenanzahl zwischen Proben aus hirnormanotypischen Schnittkulturen und Proben, die direkt aus Mäusen gewonnen wurden und die somit keine Exposition *in vitro* erfahren haben. Berücksichtigt man, dass cerebelläre Schnitte, aus Mäusen am zehnten postnatalen Tag entnommen (P10), die beste Entwicklung in der hirnormanotypischen Kultur zeigen, und dass nach Abschluss der Präparation zehn bis zwölf Tage in Kultur folgen sollten, um Zeit für ausreichend Regeneration und Reorganisation zu lassen, begannen die experimentellen Untersuchungen also 20 bis 22 Tage nach der Geburt der Maus (P20 – P22). In der vorliegenden Untersuchung wurden (mit Ausnahme der Untersuchungen, in denen anderes angegeben ist) Schnittkulturen mit einem Alter von P22 bis P25 verwendet.

Diesen wurden Kleinhirnhomogenisate gegenübergestellt, die direkt aus Mäusen mit dem entsprechenden postnatalen Alter gewonnen wurden und neben dem Vermis noch Teile der Hemisphären enthielten.

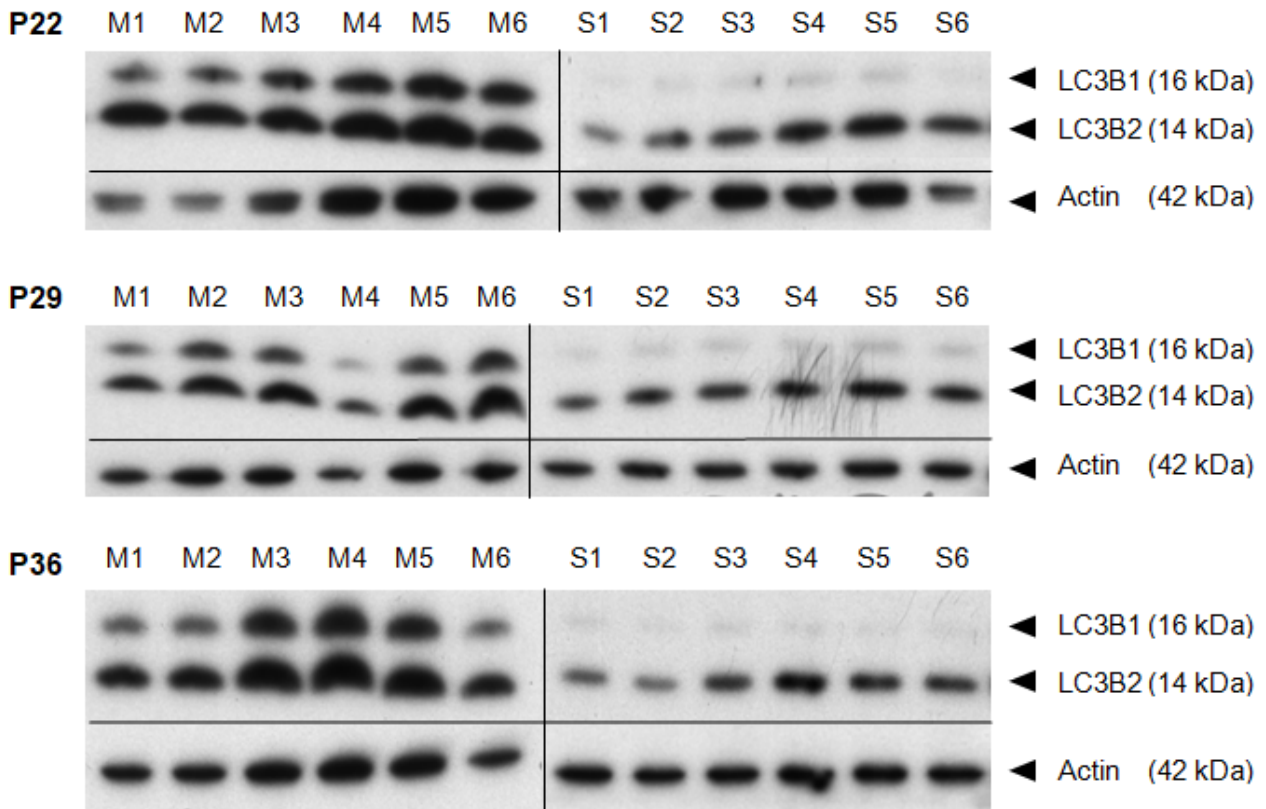
Zum Vergleich der Autophagosomengehalte der Proteinextrakte wurden Western Blots von jeweils sechs Schnitten und sechs Mausproben durchgeführt ($n = 6$, Abb. 16, M = Maus, S = Schnitt). Zusätzlich wurden neben dem Zeitpunkt P22 auch noch P29 und P36 untersucht, um einen besseren Eindruck zu bekommen, ob es eine konstante und reproduzierbare quantitative Beziehung zwischen der Schnittkultur und der direkt aus der Maus gewonnenen Probe gibt. Insgesamt wurden also 18 Schnitte und 18 Mausproben im Western Blot untersucht. Dabei wurden die jeweils zu vergleichenden Proben (S1-M1, S2-M2, S3-M3 etc.) zunächst in Bezug auf ihre Actinkonzentration untersucht. Das Auftragungsvolumen für den Probenvergleich sollte anhand der Actinkonzentration adjustiert werden, damit gemessene Proteindichten nicht aufgrund unterschiedlicher allgemeiner Proteinkonzentrationen der Proben stark auseinandergehen (genauer siehe Kapitel 4.6.2.1). Nachdem der Western Blot in den adjustierten Probenvolumina mit Bestimmung des LC3B sowie des Actin durchgeführt wurde, konnte nach dem Scannen entwickelter Filme ein Quotient aus der optischen Dichte der Banden des Autophagosomen-gebundenen LC3B2 (14 kDa im Unterschied zum cytosolischen LC3B1 mit 16 kDa) und der optischen Dichte der Actinbanden (42 kDa) gebildet werden. Durch diese Normalisierung konnten gemessene Werte nochmals im Hinblick auf Unterschiede in Zell- und Gesamtproteingehalt korrigiert und so die Vergleichbarkeit erhöht werden.

Dieser Versuch führte zu zweierlei Ergebnissen, die in den Abbildungen 16 und 17 sowie der Tabelle 6 dargestellt sind. Die Abbildungen zeigen einen deutlichen Unterschied zwischen den Proben aus den Schnittkulturen und denen aus gleichaltrigen Mäusen. Dabei ergab sich eine quantitative Beziehung, bei denen der LC3B2/Actin-Mittelwert der Mausproben jeweils den der Kulturproben um den Faktor 3,1 (P22), 1,7 (P29) und 2,4 (P36) übersteigt. Die genauere Darstellung der Ergebnisse der LC3B2/LC3B1-Quotienten findet sich in Kapitel 7.1 (Appendix).

Tabelle 6. Vergleich der Mittelwerte der LC3B2/Actin-Quotienten (mit Standardabweichungen) zwischen cerebellärem hirnorganotypischem Schnitt und cerebellärem Homogenisat aus gleichaltrigen Mäusen.

N = 6	Schnitt	Maus	Unterschiedsfaktor
P22	0,67 (0,28 – 1,06)	2,06 (1,1 – 3,02)	3,1
P29	0,80 (0,65 – 0,95)	1,35 (1,03 – 1,67)	1,7
P36	0,57 (0,42 – 0,72)	1,39 (1,28 – 1,5)	2,4

Die Untersuchung der LC3B2/LC3B1-Quotienten zeigte ein spiegelbildliches Ergebnis zu dem LC3B2/Actin-Quotienten, bei dem die Werte der Schnitte diejenigen der Mäuse um ein Vielfaches überstiegen. Dies ist bei einem starken Abfall des LC3B2-Gehalts (optische Dichte x Fläche der Banden) gegenüber den Mausproben insbesondere auf einen noch stärkeren Abfall des LC3B1-Gehalts zurückzuführen, wie er in den Abbildungen der Western Blots (16 A – C) zu entnehmen ist. In Abbildung 17 ist im direkten Vergleich zwischen Schnitt und Maus der Schnitt stets gleich 100% gesetzt und der Wert der Mausprobe hierzu ins Verhältnis gesetzt worden. Die hohe Standardabweichung bei den Ergebnissen der Schnitte P22 ist auf eine große Streuung bei niedriger Fallzahl zurückzuführen.



Schnitt (S) vs. Maus (M)

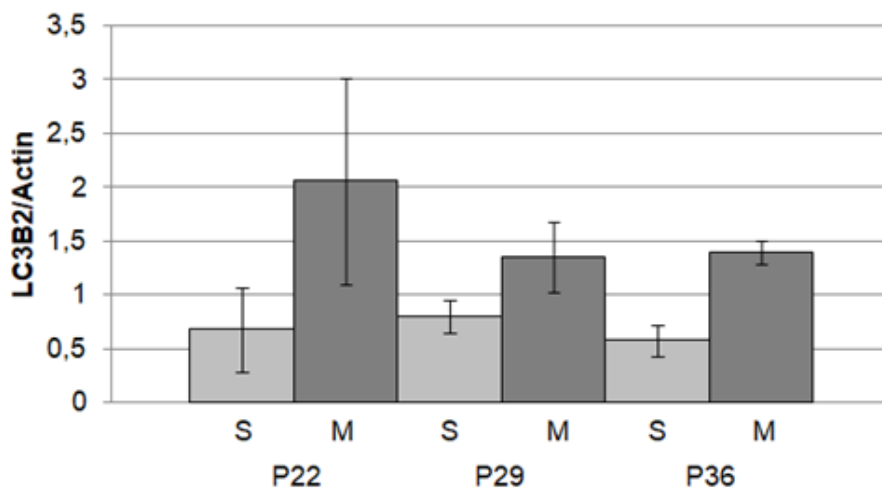


Abbildung 16. Vergleich des LC3B2/Actin-Wertes nach Western Blots von hirnormotypischen Schnittkulturen (S) und Proben aus Mäusen (M) gleichen Alters (siehe Text). N = 6. Gegenübergestellt wurden Kleinhirnproben mit einem Alter von P22, P29 und P36. Die Schnittkanten der zusammengesetzten Western Blots sind mit schwarzen Linien markiert. Die Anpassung der Probenvolumina erfolgte M1 – S1, M2 – S2 usw. Unten: Deskriptive Darstellung der Mittelwerte mit Standardabweichung. Zu erkennen ist ein deutlicher quantitativer Unterschied zwischen Schnittkulturen und Maushomogenisaten jenseits der Standardabweichungen. Mittelwerte für Schnitte: P22 0,67 (0,28 – 1,06), P29 0,80 (0,65 – 0,95) und P36 0,57 (0,42 – 0,72); Werte für Mäuse: P22 2,06 (1,1 – 3,02), P29 1,35 (1,03 – 1,67) und P36 1,39 (1,28 – 1,5). Anhand der Molekülgröße kann man im Western Blot zuverlässig das cytosolische LC3B1 (16 kDa) von dem Autophagosomen-gebundenen LC3B2 (14 kDa) unterscheiden. Bei den Kratzern über den LC3B-Banden in P29 S4/5 handelt es sich um Artefakte, die aufgrund des Messfeldes, das eng um die schwarzen Banden gezogen wurde keinen wesentlichen Einfluss auf die Auswertung nehmen.

Es bleibt festzuhalten, dass der untersuchte LC3B2/Actin-Quotient in den Schnittkulturen unterhalb des Niveaus von direkt aus Tieren entnommenen Proben lag. Dieses Resultat ist unabhängig von der Kulturdauer im Rahmen der ersten 26 Tage nach Schnittpräparation.

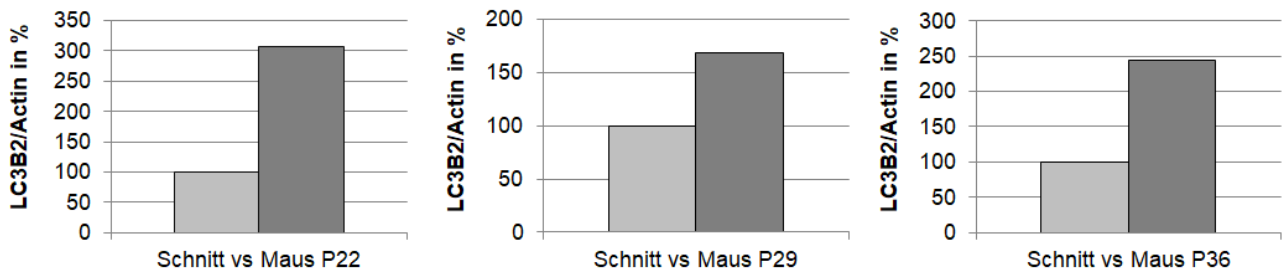


Abbildung 17. Gegenüberstellung der relativen Unterschiede der Mittelwerte der LC3B2/Actin-Quotienten zwischen cerebellärem hirnormanotypischem Schnitt und cerebellärem Homogenisat gleichaltriger Mäuse. Die Werte der Schnitte wurden jeweils gleich 100% gesetzt und dann das Verhältnis der Mausprobenhomogenisate hierzu berechnet. Wie in Abbildung 16 ist ein deutlich höherer LC3B2/Actin-Quotient der Mausproben gegenüber den Schnittkulturproben zu erkennen.

5.2 Einfluss der Kulturdauer auf die Autophagosomenanzahl

Als nächstes wurde untersucht, ob die Kultivierungsdauer einen Einfluss auf die quantitative Untersuchung von Autophagosomen in der hirnormanotypischen Schnittkultur hat und somit einen Störfaktor in der beabsichtigten Untersuchung darstellt. Hierfür wurden jeweils sechs Schnittkulturen für 12 (P22), 19 (P29) und 26 (P36) Tage kultiviert und anschließend im Western Blot auf den LC3B2/Actin- und LC3B2/LC3B1-Quotienten untersucht (Abb. 18, Tabelle 7). Die genauere Darstellung der Ergebnisse der LC3B2/LC3B1-Quotienten findet sich in Kapitel 7.2 (Appendix).

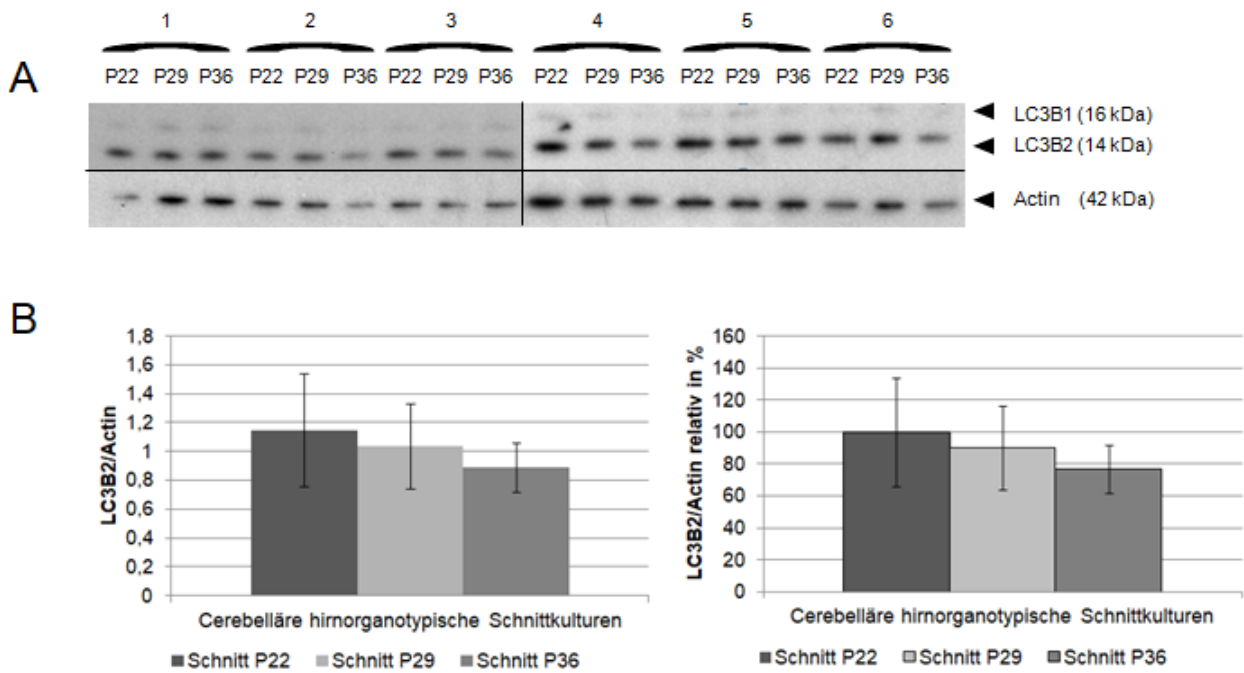


Abbildung 18. Einfluss der Kultivierungsdauer von cerebellären hirnanorganotypischen Schnittkulturen aus der Maus auf den gemessenen LC3B2/Actin-Quotienten im Rahmen von maximal 26 Kultivierungstagen. N = 6. A: Ergebnisse des Western Blots. Die Schnittkanten der zusammengesetzten Western Blots sind mit schwarzen Linien markiert. Die Auftragungsvolumina wurden wie im Methodenteil beschrieben angepasst. Hier mit aufgeführt sind die jeweiligen Actinbanden nach Korrektur der Auftragungsvolumina, die zur Ermittlung des LC3B2/Actin-Quotienten herangezogen wurden. B: Darstellung der Mittelwerte des LC3B2/Actin-Quotienten mit Standardabweichung als absolute Werte und in relativem Verhältnis, wobei P22 gleich 100% gesetzt wurde. LC3B2/Actin: P22: 1,15 (0,75 – 1,55), P29: 1,04 (0,74 – 1,34), P36: 0,89 (0,72 – 1,06). Es ist kein Unterschied jenseits der Standardabweichungen über die Kulturdauer hinweg zu erkennen.

Tabelle 7. Vergleich der Mittelwerte des LC3B2/Actin-Quotienten (mit Standardabweichungen) in cerebellären hirnanorganotypischen Schnittkulturen nach unterschiedlicher Kultivierungsdauer.

N = 6	P22	P29	P36
Absolut	1,15 (0,75 – 1,55)	1,04 (0,74 – 1,34)	0,89 (0,72 – 1,06)
Relativ	100%	90%	77%

Wie in Abbildung 18 zu sehen, ist bei dem LC3B2/Actin-Verhältnis eine leichte Tendenz zur Abnahme vor allem jenseits von P29 zu beobachten, jedoch mit geringer Effektstärke und sich überlappenden Standardabweichungen. Bei dem LC3B2/LC3B1-Konversionsindex zeigte sich kein relevanter Unterschied zwischen den Kultivierungszeiten – jedoch erneut mit großer Streuung. In der Zusammenschau beider Quotienten, bei der sich trotz großer Streuung bei den ohnehin nur eingeschränkt interpretierbaren LC3B2/LC3B1-Werten ein gemeinsamer Trend zeigte, ließ sich eine über einige Tage variable Kultivierungsdauer als gravierender Störfaktor einer Untersuchung des Autophagosomenstatus an cerebellären Schnittkulturen ausschließen.

5.3 Induzierbarkeit der Autophagosomenbildung im hirnorganotypischen Schnitt

Zunächst war zu überprüfen, ob sich die Methode der hirnorganotypischen Schnittkultur zur Untersuchung der Autophagosomenanzahl überhaupt eignet. Kontemporäre Modelle der Autophagiemaschinerie stellen ihre Rolle als Stressantwort und Überlebensmechanismus besonders heraus (vgl. (73)). In diesen Modellen spielen die Präparationsnarbe, die traumatische Reorganisation mit Abflachung, Zellverlust und Gliaproliferation sowie die Ernährung der Schnitte über Diffusion eine nicht unwesentliche Rolle (6, 8, 11, 12). Somit galt es zu prüfen, ob die cerebellären Schnittkulturen sich in einem Zustand der starken Aktivierung der Autophagie oder aber umgekehrt der Suppression (s. 5.5) befinden und die Messung der Autophagosomen damit lediglich einen reaktiven Zustand darstellen würde. Die genauere Darstellung der Ergebnisse der LC3B2/LC3B1-Quotienten findet sich in Kapitel 7.3 (Appendix).

Zur Überprüfung dieser Frage wurde zunächst getestet, ob sich der Autophagosomenstatus, gemessen über die LC3B2/Actin-Quotienten, durch [1] metabolischen Mangel, wobei das Nährmedium durch nährstoffreiches PBS ersetzt wurde, bzw. [2] pharmakologische Manipulation mittels einer Einmalgabe von 500 nM Rapamycin überhaupt noch induzieren lässt. Um zu verhindern, dass eine eventuelle Induktion der Autophagiemaschinerie durch eine gesteigerte Degradation sofort abgefangen würde und somit nicht messbar wäre, wurde zusätzlich das Makrolidantibiotikum Bafilomycin B1 (s. 3.3.3 und 4.4), das die Fusion von Autophagosomen mit Lysosomen und damit deren konsekutiven Abbau verhindert, in der üblichen Konzentration von 100 nM verwendet. Entsprechend wurden jeweils drei Schnitte mit 100 nM Bafilomycin in normalem Kulturmedium (Kontrolle), 100 nM Bafilomycin in nährstoffreichem PBS (metabolische Induktion) und 100 nM Bafilomycin mit 500 nM Rapamycin in normalem Kulturmedium (pharmakologische Induktion) für zwei Stunden inkubiert und anschließend über Western Blots analysiert (Abb. 19 und Tabelle 8; n = 3).

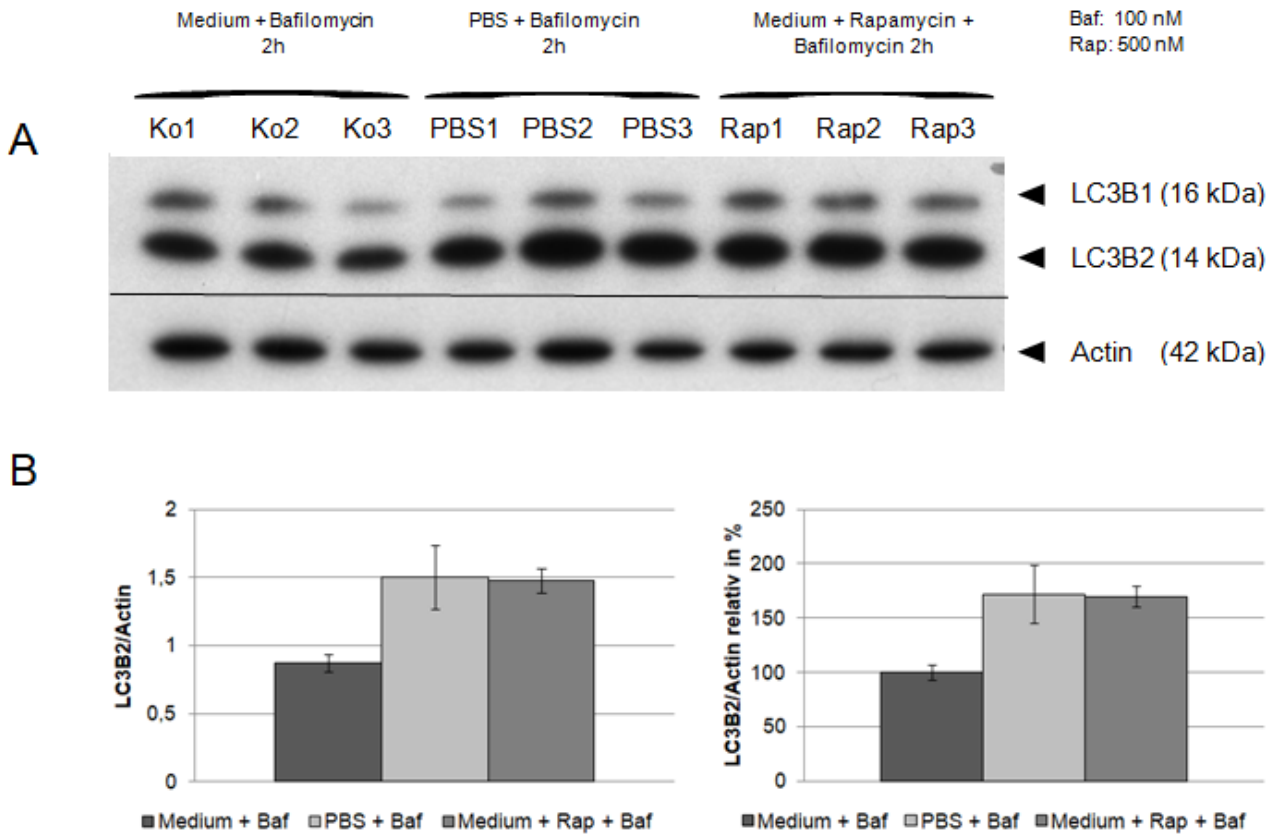


Abbildung 19. Induzierbarkeit der Autophagosomenbildung in cerebellären hirnormototypischen Schnittkulturen aus der Maus (siehe Text). N = 3. Jeweils drei Schnitte wurden im Alter von 24 bzw. 25 Tagen entweder mit 100 nM Bafilomycin in Nährmedium (Kontrolle) oder mit 100 nM Bafilomycin in nährstofffreiem PBS bzw. 500 nM Rapamycin plus 100 nM Bafilomycin in Nährmedium für zwei Stunden behandelt. A: Western Blots: die Schnittkanten der zusammengesetzten Western Blots sind durch eine schwarze Linie markiert; neben den LC3B-Banden wird die Actinbande nach Korrektur der Auftragungsvolumina angegeben. B: Ergebnisse der Auswertung der Blots mit ImageJ. Es ergaben sich Mittelwerte des LC3B2/Actin-Quotienten (mit Standardabweichung) von 0,87 (0,81 – 0,93), 1,5 (1,27 – 1,73) und 1,48 (1,39 – 1,57) für die Kontrollen (Ko), die PBS-Behandlung und die Rapamycin-Behandlung. Zu erkennen ist eine deutliche Zunahme des LC3B2/Actin-Quotienten jenseits der Standardabweichungen nach Behandlung mit Rapamycin bzw. Kultivierung in nährstofffreiem PBS gegenüber der Kontrolle.

Tabelle 8. Mittelwerte und Standardabweichung des LC3B2/Actin-Quotienten nach Behandlung mit PBS und Bafilomycin (metabolische Induktion), Rapamycin und Bafilomycin (pharmakologische Induktion) sowie Kontrollen (nur Bafilomycin).

N = 3	Medium + Baf	PBS + Baf	Medium + Rap + Baf
Absolut	0,87 (0,81 – 0,93)	1,5 (1,27 – 1,73)	1,48 (1,39 – 1,57)
Relativ	100%	172%	170%

Daraus ergibt sich eine Induzierbarkeit der Autophagie in den Schnittkulturen um 70-72% im Bezug auf den LC3B2/Actin-Quotienten, die in Abbildung 19 klar ersichtlich und auch mit den ermittelten LC3B2/LC3B1-Quotienten vereinbar ist.

5.4 Pharmakologische Manipulation mit Bafilomycin B1

Nachdem die Induzierbarkeit der cerebellären hirnanorganotypischen Schnittkulturen experimentell untersucht worden war, wurden als nächstes die zu applizierende Konzentration und die Behandlungsdauer des Makrolidantibiotikums Bafilomycin B1 ermittelt. Dieses Pharmakon hemmt die Fusion von Lysosomen mit Autophagosomen und deren konsekutiven Abbau und ermöglicht es so, deren Akkumulation über die Zeit als Maß für die Autophagosomenbildung darzustellen. Eine wesentliche Voraussetzung hierfür ist, die Anzahl der aufgrund ihrer Degradation nicht darstellbaren Autophagosomen zu minimieren, indem das Wirkmaximum von Bafilomycin angewendet wird. Orientierungspunkt bei der Austestung dieses Wirkmaximums und der Behandlungsdauer waren die gängig verwendeten Konzentrationen im submikromolaren Bereich und ein Behandlungszeitraum von wenigen Stunden bis zu einem Tag. Aufgrund der höheren Gewebedichte und den in den organotypischen Kulturen vorhandenen Gliazellen im Vergleich zu primären Neuronenkulturen wurde vermutet, dass eine etwas höhere Konzentration benötigt würde, weshalb mit 100 nM Bafilomycin begonnen wurde. Darüber hinaus wurde unser Versuchsansatz auf maximal 24 Stunden begrenzt, da ab einer Behandlungszeit von 18 Stunden über signifikante Disruptionen des Zellmetabolismus berichtet wurde (109).

Die genauere Darstellung der Ergebnisse der LC3B2/LC3B1-Quotienten findet sich in Kapitel 7.4 (Appendix).

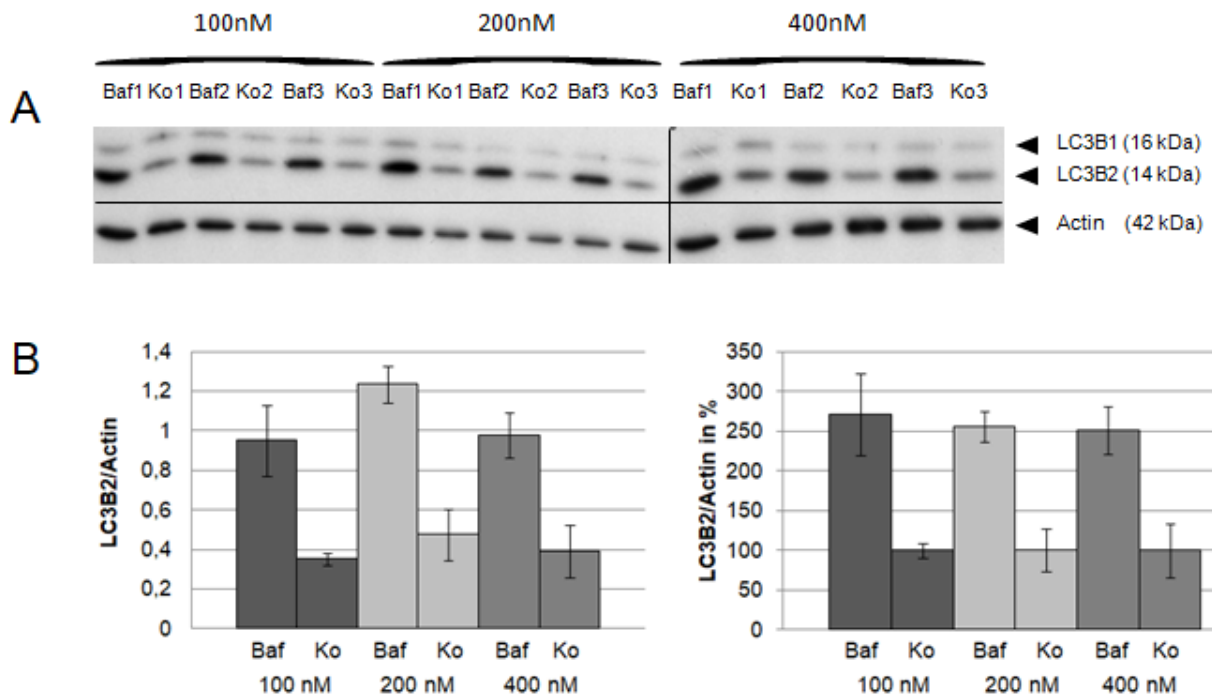


Abbildung 20. Bestimmung der zu verwendenden Bafilomycinkonzentration. N = 3. A: Zusammengesetzter Western Blot nach Behandlung von Schnittkulturen mit 100, 200 oder 400 nM Bafilomycin für acht Stunden vs. Kontrollen (Ko). Die Schnittkanten der zusammengesetzten Western Blots sind mit schwarzen Linien markiert. Zusätzlich abgebildet sind die Actinbänder nach Korrektur der Probenvolumina wie im Methodenteil beschrieben. B: Darstellung der LC3B2/Actin-Werte mit Standardabweichung. Jeweils Kontrolle vs. Behandlung: 100nM: 0,35 (0,32 – 0,38) => 0,95 (0,77 – 1,13); 200nM: 0,48 (0,35 – 0,61) => 1,23 (1,14 – 1,32); 400nM 0,39 (0,26 – 0,52) => 0,98 (0,86 – 1,1). Zu erkennen ist eine Zunahme des LC3B2/Actin-Quotienten jenseits der Standardabweichungen nach Behandlung mit Bafilomycin jeder Konzentration. Dabei bleibt die relative Zunahme gegenüber den Kontrollen ähnlich bei jeder der drei verwendeten Konzentrationen.

Es wurden jeweils drei Schnitte (P23 bis P25; n = 3) mit 100, 200 und 400 nM Bafilomycin B1 (in DMSO) für acht Stunden behandelt und mit entsprechenden Kontrollen (DMSO) verglichen (Abb. 20). Hieraus ergaben sich die in Abbildung 20 sowie Tabelle 9 dargestellten Mittelwerte mit den jeweiligen Standardabweichungen.

Tabelle 9. Mittelwerte und Standardabweichung des LC3B2/Actin-Quotienten nach Behandlung mit 100, 200 oder 400 nM Bafilomycin sowie Kontrollen.

N = 3	Kontrolle	Bafilomycin	Unterschiedsfaktor
100 nM	0,35 (0,32 – 0,38)	0,95 (0,77 – 1,13)	2,7
200 nM	0,48 (0,35 – 0,61)	1,23 (1,14 – 1,32)	2,6
400 nM	0,39 (0,26 – 0,52)	0,98 (0,86 – 1,1)	2,5

Es zeigten sich nur geringe Differenzen in der relativen Wirkstärke zwischen den verschiedenen Konzentrationen: nach Beurteilung anhand des LC3B2/Actin-Verhältnisses war die stärkste Differenz bei 100 nM (Faktor 2,7) zu sehen. Hierbei ist zu beachten, dass

die Auftragungsvolumina der Proben nur für die jeweils zugeordnete Kontrolle anhand ihrer Actinkonzentration adjustiert wurden (100 nM - Ko 100 nM, 200 nM - Ko 200 nM etc.) und nicht über alle Konzentrationen hinweg (100 nM - 200 nM - 400 nM). Mit diesem Ansatz kann aus den absoluten Werten bezüglich der Wirkstärke der Bafilomycinkonzentration keine valide vergleichende Schlussfolgerung gezogen werden. Deshalb wurde stattdessen der jeweilige Faktor ermittelt, um den der LC3B2/Actin-Quotient nach Bafilomycineinsatz anstieg, um damit eine Aussage über die relative Wirkungsstärke der Bafilomycinkonzentrationen zu generieren.

Anhand dieser Ergebnisse entschieden wir uns, für weiterführende Versuche Bafilomycin B1 in einer Konzentration von 100 nM zu verwenden. Eine möglichst geringe Konzentration sollte zudem unspezifische Off-Target-Effekte minimieren.

Als zweites wurde die Behandlungsdauer mit Bafilomycin ermittelt, indem jeweils drei Schnitte (P21) mit 100 nM Bafilomycin B1 für 3, 6, 12 und 24 Stunden behandelt und mit unbehandelten Kontrollen (DMSO) verglichen wurden (Abb. 21, Tabelle 10). Es ist allerdings zu beachten, dass erneut nur die Auftragungsvolumina zwischen Probe und Kontrolle angepasst wurden (3h: Baf - Ko, 6h: Baf - Ko etc.) und nicht über die gesamten Behandlungszeiten hinweg (3 h - 6 h - 12 h - 24 h). Damit lassen sich aus der Western Blot-Analyse sowie den Proteinquotienten erneut keine direkten Aussagen über eine zeitliche Entwicklung treffen. In allen Diagrammen, in denen eine solche Anpassung der Probenvolumina nur zwischen Probe und Kontrolle eines Behandlungszeitpunktes, nicht aber über die gesamte Behandlungsdauer hinweg erfolgte – ein Vergleich in der Zeitachse also schwieriger ist - wurden gestrichelte Linien verwendet. Allerdings lassen Zu- und Abnahme der relativen Wirkung im Vergleich zu den Kontrollen, Zeitpunkt des Wirkmaximums und Beginn des Wirkungsverlusts erkennen.

Tabelle 10. Wirkung von Bafilomycin über die Zeit auf die LC3B2/Actin-Quotienten. Errechnete Mittelwerte mit Standardabweichungen und relativen Veränderungen.

Behandlungsdauer (100 nM Baf)	Kontrolle	100 nM Bafilomycin	Anstieg durch Bafilomycin (%)
3 h	0,49 (0,45 – 0,53)	0,66 (0,58 – 0,74)	35%
6 h	0,60 (0,46 – 0,74)	1,18 (0,95 – 1,41)	96%
12 h	0,26 (0,24 – 0,28)	1,01 (0,98 – 1,04)	288 %

24 h	0,68 (0,51 – 0,85)	2,02 (1,64 – 2,4)	197%
------	--------------------	-------------------	------

Abbildung 21 zeigt, dass das Wirkmaximum (die stärkste Zunahme von Autophagosomen bzw. dem LC3B2/Actin-Quotienten im Vergleich zur Kontrolle) in der vorliegenden Untersuchung nach zwölf Stunden erreicht wurde. Aufgrund dieses Ergebnisses und der zunehmenden Gefahr der Vitalitätsstörung durch längerfristige Beeinflussung der Autophagiemaschinerie sowie zunehmender unspezifischer Effekte bei einer Behandlung mit Bafilomycin über 18 Stunden hinweg wurden die nachfolgenden Untersuchungen mit Bafilomycin auf einen Behandlungszeitraum von maximal zwölf Stunden bei einer Konzentration von 100 nM beschränkt (109).

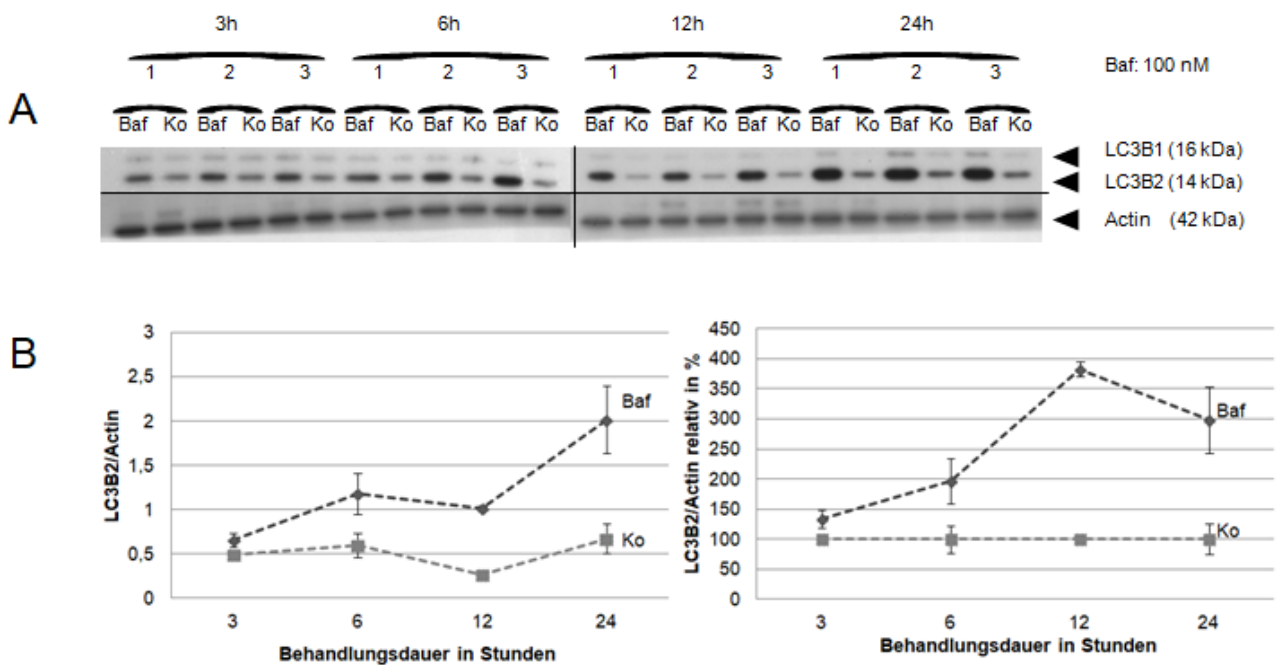


Abbildung 21. Einfluss der Behandlungsdauer mit 100 nM Bafilomycin B1 auf den LC3B2/Actin-Mittelwert mit Standardabweichung in hirnormotischen Schnittkulturen aus der Maus. N = 3. Jeweils drei Schnitte (P21) wurden mit 100 nM für 3, 6, 12 und 24 h behandelt und mit Kontrollen (Ko) verglichen, deren Proben volumina wie im Methodenteil beschrieben angepasst wurden. A: Darstellung der zusammengeschnittenen Western Blots inkl. der Actinbänder nach Anpassung der Proben volumina. Die Schnittkanten sind mit schwarzen Linien markiert. B: Darstellung der absoluten und relativen ermittelten LC3B2/Actin-Mittelwerte mit Standardabweichung im Vergleich zu den Kontrollen. Man beachte die gestrichelte Linie als Zeichen dafür, dass die Auftragungsvolumina nicht über die Behandlungszeiten hinweg angepasst wurden und somit nicht direkt vergleichbar sind. Zu erkennen ist eine Zunahme des LC3B2/Actin-Quotienten jenseits der Standardabweichung gegenüber den Kontrollen zu jeder Behandlungszeit mit einem Maximum bei zwölf Stunden.

5.5 Pharmakologische Manipulation mit 3-Methyladenin

Es folgte eine weitere, die letzte Voruntersuchung mit einem weiteren Pharmakon. Der Test mit dem PI3K-Inhibitor 3-Methyladenin (3-MA), der die Bildung neuer Autophagosomen hemmen soll (s. Kapitel 3.3.3), diente zweierlei Zielen.

Erstens ging es darum zu ermitteln, inwiefern der Autophagiestatus der hirnnorganotypischen Schnittkulturen als basaler Autophagiestatus im Gegensatz zu induzierter oder supprimierter Autophagie anzusehen ist. Bisher wurde lediglich mit Hilfe von Rapamycin untersucht, ob sich die Autophagosomenbildung in den Schnittkulturen induzieren lässt und sich deshalb noch nicht auf maximal induziertem Niveau bewegt. Zweitens sollte die Behandlung der Schnitte mit einem zweiten gängigen Pharmakon, das nicht wie Bafilomycin den Abbau von Autophagosomen, sondern im Gegensatz dazu ihre Bildung beeinflusst, dem Nachweis dienen, dass die Autophagie sich auch in dieser Untersuchung den verbreiteten Methoden in der Autophagieforschung entsprechend manipulieren lässt. Dies würde die Validität der vorliegenden Untersuchung stärken.

Hierfür wurden jeweils drei Schnitte (P22) für 1, 2 und 6 h mit 3 mM 3-MA behandelt und mit drei Kontrollen gleichen Alters verglichen. Die Auswahl der Konzentration und Behandlungsdauer orientierten sich an eigenen Erfahrungen und variierten ausschließlich in der Behandlungsdauer (9, 178). Es ist auch hier zu berücksichtigen, dass die absoluten Werte der 3-MA-Untersuchung nicht über die Behandlungszeiten hinweg vergleichbar sind, weil die Auftragungsvolumina lediglich zwischen behandelter Probe und Kontrolle innerhalb eines Behandlungszeitpunktes (3-MA - Ko) und nicht über die Behandlungszeitpunkte hinweg (0 h - 2 h - 6 h) angepasst wurden. Dies wurde in Abbildung 22 erneut mit gestrichelten Linien dargestellt. Der Versuch ergab die in Tabelle 11 dargestellten Werte. Eine Darstellung der Ergebnisse der LC3B2/LC3B1-Quotienten findet sich in Kapitel 7.5 (Appendix).

Es zeigte sich ein durch 3-MA im Vergleich zu den Kontrollen supprimierbarer LC3B2/Actin-Quotient jenseits der Standardabweichungen. Das Wirkmaximum lag bei 6 h mit einem Abfall um 60% nach Inkubation mit 3-MA im Vergleich zur Kontrolle.

Tabelle 11. Wirkung von 3-MA über die Zeit auf die LC3B2/Actin-Quotienten. Dargestellt sind die errechneten Mittelwerte mit Standardabweichungen und relativen Veränderungen (Behandlung vs. Kontrolle).

Behandlungsdauer	Kontrolle	3 mM 3-MA	Suppression (in % des Kontrollwertes) nach 3-MA um
1 h	1,26 (0,99 – 1,53)	0,69 (0,47 – 0,91)	55%
2 h	1,56 (0,95 – 2,17)	0,53 (0,24 – 0,82)	34%
6 h	2,93 (2,06 – 3,8)	1,18 (1,01 – 1,35)	40%

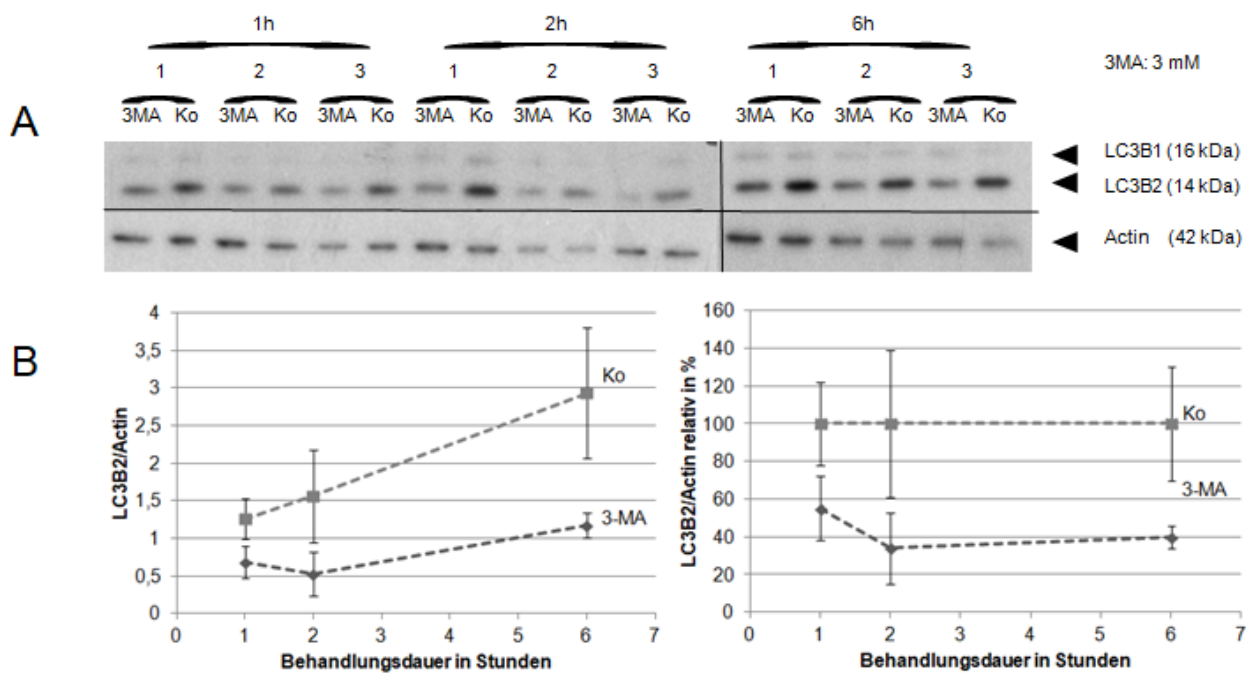


Abbildung 22. LC3B2/Actin-Mittelwerte mit Standardabweichung in cerebellären hirnanorganotypischen Schnittkulturen nach Behandlung mit 3 mM 3-Methyladenin (3-MA) für 1, 2 und 6 Stunden sowie Kontrollen (Ko). N = 3. A: Zusammengesetzte Western Blots inklusive der Actinbanden nach Korrektur der Auftragungsvolumina wie im Methodenteil beschrieben. Die Schnittkanten sind mit schwarzen Linien markiert. B: LC3B2/Actin-Quotient aus Mittelwerten mit Standardabweichung (siehe Tabelle und Text). Man beachte, dass die Auftragungsvolumina nicht über die Behandlungszeiten hinweg angepasst wurden und die absoluten Werte damit nicht direkt vergleichbar sind. Deshalb wurden gestrichelte Linien zur Verbindung gewählt. Verglichen werden sollten lediglich die relative Wirkung der 3-MA-Behandlung im Vergleich zu den Kontrollwerten über die Zeit. Zu erkennen ist eine Abnahme des LC3B2/Actin-Quotienten jenseits der Standardabweichung nach Behandlung mit 3-MA im Vergleich zu den Kontrollen zu jeder Behandlungszeit.

5.6 Neuronentyp spezifische quantitative Unterschiede in der Autophagosomenbildung

Insgesamt wurden 1344 cerebelläre Neurone analysiert. Die Zahl der Schnitte und analysierten Zellen des cerebellären vermalen Lobulus VIII wird in Tabelle 12 für jede Behandlungsdauer mit 100 nM Bafilomycin B1 aufgelistet. Dabei wurden alle in den mikroskopierten Blickfeldern erkennbaren Zellen numeriert und dann wurde aus den numerierten Zellen eine Stichprobe gebildet. Die Größe der Stichprobe wurde anhand des Schnittes mit der niedrigsten Nervenzellzahl festgelegt, weil dieser die Stichprobengröße nach oben begrenzte (Schnittnr. 43 - 58 Zellen, davon 28 PZs/Purkinje-Zellen und 30 PVIs/Parvalbumin-positive Interneuronen). Aus diesem Grund wurde pro Schnitt aus insgesamt drei bis fünf mikroskopischen Blickfeldern in einer 63fachen Vergrößerung eine Stichprobe von 28 Zellen jedes Typs ausgewählt. Daraus ergibt sich, dass insgesamt 2520 Zellen primär in den Blickfeldern vorhanden waren und davon 1344 Nervenzellen zufällig anhand ihrer designierten Nummer im Rahmen einer Einzelzellanalyse in die Stichprobe einbezogen wurden:

Tabelle 12. Liste der verwendeten Versuchstiere, Schnitte, Gesamtzahl der mikroskopierten Zellen und Anzahl der analysierten Zellen.

Behandlungsdauer mit 100nM Bafilomycin B1	Schnittnr.	Mausnr.	Anzahl an nummerierten Zellen (PZ + PVI)	Stichprobe (PZ + PVI)
0 h	43	12.3	58 (28 + 30)	56 (28 + 28)
	54	15.2	64 (30 + 34)	56 (28 + 28)
	55	16.3	66 (33 + 33)	56 (28 + 28)
	58	19.1	83 (42 + 41)	56 (28 + 28)
	59	20.1	142 (80 + 62)	56 (28 + 28)
	60	19.2	100 (49 + 51)	56 (28 + 28)
3 h	19	6.1	81 (31 + 50)	56 (28 + 28)
	25	8.1	124 (78 + 46)	56 (28 + 28)
	26	9.1	140 (84 + 56)	56 (28 + 28)
	40	13.2	86 (36 + 50)	56 (28 + 28)
	52	17.2	98 (51 + 47)	56 (28 + 28)
	62	21.1	113 (46 + 67)	56 (28 + 28)
6 h	29	9.2	116 (48 + 68)	56 (28 + 28)
	34	11.1	106 (49 + 57)	56 (28 + 28)
	35	12.1	100 (51 + 49)	56 (28 + 28)
	46	15.1	113 (55 + 58)	56 (28 + 28)
	65	21.2	122 (52 + 70)	56 (28 + 28)
	66	22.2	133 (59 + 74)	56 (28 + 28)
12 h	70	23.3	102 (28 + 74)	56 (28 + 28)
	79	24.3	123 (56 + 67)	56 (28 + 28)
	80	25.3	118 (62 + 56)	56 (28 + 28)
	82	27.3	124 (68 + 56)	56 (28 + 28)

	90	29.3	124 (60 + 64)	56 (28 + 28)
	91	30.3	143 (57 + 86)	56 (28 + 28)
Gesamt	24 (Schnitte)	19 (Mäuse)	2520 (1173 + 1347)	1344 (672 + 672)

Abbildung 23 dient der Übersicht über die verwendete Parvalbuminfärbung der Cytoarchitektur des cerebellären Cortex.

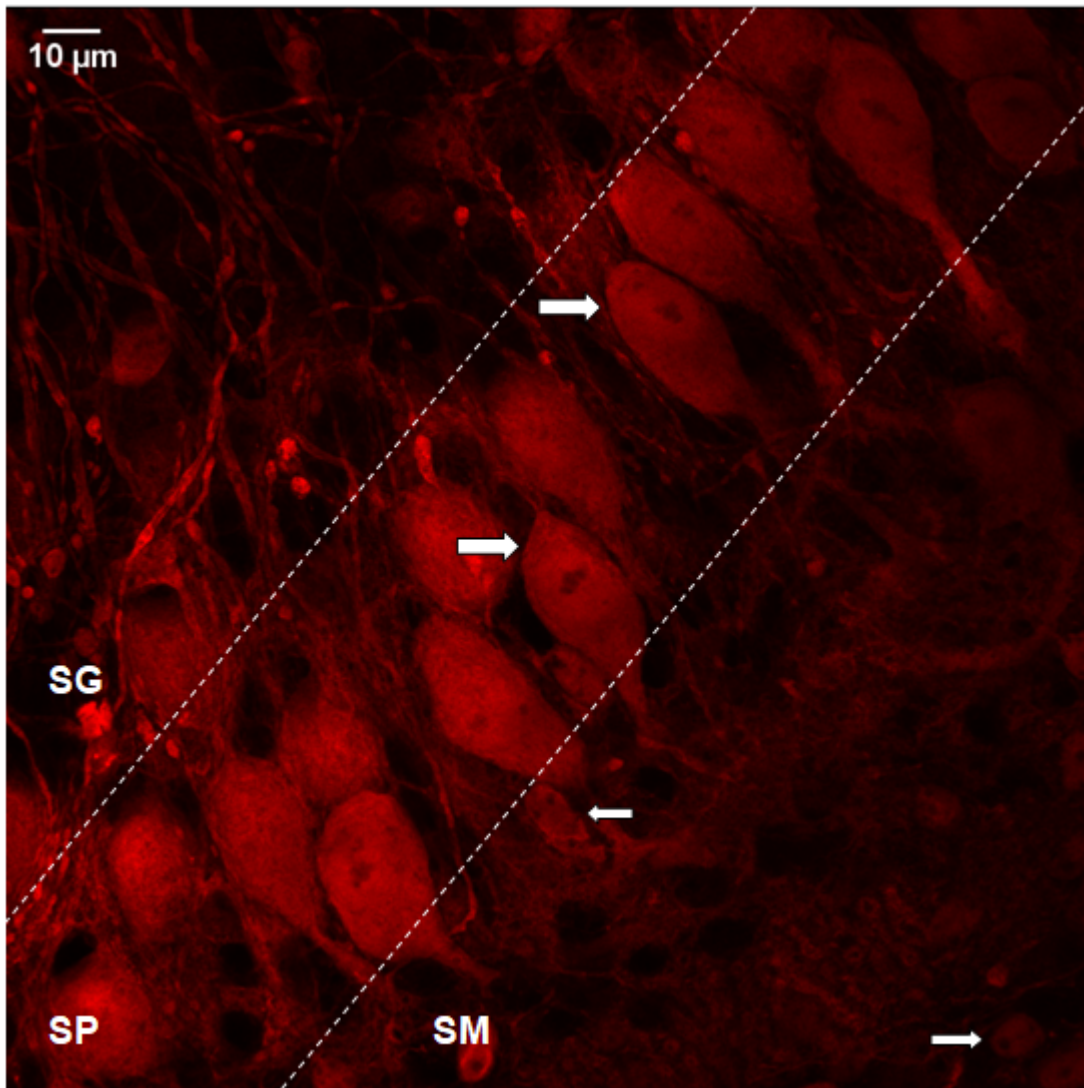


Abbildung 23. Parvalbuminfärbung des cerebellären Cortex in einem hirnanatomischen Schnitt. Der dreischichtige Aufbau ist angedeutet (gestrichelte Linien). Der cerebelläre Cortex organisiert sich um das Stratum purkinjense (SP) herum, das aus einer bis zwei Reihen von großen Purkinje-Zellen (30-40 μm) besteht (dicke Pfeile). Oberflächlich zum SP liegt das Stratum granulosum (SG), in dem sich die meisten Parvalbumin-positiven Interneurone (10-20 μm) befinden. Diese liegen entweder nahe an der Grenze zum SP oder weiter verstreut im SM und entsprechen den tiefer gelegenen Korb- und oberflächlicher gelegenen Sternzellen. Zusammenfassend werden die Interneurone des SM auch als MLI (Molecular layer interneurons, dünne Pfeile) bezeichnet und sind zuverlässig mit der Parvalbuminfärbung darstellbar. Das tiefer gelegene Stratum moleculare (SM) bleibt bei dieser Färbung jedoch ausgespart.

Abbildung 24 zeigt eine Auswertung der mittleren Somagröße aller untersuchten Nervenzellen zur Dokumentation der reproduzierbaren Kulturbedingungen. Da mit ImageJ Flächen in Pixeleinheiten gemessen werden ($0,180 \mu\text{m} \times 0,180 \mu\text{m}$), korrespondiert eine ImageJ Flächeneinheit mit 32500 nm^2 oder $0,0325 \mu\text{m}^2$.

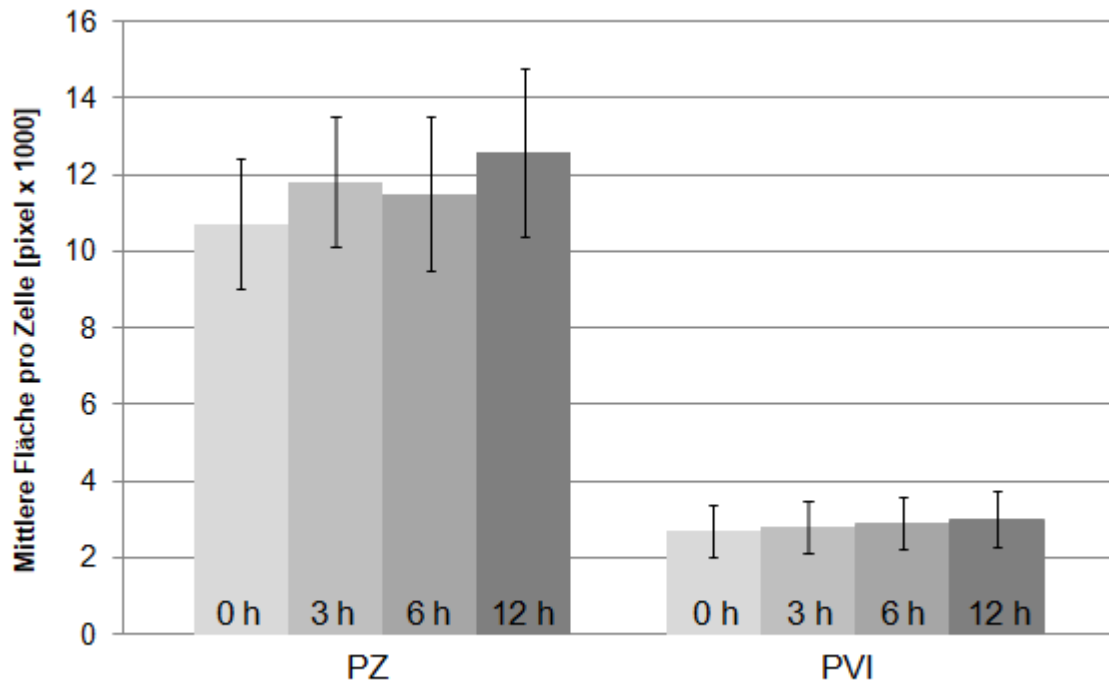


Abbildung 24. Durchschnittliche Fläche pro Zelltyp mit einfacher Standardabweichung und Behandlungsdauer in der hirnanorganotypischen Schnittkultur in Pixeln. Ein Pixel misst $0,180 \mu\text{m} \times 0,180 \mu\text{m}$. PZ: Purkinje-Zelle; PVI: Parvalbumin-positives Interneuron. Zusätzlich angegeben ist die Dauer der Behandlung mit 100nM Bafilomycin B1 in Stunden.

Die Ergebnisse der Hauptuntersuchung wurden unter zwei Aspekten ausgewertet. Erstens wurde anhand der Anzahl LC3B-immunopositiver Partikel pro Zelle (der in der Literatur übliche Parameter) die Gesamtmenge gebildeter Autophagosomen in Abhängigkeit vom Zelltyp ermittelt. Darüber hinaus wurde besonders auf die Zellgröße eingegangen unter der Annahme, dass die autophagische Aktivität maßgeblich abhängig sei von der metabolischen Aktivität und dass diese wiederum besonders mit der Zellgröße korreliere (187, 188). Aus diesem Grund wurde die Partikelanzahl pro Zelle auf die Zellfläche bezogen, um die Ergebnisse für diesen Faktor zu korrigieren. Bei der Untersuchung ergab sich ein signifikanter absoluter Unterschied zwischen PZs und PVIs. Als zweites wurde die Kinetik der Autophagosomenbildung unter basalen Autophagiebedingungen innerhalb der Zelltypen über die gesamte Behandlungsdauer hinweg verglichen. Dabei wurden unabhängig vom untersuchten Zelltyp analoge relative

quantitative Entwicklungen in der Autophagosomenbildung innerhalb der zwölfstündigen Behandlung festgestellt.

Zur Ermittlung dieser Ergebnisse wurden die untersuchten Schnitte (P22 - 25) mit 100 nM Bafilomycin B1 für 0, 3, 6 und 12 Stunden behandelt, bevor sie unmittelbar nach Ende der Behandlung fixiert und angefärbt wurden. Genaueres zur mikroskopischen und digitalen Analyse der Schnitte ist an anderer Stelle beschrieben (Kapitel 4.6.3 & 4.6.4).

5.6.1 Absolute Unterschiede in der Autophagosomenbildung zwischen verschiedenen Neuronentypen im gleichen organotypischen Mikromilieu

Um die basale Kapazität der verschiedenen Nervenzelltypen zur Autophagosomenbildung zu erfassen, wurden folgende Parameter untersucht:

1. Anzahl der LC3B-immunopositiven Partikel pro Zelle und pro Zellfläche
2. Gesamtfläche der partikulären LC3B-immunopositiven Signale pro Zelle und pro Zellfläche
3. Durchschnittliche Fläche von LC3B-immunopositiven Signalpartikeln pro Zelle und pro Zellfläche

Die unter 2. und 3. aufgeführten Parameter wurden der Vollständigkeit halber mitbestimmt und werden zur Wahrung der Übersichtlichkeit und Verständlichkeit des folgenden Kapitels in der Appendix dargestellt. Der Rückgriff auf die Zellfläche diente zum Ausschluss der Zellgröße als möglichem wesentlichem Störfaktor bei dem Vergleich des Autophagosomenstatus zweier unterschiedlicher Zelltypen. Der Quotient [Anzahl LC3B-positiver Partikel pro Zelle/ Zellfläche] ist somit „konservativer“ als der reine Vergleich des LC3B-immunopositiven Signals pro Zelle und spiegelt den „Grad der Punktierung“ der Einzelzelle wieder, wie er auch von Sharkey et al. angewandt wurde (189). Hierbei wurden nur Somafläche und proximaler Dendrit als Zellfläche gemessen, da das Axon verschwindend klein war. Zum einen hätten Flächenmessungen des Axons nicht mit ausreichender Genauigkeit durchgeführt werden können, sodass bei ohnehin kleiner Axonfläche ein substanzieller methodischer Fehler entstanden wäre. Zum anderen haben Maday und Holzbaur nachgewiesen, dass die Bafilomycinbehandlung vor allem eine Autophagosomenakkumulation im Soma bewirkt (98).

Anhand des in der Literatur üblichen Parameters „Partikel pro Zelle“ wurde die konfirmatorische Testung der Nullhypothese vorgenommen, während die anderen Parameter ausschließlich deskriptiv in die Arbeit aufgenommen wurden. Als Signalpartikel misst ImageJ zusammenhängende signalpositive Pixel, die aus diesem Grund als eine zusammenhängende Struktur erfasst werden. Ein Signalpartikel verfügt also häufig über eine Fläche, die aus mehr als einem Pixel besteht. Zusätzlich erfolgten unter basalen Autophagiebedingungen exploratorische Testungen der zelltypspezifischen Kinetik der Autophagosomenbildung. Das LC3B-Signal war nach zwölfstündiger Behandlung mit Bafilomycin im Gegensatz zu den anderen Messzeitpunkten kaum darstellbar. Zwar werden die in diesem Ansatz gemessenen Ergebnisse tabellarisch noch mit aufgeführt, allerdings sollen das Ergebnis nach 12-stündiger Behandlung und die Ursachen für die mangelnde Anfärbbarkeit des LC3B gesondert diskutiert und aus den graphischen Darstellungen ausgeschlossen werden. Trotz nur sehr schwacher Darstellbarkeit des LC3B in dem 12h-Versuchsansatz spiegelt auch das Ergebnis dieses Versuchsansatzes das in den anderen Ansätzen ermittelte relative Verhältnis zwischen PZ und PVI wider.

Die Anzahl der LC3B-immunopositiven Signalpartikel pro Zelle ist in der Abbildung 25 sowie der Tabelle 13 dargestellt. Daraus gehen deutliche zelltypabhängige Unterschiede der LC3B-Partikelanzahl um den Faktor 7,3 bis 7,6 zugunsten der Purkinje-Zellen hervor, die in den Abbildungen sowohl in absoluten Zahlen als auch in prozentualem Verhältnis dargestellt werden. Der Einfluss des unabhängigen Faktors „Zelltyp“ auf die bestimmte Anzahl von LC3B-Partikeln pro Zelle wurde mittels konfirmatorischer TWO-WAY-Anova als signifikant bestätigt ($p < 0,001$).

Tabelle 13. Anzahl der LC3B-immunopositiven Signalpartikel pro Zelle bei PZ und PVI nach Behandlung mit 100 nM Bafilomycin angegeben in gerundeten Mittelwerten (mit 95%-Konfidenzintervall).

N = 168	0 h Bafilomycin	3 h Bafilomycin	6 h Bafilomycin	12 h Bafilomycin
PVI	5,8 (4,0 – 7,6)	8,9 (6,2 – 11,6)	11,6 (8,0 – 15,2)	1,1 (0,9 – 1,3)
PZ	43,2 (31,9 – 54,4)	67,6 (55,6 – 79,5)	84,9 (71,9 – 98,0)	13,3 (11,5 – 15,0)
Unterschieds-faktor	7,4	7,6	7,3	12,1

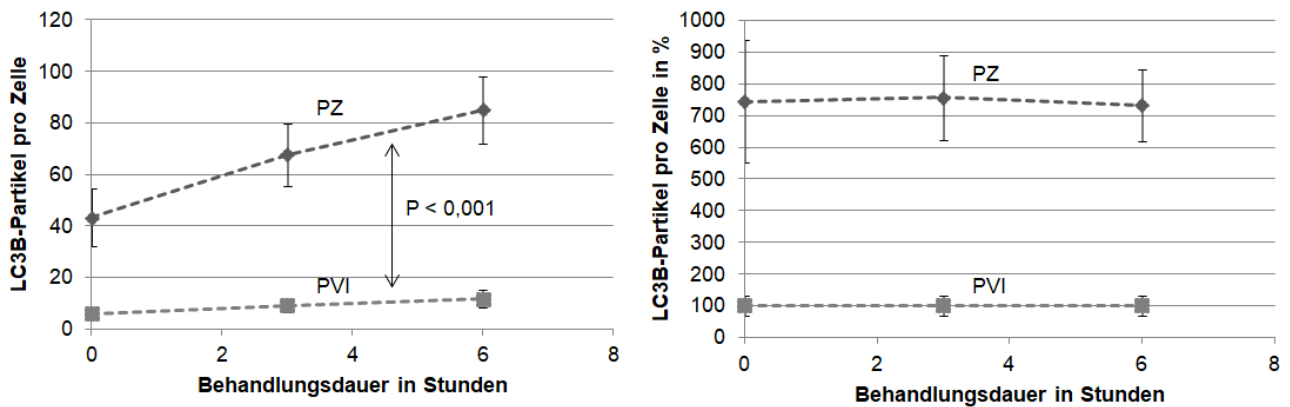


Abbildung 25. Zelltypabhängiger zeitlicher Verlauf der Anzahl LC3B-immunopositiver Partikel pro Zelle in absoluten (links) und relativen (rechts) Werten nach Behandlung mit 100 nM Bafilomycin. Bei den relativen Werten wurden die PVI-Werte jeweils gleich 100% und die PZ hierzu in Beziehung gesetzt. Die Werte sind dargestellt mit einem Konfidenzintervall von 95%. Die Signifikanz wurde mittels einer TWO-WAY-ANOVA anhand des Quotienten [Anzahl LC3B-immunopositiver Partikel pro Zelle] berechnet ($p < 0,001$). Die LC3B-immunopositiven Flächen bzw. Partikel sind nicht mit Autophagosomen gleichzusetzen, werden aber als Maß für diese verwendet. Zu erkennen ist ein signifikanter Unterschied zwischen PZ und PVI über alle Behandlungszeitpunkte um den Faktor 7 bis 12.

Die gleiche Tendenz bestätigte sich, wenn auch mit geringer Effektstärke, auch nach Justierung der Werte für die deutlichen Unterschiede in der Zellfläche von PZ und PVI. Dieser „konservativere“ – weil stärker korrigiertere – Wert wird in Tabelle 14 und Abbildung 26 dargestellt und zeigt immer noch einen Unterschied zugunsten der PZ um den Faktor 1,88 bis 2,23.

Tabelle 14. Anzahl der LC3B-immunopositiven Signalpartikel pro Zelle und pro Zellfläche bei PZ und PVI nach Behandlung mit 100 nM Bafilomycin angegeben in gerundeten Mittelwerten $\times 10^{-3}$ (mit 95%-Konfidenzintervall).

N = 168	0 h Bafilomycin	3 h Bafilomycin	6 h Bafilomycin	12 h Bafilomycin
PVI	2,21 (1,59 – 2,85)	3,07 (2,24 – 3,90)	3,56 (2,60 – 4,52)	0,34 (0,28 – 0,40)
PZ	4,16 (3,13 – 5,18)	6,37 (5,24 – 7,49)	7,93 (6,73 – 9,13)	1,08 (0,94 – 1,22)
Unterschieds-faktor	1,88	2,07	2,23	3,18

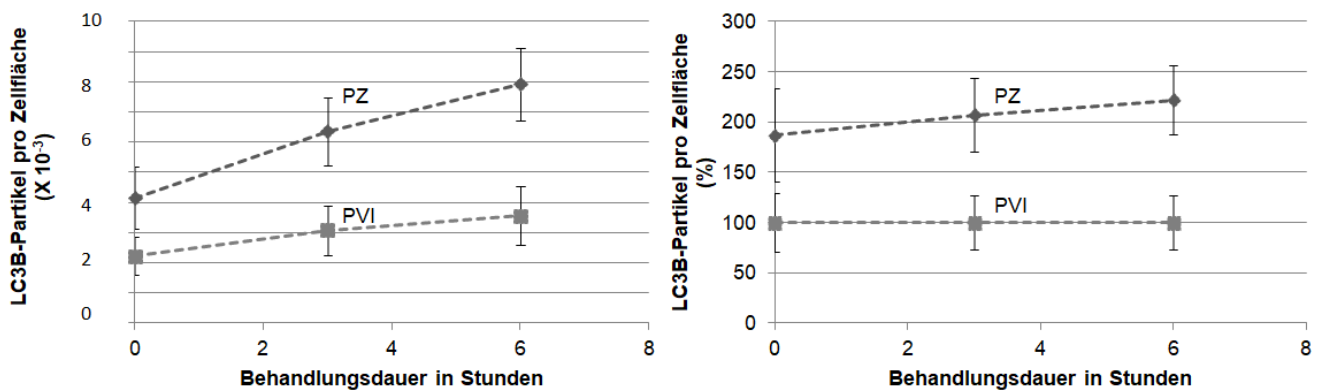


Abbildung 26. Zelltypabhängiger zeitlicher Verlauf der Anzahl der LC3B-immunopositiven Partikel pro Zelle und pro Zellfläche in absoluten (links) und relativen (rechts) Werten nach Behandlung mit 100 nM Bafilomycin. Bei den relativen Werten wurden die PVI-Werte jeweils gleich 100% und die PZ hierzu in Beziehung gesetzt. Die Werte sind dargestellt mit einem Konfidenzintervall von 95%. Die LC3B-immunopositiven Flächen bzw. Partikel sind nicht mit Autophagosomen gleichzusetzen, werden aber als Maß für diese verwendet. Zu erkennen ist ein Unterschied zwischen PZ und PVI jenseits der Konfidenzintervalle auch nach Korrektur für die unterschiedlichen Zellflächen um den Faktor 1,88 bis 3,18.

Es zeigte sich also eine deutliche Differenz zwischen PZ und PVI in Bezug auf die anfärbbaren LC3B-immunopositiven Signalpartikel pro Zelle (um den Faktor 7,3 bis 7,6). Dieser Unterschied blieb auch nach Korrektur für die jeweilige Zellgröße bestehen, war aber deutlich geringer ausgeprägt (um den Faktor 1,88 – 2,23). Die Signifikanztestung des Einflusses der unabhängigen Variablen „Zelltyp“ (PZ vs. PVI) sowie „Behandlung“ (0 h vs. 3 h vs. 6 h 100 nM Bafilomycin) auf die abhängige Variable „Anzahl LC3B-positiver Signalpartikel pro Zelle“ ergab einen signifikanten Einfluss sowohl des Zelltyps als auch der Behandlung ($p < 0,001$). Der Post-Hoc-Test der festgestellten Mittelwerte ergab signifikante Unterschiede zwischen allen drei Behandlungszeitpunkten wie in Tabelle 15 aufgeführt. Hierbei ist allerdings zu beachten, dass die Zelltypen anhand ihrer Behandlungszeiten zu Gruppen zusammengefasst wurden, weshalb die so ermittelten Signifikanzwerte bezüglich des Einflusses der Behandlungsdauer zelltypübergreifend zu verstehen sind.

Tabelle 15. Ergebnisse der Signifikanzwerte nach multiplen Vergleichen der berechneten Mittelwerte des Parameters „Signalpartikel pro Zelle“ mittels des Tukey-HSD Post-Hoc-Tests für die Beziehungen zwischen den jeweiligen Behandlungszeitpunkten über beide Zelltypen hinweg.

100 nM Bafilomycin	100 nM Bafilomycin	Signifikanz
0 h	3 h	0,006
	6 h	< 0,001
3 h	0 h	0,006
	6 h	0,063

6 h	0 h	< 0,001
	3 h	0,063

5.6.2 Relative Ähnlichkeit der Kinetik der Autophagosomenbildung unabhängig vom Neuronentyp im gleichen organotypischen Mikromilieu

Als zweites lässt sich die Kinetik der Autophagosomenbildung innerhalb der jeweiligen Zelltypen unter basalen Autophagiebedingungen über die Behandlungsdauer hinweg beschreiben (ebenfalls Abb. 25 und 26). Bei Betrachtung der Anzahl LC3B-immunopositiver Signalpartikel (Abb. 25) zeigt sich eine beinahe lineare Akkumulation innerhalb von sechs Stunden. Die entsprechende Dynamik lässt sich auch in den konfokalen immunhistochemischen Bildern beobachten, wie sie in den Abbildungen 27 (PZ) und 28 (PVI) nachvollzogen werden kann. Diese immunhistochemischen Bilder zeigen das Ausmaß der Partikelakkumulation in Abhängigkeit vom Behandlungszeitpunkt und Zelltyp in hirnormotypischen Schnittkulturen aus Wildtypmäusen, die im Gegensatz zu Mäusen mit Speicherkrankheiten wie Niemann-Pick Typ C keine besonders großen Autophagosomen aufweisen (177). Die partikuläre Gesamtfläche LC3B-immunopositiver Signale pro Zelle und im Verhältnis zur Zellfläche (Appendix Kapitel 7.7) zeigten zwischen einer drei- und sechsständigen Behandlung ein Plateau, was auf eine zunehmende Partikelakkumulation bei kleiner werdenden Partikeln hindeutet. Dieser Effekt zeigte sich auch in der durchschnittlichen Partikelgröße (Appendix Kapitel 7.7), die zwischen 3 h und 6 h leicht abnahm. Angesichts der aufgeführten 95%-Konfidenzintervalle kann es sich hierbei allerdings auch um Zufallsschwankungen handeln.

Im Gegensatz zu den klaren absoluten Differenzen in der Autophagosomenbildung zwischen den Zelltypen ließen sich in der relativen Entwicklung innerhalb der Behandlung sehr ähnliche Bewegungen feststellen. Obwohl beide Zelltypen auf vollkommen unterschiedlichen quantitativen Niveaus begannen, fand innerhalb der ersten drei Stunden eine ähnliche relative Akkumulation statt, bei der bezogen auf die Anzahl LC3B-immunopositiver Signalpartikel pro Zelle die PZ eine Zunahme von im Mittel ungefähr 56% (43,2 => 67,6) und die PVIs von ungefähr 53% (5,8 => 8,9) zeigten. Im zweiten Zeitabschnitt (zwischen 3 h und 6 h) bestätigte sich diese analoge Entwicklung zwischen PZ und PVI mit einem weiteren Anstieg um ungefähr 26% (PZ) bzw. 30% (PVI). Trotz dieser ähnlichen Steigung zeigte sich aufgrund des sehr unterschiedlichen absoluten

Niveaus, auf dem sich PZ und PVI bewegen, in einem linearen Regressionsmodell beider Zelltypen auch ein deutlicher Unterschied in der Größe des Regressionskoeffizienten, der für PZ 20,89 und für PVI 2,9 beträgt.

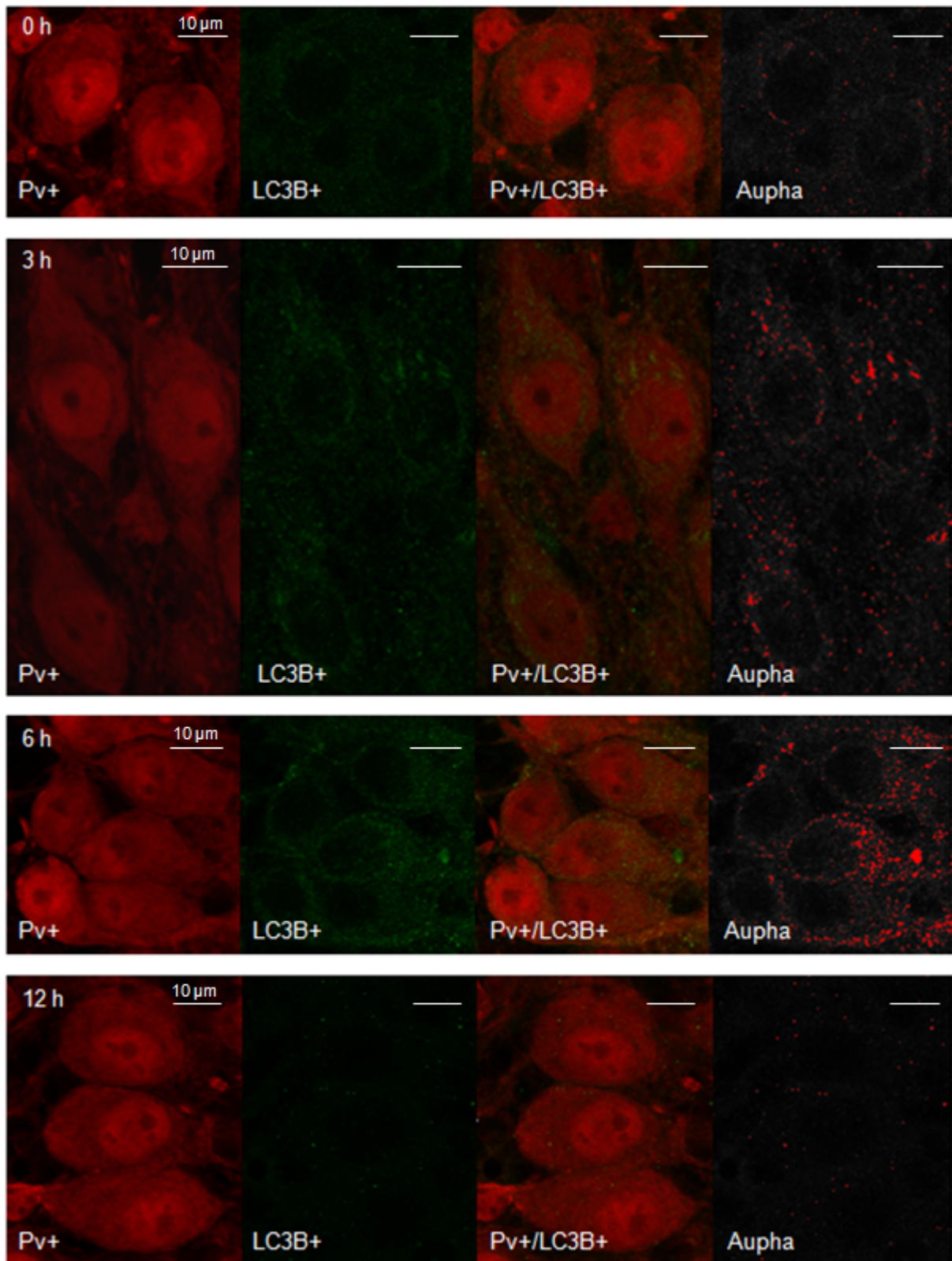


Abbildung 27. Summationsbilder aus der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie von PZs. Von links nach rechts: Pv+: Parvalbuminkanal (594 nm); LC3B+: LC3B-Kanal (488 nm); Pv+/LC3B+: beide Kanäle kombiniert; Aupha:

gemessenes Autophagosomen-gebundenes LC3B2 nach Anwendung der Messschwelle. Von oben nach unten: Behandlungsdauer mit Bafilomycin B1 von 0, 3, 6 und 12 h. Der dargestellte Maßstab entspricht 10 μm .

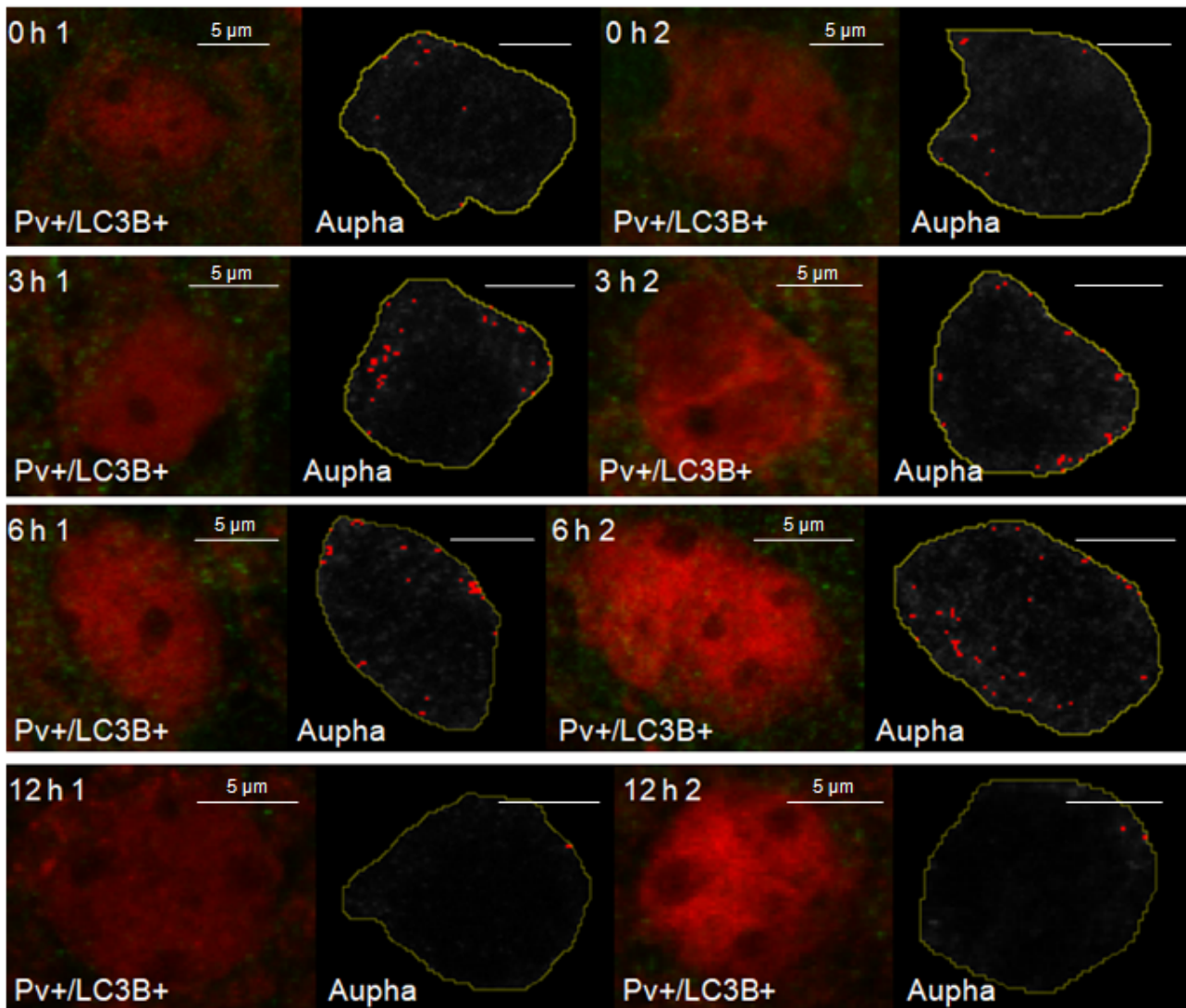


Abbildung 28. Summationsbilder aus der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie von PVIs. Von links nach rechts: Pv+/LC3B+: Parvalbuminkanal (594 nm) und LC3B-Kanal (488 nm) kombiniert; Aupha: gemessenes Autophagosomen-gebundenes LC3B2 nach Anwendung der Messschwelle. Da die PVIs verstreut innerhalb des Stratum moleculare liegen, ist es kaum möglich, mehrere in einem Bildausschnitt darzustellen, in dem man gleichzeitig noch die LC3B-immunopositiven Partikel erkennen kann. Aus diesem Grund sind hier für jeden Messzeitpunkt zwei getrennte PVIs dargestellt. Von oben nach unten: Behandlungsdauer mit Bafilomycin B1 von 0, 3, 6 und 12 h. Der dargestellte Maßstab entspricht 5 μm .

Die exploratorischen ONE-WAY-Anovas, die den Einfluss der unabhängigen Variable „Behandlungsdauer“ auf die abhängigen Variablen „Anzahl der LC3B-immunopositiven Partikel / Zelle“ bzw. „Anzahl der LC3B-immunopositiven Partikel / Zelle / Zellfläche“ testeten, fanden ebenfalls signifikante Effekte der Behandlungsdauer und werden hier aufgrund ihres exploratorischen Charakters bewusst getrennt in Tabelle 16 aufgeführt. Darüber hinaus gibt es eine nicht zu vernachlässigende Varianz zwischen den Kulturen

innerhalb eines Zeitpunktes (also innerhalb eines „Clusters“ von Kulturen und nicht innerhalb einer Kultur). Dies mindert die Signifikanz des Einflusses der Behandlungsdauer zwar nicht sehr ausgeprägt, limitiert jedoch einen direkten Vergleich der Kulturen über die Zeitpunkte hinweg. Diese Varianz ist in den errechneten Konfidenzintervallen enthalten. Der direkte Vergleich von PZ und PVI innerhalb der einzelnen Kulturen hingegen erbrachte mit großer Konstanz ein Gefälle, wie es in Kapitel 5.6.1 dargestellt wurde teilweise in noch größerer Ausprägung.

Tabelle 16. Ergebnis der exploratorischen ONE-WAY-Anovas zur Bestimmung des Einflusses der unabhängigen Variablen „Behandlungsdauer“ auf die abhängige Variable für PZ und PVI, angegeben als P-Wert.

Abhängige Variable	Zelltyp	Einfluss der unabhängigen Variablen „Behandlungsdauer“
LC3B-Partikel / Zelle	PZ	p < 0,001
	PVI	P = 0,015
LC3B-Partikel / Zelle / Zellfläche	PZ	P < 0,001
	PVI	P = 0,068

6 Diskussion

Die vorliegende Studie [1] evaluierte erstmals die cerebelläre organotypische Schnittkultur für eine Untersuchung des Autophagosomenflusses und [2] ermittelte erstmals durch experimentelle Ansätze quantitativ die Unterschiede in der Autophagosomenbildung zwischen zwei cerebellären Neuronenklassen.

6.1 Die cerebelläre hirnormotypische Schnittkultur als experimentelles System für die vergleichende quantitative Autophagieforschung

Zur Etablierung der hirnormotypischen Schnittkultur als experimentellem System für eine vergleichende quantitative Autophagieforschung müssen eine Reihe von

Rahmenbedingungen bestimmt werden, die bereits in der Einleitung aufgezählt wurden und im Folgenden nacheinander diskutiert werden:

1. Wie verhält sich die Menge der Autophagosomen im cerebellären hirnanatomischen Schnitt im Vergleich zu jener Dichte in einer Kleinhirnprobe einer Maus gleichen Alters?

Die in 5.1 dargestellten Ergebnisse (LC3B2/Actin überwiegt im Maushomogenisat vs. Schnittkulturhomogenisat um den Faktor 1,7 – 3,1) zeigen, dass sich die Autophagosomendichte in Schnittkulturen, gemessen an dem Gehalt des Autophagosomen-assoziierten Proteins LC3B2 im Verhältnis zu Actin, deutlich von derjenigen in Mausproben unterscheidet. Dieser Effekt ist unabhängig von den sich deutlich unterscheidenden Gesamtproteingehalten (Mausprobe > Schnitt) des verwendeten Probenmaterials, da die Auftragungsvolumina für die Proteinauftrennung und anschließende Western Blot Analytik durch einen initialen Vergleich der Actingehalte der zu testenden Proben zwischen Maus- und Schnittprobe angepasst wurden. Dabei folgten wir den Richtlinien, die zur Autophagiemessung vorgeschlagen werden (109).

Diese deutlichen Unterschiede der Protein- bzw. Actingehalte sind möglicherweise eine Begleiterscheinung der morphologischen Änderungen im Rahmen der Schnittkultivierung. Zur Sicherung des Überlebens lassen sich zum einen eine erhebliche Abflachung des Schnittes und auch eine axonale Reorganisation der Purkinje-Zellen nach Axotomie hin zu einer gegenseitigen Autoinnervation mit verminderter Axonlänge und -dichte feststellen. Zum anderen findet im Rahmen der Abflachung ein Zelluntergang nicht mehr regenerierbarer Neuronen statt, während sich an den Schnittflächen eine Narbe durch Gliaproliferation bildet (5, 6, 8, 12). Somit sind eine Veränderung der relativen Zellzusammensetzung und auch eine Abnahme der Autophagosomenmenge wahrscheinlich. Der Einfluss dieser veränderten Gewebeorganisation lässt sich in Ermangelung quantitativer Vergleichsuntersuchungen allerdings nur vermuten. Die Tatsache, dass die Untersuchung der Vergleichsparameter (Purkinje-Zellen und Parvalbumin-positive Interneuronen) innerhalb des gleichen Systems vorgenommen wird, minimiert eine mögliche Verzerrung, die durch die unterschiedliche Autophagosomendichte in Schnitt und Mausprobe entsteht. Dies ist allerdings nur dann zutreffend, wenn keine zelltypabhängigen stressbedingten langfristigen Modifikationen der

Autophagiemaschine durch die Schnittpräparation oder die Kulturbedingungen induziert werden, die über die Reorganisations- und Regenerationsphase hinaus anhalten. Solch eine zelltypspezifische und nachhaltige, von außen induzierte Veränderung des Autophagiestatus als Stressantwort beinahe zwei Wochen über den Stressreiz hinaus ist jedoch nach hiesiger Kenntnis noch nie beschrieben worden. Allerdings berichteten sowohl Rodriguez-Muela et al. als auch Romeo-Guitart et al. davon, dass eine Axotomie zu einer kompensatorischen Autophagieinduktion in retinalen Ganglienzellen und spinalen Motoneuronen führt, die zum Zellüberleben beiträgt (190, 191). Außerdem gelten Purkinje-Zellen als besonders stressresistent gegenüber Axonschäden und –degenerationen, was über die PVI nicht bekannt ist (10). Daher ist es von besonderer Wichtigkeit, den Autophagiestatus der untersuchten Schnittkulturen zu bestimmen, um festzustellen, ob cerebelläre hirnorganotypische Schnittkulturen sich überhaupt zur Untersuchung der basalen Autophagie eignen oder sich durch die Folgen der Schnittpräparation in einem induzierten Zustand befinden.

2. Wie beeinflusst das Alter des Schnittes die Menge an Autophagosomen? Spielt dabei die exakte Kulturdauer eine maßgebliche Rolle?

Es stellte sich aufgrund der sehr aufwendigen Präparation der Schnittkulturen der Praktikabilität halber die Frage, ob alle hierfür notwendigen personellen und materiellen Ressourcen inklusive der benötigten Mäuse in passendem Alter und in ausreichender Zahl zeitlich so koordiniert werden müssten, dass die Folgeversuche exakt 22 Tage nach Präparation weitergeführt werden könnten. Die in 5.2 beschriebenen Untersuchungen zeigen keine wesentliche Schwankung des LC3B2/Actin-Quotienten über die Kultivierungsdauer hinweg. Damit ist der genutzte Zeitraum (P22 – P29) unbedenklich im Hinblick auf die Vergleichbarkeit der Schnittkulturen. Darüber hinaus zeigen die Ergebnisse ebenfalls, dass während einer Kultivierungsdauer über 14 Tagen nach Abschluss der Reorganisationsphase hinweg keine relevante Veränderung des LC3B2/Actin-Quotienten oder des LC3B2/LC3B1-Konversionsindex auftreten. Somit kann innerhalb der ersten Wochen von einer weitestgehend konstanten Autophagiesituation ausgegangen werden, was für die Stabilität des experimentellen Systems spricht.

3. Ist die Autophagosomenbildung im cerebellären hirnorganotypischen Schnitt noch induzierbar und supprimierbar?

Die in 5.3 (Induktion durch Rapamycin bzw. Nährstoffdeprivation s.u.) und 5.5 (Suppression durch 3-MA s.u.) dargestellten Ergebnisse demonstrieren, dass sich der LC3B2/Actin-Wert sowohl durch den Einsatz des induzierenden Pharmakons Rapamycin als auch durch vollständigen Nährstoffmangel steigern und durch 3-Methyladenin vermindern lässt. Dies bestätigt nicht nur die aus anderen experimentellen Systemen bekannten Wirkungen dieser Pharmaka auf die Autophagosomenzahl, sondern zeigt auch, dass sich die Schnitte in einem regulierbaren Autophagiezustand befinden. Der Autophagiestatus in den cerebellären hirnorganotypischen Schnittkulturen ließ sich um ungefähr 70% (Rapamycin) bzw 72% (Nährstoffdeprivation) induzieren (5.3) und um 66% supprimieren (5.5). Es kann geschlossen werden, dass sich der Autophagiestatus in Schnittkulturen, entnommen von Mäusen im Alter von P10 und kultiviert für ungefähr zwei Wochen (11 - 15 Tage), in gleichem Maße supprimieren und induzieren lässt, sich also in einem basalen Zustand befindet, d.h. unter normalen Kulturbedingungen. Dabei entspricht die hier bestimmte relative Suppression von 66% durch 3-MA den Werten, die von Meske et al. für die primäre Neuronenkultur beschrieben wurden (178).

Eine prinzipielle Stimulierbarkeit der Autophagie wurde bereits in kurz kultivierten Retinapräparaten der Maus von Esteban-Martinez und Boya gezeigt (192). Allerdings wurde dies weder quantifiziert noch unter Bedingungen erhoben, in denen der Kultur eine ausreichende Reorganisations- und Anpassungszeit gegeben wurde. Die Inhibierbarkeit wurde nicht untersucht, sodass unklar bleibt, ob dabei – so wie bei der vorliegenden Studie – eine ausgewogene Mittellage im Sinne eines etwa gleich großen Ausmaßes von Stimulierbarkeit und Inhibierbarkeit vorlag.

4. Lässt sich die Autophagie in der hirnorganotypischen Schnittkultur mit ähnlichen Effekten pharmakologisch manipulieren wie in primären Neuronenkulturen?

Es stellt sich die Frage, ob sich die in der Autophagieforschung typischerweise verwendeten Pharmaka ebenso und unter gleichen Konzentrationen nutzen lassen wie in primären Neuronenkulturen, denn die Schnittkultur bildet eine Glianarbe aus, die sowohl ein Pharmakon-absorbierendes Gewebe als auch eine Diffusionsbarriere darstellen kann.

Die vorgestellten Ergebnisse von Untersuchungen mit dem Autophagie-induzierenden Rapamycin (5.3, Anstieg LC3B2/Actin 70% vs. Kontrolle), dem die Autophagosomendegradation inhibierenden Bafilomycin B1 (5.4, Anstieg LC3B2/Actin um bis zu 288% vs. Kontrolle) sowie dem Autophagiesuppressor 3-MA (5.5, Abnahme LC3B2/Actin um bis zu 66% vs. Kontrolle) demonstrieren die prinzipielle Wirksamkeit dieser Pharmaka auch im organotypischen Versuchsansatz anhand der verwendeten LC3B2/Actin-Verhältnisse (und LC3B2/LC3B1-Verhältnisse, siehe Appendix). Darüber hinaus zeigen diese Ergebnisse die Beeinflussbarkeit beider Schenkel der Autophagie, der Autophagosomenbildung (Rapamycin, 3-MA) und des Autophagosomenabbaus durch Fusion mit degradativen Lysosomen (Bafilomycin B1). Es konnte gezeigt werden, dass eine mögliche Glianarbenbildung als Konsequenz des Präparationstraumas und auch andere Folgen der Kultivierung zu keinem Problem der Penetration der verwendeten Pharmaka in cerebellären Schnittkulturen führen.

Die Wirkung des 3-MA ist, wie bereits erwähnt, mit derjenigen Wirkung zu vergleichen, die Meske et al. in primären Neuronenkulturen und in histologischer Untersuchung bei einer wesentlich längeren Expositionsdauer von 18 Stunden ermittelten, und die bei ungefähr 55% lag (178).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass cerebelläre hirnorganotypische Schnittkulturen als experimentelles System zur vergleichenden quantitativen Untersuchung verschiedener Aspekte der basalen Autophagie herangezogen werden können. Sie befinden sich in einem ausgewogenen Autophagiestatus (in ähnlichem Maße induzierbar wie supprimierbar) und lassen sich pharmakologisch auf die bisher bekannte Weise beeinflussen (Bafilomycin B1, Rapamycin, 3-Methyladenin). Dabei zeigen Rahmenbedingungen wie etwa die Kultivierungsdauer eine konstante Beziehung zur Autophagosomenzahl. Das organotypische Mikromilieu mit typischer dreidimensionaler Gewebearchitektur lässt sich zuverlässig reproduzieren. Es ist dabei aber zu berücksichtigen, dass die Schnittkulturen vermutlich aufgrund der Anpassungsprozesse im Rahmen ihrer Reorganisation und Regeneration einen insgesamt geringeren Gehalt an Autophagosomen-assoziiertem LC3B2 zeigen als vergleichbare Proben, die direkt aus Mäusen entnommen wurden. Deshalb sind quantitative Daten aus Schnittkulturen und Ganztieruntersuchungen nicht unmittelbar vergleichbar, selbst wenn sie aus gleicher Spezies, gleichem Alter und gleicher Hirnregion stammen.

6.2 Zelltypspezifische quantitative Unterschiede der Autophagosomenbildung in Neuronen

Wie in der Einleitung beschrieben (Kapitel 3.4), ergab eine umfangreiche und detaillierte Datenbank-Recherche, dass bislang keine vergleichenden Untersuchung zur Autophagie in verschiedenen Nervenzellklassen im gleichen organotypischen Mikromilieu unter basalen oder gar pharmakologisch provozierten Bedingungen publiziert wurden. Somit zeigen die hier beschriebenen experimentellen Befunde erstmals, dass sich cerebelläre Projektionsneurone und cerebelläre Interneurone signifikant in ihrem basalen Autophagiestatus unterscheiden, hinsichtlich der Reaktionskinetik nach Bafilomycingabe jedoch gleich verhalten.

Die Daten wurden dabei an einem organotypischen Langzeit-Kulturmodell vom Cerebellum erhoben, sodass die untersuchten 1344 Nervenzellen denen jung-adulter Tiere entsprechen. Solche Kulturen haben für die experimentellen Untersuchungen viele Vorteile: die Organotypizität, ein gleiches Mikromilieu und eine gut kontrollierte Pharmakonanflutung (bspw. ohne potenzielles Problem bei der Penetration der Blut-Hirn-Schranke). Ein weiterer Vorteil ist die Möglichkeit des quantitativen Vergleichs verschiedener Zelltypen innerhalb des Gewebeschnittes. Damit sind die jeweils aktuellen experimentellen Mikromilieuparameter vergleichbar – eine direkte Vergleichbarkeit ist gegeben, d.h. es werden keine Referenzkontrollen benötigt, die notwendig wären, wenn Zellen unterschiedlicher Regionen entsprechend verglichen würden.

Die zu dem 12-Stunden-Behandlungszeitpunkt ermittelten Ergebnisse fallen vollständig aus der Reihe, weil das nachweisbare LC3B nicht nur abfällt, sondern sogar unter den Ausgangswert (0 h = Nullwert) fällt und nur noch in geringem Maße anfärbbar war. Hierfür sind prinzipiell mehrere Erklärungen möglich, die bezogen auf die vorliegende Arbeit jedoch spekulativ bleiben und deshalb hier nicht weiter erörtert werden sollen. Wegen der mangelnden Interpretierbarkeit des 12-h-Versuchsansatzes, und weil dieser mit den bisherigen Erfahrungen im Umgang mit der Autophagieforschung in der Zellkultur schwer vereinbar ist, werden die Ergebnisse zwar der Vollständigkeit halber mit angeführt, ansonsten jedoch als Fehlversuch gewertet. Nichtsdestotrotz werden selbst in diesem Versuchsansatz – auch wenn er für die Beurteilung der Kinetik nicht herangezogen werden kann – die gleichen neuronentypspezifischen Unterschiede gefunden (überwiegen der LC3B-Partikel pro Zelle zugunsten der PZ um den Faktor 12,1).

Die in 5.6 vorgestellten Ergebnisse einer zelltypspezifischen histologischen Untersuchung von insgesamt 1344 Nervenzellen nach Bafilomycin B1-Behandlung in Form der Einzelzellanalyse über vier verschiedene Behandlungszeitpunkte können wie folgt beurteilt werden:

Betrachtet man die Akkumulation des LC3B im Vergleich zum Ausgangsbefund ohne Bafilomycinbehandlung (0 h), lässt sich indirekt schließen, dass die über die Zeitachse akkumulierten Autophagosomen unter basalen Bedingungen ohne die Bafilomycinbehandlung nicht „sichtbar“ gewesen wären und somit der abgebauten Anzahl entsprechen. Die Behandlung mit Bafilomycin hemmt die Fusion der Autophagosomen mit Lysosomen und ihre konsekutive Degradation. Die dadurch herbeigeführte Akkumulation von Autophagosomen kommt also durch diejenigen Autophagosomen zustande, die ständig neu gebildet werden und der Autophagosomenbildungsrate entsprechen.

Somit konnten unter gleichen organotypischen, nicht Autophagie-induzierten Bedingungen deutliche quantitative Unterschiede in der Autophagosomenbildung nachgewiesen werden.

Dieser Unterschied erstreckt sich sowohl über den in der Literatur üblichen Parameter „LC3B-positive Partikel pro Zelle“ als auch den konservativeren für die Zellgröße korrigierenden Parameter „LC3B-positive Partikel pro Zelle pro Zellfläche“. Allerdings deutet der weitaus kleinere Unterschied nach Korrektur für die Zellfläche (Faktor 1,88 bis 2,23 nach, Faktor 7,3 bis 7,6 vor Justierung für die Zellfläche) darauf hin, dass die Zellgröße eine wesentliche Rolle für die Autophagosomenanzahl, die sich für eine Zelle bestimmen lässt, spielt.

Darüber hinaus lässt sich feststellen, dass sich die durchschnittliche Größe der als Autophagosomen gewerteten Signalpartikel unterscheidet (wobei PZ im Mittel größere Partikel aufweisen). Sowohl bei den PZ als auch den PVI deutet sich im Verlauf der Akkumulation eine leichte Änderung an, die jedoch aufgrund der sich überschneidenden Konfidenzintervalle zufällig beobachtet worden sein kann. Es kommt zwar zwischen 3 h und 6 h zu einer Stagnation der LC3B-Akkumulation der Bafilomycinbehandlung im Hinblick auf die partikuläre Gesamtfläche des LC3B-positiven Signals pro Zelle s. Abb. 35 in Kapitel 7.7). Aber es findet sich eine weitere Zunahme von LC3B-Signalpartikeln, die mit

einer geringeren durchschnittlichen Größe der einzelnen Partikel einhergeht (Abb. 37 in Appendix). Änderungen der Autophagosomengröße in Abhängigkeit der einzuschließenden Zielstrukturen und des Autophagiestatus sind kein neues Phänomen. Bekannt ist bei pharmakologischer Induktion der Autophagosomenbildung mittels Rapamycin oder eines Mangelzustandes beispielsweise eine Zunahme der Autophagosomengröße (173, 193). In diesem Sinne lässt sich in der vorliegenden Untersuchung eine umgekehrte Reaktion beobachten: nach einer anfänglichen Zunahme eine kontinuierliche Abnahme der Autophagosomengröße bei zunehmender Akkumulation und während des folgenden kompensatorischen Abfalls an messbaren LC3B-positiven Strukturen unter Bedingungen der basalen Autophagie.

Damit kann die in der Einleitung formulierte Nullhypothese widerlegt werden.

Anzumerken ist jedoch, dass die generierten Ergebnisse ausschließlich eine Aussage über den Grad der LC3B-Punktierung als Maß für die Zahl der Autophagosomen bzw. ihren relativen Anteil an der Somafläche aussagen. Maday und Holzbaur zeigten hierzu, dass sich der Einsatz von Bafilomycin fast ausschließlich in einer Autophagosomenakkumulation im Soma niederschlägt und dieses somit als Untersuchungsobjekt genügt (98).

Ob der ermittelte Unterschied von der Art der Zelltypen, ihrem elektrophysiologischen oder molekularen Profil, ihrer metabolischen Belastung oder morphologischen Faktoren wie der Axonlänge und Anzahl an distalen Axonterminalen bestimmt wird kann an dieser Stelle nur gemutmaßt werden (98). Nichtsdestotrotz kann ein solcher Unterschied eine Grundlage für eine differenzielle Vulnerabilität verschiedener Zelltypen sein und erfordert weitere Untersuchungen.

Das zweite Ergebnis der vorliegenden Untersuchung ist die Ähnlichkeit der relativen Änderungen der LC3B-immunopositiven Flächen und Partikel innerhalb der Zelltypen. Bei beiden Zelltypen finden sich einander entsprechende signifikante Anstiege unter der Bafilomycinbehandlung. Ebenso finden sich in beiden Zelltypen die gleichen relativen Kapazitäten zur Änderung der LC3B-Gehalte - unabhängig von ihren Unterschieden bezüglich der absoluten LC3B-Gehalte. Eine naheliegende Erklärung wäre, dass in beiden Zellklassen ein evolutionär konservierter Mechanismus existiert, der entsprechend gleich

reagiert, zumal beide Zelltypen in gleichem Maße auf den lysosomalen v-ATPase-Inhibitor Bafilomycin B1 reagieren.

6.3 Fazit und Ausblick

Die vorliegende Arbeit liefert mit der Etablierung eines für die Untersuchung zelltypspezifischer Autophagieunterschiede praktikablen experimentellen Systems – der cerebellären hirnorganotypischen Schnittkultur – den ersten Schritt im Bereich der Autophagieforschung mit diesem Ansatz. Sie zeigt darüber hinaus in einem experimentellen Untersuchungsansatz erstmals quantitative neuronentypspezifische Unterschiede im Hinblick auf Autophagosomenzahl und –bildung auf, die von der Untersuchung einer großen Menge von Nervenzellen gestützt werden. Dabei ergab sich ein relevanter Unterschied zwischen den beiden zu vergleichenden cerebellären Neuronengruppen – den großen Purkinje-Zellen (Projektionsneuronen) und den kleinen Parvalbumin-positiven Interneuronen (Interneuronen) – im quantitativen Ausmaß der basalen Autophagosomenbildung, der eine Grundlage für eine unterschiedliche Vulnerabilität bzw. eine unterschiedliche Kapazität zur Kompensation von akuten und chronischen Stresssituationen abbilden könnte. Die Effektstärke der mittels der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie ermittelten zelltypspezifischen Unterschiede ermöglicht es nun zudem, die notwendige statistische Power für eine hochauflösendere transmissionselektronenmikroskopische Untersuchung zu kalkulieren und so zelltypspezifische Unterschiede zwischen cerebellären Neuronen mit höherer Beweiskraft zu bestätigen.

Über hinter diesen zelltypspezifischen Differenzen liegende Gründe und Mechanismen kann zum jetzigen Zeitpunkt jedoch keine Aussage getroffen werden. Ebenso wurde in der vorliegenden Arbeit nicht die Funktionalität der Autophagosomen untersucht. Beides erfordert weitere Studien zelltypabhängiger autophagischer Unterschiede im Kontext einer selektiven Vulnerabilität.

Diesen Untersuchungsansatz weiterzuverfolgen, empfiehlt sich zum einen im Hinblick auf die Frage, wie sich die Autophagie bei verschiedenen Zelltypen unterscheiden kann. Dabei ist nicht nur der vom Neuronentyp abhängige Unterschied bei Pathologien des

Nervensystems von Interesse. Auch aus Unterschieden zwischen Nervenzellen und den bisher im Kontext der quantitativen Autophagie eher weniger betrachteten Gliazellen ließen sich womöglich auf lange Sicht therapeutische Implikationen für die Behandlung von Gliomen, cerebralen Ischämien und anderen Pathologien des Nervensystems gewinnen, bei denen Neurone und Astrozyten unterschiedliche Reaktionen im Hinblick auf ihre Autophagie zeigen. Ein Anfang ist hier bereits gemacht mit den Untersuchungen von Pamerter et al. und Kulkarni et al., die ergaben, dass Astrozyten auf metabolischen und ischämischen Stress mit einer wesentlich stärker ausgeprägten Induktion der Autophagie reagieren als hippocampale Neurone (194, 195). Dass solche autophagiebezogenen Erkenntnisse klinisch praktische Folgen haben können, demonstrieren mittlerweile eine Reihe von Arbeiten zur autophagiebasierten Neuroprotektion zu Substanzen wie Carbamazepin, Curcumin, Rapamycin aber auch kalorischer Restriktion oder Injektionen von autophagieassoziierten Substanzen wie Beclin -1 (131, 196-200). Nichtzuletzt gerät die Suche nach möglichen Ursachen für eine selektive Vulnerabilität bestimmter Neuronengruppen in den letzten Jahren zunehmend in den Fokus (201).

7 Appendix

7.1 Die Bedeutung der statistischen Signifikanz

Da die statistische Signifikanz häufig als Maßstab zur Bewertung der Qualität eines Versuchsergebnisses herangezogen wird, ihre Aussagekraft jedoch auf bestimmte Zwecke begrenzt ist, herrscht in wissenschaftlichen Kreisen eine rege Diskussion über Stellenwert und Verwendung der statistischen Signifikanz. Aus den im Folgenden erläuterten Gründen wurde in Rücksprache mit dem Institut für Biometrie und klinische Epidemiologie der Charité Universitätsmedizin Berlin der Einsatz des P-Wertes im confirmatorischen und exploratorischen Sinne auf eng umrissene Fragestellungen begrenzt und nicht jedes ermittelte Ergebnis auf seine Signifikanz getestet.

Die statistische Signifikanz wurde in den 1920er Jahren durch den britischen Statistiker Ronald Fisher eingeführt als Konzept zur Testung der Vereinbarkeit von Daten mit zuvor aufgestellten Hypothesen und wird unter anderem in einer Veröffentlichung des Winton Professors David Spiegelhalter ausführlich diskutiert (202). Nach diesem Konzept wird eine Signifikanzschwelle (seit Fisher häufig 0,05 oder 0,01) definiert, die von einem für einen vorliegenden Datensatz errechneten Signifikanzwert (P-Wert) unterschritten werden muss, damit das Verwerfen der Nullhypothese als gerechtfertigt betrachtet wird. Als Nullhypothese wird die Annahme verstanden, dass kein Effekt bzw. Unterschied zwischen zwei untersuchten Populationen oder Interventionen besteht. In diesem Sinne stellt die statistische Signifikanz ein praktisches Maß dar, um mit hinreichender Sicherheit auszuschließen, dass ein neu entdeckter Effekt zufällig beobachtet wurde. Ein signifikantes Ergebnis bedeutet weder einen Beweis der Alternativhypothese noch einen Ausschluss der Nullhypothese – und ein nicht signifikantes Ergebnis bedeutet auch nicht einen Beweis der Nullhypothese. Ein Signifikanzwert ist eine Schätzung für die Wahrscheinlichkeit, dass ein so extremer oder noch extremerer Wert unter Annahme der Nullhypothese auftritt (203). Dieses statistische Konzept hat sich in den vergangenen Jahrzehnten in beinahe allen Bereichen der Naturwissenschaften ausgebreitet, ist ein häufiger Maßstab zur Beurteilung der „Wichtigkeit“ von Erkenntnissen und wird gelegentlich fälschlicherweise als „Gütesiegel“ einer Aussage begriffen.

Aufgrund einiger evidenter Schwächen des verbreiteten P-Wertes und einer mutmaßlichen Reproduktionskrise der kontemporären Wissenschaften gerät die statistische Signifikanz als bestimmender Maßstab der Datenbeurteilung jedoch zunehmend in die Kritik. Die

Untersuchungen zweier großer Industrielabore ergaben eine Reproduktionsrate veröffentlichter biomedizinischer Forschungsergebnisse von 12% und 25%, während eine Untersuchung der Open Science Collaboration von über 100 veröffentlichten psychologischen Studien – von denen ursprünglich 97% signifikante Ergebnisse zeigten – in den Reproduktionsarbeiten nur noch zu 36% signifikante Ergebnisse und nur zu 47% die originalen Effektstärken ergaben (204-206). Ähnliche Ergebnisse verleiteten John Ioannidis bereits im Jahr 2005 zu der öffentlichen Äußerung, dass die meisten veröffentlichten Forschungsergebnisse falsch seien (207). Dies führte er neben vorurteilsbehafteter Forschung, kleinen Studienpopulationen, kleinen Effektstärken, zu vielen gleichzeitig getesteten Hypothesen und Beziehungen auch auf den Wettbewerb um positive und besonders signifikante Ergebnisse zurück. Dabei beinhaltet eine Signifikanzschwelle von $\alpha = 0,05$ noch eine vergleichsweise hohe falsch-positive Testrate, sodass bei zehn signifikanten P-Werten bereits eine ungefähr 40%ige Wahrscheinlichkeit besteht, eine der untersuchten Nullhypothesen fälschlicherweise zu verwerfen ($1 - (0,95)^{10} = 0,4013$). Deshalb sollten Signifikanztestungen nicht in großen Mengen durchgeführt werden. Eine Korrektur für diesen Fehler wird üblicherweise durchgeführt, erhöht aber das Risiko falsch-negativer Ergebnisse. Alternativ setzt sich eine Gruppe von Statistikern für die Etablierung einer Signifikanzschwelle $\alpha = 0,005$ ein mit einem „sanften“ Übergang zwischen 0,05 und 0,005, der als „suggestiv“ gewertet werden sollte, da dies die Reproduzierbarkeit statistisch signifikanter Ergebnisse deutlich erhöhen würde (203). Dass auch eine solche Vorgehensweise nicht vor einem kritischen Einsatz von Signifikanztestungen schützt, zeigte eine funktionelle MRT-Untersuchung des Gehirns während einer Mentalisierungsaufgabe, die an einem toten Lachs durchgeführt wurde und zu 16 signifikant aktiven Hirnarealen trotz einer verhältnismäßig niedrigen Signifikanzschwelle von $\alpha = 0,001$ führte (208). Desweiteren betonten die Statistiker Andrew Gelman und Hal Stern bereits 2006, dass der Unterschied zwischen „signifikant“ und „nicht signifikant“ häufig selbst nicht signifikant sei und statistische Signifikanz nicht gleichzusetzen sei mit praktischer Bedeutung (209). Sie tragen vor, dass zwei Ergebnisse zu derselben Thematik, von denen eins signifikant und das andere nicht signifikant ist, selbst keinen signifikanten Unterschied aufweisen können, während umgekehrt sich zwei signifikante Ergebnisse zu derselben Thematik untereinander signifikant unterscheiden können.

7.2 LC3B2/LC3B1-Quotient zu Kapitel 5.1

Tabelle 17. Vergleich der Mittelwerte der LC3B2/LC3B1-Quotienten (mit Standardabweichungen) zwischen cerebellärem hirnormanotypischen Schnitt und cerebellärem Homogenisat aus gleichaltrigen Mäusen.

N = 6	Schnitt	Maus	Relativer Unterschied um den Faktor
P22	17,47 (0 – 36,14)	1,83 (1,41 – 2,25)	0,10
P29	13,00 (7,2 – 18,8)	2,22 (1,44 – 3)	0,17
P36	17,79 (11,91 – 23,67)	1,91(1,47 – 2,35)	0,11

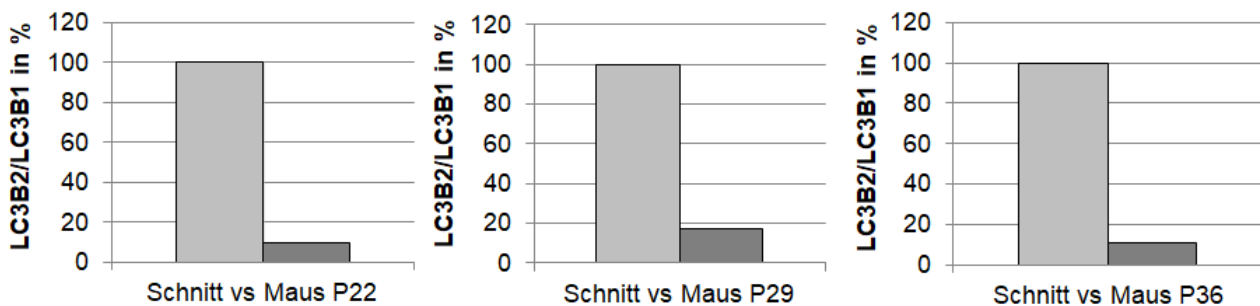


Abbildung 29. Gegenüberstellung der relativen Unterschiede der LC3B2/LC3B1-Quotienten zwischen cerebellärem hirnormanotypischem Schnitt und cerebellärem Homogenisat gleichaltriger Mäuse. Die Werte der Schnitte wurden jeweils gleich 100% gesetzt und das Verhältnis der Homogenisate hierzu berechnet. Zu erkennen ist ein deutlicher Unterschied des LC3B2/LC3B1-Quotienten zugunsten der aus Schnittkulturen gewonnenen Proben.

7.3 LC3B2/LC3B1-Quotient zu Kapitel 5.2

Tabelle 18. Vergleich der Mittelwerte des LC3B2/LC3B1-Konversionsindex (mit Standardabweichung) in cerebellären hirnormanotypischen Schnittkulturen nach unterschiedlicher Kultivierungsdauer.

N = 6	P22	P29	P36
Absolut	15,76 (5,56 – 25,96)	16,65 (2,12 – 31,18)	11,30 (5,07 – 17,53)
Relativ	100%	106%	72%

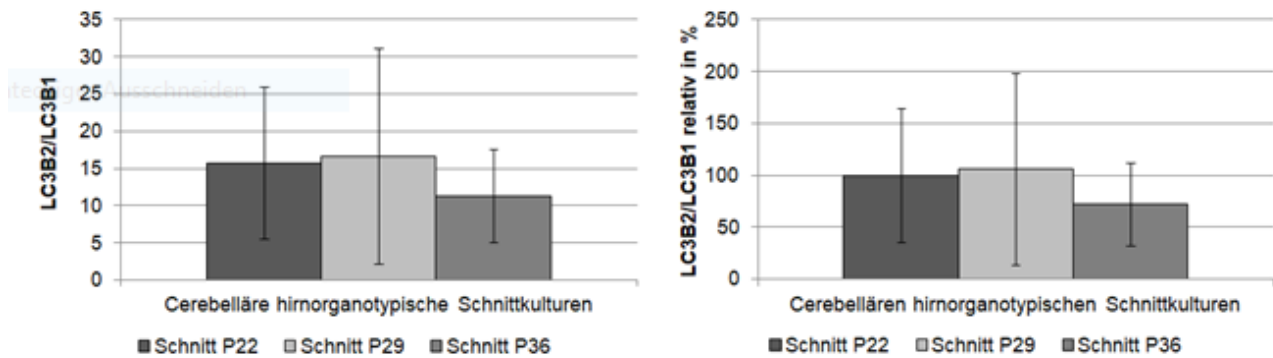


Abbildung 30. Einfluss der Kultivierungsdauer von cerebellären hirnanorganotypischen Schnittkulturen aus der Maus auf den gemessenen LC3B2/LC3B1-Quotienten im Rahmen von maximal 26 Kultivierungstagen (n = 6). Links: absolute Mittelwerte mit Standardabweichungen: P22 15,76 (5,56 – 25,96), P29: 16,65 (2,21 – 31,18), P36: 11,30 (5,07 – 17,53). Rechts: relative Darstellung, in der P22 gleich 100% gesetzt und P29 und 36 ins Verhältnis dazu gesetzt wurden. Es ist kein Unterschied jenseits der Standardabweichungen zwischen den unterschiedlichen Kultivierungsdauern zu erkennen.

7.4 LC3B2/LC3B1-Quotient zu Kapitel 5.3

Tabelle 19. Mittelwerte und Standardabweichung des LC3B2/LC3B1-Quotienten nach Behandlung mit PBS und Bafilomycin (metabolische Induktion), Rapamycin und Bafilomycin (pharmakologische Induktion) sowie Kontrollen (nur Bafilomycin).

N = 3	Medium + Baf	PBS + Baf	Medium + Rap + Baf
Absolut	3,37 (1,9 – 4,84)	5,06 (4,01 – 6,11)	3,31 (3 – 3,62)
Relativ	100%	150%	98%

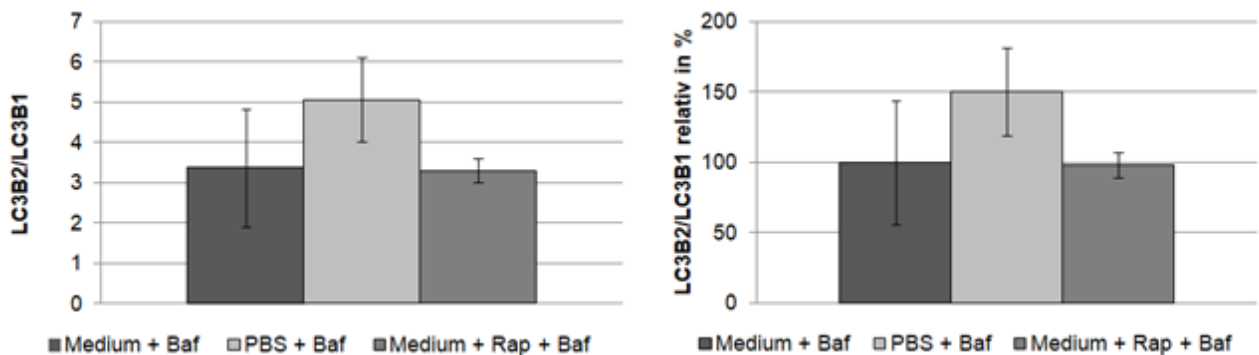


Abbildung 31. Induzierbarkeit der Autophagosomenbildung in cerebellären hirnanorganotypischen Schnittkulturen aus der Maus (siehe Text). Jeweils drei Schnitte wurden im Alter von 24 bzw. 25 Tagen entweder mit 100 nM Bafilomycin in Nährmedium (Kontrolle) oder mit 100 nM Bafilomycin in nährstofffreiem PBS bzw. 500 nM Rapamycin plus 100 nM Bafilomycin in Nährmedium für zwei Stunden behandelt (n = 3). Links: Darstellung des LC3B2/LC3B1-Quotienten in absoluten Werten als Mittelwert mit Standardabweichungen von links nach rechts: 3,37 (1,9 – 4,84), 5,06 (4,01 – 6,11), 3,31 (3 – 3,62). Rechts: relative Darstellung bei der die Kontrolle Medium + Baf gleich 100% gesetzt und die anderen ins Verhältnis dazu gestellt wurden. Es ist kein Unterschied jenseits der Standardabweichungen im Vergleich zur Kontrolle zu erkennen.

7.5 LC3B2/LC3B1-Quotient zu Kapitel 5.4

Tabelle 20. Mittelwerte und Standardabweichung des LC3B2/LC3B1-Quotienten nach Behandlung mit 100, 200 oder 400 nM Bafilomycin sowie Kontrollen.

N = 3	Kontrolle	Bafilomycin	Relativer Unterschied um den Faktor
100 nM	2,11 (1,65 – 2,57)	4,35 (3,37 – 5,33)	2,1
200 nM	4,16 (2,99 – 5,33)	11,17 (5,27 – 17,07)	2,7
400 nM	3,17 (2,33 – 4,01)	7,65 (6,8 – 8,5)	2,4

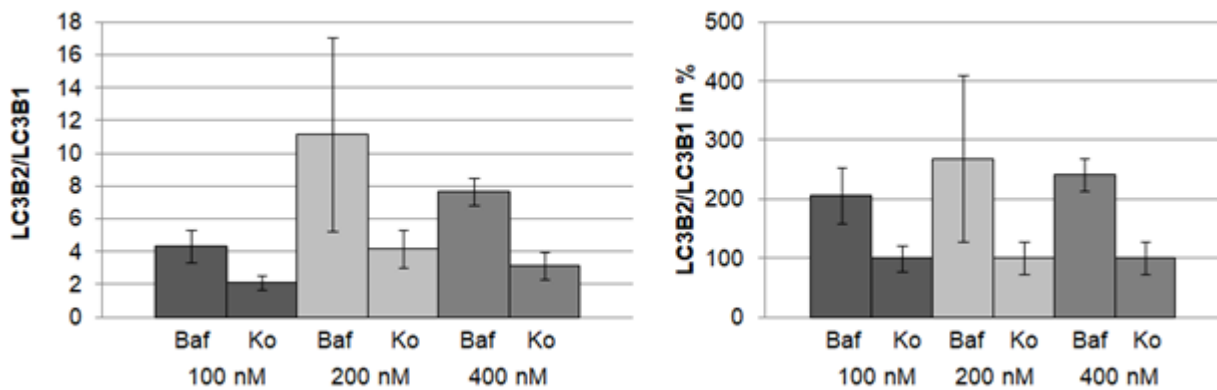


Abbildung 32. Bestimmung der zu verwendenden Bafilomycinkonzentration. N = 3. Links: absolute Werte des LC3B2/LC3B1-Konversionsindex als Mittelwerte mit Standardabweichungen (siehe Tabelle 20). Rechts: Relative Darstellung in Prozent mit Standardabweichung, jeweils die Kontrollen wurden gleich 100% gesetzt und die behandelten Proben dazu ins Verhältnis gesetzt.

Tabelle 21. Wirkung von Bafilomycin über die Zeit auf die LC3B2/LC3B1-Quotienten. Errechnete Mittelwerte mit Standardabweichungen und relativen Veränderungen.

Behandlungsdauer (100 nM Baf)	Kontrolle	100 nM Bafilomycin	Prozentualer Anstieg durch Bafilomycin
3 h	2,2 (2,05 – 2,35)	2,69 (2,43 – 2,95)	22 %
6 h	3,52 (2,86 – 4,18)	8,38 (3,35 – 13,41)	138 %
12 h	15,52 (8,95 – 22,09)	18,86 (14,63 – 23,09)	22 %
24 h	12,57 (5,97 – 19,17)	10,73 (7,06 – 14,4)	15 % Abfall

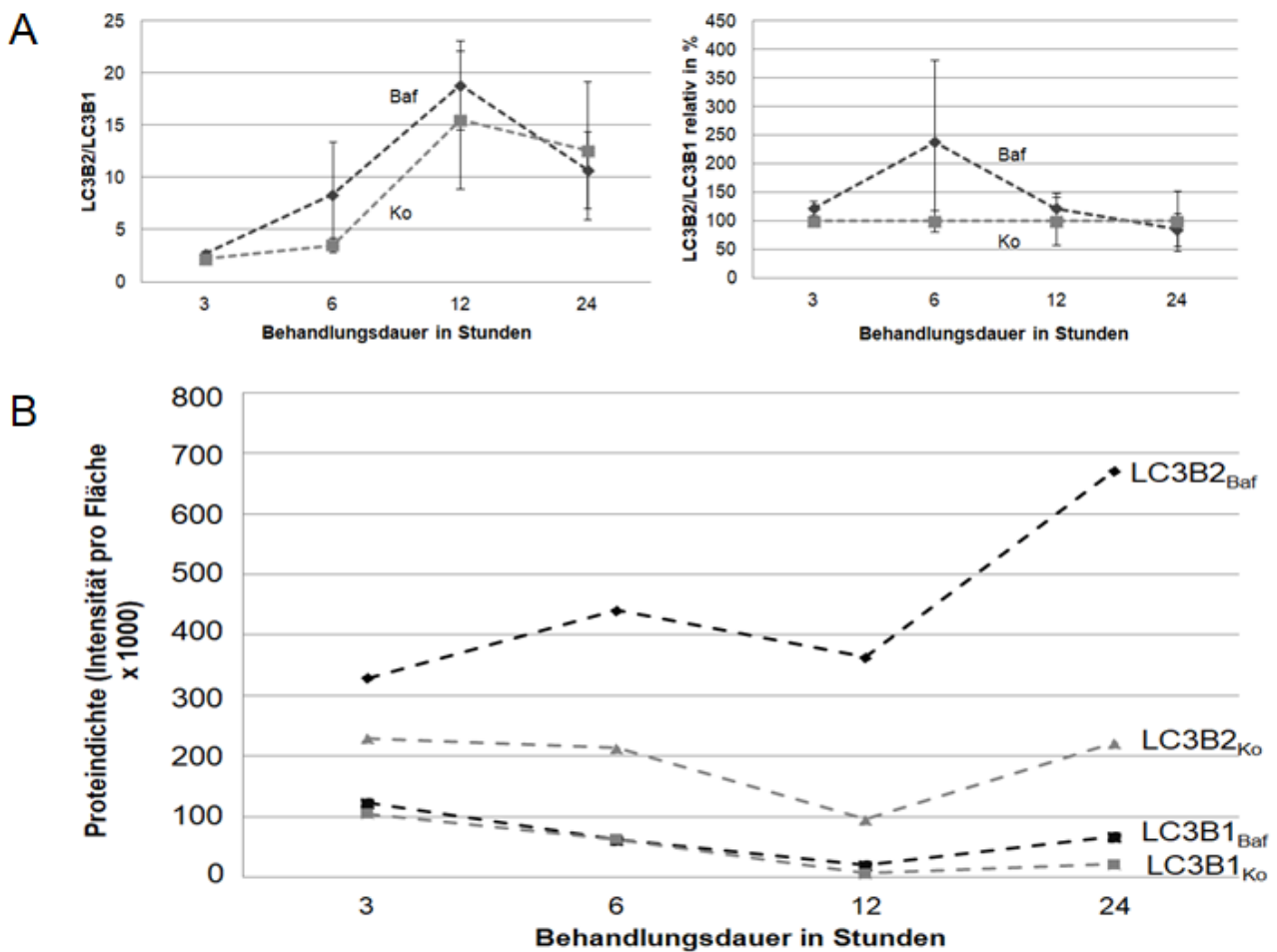


Abbildung 33. Einfluss der Behandlungsdauer mit 100 nM Bafilomycin B1 auf den LC3B2/LC3B1-Mittelwert mit Standardabweichung in hirnanatomischen Schnittkulturen aus der Maus. Jeweils drei Schnitte (P21) wurden mit 100 nM für 3, 6, 12 und 24 h behandelt und mit Kontrollen, deren Probenvolumina anhand ihres Actingehalts angepasst wurden, verglichen (n = 3). A: Darstellung der absoluten und relativen ermittelten LC3B2/LC3B1-Mittelwerte mit Standardabweichung. Man beachte die gestrichelte Linie als Zeichen dafür, dass die Auftragungsvolumina nicht über die Behandlungszeiten hinweg angepasst wurden und somit nicht direkt vergleichbar sind. B: Genaue Darstellung der LC3B2- und LC3B1-Konzentrationen (für die exakten Werte s. Tabelle 21-23). Auf die Standardabweichungen wurde zugunsten der Übersichtlichkeit verzichtet. Zu erkennen ist eine deutliche absolute Zunahme der LC3B1- und LC3B2-Konzentrationen nach Bafilomycinbehandlung bei gleichbleibendem LC3B2/LC3B1-Quotienten.

Tabelle 22. Wirkung von Bafilomycin über die Zeit auf die LC3B2-Gehalte der behandelten Schnitte, angegeben in Mittelwerten und Standardabweichungen (StAbw) der Proteingehaltswerte, die durch die Multiplikation der optischen Dichte der Western Blot Banden mit ihrer Fläche entstehen.

Behandlungsdauer	Dargestellter Wert	LC3B2		Änderung um den Faktor (gerundet)
		Kontrolle	Bafilomycin	
3 h	Mittelwert	229236	328842	1,4
	StAbw	14772	20123	
6 h	Mittelwert	214033	441128	2,1
	StAbw	24428	69957	
12h	Mittelwert	96137	363668	3,8

	StAbw	13656	40582	
24h	Mittelwert	222374	670926	3,0
	StAbw	71217	71217	

Tabelle 23. Wirkung von Bafilomycin über die Zeit auf die LC3B1-Gehalte der behandelten Schnitte, angegeben in Mittelwerten und Standardabweichungen (StAbw) der Proteingehaltswerte, die durch die Multiplikation der optischen Dichte der Western Blot Banden mit ihrer Fläche entstehen.

Behandlungsdauer	Dargestellter Wert	LC3B1		Änderung um den Faktor (gerundet)
		Kontrolle	Bafilomycin	
3 h	Mittelwert	104794	122505	1,2
	StAbw	13139	4899	
6 h	Mittelwert	62683	62320	0,99
	StAbw	16693	24422	
12h	Mittelwert	6852	19928	2,9
	StAbw	2356	4641	
24h	Mittelwert	21566	67523	3,1
	StAbw	11474	23728	

Tabelle 24. Wirkung von Bafilomycin über die Zeit auf die Actin-Gehalte der behandelten Schnitte, angegeben in Mittelwerten und Standardabweichungen (StAbw) der Proteingehaltswerte, die durch die Multiplikation der optischen Dichte der Western Blot Banden mit ihrer Fläche entstehen.

Behandlungsdauer	Dargestellter Wert	Actin		Änderung um den Faktor (gerundet)
		Kontrolle	Bafilomycin	
3 h	Mittelwert	470201	502662	1,1
	StAbw	53157	33083	
6 h	Mittelwert	363491	375987	1,03
	StAbw	49966	28766	
12h	Mittelwert	362472	358074	0,99
	StAbw	33547	28123	
24h	Mittelwert	332900	339182	1.02
	StAbw	26518	59266	

7.6 LC3B2/LC3B1-Quotient zu Kapitel 5.5

Tabelle 25. Wirkung von 3-MA über die Zeit auf die LC3B2/LC3B1-Quotienten. Dargestellt sind aufgrund einzelner Ausreißer bei niedriger Fallzahl die Medianwerte und relativen Veränderungen (Behandlung vs. Kontrolle).

Behandlungsdauer	Kontrolle	3 mM 3-MA	Prozentualer Anteil des Kontrollwertes nach 3-MA
1 h	9,06	7,98	88%
2 h	5,63	4,61	82%
6 h	15,93	6,46	41%

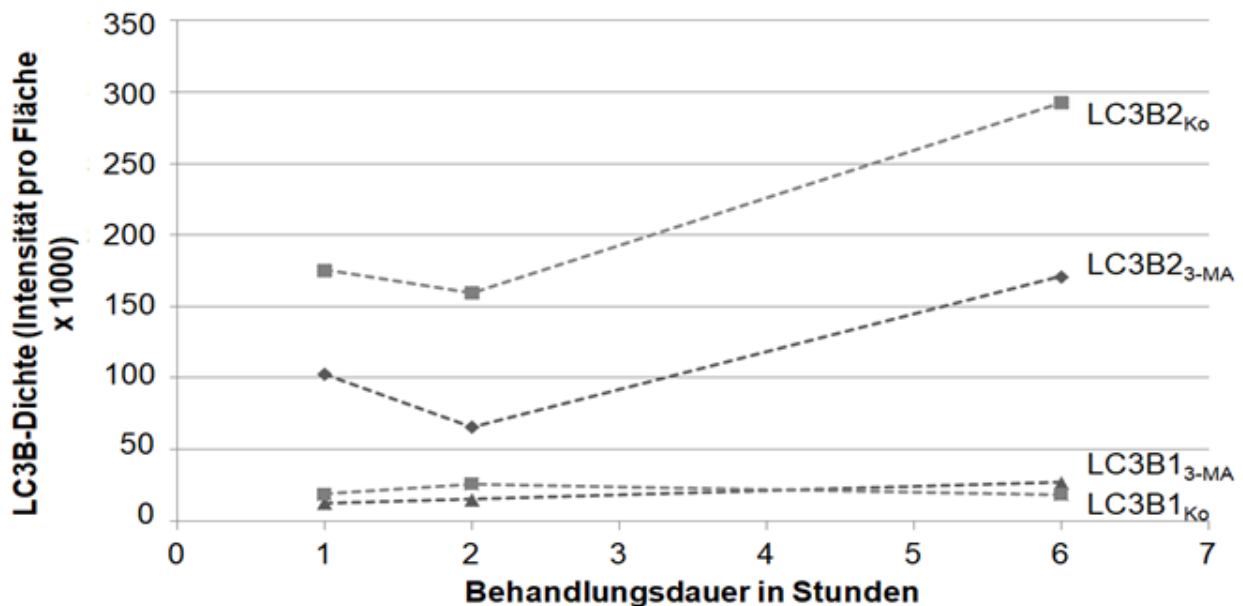


Abbildung 34. Darstellung der optischen Dichten der aus den Western Blot Banden ermittelten LC3B2- und LC3B1-Gehalte in cerebellären hirnanatomischen Schnittkulturen nach Behandlung mit 3 mM 3-Methyladenin für 1, 2 und 6 h sowie Kontrollen. N = 3. Man beachte, dass die Auftragungsvolumina nicht über die Behandlungszeiten hinweg angepasst wurden, die absoluten Werte somit nicht direkt vergleichbar sind. Deshalb wurden gestrichelte Linien zur Verbindung gewählt. Verglichen werden sollten lediglich die relative Wirkung der 3-MA-Behandlung im Vergleich zu den Kontrollwerten über die Zeit. Zugunsten der Übersichtlichkeit wurde auf die Darstellung der Standardabweichungen verzichtet. Es findet sich das gleiche Phänomen wie in Abb. 33 bzw. den Tabellen 22 bis 24: eine deutliche Abnahme der Konzentrationen von LC3B2 und LC3B1 bei gleichbleibendem Quotienten.

7.7 Ergänzend zu Kapitel 5.6.1 bestimmte Parameter

Tabelle 26. Partikuläre Gesamtfläche des LC3B-immunopositiven Signals pro Zelle bei PZ und PVI in Image J Pixeln nach Behandlung mit 100 nM Bafilomycin, angegeben in gerundeten Mittelwerten (mit 95%-Konfidenzintervall).

N = 168	0 h Bafilomycin	3 h Bafilomycin	6 h Bafilomycin	12 h Bafilomycin
PVI	16,9 (10,3 – 23,5)	30,2 (15,8 – 44,5)	34,8 (19,9 – 49,7)	2,2 (1,6 – 2,8)
PZ	293,6 (173,4 – 413,7)	502 (359,2 – 644,8)	516,1 (397,4 – 634,8)	25,6 (22,1 – 29)
Unterschied um den Faktor	17,4	16,6	14,8	11,6

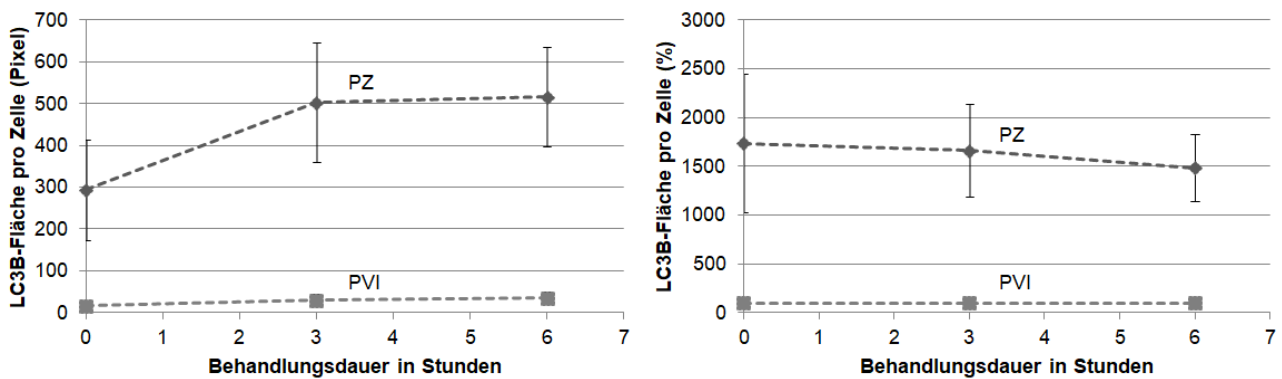


Abbildung 35. Zelltypabhängiger zeitlicher Verlauf der LC3B-immunopositiven Fläche pro Zelle in absoluten (links) und relativen (rechts) Werten bei PZ vs. PVI nach Behandlung mit 100 nM Bafilomycin. Bei den relativen Werten wurden die PVI-Werte jeweils gleich 100% und die PZ hierzu in Beziehung gesetzt. Die Werte sind dargestellt als Mittelwerte mit einem Konfidenzintervall von 95%. Die LC3B-immunopositiven Flächen sind nicht mit Autophagosomen gleichzusetzen, werden aber als Maß für diese verwendet. Zu erkennen ist ein deutlicher Unterschied jenseits der Konfidenzintervalle zugunsten der PZ.

Tabelle 27. Partikuläre Gesamtfläche des LC3B-immunopositiven Signals pro Zelle pro Zellfläche bei PZ und PVI nach Behandlung mit 100 nM Bafilomycin, angegeben in gerundeten Mittelwerten $\times 10^{-2}$ (mit 95%-Konfidenzintervall).

N = 168	0 h Bafilomycin	3 h Bafilomycin	6 h Bafilomycin	12 h Bafilomycin
PVI	0,64 (0,41 – 0,88)	1,00 (0,58 – 1,41)	1,02 (0,66 – 1,38)	0,07 (0,05 – 0,10)
PZ	2,67 (1,65 – 3,70)	4,82 (3,50 – 6,17)	4,84 (3,74 – 5,95)	0,21 (0,18 – 0,23)
Unterschied	4,17	4,82	4,75	3

um den Faktor				
---------------	--	--	--	--

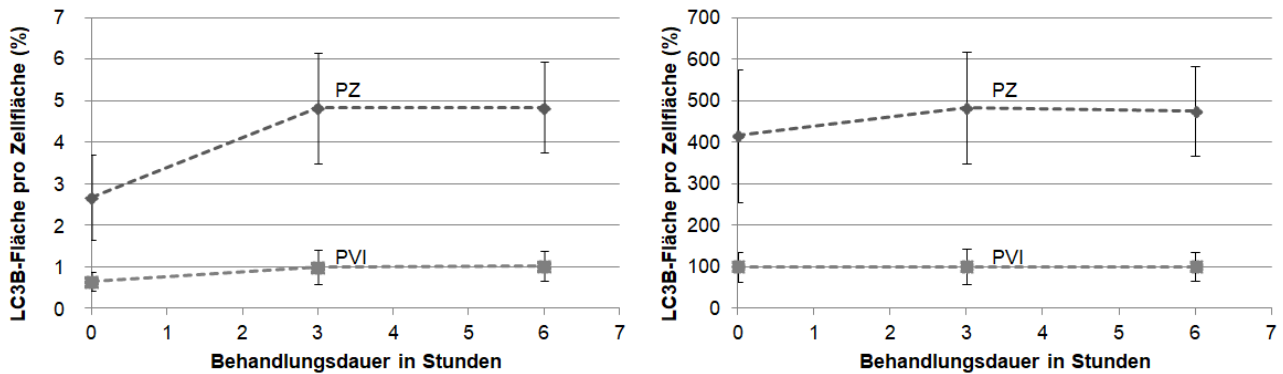


Abbildung 36. Zelltypabhängiger zeitlicher Verlauf der LC3B-immunopositiven Fläche pro Zelle im Verhältnis zur Zellfläche in absoluten (links) und relativen Werten (rechts) bei PZ vs. PVI nach Behandlung mit 100 nM Bafilomycin. Bei den relativen Werten wurden die PVI-Werte jeweils gleich 100% und die PZ hierzu in Beziehung gesetzt. Die Werte sind dargestellt als Mittelwerte mit einem Konfidenzintervall von 95%. Die LC3B-immunopositiven Flächen bzw. Partikel sind nicht mit Autophagosomen gleichzusetzen, werden aber als Maß für diese verwendet. Zu erkennen ist ein deutlicher Unterschied jenseits der Konfidenzintervalle zugunsten der PZ zu jedem Behandlungszeitpunkt.

Tabelle 28. Durchschnittliche Partikelfläche pro Zelle (in Pixel) bei PZ und PVI nach Behandlung mit 100 nM Bafilomycin, angegeben in gerundeten Mittelwerten (mit 95%-Konfidenzintervall).

N = 168	0 h Bafilomycin	3 h Bafilomycin	6 h Bafilomycin	12 h Bafilomycin
PVI	1,16 (0,93 – 1,39)	1,43 (1,20 – 1,66)	1,31 (1,12 – 1,49)	1,13 (0,01 – 1,35)
PZ	2,95 (2,36 – 3,54)	4,15 (3,25 – 5,06)	3,83 (3,27 – 4,39)	1,94 (1,86 – 2,03)
Unterschied um den Faktor	2,54	2,90	2,92	1,72

Tabelle 29. Durchschnittliche Partikelfläche pro Zelle im Verhältnis zur Zellfläche bei PZ und PVI nach Behandlung mit 100 nM Bafilomycin, angegeben in gerundeten Mittelwerten $\times 10^{-4}$ (mit 95%-Konfidenzintervall).

N = 168	0 h Bafilomycin	3 h Bafilomycin	6 h Bafilomycin	12 h Bafilomycin
PVI	4,54 (3,57 – 5,50)	5,27 (4,37 – 6,16)	4,32 (3,7 – 4,94)	3,96 (2,96 – 4,97)
PZ	2,78	3,94	3,59	1,58

	(2,26 – 3,30)	(3,05 – 4,83)	(3,01 – 4,17)	(1,51 – 1,66)
Unterschied um den Faktor	0,61	0,75	0,83	0,40

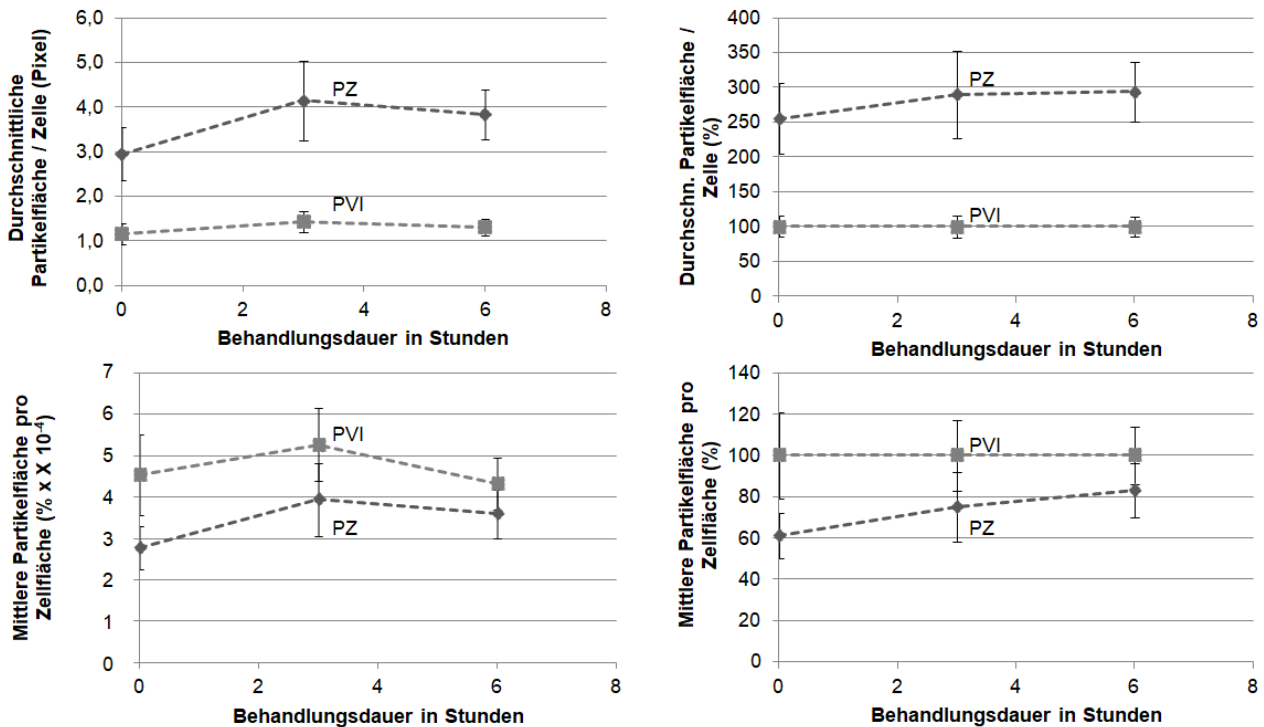


Abbildung 37. Zelltypabhängiger zeitlicher Verlauf der durchschnittlichen Fläche der LC3B-immunopositiven Partikel pro Zelle (oben) sowie zusätzlich im Verhältnis zur Zellfläche (unten) in absoluten (links) und relativen (rechts) Werten nach Behandlung mit 100 nM Bafilomycin bei PZ vs. PVI. Bei den relativen Werten wurden die PVI-Werte jeweils gleich 100% und die PZ hierzu in Beziehung gesetzt. Die Werte sind dargestellt als Mittelwerte mit einem Konfidenzintervall von 95%. Die LC3B-immunopositiven Flächen bzw. Partikel sind nicht mit Autophagosomen gleichzusetzen, werden aber als Maß für diese verwendet. Während die durchschnittliche Partikelfläche/Zelle einen Unterschied jenseits der Konfidenzintervalle zugunsten der PZ zu erkennen ist, dreht sich dieses Verhältnis nach Korrektur für die Zellfläche um und variiert bei drei- und sechsständiger Behandlung nur noch innerhalb der Konfidenzintervalle.

8 Literaturverzeichnis

1. Winkler PA. Neuroanatomie des intrakraniellen Raums. In: Moskopp W, editor. Neurochirurgie: Handbuch für die Weiterbildung und interdisziplinäres Nachschlagewerk. Stuttgart: Schattauer GmbH; 2015.
2. Cobb M. The Idea of the Brain: A History. London: Profile Books Ltd.; 2020.
3. Kandel ER. In Search of Memory: The Emergence of a New Science of Mind. New York, USA: W. W. Norton & Company; 2007.
4. Kandel ER. Reductionism in Art and Brain Science: Bridging the Two Cultures. New York: Columbia University Press; 2016.
5. Humpel C. Organotypic brain slice cultures: A review. *Neuroscience*. 2015;305:86-98.
6. Wolf MK. Anatomy of cultured mouse cerebellum. II. Organotypic migration of granule cells demonstrated by silver impregnation of normal and mutant cultures. *J Comp Neurol*. 1970;140(3):281-98.
7. Gahwiler BH. Organotypic monolayer cultures of nervous tissue. *J Neurosci Methods*. 1981;4(4):329-42.
8. Stoppini L, Buchs PA, Muller D. A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *J Neurosci Methods*. 1991;37(2):173-82.
9. Marschalek N, Albert F, Meske V, Ohm TG. The natural history of cerebellar degeneration of Niemann-Pick C mice monitored in vitro. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2014;40(7):933-45.
10. Dusart I, Sotelo C. Lack of Purkinje cell loss in adult rat cerebellum following protracted axotomy: degenerative changes and regenerative attempts of the severed axons. *J Comp Neurol*. 1994;347(2):211-32.
11. Falsig J, Aguzzi A. The prion organotypic slice culture assay--POSCA. *Nat Protoc*. 2008;3(4):555-62.
12. Takacs J, Metzger F. Morphological study of organotypic cerebellar cultures. *Acta Biol Hung*. 2002;53(1-2):187-204.
13. Reil JC. Fragmente über die Bildung des kleinen Gehirns im Menschen. *Arch Physiol*. 1807-1808;8:1-58.
14. Voogd J, Koehler PJ. Historic notes on anatomic, physiologic, and clinical research on the cerebellum. *Handb Clin Neurol*. 2018;154:3-26.
15. Sotelo C. Molecular layer interneurons of the cerebellum: developmental and morphological aspects. *Cerebellum*. 2015;14(5):534-56.
16. Ashida R, Cerminara NL, Brooks J, Apps R. Principles of organization of the human cerebellum: macro- and microanatomy. *Handb Clin Neurol*. 2018;154:45-58.
17. Clark DA, Mitra PP, Wang SS. Scalable architecture in mammalian brains. *Nature*. 2001;411(6834):189-93.
18. Herculano-Houzel S, Collins CE, Wong P, Kaas JH. Cellular scaling rules for primate brains. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(9):3562-7.
19. Herculano-Houzel S, Mota B, Lent R. Cellular scaling rules for rodent brains. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(32):12138-43.
20. Rhoton AL, Jr. Cerebellum and fourth ventricle. *Neurosurgery*. 2000;47(3 Suppl):S7-27.
21. Jan Voogd TJHR. Cerebellum and Precerebellar Nuclei. In: Mai P, editor. The Human Nervous System. London: Elsevier Inc.; 2012.
22. Larsell O. The morphogenesis and adult pattern of the lobules and fissures of the cerebellum of the white rat. *J Comp Neurol*. 1952;97(2):281-356.
23. Bolk L. Das Cerebellum der Säugetiere. Haarlem: Fischer; 1906.
24. Schünke M. SE, Schumacher U. et al. 1.7 Übersicht über das Gehirn: Truncus encephali und Cerebellum. In: Schünke M SE, Schumacher U et al., editor. Prometheus LernAtlas - Kopf, Hals und Neuroanatomie. Stuttgart: Thieme; 2018.
25. Golgi C. Untersuchungen über den feineren Bau des centralen und peripherischen Nervensystems. Jena: Fischer Verlag; 1894.
26. Rodolfo Llinas CS. The cerebellum revisited. New York: Springer; 1992.
27. Glickstein M, Strata P, Voogd J. Cerebellum: history. *Neuroscience*. 2009;162(3):549-59.
28. Ramon Y Cajal S. The Croonian Lecture: La Fine Structure des Centres Nerveux. Proceedings of the Royal Society of London. 1894;55:444-68.

29. Schwann T. Mikroskopische Untersuchungen über die Übereinstimmung in der Struktur und dem Wachstume der Tiere und Pflanzen. Berlin: Sander; 1839.
30. Ito M, Yoshida M. The origin of cerebral-induced inhibition of Deiters neurones. I. Monosynaptic initiation of the inhibitory postsynaptic potentials. *Exp Brain Res.* 1966;2(4):330-49.
31. Eccles JC IM, Szentagothai J. The cerebellum as a neuronal machine. Berlin - Heidelberg: Springer; 1967.
32. Hibi M, Shimizu T. Development of the cerebellum and cerebellar neural circuits. *Dev Neurobiol.* 2012;72(3):282-301.
33. Hoshino M, Nakamura S, Mori K, Kawauchi T, Terao M, Nishimura YV, Fukuda A, Fuse T, Matsuo N, Sone M, Watanabe M, Bito H, Terashima T, Wright CV, Kawaguchi Y, Nakao K, Nabeshima Y. Ptf1a, a bHLH transcriptional gene, defines GABAergic neuronal fates in cerebellum. *Neuron.* 2005;47(2):201-13.
34. Maricich SM, Herrup K. Pax-2 expression defines a subset of GABAergic interneurons and their precursors in the developing murine cerebellum. *J Neurobiol.* 1999;41(2):281-94.
35. Zhang L, Goldman JE. Developmental fates and migratory pathways of dividing progenitors in the postnatal rat cerebellum. *J Comp Neurol.* 1996;370(4):536-50.
36. Marzban H, Del Bigio MR, Alizadeh J, Ghavami S, Zachariah RM, Rastegar M. Cellular commitment in the developing cerebellum. *Front Cell Neurosci.* 2014;8:450.
37. Hashimoto M, Mikoshiba K. Mediolateral compartmentalization of the cerebellum is determined on the "birth date" of Purkinje cells. *J Neurosci.* 2003;23(36):11342-51.
38. Rudolf Nieuwenhuys LP. Towards a New Neuromorphology. Heidelberg: Springer; 2016.
39. Kugler P. Kleinhirn. In: Benninghoff D, editor. *Anatomie: Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie.* München: Urban & Fischer 2004.
40. Ahn AH, Dziennis S, Hawkes R, Herrup K. The cloning of zebrin II reveals its identity with aldolase C. *Development.* 1994;120(8):2081-90.
41. Brochu G, Maler L, Hawkes R. Zebrin II: a polypeptide antigen expressed selectively by Purkinje cells reveals compartments in rat and fish cerebellum. *J Comp Neurol.* 1990;291(4):538-52.
42. Hawkes R, Herrup K. Aldolase C/zebrin II and the regionalization of the cerebellum. *J Mol Neurosci.* 1995;6(3):147-58.
43. Apps R, Hawkes R. Cerebellar cortical organization: a one-map hypothesis. *Nat Rev Neurosci.* 2009;10(9):670-81.
44. Cerminara NL, Lang EJ, Sillitoe RV, Apps R. Redefining the cerebellar cortex as an assembly of non-uniform Purkinje cell microcircuits. *Nat Rev Neurosci.* 2015;16(2):79-93.
45. Ito M. Cerebellar control of the vestibular neurones: physiology and pharmacology. *Prog Brain Res.* 1972;37:377-90.
46. Ito M. Neural design of the cerebellar motor control system. *Brain Res.* 1972;40(1):81-4.
47. Ito M. The cerebellum and neural control. New York: Raven Press; 1984.
48. Coesmans M, Weber JT, De Zeeuw CI, Hansel C. Bidirectional parallel fiber plasticity in the cerebellum under climbing fiber control. *Neuron.* 2004;44(4):691-700.
49. D'Angelo E, Rossi P, Armano S, Taglietti V. Evidence for NMDA and mGlu receptor-dependent long-term potentiation of mossy fiber-granule cell transmission in rat cerebellum. *J Neurophysiol.* 1999;81(1):277-87.
50. Jorntell H, Hansel C. Synaptic memories upside down: bidirectional plasticity at cerebellar parallel fiber-Purkinje cell synapses. *Neuron.* 2006;52(2):227-38.
51. Javier DeFelipe EGJ. *Cajal on the Cerebral Cortex: An annotated translation of the complete writings.* New York: Oxford University Press; 1988.
52. Tremblay R, Lee S, Rudy B. GABAergic Interneurons in the Neocortex: From Cellular Properties to Circuits. *Neuron.* 2016;91(2):260-92.
53. Benes FM, McSparren J, Bird ED, SanGiovanni JP, Vincent SL. Deficits in small interneurons in prefrontal and cingulate cortices of schizophrenic and schizoaffective patients. *Arch Gen Psychiatry.* 1991;48(11):996-1001.
54. Canetta S, Bolkan S, Padilla-Coreano N, Song LJ, Sahn R, Harrison NL, Gordon JA, Brown A, Kellendonk C. Maternal immune activation leads to selective functional deficits in offspring parvalbumin interneurons. *Mol Psychiatry.* 2016;21(7):956-68.
55. Gogolla N, Leblanc JJ, Quast KB, Sudhof TC, Fagiolini M, Hensch TK. Common circuit defect of excitatory-inhibitory balance in mouse models of autism. *J Neurodev Disord.* 2009;1(2):172-81.

56. Nakazawa K, Zsiros V, Jiang Z, Nakao K, Kolata S, Zhang S, Belforte JE. GABAergic interneuron origin of schizophrenia pathophysiology. *Neuropharmacology*. 2012;62(3):1574-83.
57. Mugnaini E, Floris A. The unipolar brush cell: a neglected neuron of the mammalian cerebellar cortex. *J Comp Neurol*. 1994;339(2):174-80.
58. Bastianelli E. Distribution of calcium-binding proteins in the cerebellum. *Cerebellum*. 2003;2(4):242-62.
59. Caillard O, Moreno H, Schwaller B, Llano I, Celio MR, Marty A. Role of the calcium-binding protein parvalbumin in short-term synaptic plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(24):13372-7.
60. Celio MR, Heizmann CW. Calcium-binding protein parvalbumin as a neuronal marker. *Nature*. 1981;293(5830):300-2.
61. Catsman-Berrevoets C, Patay Z. Cerebellar mutism syndrome. *Handb Clin Neurol*. 2018;155:273-88.
62. Schmahmann JD. Disorders of the cerebellum: ataxia, dysmetria of thought, and the cerebellar cognitive affective syndrome. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*. 2004;16(3):367-78.
63. Stephen G, Lisberger WTT. The Cerebellum. In: Eric R. Kandel JHS, Thomas M. Jessell, Steven A. Siegelbaum, A.J. Hudspeth, editor. *Principles of Neural Science*. New York: The McGraw-Hill Companies; 2013. p. 960 - 81.
64. Weier K, Banwell B, Cerasa A, Collins DL, Dogonowski AM, Lassmann H, Quattrone A, Sahraian MA, Siebner HR, Sprenger T. The role of the cerebellum in multiple sclerosis. *Cerebellum*. 2015;14(3):364-74.
65. Koeppen AH. The neuropathology of the adult cerebellum. *Handb Clin Neurol*. 2018;154:129-49.
66. Kemp KC, Cook AJ, Redondo J, Kurian KM, Scolding NJ, Wilkins A. Purkinje cell injury, structural plasticity and fusion in patients with Friedreich's ataxia. *Acta Neuropathol Commun*. 2016;4(1):53.
67. de Duve C. Lysosomes revisited. *Eur J Biochem*. 1983;137(3):391-7.
68. E. Karanasios NK. *Autophagy at the Cell, Tissue and Organismal Level*: Springer Nature; 2016.
69. Ohsumi Y. Historical landmarks of autophagy research. *Cell Res*. 2014;24(1):9-23.
70. Nam T, Han JH, Devkota S, Lee HW. Emerging Paradigm of Crosstalk between Autophagy and the Ubiquitin-Proteasome System. *Mol Cells*. 2017;40(12):897-905.
71. Denton D, Xu T, Kumar S. Autophagy as a pro-death pathway. *Immunol Cell Biol*. 2015;93(1):35-42.
72. Burman C, Ktistakis NT. Autophagosome formation in mammalian cells. *Semin Immunopathol*. 2010;32(4):397-413.
73. Ravanan P, Srikumar IF, Talwar P. Autophagy: The spotlight for cellular stress responses. *Life Sci*. 2017;188:53-67.
74. Mizushima N, Komatsu M. Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell*. 2011;147(4):728-41.
75. Jung CH, Jun CB, Ro SH, Kim YM, Otto NM, Cao J, Kundu M, Kim DH. ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery. *Mol Biol Cell*. 2009;20(7):1992-2003.
76. Funderburk SF, Wang QJ, Yue Z. The Beclin 1-VPS34 complex--at the crossroads of autophagy and beyond. *Trends Cell Biol*. 2010;20(6):355-62.
77. Backer JM. The regulation and function of Class III PI3Ks: novel roles for Vps34. *Biochem J*. 2008;410(1):1-17.
78. Kabeya Y, Mizushima N, Yamamoto A, Oshitani-Okamoto S, Ohsumi Y, Yoshimori T. LC3, GABARAP and GATE16 localize to autophagosomal membrane depending on form-II formation. *J Cell Sci*. 2004;117(Pt 13):2805-12.
79. Weidberg H, Shvets E, Shpilka T, Shimron F, Shinder V, Elazar Z. LC3 and GATE-16/GABARAP subfamilies are both essential yet act differently in autophagosome biogenesis. *EMBO J*. 2010;29(11):1792-802.
80. Deng Z, Purtell K, Lachance V, Wold MS, Chen S, Yue Z. Autophagy Receptors and Neurodegenerative Diseases. *Trends Cell Biol*. 2017;27(7):491-504.
81. Axe EL, Walker SA, Manifava M, Chandra P, Roderick HL, Habermann A, Griffiths G, Ktistakis NT. Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol*. 2008;182(4):685-701.

82. Hailey DW, Rambold AS, Satpute-Krishnan P, Mitra K, Sougrat R, Kim PK, Lippincott-Schwartz J. Mitochondria supply membranes for autophagosome biogenesis during starvation. *Cell*. 2010;141(4):656-67.
83. Zhao YG, Zhang H. Autophagosome maturation: An epic journey from the ER to lysosomes. *J Cell Biol*. 2019;218(3):757-70.
84. Jahreiss L, Menzies FM, Rubinsztein DC. The itinerary of autophagosomes: from peripheral formation to kiss-and-run fusion with lysosomes. *Traffic*. 2008;9(4):574-87.
85. Pu J, Guardia CM, Keren-Kaplan T, Bonifacino JS. Mechanisms and functions of lysosome positioning. *J Cell Sci*. 2016;129(23):4329-39.
86. Nakamura S, Yoshimori T. New insights into autophagosome-lysosome fusion. *J Cell Sci*. 2017;130(7):1209-16.
87. Jahn R, Scheller RH. SNAREs--engines for membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006;7(9):631-43.
88. Dunn WA, Jr. Studies on the mechanisms of autophagy: maturation of the autophagic vacuole. *J Cell Biol*. 1990;110(6):1935-45.
89. Eleftherios Karanasios NTK. Signalling in Autophagy. In: Eleftherios Karanasios NTK, editor. *Autophagy at the Cell, Tissue and Organismal Level*. Switzerland: Springer 2016. p. 22 - 33.
90. Kim YC, Guan KL. mTOR: a pharmacologic target for autophagy regulation. *J Clin Invest*. 2015;125(1):25-32.
91. Hara K, Yonezawa K, Weng QP, Kozlowski MT, Belham C, Avruch J. Amino acid sufficiency and mTOR regulate p70 S6 kinase and eIF-4E BP1 through a common effector mechanism. *J Biol Chem*. 1998;273(23):14484-94.
92. Wolfson RL, Chantranupong L, Saxton RA, Shen K, Scaria SM, Cantor JR, Sabatini DM. Sestrin2 is a leucine sensor for the mTORC1 pathway. *Science*. 2016;351(6268):43-8.
93. Dibble CC, Cantley LC. Regulation of mTORC1 by PI3K signaling. *Trends Cell Biol*. 2015;25(9):545-55.
94. Kim J, Kundu M, Viollet B, Guan KL. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol*. 2011;13(2):132-41.
95. Stavoe AKH, Holzbaur ELF. Autophagy in Neurons. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2019;35:477-500.
96. Hara T, Nakamura K, Matsui M, Yamamoto A, Nakahara Y, Suzuki-Migishima R, Yokoyama M, Mishima K, Saito I, Okano H, Mizushima N. Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature*. 2006;441(7095):885-9.
97. Komatsu M, Waguri S, Chiba T, Murata S, Iwata J, Tanida I, Ueno T, Koike M, Uchiyama Y, Kominami E, Tanaka K. Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature*. 2006;441(7095):880-4.
98. Maday S, Holzbaur EL. Compartment-Specific Regulation of Autophagy in Primary Neurons. *J Neurosci*. 2016;36(22):5933-45.
99. Maday S, Holzbaur EL. Autophagosome biogenesis in primary neurons follows an ordered and spatially regulated pathway. *Dev Cell*. 2014;30(1):71-85.
100. Maday S, Wallace KE, Holzbaur EL. Autophagosomes initiate distally and mature during transport toward the cell soma in primary neurons. *J Cell Biol*. 2012;196(4):407-17.
101. Ka M, Smith AL, Kim WY. MTOR controls genesis and autophagy of GABAergic interneurons during brain development. *Autophagy*. 2017;13(8):1348-63.
102. Ban BK, Jun MH, Ryu HH, Jang DJ, Ahmad ST, Lee JA. Autophagy negatively regulates early axon growth in cortical neurons. *Mol Cell Biol*. 2013;33(19):3907-19.
103. Boland B, Kumar A, Lee S, Platt FM, Wegiel J, Yu WH, Nixon RA. Autophagy induction and autophagosome clearance in neurons: relationship to autophagic pathology in Alzheimer's disease. *J Neurosci*. 2008;28(27):6926-37.
104. Rodriguez-Muela N, Koga H, Garcia-Ledo L, de la Villa P, de la Rosa EJ, Cuervo AM, Boya P. Balance between autophagic pathways preserves retinal homeostasis. *Aging Cell*. 2013;12(3):478-88.
105. Yamamoto A, Tagawa Y, Yoshimori T, Moriyama Y, Masaki R, Tashiro Y. Bafilomycin A1 prevents maturation of autophagic vacuoles by inhibiting fusion between autophagosomes and lysosomes in rat hepatoma cell line, H-4-II-E cells. *Cell Struct Funct*. 1998;23(1):33-42.

106. Yoshimori T, Yamamoto A, Moriyama Y, Futai M, Tashiro Y. Bafilomycin A1, a specific inhibitor of vacuolar-type H(+)-ATPase, inhibits acidification and protein degradation in lysosomes of cultured cells. *J Biol Chem.* 1991;266(26):17707-12.
107. Klionsky DJ, Elazar Z, Seglen PO, Rubinsztein DC. Does bafilomycin A1 block the fusion of autophagosomes with lysosomes? *Autophagy.* 2008;4(7):849-50.
108. Mauvezin C, Nagy P, Juhasz G, Neufeld TP. Autophagosome-lysosome fusion is independent of V-ATPase-mediated acidification. *Nat Commun.* 2015;6:7007.
109. Klionsky DJ, Abdelmohsen K, Abe A, Abedin MJ, Abeliovich H, Acevedo Arozena A, Adachi H, Adams CM, Adams PD, Adeli K, Adhietty PJ, Adler SG, Agam G, Agarwal R, Aghi MK, Agnello M, Agostinis P, Aguilar PV, Aguirre-Ghiso J, Airoidi EM, Ait-Si-Ali S, Akematsu T, Akporiaye ET, Al-Rubeai M, Albaiceta GM, Albanese C, Albani D, Albert ML, Aldudo J, Algul H, Alirezai M, Alloza I, Almasan A, Almonte-Beceril M, Alnemri ES, Alonso C, Altan-Bonnet N, Altieri DC, Alvarez S, Alvarez-Erviti L, Alves S, Amadoro G, Amano A, Amantini C, Ambrosio S, Amelio I, Amer AO, Amessou M, Amon A, An Z, Anania FA, Andersen SU, Andley UP, Andreadi CK, Andrieu-Abadie N, Anel A, Ann DK, Anoopkumar-Dukie S, Antonioli M, Aoki H, Apostolova N, Aquila S, Aquilano K, Araki K, Arama E, Aranda A, Araya J, Arcaro A, Arias E, Arimoto H, Ariosa AR, Armstrong JL, Arnould T, Arsov I, Asanuma K, Askanas V, Asselin E, Atarashi R, Atherton SS, Atkin JD, Attardi LD, Auburger P, Auburger G, Aurelian L, Autelli R, Avagliano L, Avantiaggiati ML, Avrahami L, Awale S, Azad N, Bachetti T, Backer JM, Bae DH, Bae JS, Bae ON, Bae SH, Baehrecke EH, Baek SH, Baghdiguian S, Bagniewska-Zadworna A, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy.* 2016;12(1):1-222.
110. Corti O, Blomgren K, Poletti A, Beart PM. Autophagy in neurodegeneration: New insights underpinning therapy for neurological diseases. *J Neurochem.* 2020;154(4):354-71.
111. Apel A, Herr I, Schwarz H, Rodemann HP, Mayer A. Blocked autophagy sensitizes resistant carcinoma cells to radiation therapy. *Cancer Res.* 2008;68(5):1485-94.
112. Chaachouay H, Ohneseit P, Toulany M, Kehlbach R, Multhoff G, Rodemann HP. Autophagy contributes to resistance of tumor cells to ionizing radiation. *Radiother Oncol.* 2011;99(3):287-92.
113. Mauthe M, Orhon I, Rocchi C, Zhou X, Luhr M, Hijlkema KJ, Coppes RP, Engedal N, Mari M, Reggiori F. Chloroquine inhibits autophagic flux by decreasing autophagosome-lysosome fusion. *Autophagy.* 2018;14(8):1435-55.
114. Seglen PO, Gordon PB, Grinde B, Solheim A, Kovacs AL, Poli A. Inhibitors and pathways of hepatocytic protein degradation. *Acta Biol Med Ger.* 1981;40(10-11):1587-98.
115. Harder LM, Bunkenborg J, Andersen JS. Inducing autophagy: a comparative phosphoproteomic study of the cellular response to ammonia and rapamycin. *Autophagy.* 2014;10(2):339-55.
116. Nixon RA, Wegiel J, Kumar A, Yu WH, Peterhoff C, Cataldo A, Cuervo AM. Extensive involvement of autophagy in Alzheimer disease: an immuno-electron microscopy study. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2005;64(2):113-22.
117. Rudnicki DD, Pletnikova O, Vonsattel JP, Ross CA, Margolis RL. A comparison of huntington disease and huntington disease-like 2 neuropathology. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2008;67(4):366-74.
118. Lopez A, Lee SE, Wojta K, Ramos EM, Klein E, Chen J, Boxer AL, Gorno-Tempini ML, Geschwind DH, Schlotawa L, Ogryzko NV, Bigio EH, Rogalski E, Weintraub S, Mesulam MM, Tauopathy Genetics C, Fleming A, Coppola G, Miller BL, Rubinsztein DC. A152T tau allele causes neurodegeneration that can be ameliorated in a zebrafish model by autophagy induction. *Brain.* 2017;140(4):1128-46.
119. Tsvetkov AS, Miller J, Arrasate M, Wong JS, Pleiss MA, Finkbeiner S. A small-molecule scaffold induces autophagy in primary neurons and protects against toxicity in a Huntington disease model. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(39):16982-7.
120. Ma Q, Qiang J, Gu P, Wang Y, Geng Y, Wang M. Age-related autophagy alterations in the brain of senescence accelerated mouse prone 8 (SAMP8) mice. *Exp Gerontol.* 2011;46(7):533-41.
121. Simonsen A, Cumming RC, Brech A, Isakson P, Schubert DR, Finley KD. Promoting basal levels of autophagy in the nervous system enhances longevity and oxidant resistance in adult *Drosophila*. *Autophagy.* 2008;4(2):176-84.
122. Lee JH, Yu WH, Kumar A, Lee S, Mohan PS, Peterhoff CM, Wolfe DM, Martinez-Vicente M, Massey AC, Sovak G, Uchiyama Y, Westaway D, Cuervo AM, Nixon RA. Lysosomal proteolysis

- and autophagy require presenilin 1 and are disrupted by Alzheimer-related PS1 mutations. *Cell*. 2010;141(7):1146-58.
123. Nixon RA, Yang DS. Autophagy failure in Alzheimer's disease--locating the primary defect. *Neurobiol Dis*. 2011;43(1):38-45.
 124. Hamano T, Gendron TF, Causevic E, Yen SH, Lin WL, Isidoro C, Deture M, Ko LW. Autophagic-lysosomal perturbation enhances tau aggregation in transfectants with induced wild-type tau expression. *Eur J Neurosci*. 2008;27(5):1119-30.
 125. Radad K, Moldzio R, Al-Shraim M, Kranner B, Krewenka C, Rausch WD. Recent advances in autophagy-based neuroprotection. *Expert Rev Neurother*. 2015;15(2):195-205.
 126. Rodriguez-Navarro JA, Rodriguez L, Casarejos MJ, Solano RM, Gomez A, Perucho J, Cuervo AM, Garcia de Yébenes J, Mena MA. Trehalose ameliorates dopaminergic and tau pathology in parkin deleted/tau overexpressing mice through autophagy activation. *Neurobiol Dis*. 2010;39(3):423-38.
 127. Lee JY, Nagano Y, Taylor JP, Lim KL, Yao TP. Disease-causing mutations in parkin impair mitochondrial ubiquitination, aggregation, and HDAC6-dependent mitophagy. *J Cell Biol*. 2010;189(4):671-9.
 128. Parganlija D, Klinkenberg M, Dominguez-Bautista J, Hetzel M, Gispert S, Chimi MA, Droese S, Mai S, Brandt U, Auburger G, Jendrach M. Loss of PINK1 impairs stress-induced autophagy and cell survival. *PLoS One*. 2014;9(4):e95288.
 129. Ravikumar B, Vacher C, Berger Z, Davies JE, Luo S, Oroz LG, Scaravilli F, Easton DF, Duden R, O'Kane CJ, Rubinsztein DC. Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease. *Nat Genet*. 2004;36(6):585-95.
 130. Zheng S, Clabough EB, Sarkar S, Futter M, Rubinsztein DC, Zeitlin SO. Deletion of the huntingtin polyglutamine stretch enhances neuronal autophagy and longevity in mice. *PLoS Genet*. 2010;6(2):e1000838.
 131. Decressac M, Mattsson B, Weikop P, Lundblad M, Jakobsson J, Bjorklund A. TFEB-mediated autophagy rescues midbrain dopamine neurons from alpha-synuclein toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(19):E1817-26.
 132. Tanji K, Odagiri S, Maruyama A, Mori F, Kakita A, Takahashi H, Wakabayashi K. Alteration of autophagosomal proteins in the brain of multiple system atrophy. *Neurobiol Dis*. 2013;49:190-8.
 133. Pla A, Pascual M, Guerri C. Autophagy Constitutes a Protective Mechanism against Ethanol Toxicity in Mouse Astrocytes and Neurons. *PLoS One*. 2016;11(4):e0153097.
 134. Hou K, Xu D, Li F, Chen S, Li Y. The progress of neuronal autophagy in cerebral ischemia stroke: Mechanisms, roles and research methods. *J Neurol Sci*. 2019;400:72-82.
 135. Ulasov IV, Lenz G, Lesniak MS. Autophagy in glioma cells: An identity crisis with a clinical perspective. *Cancer Lett*. 2018;428:139-46.
 136. Braak H, Braak E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol*. 1991;82(4):239-59.
 137. Braak H, Del Tredici K, Rub U, de Vos RA, Jansen Steur EN, Braak E. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging*. 2003;24(2):197-211.
 138. Braak H, Braak E. Ratio of pyramidal cells versus non-pyramidal cells in the human frontal isocortex and changes in ratio with ageing and Alzheimer's disease. *Prog Brain Res*. 1986;70:185-212.
 139. Ruiz R, Perez-Villegas EM, Bachiller S, Rosa JL, Armengol JA. HERC 1 Ubiquitin Ligase Mutation Affects Neocortical, CA3 Hippocampal and Spinal Cord Projection Neurons: An Ultrastructural Study. *Front Neuroanat*. 2016;10:42.
 140. Sato M, Ohta T, Morikawa Y, Konno A, Hirai H, Kurauchi Y, Hisatsune A, Katsuki H, Seki T. Ataxic phenotype and neurodegeneration are triggered by the impairment of chaperone-mediated autophagy in cerebellar neurons. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2021;47(2):198-209.
 141. He F, Nichols RM, Kailasam L, Wensel TG, Agosto MA. Critical Role for Phosphatidylinositol-3 Kinase Vps34/PIK3C3 in ON-Bipolar Cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2019;60(8):2861-74.
 142. Zanjani SH, Selimi F, Vogel MW, Haeberle AM, Boeuf J, Mariani J, Bailly YJ. Survival of interneurons and parallel fiber synapses in a cerebellar cortex deprived of Purkinje cells: studies in the double mutant mouse *Grid2Lc/+;Bax(-/-)*. *J Comp Neurol*. 2006;497(4):622-35.

143. Clement AB, Gamberdinger M, Tamboli IY, Lutjohann D, Walter J, Greeve I, Gimpl G, Behl C. Adaptation of neuronal cells to chronic oxidative stress is associated with altered cholesterol and sphingolipid homeostasis and lysosomal function. *J Neurochem.* 2009;111(3):669-82.
144. Rudnick ND, Griffey CJ, Guarnieri P, Gerbino V, Wang X, Piersaint JA, Tapia JC, Rich MM, Maniatis T. Distinct roles for motor neuron autophagy early and late in the SOD1(G93A) mouse model of ALS. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017;114(39):E8294-E303.
145. Chen L, Jiang Z, Ma H, Ning L, Chen H, Li L, Qi H. Volatile Oil of *Acori Graminei Rhizoma*-Induced Apoptosis and Autophagy are dependent on p53 Status in Human Glioma Cells. *Sci Rep.* 2016;6:21148.
146. Yin Y, Yi MH, Kim DW. Impaired Autophagy of GABAergic Interneurons in Neuropathic Pain. *Pain Res Manag.* 2018;2018:9185368.
147. Guo T, Nan Z, Miao C, Jin X, Yang W, Wang Z, Tu Y, Bao H, Lyu J, Zheng H, Deng Q, Guo P, Xi Y, Yang X, Ge W. The autophagy-related gene Atg101 in *Drosophila* regulates both neuron and midgut homeostasis. *J Biol Chem.* 2019;294(14):5666-76.
148. Komatsu M, Waguri S, Koike M, Sou YS, Ueno T, Hara T, Mizushima N, Iwata J, Ezaki J, Murata S, Hamazaki J, Nishito Y, Iemura S, Natsume T, Yanagawa T, Uwayama J, Warabi E, Yoshida H, Ishii T, Kobayashi A, Yamamoto M, Yue Z, Uchiyama Y, Kominami E, Tanaka K. Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice. *Cell.* 2007;131(6):1149-63.
149. Moruno-Manchon JF, Uzor NE, Ambati CR, Shetty V, Putluri N, Jagannath C, McCullough LD, Tsvetkov AS. Sphingosine kinase 1-associated autophagy differs between neurons and astrocytes. *Cell Death Dis.* 2018;9(5):521.
150. Capurro A, Bodea LG, Schaefer P, Luthi-Carter R, Perreau VM. Computational deconvolution of genome wide expression data from Parkinson's and Huntington's disease brain tissues using population-specific expression analysis. *Front Neurosci.* 2014;8:441.
151. de Git KC, Adan RA. Leptin resistance in diet-induced obesity: the role of hypothalamic inflammation. *Obes Rev.* 2015;16(3):207-24.
152. Kalita-de Croft P, Straube J, Lim M, Al-Ejeh F, Lakhani SR, Saunus JM. Proteomic Analysis of the Breast Cancer Brain Metastasis Microenvironment. *Int J Mol Sci.* 2019;20(10).
153. Kastriiti ME, Kameneva P, Kamenev D, Dyachuk V, Furlan A, Hampl M, Memic F, Marklund U, Lallemand F, Hadjab S, Calvo-Enrique L, Ernfors P, Fried K, Adameyko I. Schwann Cell Precursors Generate the Majority of Chromaffin Cells in Zuckerkandl Organ and Some Sympathetic Neurons in Paraganglia. *Front Mol Neurosci.* 2019;12:6.
154. Lieberman OJ, Frier MD, McGuirt AF, Griffey CJ, Rafikian E, Yang M, Yamamoto A, Borgkvist A, Santini E, Sulzer D. Cell-type-specific regulation of neuronal intrinsic excitability by macroautophagy. *Elife.* 2020;9.
155. Ojo JO, Reed JM, Crynen G, Vallabhaneni P, Evans J, Shackleton B, Eisenbaum M, Ringland C, Edsell A, Mullan M, Crawford F, Bachmeier C. APOE genotype dependent molecular abnormalities in the cerebrovasculature of Alzheimer's disease and age-matched non-demented brains. *Mol Brain.* 2021;14(1):110.
156. Rinschen MM, Godel M, Grahmmer F, Zschiedrich S, Helmstadter M, Kretz O, Zarei M, Braun DA, Dittrich S, Pahmeyer C, Schroder P, Teetzen C, Gee H, Daouk G, Pohl M, Kuhn E, Schermer B, Kuttner V, Boerries M, Busch H, Schiffer M, Bergmann C, Kruger M, Hildebrandt F, Dengjel J, Benzing T, Huber TB. A Multi-layered Quantitative In Vivo Expression Atlas of the Podocyte Unravels Kidney Disease Candidate Genes. *Cell Rep.* 2018;23(8):2495-508.
157. Son SM, Park SJ, Lee H, Siddiqi F, Lee JE, Menzies FM, Rubinsztein DC. Leucine Signals to mTORC1 via Its Metabolite Acetyl-Coenzyme A. *Cell Metab.* 2019;29(1):192-201 e7.
158. Tang BL. Vesicle transport through interaction with t-SNAREs 1a (Vti1a)'s roles in neurons. *Heliyon.* 2020;6(8):e04600.
159. Tsenkina Y, Ruzov A, Gliddon C, Horsburgh K, De Sousa PA. White matter tract and glial-associated changes in 5-hydroxymethylcytosine following chronic cerebral hypoperfusion. *Brain Res.* 2014;1592:82-100.
160. Zhang N, Diao Y, Hua R, Wang J, Han S, Li J, Yin Y. Nitric oxide-mediated pathways and its role in the degenerative diseases. *Front Biosci (Landmark Ed).* 2017;22:824-34.
161. Alves S, Cormier-Dequaire F, Marinello M, Marais T, Muriel MP, Beaumatin F, Charbonnier-Beaupel F, Tahiri K, Seilhean D, El Hachimi K, Ruberg M, Stevanin G, Barkats M, den Dunnen W,

- Priault M, Brice A, Durr A, Corvol JC, Sittler A. The autophagy/lysosome pathway is impaired in SCA7 patients and SCA7 knock-in mice. *Acta Neuropathol.* 2014;128(5):705-22.
162. Bains M, Zaegel V, Mize-Berge J, Heidenreich KA. IGF-I stimulates Rab7-RILP interaction during neuronal autophagy. *Neurosci Lett.* 2011;488(2):112-7.
163. Bak DH, Zhang E, Yi MH, Kim DK, Lim K, Kim JJ, Kim DW. High omega3-polyunsaturated fatty acids in fat-1 mice prevent streptozotocin-induced Purkinje cell degeneration through BDNF-mediated autophagy. *Sci Rep.* 2015;5:15465.
164. Heitz S, Grant NJ, Bailly Y. Doppel induces autophagic stress in prion protein-deficient Purkinje cells. *Autophagy.* 2009;5(3):422-4.
165. Vig PJ, Shao Q, Subramony SH, Lopez ME, Safaya E. Bergmann glial S100B activates myo-inositol monophosphatase 1 and Co-localizes to purkinje cell vacuoles in SCA1 transgenic mice. *Cerebellum.* 2009;8(3):231-44.
166. Kang I, Lee BC, Lee JY, Kim JJ, Sung EA, Lee SE, Shin N, Choi SW, Seo Y, Kim HS, Kang KS. Stem cell-secreted 14,15- epoxyeicosatrienoic acid rescues cholesterol homeostasis and autophagic flux in Niemann-Pick-type C disease. *Exp Mol Med.* 2018;50(11):1-14.
167. Chen G, Ke Z, Xu M, Liao M, Wang X, Qi Y, Zhang T, Frank JA, Bower KA, Shi X, Luo J. Autophagy is a protective response to ethanol neurotoxicity. *Autophagy.* 2012;8(11):1577-89.
168. Lee YR, Wang PS, Wang JR, Liu HS. Enterovirus 71-induced autophagy increases viral replication and pathogenesis in a suckling mouse model. *J Biomed Sci.* 2014;21:80.
169. Wolf E, Gebhardt A, Kawachi D, Walz S, von Eyss B, Wagner N, Renninger C, Krohne G, Asan E, Roussel MF, Eilers M. Miz1 is required to maintain autophagic flux. *Nat Commun.* 2013;4:2535.
170. Zhang L, Wang H, Cong Z, Xu J, Zhu J, Ji X, Ding K. Wogonoside induces autophagy-related apoptosis in human glioblastoma cells. *Oncol Rep.* 2014;32(3):1179-87.
171. Duan W, Guo M, Yi L, Zhang J, Bi Y, Liu Y, Li Y, Li Z, Ma Y, Zhang G, Liu Y, Song X, Li C. Deletion of Tbk1 disrupts autophagy and reproduces behavioral and locomotor symptoms of FTD-ALS in mice. *Aging (Albany NY).* 2019;11(8):2457-76.
172. Yue Z. Autophagy in lurcher mice: indicted but yet to be acquitted for the death of Purkinje cells. *Autophagy.* 2010;6(4):571-2; discussion 3.
173. Oliva Trejo JA, Tanida I, Suzuki C, Kakuta S, Tada N, Uchiyama Y. Characterization of starvation-induced autophagy in cerebellar Purkinje cells of pHluorin-mKate2-human LC3B transgenic mice. *Sci Rep.* 2020;10(1):9643.
174. Kim CD, Reed RE, Juncker MA, Fang Z, Desai SD. Evidence for the Deregulation of Protein Turnover Pathways in Atm-Deficient Mouse Cerebellum: An Organotypic Study. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2017;76(7):578-84.
175. Mizushima N, Yoshimori T. How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy.* 2007;3(6):542-5.
176. Han X, Zhu J, Zhang X, Song Q, Ding J, Lu M, Sun S, Hu G. Plin4-Dependent Lipid Droplets Hamper Neuronal Mitophagy in the MPTP/p-Induced Mouse Model of Parkinson's Disease. *Front Neurosci.* 2018;12:397.
177. Meske V, Erz J, Priesnitz T, Ohm TG. The autophagic defect in Niemann-Pick disease type C neurons differs from somatic cells and reduces neuronal viability. *Neurobiol Dis.* 2014;64:88-97.
178. Meske V, Priesnitz T, Albert F, Ohm TG. How to reduce the accumulation of autophagic vacuoles in NPC1-deficient neurons: a comparison of two pharmacological strategies. *Neuropharmacology.* 2015;89:282-9.
179. Wang C, Haas MA, Yang F, Yeo S, Okamoto T, Chen S, Wen J, Sarma P, Plas DR, Guan JL. Autophagic lipid metabolism sustains mTORC1 activity in TSC-deficient neural stem cells. *Nat Metab.* 2019;1(11):1127-40.
180. Zhang F, Zhong R, Qi H, Li S, Cheng C, Liu X, Liu Y, Le W. Impacts of Acute Hypoxia on Alzheimer's Disease-Like Pathologies in APP(swe)/PS1(dE9) Mice and Their Wild Type Littermates. *Front Neurosci.* 2018;12:314.
181. Xu HJ, Umaphysivam K, McNeilage J, Gordon TP, Roberts-Thomson PJ. An enhanced chemiluminescence detection system combined with a modified immunoblot technique for the detection of low molecular weight IgM in sera from healthy adults and neonates. *J Immunol Methods.* 1992;146(2):241-7.
182. Bayguinov PO, Oakley DM, Shih CC, Geanon DJ, Joens MS, Fitzpatrick JAJ. Modern Laser Scanning Confocal Microscopy. *Curr Protoc Cytom.* 2018;85(1):e39.

183. Lee JH, Rao MV, Yang DS, Stavrides P, Im E, Pensalfini A, Huo C, Sarkar P, Yoshimori T, Nixon RA. Transgenic expression of a ratiometric autophagy probe specifically in neurons enables the interrogation of brain autophagy in vivo. *Autophagy*. 2019;15(3):543-57.
184. Mizushima N, Yamamoto A, Matsui M, Yoshimori T, Ohsumi Y. In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker. *Mol Biol Cell*. 2004;15(3):1101-11.
185. Curtin F, Schulz P. Multiple correlations and Bonferroni's correction. *Biol Psychiatry*. 1998;44(8):775-7.
186. Mishra P, Singh U, Pandey CM, Mishra P, Pandey G. Application of student's t-test, analysis of variance, and covariance. *Ann Card Anaesth*. 2019;22(4):407-11.
187. Miettinen TP, Bjorklund M. Mitochondrial Function and Cell Size: An Allometric Relationship. *Trends Cell Biol*. 2017;27(6):393-402.
188. Miettinen TP, Caldez MJ, Kaldis P, Bjorklund M. Cell size control - a mechanism for maintaining fitness and function. *Bioessays*. 2017;39(9).
189. Sharkey LM, Safren N, Pithadia AS, Gerson JE, Dulchavsky M, Fischer S, Patel R, Lantis G, Ashraf N, Kim JH, Meliki A, Minakawa EN, Barmada SJ, Ivanova MI, Paulson HL. Mutant UBQLN2 promotes toxicity by modulating intrinsic self-assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018;115(44):E10495-E504.
190. Rodriguez-Muela N, Germain F, Marino G, Fitze PS, Boya P. Autophagy promotes survival of retinal ganglion cells after optic nerve axotomy in mice. *Cell Death Differ*. 2012;19(1):162-9.
191. Romeo-Guitart D, Leiva-Rodriguez T, Fores J, Casas C. Improved Motor Nerve Regeneration by SIRT1/Hif1 α -Mediated Autophagy. *Cells*. 2019;8(11).
192. Esteban-Martinez L, Boya P. Autophagic flux determination in vivo and ex vivo. *Methods*. 2015;75:79-86.
193. Jin M, Klionsky DJ. Regulation of autophagy: modulation of the size and number of autophagosomes. *FEBS Lett*. 2014;588(15):2457-63.
194. Kulkarni A, Dong A, Kulkarni VV, Chen J, Laxton O, Anand A, Maday S. Differential regulation of autophagy during metabolic stress in astrocytes and neurons. *Autophagy*. 2019;1-17.
195. Pamerter ME, Perkins GA, McGinness AK, Gu XQ, Ellisman MH, Haddad GG. Autophagy and apoptosis are differentially induced in neurons and astrocytes treated with an in vitro mimic of the ischemic penumbra. *PLoS One*. 2012;7(12):e51469.
196. Alvarez-Erviti L, Seow Y, Schapira AH, Gardiner C, Sargent IL, Wood MJ, Cooper JM. Lysosomal dysfunction increases exosome-mediated alpha-synuclein release and transmission. *Neurobiol Dis*. 2011;42(3):360-7.
197. Li L, Zhang S, Zhang X, Li T, Tang Y, Liu H, Yang W, Le W. Autophagy enhancer carbamazepine alleviates memory deficits and cerebral amyloid-beta pathology in a mouse model of Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res*. 2013;10(4):433-41.
198. Liu K, Shi N, Sun Y, Zhang T, Sun X. Therapeutic effects of rapamycin on MPTP-induced Parkinsonism in mice. *Neurochem Res*. 2013;38(1):201-7.
199. Minina EA, Sanchez-Vera V, Moschou PN, Suarez MF, Sundberg E, Weih M, Bozhkov PV. Autophagy mediates caloric restriction-induced lifespan extension in *Arabidopsis*. *Aging Cell*. 2013;12(2):327-9.
200. Wang C, Zhang X, Teng Z, Zhang T, Li Y. Downregulation of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in curcumin-induced autophagy in APP/PS1 double transgenic mice. *Eur J Pharmacol*. 2014;740:312-20.
201. Fu H, Hardy J, Duff KE. Selective vulnerability in neurodegenerative diseases. *Nat Neurosci*. 2018;21(10):1350-8.
202. Spiegelhalter D. *Die Kunst der Statistik*. München: Redline Verlag; 2020.
203. Benjamin DJ, Berger JO, Johannesson M, Nosek BA, Wagenmakers EJ, Berk R, Bollen KA, Brembs B, Brown L, Camerer C, Cesarini D, Chambers CD, Clyde M, Cook TD, De Boeck P, Dienes Z, Dreber A, Easwaran K, Efferson C, Fehr E, Fidler F, Field AP, Forster M, George EI, Gonzalez R, Goodman S, Green E, Green DP, Greenwald AG, Hadfield JD, Hedges LV, Held L, Hua Ho T, Hoijtink H, Hruschka DJ, Imai K, Imbens G, Ioannidis JPA, Jeon M, Jones JH, Kirchler M, Laibson D, List J, Little R, Lupia A, Machery E, Maxwell SE, McCarthy M, Moore DA, Morgan SL, Munafò M, Nakagawa S, Nyhan B, Parker TH, Pericchi L, Perugini M, Rouder J, Rousseau J, Savalei V, Schonbrodt FD, Sellke T, Sinclair B, Tingley D, Van Zandt T, Vazire S, Watts DJ, Winship C,

- Wolpert RL, Xie Y, Young C, Zinman J, Johnson VE. Redefine statistical significance. *Nat Hum Behav.* 2018;2(1):6-10.
204. Begley CG, Ellis LM. Drug development: Raise standards for preclinical cancer research. *Nature.* 2012;483(7391):531-3.
205. Open Science C. PSYCHOLOGY. Estimating the reproducibility of psychological science. *Science.* 2015;349(6251):aac4716.
206. Prinz F, Schlange T, Asadullah K. Believe it or not: how much can we rely on published data on potential drug targets? *Nat Rev Drug Discov.* 2011;10(9):712.
207. Ioannidis JP. Why most published research findings are false. *PLoS Med.* 2005;2(8):e124.
208. Bennett CM, Wolford GL, Miller MB. The principled control of false positives in neuroimaging. *Soc Cogn Affect Neurosci.* 2009;4(4):417-22.
209. Stern AGH. The Difference Between "Significant" and "Not Significant" is not Itself Statistically Significant. *The American Statistician.* 2006;60(4):328 - 31.

9 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Lennart Wilhelm Sannwald, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Zelltypspezifische quantitative Analyse der neuronalen Autophagosomenbildung in cerebellären hirnormanotypischen Schnittkulturen aus der Maus / Cell type-specific quantitative analysis of neuronal autophagosome formation in cerebellar organotypic slice cultures from mice“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

[Für den Fall, dass Sie die Forschung für Ihre Promotion ganz oder teilweise in Gruppenarbeit durchgeführt haben:] Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

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

Datum

Unterschrift

10 Curriculum vitae

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

11 Danksagung

„So entdecken wir auch hier eine Nacht und einen Tag als Lebensbedingung für uns: Erkennen-wollen und Irren-wollen sind Ebbe und Fluth. Herrscht eines absolut, so geht der Mensch zu Grunde; und zugleich die Fähigkeit.“

Friedrich Nietzsche, Nachlass Herbst 1881 [162]

Anfangs stolperte ich unerfahren und einigermaßen naiv in diese Arbeit hinein. Heute, mehr als zweieinhalb Jahre später, ginge ich vieles auf eine andere Art und Weise an. Dies ist die größte Lehre, die ich aus meiner ersten wissenschaftlichen Arbeit mitnehme. Neben vielen theoretischen Inhalten sowie dem hypothesenbasierten Vorgehen erlernte ich neue Methodiken und setzte mich mit Statistik und Wissenschaftsphilosophie auseinander. Mein Blick auf die Bedeutung der Wissenschaften und der wissenschaftlichen Methode hat sich grundlegend gewandelt. An dieser Stelle möchte ich denjenigen Menschen danken, die mich während dieser wissenschaftlichen und emotionalen Reifung begleiteten und anleiteten:

Prof. Dr. Thomas Georg Ohm, der mir diese Arbeit überhaupt ermöglichte

Prof. Dr. Imre Vida, der mir stets ein offenes Ohr schenkte

Prof. Dr. Dieter Blottner, der mir die technische Umsetzung ermöglichte

Dr. rer. nat. Volker Meske, der mich das wissenschaftliche Vorgehen lehrte

Frank Albert, der mich die technische Umsetzung lehrte

M.Sc. Kerstin Rubarth, die mich stets mit statistischen Beratungen unterstützte

B.Sc. Sandra Gerstenberg, die mir im Laboralltag eine Stütze war

Dr. rer. medic. Gürkan Bal, der mich den Umgang mit dem konfokalen Mikroskop lehrte

PD Dr. med. Irene Brunk, die mich zur Anatomie führte

Cand. med. Anne Kesting, die mich durch schwierige Zeiten trug

B.Sc. Linus Fiedler, der mich die Theorie der konfokalen Mikroskopie lehrte

Dr. rer. nat. Volker und Christiane Kesting, die mich immer ermutigten

Dr. med. Renate und Dr. iur. Rüdiger Sannwald - *lux in tenebra mihi fuistis*

Die oben genannten Personen lehrten mich, die Quintessenz von Wilhelm von Humboldts Dictum zu verinnerlichen: „Dies vorausgeschickt, sieht man leicht, dass bei der inneren Organisation der höheren wissenschaftlichen Anstalten Alles darauf beruht, das Prinzip zu

erhalten, die Wissenschaft als etwas noch nicht ganz Gefundenes und nie ganz Aufzufindendes zu betrachten, und unablässig sie als solche zu suchen“ (aus: Wilhelm von Humboldt: Schriften zur Bildung, Ditzingen: Reclam, 2017; 155).

12 Bescheinigung Statistik



CharitéCentrum für Human- und Gesundheitswissenschaften

Charité | Campus Charité Mitte | 10117 Berlin

Institut für Biometrie und klinische Epidemiologie (iBikE)

Direktor: Prof. Dr. Geraldine Rauch

Postanschrift:
Charitéplatz 1 | 10117 Berlin
Besucheranschrift:
Reinhardtstr. 58 | 10117 Berlin

Tel. +49 (0)30 450 562171
geraldine.rauch@charite.de
<https://biometrie.charite.de/>



Name, Vorname: Sannwald, Lennart Wilhelm
Emailadresse: [REDACTED]
Matrikelnummer: [REDACTED]
PromotionsbetreuerIn: Prof. T. G. Ohm
Promotionsinstitution / Klinik: Institut für integrative Neuroanatomie

Bescheinigung

Hiermit bescheinige ich, dass Herr Lennart Wilhelm Sannwald innerhalb der Service Unit Biometrie des Instituts für Biometrie und klinische Epidemiologie (iBikE) bei mir eine statistische Beratung zu einem Promotionsvorhaben wahrgenommen hat. Folgende Beratungstermine wurden wahrgenommen:

- Termin 1: 22.10.2019
- Termin 2: 06.12.2019
- Termin 3: 12.10.2020
- Termin 4: 18.01.2021
- Termin 5: 08.02.2021

Folgende wesentliche Ratschläge hinsichtlich einer sinnvollen Auswertung und Interpretation der Daten wurden während der Beratung erteilt:

- Anwendung einer Two-Way ANOVA zur Beantwortung der Hauptfragestellung.
- Weitergehende Analysen sollten lediglich als explorativ deklariert werden. Dabei sollte der Fokus nicht auf den p-Werten liegen sondern auf der Deskription der Daten mittels adäquaten Grafiken und Tabellen. Auf eine Adjustierung für multiples Testen sollte verzichtet werden.

Diese Bescheinigung garantiert nicht die richtige Umsetzung der in der Beratung gemachten Vorschläge, die korrekte Durchführung der empfohlenen statistischen Verfahren und die richtige Darstellung und Interpretation der Ergebnisse. Die Verantwortung hierfür obliegt allein dem Promovierenden. Das Institut für Biometrie und klinische Epidemiologie übernimmt hierfür keine Haftung.

Datum: 29.03.2021

Name des Beraters/ der Beraterin: Kerstin Rubarth

[REDACTED]
Unterschrift BeraterIn, Institutsstempel

