

Aus der Klinik für Neurologie
(Prof. Dr. med. M. Bähr)
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Effekte einer pharmakologischen
Inhibition der ULK1-Kinase auf die
akute axonale Degeneration *in vivo***

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät der

Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Jonas Sundermeyer

aus

Gehrden

Göttingen 2022

Dekan: Prof. Dr. med. W. Brück

Betreuungsausschuss

Betreuer: Priv.-Doz. Dr. med. J. C. Koch

Ko-Betreuerin: Prof. Dr. med. C. Stadelmann-Nessler

Prüfungskommission

Referent: Priv.-Doz. Dr. med. J. C. Koch

Ko-Referentin: Prof. Dr. med. C. Stadelmann-Nessler

Drittreferent: Prof. Dr. med. R. Dressel

Datum der mündlichen Prüfung: 06.09.2022

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Effekte einer pharmakologischen Inhibition der ULK1-Kinase auf die akute axonalen Degeneration *in vivo*" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den

.....

(Jonas Sundermeyer)

Die Daten, auf denen die vorliegende Arbeit basiert, wurden teilweise publiziert:

Vahsen BF, Ribas VT, **Sundermeyer J**, Boecker A, Dambeck V, Lenz C, Shomroni O, Caldi Gomes L, Tatenhorst L, Barski E, Roser AE, Michel U, Urlaub H, Salinas G, Bähr M, Koch JC, Lingor P (2020): Inhibition of the autophagic protein ULK1 attenuates axonal degeneration in vitro and in vivo, enhances translation, and modulates splicing. *Cell Death Differ* 27, 2810-2827

INHALTSVERZEICHNIS

ABBILDUNGSVERZEICHNIS	IV
TABELLENVERZEICHNIS.....	V
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VI
EINHEITEN	Fehler! Textmarke nicht definiert.
1 EINLEITUNG	1
1.1 Neurodegeneration.....	1
1.1.1 Axonale Degeneration im ZNS.....	1
1.1.2 Akute axonale Degeneration.....	2
1.1.3 Spätphase der traumatischen axonalen Degeneration.....	4
1.2 Autophagie	5
1.2.1 Definition und Funktion der Autophagie	5
1.2.2 Molekularbiologische Grundlage der Makroautophagie.....	7
1.2.3 Autophagie in Neuronen	10
1.2.4 Physiologische Funktion der Autophagie in Neuronen.....	11
1.2.5 Therapeutische Modulation der Autophagie in der chronischen Neurodegeneration	12
1.2.6 Autophagie in der akuten axonalen Degeneration des ZNS.....	13
1.2.7 ULK1-Inhibition in der axonalen Degeneration.....	14
1.3 Untersuchung von axonalen Degenerationsprozessen im optischen Nerv.....	16
1.3.1 Der <i>N. opticus</i> als Modellsystem für axonale Degeneration <i>in vivo</i>	16
1.3.2 Induktion der axonalen Degeneration durch <i>Crush</i> -Läsion.....	16
1.3.3 <i>Live imaging</i> des optischen Nervs im ZNS.....	17
1.4 Fragestellung und Zielsetzung der Studie.....	19
2 MATERIAL UND METHODEN	20
2.1 Equipment.....	20
2.1.1 Reagenzien.....	22
2.1.2 Puffer und Lösungen.....	23
2.1.3 Antikörper, Kits und Inhibitor	24
2.1.4 Software.....	25
2.2 Imaging des optischen Nervs	26

INHALTSVERZEICHNIS

2.2.1	Studiendesign.....	26
2.2.2	Versuchstiere	27
2.2.3	Anästhesie und Monitoring.....	27
2.2.4	Visualisierung der Axone des N. opticus durch intravitreale Injektion von AAV-Vektoren <i>in vivo</i>	28
2.2.5	SBI-0206965 und DMSO-Kontrollinjektion.....	29
2.2.6	Konfiguration des Equipments	29
2.2.7	Operative Freilegung des optischen Nervis.....	30
2.2.8	<i>Crush</i> -Läsion.....	33
2.2.9	Epifluoreszenz-Mikroskopie des optischen Nervis.....	34
2.2.10	Euthanasie und Gewebeprobenentnahme.....	36
2.2.11.	Quantifizierung der axonalen Degeneration	36
2.3	Immunofluoreszenzfärbungen.....	39
2.3.1	Prinzip der indirekten Immunofluoreszenz.....	39
2.3.2	Gewebefixierung, Kryoprotektion und Gefrierschnitte.....	39
2.3.3	Färbeprotokoll.....	40
2.3.4.	Konfokale Mikroskopie der IHC-Färbungen und Quantifizierung von LC3 und p62.....	42
2.4	Retinaler <i>Flat mount</i>	43
2.4.1	Probenaufbereitung und Präparation.....	43
2.4.2	Evaluation der RGC-Transfektion und Phototoxizitätsanalyse	44
2.5	Statistische Analyse	45
3	ERGEBNISSE.....	46
3.1	<i>Live-imaging</i> -Mikroskopie der akuten axonalen Degeneration im Optischen Nerv..	46
3.1.1	Visualisierung der RGC-Axone	46
3.1.2	<i>Live-imaging</i> -Mikroskopie der RGC-Axone nach ONC unter SBI- und DMSO-Behandlung.....	48
3.1.3	Ergebnisse der <i>Axonal integrity ratio</i>	50
3.1.4	Ergebnisse der Schnittpunkt-Quantifizierung.....	53
3.1.5	Quantifizierung der axonalen Bulbs in der akuten axonalen Degeneration.....	56
3.2	Immunohistochemische Quantifizierung von Autophagiemarkerproteinen.....	59
3.2.1	Ergebnisse der LC3-Quantifizierung.....	60
3.2.2	Ergebnisse der p62-Quantifizierung.....	64
3.3	Zusammenfassung der Ergebnisse	68

INHALTSVERZEICHNIS

4	DISKUSSION	69
4.1	<i>Live imaging</i> des optischen Nervs nach <i>Crush</i> -Läsion als ein verlässliches Modellsystem zur Evaluation der AAD <i>in vivo</i>	69
4.2	<i>Live imaging</i> proximo-dorsal gelegener RGC-Neurone.....	70
4.3	SBI-0206965 vermindert axonale Integritätsverluste in RGC-Neuronen in der AAD	72
4.4	Effekte von SBI-0206965 auf axonale <i>Bulbs</i> im Tiermodell	75
4.4.1	Axonale Auftreibungen als ein frühes morphologisches Korrelat in der akuten axonalen Degeneration	75
4.4.2	SBI-0206965 zeigt keinen entscheidenden Einfluss auf die Morphologie und Kinetik axonaler <i>Bulbs</i> in der akuten axonalen Degeneration <i>in vivo</i>	75
4.5	Potentielle Wirkmechanismen von SBI-0206965 in der akuten axonalen Degeneration	78
4.6	Weitere ULK1-Inhibitoren	80
4.7	SBI-0206965 verringert LC3-positive Autophagosomenbildung nach <i>Crush</i> -Läsion in der akuten axonalen Degeneration.....	80
4.8	Unterschiede SBI-unabhängiger Autophagosomen-Konzentrationen zu beiden Seiten der <i>Crush</i> -Läsion.....	83
4.9	Die Rolle von Autophagie in der akuten versus chronischen axonalen Degeneration im ZNS.....	85
5	ZUSAMMENFASSUNG	87
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	88

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Schema der Makroautophagie.....	6
Abbildung 2: Molekularbiologische Grundlage der Makroautophagie.....	9
Abbildung 3: Modell der neuronalen Autophagie.....	11
Abbildung 4: SBI-0206965.....	15
Abbildung 5: <i>Live-imaging</i> -Mikroskopie des optischen Nervs.....	18
Abbildung 6: Schematische Darstellung zum tierexperimentellen Design.....	26
Abbildung 7: Fixierung und Positionierung des Versuchstiers.....	29
Abbildung 8: Operative Freilegung ON Schritt 1 & 2.....	30
Abbildung 9: Operative Freilegung ON Schritt 3 & 4.....	31
Abbildung 10: Operative Freilegung ON Schritt 5 & 6.....	32
Abbildung 11: Operativer Schritt des ONC.....	33
Abbildung 12: Epifluoreszenzmikroskopie retinaler RGC-Axone des ON.....	35
Abbildung 13: Beispielbilder zur Quantifizierung der axonalen Degeneration.....	37
Abbildung 14: Beispielbilder zu Quantifizierungsmethode der axonalen Bulbs.....	38
Abbildung 15: Beispielbilder der LC3- und SMI32-Färbungen unter dem konfokalen Mikroskop.....	43
Abbildung 16: Beispielbilder eines retinalen <i>Flat-mount</i> -Präparats.....	44
Abbildung 17: Transfektion der RGC-Neurone nach intravitrealer Injektion von AAV.eGFP.....	47
Abbildung 18: Repräsentative <i>Live-imaging</i> -Bilder der akuten axonalen Degeneration.....	49
Abbildung 19: 50 μ M SBI-0206965 hemmt den axonalen Integritätsverlust.....	52
Abbildung 20: 50 μ M SBI-0206965 führt zu einer signifikant höheren Anzahl von.....	53
Abbildung 21: Verlust der axonalen Integrität in Abhängigkeit zur Distanz der <i>Crush</i> - Läsion.....	55
Abbildung 22: <i>Bulb</i> -Verteilungsdichte nach intravitrealer Injektion von SBI-020696.....	57
Abbildung 23: Die axonale <i>Bulb</i> -Größe bleibt postläsional durch SBI-0206965 nahezu unbeeinflusst.....	58
Abbildung 24: Repräsentative Aufnahmen der immunhistochemischen LC3- Quantifizierung 400 μ m proximal.....	60

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 25: Repräsentative Aufnahmen der immunhistochemischen LC3-Quantifizierung 400 µm distal.	61
Abbildung 26: Intravitreale Injektion von 50 µM SBI-0206965 reduziert die Anzahl LC3-positiver Puncta 5 h nach <i>Crush</i> -Läsion.....	63
Abbildung 27: Repräsentative Aufnahmen der immunhistochemischen p62-Quantifizierung 400 µm proximal.....	64
Abbildung 28: Repräsentative Aufnahmen der immunhistochemischen p62-Quantifizierung 400 µm proximal.....	65
Abbildung 29: Intravitreale Injektion von 50 µM SBI-0206965 erhöht die Anzahl p62-positiver Puncta 5 h nach <i>Crush</i> -Läsion.	67

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Equipment	20
Tabelle 2: Reagenzien	22
Tabelle 3: Puffer und Lösungen.....	23
Tabelle 4: Primäre Antikörper.....	24
Tabelle 5: Sekundäre Antikörper	24
Tabelle 6: Kits.....	24
Tabelle 7: Inhibitoren	24
Tabelle 8: Verwendete Software	25
Tabelle 9: Übersicht Versuchsgruppen.....	26
Tabelle 10: Übersicht IHC-Färbeprotokoll LC3, p62, SMI32	41
Tabelle 11: Anzahl ausgewerteter Axone in der AIR	50

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AAD	Akute axonale Degeneration
AAV	Adeno-assoziiertes Virus
AIR	<i>Axonal integrity ratio</i>
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
AMPK	Adenosinmonophosphat-aktivierte Proteinkinase
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
ATG-	<u><i>Autophagy</i></u> - (im Zusammenhang mit Proteinnamen)
ATP	Adenosin-Triphosphat
CMA	<i>Chaperone-mediated autophagy</i>
CRMP-2	<i>Collapsin response mediator protein-2</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DsRed	<i>Discosoma red fluorescent protein</i>
EGFP	<i>Enhanced green fluorescent protein</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EtOH	Ethanol
H ₂ O	Wasser
HCl	Salzsäure
Hsc70	<i>Heat shock cognate 70</i>
i.c.	intracutan
i.p.	intraperitoneal
LAMP	<i>Lysosomal membrane-associated protein</i>
MAP1-LC3	<i>Microtubule-associated protein1- light chain 3</i>
MS	Multiple Sklerose
mTORC1	<i>Mechanistic target of rapamycin complex-1</i>
MVB	<i>Multivesicular bodies</i>
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriummonoxid
ON	Optischer Nerv

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS UND EINHEITEN

ONC	<i>Optic nerve crush</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PFA	Paraformaldehyd
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIK3	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat
RFP	<i>Red fluorescent protein</i>
RGC	<i>Retinal ganglion cell</i>
ROCK	<i>Rho-associated protein kinase</i>
RT	Raumtemperatur
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
shRNA	<i>Short hairpin RNA</i>
SQSTM1	<i>Sequestosome 1 (=p62)</i>
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
ULK	Unc-51-ähnliche Autophagie-aktivierende Kinase
Vps43	<i>Vacuolar protein sorting 34</i> , eine Lipid-Kinase
WIPI	<i>WD-repeat protein interacting with phosphoinositides</i>
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 EINLEITUNG

1.1 Neurodegeneration

Neurodegeneration beschreibt einen Prozess des fortschreitenden Absterbens spezifischer Neuronenpopulationen mit resultierendem Funktionsverlust der Neuronen, der sowohl bei neurodegenerativen Erkrankungen als auch nach traumatischen Nervenläsionen beobachtet wird. Auch im Rahmen ischämischer und inflammatorischer Erkrankungen des zentralen Nervensystems (ZNS), wie z. B. dem Apoplex oder der Multiplen Sklerose (MS), kommt es zu neurodegenerativen Prozessen, die den Verlauf der Erkrankung maßgeblich bestimmen. Neurodegenerative Erkrankungen wie Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson oder die Amyotrophe Lateralsklerose (ALS) zeigen einen progressiven Krankheitsverlauf und führen durch die physischen, psychischen und sozialen Einschränkungen zu einer starken Beeinträchtigung der gesundheitsbezogenen Lebensqualität der Betroffenen. Hauptrisikofaktor dieser Gruppe von Erkrankungen ist das Alter, wobei die Inzidenz nach dem 55. Lebensjahr nahezu exponentiell ansteigt (Driver und Kurth 2009). Im Hinblick auf die aktuelle demographische Entwicklung mit einer immer älter werdenden Weltbevölkerung kommt daher den neurodegenerativen Erkrankungen eine zunehmende Bedeutung zu.

Die zugrunde liegenden molekularen Pathomechanismen neurodegenerativer Erkrankungen und neurotraumatischer Nervenläsionen sind bisher nur unvollständig verstanden. Daher existieren derzeit für die meisten neurodegenerativen Erkrankungen und Nervenläsionen des ZNS nahezu keine kurativen Therapieansätze. Neue Erkenntnisgewinnung in der molekularbiologischen Grundlagenforschung sowie in der translationalen Medizin nehmen somit einen hohen Stellenwert in der modernen Neurowissenschaft ein.

1.1.1 Axonale Degeneration im ZNS

Die axonale Degeneration beschreibt den Zerfall des Axons und ist ein grundlegender Prozess in der Pathophysiologie traumatischer, entzündlicher und chronisch-neurodegenerativer Nervenerkrankungen des ZNS, wie beispielsweise bei MS, ALS, Morbus Parkinson oder traumatischen Hirn- und Rückenmarksverletzungen (Fischer et al. 2004; Coleman 2005; Lingor et al. 2012; Burke und O'Malley 2013). Die axonale Degeneration unterliegt Mechanismen, die sowohl bei chronisch-neurodegenerativen Erkrankungen als auch nach traumatischen Nervenverletzungen einen selbstpropagierenden Charakter in einer räumlich und zeitlich definierten Ordnung aufweisen (Lingor et al. 2012; Wang et al. 2012). Studien deuten darauf hin, dass die axonale Degeneration bei zahlreichen neurodegenerativen Erkrankungen

bereits in der frühen Phase des Krankheitsverlaufs auftritt (Adalbert und Coleman 2013). Dies konnte etwa als frühe Degeneration von nigrostriatalen Projektionsneuronen und kardialen Sympathikusnerven in der Parkinsonpathologie oder als Untergang von kortikospinalen Traktusfasern bei der ALS beschrieben werden (Fischer et al. 2004; Orimo et al. 2008). Die Degeneration der Axone tritt hierbei noch vor dem Absterben der Somata und somit vor dem neuronalen Zelltod in Erscheinung und erfolgt in der Regel nach dem *Dying-back*-Muster (Fischer und Glass 2007; Öztürk et al. 2013). In vielen Fällen geht die axonale Degeneration mit irreversiblen Defekten der Axonintegrität, einem Funktionsverlust und im weiteren Verlauf mit einem Untergang des Neurons einher, und manifestiert sich klinisch in neurologischen Defiziten (Jawhar et al. 2012).

Die zugrundeliegende Pathophysiologie der axonalen Degeneration ist noch unzureichend verstanden, sodass die Erforschung der molekularen Mechanismen eine wichtige Grundlage für das Verständnis neuropathologischer Prozesse darstellt. Da die axonale Degeneration in der frühen Krankheitsphase auftritt und Axone ein gewisses Regenerationspotential besitzen (Kerschensteiner et al. 2005; Hagg und Oudega 2006), könnte die Untersuchung dieser Mechanismen vielversprechende Möglichkeiten therapeutischer Angriffspunkte für zukünftige Behandlungsstrategien aufdecken.

Entsprechend der Kinetik und Lokalisation am Axon lässt sich die Axonale Degeneration in verschiedene Formen unterteilen. Die **Traumatische axonale Degeneration** folgt einer mechanischen Nervenläsion, z. B. nach Rückenmarksverletzungen, und geht zunächst mit der **akuten axonalen Degeneration** einher. Nach einer Latenzphase folgt die **Wallerische Degeneration**. Die **chronische axonale Degeneration** zeigt sich oftmals bei neurodegenerativen und neuroinflammatorischen Erkrankungen, verläuft über einen längeren Zeitraum und erstreckt sich in einem bestimmten Trakt häufig nur über einen Teil der Axone. Des Weiteren wurden **physiologische Prozesse der axonalen Degeneration im Rahmen der Entwicklung** des ZNS beschrieben (Luo und O’Leary 2005).

1.1.2 Akute axonale Degeneration

Die Bezeichnung der akuten axonalen Degeneration (AAD) bezieht sich auf einen axonalen Pathomechanismus, der innerhalb der ersten Minuten bis zu einigen Stunden nach einer traumatischen Läsion von Axonen im ZNS auftritt (Kerschensteiner et al. 2005; Knoferle et al. 2010). Die AAD führt dabei in einem 500 µm proximal (dem Zellsoma zugewandt) und distal (dem Zellsoma abgewandt) zur Läsion liegenden Bereich zu einem Integritäts- und Funktionsverlust des Axons. Dieser räumlich und zeitlich eingrenzbarer postläsionaler Prozess

konnte in vorangegangenen Studien sowohl im Rückenmark (Kerschensteiner et al. 2005) als auch im optischen Nerven (Knoferle et al. 2010) *in vivo* per *Live-imaging*-Methodik visualisiert und beschrieben werden. Ein typisches morphologisches Korrelat der beginnenden axonalen Degeneration ist die Entstehung lokaler Verdickungen des Axons, sog. *axonal bulbs*, die in der Regel als Frühzeichen mikroskopisch sichtbar werden (Kerschensteiner et al. 2005) und sich in Einzelfällen auch spontan zurückbilden können (Nikić et al. 2011).

In den ersten 30 Minuten nach einem Nerven trauma bleibt die axonale Integrität im 500 µm proximal und distal der Läsion liegenden Bereich morphologisch stabil (Knoferle et al. 2010). Nach etwa fünf Minuten sind erste *axonal bulbs* detektierbar, die sich in verschiedene Arten unterteilen lassen. Der häufigste Subtyp dieser Axonaufreibungen zeigt in der elektronenmikroskopischen Analyse eine dichte zytoplasmatische Ansammlung von Zellorganellen, bei denen es sich vorrangig um Vakuolen und Mitochondrien handelt (Knoferle et al. 2010). Letztere zeigen häufig Degradationsmerkmale, die ein Indiz für mitochondriale Dysfunktion sein könnten (Knoferle et al. 2010). Eine Subpopulation der Vakuolen ähnelte morphologisch den Autophagosomen, bei denen sich das Autophagie-Induktionsprotein *Microtubule associated protein 1 light chain 3* (LC3) immunhistochemisch nachweisen lässt (Knoferle et al. 2010).

Auf molekularer Ebene setzt postläsional schon innerhalb der ersten Minute eine Signalkaskade ein, die durch eine vorübergehend erhöhte axoplasmatische Calciumkonzentration getriggert wird, bedingt durch einen schnellen Calciumeinstrom (Knoferle et al. 2010). Mithilfe von Calcium-empfindlichen Farbstoffen konnten läsionsinduzierte Veränderungen am optischen Nerven verfolgt werden, die einen schnellen Calciumanstieg in den ersten 30 Sekunden mit nachfolgender Abnahme über eine Minute auf das zuvor bestehende basale Calciumlevel zeigten (Knoferle et al. 2010). Die Applikation einer Kombination aus Calciumkanalhemmern (*L-/N-type channel blocker amlodipine*, *T-type channel blocker amiloride*, *AMPA receptor blocker NBQX*) zum Zeitpunkt der Läsionssetzung konnte erfolgreich den intraaxonalen Calciumanstieg blockieren und infolgedessen eine Fragmentierung der Axone im Rahmen der akuten axonalen Degeneration abschwächen (Ribas et al. 2016). Der schnelle intraaxonale Einstrom extrazellulärer Calciumionen nach Axotomie stellt somit wahrscheinlich einen entscheidenden Induktionsmechanismus der AAD dar (Knoferle et al. 2010; Ribas et al. 2016; George et al. 2018).

In *In-vivo*-Studien zur AAD im Rückenmark und im optischen Nerven und konnte gezeigt werden, dass der Calciumeinstrom im Rahmen der AAD zu einer Aktivierung der calciumsensitiven Protease Calpain führt (Kerschensteiner et al. 2005; Zhang et al. 2016). Das Maximum der Aktivität wurde nach 30 Minuten etwa 400 µm proximal und distal des

Läsionsortes (Rückenmarksdurchtrennung) erreicht. Die Anwendung von Calpain-Inhibitoren konnte in mehreren Modellen vor einem progredienten Integritätsverlust in der akuten axonalen Degeneration schützen (Kerschensteiner et al. 2005; Kilinc et al. 2009; Lingor et al. 2012). Zudem konnte neben der Hemmung von Calpain auch eine Überexpression des *Collapsin-response-mediator-Protein-2* (CRMP-2), einem molekularen Downstream-Ziel von Calpain, Prozesse der AAD entscheidend abschwächen (Zhang et al. 2016).

Ein weiteres frühes molekulares Charakteristikum der AAD ist die Aktivierung von Autophagie (Koch et al. 2010; Ribas et al. 2015; Menzies et al. 2017). Sowohl proximal als auch distal der Axotomiestelle nimmt im optischen Nerv die Anzahl LC3-positiver Autophagosomen nach 30 Minuten signifikant zu und lässt sich, verglichen zum nativen ON, sechs Stunden nach induzierter Axonläsion nahezu in doppelter Konzentration nachweisen (Knoferle et al. 2010). Die pharmakologische Hemmung des initialen Calciumeinstroms durch Calciumkanalinhibitoren reduziert nicht nur den axonalen Zerfall, sondern auch die Autophagieaktivität in der AAD. Letzteres impliziert eine Aktivierung der Autophagie-Kaskade durch erhöhte axoplasmatische Calciumionenkonzentrationen (Knoferle et al. 2010). Die genaue Rolle der Autophagie sowie deren potentielle pharmakologische Beeinflussung in pathophysiologischen Prozessen der axonalen Degeneration ist zum aktuellen Zeitpunkt nur unvollständig verstanden und Gegenstand der vorliegenden Studie.

1.1.3 Spätphase der traumatischen axonalen Degeneration

Die traumatische axonale Degeneration ist ein dynamischer Prozess, der sich in verschiedene morphologische Stadien der Degeneration unterteilen lässt. Der fokalen Axonläsion folgt die AAD, die innerhalb der ersten 4 – 6 Stunden zur Fragmentierung beider benachbarten, etwa 500 μm langen Axonanteile führt (Kerschensteiner et al. 2005; Knoferle et al. 2010). Im anschließenden Degenerationsstadium lassen sich proximal und distal der Läsion morphologisch unterschiedliche Prozesse differenzieren. Distale Axonanteile verbleiben zunächst stabil und zerfallen erst verzögert nach etwa 24 – 72 Stunden in einem Prozess der sog. Wallerschen Degeneration vollumfänglich (Waller 1851; Conforti et al. 2014). Proximale Axonanteile hingegen zeigen in diesem Zeitabschnitt nahezu keinen Integritätsverlust. Je nach Neuronentyp und Läsionsmuster zerfallen sie dann erst verzögert über Tage bis Jahre nach dem *Dying-back*-Muster. Obwohl die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen der Wallerschen Degeneration überwiegend erfolgreich exploriert wurden (Conforti et al. 2014), fehlt der modernen Neurowissenschaft nach wie vor ein grundlegendes Verständnis über die Pathophysiologie der AAD nach traumatischen oder ischämiebedingten Läsionsereignissen.

Therapeutischer Ansatzpunkte sollten in der AAD insbesondere auf den Erhalt des verbleibenden proximalen Axonsegments und damit des Zellsomas abzielen. Zudem könnte eine Inhibition der AAD eine folgende axonale Regeneration erleichtern und verbessern.

1.2 Autophagie

1.2.1 Definition und Funktion der Autophagie

Autophagie (von altgriechisch ἀὐτόφαγος *autóphagos* „sich selbst verzehrend“) ist ein intrazellulärer Prozess, um gealterte und dysfunktionale zelleigene Organellen, Proteine und Lipide über den Endosomal-Lysosomalen Weg abzubauen oder zu recyceln (Klionsky 2008; Mizushima und Komatsu 2011). Der hochdynamische Autophagieprozess ist für die Aufrechterhaltung der Zellhomöostase und somit für das Gleichgewicht zwischen Abbau und Produktion zellulärer Bestandteile entscheidend. Stressbedingte Schäden an der Zelle können verhindert werden, indem nichtfunktionelle Komponenten in Doppelmembranvesikeln, sogenannte Autophagosomen, eingeschlossen und zum Abbau an das Lysosom abgegeben werden (Mizushima und Komatsu 2011; Antonioli et al. 2017).

Durch eine Vielzahl zellulärer Signalkaskaden, die auf die Autophagiekaskade konvergieren, kann sich die Zelle auf eine Vielfalt von Stressoren innerhalb von Minuten adaptieren (Xie Yangchun et al. 2015; Antonioli et al. 2017). Man unterscheidet drei Hauptformen der Autophagie: Die **Makroautophagie**, die bei selektivem Abbau von Mitochondrien auch als Mitophagie bezeichnet wird, die **Mikroautophagie** und die **Chaperon-vermittelte Autophagie** (Cuervo 2010).

In dem Prozess der **Makroautophagie** formt sich zunächst eine kappenförmige Isolationsmembran, das sogenannte Phagophor. Diese initiale Membran umschließt in einem sich expandierenden Prozess, der durch eine molekulare Interaktion von autophagozytose-spezifischen (ATG) Proteinen kontrolliert wird, einen Teil des Zytoplasmas mit löslichen Bestandteilen und Zellorganellen in doppelmembranösen Vesikeln ein und bildet die sog. Autophagosomen (Ohsumi und Mizushima 2004). Studien deuten darauf hin, dass das Ursprungsmaterial zur Bildung der Isolationsmembran u.a. aus dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) stammt (Axe et al. 2008; Jaeger und Coray 2009). Autophagosomen durchlaufen weitere Reifungsschritte, indem sie mit Endosomen oder multivesikalen Kompartimenten (*Multivesicular bodies*, MVB) fusionieren (Burman und Ktistakis 2010). Das 0,5 – 1,5 μm große Autophagosom verschmilzt mit dem Lysosom zum Autophagolysosom, um die darin enthaltenen Bestandteile zu degradieren (Wang und Klionsky 2003; Mizushima und Komatsu 2011; Agholme et al. 2012).

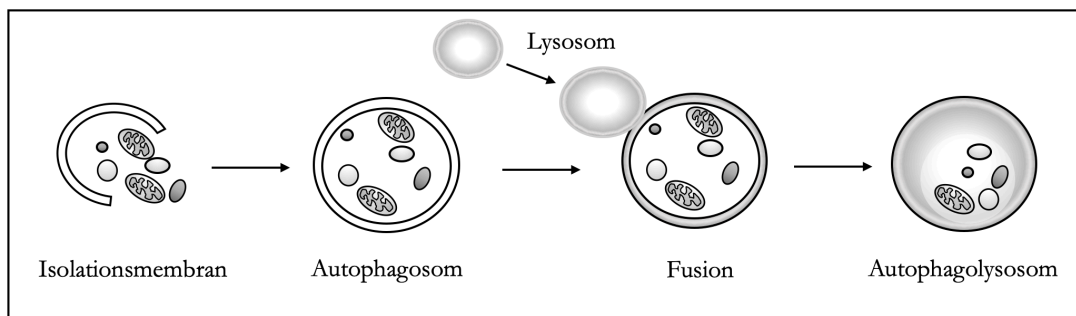


Abbildung 1: Schema der Makroautophagie.

Ein Teil des Zytoplasmas wird mit löslichen Bestandteilen und Zellorganellen durch eine Isolationsmembran umschlossen, um ein Autophagosom zu bilden. Die äußere autophagosomale Membran fusioniert anschließend mit Lysosomen zur Degradation der umschlossenen Bestandteile (eigene Abbildung).

In der **Mikroautophagie** werden zytoplasmatische Proteine oder Organellen direkt durch die Invagination lysosomaler Membranen zu MVB umschlossen und darin abgebaut. Die molekularen Mechanismen der Invagination und die MVB-Biogenese sind heute noch nicht im Detail verstanden, die Membrandynamik ähnelt jedoch stark derjenigen des endosomalen Sortierungskomplexes (Mizushima und Komatsu 2011; Sahu et al. 2011). Mikroautophagie gilt als die Form, die an der ständigen Entfernung von Organellen und intrazellulären Proteinen beteiligt ist (Liu et al. 2015).

Im Gegensatz zur Makro- und Mikroautophagie bedarf die **Chaperon-vermittelte Autophagie** (*Chaperon mediated autophagy*, CMA) keine Bildung von Vesikelkompartimenten oder einer Neuorganisation von Membranen. Stattdessen werden die abzubauenen Substrate aus dem Zytosol direkt über die Biomembran in das lysosomale Lumen transloziert (Kaushik und Cuervo 2008; Cuervo 2010). Das Chaperon-Protein Hsc70 (*Heat shock cognate 70*) und Co-Chaperone erkennen anhand von Ladungs- und hydrophoben Eigenschaften spezifisch zytoplasmatische Proteine, die ein KFERQ-ähnliches Pentapeptid enthalten (Orenstein und Cuervo, 2010). Dieser Proteinkomplex interagiert mit dem Membranrezeptor *Lysosomal membrane-associated protein 2a* (LAMP-2A), sodass die von Hsc70 entfaltete Proteine durch den multimeren Translokationskomplex in das lysosomale Lumen gelangen können (Bandyopadhyay et al. 2008; Kaushik und Cuervo 2008; Cuervo 2010; Mizushima und Komatsu 2011). In der CMA können aufgrund der Spezifität im selektiven Abbau nur lösliche Proteine, jedoch keine kompletten Zellorganellen degradiert werden (Cuervo 2010). Die CMA-Aktivität nimmt mit dem Alter ab und ist bei neurodegenerativen Erkrankungen verändert (Liu et al. 2015). Neueste Untersuchungen deuten darauf hin, dass der Verlust der CMA-Aktivität mit einer Vielzahl von genetischen und toxischen Zuständen assoziiert ist,

die im Zusammenhang mit pathologischen Prozessen des Morbus Parkinson eine Rolle spielen könnten (Liu et al. 2015; Yang et al. 2016).

1.2.2 Molekularbiologische Grundlage der Makroautophagie

Bisher wurden ~40 ATG-Gene (*autophagy*, ATG) in Hefen identifiziert, von denen etwa die Hälfte als Homologe in Säugetierzellen vorliegen und entscheidend für die Induktion und Vermittlung verschiedener Phasen in der Biogenese der Autophagosomen sind (Koyama-Honda et al. 2013; Xie Yangchun et al. 2015). Neben den im Folgenden beschriebenen Signaltransduktionskinasen sind auch posttranslationale Modifizierungsenzyme an der Reagibilität auf Zellstressoren beteiligt, wobei E3-Ubiquitin-Ligasen eine wichtige Rolle spielen (Xie Yangchun et al. 2015; Antonioli et al. 2017).

Als Reaktion auf Stressoren, wie beispielsweise Nährstoffmangel, vermittelt die Aktivität des Serin-Threonin-Proteins *Unc-51-like-autophagy-activating*-Kinase (ULK1) als einer der frühesten Faktoren die Induktion der Phagophorbildung (Koyama-Honda et al. 2013; Petherick et al. 2015; Bingol 2018). In seiner aktiven Form liegt ULK1 in einem Komplex mit dem 200 kDA großem Interaktionsprotein FIP200 der FAK-Familie (*Focal adhesion kinase*, FAK) und den regulatorischen Untereinheiten ATG101 und ATG13 vor, letzteres ist für die maximale Aktivität des ULK1-Kinasekomplexes unerlässlich (Hara et al. 2008; Chan et al. 2009; Lin und Hurley 2016; Bingol 2018). In diesem Komplex phosphoryliert die ULK1-Kinase ATG13 und FIP200 sowie das Transmembranprotein ATG9, das aus der Plasmamembran und dem Golgi-Apparat kommend die Expansion des frühen Phagophors fördert (Orsi et al. 2012; Galluzzi et al. 2017).

Der aktivierte ULK1-Komplex initiiert die Verlängerung des Phagophors, vermutlich durch den Einbau von Phospholipiden aus dem ER, recycelten Endosomen und Mitochondrien (Axe et al. 2008; Lamb et al. 2013; Galluzzi et al. 2017). Das ER ist in der neuronalen Autophagosomenbiogenese die Hauptmembranquelle (Maday und Holzbaur 2014). Es wird ein Multiproteinkomplex rekrutiert, der mit einer Phosphatidylinositol-3-Kinase-Aktivität der Klasse III (PIK3C3), auch bekannt als Lipidkinase VPS34 (*Vacuolar protein sorting 34*), als ein Schlüsselenzym die weitere Biogenese des Phagophors vorantreibt (Koyama-Honda et al. 2013; Lamb et al. 2013; Bingol 2018). Der VPS34-Komplex besteht aus den autophagozytosespezifischen Cofaktoren BECLIN-1 und ATG14 sowie dem VPS15-Gerüstprotein, das für den Aufbau der katalytischen und regulatorischen Untereinheiten benötigt wird (Matsunaga et al. 2010; Baskaran et al. 2014; Antonioli et al. 2017). In der aktiven Phase produziert VPS34 Phosphatidylinositol-3-phosphate (PI3P), die eine Expansion der

autophagosomalen Membranen weiter unterstützen, bis es zum Verschluss durch Einwirkung von PI3P-bindenden ATG-Proteinen und Proteinen der WIPI-Familie (*WD-repeat protein interacting with phosphoinositides*, WIPI) kommt (Proikas-Cezanne et al. 2015; Galluzzi et al. 2017). PI3P bilden zudem für diese Proteine wichtige Orientierungspunkte und werden hauptsächlich in spezialisierten Membranerweiterungen des ER, in sogenannten Omegasomen (Omega-ähnlichen (Ω) Form), produziert (Axe et al. 2008; Karanasios et al. 2013; Ktistakis und Tooze 2016).

Wichtige Hauptregulatoren in der initialen Makroautophagie-Kaskade sind der mTOR-Komplex I (*Mechanistic target of rapamycin complex-1*, mTORC1) und die AMPK (*AMP-aktivierte Proteinkinase*). Der mTORC1 integriert Signale von Wachstumsfaktoren, Energiestatus, Sauerstoffkonzentration und Aminosäuren und fördert die Proteinbiosynthese sowie weitere anabole Prozesse des Zellmetabolismus (Lin und Hurley 2016). Gleichzeitig werden unter mTORC1-Aktivität katabole Prozesse wie Autophagie durch Phosphorylierungen von Serinresten im ULK1 sowie ATG13 gehemmt, und somit die Fähigkeit des ULK1-Komplexes zur weiteren Autophagie-Induktion inhibiert (Wong et al. 2013). Des Weiteren hemmt mTORC1 die Makroautophagie, indem es die Kerntranslokation des Transkriptionsfaktors EB (TFEB), ein Haupttranskriptionsfaktor für lysosomale Biogenese und Makroautophagie, verhindert (Settembre et al. 2012; Galluzzi et al. 2017). Wird mTORC1 hingegen unter katabolen Bedingungen inhibiert, dissoziiert es vom ULK1-A13-FIP200-Komplex (Yu-shin Sou, Satoshi Waguri, Jun-ichi Iwata, Takashi Ueno, Tsutomu Fujimura et al. 2008). ULK1 wird darüber hinaus über die AMPK reguliert, die als Sensor des Energiestatus bei niedrigem ATP-Level und darauffolgender AMP-Akkumulation allosterisch aktiviert wird (Kim et al. 2011). Phosphorylierungsereignisse am ULK1-Protein durch die AMPK bedingen eine direkte Aktivierung des ULK1-Komplexes. Zudem wird ULK1 über eine Inhibition von mTORC1 indirekt aktiviert (Kim et al. 2011).

Auch der VPS34-Komplex unterliegt einer Regulierung durch mTORC1 und AMPK, ähnlich der ULK1-Steuerung. Der aktive mTORC1-Komplex phosphoryliert ATG14 und inhibiert die Kinaseaktivität des VPS34-Komplexes, die AMPK hingegen phosphoryliert BECN1 und stimuliert die VPS34-Kinaseaktivität (Kim et al. 2011). Somit regulieren mTORC1 und AMPK entgegengesetzt die Kinase-Aktivitäten von ULK1- und VPS34 in der Autophagosomenbiogenese.

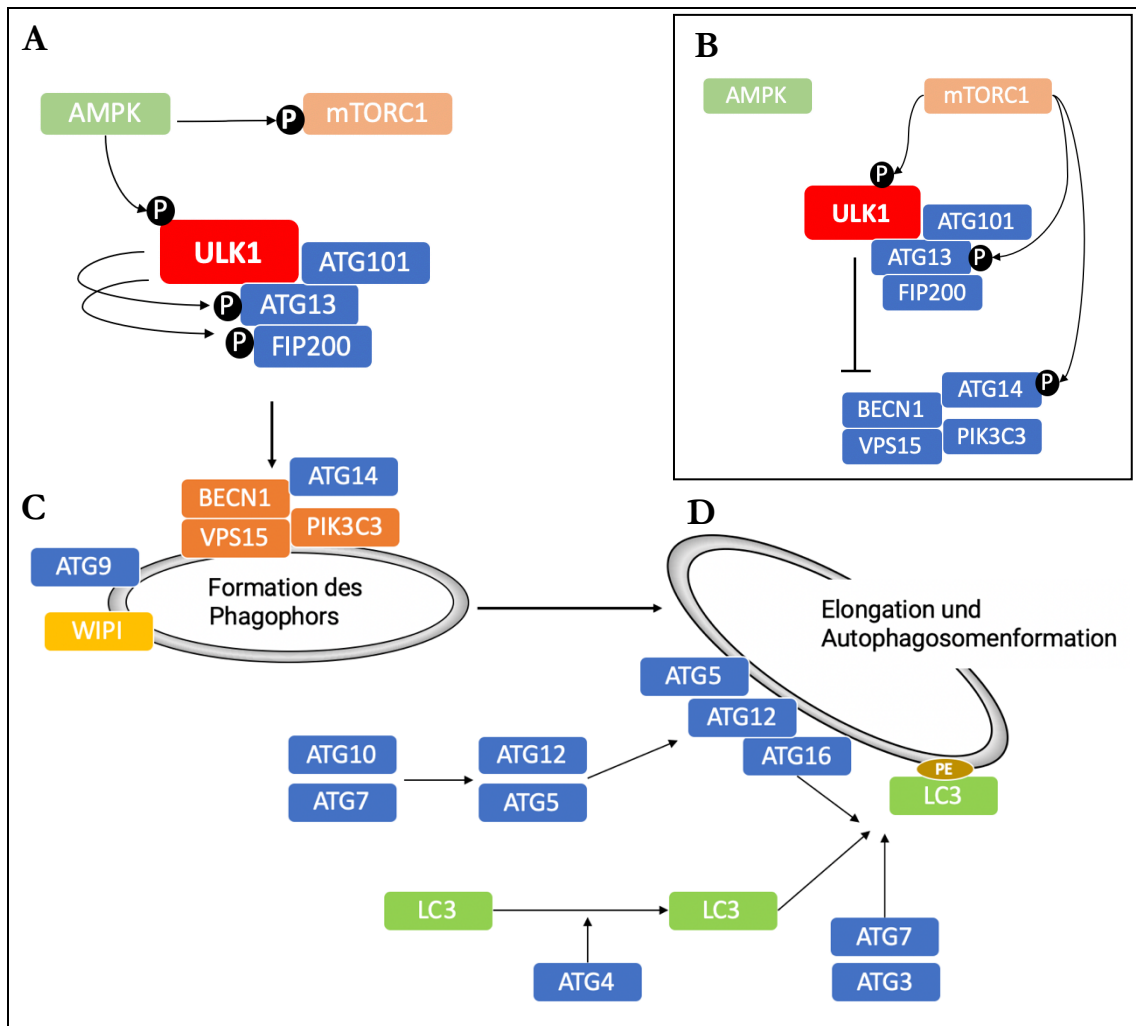


Abbildung 2: Molekularbiologische Grundlage der Makroautophagie.

Zu Beginn der Autophagiekaskade steht der ULK-1-Komplex, bestehend aus ULK1, ATG13, ATG101 in Verbindung mit dem Gerüstprotein FIP200. **(A)** Aktivierung der Autophagiekaskade: Durch Stressoren der Zellhomöostase, beispielsweise Energie- oder Nährstoffmangel, wird die AMP-Kinase (AMPK) als Sensor bei niedrigem ATP-Level und darauffolgender AMP-Akkumulation aktiviert. Durch Phosphorylierungsereignisse der AMPK am ULK1-Protein kommt es zur Aktivierung des ULK1-Komplexes. Zudem wird ULK1 über eine Inhibition von mTORC1 indirekt aktiviert. **(B)** Inhibition der Autophagiekaskade: Unter mTORC1-Aktivität werden katabole Prozesse wie Autophagie durch Phosphorylierungen von Serinresten im ULK1 sowie ATG13 gehemmt, und somit die Fähigkeit des ULK1-Komplexes zur weiteren Autophagie-Induktion inhibiert. **(C)** Formation des Phagophors: der VPS-Komplex besteht aus der Klasse-III-Phosphatidylinositol-3-Kinase (PIK3C3) und interagiert mit den autophagiespezifischen Kofaktoren Beclin1 (BECN1), ATG14 und dem VPS15-Gerüstprotein. In der Formation des Phagophors bildet dieser Komplex das Phosphatidylinositol-3-Phosphat (PI3P). **(D)** Elongation und Autophagosomenformation: Der Membranexpansionsprozess wird durch LC3 reguliert, das durch ein mit PI3P-(PE) wechselwirkendes Protein (WIPI2) in der Membran verankert wird. Zuvor durchläuft LC3 eine Aktivierungskaskade, die durch ATG4, ATG7, ATG3 und den Ligasekomplex ATG5-ATG12-ATG16L1 reguliert wird (eigene Abbildung).

Das an der weiteren Formation des Phagophors beteiligte Protein MAP1LC3B (*Microtubule-associated protein 1A/1B light chain 3B*, LC3) ist über das konjugierte Lipidmolekül

Phosphatidylethanolamin in der Isolationsmembran verankert (MAP1LC3-II, LC3-II), dient als spezifischer Marker für die Autophagosomen und ist immunhistochemisch darstellbar (Kabeya et al. 2000; Kim und Gladyshev 2004). Die Konjugation von LC3 durchläuft sequenziell die in Abbildung 2D dargestellte Kaskade, die durch ATG4, ATG7, ATG3 und den Ligasekomplex ATG5-ATG12-ATG16L1 reguliert wird (Mizushima et al. 2011). Während der Autophagosomenbiogenese steuert LC3 Membranbindungs- und Fusionsaktivitäten, um die Größe von Autophagosomen zu kontrollieren (Antonioli et al. 2017). Des Weiteren interagiert LC3 mit dem spezifischen Ladungsrezeptor *Sequestosome 1* (SQSTM1), auch Protein p62 genannt, der eine gewisse Selektivität in der Degradation von Ladungsbestandteilen der Autophagosomen induziert (Bjørkøy et al. 2009). SQSTM1/p62 rekrutiert diesbezüglich durch eine LC3-Interaktionsregion (LIR) ubiquitinierte Proteine für die autophagosomale Degradation und wird selbst durch Autophagie abgebaut (Bjørkøy et al. 2009). Da eine Inhibition der Autophagie infolgedessen zu einer Akkumulation von p62 führt, und sich durch Induktion verringerte Werte beobachten lassen, dient p62 als Marker der Autophagieaktivität (Bjørkøy et al. 2009).

1.2.3 Autophagie in Neuronen

Neurone sind postmitotische Zellen und können toxische Proteine nicht durch Zellteilung verdünnen, sodass sie insbesondere auf konstitutive Abbaewege wie Autophagie angewiesen sind (Redmann et al. 2016). In Studien der letzten Dekade konnte gezeigt werden, dass die Bildung von Autophagosomen in primären Neuronen überwiegend als ein konstitutiver Prozess im distalen Axon stattfindet (Maday et al. 2012; Maday 2016). Unter homöostatischen Bedingungen reichern sich Autophagosomen am distalen Axonende an und durchlaufen einen retrograden Transport entlang des Axons in Richtung Zellsoma (Maday et al. 2012; Maday und Holzbaur 2014; Maday 2016), angetrieben durch das Mikrotubuli assoziierte Motorprotein Dynein (Cheng et al. 2015). Wang et. al konnten zeigen, dass sowohl die präsynaptische Bildung von Autophagosomen, als auch der Beginn ihres retrograden Verkehrs durch präsynaptische Aktivitäten streng reguliert werden (Wang et al. 2015). Für den überwiegenden Anteil retrograd laufender Autophagosomen im mittleren Axonsabschnitt wurde in Untersuchungen eine Positivität für den späten Endosom-Lysosomenmarker *Lysosomal-membrane-associated-Protein-1* (LAMP1) nachgewiesen, was auf eine Fusion mit späten Endosomen und Lysosomen beim Austritt aus dem distalen Axon hinweist (Maday et al. 2012). Sowohl das Fusionsereignis selbst (Cheng et al. 2015), als auch der Erwerb der Gerüstproteine JIP1 und Huntingtin scheinen die Induktion des retrograden Transports zu triggern (Fu

et al. 2014; Maday 2016). Während der Wanderung entlang des Axons reifen die Autophagosomen zu degradierenden Autophagolysosomen, die sich entsprechend im proximalen Axon und Soma als angesäuerte Kompartimente mit erhöhten Abbaueigenschaften detektieren lassen (Maday et al. 2012; Maday und Holzbaur 2014; Maday 2016).

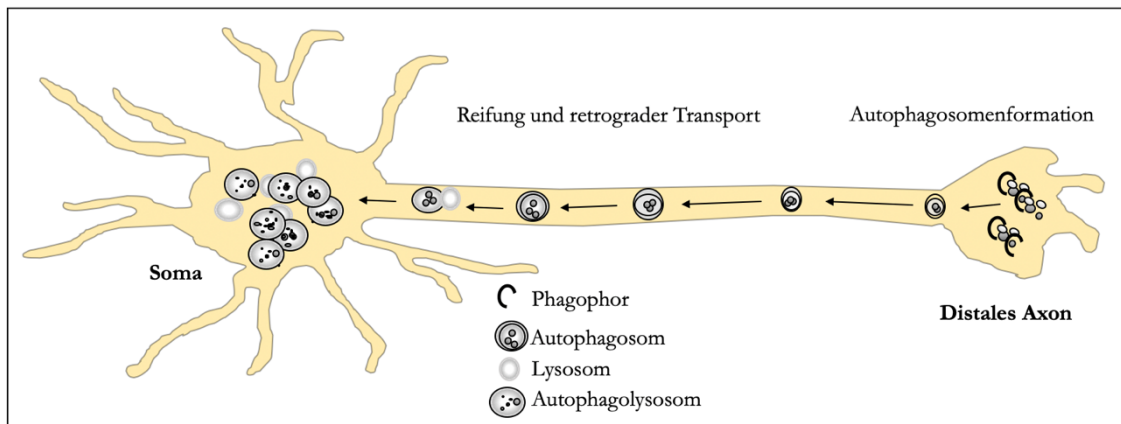


Abbildung 3: Modell der neuronalen Autophagie.

Im distalen Axonsegment formieren sich frühe Autophagosomen. Während des retrograden axonalen Transports der Autophagosomen reifen diese zu degradierenden Autophagolysosomen (eigene Abbildung).

1.2.4 Physiologische Funktion der Autophagie in Neuronen

Falsch gefaltete oder fehllokalisierte Proteine und Proteinaggregationen werden zum **Erhalt der neuronalen Zellhomöostase** durch Proteasomen und Lysosomen abgebaut (Ciechanover und Kwon 2015). Der altersbedingte Kapazitätsabfall dieser Abbauewege sowie Mutationen in den Schlüsselmolekülen führen zu einer verringerten Clearance und einer Zunahme neurotoxischer Proteine (Bingol 2018). In Tiermodellen konnten übereinstimmend neuroprotektive Funktionen der Autophagie durch Deletion von *Atg*-Genen gezeigt werden. Die Ausschaltung von neuronalem *Atg5* oder *Atg7* bei Mäusen verursachte eine Anhäufung von Proteinaggregaten, zeigte motorische Defizite und resultierte in einer progressiven Degeneration der Purkinjezellen des Cerebellums bei Mäusen (Hara et al. 2006; Komatsu et al. 2006). Trotz des ausgefallenen Aufbaus des Purkinjezellendendritenbaums konnte nur ein geringer degenerativer Effekt auf Dendriten und Dornenfortsätzen (*Spines*) beobachtet werden, was auf eine höhere Vulnerabilität der Axone bei fehlender Autophagie hindeutet (Komatsu et al. 2007).

Studien weisen darauf hin, dass Autophagie in molekularen Prozessen **neuronaler Entwicklung** auftritt, insbesondere in Mechanismen zur Feinabstimmung des frühen Axonwachstums (Ban et al. 2013). Interessanterweise verursachte die Inhibierung der

Autophagie durch kleine interferierende RNA (siRNA) am *ATG7* eine Verlängerung der Axone, während eine Aktivierung der Autophagie durch Rapamycin das Axonwachstum unterdrückt (Ban et al. 2013). In der Embryogenese ist ein komplexes Zusammenspiel zwischen Autophagie, Zellwachstum und Zelltod für die neuronale Entwicklung erforderlich (Fimia et al. 2007).

Neben der Aufrechterhaltung der axonalen Homöostase reguliert die Autophagie auch präsynaptische Funktionen einschließlich der **Neurotransmission** (Hernandez et al. 2012) und **Synapsenentwicklung** (Shen et al. 2015; Maday 2016). Zudem wird eine entscheidende Beteiligung von Autophagie zur Aufrechterhaltung der **Integrität des Proteoms** im distalen Axon vermutet (Maday 2016). Am distalen Axonende sind Proteine und Zellorganellen weit von ihrem primären Synthesort, dem Soma, entfernt (axonaler Transport ~ 10 mm pro Tag). Distale zytosolische Proteine sind vermutlich älter und anfälliger für Schädigungen. Zudem konnte nachgewiesen werden, dass distal akkumulierende Mitochondrien im Vergleich zu proximal liegenden Mitochondrien eine gealterte Struktur zeigen (Ferree et al. 2013) und in der mitochondrialen DNA vermehrt Mutationen aufweisen (Lehmann et al. 2011; Maday 2016).

Die o.g. Studien belegen, dass ein basales Level der Autophagie für den Erhalt der neuronalen Homöostase essentiell ist und in der Entwicklung und Funktion des zentralen Nervensystems eine wichtige Rolle spielt.

1.2.5 Therapeutische Modulation der Autophagie in der chronischen Neurodegeneration

Aufgrund der Tatsache, dass eine veränderte Autophagie eine entscheidende Rolle bei neurodegenerativen Prozessen einschließlich der axonalen Degeneration spielen könnte (Menzies et al. 2017), ist eine Beeinflussung der Autophagieregulation als therapeutischer Ansatzpunkt von großem Interesse. mTOR1-Signalweginhibitoren wie Rapamycin oder Sirolimus sind die am häufigsten verwendeten Autophagieinduktoren in aktuellen Studien (Wu et al. 2018). mTOR-Inhibitoren sind entweder ATP-kompetitive Inhibitoren (z. B. Torin1) oder nicht-ATP-kompetitive Inhibitoren, z. B. Rapamycin und Rapalogs (Kim und Guan 2015). Rapamycin als Induktor der Autophagie zeigte sich in verschiedenen Tiermodellen als eine potente Therapiestrategie gegen chronisch-neurodegenerative Prozesse, vermittelt durch eine erhöhte *Clearance* von Proteinaggregaten oder pathologischen Proteinen wie phosphoryliertes Tau, α -Synuclein oder Huntingtin-Fragmenten (Williams et al. 2006; Sarkar et al. 2008; Bingol 2018). Klinische Studien beim Menschen bleiben jedoch abzuwarten, auch

vor dem Hintergrund möglicher Langzeitnebenwirkungen, da mTOR als Regulator vieler Stoffwechselwege der Zellhomöostase und des Immunsystems entscheidend in eine Vielzahl von Autophagie unabhängigen Wegen eingreift (Li J et al. 2014). Die Suche nach weiteren selektiven Aktivatoren und Inhibitoren der Autophagie und die schnelle Erprobung in translativen Ansätzen bleibt somit aus neurowissenschaftlicher Sicht ein hochaktuelles Thema.

Eine heraufregulierte Autophagie konnte auch in mTORC1-unabhängigen Aktivierungen neuroprotektive Effekte zeigen. Trehalose ist ein Disaccharid, das Autophagie durch eine Hemmung des gelösten Glukosetransporters 2A (SLC2A / GLUT) induziert, indem bei steigenden Glukosespiegeln die AMPK als Autophagie-Initiator fungiert (Sarkar et al. 2007; DeBosch et al. 2016). In einer Vielzahl von Tiermodellen zu *Levy-body*-Erkrankungen wie Morbus Parkinson (Tanji et al. 2015), Tauopathien (Schaeffer und Goedert 2012) und ALS (Castillo et al. 2013) konnte die Induktion der Autophagie durch Trehalose vorteilhafte Effekte zeigen (Menzies et al. 2017). Metformin ist ein weiterer AMPK-abhängiger Autophagie-Induktor, der sich in Tiermodellen zur Neurodegeneration bei Alzheimer-Erkrankung positiv ausgewirkt hat (Son et al. 2016).

Weitere Strategien zur Aktivierung der Autophagie umfassen die Hemmung des Inositolmonophosphatase-Wegs durch Lithium und Natriumvalproat. Es konnte u.a. eine Verhinderung des neurodegenerativen Phänotyps in einem Huntington-Tiermodell gezeigt werden, indem der Einsatz dieser Substanzen die mutierte Huntingtinaggregation reduzierte (Williams et al., 2008; Sarkar et al., 2008). Auch die Hemmung der Acetyltransferasen durch Spermidin und die Hemmung der cytosolischen Protease Calpain durch Calpastatin wurden als Autophagie-Induktoren erfolgreich eingesetzt (Eisenberg et al. 2009; Menzies et al. 2015).

1.2.6 Autophagie in der akuten axonalen Degeneration des ZNS

Nach verschiedenen akuten Verletzungsmustern des ZNS, einschließlich traumatischer Hirnverletzung, Apoplex oder globaler zerebraler Ischämie, konnte in degenerierenden Neuronen eine erhöhte Aktivität der Autophagie detektiert werden (Koch et al. 2010; Ribas et al. 2015; Menzies et al. 2017; Wolf et al. 2019). Wie bereits in Kapitel 1.1.2 (Seite 2) beschrieben, konnte in mehreren experimentellen Modellen zur Erforschung akuter traumatischer Nervenläsionen innerhalb der ersten Minuten eine signifikante Zunahme von LC3-II positiven Autophagosomen beobachtet werden (Lai et al. 2008; Liu et al. 2008; Knoferle et al. 2010). Koch und Lingor et. al. konnten im Läsionsmodell des optischen Nerven zeigen, dass dem Tod von retinalen Ganglienzellen (*Retinal ganglion cell*, RGC) eine deutliche Aktivierung der

Autophagie vorausging (Koch und Lingor 2016). Nach Rückenmarksverletzungen im Mausmodell wurde innerhalb der ersten Stunden postläsional eine hochregulierte Expression von ULK1, ATG7 und ATG5 in den degenerierenden Axonen nachgewiesen (Ribas et al. 2015).

Studien der letzten Dekade legen zudem nahe, dass Autophagie in der akuten axonalen Degeneration nach Rückenmarksverletzungen auch über den AMPK/ULK1-Weg vermittelt wird und eine Hemmung der Autophagosomenbildung durch 3-Metyhladenin (3-MA) oder Compound C (AMPK-Hemmung) das Überleben axotomisierter Neurone verbessert (Bisicchia et al. 2017). Eine lokale Applikation des Autophagie-Inhibitors 3-MA im *N. opticus* der Ratte konnte die AAD *in vivo* signifikant verzögern (Knoferle et al. 2010). Die vorteilhafte Wirkung auf die axonale Integrität konnte auch in *In-vitro*-Modellen durch Hemmung der Autophagie mit niedermolekulare Molekülen und siRNA gezeigt werden (Yang et al. 2007). *In vivo*-Modelle zu traumatischen Hirnverletzungen konnten zudem im Widerspruch stehende Ergebnisse zu den chronisch-degenerativen Krankheitsmodellen bezüglich Rapamycin-Behandlung aufzeigen. Die Behandlung mit der autophagieinduzierenden Substanz Rapamycin steigert die funktionelle Erholung kortikaler Neurone signifikant und zeigt neuroprotektive Behandlungseffekte bei akuten traumatischen Hirnverletzungen (Erlich et al. 2007).

Ein Atg7-Knockdown schützt im Zellkulturmodell partiell Neuronen vor akuten degenerativen Prozessen innerhalb der ersten Stunden nach Axotomie (Yang et al. 2007). Auch in akuten hypoxisch-ischämischen Zuständen, wie sie bei einem Apoplex zu finden sind, erhöht eine Inhibition der Autophagie durch Ausschaltung von Atg7 das Überleben von Neuronen im Mausmodell (Koiike et al. 2008; Xie et al. 2016). In dopaminergen Neuronen wurde unter Atg7-Deletion zudem eine protektive Wirkung auf die retrograde axonale Degeneration detektiert (Cheng et al. 2011).

Diese Daten legen nahe, dass die Autophagie eine tragende Rolle im Initiierungsprozess akuter axonaler Degenerationsprozesse spielen und eine therapeutische Modulation der Autophagiekaskade ein mögliches Ziel für die Minimierung neurologischer Defizite akuter Nervenläsionen darstellen könnte.

1.2.7 ULK1-Inhibition in der axonalen Degeneration

Die erhöhte Expression von ULK, einem zentralen Schaltelement im Initiierungsprozess der Autophagie (Koyama-Honda et al. 2013; Petherick et al. 2015; Bingol 2018), konnte in der AAD insbesondere im Bereich der Läsionsstelle nachgewiesen werden (Ribas et al. 2015).

Egan et al. entdeckten und charakterisierten einen potenten und hoch spezifischen, niedermolekularen **ULK1-Kinase-Inhibitor**, den sog. **SBI-0206965** (Egan et al. 2015), siehe Abbildung 4. Die Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass die nachgeschalteten Phosphorylierungsereignisse von ULK1 durch SBI-0206965 *in vitro* supprimiert werden und somit eine potente Inhibition der Autophagie erreicht werden kann (Egan et al. 2015). Zudem konnte eine möglicherweise erhöhte Sensitivität von SBI-0206965 auf den aktiven Pool von ULK1-Kinasekomplexen beobachtet werden, da ULK1 und sein Bindungspartner ATG13 nur durch Kombination mit Nahrungsmangel oder mit mTOR-Inhibitoren (erhöhte Autophagieaktivität) selektiv abgebaut wurden, jedoch nicht durch eine dieser Behandlungen allein (Egan et al. 2015).

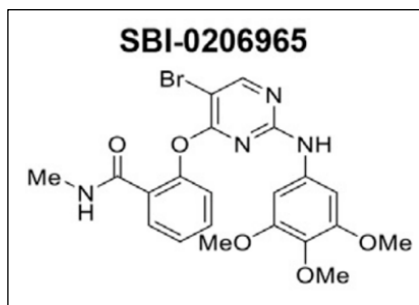


Abbildung 4: SBI-0206965.
Chemische Strukturformel des
ULK1-Kinase-Inhibitors.

In-vitro-Studien konnten zeigen, dass Autophagie durch Expression einer dominant negativen Form von ULK1 (ULK1.DN), bestehend aus der C-terminale Domäne (CTD) von ULK1, gehemmt werden kann (Chan et al. 2008). Eine Überexpression von ULK1.DN in primären kortikalen Neuronen sowie im Rückenmark und im optischen Nerven führte zu einer signifikanten Hemmung der Autophagie und zeigte protektive Effekte auf die AAD *in vivo* (Vahsen et al. 2020).

Es ist nach wie vor fraglich, ob eine selektive ULK1-Inhibition in der axonalen Degeneration von Vorteil sein könnte. Bisher ist eine mögliche Beeinflussung der Autophagie durch selektive Hemmstoffe in der AAD und in chronisch-degenerativen Axonprozessen als therapeutischer Ansatzpunkt in der Frühphase noch unzureichend erforscht. ULK1 stellt jedoch als medikamentös angreifbare Serin/Threonin-Kinase ein attraktives Ziel für die Modulation durch niedermolekulare Stoffe dar (Jiang et al. 2015). SBI-0206965 soll in der vorliegenden Studie im translationalen Ansatz auf eine mögliche Übertragbarkeit in das komplexe Umfeld des ZNS *in vivo* auf protektive Effekte in der akuten axonalen Degeneration überprüft werden.

1.3 Untersuchung von axonalen Degenerationsprozessen im optischen Nerv

1.3.1 Der *N. opticus* als Modellsystem für axonale Degeneration *in vivo*

Axonale Degenerationsprozesse finden sich in einer Vielzahl von Erkrankungspathologien des optischen Nervs wieder, einschließlich inflammatorischer Erkrankungen wie Neuritis nervi optici (Costello et al. 2006), hereditären Atrophien wie der Leberschen Optikusatrophie (Calkins und Horne 2012), oder bei traumatischen und mechanischen Läsionen des *Nervus opticus*, beispielsweise durch lokales Tumorwachstum oder ein Schädelhirntrauma (Ghaffarieh und Levin 2012). Den degenerativen Veränderungen in den Axonen der retinalen Ganglienzellen (RGC) folgt meist unabdingbar der neuronale Zelltod der betroffenen RGC (Rabacchi et al. 1994) und führt zu sekundären Degenerationsschäden in benachbarten RGC-Neuronen und Gliazellen (Li HY et al. 2014).

Der optische Nerv ist in vorangegangenen Studien als etabliertes Modellsystem zur Evaluation der Pathophysiologie degenerativer axonaler Prozesse im ZNS erfolgreich verwendet worden (Koch et al. 2011). Dies ist insbesondere in einer chirurgisch unkomplizierten und anatomisch gut darstellbaren Erreichbarkeit begründet sowie in der Möglichkeit, RGC-Axone durch intravitreale Injektionen viraler Vektoren oder pharmakologischer Substanzen zu manipulieren (Koch et al. 2011). Weiterhin konnten Studien belegen, dass die Aktivierung der Autophagiekaskade eines der wesentlichen Merkmale der akuten und chronischen axonalen Degeneration im Sehnerven darstellt, sodass dieses Modellsystem für die vorliegende Studie als höchst geeignet erscheint (Kim et al. 2008; Knoferle et al. 2010; Deng et al. 2013; Munemasa und Kitaoka 2015; Koch und Lingor 2016).

1.3.2 Induktion der axonalen Degeneration durch *Crush-Läsion*

Um die Mechanismen der axonalen De- und Regeneration zu untersuchen, dienten in der Vergangenheit zumeist traumatische Läsionsmodelle des optischen Nervs. Unter dem Begriff Axotomie versteht man die Transsektion des gesamten Nervs, was in RGC-Axonen zur akuten und folgend zur chronisch-axonalen Degeneration führt, und letztlich im apoptotischen Zelltod der RGC-Neurone endet (Rabacchi et al. 1994). Eine spezielle Form der Axotomie ist der sog. „*Optic nerve crush*“ (ONC). Eine den Nerv umschlingende Naht führt hierbei an definierter Stelle zur vollständigen Durchtrennung aller Axone, während die anatomischen Strukturen des Sehnervs intakt bleiben (Lingor et al. 2007; Knoferle et al. 2010; Koch

et al. 2011). Ein solches Läsionsmodell am *N. opticus* hat sich in Kombination mit einem *Live-imaging*-Verfahren *in vivo* zur Untersuchung der axonalen Degeneration bereits bewährt (Knoferle et al. 2010).

1.3.3 *Live imaging* des optischen Nervs im ZNS

Durch die *Live-imaging*-Technik lassen sich Einblicke in dynamische Prozesse der Zellmorphologie, der Interaktion von Proteinen oder in Zellorganelldynamiken gewinnen, um ein besseres Verständnis biologischer Funktionen zu erlangen (Baker 2010). Durch die *in vivo* Mikroskopie des optischen Nervs bietet sich die Möglichkeit, Dynamiken der axonalen Degeneration am lebenden Tier, die sich in den RGC-Axonon teilweise in Sekunden abspielen, adäquat zu analysieren (Knoferle et al. 2010; Koch et al. 2011). Im fixierten Nervengewebe wäre die Aussagekraft zu morphologischen Veränderungen durch Fixations- und Färbefakte sowie eine begrenzte Zeitkinetik bezeichnend eingeschränkt. Weiterhin wird vermutet, dass Störungen im axonalen Transport, in mitochondrialen Funktionen und in der intraaxonalen Calciumhomöostase wichtige Schlüsselereignisse in der Pathogenese axonaler Degeneration darstellen (Coleman 2005), deren Dynamik sich im fixierten Gewebe gleichermaßen nur unzureichend untersuchen ließe. Demnach erscheint die *In-vivo*-Livebildgebung zur Analyse axonaler Degenerationsmechanismen als Methode der Wahl (Koch et al. 2011).

Koch et. al. etablierten ein *Live-imaging*-Setup, in dem einzelne Axone des Sehnervs *in vivo* über einen Zeitraum von bis zu 8 Stunden visualisiert werden können (Knoferle et al. 2010; Koch et al. 2011). Die RGC-Axone werden durch intravitreale Injektionen viraler Vektoren, die fluoreszierende Proteine (Fluorophore) exprimieren, sichtbar gemacht. Vorteilhaft ist diesbezüglich die mögliche Auswahl zelltypspezifischer Markierungsvektoren, beispielsweise durch adenoassoziierte virale Vektoren (AAV), sowie die Möglichkeit einer Co-Expression von Fluorophoren und einem Protein oder shRNA (Small hairpin RNA, Fähigkeit zur spezifischen und dauerhaften Genestillegung). Beispielsweise wurden zur Rolle des ROCK-Knockdowns im Rahmen der axonalen De- und Regeneration Untersuchungen durchgeführt, bei denen AAV gleichzeitig Fluorophore zur axonalen Visualisierung sowie eine shRNA gegen die Proteinkinase ROCK co-exprimierten (Koch et al. 2014). Zudem kann in Abhängigkeit des Mikroskopieaufbaus eine breite Auswahl an Fluorophoren wie EGFP (*enhanced green fluorescent protein*), dsRed und mCherry im *Live-Imaging*-Setup Verwendung finden (Koch et al. 2011).

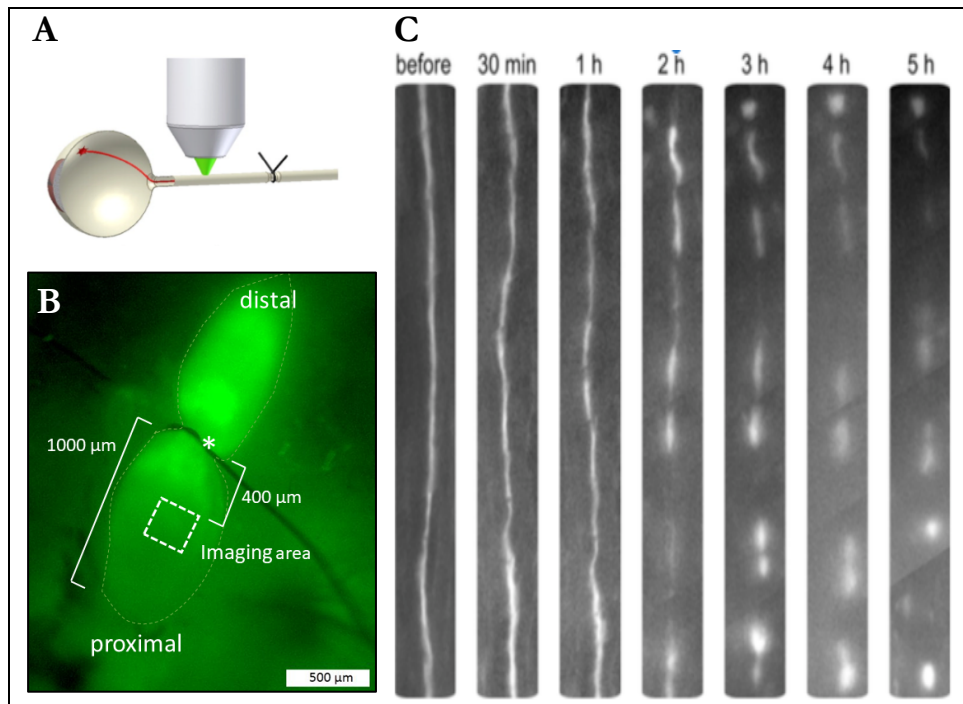


Abbildung 5: Live-imaging-Mikroskopie des optischen Nervs.

Visualisierung der retinalen Ganglienzellaxone (RGC) im optischen Nerv (ON) *in vivo*. **(A)** Schema des experimentellen Setups. RGC (rot) werden durch intravitreale Injektionen von adenoassoziierten viralen Vektoren (AAV), die EGFP exprimieren, visualisiert (mit freundlicher Genehmigung von PD Dr. J.C. Koch). **(B)** ON unter dem Fluoreszenzmikroskop (EGFP-Kanal) mit *Optic nerve crush* (ONC): Eine den Nerv umschlingende Naht (Sternmarkierung) führt an definierter Stelle zur vollständigen Durchtrennung der Axone (Eigene Aufnahme). **(C)** Repräsentativer Bildausschnitt EGFP-markierter RGC-Axone 500 µm proximal der Läsionsstelle mit degenerativen Veränderungen im zeitlichen Verlauf vor- und bis 300 Minuten nach ONC. Die Bilder zeigen generierte 2D-Projektionen aus originalen Z-Stack-Bildaufnahmen (eigene Aufnahme).

1.4 Fragestellung und Zielsetzung der Studie

Der Pathomechanismus der axonalen Degeneration spielt sowohl bei akuten Nervenschädigungen (AAD) als auch im Rahmen von chronisch-neurodegenerativen Erkrankungen eine zentrale Rolle. Auf molekularer Ebene konnte hierbei eine Beteiligung von Prozessen der Autophagie gezeigt werden, bei deren Initiierung der ULK1-Kinase eine besondere Bedeutung zukommt. Das ULK-1-Protein stellt als medikamentös angreifbare Serin/Threonin-Kinase ein attraktives Ziel für die Beeinflussung durch niedermolekulare Moleküle dar.

Die vorliegende Studie soll in einem Modell der mechanischen Nervenschädigung untersuchen, ob der selektive ULK-1-Inhibitor SBI 0206965 akute axonale Degeneration *in vivo* beeinflusst.

Im Einzelnen sollen die folgenden Fragen beantwortet werden:

- Welchen Effekt hat die intravitreale Injektion von SBI-0206965 auf die Autophagie in RGC-Neuronen des optischen Nervs?
- Beeinflusst die intravitreale Injektion von SBI-0206965 intraneuronale Autophagie nach *Crush*-Läsion des optischen Nervs?
- Wie verändert sich die Autophagieaktivität nach Applikation von SBI-0206965 in der Analyse molekularer Autophagie-Marker wie LC3 und p62?
- Zeigt der ULK-1-Inhibitor SBI-0206965 einen Effekt auf die Stabilität und Integrität von Axonen in den ersten 5 Stunden nach *Crush*-Läsion des optischen Nervs?
- Zeigen sich unter SBI-0206965-Behandlung Veränderungen in der Kinetik und Morphologie der axonalen Axonaufreibungen (axonale *Bulbs*)?

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Equipment

Tabelle 1: Equipment

MATERIAL	HERSTELLER
Chirurgisches Nahtmaterial: Faden 10-0 VICRYL <i>Cryomatrix</i> TM	Ethicon (New Brunswick, USA) Thermo Scientific (Bremen, DE)
Cryostat CM 3050 S	Leica (Wetzlar, DE)
Deckgläser 24 x 36 mm	Gehard Menzel GmbH (Braunschweig, DE)
<i>Eclipse</i> TM Nadeln 23 Gx1 (0,6mm x 25 mm)	BD (Heidelberg, DE)
Eismaschine	Scotam (Pogliano Milanese, Italien)
Epifluoreszenzmikroskop	Zeiss (Jena, DE)
<ul style="list-style-type: none"> - <i>AXIO Examiner.Z1</i> - <i>AxioCam MRm3 S/N 5217</i> - Wasserimmersionsobjektiv: Plan-APOCHROMAT, ×40/1,0 	
Feinwaage	Sartorius (Göttingen, DE)
<i>Hairclipper</i>	WAHL (Sterling, USA)
Heizpad (<i>Homeothermic Warming System, Right Temp</i> TM , <i>Animal Sensor</i>)	Kent Scientific corporation (Torrington, USA)
Injektionskanüle	Braun (Melsungen, DE)
Injektionsspritze 701 RN 26s ga, 10µl	Hamilton (Bonaduz, Schweiz)
Käfigsystem, Makrolon Typ 4	Tecniplast (Hohenpeißenberg, DE)
Konfokales Mikroskop, Leica TCS SP5	Leica Camera AG (Wetzlar, DE)
<ul style="list-style-type: none"> - 40x/1.25 NA Öl-Immersion-Objektiv 	
Labortücher	Kimberly-Clark Professional (Villey-Saint-Etienne, Frankreich)
Magnetrührer	Heidolph Instruments (Schwabach, DE)
<i>Micro-Bohrer, Rotary Micromotor</i>	Foredom (Bethel NY, USA)
Mikroschere, Cohann-Vannas Spring, 15000-02	Fine Science Tools (North Vancouver, Canada)
<i>Minishaker</i> MS2	IKA Werke GmbH & Co. KG (Staufen im Breisgau, DE)

MATERIAL UND METHODEN

MATERIAL	HERSTELLER
Objektivbeheizung; <i>Pecon Tempcontrol mini</i>	PeCon GmbH (Erbach, DE)
Objekträger, Superfrost PLUS	Gehard Menzel GmbH (Braunschweig, DE)
Operationshaken	Eigenanfertigung
<i>pH</i> -Meter	Sartorius (Göttingen, DE)
Pinsel (Gr. 2)	Pelikan (Berlin, DE)
Pipetten	Gilson (Villiers de belle, Frankreich)
<i>Plastipak</i> TM Spritzen 1 ml	BD (Heidelberg, DE)
Präzisionspinzetten, Typ 5, 11253-20	Dumont (Montignez, Schweiz)
Pulsoxymeter (Model 2500A VET)	Nonin Medical, (Plymouth, USA)
<i>RA-6N rat head holding adaptor</i>	NARISHIGE (Tokyo, Japan)
Rattenpositionierungssystem	Eigenanfertigung
Reagenzgefäß 1,5 ml	Sarstedt (Nümbrecht, DE)
Röhre 50 ml 114x28 mm	Sarstedt (Nümbrecht, DE)
<i>Shaker</i> DRS-12	LTF Labortechnik GmbH (Wasserburg, DE)
Skalpell	Dahlhausen (Köln, DE)
Stereomikroskop, <i>OPMI pico</i>	Zeiss (Jena, DE)
Thermokoagulator	Bovie (Clearwater, USA)
- <i>Change-A-Tip</i> TM	
- <i>High Temperature Handle</i>	
Transferpipette 1ml	Sarstedt (Nümbrecht, DE)
Wasserbad	GFL (Burgwedel, DE)
Zentrifuge 5415C	Eppendorf AG (Hamburg, DE)

2.1.1 Reagenzien

Tabelle 2: Reagenzien

CHEMIKALIE	HERSTELLER
Adeno-assoziierte virale Vektoren (AAV)	Sigma Aldrich (Taufkirchen, DE)
Bepanthen® Augen- und Nasensalbe	Bayer (Leverkusen, DE)
Buprenorphin-Hydrochlorid	Amrican Regent (New York, USA)
DAKO Antibody Diluent	Dako (Hamburg, DE)
DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol)	Sigma Aldrich (Taufkirchen, DE)
DMSO (Dimethylsulfoxid)	AppliChem (Darmstadt, DE)
Ethanol	AppliChem (Darmstadt, DE)
Glukose	Merck (Darmstadt, Germany)
Glycerol	Roth (Karlsruhe, DE)
HCl (Salzsäure)	Merck (Darmstadt, DE)
Ketamine 10%	Medistar (Ascheberg, DE)
Meditomidinhydrochlorid 1mg/ml	Zoetis (Louvain-la-Neuve, Belgien)
Methanol	AppliChem (Darmstadt, DE)
Mowiol	Sigma Aldrich (Taufkirchen, DE)
NaCl 0,9% (Natriumchlorid)	Braun (Melsungen, DE)
NaOH (Natriummonoxid)	AppliChem (Darmstadt, DE)
PBS (<i>Phosphate-Buffered Saline</i>)	AppliChem (Darmstadt, DE)
PFA (Paraformaldehyd)	AppliChem (Darmstadt, DE)
SDS (<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>)	AppliChem (Darmstadt, DE)
Sterofundin	Braun (Melsungen, DE)
Sukrose	AppliChem (Darmstadt, DE)
Tris (Tris(hydroxymethyl)aminomethan)	AppliChem (Darmstadt, DE)
TritonX 100	AppliChem (Darmstadt, DE)
Wasserstoffperoxid 30%	Merck (Darmstadt, DE)

2.1.2 Puffer und Lösungen

Tabelle 3: Puffer und Lösungen

LÖSUNG / PUFFER	ZUSAMMENSETZUNG
Sukrose-Lösung 30%	30 g Sucrose in 0,1 M PB auf 100 ml
Blocker-Lösung NGS (<i>Normal goat serum</i>)	10 % NGS, 0.1 % TritonX 100 in PBS
DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol)	1 µg/ ml DAPI in PBS
Mowiol	6 g Glycerol 2.4 g Mowiol 6 ml H ₂ O 12 ml Tris, pH 7.2
PBS (<i>Phosphate-buffered Saline</i>)	138 mM Natriumchlorid 2,7 mM Kaliumchlorid 10 mM Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat 2 mM Potassiumphosphat
PBS/Wasserstoffperoxid-Lösung	45 ml PBS 5 ml 30 % Wasserstoffperoxid
PFA (Paraformaldehyd) 4 %	4 g PFA pro 100 ml 0,2 M Phosphatpuffer (PB = 21,8 g/l Na ₂ HPO ₄ , 6,28 g/l NaH ₂ PO ₄) pH 7,4, 4° C
TBS (<i>Tris buffered saline</i>)	Tris 0,05 M, pH 7,4 + 150 mM NaCl in destilliertem Wasser Tris 0,1 M, pH 9,0 Tris 0,1 M, pH 7,6, NaCl 0,9 %

2.1.3 Antikörper, Kits und Inhibitor

Tabelle 4: Primäre Antikörper

ANTIKÖRPER	VERDÜNNUNG	HERSTELLER
<i>Anti-LC3, goat, sc-16756, α/β, polyclonal</i>	1:50	Santa Cruz Blotechnology (Dallas, TX, USA)
<i>Anti-p62, rabbit, P0067, polyclonal</i>	1:2000	Sigma Aldrich (Taufkirchen, DE)
<i>Anti-SMI32, mouse, SMI32P, monoclonal</i>	1:1000	Covance (San Diego, USA)

Tabelle 5: Sekundäre Antikörper

ANTIKÖRPER	VERDÜNNUNG	HERSTELLER
<i>Alexa Fluor 546 donkey anti-rabbit, polyclonal</i>	1:250	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
<i>Alexa Fluor 647 donkey anti-mouse, polyclonal</i>	1:250	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
<i>Cy3 donkey anti-goat, polyclonal</i>	1:250	Dianova (Hamburg, DE)
<i>Goat anti-rabbit, biotinylated, polyclonal</i>	1:200	Dianova (Hamburg, DE)

Tabelle 6: Kits

KIT	HERSTELLER
<i>Diaminobenzidin-Kit (DAB)</i>	Vector Laboratories (Burlingame, USA)
<i>VECTASTAIN ABC Peroxidase Standard Kit</i>	Vector Laboratories (Burlingame, USA)

Tabelle 7: Inhibitoren

INHIBITOR	HERSTELLER
SBI-0206965	APExBIO (Houston, USA)

2.1.4 Software

Tabelle 8: Verwendete Software

SOFTWARE	HERSTELLER
AxioVision 4.8	Carl Zeiss Microscopy GmbH (Jena, DE)
GraphPad Prism 8	GraphPad Software (San Diego, USA)
ImageJ 1.51g	National Institutes of Health (Wayne Rasband, USA)
Mendeley 1.19.4	Mendeley Ltd., Elsevier Verlag (Amsterdam, Niederlande)
Microsoft Excel 16.16.11	Microsoft Corporation (Redmond, Washington, USA)
Microsoft Word 16.16.11	Microsoft Corporation (Redmond, Washington, USA)
ZEN pro 2011 (Blue edition)	Carl Zeiss MicroImaging GmbH (Jena, DE)

2.2 Imaging des optischen Nervs

2.2.1 Studiendesign

Die vorliegende Arbeit umfasst als verblindete Interventionsstudie die Analyse des Effektes einer niedermolekularen Inhibition der Serine/Threonin-Proteinkinase ULK1 durch den Autophagie-Inhibitor SBI-0206965 in der AAD *in vivo*. Diesbezüglich wurde ein *Live-imaging*-Modell des optischen Nervs (ON) verwendet (Knoferle et al. 2010), das die Darstellung einzelner RGC-Axone des *Nervus opticus* der Ratte über einen Zeitraum von 300 Minuten nach erfolgter *Crush*-Läsion erlaubt (Koch et al. 2011). In der vorliegenden Studie wurden zunächst 39 Tiere in Kontroll- und Interventionsgruppen eingeteilt, wie in Tabelle 9 dargestellt.

Zur Visualisierung einzelner RGC-Axone erfolgte bei allen Tieren 14 Tage vor der *In-vivo-live-imaging*-Mikroskopie eine intravitreale Injektion (s. Kapitel 2.2.4) von AAV-Vektoren (*adeno-assoziiert*, AAV), die ein fluoreszierendes Protein exprimierten. 2,5 Stunden vor gesetzter *Crush*-Läsion (s. Kapitel 2.2.8) wurde der Inhibitor SBI-0206965 in 5 μ M, 50 μ M oder eine DMSO-Kontrolllösung intravitreal appliziert. Nach operativer Freilegung des ON und ONC (*Optic nerve crush*) erfolgte das *Live-imaging* der RGC-Axone 400 μ m proximal zur Läsion über 300 Minuten (s. Kapitel 2.2.9). Weiterführenden Details dieser Experimente sind in den folgenden Kapiteln näher erläutert.

Tabelle 9: Übersicht Versuchsgruppen

GRUPPEN	N	GESCHLECHT
DMSO	13	♀
5 μ M SBI	13	♀
50 μ M SBI	13	♀

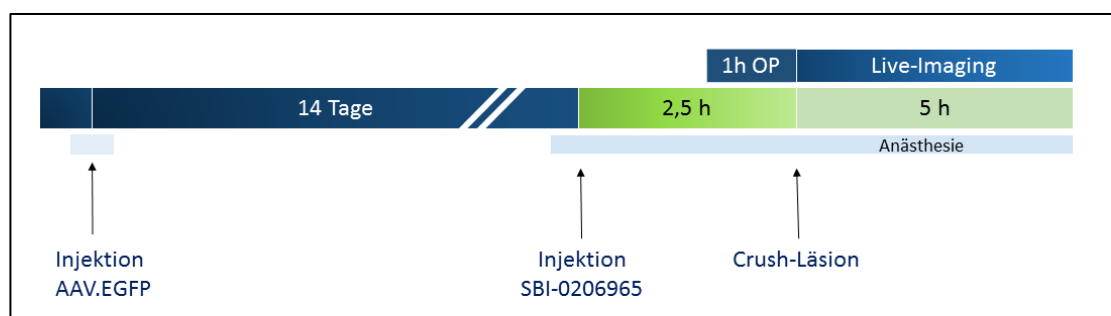


Abbildung 6: Schematische Darstellung zum tierexperimentellen Design.

2.2.2 Versuchstiere

Für die im Folgenden beschriebenen Experimente eigneten sich weibliche Ratten vom Typ *Wistar* (Zucht der *Charles River GmbH*, Sulzfeld, DE), mit einem Körpergewicht von 250 bis 350 g und einem Alter von 13 Wochen. Aufgrund der anatomisch recht großen, intraorbitalen Strukturen brachten diese Tiere die passenden Eigenschaften für die unproblematische Durchführung einer operativen Freilegung des ON mit sich.

Die in die Studie eingeschlossenen Versuchstiere wurden entsprechend den Vorgaben der Gesellschaft für Versuchstierkunde (GV Solas) unter Standardbedingungen, maximal zu fünf in einem Käfig, in der Zentralen Tierexperimentellen Einrichtung der Universitätsmedizin Göttingen (ZTE – UMG) gehalten. Die Tag-Nacht-Photoperiode betrug 12:12 Stunden, bei einer Raumtemperatur von 22 - 24 °C sowie konstanter Luftfeuchtigkeit von 60 % und einer *ad libitum*-Fütterung mit Trockenpellets als vollwertige Alleinfuttermischung (ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland).

Diese Studie wurden in Übereinstimmung mit bestehenden nationalen und internationalen Richtlinien im Umgang mit Versuchstieren sowie nach dem deutschen Tierschutzgesetz (TierSchG) durchgeführt und vom Niedersächsischen Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (LAVES Niedersachsen) als zuständige Behörde geprüft und genehmigt. Eine regelmäßige Kontrolle erfolgte durch die veterinärmedizinische Abteilung der ZTE in der Universitätsklinik Göttingen. Sämtliche beschriebenen Tierversuche inklusive der Anästhesie wurden persönlich oder in direkter Supervision durch die hierzu berechtigten Ärzte Dr. A. Böcker und PD Dr. J. C. Koch durchgeführt.

2.2.3 Anästhesie und Monitoring

Die Versuchstiere wurden mittels intraperitonealer (i.p.) Injektion von Ketamin 10% in einer Dosierung von 75,0 mg/kg Körpergewicht und Medetomidinhydrochlorid 1mg/ml in einer Dosierung von 0,5 mg/kg Körpergewicht narkotisiert. Diesbezüglich wurde die Injektionskanüle in senkrechter Einstichtechnik in den linken, unteren Quadranten, lateral der *Linea alba*, eingestochen. Dies führte in der Regel zu einer ausreichenden anästhetischen Wirkung nach 10 - 15 min. Die Körpertemperatur wurde durch ein homeothermisches Wärmesystem (*Homeothermic Warming System, Far Infrared Warming Pad, Animal Sensor*) automatisch angepasst und konstant bei 36° C gehalten. Die Narkosetiefe konnte anhand von Herzfrequenz, Atmung sowie Zwischenzehen- und Kornealreflex visuell und palpabel überwacht werden. Zur Aufrechterhaltung der Anästhesie während der intravitrealen Injektionen, der operativen Freilegung des ON sowie der anschließenden *Live-imaging*-Mikroskopie (Narkosegesamtzeit

ca. 8 h) bedurfte es zusätzlicher Dosen von Ketamin/Meditomidinhydrochlorid (30% der Initialdosis i.p.), etwa alle 60 min in individueller Anpassung je nach Tier. Alle 3 Stunden wurden 2 ml Flüssigkeit und Elektrolyte in Form von Sterofundin *i.p.* oder *i.c.* injiziert. Ein präanästhetisches Nüchternhalten war nicht notwendig und ist bei Ratten kontraindiziert (Hypoglykämiegefahr).

2.2.4 Visualisierung der Axone des *N. opticus* durch intravitreale Injektion von AAV-Vektoren *in vivo*

Zur Visualisierung einzelner RGC-Axone im ON wurde zwei Wochen vor dem ONC und anschließendem *Live imaging* adeno-assoziierte virale Vektoren (AAV.eGFP) in den intravitrealen Raum (Glaskörper) injiziert, die das Fluoreszenzprotein eGFP (*enhanced Green Fluorescent Protein*) exprimierten. Durch die gezielte Verabreichung der AAV-Vektoren konnte eine ausreichende Transduktion der RGC-Axone im dorsalen Bereich des ON erreicht werden. Hierfür wurde nach suffizienter Einleitung der Narkose (s. Kapitel 2.2.3) unter stereomikroskopischer Durchsicht mithilfe einer Hamilton Spritze (701 RN, 26s gauge/51mm), über 60 Sekunden 5 μ l (Dureau et al. 2000) des AAV.eGFP (Gen-Bank ID: HQ416702) in einer Konzentration von 5×10^8 TU/ μ l injiziert. Der linke *Bulbus oculi* wurde bei zurückgezogenem Augenlid auf der nasalen Hälfte mit Daumen und Zeigefinger der linken Hand fixiert, während die rechte Hand die Injektion durchführte. Die Perforationsstelle am linken Auge befand sich ca. 2 μ m posterior der *Ora serrata* am unteren temporalen *Limbus*. Der Einstich unter visueller, stereomikroskopischer Kontrolle mit kranio-nasaler Ausrichtung erfolgte zum rechten, oberen Quadranten der *Retina*. Nach der Virusinjektion verblieb die Nadel weitere 60 Sekunden im *Corpus vitreum*, um ein schnelles zurückfließen der Lösung durch den Einstichskanal zu verhindern und eine ausreichende Diffusion zu gewährleisten. Die Spritze wurde nach dem Gebrauch mit SDS und EtOH (70%) sowie *Aqua dest.* gereinigt. Nach Applikation wurde mit Bepanthen® Augen- und Nasensalbe nachbehandelt, um einen schnelleren Heilungsprozess der Injektionsstelle zu erreichen. Das Tier wurde postinterventionell für 1 Stunde vital überwacht und zurück in den Tierstall transferiert. Prophylaktisch erfolgte die Analgesie durch subkutane Injektion von Buprenorphin-Hydrochlorid (0.3 mg/kg Körpergewicht).

Für eine ausreichende virale Transfektion der RGC-Axone und eine stabile Expression des Fluorophors betrug die Inkubationszeit 14 Tage. Auf diese Weise konnten ca. 5 – 20 verschiedene, dorsal-oberflächlich liegende Axone des ON für die *Live-imaging*

Immunofluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht werden. Gemäß der Gentechnik-Sicherheitsverordnung (GenTSV) wurden alle Arbeiten mit AVV-Vektoren in S2-Laboren durchgeführt.

2.2.5 SBI-0206965 und DMSO-Kontrollinjektion

2,5 Stunden vor dem ONC wurden durch intravitreale Injektionen (s. Kapitel 2.2.8) der ULK1-Kinase-Inhibitor SBI-0206965 oder eine DMSO-Kontrolllösung appliziert. Der SBI-0206965 wurde zuvor in DMSO gelöst (Stammlösung mit 20 μM SBI), anschließend in entionisiertem H₂O auf eine 5 μM oder 50 μM verdünnt und als Arbeitslösung appliziert. Die DMSO-Kontrolllösung entsprach einer Konzentration von 0,25%.

2.2.6 Konfiguration des Equipments

Zur Positionierung und Fixierung während des operativen und mikroskopischen Setups wurde die Ratte einschließlich des *Warmingpad*-Systems auf einer Platte gehalten, die über eine zentrale Bar ein suffizientes Kippen nach lateral ermöglichte. Ein zentral an der Platte angebrachter *Head holder* (Kopfhalterung) ließ sich entsprechend der Größe und Kopfform des Tieres in Höhe, Länge und seitlicher Rotation verstellen (Abbildung 7). Die Konstruktion ermöglichte während der Operation sowie dem anschließenden *Imaging* die benötigte Adjustierung durch laterale Rotation (bis zu 30°). Eine stabile Fixierung des Tieres unter dem Mikroskop war zur Vermeidung jeglicher Bewegungsartefakte während der *Live-imaging*-Mikroskopie unabdingbar.

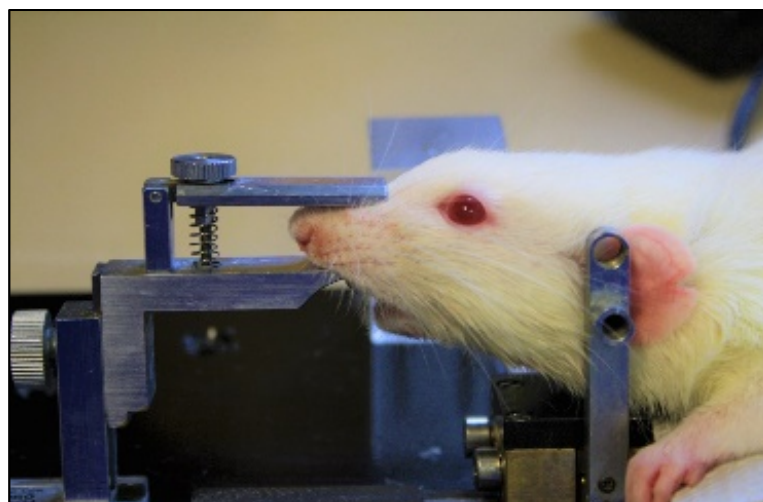


Abbildung 7: Fixierung und Positionierung des Versuchstiers im Head holder (eigene Aufnahme).

2.2.7 Operative Freilegung des optischen Nervs

Für die Durchführung des ONC und anschließender *in-vivo*-Mikroskopie der dorsalen RGC-Axone war eine vorausgehende operative Exposition des ON obligat. Nach entsprechender Narkose (s. Kapitel 2.2.3) sowie Fixierung des Tieres (30° Neigung des Kopfes zur rechten Seite) erfolgte die Entfernung des Fellhaars im dorsalen Kopfbereich mit anschließender Hautdesinfektion des Operationsfeldes (Ethanol, 70%). Alle folgenden Operationsschritte wurden unter stereomikroskopischer Durchsicht durchgeführt und orientieren sich überwiegend am Protokoll von Koch et. al. (Koch et al. 2011).

Die medial der Augen liegende Kopfhaut wurde in retro-kaudaler Richtung sagittal mit einem sterilen Skalpell eröffnet. Die Schnittlänge betrug ca. 1 cm, auf Höhe einer gedachten Verbindungslinie zwischen beiden Augen, rostral beginnend (s. Abbildung 8). Das Operationsfeld wurde durch Auseinanderziehen der Kopfhaut samt *Galea aponeurotica* mit Hilfe von vier Operationshaken zu allen vier Seiten aufgedehnt. Am kranialen Rand des Orbitaknochens erfolgte die Eröffnung der Orbitahöhle mittels Thermokoagulation. Insbesondere die medial aus dem Orbitaknochen tretende Arterie musste in diesem Moment sorgfältig verödet werden, ebenso wie kleine Gefäße der kranialen Schädelkalotte, um weitere Einblutungen in das Operationsgebiet zu vermeiden (s. Abbildung 8).

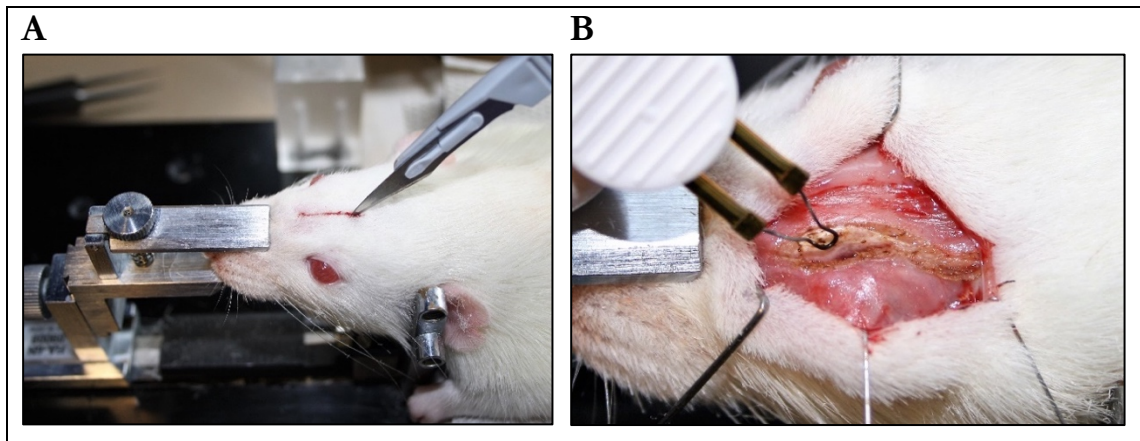


Abbildung 8: Operative Freilegung ON Schritt 1 & 2.

(A) Hautschnitt medial als operativer Zugang zur Orbitahöhle. **(B)** Thermokoagulation entlang des kranialen Orbitaknochens, bis die retroorbital liegende Tränendrüse sichtbar wird. Das Operationsfeld wird durch 4 Haken offengehalten (eigene Aufnahmen).

Um ein späteres Absenken des Wasserimmersionsobjektives im Verlauf des *Imagings* gewährleisten zu können, mussten die hervorstehenden Anteile der Orbitakante mit einem Feinbohrer abgetragen werden (s. Abbildung 9). Nachfolgend wurden durch mehrmaliges Spülen mit Sterofundin jegliche Knochenfragmente entfernt. Der *Nervus supraorbitalis* sowie die auf der *Glandula lacrimalis* verlaufende Venen wurden mittels Koagulation durchtrennt. Die dadurch sich nach kranial hervorwölbende *Gl. lacrimalis* konnte nun mit der Pinzette am kaudalen Anteil gepackt und schonend nach rostral luxiert (s. Abbildung 9) sowie in Teilen reseziert werden. Die anschließende Durchtrennung der Muskelfasern des *M. levator palpebrae superior* erfolgte mit einer Mikroschere.

Durch den Gebrauch einer Pinzette wurde der darunterliegenden *M. rectus superior* zunächst leicht angehoben und am Sehnenansatz fixiert, um durch anschließende kranial gerichtete Traktion am medialen Bereich des Muskels, mittels einer zweiten Pinzette, ein Lösen am Muskelursprung (*Arcus tendineus*) zu erreichen.

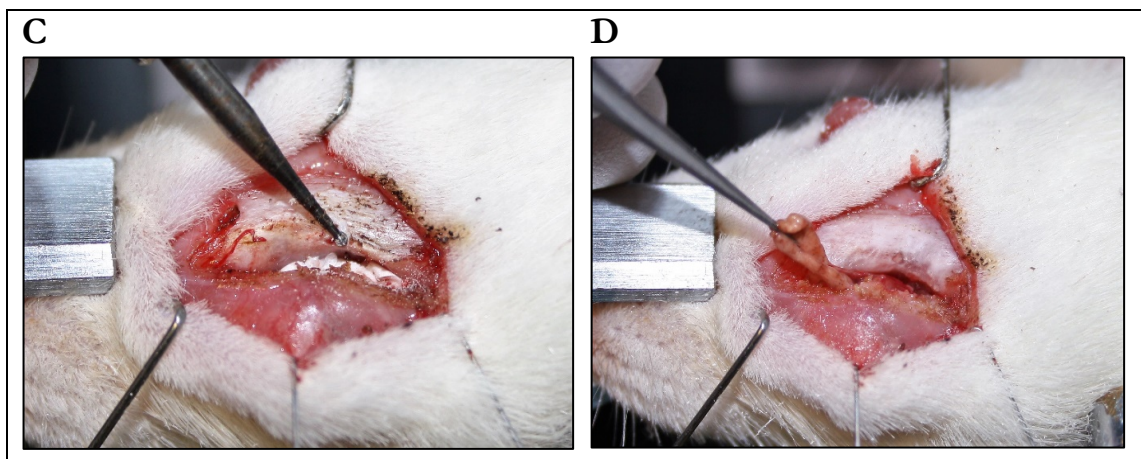


Abbildung 9: Operative Freilegung ON Schritt 3 & 4.

(C) Nach Abdeckung der Drüse mit kleinen Mulltupfern werden hervorstehende Teile des Orbitalknochens mit dem Bohrer abgetragen. **(D)** Luxation der *Glandula lacrimalis* am kranialen Anteil mit einer Mikro-Pinzette (eigene Aufnahmen).

Durch vorsichtigen Zug am *M. rectus superior* in Richtung des Operateurs wurde der Bulbus oculi nach ventral rotiert und in dieser Stellung nahe des Muskelansatzes mit einem fünften Haken fixiert. Hierdurch konnte eine ausreichende Exposition des *Nervus opticus* ermöglicht werden (s. Abbildung 10). Darüber liegende Fettschichten wurden entfernt und die den ON umgebende *Dura Mater*, unter Schonung der Zentralarterie, longitudinal inzidiert. Diesbezüglich kamen die Mikroschere und Präzisionspinzetten zum Einsatz. Für eine volle Exposition des *N. opticus* wurden die Durablätter samt enthaltenen Blutgefäßen beidseits der

Inzision zurückgezogen. Nach einer erneuten Spülung des gesamten Operationsgebiets erfolgte ein erstes Kontroll-*Imaging*, um eine durch den operativen Eingriff ausgelöste axonale Degeneration des ON auszuschließen.

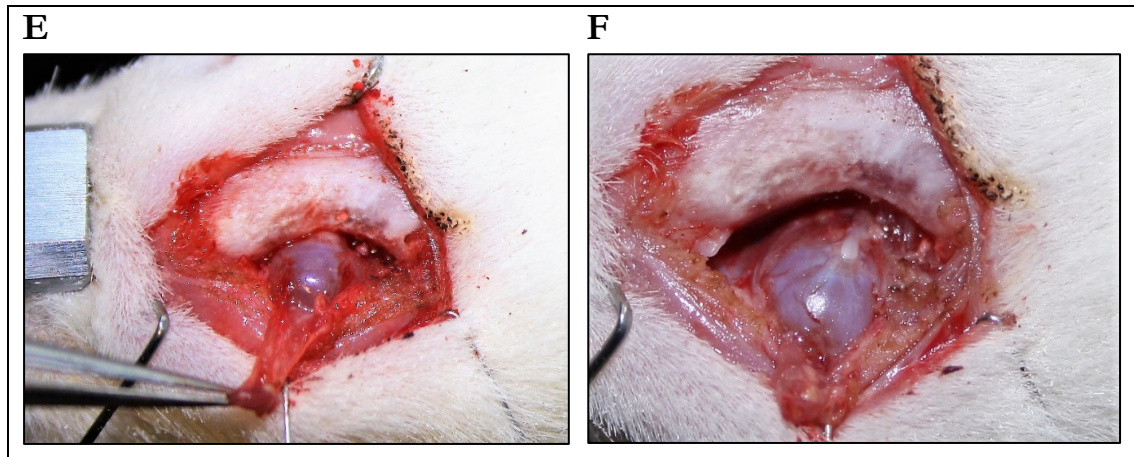


Abbildung 10: Operative Freilegung ON Schritt 5 & 6.

(E) Der *M. rectus superior* wird mit einer Pinzette nach oben gezogen, bis er sich von seinem Ursprung löst. (F) Ein weiterer Operationshaken wird in den *M. rectus superior* eingeführt und in nach unten gerichteter Führung fixiert, um eine ausreichende Exposition des ON zu erreichen (eigene Aufnahmen).

2.2.8 *Crush-Läsion*

Zur Induktion der AAD in den RGC-Axonen des ON erfolgte die Durchführung einer *Crush-Läsion*, auch *ONC* (*Optic nerve crush*) genannt. Eine *Crush-Läsion* ist eine definierte Quetschung des Nerven, bei der Axone zwar durchtrennt werden, sich jedoch die anatomische Position des betroffenen Gewebes nur wenig ändert (Lingor et al. 2007; Knoferle et al. 2010; Koch et al. 2011).

Der chirurgisch exponierte ON wurde unter stereomikroskopischer Kontrolle mit einem Faden zuglos umschlossen (s. Abbildung 11) und das Operationsgebiet mehrmalig mit Sterofundin gespült. Am noch unläsionierten ON wurde nachfolgend und noch vor dem *ONC* ein *Kontroll-Imaging* (s. Kapitel 2.2.9) durchgeführt, um mögliche degenerative Veränderungen durch die Operation an den RGC-Axonen auszuschließen und eine ausreichende Immunofluoreszenz zu verifizieren. In der vorliegenden Arbeit erfolgte anschließend, 2,5 h nach Applikation des SBI-0206965 oder einer DMSO-Kontrolllösung, mittels eines chirurgischen VICRYL®-Fadens der Größe 10-0 der *ONC*. Über 30 Sekunden wurde ein dorsal des *Nervus opticus* gelegener Einfach-Knoten (stereomikroskopisch) festgezogen, ca. 1 mm proximal des Nervenursprungs am *Bulbus oculi* (s. Abbildung 11).

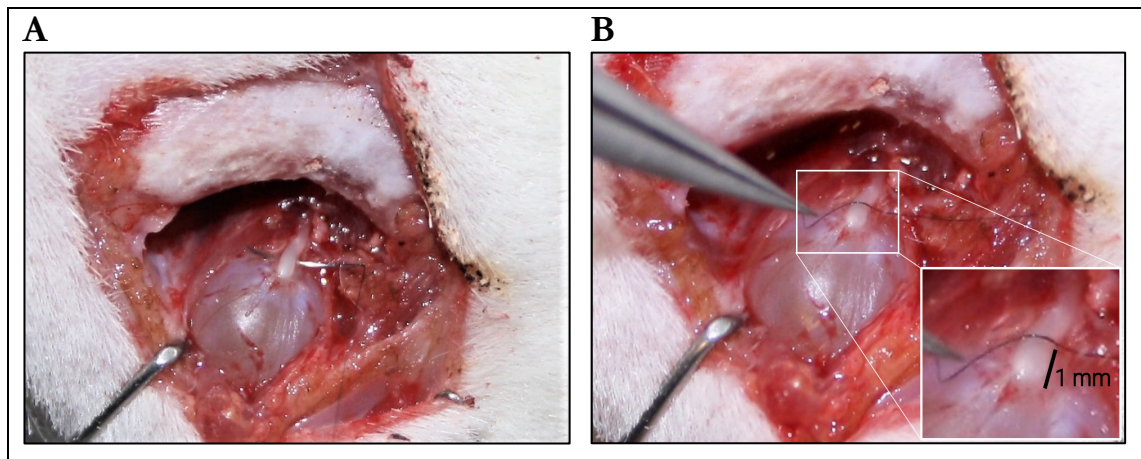


Abbildung 11: Operativer Schritt des ONC.

(A) Eine dünne Nadel (chirurgische Naht 10-0) wurde unter dem ON unter Erhalt aller Nervenfasern ventral hindurchgeführt. **(B)** Über 30 Sekunden wurde der dorsal liegende Einfach-Knoten mit zwei Pinzetten festgezogen, 1 mm proximal des *Bulbus oculi* (eigene Aufnahmen).

2.2.9 Epifluoreszenz-Mikroskopie des optischen Nervs

Zur Detektion und Analyse der akuten axonalen Degeneration *in vivo* im zeitlichen Verlauf über 300 min nach ONC erfolgte die *Live-imaging*-Mikroskopie der dorsalen RGC-Axone. Das *Live imaging* wurde mit dem Weitfeld-Epifluoreszenzmikroskop Axio Examiner.Z1 (Zeiss), einer *AxioCam* MRm3 S/N 5217 (Zeiss) sowie einem $\times 40/1,0$ NA Wasserimmersionsobjektiv samt Objektivbeheizung (konstant auf 37°C) durchgeführt.

Das Versuchstier wurde zur genauen Positionierung samt Fixierungsaufbau und Wärmekissen auf den Mikroskoptisch transferiert, sodass ein Abstand von 3 – 5 mm zwischen dorsalem ON und Objektiv erreicht werden konnte. Das Operationsfeld wurde nach mehrmaligem Spülen mit Sterofundin mit selbigem so weit aufgefüllt, bis die Flüssigkeit das Objektivende komplett umschloss.

Mithilfe der *ZEN-pro-Software (Blue Edition, Carl Zeiss MicroImaging GmbH)* war eine direkte Bildgebung oberflächlich liegender, fluoreszenzmarkierter Axone in Echtzeit möglich. Ein bis drei gut darstellbare Bereiche der RGC-Axone wurden 400 – 600 μm proximal der *Crush*-Läsion aufgesucht und *Live*-Bilder im zeitlichen Abstand von 5, 30, 60, 180, 240 und 300 Minuten nach erfolgtem ONC aufgenommen (s. Abbildung 12). Um die leicht vertikal zur Bildebene liegenden Axone über einen längeren Verlauf in Gänze detektieren zu können, war es notwendig, eine Reihe von Bildern in verschiedenen Ebenen des dorsalen ON, sog. *Z-Stacks* (200 – 400 Schnittbildebene, Intervall 0,45 μm), zu produzieren (s. Abbildung 12). Es wurde für jede *Imaging*-Region eine optimale *Z-Stack*-Tiefe mithilfe einer Ober- und Untergrenze (*X- und Y-Stack*) in der ZEN-Software ermittelt, und im Histogramm die Funktion „*Best fit*“ gewählt, um eine optimale Belichtung mit wenig Hintergrundrauschen zu erreichen. Die Belichtungszeit betrug im eGFP-Kanal zwischen 50 und 200 ms, bei einer geringstmöglichen fluoreszenzbedingten Belichtungsintensität, um ein Ausbleichen der Axone zu vermeiden.

Die chirurgische Exposition distal liegender Bereiche des ON bringt aufgrund der anatomisch tieferen Lage eine erhöhte Verletzungsgefahr der RGC-Axone mit sich, ebenso führt ein *Live imaging* sowohl des proximalen, als auch des distalen Bereichs der Läsionsstelle zu einem stärkeren *Bleaching*-Effekt (*Bleaching, Photobleichung*), mit nachfolgend geringerer Bildqualität. Das Ausmaß des *Bleaching*-Effekts, bedingt durch eine Zerstörung der Fluorophormoleküle bei Bestrahlung mit Anregungslicht, hängt insbesondere von der Energie und Intensität des Anregungslasers sowie vom strukturellen Aufbau des Fluorophors ab (Song et al. 1995). Diesbezüglich wurde die Bildgebung bewusst auf den Bereich 400 bis 600 μm proximal zur Läsionsstelle beschränkt, und distal zum ONC liegende Regionen nicht untersucht.

Unter regelmäßiger Kontrolle der Vitalparameter erfolgte die Anpassung der Narkosetiefe nach dem in Kapitel 2.2.3 beschriebenen Schema über den gesamten fünfstündigen Zeitraum des *Live imagings*.

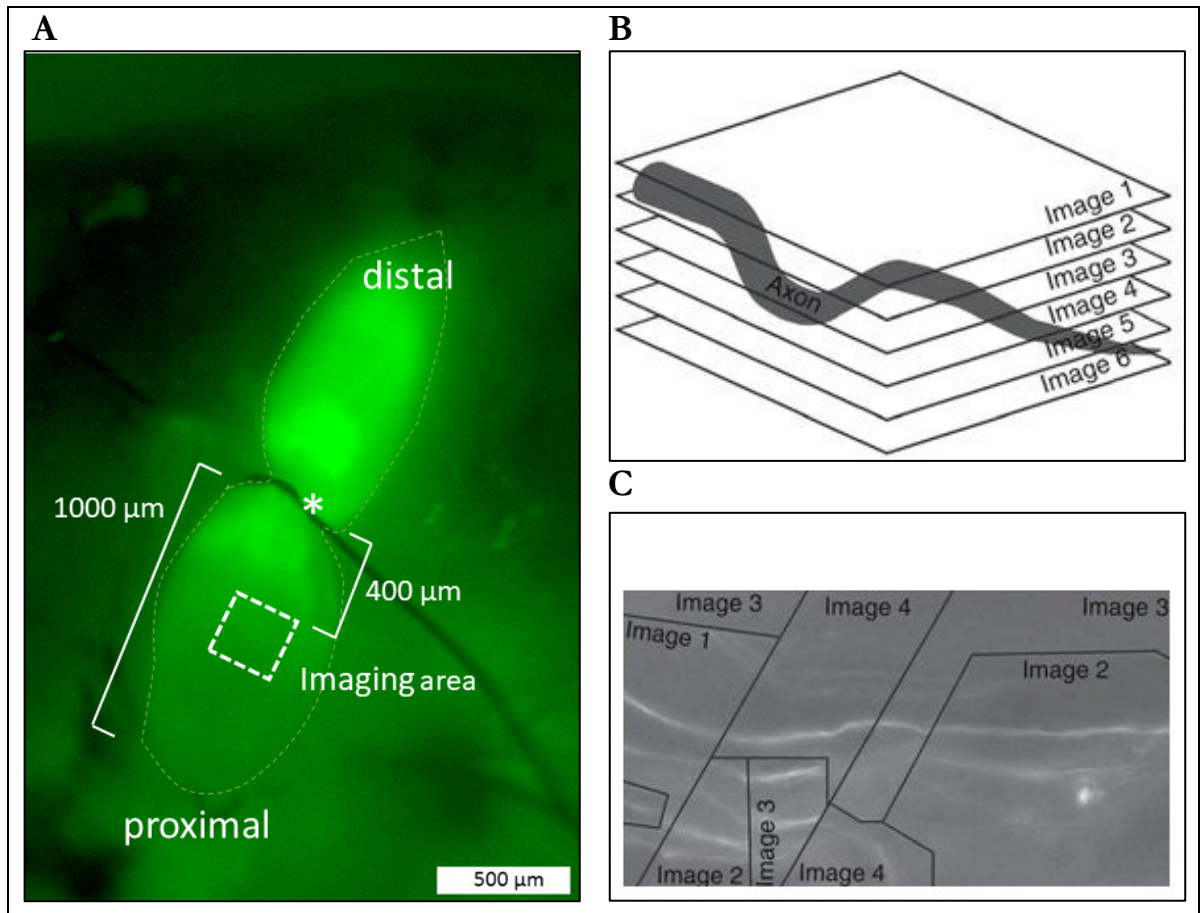


Abbildung 12: Epifluoreszenzmikroskopie retinaler RGC-Axone des ON.

(A) Beispielaufnahme eines optischen Nerven (ON) unter dem Epifluoreszenzmikroskop (eGFP-Kanal) in der Übersichtsaufnahme. Der *Crush* (Sternchenmarkierung) teilt den Nerv in einen proximalen und distalen Anteil. 400 bis 600 µm proximal zur Läsionsstelle wurde die *Imaging*-Region aufgesucht (eigene Aufnahme). (B) Beispielhafte Skizze eines dreidimensionalen Axonverlaufs im ON. Der Verlauf machte eine serielle Aufnahme in mehreren Bildebenen nötig (sog. Z-Stacks), um Axone über eine längere Distanz verfolgen und quantifizieren zu können (C) Beispielbild einer 2-D-Rekonstruktion verschiedener Bildebenen der Z-Stack-Aufnahmen (Abb. B und C mit freundlicher Genehmigung von PD Dr. J.C. Koch).

2.2.10 Euthanasie und Gewebeprobentnahme

Bei allen Tieren wurden nur die im Anhang IV der Richtlinie 2010/63/EU des europäischen Parlaments und des Rates vom 22. September 2010 zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere (DE Anlage 2 TierSchVerV, CH Richtlinie 3.02) erlaubten Tötungsmethoden angewandt. Die narkotisierten Tiere wurden 5 Stunden nach ONC durch Inhalation von Stickstoff in entsprechend luftdichten Käfigen sowie mit einem anschließenden Genickbruch und Entbluten getötet.

Für die immunhistochemischen Aufarbeitung des ON (s. Kapitel 2.3.2), zur retinalen *Flat-mount*-Präparation und zur Toxizitätsanalyse der retinalen Ganglienzellen (s. Kapitel 2.4) folgte die Entnahme des gesamten *Bulbus oculi* und einem Teil des *Nervus opticus*. Diesbezüglich wurden Gewebeanteile in der konjunktivalen Übergangsfalte mit einem scharfen Skalpell durchtrennt, der ON mit der Mikroschere in der Tiefe durchschnitten sowie weitere Augenmuskeln bulbusnah am Ansatz gelöst.

2.2.11 Quantifizierung der axonalen Degeneration

Für die Analyse der axonalen Degeneration in den dorsalen RGC-Axonon des *N. opticus* wurden Aufnahmen der 5 μM -*SBI0206965*-Gruppe, 50 μM -*SBI0206965*-Gruppe und der DMSO-Kontrollgruppe ausgewertet. Für einen Überblick über die in unterschiedlichen Ebenen verlaufenden Axone der *Z-Stack*-Bildaufnahmen konnten die dreidimensionalen Bilddateien der ZEN-Software als ZVI-Datei (.czi) exportiert und mit Hilfe der *AxioVision-Software* in 2D-Bilder umgewandelt werden (siehe beispielhaft Abbildung 13). Alle nachfolgenden Analysen wurden verblindet durchgeführt.

Unter Zuhilfenahme der bereits etablierten *Axonal integrity ratio* (AIR) erfolgte die Quantifizierung der axonalen Fragmentierung der AAD im zeitlichen Verlauf über 5 Stunden (Knoferle et al. 2010; Koch et al. 2011). Die Axone wurden mit dem Plugin *Simple Neurite Tracer* der *Software ImageJ* durch die dreidimensionalen Z-Ebenen der ZEN-Aufnahmen in der Länge verfolgt und in einem Bereich 400 – 600 μm proximal der *Crush*-Läsion ausgemessen (s. Abbildung 13). Zur Berechnung der AIR wurde die Länge der einzelnen Axonfragmente je Axon nach 5, 30, 60, 120, 180, 240 und 300 min postläsional zu den jeweiligen Zeitpunkten summiert und durch die Länge des anfänglich intakten Axons (vor ONC) dividiert. Je größer der Verlust der axonalen Integrität, desto kleiner ist die AIR.

Als ergänzender Ansatz zur Messung der axonalen Fragmentierung wurde die Anzahl der Schnittpunkte zwischen den einzelnen Axonen mit drei horizontal verlaufenden Linien zu allen Zeitpunkten postläsional analysiert. Die drei Linien wurden in *ImageJ* horizontal zu den vertikal verlaufenden Axonen im Abstand von 90 μm durch alle Z-Ebenen gezeichnet (s. Abbildung 13). Zu jedem Zeitpunkt wurde die Gesamtanzahl an Schnittpunkten zwischen Axonen und den drei Linien quantifiziert und zur Gesamtanzahl aller Schnittpunkte vor dem ONC normalisiert.

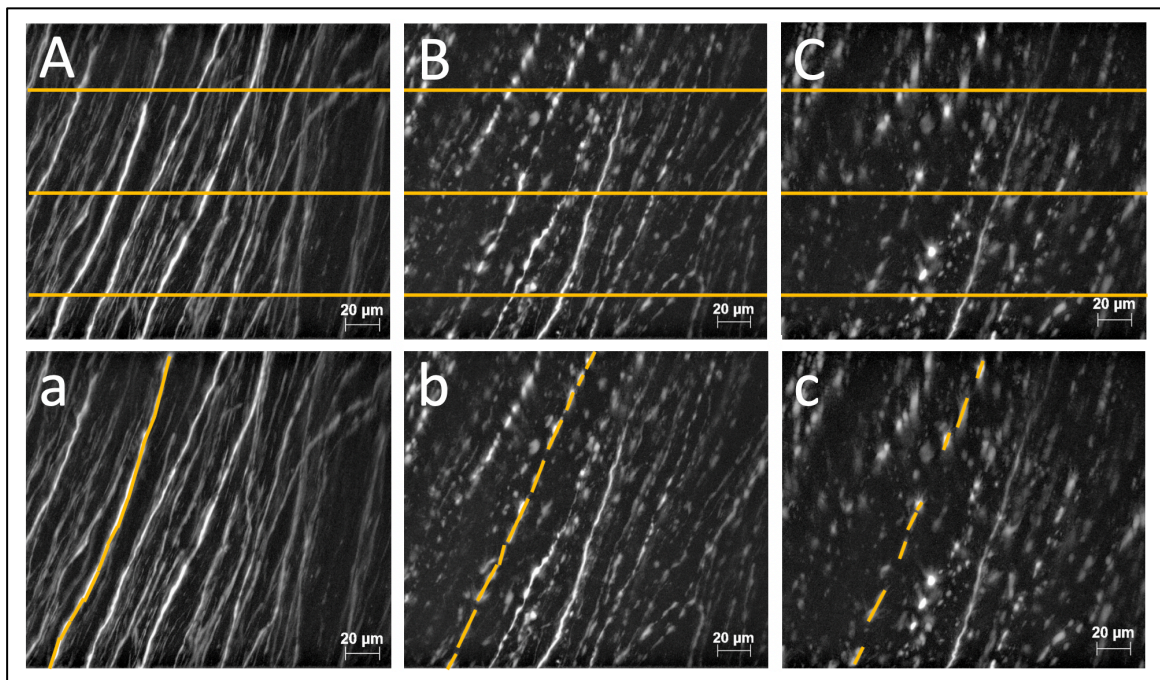


Abbildung 13: Beispielbilder zur Quantifizierung der axonalen Degeneration.

Die Bilder zeigen generierte 2D-Projektionen aus originalen Z-Stack-Bildaufnahmen. **(A, a)** Axone im ON vor ONC. **(B, b)** Axone 120 min nach ONC. **(C, c)** Axone 240 min nach ONC. **(A, B, C)** Zu jedem Zeitpunkt nach ONC wurde die Gesamtanzahl an Schnittpunkten zwischen Axonen und den drei Linien quantifiziert (Abstand zwischen den Linien = 90 μm). **(a, b, c)** *Axonal integrity ratio* (AIR): Die Länge der einzelnen Axonfragmente je Axon zu allen Zeitpunkten postläsional wurde summiert und durch die Länge des anfänglich intakten Axons vor ONC dividiert.

Ein frühes Zeichen der beginnenden AAD ist die Entstehung lokaler Verdickungen des Axons, sogenannte *axonal bulbs* (s. Kapitel 1.1.2). Zur Bestimmung der axonalen *Bulb*-Kinetik wurden Anzahl und Größe (maximaler Durchmesser) zu allen *Imaging*-Zeitpunkten nach *Crush*-Läsion in den einzelnen Versuchsgruppen mittels *ImageJ* quantifiziert. Des Weiteren wurde in der vorliegenden Studie die Anzahl der axonalen *Bulbs* in ein Verhältnis zu der Gesamtlänge des Axons gesetzt (sog. *Axonal Bulb Ratio*). Die *Z-Stack*-Aufnahmen der ZEN-Software wurden in *ImageJ* geöffnet und zu allen Zeitpunkten eines *Live imaging* ein

Viereck durch alle Bildebenen gezeichnet (s. Abbildung 14). In der Bilddatei 5 min nach ONC wurde eine geeignete Axonregion parallel zur axonalen Verlaufsrichtung ausgewählt, alle Axone in allen Z-Ebenen innerhalb des Vierecks gezählt und anschließend mit der Länge des Vierecks multipliziert, um eine Gesamtlänge der Axone in der dieser Region zu ermitteln. Anschließend wurde die Anzahl aller sichtbaren axonalen *Bulbs* innerhalb dieses Vierecks zu den jeweiligen Zeitpunkten gezählt und mit der zuvor ermittelten Axonlänge als *Axonal Bulb Ratio* in ein Verhältnis gesetzt. Durch eine Markierungsfunktion in *ImageJ* konnte eine Mehrfachzählung in verschiedenen Bildebenen vermieden werden. Alle detektierbaren axonalen *Bulbs* wurden in ihrem größten Durchmesser ausgemessen und zu den jeweiligen Zeitpunkten nach ONC gemittelt.

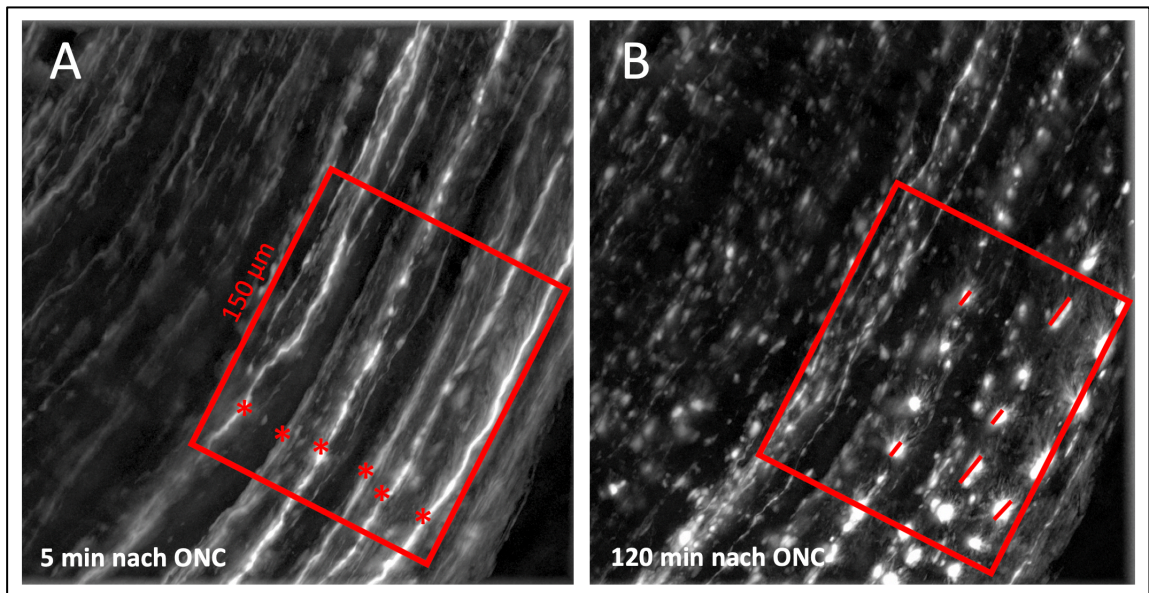


Abbildung 14: Beispielbilder zu Quantifizierungsmethode der axonalen *Bulbs*.

Die Bilder zeigen generierte 2D-Projektionen aus originalen Z-Stack-Bildaufnahmen. **(A)** 5 min nach ONC wurde in einer geeigneten Axonregion alle Axone (*) in allen Z-Ebenen innerhalb des Vierecks gezählt (mit der Länge des Vierecks multipliziert entspricht dies der Gesamtlänge der Axone in dieser Region). **(B)** Beispielbild 120 min nach ONC mit Quantifizierung der axonalen *Bulbs* in Anzahl und Durchmesser. Anzahl der axonalen *Bulbs* zu jedem Zeitpunkt pro Axonlänge entspricht der *Axonal Bulb Ratio*.

2.3 Immunofluoreszenzfärbungen

2.3.1 Prinzip der indirekten Immunfluoreszenz

Das Prinzip der Immunohistochemie (IHC) dient der räumlichen Detektion und Visualisierung von Proteinen im Gewebe. Die angefertigten Gewebeschnitte des *Nervus opticus* wurden als Antigen-Substrate verwendet. Im ersten Inkubationsschritt erfolgte die Bindung des Primärantikörpers an Epitope des gesuchten Proteins. Zur Sichtbarmachung dieser Komplexbildung wurde im zweiten Inkubationsschritt ein fluoreszierender Sekundärantikörper eingesetzt und die gebundenen Antikörper im Fluoreszenzmikroskop detektiert.

2.3.2 Gewebefixierung, Kryoprotektion und Gefrierschnitte

Alle immunhistochemischen Gewebeproben entsprachen dem Zeitpunkt 300 min nach ONC. Nach vorangegangener Entnahme des ON samt *Bulbus oculi* aus der Orbita wurde der ON mit einem zirkulärem Retinarest, der als proximale Markierung diente, über Nacht in 4% PFA (4 g PFA pro 100 ml 0,2 M Phosphatpuffer) bei 4°C fixiert, mit anschließendem Transfer in 30% Sucrose (30 g in 0,1 M PB auf 100 ml) für 48 Stunden (4°C). Bis zur weiteren Aufarbeitung wurden die fixierten und kryoprotectierten optischen Nerven bei – 80° C zwischengelagert.

Unter Zuhilfenahme eines Cryostaten wurden die *Nervi optici* bei einer Kammertemperatur von -21° C in longitudinaler Ausrichtung zu 16 µm Schnitten verarbeitet, eingebettet in einer *Cryomatrix*, und auf Superfrost®-PLUS-Objektträgern positioniert. Die Gewebeschnitte wurden hierbei in chronologischer Systematik, von dorsal nach ventral verlaufend, auf nummerierten Objektträger aufgenommen, um eine spätere Lokalisation der Schnittebene in der immunhistochemischen Quantifizierung zu gewährleisten. Anschließend erfolgte die Trocknung bei 37° C für 20 Minuten und Lagerung bei -20° C bis zum Färbeprozess.

2.3.3 Färbeprotokoll

Um die Auswirkung von SBI-0206965 auf die molekularen Prozesse der Autophagie bezüglich der AAD postläsional zu untersuchen, wurde eine intraaxonale Quantifizierung der Autophagiemarkerproteine LC3 und p62 immunhistochemisch in den 16 µm dicken, longitudinalen Anschnitten des ON nach folgendem Protokoll durchgeführt (s. auch Tabelle 10).

Die Objektträger mit den Gewebeschnitten des ON wurden nach Entfrostung im Inkubationsschrank bei 37° C für 20 min getrocknet und anschließend in 0,05 M Tris (1,5% NaCl, pH 7,6) für 15 Minuten bei RT auf dem Schwenktisch rehydriert. Um eine verbesserte Immunreaktivität der fixierten Schnitte zu erreichen, erfolgte eine Antigenmaskierung (*Antigen-Retrieval*) in 0,1 M Tris (pH-Wert 9) im Wasserbad bei 60° C für 4 h. Nach Abkühlung auf RT und einem anschließenden Waschriff von 5 min in 0,05 M Tris (pH-Wert 7,6) wurden die Objektträger in Methanol bei -20° C für 10 min permeabilisiert und erneut gewaschen. Mittels eines Liquidblockerstifts konnte durch ein Umranden der Schnitte ein Verlaufen der Lösungen in den folgenden Färbeschritten vermieden werden. Für das Blocken unspezifischer Bindungen wurden alle Schnitte mit *Dako-Diluent* für 60 min bei RT geblockt. Anschließend wurden die in *Dako-Diluent* verdünnten Primärantikörper *Anti-SMI32* (1:1000, *mouse*, *SMI32P*, Covance) und *Anti-LC3* (1:50, *goat*, *sc-16756*, *a/b*, Santa Cruz Blotechnology) oder *Anti-SMI32* (s.o.) und *Anti-p62* (1:2000, *rabbit*, *P0067*, Sigma Aldrich) auf die Objektträger aufgetragen und über Nacht bei 4° C in feuchtem Milieu inkubiert.

Nach Entfernung der Primärantikörperlösung erfolgte für 3 mal 5 min eine weitere Waschung in Tris 0,05 M (pH7,6) auf dem Schwenktisch. Die weiteren Färbeschritte wurden für LC3 und p62 getrennt durchgeführt. Folgende fluoreszierende Sekundärantikörper wurden für 60 min in der Verdünnung von 1:250 in *Dako-Diluent* bei RT inkubiert: *Alexa Fluor 546 donkey anti-rabbit* (Thermo Fisher Scientific), *Alexa Fluor 647 donkey anti-mouse* (Thermo Fisher Scientific), *Cy3 donkey anti-goat* (Dianova). Für die Zellkernfärbung erfolgte nach dem erneuten Waschen (Tris 0,05 M) das Auftragen einer DAPI-Lösung (4,6-diamidino-2-phenylindole, Sigma-aldrich) für 2 min. Nach einem weiteren Waschriff von 3 mal 5 Minuten (Tris 0,05 M) wurden alle Objektträger getrocknet und anschließend mittels DAPCO-Deckmedium oder Mowiol und Deckgläschen eingedeckt.

MATERIAL UND METHODEN

Tabelle 10: Übersicht IHC-Färbeprotokoll LC3, p62, SMI32

Tag 1

Vorgang	Zeit	Reagenzien, Temperatur
Trocknen der Gewebeschnitte	20 min	RT
Rehydrieren	15 min	Tris 0,05 M (1,5% NaCl, pH 7,6), RT
Antigen-Retrieval im Wasserbad	60 min	0,1 M Tris (pH-Wert 9), 80° C
Abkühlen	20 min	RT
Waschen	5 min	Tris 0,05 M (1,5% NaCl, pH 7,6), RT
Permeabilisieren	8 min	Methanol, -20° C
Waschen	15 min	Tris 0,05 M (1,5% NaCl, pH 7,6), RT
Blocken	60 min	Dako-Diluent, RT
Primär-AK-Inkubation	Min. 12 Std.	4° C <ul style="list-style-type: none"> - Anti-LC3, 1:50 - Anti-p62, 1:2000 - Anti SMI32-P, 1:1000

Tag 2

Vorgang	Zeit	Reagenzien
Waschen	3x5 min	Tris 0,05 M (1,5% NaCl, pH 7,6), RT
Sekundär-AK-Inkubation	60 min	RT, 1:250 <ul style="list-style-type: none"> - Alexa Fluor 546 donkey anti-rabbit - Alexa Fluor 647 donkey anti-mouse - Cy3 donkey anti-goat
Waschen	3x5 min	Tris 0,05 M (1,5% NaCl, pH 7,6), RT
Zellkernfärbung	2 min	DAPI, RT
Waschen	3x5 min	Tris 0,05 M (1,5% NaCl, pH 7,6), RT
Trocknen	20 min	RT
Einbetten		Mowiol (alt. DAPCO)

2.3.4 Konfokale Mikroskopie der IHC-Färbungen und Quantifizierung von LC3 und p62

Die konfokale Mikroskopie der immunhistochemischen Färbungen wurde mit einem *Leica TCS SP5* Mikroskop (40x/1.25 NA Öl-Immersion-Objektiv) durchgeführt. Bei eingeschalteter *Pinhole*-Funktion fanden alle Aufnahmen im 5-fachen digitalen Zoom bei einer Bildgröße von 78.5 μm x 78.5 μm statt. Die IHC-Bilder wurden beidseitig 400 μm proximal sowie distal des ONC aufgenommen. Bei jedem Versuchstiergruppe wurden hierfür 12 Bilder in 3 verschiedenen Anschnitten dieser Region des ON aufgezeichnet.

Die intraaxonalen LC3 und p62 *Puncta* wurden mithilfe der *ImageJ-Software* quantifiziert. Alle Bildaufnahmen der SMI-32-, LC3- und p62-Färbungen wurden in *8-Bit*-Dateien (veränderte Farbausdifferenzierung) konvertiert. Zur genaueren Bestimmung der prozentualen axonalen Fraktion der SMI-32-Aufnahme wurde der *Threshold* (Schwellenwert) angepasst, um die SMI-32-markierten Neurone hervorzuheben. Die bearbeiteten SMI-32-Aufnahmen wurden mittels *Image calculator* in ImageJ von den LC3- und p62-Bildern subtrahiert. Das resultierende Bild enthielt nur die intraaxonalen LC3- oder p62-*Puncta*, die in einer verblindeten Arbeitsweise gezählt wurden. Die Anzahl der intraaxonalen Punkte wurde letztendlich mit der prozentualen Axonfläche des Bildes ins Verhältnis gesetzt.

Für die Analyse der Gesamtanzahl aller LC3- und p62-*Puncta* (*Overall-LC3/-p62*) in einer IHC-Färbungsaufnahme wurden die Dateien ebenfalls in *8-Bit* konvertiert und der *Threshold* angepasst (*Threshold* bei allen Bildern 0.51). Über die Funktion *Partikelanalyse* der *ImageJ-Software* konnten alle Punkte einer zuvor definierten Größe durch das Programm gezählt werden (Setupparameter: *Size (inch*2)*: "3-infinity", *pixel units on*, *Circularity*: "0.00-1.00", *Show*: "Masks", *Clear results on*, *Summarize on*, *include holes on*, *in situ show on*).

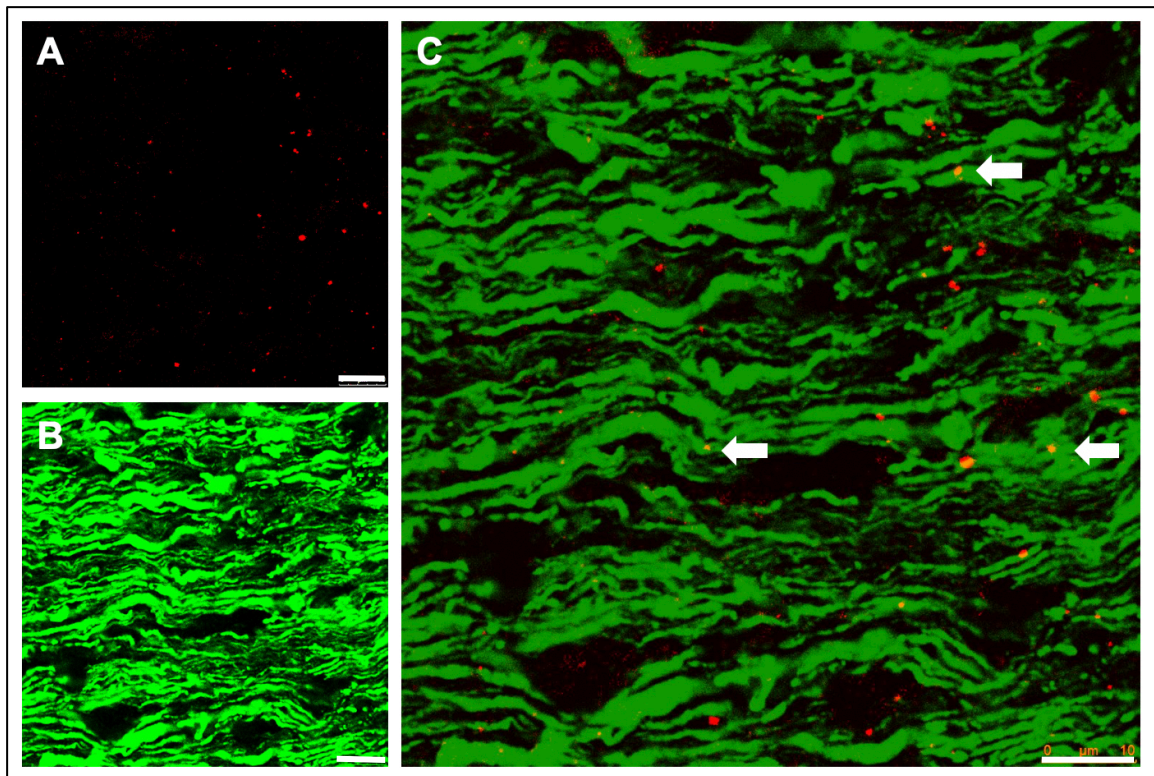


Abbildung 15: Beispielbilder der LC3- und SMI32-Färbungen unter dem konfokalen Mikroskop. (A) LC3-Färbung, Cy3 (B) SMI-32P-Färbung, Alexa Fluor 647. (C) Merge. Intraaxonale Puncta (beispielhaft mit Pfeilen markiert) sind durch die Überlagerung in *ImageJ* detektierbar. Maßbalken 10 µm (eigene Aufnahmen).

2.4 Retinaler *Flat mount*

2.4.1 Probenaufbereitung und Präparation

Nach vorangegangener Entnahme der *Bulbi oculi* (s. Kapitel 2.2.10) erfolgte die Abtragung verbliebener Muskeln und Bindegewebsreste mittels Präzisionspinzette und Mikroschere in einer Sterofundin-Lösung, insbesondere im Bereich der *Ora serrata*. Die *Bulbi* wurden im Ganzen für 24 Stunden bei 4° C in eine Fixierlösung mit 4% Paraformaldehyd (PFA in PBS, pH = 7,4) gegeben.

Anschließend erfolgte in Sterofundin mittels einer Mikroschere ein Äquatorialschnitt, etwas kaudal und entlang der *Ora serrata*, das Auge am *Limbus corneae* (Übergang zwischen Kornea und Sklera) mit einer Pinzette haltend. Der Linsenapparat und das *Corpus vitreum* wurden vom dorsalen Anteil des Auges entfernt und die verbleibende Retina mit der Präzisionspinzette (Typ 5, Dumont) entlang der Zirkumferenz von der Sklera getrennt. Besondere Vorsicht bedurfte es hierbei an Verwachsungsstellen, die zum einen am Ort der Einstichstelle intravitrealer Injektionen auftraten, zum anderen an der Austrittsstelle des *Nervus opticus*

(*Papilla nervi optici*). Für eine flache Präparation der Retina erfolgten vier Inzisionen in halber Länge von der retinalen Peripherie in Richtung der Sehnervenpapille bei drei, sechs, neun und zwölf Uhr (sogenannte Kleeblattform der Retina). Es folgte die Eindeckung mit 30% Glycerol zwischen Objektträger und Deckgläschen.

2.4.2 Evaluation der RGC-Transfektion und Phototoxizitätsanalyse

Die Visualisierung einzelner RGC-Axone im ON erfolgte durch intravitriale Injektionen von AAV.eGFP (s. Kapitel 2.2.4). Die Evaluation des RGC-Transfektion konnte in Mosaik-Bildaufnahmen mittels Epifluoreszenzmikroskops durchgeführt werden (Setup: *multidimensional analysis, mosaik X, 5% overlap*). Resultierende Bilder zeigten das spezifische *Labeling* (Markierung) der RGC in den 4 verschiedenen Quadranten der Retina, wodurch sich das Ausmaß der Transfektion abschätzen ließ (s. Abbildung 16).

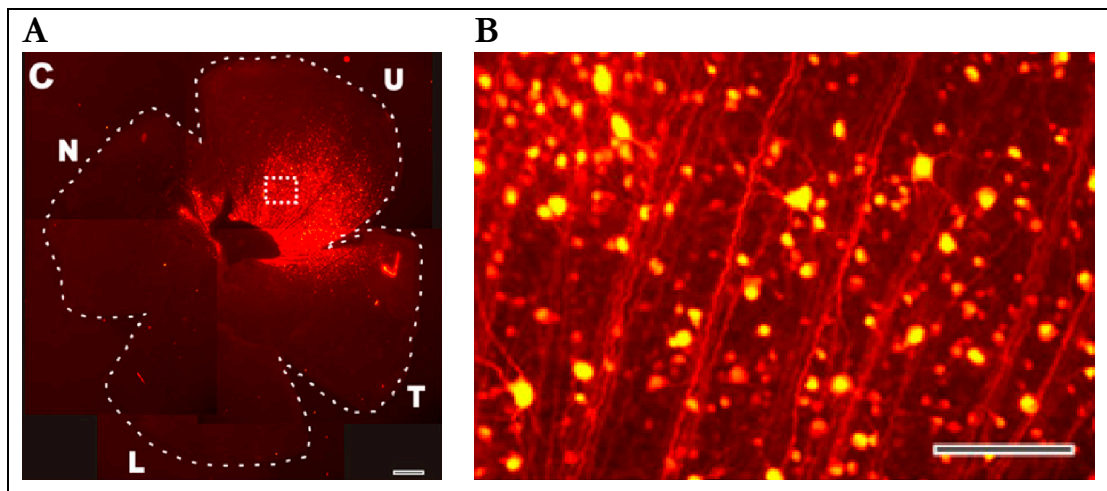


Abbildung 16: Beispielbilder eines retinalen *Flat-mount*-Präparats

(A) *Flat mount* einer Injektion mit AAV(1/2)hSYN.dsRed, die ein spezifisches *Labeling* der RGC-Axone im oberen Quadranten (U) zeigt. Der temporale (T), nasale (N) und der untere (L) zeigen eine geringere Transfektion mit dem Fluorophor. **(B)** Vergrößerter Ausschnitt der Retina aus dem oberen Quadranten (U), sichtbare Somata und Axone der RGC, Maßbalken 200 µm (mit freundlicher Genehmigung von PD Dr. J.C.Koch).

2.5 Statistische Analyse

Die statistische Auswertung der erhobenen Daten sowie die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte mithilfe des Programms GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software; San Diego, USA), die Darstellung der Rohdaten mittels Microsoft Excel (Version 16.16.11, Microsoft Corporation, Redmond, USA). Alle im Ergebnisteil aufgeführten Werte werden als Mittelwert \pm Standardfehler (SEM) abgebildet. Die Bars in den Abbildungen entsprechen dem Mittelwert, die Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler. Bei Gruppenvergleichsmessungen wurde eine Varianzanalyse (*Analysis of variance*, ANOVA) als *One-way*-ANOVA, *Two-way*-ANOVA oder ANOVA *with repeated measures* durchgeführt, bei vorhandener Signifikanz gefolgt von einer Dunnett's und Tukey's post-hoc Analyse. Der statistische Test und die Gruppenanzahl der für jede Analyse verwendeten *In-vitro*- oder *In-vivo*-Experimente sind in jeder Abbildungslegende angegeben. Bei einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ wurden die Ergebnisse als statistisch signifikant bewertet (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

3 ERGEBNISSE

Studien der letzten Dekade konnten zeigen, dass eine Hemmung der Autophagie im Tiermodell die AAD signifikant verzögert. Um ein besseres Verständnis der molekularen Autophagieprozesse in der AAD zu erlangen und im translationalen Ansatz eine therapeutische Beeinflussbarkeit durch hochselektive Autophagie-Inhibitoren zu testen, wurde eine Interventionsstudie im Rattenmodell des *Nervus opticus* durchgeführt. In der vorliegenden Arbeit wurden die Effekte einer niedermolekularen Inhibition der Serin/Threonin-Proteinkinase ULK1 (*unc-51 like autophagyactivating kinase 1*) durch den Autophagie-Inhibitor SBI-0206965 in der AAD *in vivo* untersucht.

3.1 *Live-imaging*-Mikroskopie der akuten axonalen Degeneration im Optischen Nerv

3.1.1 Visualisierung der RGC-Axone

Die Visualisierung der RGC-Neurone im ON bildet die entscheidende Grundlage zur Analyse der AAD im *Live imaging*. Um eine ausreichende Transduktion der dorsalen RGC-Axone des ON mit EGFP nachzuweisen, wurde AAV.eGFP in unterschiedlichen Konzentrationen intravitreal injiziert und nach einer Inkubationszeit von 14 Tagen mittels retinalen *Flat mounts* sowie Probe-*Imagings* analysiert. Unter stereomikroskopischer Kontrolle erfolgte die Virusinjektion in streng kranio-nasaler Ausrichtung zum rechten, oberen Quadranten der Retina, um eine Visualisierung der dorsalen RGC-Neurone zu gewährleisten. Eine intravitreale Injektion von 5 μ l AAV.eGFP in einer Konzentration von 5×10^8 TU/ μ l zeigte im retinalen *Flat mount* (n = 6) eine optimale Expression des Fluorophors im oberen Quadranten sowie entsprechend eine gute Transfektion der 5 – 20 oberflächlich gelegenen, dorsalen RGC-Axone im *Live imaging* (s. Abbildung 17, Seite 47).

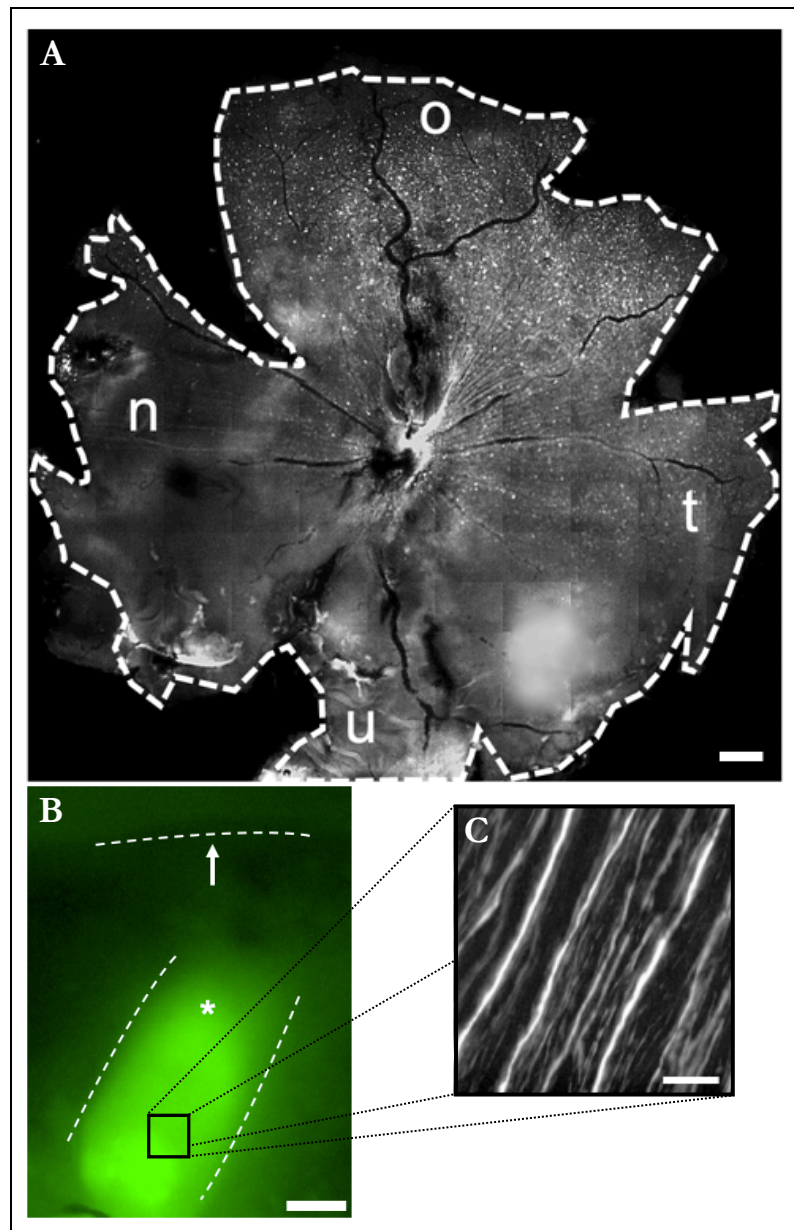


Abbildung 17: Transfektion der RGC-Neurone nach intravitrealer Injektion von AAV.eGFP.

(A) Repräsentativer *Flat mount* mit spezifischem Labeling der RGC-Axone im oberen Quadranten (o). Der temporale (t), nasale (n) und der untere (u) Quadrant zeigen eine geringere Transduktion mit dem Fluorophor. Es handelt sich um ein *Composite picture* aus vielen Einzelaufnahmen. Maßbalken 200 μm . (B) *Labeling* des ON (*) nach chirurgischer Freilegung (der Pfeil zeigt die temporale Knochenkante). Maßbalken 200 μm . (C) EGFP-fluoreszierende Axone des dorsalen ON. Maßbalken 20 μm (eigene Aufnahmen).

3.1.2 *Live-imaging*-Mikroskopie der RGC-Axone nach ONC unter SBI- und DMSO-Behandlung

Die *Live-imaging*-Technik des optischen Nervs der Ratte nach *Crush*-Läsion ist ein etabliertes Modell, um Prozesse der AAD *in vivo* zu untersuchen. Der hier dargestellte Hauptversuch diente der Analyse morphologischer Charakteristika der AAD (Prozesse der axonalen Fragmentation und Integrität, *Axonal-bulb*-Formation) über den zeitlichen Verlauf von 5 Stunden nach ONC nach Applikation des ULK1-Inhibitor SBI-0206965. Es wurden 39 Versuchstiere einer Intervention unterzogen. 31 Tiere wurden in die finale Auswertung aufgenommen (5 μ M SBI-Gruppe: n = 11; 50 μ M SBI-Gruppe: n = 11; DMSO-Gruppe: n = 9). Sechs *Live-imagings* waren aufgrund von schwacher Transfektion oder starkem *Bleaching*-Effekt nicht auswertbar, 2 Tiere sind während der Narkose vorzeitig verstorben.

Zur Visualisierung der einzelnen RGC-Axone erfolgte bei allen Tieren 14 Tage vor *Live imaging* eine intravitreale Injektion der AAV-Vektoren (AAV.eGFP). 2,5 Stunden vor der *Crush*-Läsion wurde der ULK1-Inhibitor SBI-0206965 in der Konzentration 5 μ M, 50 μ M oder eine DMSO-Kontrolllösung intravitreal appliziert. Dosisabhängige Effekte von SBI-0206965 konnten in *In-vitro*-Studien (Egan et al. 2015; Dite et al. 2018; Vahsen et al. 2020) sowie *Western-Blot*-Analysen unserer Arbeitsgruppe für die Konzentrationen 5 und 50 μ M gezeigt werden. *In vivo* fehlen jedoch Analysen zur Wirkkonzentration, Pharmakokinetik, zytoplasmatischen Verteilung oder dem axonalen Transport von SBI-0206965, sodass die hier dargestellten Ergebnisse aus einer ersten, translationalen Pilotstudie entstanden sind.

Nach operativer Freilegung des ON erfolgte ein Kontroll-*Imaging* zum Ausschluss von morphologischen Charakteristika der AAD, die durch die vorangegangene Nervenpräparation (siehe Kapitel 2.2.7, Seite 30) entstanden sein könnten. In allen *Live imagings* (n = 39) konnte vor ONC eine durchgehende axonale Integrität sowie das Fehlen von *Bulb*-Formationen dokumentiert werden, sodass von einer läsionsfreien, operativen Exposition des ON ausgegangen werden kann. Nach ONC wurde ein *Live imaging* der oberflächlich liegenden, fluoreszenzmarkierten RGC-Axone 400 – 600 μ m proximal zur Läsion zu den Zeitpunkten 5 min, 30 min, 60 min, 120 min, 180 min, 240 min und 300 min durchgeführt. Mit Hilfe der *ZEN-pro-Software* konnten die Axone in Echtzeit in ein bis drei darstellbaren Tiefen des ON verfolgt und zu späteren Zeitpunkten im exakt selben Bereich erneut aufgesucht werden.

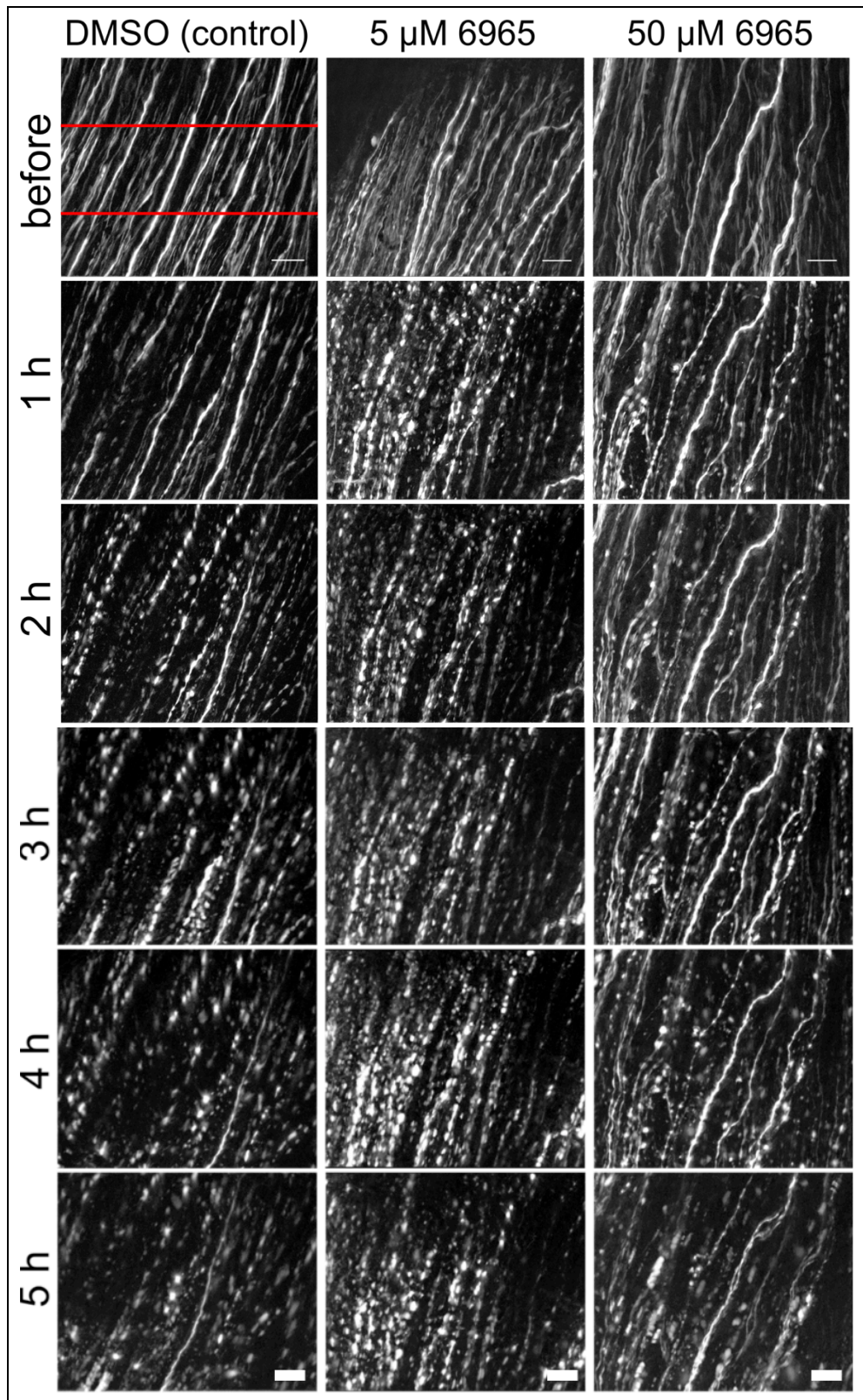


Abbildung 18: Repräsentative *Live-imaging*-Bilder der akuten axonalen Degeneration. EGFP-fluoreszierende Axone des *Nervus opticus* vor und 1 – 5 h nach *Crush*-Läsion in der DMSO-Kontrollgruppe, 5 μ M- und 50 μ M-SBI-Gruppe. Alle Bilder zeigen generierte 2D-Projektionen aus originalen Z-Stack-Bildaufnahmen. Maßbalken 30 μ m. Eigene Aufnahmen, diese Abbildungen wurden teils in Vahsen et al. (2020) veröffentlicht.

Im Folgenden werden die Ergebnisse der *Live-imaging*-Methode detailliert dargestellt. Repräsentativen Aufnahmen der akuten axonalen Degeneration in den drei Versuchstiergruppen (5 μ M SBI, 50 μ M SBI, DMSO-Kontrolle) werden in Abbildung 18 (Seite 49) über 5 Stunden nach ONC gezeigt. Zunächst werden die Analyse der *Axonal integrity ratio* (siehe Kapitel 3.1.3), gefolgt von der 3-Linien-Quantifizierung (siehe Kapitel 3.1.4) und den Ergebnissen der *Axonal-bulb*-Analyse (siehe Kapitel 3.1.5) dargestellt.

3.1.3 Ergebnisse der *Axonal integrity ratio*

Um den Grad des axonalen Zerfalls und des Integritätsverlusts in der AAD *in vivo* über 5 Stunden postläsional nach SBI-Applikation zu untersuchen, wurde im zeitlichen Verlauf von 5 Stunden 400 – 600 μ m proximal des ONC die in Abbildung 19 illustrierte *Axonal integrity ratio* (axonale Integritätsrate) berechnet. Die Länge der einzelnen Axonfragmente je Axon wurde postläsional zu den jeweiligen Zeitpunkten summiert und durch die Länge des anfänglich intakten Axons (vor *Crush*-Läsion) dividiert. Werte von 1,0 zeigen somit eine vollständig erhaltene Integrität. Ein Wert von 0,6 bedeutet dagegen, dass von diesem Axon nur noch 60% der ursprünglichen Länge fluoreszenzmikroskopisch detektiert werden konnte. Die Anzahl der ausgewerteten Tiere pro Versuchsgruppe und die analysierten Axone pro Kohorte sind in Tabelle 11 dargestellt. Die Variabilität in der Anzahl der auswertbaren Axone pro Gruppe war durch das unterschiedliche *Labeling* der dorsalen RGC-Axone sowie deren anatomischen Verlauf an der Nervenoberfläche bedingt. Alle Axone wurden mit dem Plugin *Simple Neurite Tracer (ImageJ)* durch die dreidimensionalen Z-Ebenen der ZEN-Aufnahmen in der Länge verfolgt und berechnet (siehe Kapitel 2.2.11, Seite 36).

Tabelle 11: Anzahl ausgewerteter Axone in der AIR

INTERVENTION	N PRO GRUPPE	ANZAHL DER AUSWERTUNGEN
DMSO-Kontrolle	9	40 Axone
5 μ M SBI-0206965	11	45 Axone
50 μ M SBI-0206965	11	64 Axone

Die Quantifizierung der AIR (siehe Abbildung 19, Seite 52) ergab, dass die *Crush*-Läsion in allen Versuchsgruppen zu einer zeitabhängigen Verminderung des axonalen Integritätsverhältnisses (AIR) führt. Je größer der Verlust der axonalen Integrität, desto kleiner war die AIR. Ab dem Zeitpunkt 120 min postläsional zeigte sich die Tendenz einer fallenden AIR in allen Gruppen im Vergleich zu ursprünglich intakten Axonen.

Die Quantifizierung der AIR ergab 240 min nach ONC signifikant höhere Werte in der mit 50 μM SBI-0206965 behandelten Gruppe im Vergleich zur DMSO-Kontrollbehandlung. Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen war statistisch signifikant ($p < 0,001$). Dieser Effekt zeigte sich anhaltend auch 5 Stunden nach *Crush*-Läsion mit einer Signifikanz von $p < 0,0001$. In der Gruppe 5 μM SBI-0206965 wurde zu keinem Zeitpunkt nach ONC ein signifikanter Unterschied zur DMSO-Kontrolle beobachtet ($p = 0,1$).

Zusammenfassend konnte eine protektive Wirkung des ULK1-Inhibitors SBI-0206965 in einer Konzentration von 50 μM auf die AAD 4 h und 5 h nach ONC durch eine Abschwächung der axonalen Integritätsverlusts beobachtet werden.

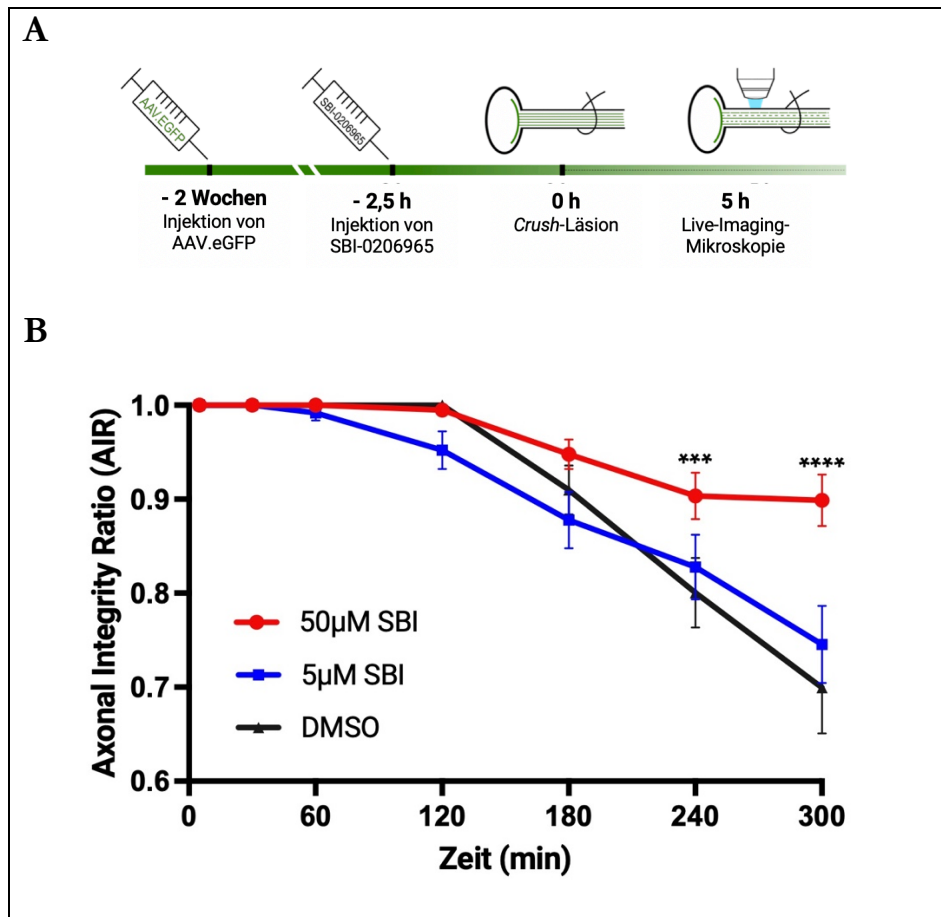


Abbildung 19: 50 μM SBI-0206965 hemmt den axonalen Integritätsverlust. **(A)** Schematische Darstellung des experimentellen Setups im zeitlichen Verlauf. **(B)** Ergebnisse der *Axonal integrity ratio*. Intravitreale Injektionen von 50 μM SBI-0206965 zeigen eine signifikant höhere AIR zu den Zeitpunkten 4 h und 5 h nach ONC verglichen zur 5 μM SBI-0206965-Gruppe und DMSO-Kontrolle. Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler (SEM). *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ bei einem *Two-Way ANOVA* mit *Tukey's multiple comparisons test* von 50 μM SBI-0206965 verglichen mit der DMSO-Kontrolle. Diese Ergebnisse wurde in Vahsen et al. (2020) veröffentlicht.

3.1.4 Ergebnisse der Schnittpunkt-Quantifizierung

Die AIR als etablierte Auswertungsmethode zur Analyse des axonalen Zerfalls in der AAD kann über eine längere Axondistanz zuverlässige Aussagen über den axonalen Integritätsverlust treffen. Hingegen ist dieses Verfahren für vergleichenden Analysen von nah beieinander liegenden Axonregionen im zeitlichen Verlauf nach ONC limitiert. Zur Verifizierung der AIR-Ergebnisse sowie zur punktuellen Analyse verschiedener Regionen entlang der Axone proximal zum ONC wurde die 3-Linien-Quantifizierung als neuartige Methode durchgeführt. Die Gesamtanzahl der Schnittpunkte aller detektierbaren Axone (vertikale Ausrichtung) in einer *Z-Stack*-Bilddatei wurde mit drei horizontal verlaufenden Linien (Abstand 90 μm) nach ONC über 5 Stunden zu allen Zeitpunkten verblindet quantifiziert (DMSO-Kontrolle: $n = 8$; 5 μM SBI: $n = 8$; 50 μM SBI: $n = 8$). Es erfolgte ein Varianzanalyse mittels *Two-way-ANOVA*, gefolgt von einem *Tukey's multiple comparisons test*.

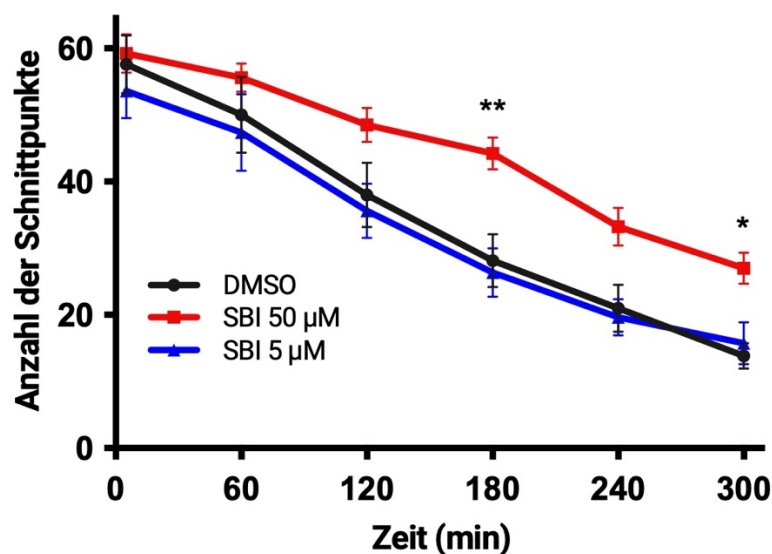


Abbildung 20: 50 μM SBI-0206965 führt zu einer signifikant höheren Anzahl von Axonschnittpunkten in der 3-Linien-Quantifizierung.

Die intravitreale Injektion von 50 μM SBI-0206965 führt zu einer signifikant höheren Anzahl von Axonschnittpunkten mit 3 Linien, 3 und 5 h postläsional im Vergleich zu 5 μM SBI-0206965 und DMSO-Kontrolle. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler (SEM) bei $n = 8$ pro Gruppe. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ bei einem *Two-Way ANOVA* mit *Tukey's multiple comparisons test* von 50 μM SBI-0206965-Applikation verglichen mit der DMSO-Kontrolle.

Abbildung 20: 50 μM SBI-0206965 führt zu einer signifikant höheren Anzahl von (Seite 53) illustriert die Ergebnisse der 3-Linien-Quantifizierung. In allen 3 Versuchsgruppen konnte ein Abfall der Schnittpunkte über 5 Stunden postläsional beobachtet werden. Ab dem Zeitpunkt 180 min nach ONC zeigte sich eine signifikant höhere Anzahl an axonalen Schnittpunkten mit allen 3 Linien nach intravitrealer Applikation von 50 μM SBI-0206965 im Vergleich zur DMSO-Kontrolllösung ($p < 0,01$). Dieser Effekt eines verminderten axonalen Integritätsverlusts konnte anhaltend statistisch signifikant ($p < 0,05$) auch 300 min nach ONC in der 50 μM SBI-0206965-Gruppe nachgewiesen werden. Nach intravitrealer Applikation von 5 μM SBI-0206965 wurde im Vergleich zur DMSO-Kontrolle zu keinem Zeitpunkt postläsional ein signifikant erhöhter Wert beobachtet.

Um unterschiedliche Stadien des axonalen Integritätsverlusts in Abhängigkeit von der Distanz zum ONC zu analysieren und den gezeigten Effekt der 50 μM SBI-0206965-Gruppe im Hinblick auf die Entfernung zur *Crusb*-Läsion zu untersuchen, wurden im Folgenden alle axonalen Schnittpunkte der Linie 1 zu den Daten der Linie 3 differenziert analysiert. Die Distanz vom ONC zu den in Linie 1 analysierten Axonen betrug $\sim 410 \mu\text{m}$, zur Linie 3 $\sim 590 \mu\text{m}$ (siehe Abbildung 21A/B), Abweichungen der Distanzen von bis zu 5 μm waren bei variablem Richtungsverlauf der Axone im 3D-Feld der *Z-Stack*-Aufnahmen möglich.

In Abbildung 21C sind die Ergebnisse der axonalen Schnittpunktanalyse für Linie 1 und Linie 3 differenziert dargestellt. Sowohl 410 μm , als auch 590 μm zum ONC wurden nach intravitrealer Injektion von 50 μM SBI-0206965 signifikant höhere Werte im Vergleich zur DMSO-Kontrolle beobachtet ($p < 0,05$). Zudem zeigte sich 590 μm vom ONC entfernt eine signifikant höhere Anzahl von gemittelten axonalen Schnittpunkten zu allen postläsionalen Zeitpunkten, verglichen zur Analyse 410 μm entfernt liegender Axonschnittpunkte (DMSO Linie 1 vs. DMSO Linie 3: $p < 0,05$; SBI 50 μM Linie 1 vs. SBI 50 μM Linie 3: $p < 0,01$) Die differenzierte Analyse von Linie 1 und Linie 3 zeigt folglich in kürzerer Distanz zum ONC einen stärkeren axonalen Integritätsverlust.

Zusammenfassend zeigt die differenzierte Schnittpunktanalyse in kürzerer Distanz zum ONC einen stärkeren axonalen Zerfall in allen Gruppen. Nach 50 μM SBI-Behandlung konnte in unterschiedlichen Axonregionen (410 – 590 μm proximal zum ONC) eine signifikante Verminderung des axonalen Zerfalls 3 – 5 Stunden nach SBI-Behandlung beobachtet werden. Die Applikation von SBI-0206965 konnte somit die AAD unabhängig von den Distanzen zum ONC abschwächen, den axonalen Integritätsverlust jedoch nicht vollends stoppen.

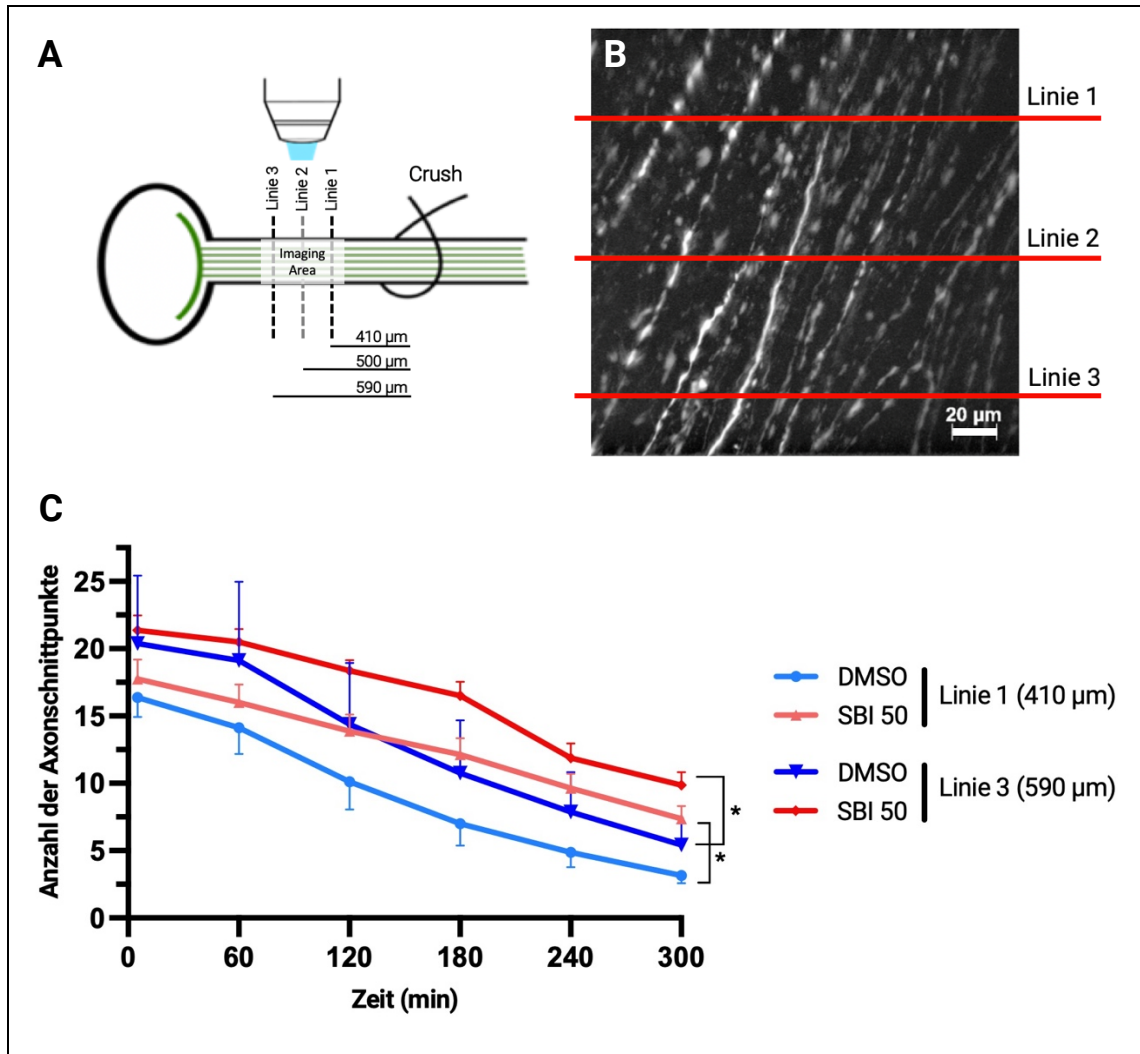


Abbildung 21: Verlust der axonalen Integrität in Abhängigkeit zur Distanz der *Crush*-Läsion. (A) Schematische Darstellung des experimentellen Setups bezüglich der 3-Linien-Quantifizierung. (B) Generierte 2D-Projektion aus einer originalen Z-Stack-Bildaufnahme. Zu jedem Zeitpunkt nach ONC wurden die Schnittpunkte zwischen vertikalen Axonen und drei horizontalen Linien quantifiziert. (C) Die intravitreale Injektion von 50 µM SBI-0206965 (SBI 50) führt zu einer signifikant höheren Anzahl von Axonschnittpunkten im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Dieser Effekt zeigt sich in einer Distanz von 410 µm (Linie 1) und 590 µm (Linie 3) proximal zur *Crush*-Läsion. In kürzerer Distanz zum *Crush* (Linie 1) findet sich eine geringere Anzahl axonaler Schnittpunkte. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler (SEM) bei n = 8 pro Gruppe. * p < 0,05 bei einem *Two-Way ANOVA* mit *Tukey's multiple comparisons test*.

3.1.5 Quantifizierung der axonalen *Bulbs* in der akuten axonalen Degeneration

Lokale Verdickungen des Axons, sog. axonale *Bulbs*, sind ein frühes morphologisches Korrelat der beginnenden AAD (siehe Kapitel 1.1.2, Seite 2) und wurden als Maß für axonale Degenerationsprozesse analysiert. Zur Bestimmung der axonalen *Bulb*-Kinetik wurden axonale *Bulbs* nach ONC über 5 Stunden mittels *Live imaging* an SBI behandelten sowie DMSO behandelten RGC-Neuronen bildmorphologisch verfolgt (DMSO-Kontrolle: n = 7; 5 µM SBI: n = 8; 50 µM SBI: n = 8).

Zunächst wurde die Anzahl der axonalen *Bulbs* im zeitlichen Verlauf quantifiziert. Hierfür wurde erstmals im Rattenmodell eine neuartige Auswertungsmethode, die sog. *Axonal Bulb Ratio*, angewendet. Die Anzahl der axonalen *Bulbs* wurde in ein Verhältnis zu der Gesamtlänge des Axons gesetzt und zu allen Zeitpunkten postläsional 400 – 600 µm proximal zum ONC ermittelt (DMSO: n = 7; 5 µM SBI: n = 8; 50 µM SBI: n = 8). In einem flächigem Auswertungsbereich wurde zunächst die Gesamtlänge aller Axone zu einem frühen *Imaging*-Zeitpunkt gemessen und anschließend die numerische *Bulb*-Formation zu jedem Zeitpunkt postläsional erfasst (siehe Kapitel 2.2.11, Seite 36). Mit dieser Auswertungsmethode konnten auch Axone einberechnet werden, die aufgrund des *Bleaching*-Effekts zu späteren Zeitpunkten schwerer auffindbar waren, wohingegen axonale *Bulbs* durch ihre Größe und Stabilität über einen längeren Zeitpunkt fluoreszenzmikroskopisch miterfasst wurden.

Abbildung 22 (Seite 57) illustriert die Ergebnisse der *Axonal Bulb Ratio* im zeitlichen Verlauf. Vor ONC waren in keinem *Live imaging Bulb*-Formationen nachweisbar, sodass neben der AIR und der 3-Linien-Quantifizierung auch mit dieser Auswertungsmethode eine läsionsfreie, operative Exposition des ON bestätigt werden konnte. 5 min nach ONC zeigten sich in allen Versuchsgruppen vereinzelt axonalen Auftreibungen in perlschnurartige Formation entlang des Axonverlaufs. Über die Zeitspanne von 5 bis 180 min zeigte sich ein konstanter Anstieg in der Anzahl der axonalen *Bulbs*, der 180 - 300 min nach ONC ein Plateau erreichte. Die Applikation von 50 µM SBI-Inhibitor führte in den ersten 120 min nach ONC bildmorphologisch zu einer geringeren *Bulb*-Verteilungsdichte, verglichen zur DMSO-Kontrolle und Applikation von 5 µM SBI-Inhibitor. Die Unterschiede erwiesen sich jedoch als statistisch nicht signifikant. Die größte Zunahme der *Bulb*-Verteilungsdichte konnte nach Applikation von 5 µM SBI-Inhibitor beobachtet werden und unterschied sich 240 – 300 min nach ONC leicht signifikant von der DMSO-Kontrollgruppe (*Two-Way ANOVA*, *Interaction* $p > 0,05$, mit *Tukey's multiple comparisons test*, $p < 0,05$ für DMSO vs. SBI 5 µM 240 – 300 min nach ONC).

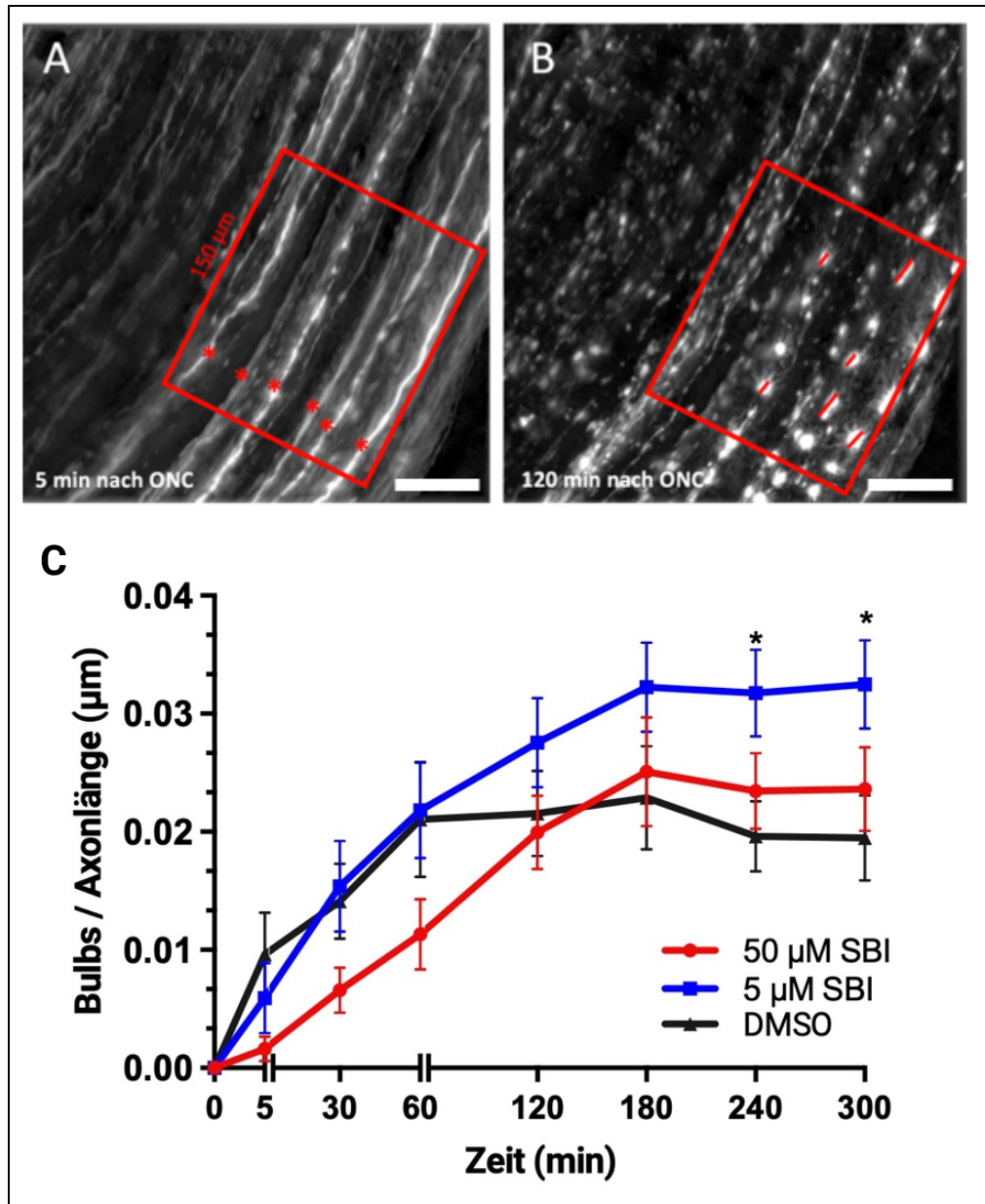


Abbildung 22: Bulb-Verteilungsdichte nach intravitrealer Injektion von SBI-0206965. (A) Beispielhafte Auswertung mittels *Axonal Bulb Ratio*: 5 min nach ONC wurde in einer geeigneten Axonregion alle Axone (*) in allen Z-Ebenen innerhalb des Vierecks gezählt (mit der Länge des Vierecks multipliziert entspricht dies der Gesamtlänge der Axone in dieser Region). (B) Beispielbild 120 min nach ONC mit Quantifizierung der axonalen *Bulbs* in Anzahl und Durchmesser. Die Anzahl der axonalen *Bulbs* zu jedem Zeitpunkt pro Axonlänge entspricht der *Axonal Bulb Ratio*. Die Bilder zeigen generierte 2D-Projektionen aus originalen Z-Stack-Bildaufnahmen der *Live imagings*, Maßbalken 50 µm. (C) Die Verläufe zeigen die *Bulb-Verteilungsdichte* (*Axonal Bulb Ratio*) nach intravitrealer Injektion von 50 µM SBI-0206965 (n = 8), 5 µM SBI-0206965 (n = 8) sowie einer DMSO-Kontrolle (n = 7). Die intravitrealen Injektionen von 50 µM führt zu keinem signifikanten Unterschied zur DMSO-Kontrolle. 5 µM SBI-0206965 führt 240 und 300 min nach ONC zu einer leicht erhöhten *Bulb*-Anzahl. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler (SEM), * p < 0,05 bei einem *Two-Way ANOVA* mit *Tukey's multiple comparisons test*.

In der Abbildung 23 ist die Größenquantifizierung der axonalen *Bulbs* graphisch über 300 Minuten nach ONC für die 3 Versuchsgruppen 50 μM SBI-0206965, 5 μM SBI-0206965 und DMSO dargestellt. Bei allen detektierbaren *Bulbs* einer definierten Region (siehe Kapitel 2.2.11, Seite 36) wurden der längste Durchmesser zu jedem Zeitpunkt postläsional ermittelt. In den ersten 30 Minuten nach ONC zeigte sich in allen Versuchsgruppen ein progredienter Größenzuwachs in der Durchmesseranalyse. 60 – 300 Minuten nach ONC wurde in keiner Versuchsgruppe eine weitere Zunahme der *Bulb*-Durchmesser dokumentiert. 5 Minuten nach ONC verminderte die intravitreale Applikation von 50 μM sowie 5 μM SBI-0206965 die *Bulb*-Größe im Vergleich zur DMSO-Behandlung. Dieses Ergebnis war statistisch signifikant (*Two-Way ANOVA*, *Tukey's multiple comparisons test*, 50 μM SBI: $p < 0,01$; 5 μM SBI: $p < 0,1$). Zu allen weiteren Zeitpunkten postläsional konnte kein signifikanter Größenunterschied in der Durchmesseranalyse zwischen der SBI-0206965-Behandlung und der DMSO-Kontrolle nachgewiesen werden.

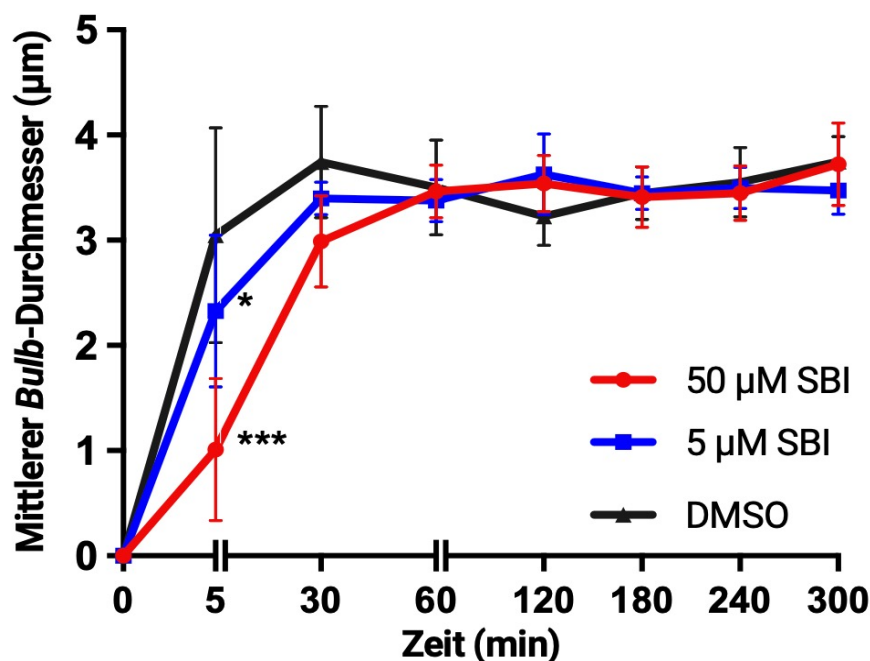


Abbildung 23: Die axonale *Bulb*-Größe bleibt postläsional durch SBI-0206965 nahezu unbeeinflusst. Die intravitreale Injektion von 50 μM und 5 μM SBI-0206965 führt zu einer geringen Abnahme der durchschnittlichen *Bulb*-Größe 5 min nach ONC im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler (SEM) bei einer Anzahl von 7 – 8 Tieren pro Gruppe. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ bei einem *Two-way ANOVA* mit anschließendem *Tukey's multiple comparisons test*.

3.2 Immunhistochemische Quantifizierung von Autophagiemarkerproteinen

Um die Effekte von SBI-0206965 als Autophagie-Inhibitor auf die molekularen Prozesse der der AAD postläsional zu untersuchen, wurden immunhistochemische Analysen der Autophagiemarkerproteine MAP1LC3-II (*Microtubule-associated protein 1A/1B light chain 3B-II*, im Folgenden LC3 genannt) und SQSTM1/p62 (*Sequestosome 1*) durchgeführt. Ziel war es, die protektiven Effekte des SBI-Inhibitors auf die AIR und 3-Linien-Quantifizierung (siehe Kapitel 3.1.3, Seite 50, Kapitel 3.1.4, Seite 53) durch den Nachweis einer intraaxonalen Autophagie-Inhibition zu bestätigen. 5 Stunden nach ONC wurde der ON 400 μm proximal und distal zur *Crush*-Läsion in 16 μm dünnen, longitudinalen Anschnitten immunhistochemisch und konfokalmikroskopisch analysiert. Pro Versuchstier wurden 12 Bilder in 3 verschiedenen Tiefenanschnitten dieser Region des ON analysiert. Die Anzahl der intraaxonalen LC3- und p62-*Puncta* wurde mit der prozentualen Axonfläche des Bildes (SMI-32 als Axonmarker) ins Verhältnis gesetzt.

Nachfolgende Abbildungen illustrieren zunächst repräsentative konfokalmikroskopische Aufnahmen der LC3-Färbungen. Die Ergebnisse der LC3-Quantifizierung werden in Kapitel 3.2.1 detailliert dargestellt, beginnend mit der Analyse intraaxonaler LC3-*Puncta* sowie der Untersuchung der Gesamtanzahl aller LC3-*Puncta* pro Färbeaufnahme. Anschließend werden die Daten der p62-*Puncta*-Analyse präsentiert (Kapitel 3.2.2).

3.2.1 Ergebnisse der LC3-Quantifizierung

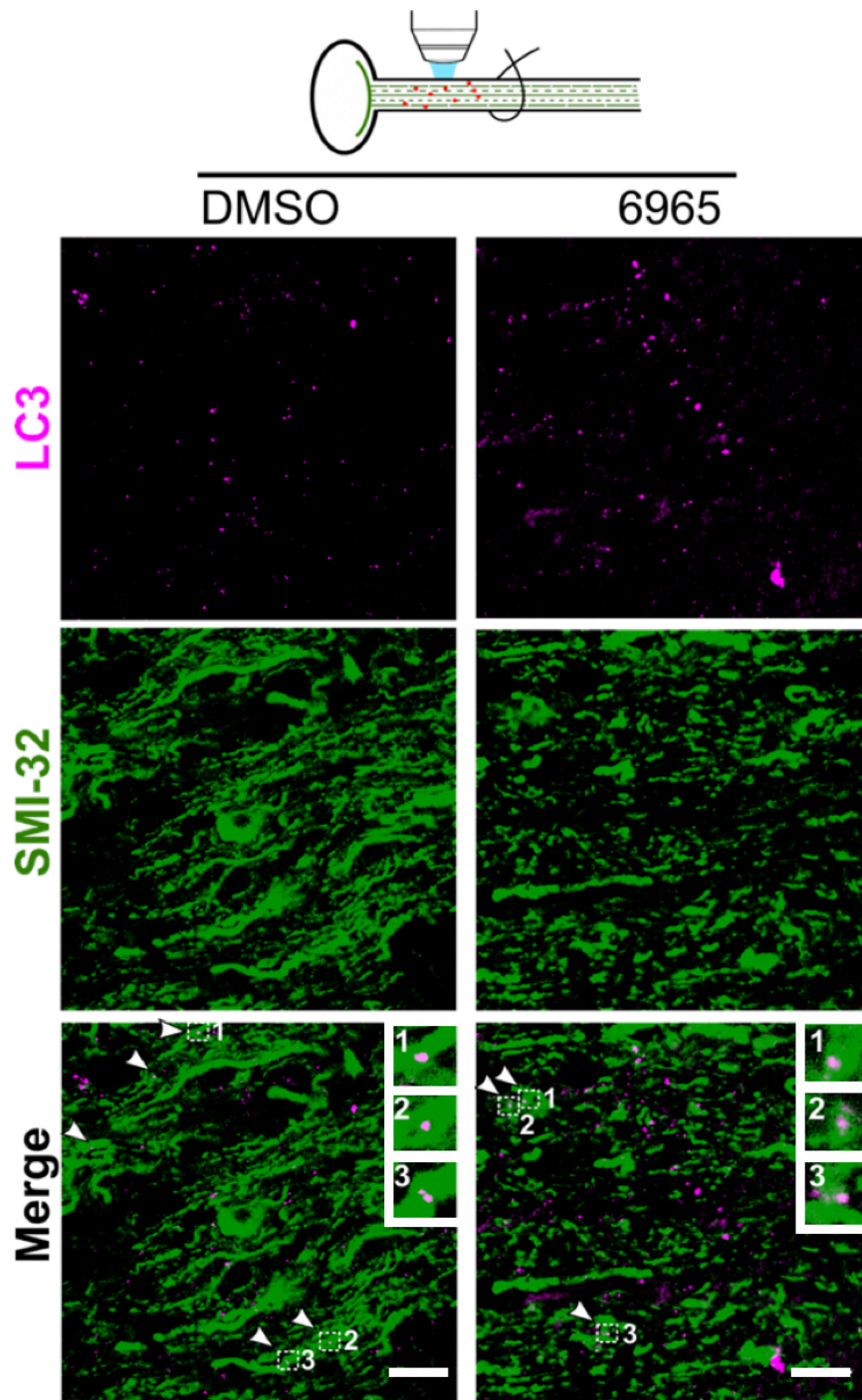


Abbildung 24: Repräsentative Aufnahmen der immunhistochemischen LC3-Quantifizierung 400 μm proximal. Aufnahmen mit dem Konfokalmikroskop immunhistochemischer Färbungen zur Detektion des axonalen Markers SMI-32P (grün) und des Autophagosomenmarkers LC3 (Magenta) im ON 5 h nach ONC. Pfeile zeigen intraaxonale LC3-Puncta, Einschübe zeigen Beispiele in höherer Vergrößerung. Maßbalken 10 μm . Diese Abbildungen wurden teilweise in Vahsen et al. (2020) veröffentlicht.

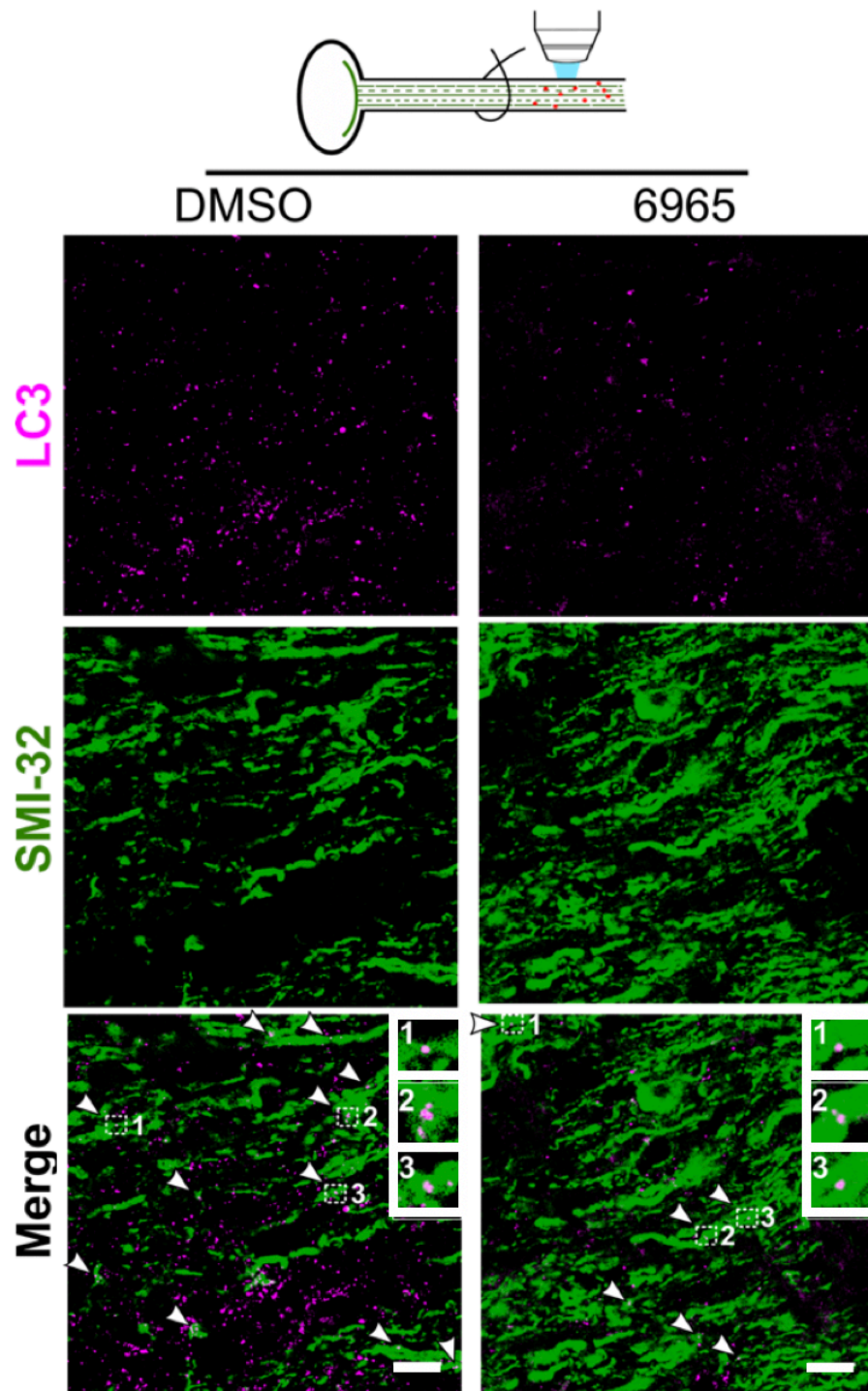


Abbildung 25: Repräsentative Aufnahmen der immunhistochemischen LC3-Quantifizierung 400 μm distal. Aufnahmen mit dem Konfokalmikroskop immunhistochemischer Färbungen zur Detektion des axonalen Markers SMI-32P (grün) und des Autophagosomenmarkers LC3 (Magenta) im ON 5 h nach ONC. Pfeile zeigen intraaxonale LC3-Puncta, Einschübe zeigen Beispiele in höherer Vergrößerung. Maßbalken 10 μm . Diese Abbildungen wurden teilweise in Vahsen et al. (2020) veröffentlicht.

Die Abbildung 26 (Seite 63) zeigt die Quantifizierung der LC3-*Puncta* 400 μm proximal und distal zur *Crush*-Läsion, 5 Stunden nach ONC ($n = 3$). Untersucht wurde die Anzahl der intraaxonalen *Puncta* nach Injektion von 50 μM SBI-0206965 verglichen zur DMSO-Injektion. Proximal zum ONC zeigte sich nach SBI-Behandlung eine geringere Anzahl von LC3-*Puncta* im Verhältnis zur DMSO-Kontrolle, ohne statistische Signifikanz. Auch 400 μm distal des ONC zeigte sich der Effekt einer verringerten Anzahl von LC3-positiven *Puncta* unter 50 μM SBI-0206965, mit einer statistischen Signifikanz im *One-way ANOVA*, gefolgt vom *Tukey's multiple comparisons test* ($p < 0,01$).

Neben dem intraaxonalen LC3-Nachweis ergab die konfokalmikroskopische Analyse auch LC3-*Puncta* im extraaxonalen Gewebe des ON. Um eine Übersicht über die Autophagieaktivität in allen Gewebearten des ON (Axone, Astrozyten, Oligodentroyten) nach intravitrealer Injektion von 50 μM SBI-0206965 zu erlangen, analysierten wir die Gesamtanzahl (*Overall-Analyse*) aller LC3-*Puncta* pro Bildaufnahme 400 μm proximal und distal zur *Crush*-Läsion 5 Stunden nach ONC ($n = 3$). Die Gesamtanzahl setzt sich in der *Overall-Analyse* aus intraaxonalen und extraaxonalen *Puncta* zusammen und ist in Abbildung 26C illustriert. 5 Stunden postläsional konnte distal zur *Crush*-Läsion nach SBI-Behandlung eine signifikant herabgesetzte Anzahl von LC3-positiven *Puncta* beobachtet werden (*One-way ANOVA*, gefolgt vom *Tukey's multiple comparisons test*, $p < 0,01$ für 50 μM SBI- 0206965 vs. DMSO).

In der gemeinsamen bildmorphologischen Betrachtung von proximal und distal zum ONC liegenden Axonregionen zeigte sich zudem eine deutlich höhere LC3-Konzentration im distalen Axonanteil. Sowohl unter SBI-Behandlung (50 μM), als auch in der DMSO-Kontrolle wurden in den distal zum ONC liegenden Regionen eine höhere Anzahl an intraxonalen LC3-*Puncta* pro *Imaging*-Bereich detektiert. Dieser Unterschied konnte in der DMSO-Gruppe (DMSO proximal vs. DMSO distal) im *One-way ANOVA* mit anschließendem *Tukey's multiple comparisons test* als signifikant nachgewiesen werden ($p < 0,001$).

Zusammenfassend konnte sowohl in der intraaxonalen als auch in der *Overall-Analyse* immunhistochemisch ein statistisch signifikanter, hemmender Effekt des ULK1-Inhibitors SBI-0206965 (50 μM) auf die Autophagosomenbildung in der AAD 5 h nach ONC 400 μm distal beobachtet werden. Zudem zeigten sich distal zur *Crush*-Läsion signifikant höhere LC3-Konzentrationen in beiden Versuchsgruppen im Vergleich zur proximalen Axonregion.

ERGEBNISSE

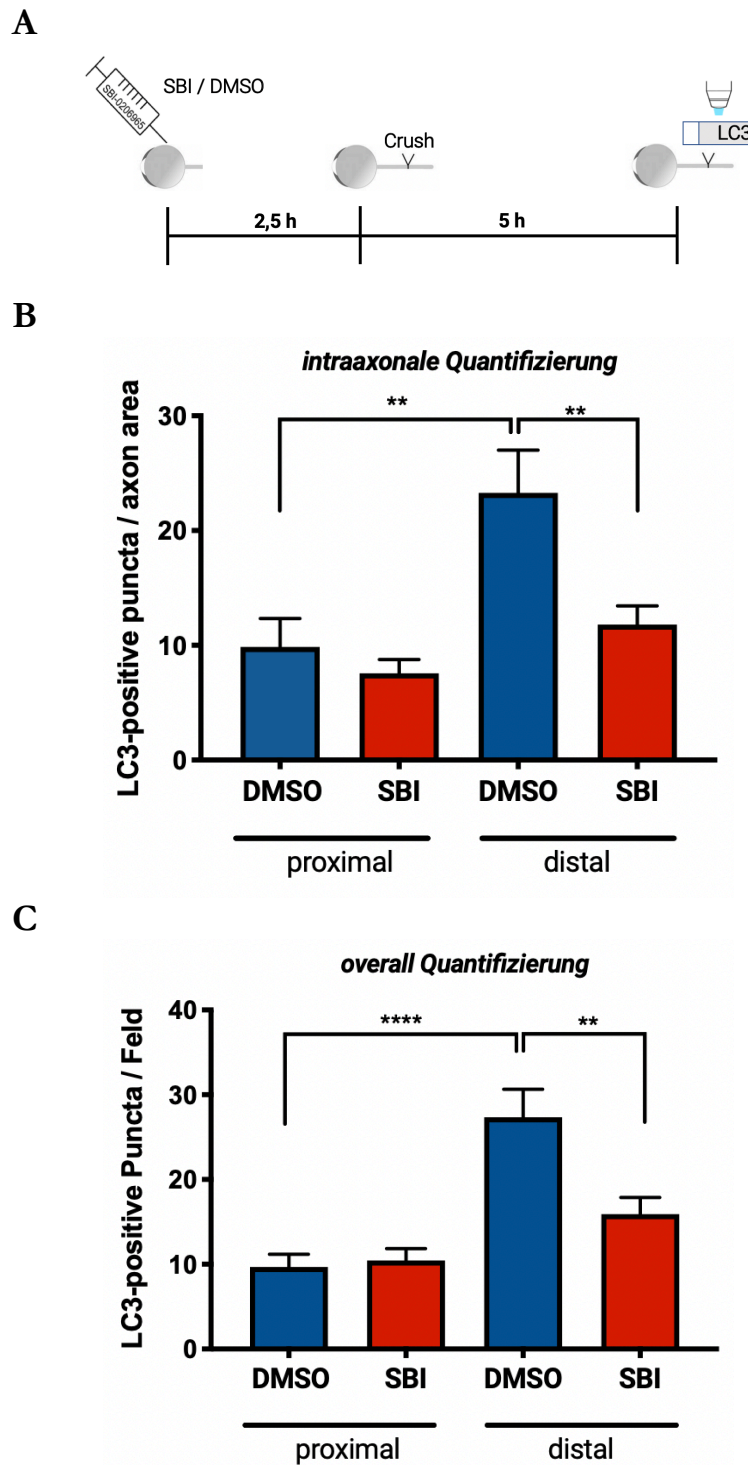


Abbildung 26: Intravitreale Injektion von 50 μ M SBI-0206965 reduziert die Anzahl LC3-positiver Puncta 5 h nach *Crush*-Läsion. (A) Schematische Darstellung der zeitlichen Abfolge des Versuchsaufbaus. (B) Quantifizierung der intraaxonalen LC3-Puncta, normalisiert zu prozentualen Axonfläche. Analyse von 11-13 Feldern 400 μ m proximal und distal zur *Crush*-Läsion pro Tier ($n = 3$). (C) Quantifizierung der Gesamtanzahl von LC3-Puncta pro Färbeaufnahme. Analyse von 11-13 Feldern 400 μ m proximal und distal zur *Crush*-Läsion pro Tier. Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler (SEM) bei einer Anzahl von 3 Tieren pro Gruppe. ** $p < 0,01$; ** $p < 0,0001$ bei einem *One-Way ANOVA* mit *Tukey's multiple comparisons test*. Diese Daten wurden teilweise in Vahsen et al. (2020) veröffentlicht.**

3.2.2 Ergebnisse der p62-Quantifizierung

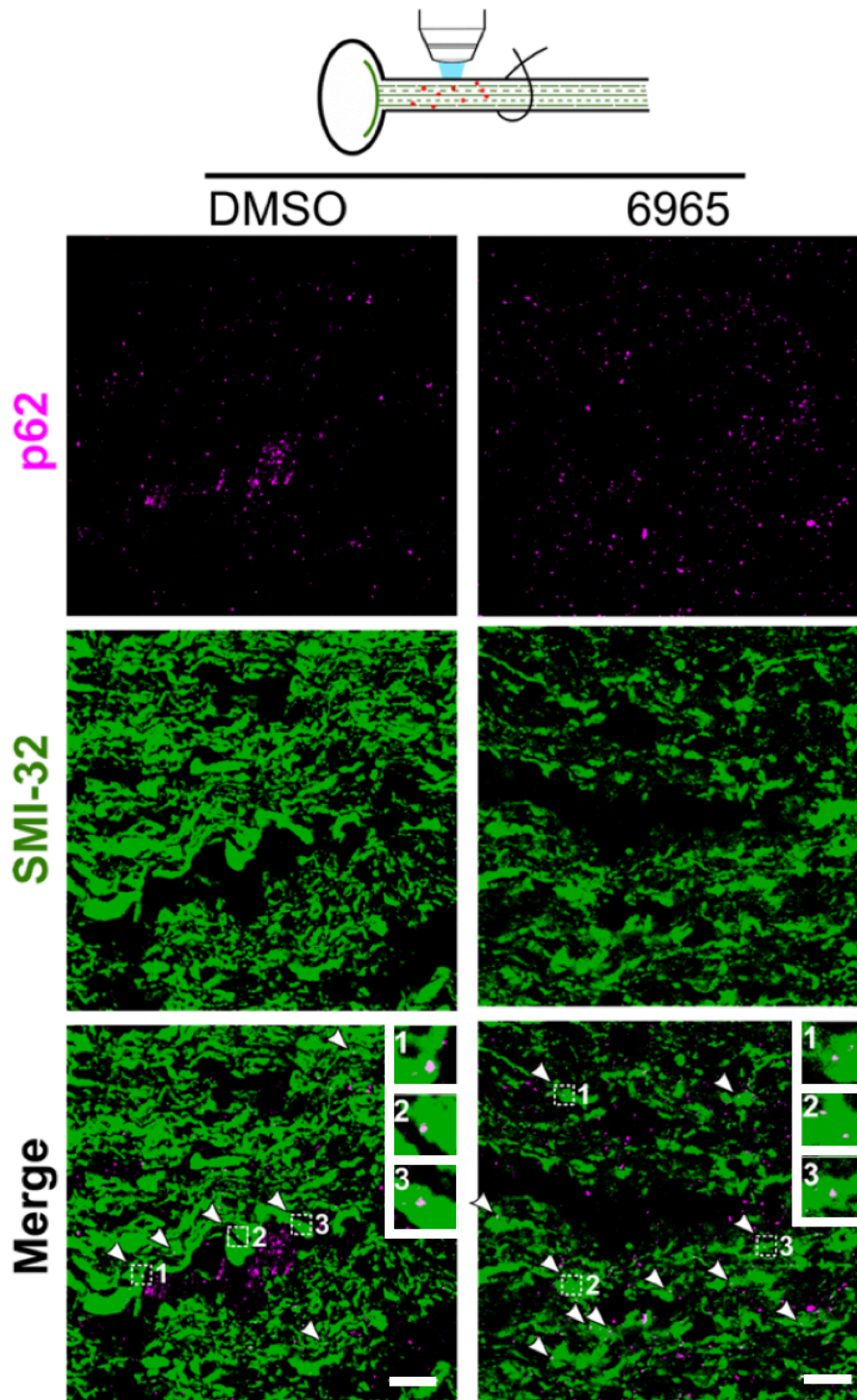


Abbildung 27: Repräsentative Aufnahmen der immunhistochemischen p62-Quantifizierung 400 μm proximal. Konfokalmikroskopische Aufnahmen immunhistochemischer Färbungen zur Detektion des axonalen Markers SMI-32P (grün) und des Autophagosomenmarkers p62 (Margenta) im optischen Nerv 5 h nach ONC. Pfeile zeigen intraaxonale p62-Puncta, Einschübe zeigen Beispiele in höherer Vergrößerung. Maßbalken 10 μm .

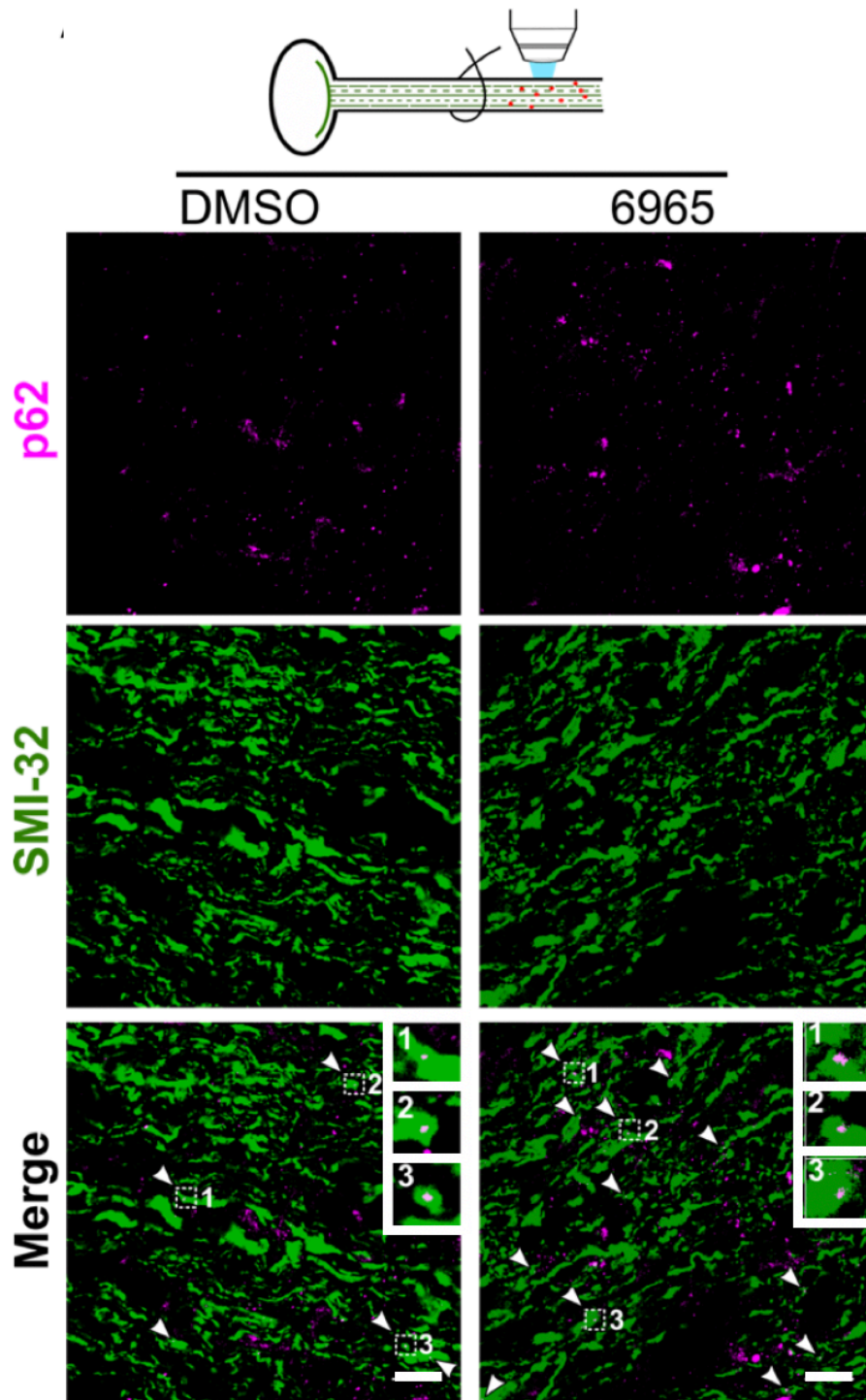


Abbildung 28: Repräsentative Aufnahmen der immunhistochemischen p62-Quantifizierung 400 μm proximal. Konfokalmikroskopische Aufnahmen immunhistochemischer Färbungen zur Detektion des axonalen Markers SMI-32P (grün) und des Autophagosomenmarkers p62 (Magenta) im optischen Nerv 5 h nach ONC. Pfeile zeigen intraaxonale p62-Puncta, Einschübe zeigen Beispiele in höherer Vergrößerung. Maßbalken 10 μm .

Um die Effekte der Applikation von SBI-0206965 auf die molekularen Prozesse der Autophagie im Rahmen der AAD postläsional genauer zu untersuchen, wurde neben der LC3-Analyse eine Quantifizierung des molekularen Autophagiemarkerproteins p62 durchgeführt. p62 rekrutiert durch eine LC3-Interaktionsregion (LIR) ubiquitinierte Proteine für die autophagosomale Degradation und wird selbst durch Autophagie abgebaut. Eine Inhibition der Autophagie führt infolgedessen zu einer Akkumulation von p62, während sich durch eine Induktion verringerte Werte beobachten lassen. Die spezifische Degradation durch Autophagie macht p62 zu einem wertvollen Marker für die Autophagieaktivität.

5 Stunden nach ONC wurde p62 400 μm proximal und distal zur *Crush*-Läsion immunhistochemisch analysiert. 97 Bildbereiche (SBI 50 μM proximal: 28; SBI 50 μM distal: 27; DMSO proximal: 20; DMSO distal: 22) wurden bei 5 Tieren pro Gruppe analog zu LC3-Analyse ausgewertet. Nach intravitrealer Injektion von 50 μM SBI-0206965 konnte proximal sowie distal im Vergleich zur DMSO-Kontrolle eine erhöhte Anzahl an intraaxonalen p62-positiven *Puncta* nachgewiesen werden (Abbildung 29B). Dieser Effekt war 400 μm distal der *Crush*-Läsion im *One-way ANOVA*, gefolgt vom *Tukey's multiple comparisons test*, statistisch signifikant ($p < 0,01$). In der Analyse aller p62-*Puncta* (*overall*-Analyse, intra- und extraaxonal) pro Bildbereich 400 μm proximal und distal zur *Crush*-Läsion konnte kein signifikanter Unterschied in den Versuchsgruppen beobachtet werden (Abbildung 29C).

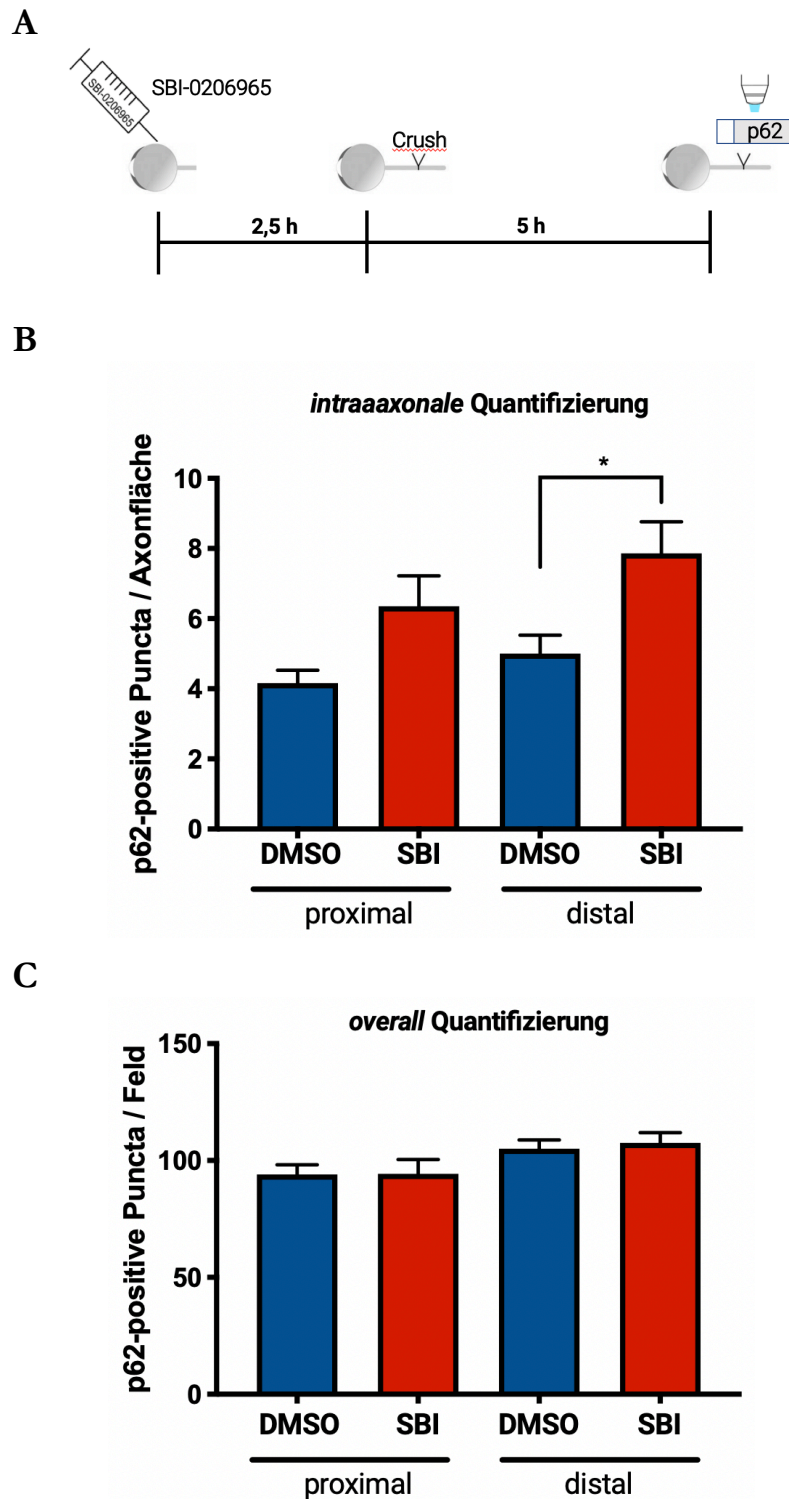


Abbildung 29: Intravitreale Injektion von 50 μM SBI-0206965 erhöht die Anzahl p62-positiver Puncta 5 h nach *Crush*-Läsion.

(A) Schematische Darstellung der zeitlichen Abfolge des Versuchsaufbaus. (B) Quantifizierung der intraaxonalen p62-Puncta, normalisiert zu prozentualen Axonfläche. Analyse von 97 Feldern 400 μm proximal und distal zur *Crush*-Läsion ($n = 5$). (C) Quantifizierung der Gesamtanzahl detektierbarer LC3-Puncta pro Färbefeld. Analyse von 97 Feldern 400 μm proximal und distal zur *Crush*-Läsion ($n = 5$). Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler (SEM). * $p < 0,01$; *One-way ANOVA* mit *Tukey's multiple comparisons test*.

3.3 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die vorliegende Studie sollte in einem translationalen Ansatz klären, ob der hochselektive niedermolekulare ULK1-Inhibitor SBI-0206965 durch eine Inhibition der Autophagie im Tiermodell vorteilhafte Effekte in der akuten axonalen Degeneration zeigt, um einen potentiellen therapeutischen Ansatzpunkt im Pathomechanismus der akuten axonalen Degeneration zu evaluieren.

Zusammenfassend konnten folgende Ergebnisse erhoben werden: Die intravitreale Injektionen von 50 μ M SBI-0206965 2,5 h vor ONC führen zu einem reduziertem Integritätsverlust in der *Axonal integrity ratio* 240 und 300 Minuten nach *Crush*-Läsion, verglichen zur DMSO-Kontrolle. Eine Konzentration von 5 μ M SBI-0206965 hatte keinen signifikanten Effekt auf die AIR. Auch in der 3-Linien-Quantifizierung konnte der Effekt eines verminderten axonalen Integritätsverlusts anhaltend signifikant 180 bis 300 Minuten postläsional in der 50 μ M SBI-0206965-Gruppe nachgewiesen werden. Zudem wurde in der 3-Linien-Quantifizierung der Propagationseffekt der axonalen Fragmentierung in der AAD präzise über Ort und Zeit analysiert. Die Ergebnisse zeigen, dass der SBI-Inhibitor zwar die morphologischen Degenerationsprozesse verzögert, jedoch nicht entscheidend abschwächt. Der ULK1-Kinase-Inhibitor SBI-0206965 führte in der *Bulb*-Analyse in den ersten Minuten nach ONC zu einer verringerten *Bulb*-Größe. Die immunhistochemischen Analysen konnten zusammengefasst zeigen, dass die intravitreale Injektion von 50 μ M SBI-0206965 2,5 Stunden vor ONC postläsional nach 5 Stunden zu einer signifikanten Reduktion der intraaxonalen LC3-*Puncta* führt. Korrespondierend ließ sich in der 50 μ M SBI-0206965-Gruppe eine signifikante p62-Akkumulation nach SBI-Applikation nachweisen. Dies lässt auf eine Inhibition der Autophagie durch SBI-0206965 mit einer verminderte Bildung LC3-II-positiver Autophagosomen im *autophagic flux* schließen. Im distalen Axonabschnitt fanden sich zudem höhere Konzentrationen des LC3-Proteins als im proximalen Anteil.

4 DISKUSSION

4.1 *Live imaging* des optischen Nervs nach *Crush*-Läsion als ein verlässliches Modellsystem zur Evaluation der AAD *in vivo*

In der vorliegenden Arbeit wurde der Effekt des selektiven ULK1-Inhibitors SBI-0206965 auf die AAD *in vivo* im *Live-imaging*-Modell des ON untersucht (Knoferle et al. 2010). Als etabliertes Modellsystem konnten *Live imagings* bereits in vorangegangenen Studien zur Evaluation der Pathophysiologie degenerativer axonaler Prozesse im ZNS beitragen (Knoferle et al. 2010; Koch et al. 2011).

Durch die *Live-imaging*-Technik lassen sich Einblicke in dynamische Prozesse der Zellmorphologie, der Interaktion von Proteinen oder in Zellorganelldynamiken gewinnen, um ein besseres Verständnis biologischer Funktionen zu erlangen (Baker 2010). Durch die *In-vivo*-Mikroskopie des *Nervus opticus* bietet sich die Möglichkeit, Dynamiken der axonalen Degeneration am lebenden Tier adäquat über 6 h darzustellen und in Echtzeit zu analysieren (Knoferle et al. 2010; Koch et al. 2011). Im fixierten Nervengewebe wäre die Aussagekraft zu morphologischen Veränderungen durch Fixations- und Färbeartefakte sowie eine begrenzte Zeitkinetik bezeichnend eingeschränkt. Weiterhin wird vermutet, dass Störungen im axonalen Transport, in mitochondrialen Funktionen und in der intraaxonalen Calciumhomöostase wichtige Schlüsselereignisse in der Pathogenese axonaler Degeneration darstellen (Coleman 2005), deren Dynamik sich im fixierten Gewebe gleichermaßen nur unzureichend untersuchen ließe.

Der ON zeigt sich im Tiermodell durch die gute anatomische, chirurgische Erreichbarkeit sowie durch seine therapeutische Manipulierbarkeit als ein geeignetes Modell für die Evaluation einer ULK1-Beeinflussung in der akuten axonalen Degeneration *in vivo*. RGC-Axone können durch intravitreale Injektionen viraler Vektoren oder pharmakologischer Substanzen auf einfachem Wege manipulieren werden (Koch et al. 2011). Demnach erscheint *Live-imaging in vivo* zur Analyse axonaler Degenerationsmechanismen als Methode der Wahl (Koch et al. 2011).

Die inkomplette Transsektion des gesamten Sehnervs durch eine definierte Quetschung (ONC) induziert in der vorliegenden Studie die AAD (Lingor et al. 2007; Knoferle et al. 2010; Koch et al. 2011). Die RGC-Axone werden durchtrennt, die anatomischen Grundstrukturen des *N. opticus* bleiben jedoch intakt und die fixierten Axone können im *Live imaging* zu jedem Zeitpunkt in gleicher Lokalisation aufgesucht werden. Um degenerative Veränderungen an den RGC-Axonon auszuschließen, die bereits vor ONC durch die

chirurgische Exposition entstanden, wurde in dieser Studie vor jeder *Crush*-Läsion ein Kontroll-*Imaging* (Kapitel 2.2.9) durchgeführt. Nachweislich zeigten sich nach chirurgischer Exposition des optischen Nerven (Kapitel 2.2.7) keine Anzeichen der akuten axonalen Degeneration (axonale *Bulbs*, axonale Desintegrität) vor ONC.

Mittels Poweranalysen, Erfahrungswerten aus vorherigen *In-vivo*-Studien zur AAD am optischen Nerv (Knoferle et al. 2010; Ribas et al. 2016; Vahsen et al. 2020) sowie in sorgfältiger Abwägung zwischen Reduktion von Tierzahlen und zugleich wissenschaftlicher Aussagekraft wurde eine Tieranzahl von 10-13 Tieren in Kontroll- und Interventionsgruppen gewählt.

4.2 *Live imaging* proximo-dorsal gelegener RGC-Neurone

Die dorsalen RGC-Neurone wurden 400 – 600 μm proximal der *Crush*-Läsion im zeitlichen Abstand von 5, 30, 60, 180, 240 und 300 Minuten nach erfolgtem ONC analysiert. Dieser räumliche und zeitliche *Imaging*-Bereich ergibt sich aus früheren Untersuchungen der AAD, wo morphologische Charakteristika sowie ein axonaler Integritäts- und Funktionsverlust 500 μm proximal und distal der Läsion in den ersten sechs Stunden nach ONC gezeigt werden konnten (Kerschensteiner et al. 2005; Knoferle et al. 2010; Ribas et al. 2016).

Die gezielte Transduktion insbesondere dorsal liegender RGC-Neurone des *N. opticus* wurde durch die intravitreale Injektion adenoassoziierter viraler Vektoren (AVV) zum kranialen Bereich der *Retina* erreicht. Durch die Auswahl eines geeigneten Serotyps von AAV-1/2 und eines *Synapsin*-Promotors für die selektive Fluorophorexpression, in dieser Studie AAV.eGFP, können Axone epifluoreszenzmikroskopisch sichtbar gemacht werden (Malik et al. 2005; Koch et al. 2011). Optimale Transfektionsergebnisse durch AAV.eGFP wurden in dieser Studie im *Live imaging*, in den retinalen *Flat-mount*-Präparaten und in der konfokalen Mikroskopie nachgewiesen und sind mit den Ergebnissen von Knoferle et al. 2010 vergleichbar.

Es besteht ein überaus hohes Forschungsinteresse im Erhalt und Regenerationsprozess des proximalen Axonsanteils nach Axotomie. Während distale Axonanteile verzögert nach etwa 24 – 72 in der Wallerschen Degeneration ihre axonale Integrität verlieren (Waller 1851; Conforti et al. 2014), führt die axonale Degeneration des proximalen Axons nach einem *Dying-back*-Muster in Richtung des Somas zum Absterben des Neurons (Öztürk et al. 2013). In vorherigen Studien unserer Arbeitsgruppe (Knoferle et al. 2010) wurden sowohl proximal als auch distal zum ONC gelegene Bereiche im Modell der

AAD in der *Live-imaging*-Technik untersucht. Knöferle et. al. postulierten einen morphologisch gleichen Degenerationsmechanismus zu beiden Seiten des Läsionsortes innerhalb der ersten 6 Stunden nach ONC, unabhängig von der Lagebeziehung zum Soma (Knöferle et al. 2010). Die chirurgische Exposition distal liegender Bereiche des optischen Nervs bringt aufgrund der anatomisch tieferen Lage jedoch eine erhöhte Verletzungsgefahr der RGC-Axone mit sich. Zudem sind die *Z-Stack*-Aufnahmen (Kapitel 2.2.9) bei steilem vertikalem Nervenverlauf erschwert und das Aufsuchen und Wiederfinden der distalen *Imaging*-Region mit einer längeren Belichtungszeit verbunden. Dies führt insgesamt zu einem stärkeren *Bleaching*-Effekt (*Bleaching*, Photobleichung), mit nachfolgend geringerer Bildqualität sowie einer erhöhten Phototoxizität der RGC-Neurone. Das Ausmaß des *Bleaching*-Effekts, bedingt durch eine Zerstörung der Fluorophormoleküle bei Bestrahlung mit Anregungslicht, hängt insbesondere von der Energie und Intensität des Anregungslichtes sowie vom strukturellen Aufbau des Fluorophors ab (Song et al. 1995). Diesbezüglich wurde in dieser Studie die Bildgebung bewusst auf den Bereich 400 bis 600 μm proximal zur Läsionsstelle beschränkt und distal zum ONC liegende Regionen nicht belichtet. Verglichen zu Vorstudien mit gleichzeitigem distalen und proximalen Imaging konnten wir bei ausschließlich proximalem Imaging mit geringstmöglicher Belichtungsintensität (Kapitel 2.2.9) eine deutlich verbesserte Bildqualität - insbesondere zu den späten Zeitpunkten vier und fünf Stunden nach ONC - generieren.

Der in dieser Studie gezeigte axonale Zerfall unbehandelter RGC-Neurone ist mit den *Live-imaging*-Ergebnissen von Knöferle et. al. 2010 sowie Ribas und Zhang et. al 2016 gut vereinbar. Dies gilt insbesondere für den progredienten axonalen Integritätsverlust über fünf Stunden nach ONC. Geringe Unterschiede lassen sich hingegen in der Geschwindigkeit des axonalen Zerfalls am nativen optischen Nerv (hier DMSO-Kontrolle) feststellen. Die vorliegende Studie zeigte eine geringfügig länger anhaltende axonale Integrität über die ersten 120 Minuten nach *Crush*-Läsion, gemessen am zeitlichen Verlauf der *Axonal integrity ratio* (AIR), verglichen zu vorangegangene Studien (Knöferle et al. 2010; Ribas et al. 2016; Zhang et al. 2016). Zudem konnten wir in den folgenden 300 Minuten jeweils einen etwas geringeren Integritätsverlust im Vergleich zu Vorstudien abbilden. Eine geringere axonale Degeneration könnte durch eine untersucherabhängige Durchführung der Nervenpräparation mitbedingt sein, beispielsweise durch Dehnungsverletzungen oder während der läsionsgefährdeten Meningepräparation. Durch die adäquate Durchführung des ONC gehen wir jedoch von einer kompletten Axiotomie des optischen Nervs aus. Bei adäquater Verblindung der zu injizierenden Substanz konnte zudem ausgeschlossen werden, dass die in dieser Studie dargestellten Unterschiede zwischen DMSO-Kontrolle und SBI-Inhibitor durch Abweichungen in der

Läsionssetzung hervorgerufen wurden. Der leichtgradig verminderte axonale Integritätsverlust könnte zudem in der verbesserten Bildqualität der *Z-Stack*-Aufnahmen bei ausschließlichem *Imaging* des proximalen Axonabschnitts sowie in einer neuartigen Auswertungsmethode begründet sein. Unter Zuhilfenahme der bereits etablierten AIR erfolgte die Quantifizierung der axonalen Fragmentierung mit dem erstmals verwendeten Plugin *Simple Neurite Tracer* der *Software ImageJ*, durch die Axone in dreidimensionalen Z-Ebenen der ZEN-Aufnahmen automatisiert und sehr präzise in der Länge verfolgt und ausgemessen wurden (Kapitel 2.2.11).

4.3 SBI-0206965 vermindert axonale Integritätsverluste in RGC-Neuronen in der AAD

Zunehmende Evidenz deutet daraufhin, dass eine gestörte Autophagie an einer Vielzahl chronisch-neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Parkinson (Dauer und Przedborski 2003), Morbus Alzheimer (Bordi et al. 2016), Chorea Huntington (Li et al. 2001), ALS (Xie Yuxiang et al. 2015) oder dem Tod von retinalen Ganglienzellen in der glaukomatösen Optikusatrophie (Munemasa und Kitaoka 2015) beteiligt ist (Wang et al. 2018). Die initiale Signalkaskade der AAD wird postläsional (in der vorliegenden Studie nach ONC) durch eine vorübergehend erhöhte axoplasmatische Calciumkonzentration bei schnellem Calciumeinstrom getriggert (Knöferle et al. 2010; Ribas et al. 2016; George et al. 2018). Nach akuten Läsionen des ZNS, einschließlich traumatischen axonalen Verletzungen, Apoplex oder globaler zerebraler Ischämie, konnte eine erhöhte Aktivität der Autophagie detektiert werden (Koch et al. 2010; Ribas et al. 2015; Menzies et al. 2017; Wolf et al. 2019). Innerhalb der ersten Stunden nach AAD-Induktion wurde eine deutlich erhöhte Expression der Autophagieproteine *Unc-51 like autophagy activating kinase* (ULK1), ATG7 und ATG5 im Bereich der Läsionsstelle sowie in axonalen *Bulbs* (bis 1000 μm proximal und distal zum ONC) nachgewiesen (Ribas et al. 2015). Vorangegangene Publikationen beschreiben eine vielversprechende therapeutischer Modulierbarkeit der neuronalen Autophagie in axonalen Degenerationsprozessen und bilden die hypothetische Grundlage des vorliegenden Versuchsprotokoll (Knöferle et al. 2010; Koch et al. 2010; Bisicchia et al. 2017; Zhang et al. 2018; Vahsen et al. 2020). ULK1 fungiert als zentrales Schaltelement im Initiierungsprozess der Autophagie (Koyama-Honda et al. 2013; Petherick et al. 2015; Bingol 2018) und wird zudem durch die Eigenschaften einer Serin/Threonin-Kinase als ein attraktives Ziel für die medikamentöse Modulation durch niedermolekulare Stoffe postuliert (Jiang et al. 2015).

Es geben vielversprechende Hinweise der Vermutung Anlass, dass ULK1 ein wichtiger beeinflussbarer Mediator in axonalen Degenerationsprozessen ist. Aktuelle Studien deuten auf neuroprotektive Effekte einer ULK1-Blockierung in der akuten axonalen Degeneration hin. Die Expression einer dominant negativen Form von ULK1 (ULK1.DN), bestehend aus der C-terminalen Domäne (CTD) von ULK1, inhibiert Autophagie (Chan et al. 2008). In primären kortikalen Neuronen der Ratte vermindert die Überexpression von ULK1.DN die axiotomieinduzierte AAD *in vitro* (Vahsen et al. 2020). ULK1.DN hemmt darüber hinaus im Rattenmodell die AAD im optischen Nerv sowie die länger anhaltenden axonalen Degenerationsprozesse nach Rückenmarksläsionen (Vahsen et al. 2020). Zusammenfassend lässt sich die Hypothese ableiten, dass eine selektive ULK1-Inhibition durch niedermolekulare Stoffe einen protektiven Einfluss auf die läsionsinduzierte AAD *in vivo* haben könnte.

Egan et al. charakterisierten erstmalig den potenten und hochselektiven, niedermolekularen und ATP-kompetitiven ULK1-Kinaseinhibitor SBI-0206965, ein 2-Aminopyrimidinderivat (Egan et al. 2015). SBI-0206965 führt *in vitro* zu einer Suppression nachgeschalteter Phosphorylierungsereignisse der Autophagiekaskade und folglich zu einer potenten Inhibition von Autophagie (Egan et al. 2015). Weitere potentielle Wirkmechanismen von SBI-0206965 werden in Kapitel 5.1.5 diskutiert.

In der vorliegenden Studie wurde im translationalen Ansatz der Effekt von SBI-0206965 auf die Einflussnahme der intraaxonalen Autophagie und Prozesse der AAD nach *Crush*-Läsion erstmalig *in vivo* untersucht. In vorherigen *In-vitro*-Studien sowie Dosisanalysen unserer Arbeitsgruppe konnte nach Applikation von 5, 10 und 50 μM SBI-0206965 eine signifikante ULK-1-Inhibition nachgewiesen werden (Egan et al. 2015; Dite et al. 2018; Vahsen et al. 2020), sodass bei begrenzter Tierversuchszahl die gezeigten Analysen mit 5 und 50 μM SBI-0206965 *in vivo* durchgeführt wurden. Die intravitreale Injektion pharmakologisch wirksamer Substanzen ist eine etablierte Methode in Modellen der AAD (Knofler et al. 2010; Koch et al. 2011; Ribas et al. 2016) und wurde daher als zuverlässige Applikationsform des SBI-Inhibitors gewertet. 5 μl Arbeitslösung wurden gemäß bisheriger Studienlage im Rattenmodell als ein optimales Volumen (Dureau et al. 2000) intravitreal injiziert.

Potentielle unerwünschte Arzneimittelwirkungen von SBI-0206965 wurden bisher *in vivo* nur unzureichend untersucht. Es gibt erste Hinweise darauf, dass SBI-0206965 im Tiermodell unabhängig von Cholesterin- und Triglyceridspiegeln Atherosklerose aggravieren könnte (Wang et al. 2019).

Im *Live-imaging*-Modell des optischen Nervs konnten wir nach intravitrealer Injektion von 50 μM SBI-0206965 eine signifikant erhöhte AIR 4 und 5 Stunden postläsional,

verglichen zur DMSO-Kontrollgruppe, detektieren. Dies belegt eine deutliche Abschwächung der axonalen Fragmentierung nach SBI-Behandlung. Eine geringere Dosierung von 5 μ M SBI resultierte hingegen in keinem signifikanten Unterschied zur Kontrolle und unterscheidet sich somit von *In-vitro*-Analysen, in denen die Applikation von 5 μ M SBI eine signifikante Abschwächung der AAD zeigen konnte (Vahsen et al. 2020). Weitere Studien zur Dosis-Wirkungs-Beziehung in Modellen der AAD *in vivo* sind bis dato ausstehend und von Bedeutung.

Als ergänzender Ansatz zur Messung der axonalen Fragmentierung mittels AIR wurde die Anzahl der Schnittpunkte zwischen den einzelnen Axonen mit drei horizontal verlaufenden Linien zu allen Zeitpunkten postläsional analysiert (3-Linien-Quantifizierung, Kapitel 2.2.11). Ein entscheidender Mehrwert der differenzierte Schnittpunktanalyse gegenüber der AIR liegt in der genaueren Beurteilung von Propagation der AAD entlang der Axone. Axonale Integritätsverluste konnten örtlich präzise über die Zeit analysiert und mit verschiedenen Regionen eines Axons punktuell verglichen werden. Die differenzierte Schnittpunktanalyse 410 μ m und 590 μ m proximal zur *Crush*-Läsion zeigte in kürzerer Distanz den zu erwartenden stärkeren axonalen Integritätsverlust. Zudem ließ sich auch mit dieser Auswertungsmethode eine signifikante Verminderung des axonalen Zerfalls nach SBI-Behandlung nachweisen, unabhängig sowohl von 410 μ m als auch 590 μ m proximal zum ONC. Insgesamt verzögert SBI-0206965 die progressive Axonfragmentation in der AAD, kann jedoch axonale Integritätsverluste nicht entscheidend terminieren.

Die Daten der vorliegenden Studie bekräftigen die Ergebnisse vorangegangener Publikationen, die einen protektiven Effekt auf die AAD durch Autophagie-Inhibition zeigen konnten. Die lokale Applikation des Autophagie-Inhibitors 3-Methyladenin (3-MA) im *N. opticus* der Ratte verzögert *in vivo* die AAD signifikant (Knöferle et al. 2010). ULK1.DN hemmt zudem im Rattenmodell die AAD im optischen Nerv (Vahsen et al. 2020). Somit sind zum aktuellen Zeitpunkt drei verschiedene Ansätze einer Autophagie-Inhibition beschrieben (SBI-0206965, ULK1.DN, 3-MA), die einen protektiven Effekt auf die axonale Fragmentierung nach *Crush*-Läsion zeigen.

Zusammenfassend zeigt die intravitreale Injektion von SBI-0206965 einen positiven Effekt auf die Stabilität und Integrität von Axonen in den ersten 5 Stunden nach *Crush*-Läsion im *N. opticus* der Ratte.

4.4 Effekte von SBI-0206965 auf axonale *Bulbs* im Tiermodell

4.4.1 Axonale Auftreibungen als ein frühes morphologisches Korrelat in der akuten axonalen Degeneration

Ein frühes morphologisches Korrelat in den ersten 30 Minuten der beginnenden axonalen Degeneration ist die Entstehung lokaler Verdickungen des Axons, sog. „*axonal bulbs*“ (Kerschensteiner et al. 2005; Knoferle et al. 2010), die sich in Einzelfällen auch spontan zurückbilden können (Nikić et al. 2011). Axonale *Bulbs* werden bereits 5 Minuten nach ONC in einem Bereich 500 μm proximal und distal der Läsion sichtbar. Elektronenmikroskopischen Analysen zeigen eine zytoplasmatische Ansammlung von Zellorganellen, bei denen es sich vorrangig um Vakuolen und Mitochondrien handelt (Knoferle et al. 2010). Zudem konnten in der AAD Kondensationen und Fehlansrichtungen von Neurofilamenten, gefolgt von einer Fragmentation der Mikrotubulie detektiert werden (Knoferle et al. 2010; Lingor et al. 2012). Auch LC3-markierte Autophagosomen sind mit kollabierten Proteinen des Zytoskeletts wie β -Tubulin-Isotyp III und dem mikrotubuliassoziierten Protein 2 (MAP2) kolokalisiert (Yang et al. 2007). Die damit verbundene Beeinträchtigung des axonalen Transports mit nachfolgender Ansammlung von Zellorganellen könnte eine Rolle in der Bildung axonaler *Bulbs* spielen (Knoferle et al. 2010; Lingor et al. 2012).

4.4.2 SBI-0206965 zeigt keinen entscheidenden Einfluss auf die Morphologie und Kinetik axonaler *Bulbs* in der akuten axonalen Degeneration *in vivo*

In der Quantifizierung der axonalen *Bulb*-Kinetik konnten wir innerhalb der ersten 30 Minuten nach ONC eine leicht verminderte *Bulb*-Größe nach intravitrealer Applikation von 50 μM sowie 5 μM SBI-0206965 im Vergleich zur DMSO-Behandlung darstellen. 50 μM SBI-0206965 führten hierbei insbesondere 5 Minuten nach ONC zu kleineren *Bulb*-Formationen als die Applikation von 5 μM SBI-0206965. Zu allen weiteren Zeitpunkten postläsional konnte kein statistisch signifikanter Größenunterschied in der *Bulb*-Struktur nachgewiesen werden.

Die Anzahl axonaler *Bulbs* wurde bereits in vorangegangenen Studien als Maß für die axonale Degeneration in der AAD analysiert (Knoferle et al. 2010; Ribas et al. 2015; Ribas

und Lingor 2015; Zhang et al. 2016; Vahsen et al. 2020). In unseren Untersuchungen zur Anzahl der axonalen *Bulbs* im Verhältnis zu der Gesamtlänge des Axons, als sog. *Axonal Bulb Ratio*, konnten die ersten axonalen Auftreibungen perlchnurartig entlang der Axone bereits 5 Minuten nach ONC detektiert werden. Über die Zeitspanne von 5 - 180 min zeigte sich ein zu erwartender Anstieg in der Anzahl axonaler *Bulbs*. Diese Daten sind mit den *In-vitro*-Ergebnissen von Zhang et. al 2016 gut vereinbar, die eine frühe zeitabhängige Bildung axonaler Auftreibungen in der AAD zeigen (Zhang et al. 2016). Interessanterweise konnten unsere Analysen 180 Minuten nach *Crush*-Läsion keinen weiteren Anstieg in der *Axonal Bulb Ratio* in allen Versuchsgruppen dokumentieren, sodass von keiner entscheidenden Neubildung axonaler *Bulbs* 180 bis 300 Minuten nach ONC *in vivo* ausgegangen werden kann. Zudem könnte ein progredientes *Bleaching* zu einer verminderten Detektion axonaler *Bulb*-Strukturen beitragen, bei optimierten Belichtungszeiten und bildmorphologisch klarer Abgrenzbarkeit 4 und 5 Stunden nach ONC scheinen diese Effekte jedoch von geringer Bedeutung. Auch könnte ein spontanes Zurückbilden von *Bulbs* diese Ergebnisse mitbedingen, was bereits in vorangegangenen Studien *in vivo* gezeigt werden konnte (Nikić et al. 2011). Bisher liegen keine vergleichbaren *In-vivo*-Daten im optischen Nerv vor. Ein derartiges Plateau in der numerischen *Bulb*-Neubildung 3 Stunden nach Induktion der AAD konnte bisher nicht nachgewiesen werden. *In-vitro*-Studien zeigten an unbehandelten Neuronen hingegen eine stetige *Bulb*-Neubildung über 480 Minuten 300-400 μm proximal zur Axotomie (Vahsen et al. 2020).

Während die Applikation von SBI-0206965 in der vorliegenden Studie *in vivo* keinen entscheidenden Unterschied auf die *Bulb*-Neubildungsrate zeigte, konnten vorangegangene *In-vitro*-Studien an kortikalen Neuronen durch eine Überexpression von *Collapsin-Response-Mediator-Protein-2* (CRMP-2) die Formation von axonalen *Bulbs* verzögern und zudem eine Beeinträchtigung des mitochondrialen Transports nach Axotomie vermindern (Zhang et al. 2016). CRMP-2 wird bei Calpain-Aktivierung (früh in der AAD) vermehrt gespalten und ist durch seine molekulare Interaktion mit dem Motorprotein Kinesin-1 an der Organellenbindung im axonalen Transport beteiligt (Kimura et al. 2005; Zhang et al. 2016). Zudem führt eine Inhibition von Calpain zu einer deutlichen Verminderung der axonale Fragmentierung proximal des ONC (Zhang et al. 2016).

Über einen Zusammenhang zwischen der ULK1-Aktivität und der Beeinflussung des axonalen Transports ist bisher nur wenig bekannt. Es wurde eine regulierende Wechselwirkung zwischen ULK1 und axonalem Transport in *Drosophila* beschrieben. UNC-51 (ULK1) phosphoryliert UNC-76, welches das Vesikelprotein Synaptotagmin-1 bindet. Ein Verlust von ULK1 führt zur Trennung synaptischer Vesikel von den Motorkomplexen, mit

schweren Transportdefekten und Ansammlungen von synaptischen Vesikeln und Zellorganellen entlang der Axone (Toda et al. 2008). Inwieweit eine selektive ULK1-Inhibition einen Effekt auf die Vesikelbindung im axonalen Transport hat, wurde bisher nicht ausreichend untersucht. AAV.ULK1.DN reduzierte *in vitro* signifikant die Anzahl neu gebildeter axonaler *Bulbs* ab 3 Stunden nach Axotomie 100 bis 400 μm proximal (Vahsen et al. 2020).

Diese vorrausgegangenen *In-vitro*-Analysen wurden in mikrofluidischen Kammersysteme (*microfluidic chamber*) mit transduzierten primären kortikalen Neuronen (spätembryonale Zellen) der Ratte durchgeführt. Es bleibt fraglich, inwieweit Ergebnisse der *In-vitro*-Studien bei einem Versuchsaufbau im *Microfluidic-chamber*-System mit den vorliegenden Daten dieser *In-vivo*-Studie an adulten RGC-Neuronen vergleichbar sind. Bemerkenswert ist hierbei nicht nur eine differentielle *Bulb*-Kinetik in unbehandelten Neuronen nach AAD-Induktion, sondern auch die Erkenntnis, dass die vielfach beschriebene axonale Fragmentierung innerhalb der ersten Stunden *in vitro* unterbleibt (Zhang et al. 2016; Vahsen et al. 2020). Der Versuchsaufbau innerhalb der *Microgrooves* könnte einen ungewollt protektiven Effekt auf die axonale Stabilität bedingen, da *in vitro* keine physiologische Interaktion zu benachbarten Neuronen sowie Myelinscheide möglich ist. Zudem könnten spätembryonale Neurone (*in vitro*) in Bezug auf molekulare Prozesse und protektiven Eigenschaften der AAD zu adulten RGC-Neuronen (*in vivo*) differieren - und zeigt die Bedeutung weiterer *In-vivo*-Analysen.

Die Kinetik, Pathophysiologie sowie molekulare Mechanismen axonaler Schwellungen in der AAD sind insbesondere *in vivo* zum aktuellen Zeitpunkt nur unzureichend verstanden. Insgesamt zeigen unsere *Bulb*-Analysen, dass die Applikation von SBI-0206965 keinen entscheidenden Einfluss auf die Morphologie und Kinetik axonaler Auftreibungen in der AAD zu haben scheint.

4.5 Potentielle Wirkmechanismen von SBI-0206965 in der akuten axonalen Degeneration

Die dargestellten Ergebnisse geben der Vermutung Anlass, dass eine selektive und dosisabhängige ULK1-Inhibition durch SBI-0206965 zu protektiven Effekten auf die axonale Integrität in der AAD führt. Im Hinblick auf einen translationalen Ansatz ist die hierbei getestete Inkubationszeit von 2,5 Stunden vorteilhaft. Sie bekräftigt die vorangegangenen *In-vitro*-Analysen unserer Arbeitsgruppe an kortikalen Neuronen, die eine rasche pharmakologische ULK1-Hemmung durch SBI-0206965 bereits nach 30 Minuten gezeigt hatten (Vahsen et al. 2020). ULK1-Agonisten wie das Molekül LYN-1604, als potenter Induktor der Autophagie, induzieren den Zelltod *in vivo* (Zhang et al. 2017). Eine Hemmung von ULK1 durch SBI-0206965 schwächte bereits *in vitro* das autophagieabhängige Zellüberleben ab (Egan et al. 2015). Eine Hemmung von ULK1 durch ULK1.DN schützt zudem kortikale Neurone *in vitro* und retinale Ganglienzellen *in vivo* in postläsionalen Modellen der AAD (Vahsen et al. 2020). Die Expression von ULK1.DN wies protektive Effekte auf degenerierende Neurone rubrospinaler Projektionen auf, auch eine Woche nach induzierter Rückenmarksläsion (Vahsen et al. 2020). Überdies konnte eine aktuelle Studie nach ULK1.DN-Expression einen protektiven Effekt auf die MPTP-induzierte Neurotoxizität nigrostriataler Neurone im Parkinson-Mausmodell zeigen, was darauf hindeutet, dass ULK1 zudem ein vielversprechendes neues Ziel bei der Behandlung von Morbus Parkinson sein könnte (Balke et al. 2019).

Eine Inhibition der Autophagie durch siRNA, *Atg7-Knockout* oder der Einsatz von 3-Methyladenin hat in Studien einen protektiven Effekt auf die AAD (Chan et al. 2007; Yang et al. 2007; Knoferle et al. 2010). Auch in der akuten hypoxisch-ischämischen Degeneration, wie sie beim Apoplex zu finden ist, erhöht eine Inhibition der Autophagie durch Ausschaltung von *Atg7* das neuronale Überleben *in vivo* (Koike et al. 2008; Xie et al. 2016). Eine ULK1-Deletion im Mausmodell unterdrückt zudem die durch traumatische Hirnverletzungen (TBI, *traumatic brain injury*) induzierte Autophagie im Hippocampus und hat einen protektiven Effekt auf TBI durch Suppression des p38- und JNK-Signalwegs (Wei et al. 2018).

Die Daten dieser Arbeit sowie die dargestellten Studien bekräftigen die zuvor beschriebene Möglichkeit einer tragenden und therapeutisch beeinflussbaren Rolle von ULK1 in degenerativen neuronalen Prozessen. Es gibt vielversprechende Hinweise, dass SBI-0206965 neben ULK1 die Adenosin-Monophosphat-aktivierte Proteinkinase (AMPK) potent inhibiert und gegenüber des vielverwendeten Compound C vielversprechende Charakteristika eines AMPK-Inhibitors aufweist (Dite et al. 2018). Direkte Phosphorylierungsereignisse am ULK1-Protein und anderen autophagieassoziierten Proteinen (z. B. VSP34

und Beclin-1) bedingen die Initiierung der weiteren Autophagiekaskade (Kim et al. 2011). Eine gleichzeitige Hemmung der AMPK- sowie der ULK1-getriggerten Autophagieinduktion könnte die Wirksamkeit von SBI-0206965 als potenten Autophagieinhibitor in der AAD erklären. Neuste Studien legen zudem nahe, dass Autophagie in der akuten axonalen Degeneration nach Rückenmarksverletzungen auch über den AMPK/ULK1-Weg vermittelt wird und eine Hemmung der Autophagosomenbildung durch 3-Methyladenin oder Compound C (AMPK-Hemmung) das Überleben axotomisierter Neurone verbessert (Knöferle et al. 2010; Bisicchia et al. 2017).

Kürzlich veröffentlichte Arbeiten unserer Arbeitsgruppe geben Hinweise darauf, dass eine ULK1-Hemmung zu einem mTOR-vermittelten Anstieg der Translation und alternativem Spleißen der degenerationsassoziierten Gene Kif1b und Ddit3 führen könnte (Vahsen et al. 2020). Kif1b kodiert für das Motorprotein Kinesin-1b, die an dem Transport von Mitochondrien und synaptischen Vesikeln zum Plus-Ende der Mikrotubuli beteiligt ist (Nangaku et al. 1994) und findet sich bei Morbus Charcot-Marie-Tooth Typ 2A1 mutiert (Zhao et al. 2001). In einem chronischen Mausmodell des Glaukoms resultierte eine verminderte retinale Expression von Kif1b in vermehrten Transportdefekten und Untergang der RGC-Neurone (Breen et al. 2016). Zuvor konnte *in vitro* gezeigt werden, dass Spleißisoformen von KIF1B, die sich in ihren Insertionssequenzen unterschieden, eine höhere motorische Aktivität und Affinität für Mikrotubuli aufweisen (Matsushita et al. 2009).

In Zusammenschau der hiesigen Ergebnisse, der vorausgegangenen Analysen unserer Arbeitsgruppe sowie der aktuellen Studienlage ist von 3 möglichen protektiven Effekten einer ULK1-Inhibition durch SBI-0206965 auf die axonale Degeneration auszugehen. Zu diesen Mechanismen könnte neben einer direkten ULK-Inhibition die Hemmung der Adenosin-Monophosphat-aktivierte Proteinkinase (AMPK) sowie ein mTOR-vermittelter Anstieg der Translation und alternativem Spleißen degenerationsassoziiierter Gene (Kif1b, Ddit3) gehören (Vahsen et al. 2020). Die ULK1-Modulation weist ein hohes therapeutisches Potential auf und in Anbetracht des raschen Fortschritts in der ULK1-Analyse scheint eine gezielte Beeinflussung von ULK1 in naher Zukunft eine vielversprechende Strategie in der Behandlung akuter und chronischer sowie neurodegenerativer Prozesse.

4.6 Weitere ULK1-Inhibitoren

Obleich eine pharmakologische Hemmung von ULK1 einen inhibitorischen Effekt auf die Autophagiekaskade seit Längerem erwarten lässt, gibt es erst wenige Jahre eine verstärkte Entwicklung selektiver ULK1-Inhibitoren. Zwei von einem TBK1-Inhibitor abgeleitete Verbindungen, MRT67307 und insbesondere MRT68921, können als selektive ULK1-Inhibitoren UK1/2 *in vitro* wirksam hemmen und den Autophagosomenfluss in Zellen nachweislich blockieren (Petherick et al. 2015). Auch Lazarus et al. entwickelten zielgerichtete Inhibitoren auf Basis des neu entschlüsselten strukturellen Aufbaus von ULK1 (Lazarus et al. 2015; Lazarus und Shokat 2015). Studien mit neusten niedermolekularen ULK1-Inhibitoren ULK-100 und ULK-101 postulieren in der Krebsforschung eine höhere Wirksamkeit und Selektivität gegenüber zuvor veröffentlichter Hemmstoffe (Martin et al. 2018). Ein direkter Vergleich in *In-vitro*-Kinasetests ergab zudem eine deutlich höhere Selektivität für ULK-101 im Vergleich zu SBI-0206965 (Martin et al. 2018). Diese neuartigen ULK1-Inhibitoren standen zum Zeitpunkt des Beginns dieser Studie noch nicht zur Verfügung und sollten in zukünftigen Analysen auf eine Wirksamkeit in der axonalen Degeneration untersucht werden.

4.7 SBI-0206965 verringert LC3-positive Autophagosomenbildung nach Crush-Läsion in der akuten axonalen Degeneration

Ultrastrukturelle Analysen zeigten bereits wenige Minuten nach induzierter Rückenmarksverletzungen oder ONC typische Anzeichen der axonalen Degeneration und eine Akkumulation von LC3-positiven Autophagosomen (Knoflerle et al. 2010; Kanno et al. 2011; Ribas et al. 2015). In der vorliegenden Studie verminderte die intravitreale Injektion von SBI-0206965 die axonalen Integritätsverluste in der AAD nach ONC *in vivo*. Um die inhibitorische Wirkung des ULK1-Inhibitors SBI-0206965 auf die Autophagie zu bestätigen, führten wir immunhistochemische Analysen des intraneuronalen *autophagic flux* durch. Der *autophagic flux* ist ein Maß für die autophagische Abbauproduktivität und beschreibt den gesamten Prozess der Autophagie, einschließlich der Fusion von Autophagosomen mit Lysosomen sowie anschließender Degradation und Freisetzung von Makromolekülen zurück in das Zytosol (Agholme et al. 2012).

Das Protein MAP1LC3-II (*Microtubule-associated protein 1A/1B light chain 3B-II*, hier als LC3 bezeichnet) dient als spezifischer Marker für Autophagosomen und ist an der initialen

Formation des Phagophors beteiligt (Kabeya et al. 2000; Kim und Gladyshev 2004). Membranbindungs- und Fusionsaktivitäten werden in der Autophagosomen-Biogenese durch LC3 gesteuert, um die Größe von Autophagosomen zu kontrollieren (Antonoli et al. 2017). Eine Erhöhung von LC3 kann sowohl die Induktion von autophagischen Degradationsprozessen als auch eine Inhibition der Autophagosomen-*Clearance* anzeigen.

Des Weiteren interagiert LC3 mit dem spezifischen Ladungsrezeptor SQSTM1 (*Sequestosome 1*), auch Protein p62 genannt, das eine gewisse Selektivität in der Degradation von Ladungsbestandteilen der Autophagosomen induziert (Bjørkøy et al. 2009). P62 rekrutiert durch eine LC3-Interaktionsregion (LIR) ubiquitinierte fehlgefaltete Proteine und beschädigte Mitochondrien für die autophagosomale Degradation, wird selbst durch Autophagie abgebaut und ist somit an die Geschwindigkeit der Autophagosomenbiosynthese gekoppelt (Pankiv et al. 2007; Bjørkøy et al. 2009; Wong und Holzbaur 2014a; Maday 2016). Da eine Inhibition der Autophagie infolgedessen zu einer Akkumulation von p62 führt, und sich durch Induktion verringerte Werte beobachten lassen, dient p62 auch als Marker der Autophagieaktivität (Bjørkøy et al. 2009). Zudem konnten Studien zeigen, dass eine p62-Akkumulation und Induktion auch durch zelluläre Stressoren sowie auf transkriptionaler Ebene durch reaktive Sauerstoffspezies bedingt sein kann, daher besteht eine zurückhaltende Beurteilung der Autophagieaktivität durch singuläre p62-Analysen (Agholme et al. 2012). Die etablierten Autophagiemarkers LC3 und p62 waren durch ihre immunhistochemische Darstellbarkeit in der Konfokalmikroskopie hervorragend für die Analyse des intraaxonalen Autophagieniveaus in der vorliegenden Studie geeignet.

Eine übermäßige Zunahme von LC3-II-positiven Autophagosomen wurde in mehreren Nervenläsionsmodellen beobachtet (Lai et al. 2008; Liu et al. 2008; Knoferle et al. 2010; Kanno et al. 2011; Ribas et al. 2015). 30 Minuten nach *Crush*-Läsion steigt die Anzahl LC3-positiver Autophagosomen im nativem optischen Nerv signifikant an (Knoferle et al. 2010). Der maximale Anstieg des axonalen LC3-Level trat im SCI-Modell (*spinal cord injury*, Rückenmarksverletzung) erst 2 Wochen nach Läsionssetzung auf (Ribas et al. 2015). Neueste Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe konnten nach ULK1-Inhibition durch ULK1.DN eine signifikante Reduktion intraaxonaler Autophagosomen und einen protektiven Effekt auf rubrospinale Neurone in der AAD im Rattenmodell eine Woche nach SCI *in vivo* zeigen (Vahsen et al. 2020). In der hier vorliegenden Studie verringerte die intravitreale Injektion von 50 μ M SBI-0206965 5 Stunden nach *Crush*-Läsion signifikant die Anzahl der distalen intraaxonalen LC3-*Puncta*, was eine verminderte Bildung LC3-II-positiver Autophagosomen vermuten lässt. Korrespondierend ließ sich eine signifikante p62-Akkumulation 5 Stunden

nach *Crush*-Läsion intraaxonal nachweisen, passend zu einer geringeren Autophagosomenformation nach SBI-Behandlung.

Bemerkenswert ist eine hohe Anzahl LC3- und p62-positiver *Puncta*, die sich neben intraaxonalem Nachweis auch im extraaxonalen Gewebe des optischen Nervs zeigten. Ein Anstieg der extraaxonalen LC3-Expression in degenerierenden Axonen steht im Einklang mit den Ergebnissen von Ribas et al. im SCI-Modell und deutet auf eine ebenfalls gesteigerte Autophagieaktivität in der Myelinscheide hin (Ribas et al. 2015). Nach Läsionssetzung im ZNS konnte eine erhöhte LC3-Expression neben Neuronen in Astrozyten und Oligodendrozyten beobachtet werden (Kanno et al. 2011).

Studien zur Autophagie in der AAD in RGC-Neuronen zeigten interessanterweise einen Anstieg der p62-positiven *Puncta* innerhalb der ersten 360 Minuten nach *Crush*-Läsion, während Kalzium-Inhibitoren den p62-Anstieg abschwächten (Knöferle et al. 2010; Koch et al. 2010). Koch et al. postulierten, dass dieser p62-Anstieg auf eine initial erhöhte Autophagie-Nachfrage zur Degradation von Proteinen zerfallener Zytoskelettanteile hinweisen könnte. Eine Hemmung des initialen Calcium-Einstroms könnten neben einer verbesserten axonalen Stabilität auch mit einem vermindertem Substratanfall und geringerer p62-Induktion einhergehen (Koch et al. 2010). Weitere vergleichende *in vivo*-Daten zu p62-Analysen im optischen Nerv liegen aktuell nicht vor.

Die AAV.ULK1.DN-vermittelte Überexpression von dominant-negativem ULK1 führte *in vitro* hingegen zu einer Autophagieinhibition nach Rapamycin-Stimulation mit erniedrigten LC3-II- und erhöhten p62-Spiegeln (Vahsen et al. 2020), passend zu den hier vorliegenden *In-vivo*-Daten. Bei korrespondierender Reduktion der LC3-II-positiven Autophagosomen mit einer signifikant erhöhten intraaxonalen p62-Akkumulation nach SBI-Behandlung gehen wir von einem spezifischen Effekt der Autophagie-Inhibition durch SBI-0206965 *in vivo* aus.

4.8 Unterschiede SBI-unabhängiger Autophagosomen-Konzentrationen zu beiden Seiten der *Crush*-Läsion

Sowohl unter SBI-Behandlung (50 μ M) als auch in DMSO-Kontrollen wurden in den distal zum ONC liegenden Bereichen eine höhere Anzahl an LC3-positiven *Puncta* pro *Imaging*-Bereich detektiert, als in den entsprechenden proximalen Regionen, mit hoher Signifikanz in der DMSO-Kontrollgruppe intraaxonal wie auch in der Gesamtanalyse. Dieser erstmals am optischen Nerv beschriebenen Daten könnten ein Hinweis auf eine unterschiedliche Autophagieaktivität zu beiden Seiten der *Crush*-Läsion 5 Stunden nach Beginn der traumatischen AAD im nativen Nerv geben. Knöferle et al. konnten hingegen im *Live-imaging*-Modell innerhalb der ersten 6 Stunde nach *Crush*-Läsion in der AAD keine eindeutigen Unterschiede der Autophagiemarker LC3 und p62 proximal zu distal darstellen (Knöferle et al. 2010). Im SCI-Modell zeigten die Axone zu beiden Seiten der Läsion in ähnlicher Weise über 24-30 Stunden typische morphologische Charakteristika der akuten axonalen Degeneration (Kerschensteiner et al. 2005; Ribas und Lingor 2015) und keinen signifikanten Unterschied in der Anzahl LC3-positiver *Puncta* (Ribas et al. 2015). Bei genauer Betrachtung der Daten zeigt sich jedoch ab 6 Stunden nach SCI distal ein nicht signifikant höherer LC3-Nachweis (Ribas et al. 2015).

In Mauskrankheitsmodellen konnten eine erhöhte Autophagieaktivität mit Akkumulation von Autophagosomen im distalen Axonende von Purkinje-Zellen zeigen werden (Wang et al. 2006). Studien der letzten Dekade an primären Neuronen sowie *in vivo* an *Caenorhabditis elegans* und *Drosophila* weisen zudem darauf hin, dass die Autophagosomenbiosynthese überwiegend als ein konstitutiver Prozess im distalen Axon stattfindet (Maday et al. 2012; Maday 2016; Stavoe et al. 2016; Neisch et al. 2017). Während des retrograden Transports entlang des Axons in Richtung Zellsoma reifen die Autophagosomen zu degradierenden Autophagolysosomen, die sich entsprechend im proximalen Axon und Soma als angesäuerte Kompartimente mit erhöhten Abbaueigenschaften detektieren lassen (Maday et al. 2012; Maday und Holzbaur 2014; Maday 2016). Axonale Autophagosomen rekrutieren das mikrotubuliassoziierte Motorprotein Dynein durch Fusion mit späten Endosomen (Cheng et al. 2015), sodass aggregierte Proteine und dysfunktionale Zellorganellen effizient im Zellsoma abgebaut werden können (Maday et al. 2012). Auch die *Scaffold*-Proteine JIP1 und Huntingtin induzieren den dyneingesteuerten axonalen Transport (Fu et al. 2014; Wong und Holzbaur 2014b). JIP1 bindet über ein konserviertes LIR-Motiv direkt an den Autophagosomenadapter LC3, was für den anfänglichen Austritt von Autophagosomen aus dem

distalen Axon, für einen anhaltenden retrograden Transport entlang des mittleren Axons und für die autophagosomale Reifung im proximalen Axon erforderlich ist (Fu et al. 2014).

Die hier beschriebene gerichtete Autophagosomenbiogenese entlang des Axons spiegelt den aktuellen Forschungsstand unter basalen Zellbedingungen wider, wo Autophagie eine essentielle Rolle für den Erhalt der Zellhomöostase spielt. In welchem Maße diese Prozesse in der akuten axonalen Degeneration fortlaufen, ist Gegenstand aktueller Forschungen. Eine traumatische axonale Läsion oder axonale Stressbelastungen könnten zu einer intraaxonalen und lokal erhöhten Autophagieaktivität führen. Eine ULK1-Induktion ist immunhistochemisch insbesondere in den axonalen *bulbs* zu beiden Seiten der *Crush*-Läsion nachweisbar (Ribas et al. 2015). Die ULK1-Expression ist in Läsionsnähe deutlich gesteigert, nimmt in größeren Entfernungen progressiv ab und erreichte nach 1000 μm das Kontrollniveau (Ribas et al. 2015). Zudem ist eine lokalisierte Mitophagie beschrieben, die durch fokal induzierte Depolarisation von Mitochondrien LC3-positive Autophagosomen und LAMP1-positive Lysosomen zur weiteren Degradation in Hippocampus-Neuronen rekrutiert (Ashrafi et al. 2014).

Die in dieser Studie distal der *Crush*-Läsion nachgewiesene höhere Autophagieaktivität ließe sich durch einen gestörten axonalen retrograden Autophagosomentransport im Bereich des *Optic nerve crush* erklären, was bei distal fortlaufendem autophagischem Fluss zu einer konsekutiven Ansammlung LC3-II-positiver Autophagosomen bei gesteigertem distalen Reifungsprozess führen könnte. Die neuronale Autophagosomenbiogenese sowie die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen während der akuten axonalen Degeneration sind zum aktuellen Zeitpunkt nur unzureichend verstanden und bedürfen weiterer Analysen.

4.9 Die Rolle von Autophagie in der akuten versus chronischen axonalen Degeneration im ZNS

Eine zunehmende Evidenz deutet daraufhin, dass eine gestörte Autophagie an einer Vielzahl chronisch-neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Parkinson (Dauer und Przedborski 2003), Morbus Alzheimer (Bordi et al. 2016), Chorea Huntington (Li et al. 2001), ALS (Xie Yuxiang et al. 2015) oder dem Tod von retinalen Ganglienzellen (Munemasa und Kitaoka 2015) beteiligt ist (Wang et al. 2018). Eine genetische Störung der Autophagie, beispielsweise in dopaminergen Neuronen des Mittelhirns, führt zur axonalen und dendritischen Degeneration, zur Bildung von ubiquitinierten Proteinaggregaten und zur präsynaptischen Akkumulation von α -Synuclein und LRRK2, wie sie beispielsweise als pathophysiologische Merkmale des Morbus Parkinson vorkommen (Ahmed et al. 2012; Friedman et al. 2012). Mutationen in Genen, die für Autophagie-Rezeptoren Optineurin, p62 und Ubiquilin-2 kodieren, verursachen ALS (Majcher et al. 2015; Maday 2016).

In Modellen mit chronisch-neurodegenerativen Erkrankungen hat sich gezeigt, dass die therapeutische Modulation der Autophagie vorteilhafte Effekte auf das Überleben von Neuron haben könnte. Eine Aktivierung der Autophagie durch den mTOR-Inhibitor Rapamycin (*mammalian target of rapamycin*, mTOR) vermindert beispielweise die Akkumulation von mutiertem Huntingtin und wirkt in einem Drosophila- und Mausmodell der Huntingtonkrankheit neuroprotektiv (Ravikumar et al. 2004). Darüber hinaus ist das Ausschalten von Atg7 in Mausvorderhirnneuronen ausreichend, um die Entwicklung spontaner epileptischer Anfälle zu fördern (McMahon et al. 2012). Ergebnisse neuester Studien zeigen, dass eine Hemmung der Autophagie die Lebensfähigkeit der Dorsalwurzelganglienzellen des Rückenmarks verringert und das Neuritenwachstum sowie die Komplexität der Verzweigung mindert (Clarke und Mearow 2016). Zudem kann eine unterdrückte Autophagie zur Akkumulation abnormaler Proteine wie A β -Peptide führen und eine proteinaggregationsinduzierte axonale Degeneration fördern (Yang et al. 2014; Wang et al. 2018).

Eine Persistenz von toxischen Proteinprodukten führt in postmitotischen Neuronen zur axonalen Degeneration und im weiteren Verlauf zum Zelltod (Wu et al. 2018). Eine gestörte Autophagie kann zu derartigen intraneuronalen Proteinansammlung führen, es gibt jedoch noch weitere Hinweise auf potentielle Mechanismen, durch die Autophagie die axonale Degeneration beeinflussen könnte. Mitochondrien sind an Prozessen wie dem programmierten Zelltod und der Regulation von Entzündungsprozessen beteiligt (Green et al. 2011). Eine dysfunktionale Autophagie verzögert die Clearance von geschädigten Mitochondrien.

Eine Beeinträchtigung der mitochondrialen Funktion und Dynamik ist jedoch mit axonaler Degeneration im Rahmen neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer oder der Parkinson-Erkrankung assoziiert (Wang et al. 2018).

In Zusammenschau der aktuellen Studienlage ist jedoch davon auszugehen, dass ein basales Autophagieniveau durch ständige Entfernung von ubiquitinierten und aggregierten Proteinen sowie dysfunktionaler Zellorganellen neuroprotektiv wirkt. Eine Hemmung der Autophagie auf basalem Zellniveau sowie in Prozessen der chronischen Neurodegeneration scheint mit negativen Effekten auf das Zellüberleben einherzugehen. Einige Autoren gehen davon aus, dass eine übermäßige Autophagieaktivierung in akuten Degenerationsprozessen möglicherweise eine erfolglose Rettungsreaktion auf den nahenden Tod neuronaler Zellen darstellt (Shen et al. 2012; Wang et al. 2018). Vorangegangene Studien (siehe Kapitel 4.2.3) sowie die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass eine kurzfristige Autophagiehemmung insbesondere protektiv auf die Prozesse der akuten axonalen Degeneration einwirkt. Eine Hemmung der Autophagie durch therapeutische ULK1-Inhibitoren, 3-MA, siRNA und *Knockout* von Genen der Autophagiekaskade führt nach akuten Nervenverletzungen zu einer verminderten akuten axonalen Degeneration (Chan et al. 2007; Yang et al. 2007; Knoferle et al. 2010; Vahsen et al. 2020). Neben traumatischen Läsionsmustern konnten Studien auch in der akuten hypoxisch-ischämischen Degeneration durch Autophagie-Inhibition einen Überlebensvorteil neuronaler Zellen *in vivo* nachweisen (Xie et al. 2016).

Insgesamt erscheint eine adäquate Autophagieaktivität in chronisch-neurodegenerativen Prozessen essentiell, wohingegen eine Inhibition der Autophagie im akuten Setting neurodegenerativer Prozesse mit einer positiven Wirkung auf das Gesamtüberleben von Neuronen einhergeht. In Anbetracht des raschen Fortschritts in der ULK1-Analyse scheint eine gezielte Beeinflussung von ULK1 sowie weiterer Proteine der Autophagiekaskade in naher Zukunft eine vielversprechende Strategie in der Behandlung axonaler Degenerationsprozesse in Neurotraumata und neurodegenerativen Erkrankungen. Weitere Studien sollten SBI-0206965 in Modellen der akuten traumatischen und chronischen axonalen Degeneration auf den vielversprechenden translationalen Ansatz untersuchen und Dosis-Wirkungs-Beziehungen sowie unerwünschte Arzneimittelwirkungen analysieren.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die axonale Degeneration ist ein grundlegender Prozess in der Pathophysiologie traumatischer und neurodegenerativer Nervenerkrankungen des ZNS. In der akuten axonalen Degeneration folgt innerhalb der ersten Stunden nach lokaler Axonläsion ein progredienter Integritäts- und Funktionsverlust. Ein frühes molekulares Charakteristikum der akuten axonalen Degeneration ist die Aktivierung von Autophagie, die sich durch eine hochregulierte Expression von Autophagieproteinen wie *Unc51-like-autophagy-activating-kinase* (ULK1) zeigt. Ziel der vorliegenden Studie war es, im translationalen Ansatz die Effekte einer therapeutischen ULK1-Inhibition durch den ULK-1-Inhibitor SBI-0206965 auf die akute axonale Degeneration *in vivo* zu untersuchen.

Morphologische Charakteristika der akuten axonalen Degeneration wurden nach intravitrealer Applikation von SBI-0206965 (5 μ M und 50 μ M) oder eine DMSO-Kontrolllösung mittels *In-vivo-live-imaging*-Mikroskopie über den Zeitraum von 5 Stunden nach axonaler *Crush*-Läsion in retinalen Ganglienzellaxonen der Ratte analysiert. Zur Beurteilung des Autophagieniveaus wurden immunhistochemische Färbungen der Autophagiemarker LC3 und p62 konfokalmikroskopisch untersucht.

Die intravitreale Injektion von 50 μ M SBI-0206965 führte zu einer signifikanten Reduktion der axonalen Fragmentierung vier und fünf Stunden nach *Crush*-Läsion. Die Konzentration von 5 μ M SBI-0206965 zeigte keine Verminderung des axonalen Integritätsverlustes. Axonale *Bulb*-Strukturen blieben in Größe und Anzahl innerhalb von fünf Stunden postläsional im Wesentlichen unbeeinflusst. Fünf Stunden nach *Crush*-Läsion verringerte 50 μ M SBI-0206965 die Anzahl intraaxonaler LC3-positiver *Puncta* und erhöhte nachweislich die Anzahl p62-positiver *Puncta*.

Zusammenfassend ist in der vorliegenden Arbeit erstmalig ein protektiver Effekt auf die akute axonale Degeneration durch eine SBI-0206965 vermittelte Autophagieinhibition gezeigt worden. Diese Ergebnisse bestätigen ULK1 als einen wichtigen Mediator in axonalen Degenerationsprozessen und zeigen einen vielversprechenden therapeutischen Ansatzpunkt in der akuten axonalen Degeneration *in vivo*.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- Adalbert R, Coleman MP (2013): Axon pathology in age-related neurodegenerative disorders. *Neuropathol Appl Neurobiol* 39, 90–108
- Agholme L, Agnello M, Agostinis P, Aguirre-ghiso JA, Ahn HJ, Ait-mohamed O, Brown EJ, Brumell JH, Brunetti-pierri N, Brunk UT, et al. (2012): Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy* 8, 445–544
- Ahmed I, Liang Y, Schools S, Dawson VL, Dawson TM, Savitt JM (2012): Development and Characterization of a New Parkinson's Disease Model Resulting from Impaired Autophagy. *J Neurosci* 32, 16503–16509
- Antonoli M, Di Rienzo M, Piacentini M, Fimia GM (2017): Emerging Mechanisms in Initiating and Terminating Autophagy. *Trends Biochem Sci* 42, 28–41
- Ashrafi G, Schlehe JS, LaVoie MJ, Schwarz TL (2014): Mitophagy of damaged mitochondria occurs locally in distal neuronal axons and requires PINK1 and Parkin. *J Cell Biol* 206, 655–670
- Axe EL, Walker SA, Manifava M, Chandra P, Roderick HL, Habermann A, Griffiths G, Ktistakis NT (2008): Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* 182, 685–701
- Baker M (2010): Taking a long, hard look. *Nature* 466, 1137–1138
- Balke D, Tatenhorst L, Dambeck V, Ribas VT, Vahsen BF, Michel U, Bähr M, Lingor P (2019): AAV-Mediated Expression of Dominant-Negative ULK1 Increases Neuronal Survival and Enhances Motor Performance in the MPTP Mouse Model of Parkinson's Disease. *Mol Neurobiol* 57, 685–697
- Ban B-K, Jun M-H, Ryu H-H, Jang D-J, Ahmad ST, Lee J-A (2013): Autophagy Negatively Regulates Early Axon Growth in Cortical Neurons. *Mol Cell Biol* 33, 3907–3919
- Bandyopadhyay U, Kaushik S, Varticovski L, Cuervo AM (2008): The Chaperone-Mediated Autophagy Receptor Organizes in Dynamic Protein Complexes at the Lysosomal Membrane. *Mol Cell Biol* 28, 5747–5763

- Baskaran S, Carlson L-A, Stjepanovic G, Young LN, Kim DJ, Grob P, Stanley RE, Nogales E, Hurley JH (2014): Architecture and dynamics of the autophagic phosphatidylinositol 3-kinase complex. *Elife* 3, 1–19
- Bingol B (2018): Autophagy and lysosomal pathways in nervous system disorders. *Mol Cell Neurosci* 91, 167–208
- Bisicchia E, Latini L, Cavallucci V, Sasso V, Nicolin V, Molinari M, D’Amelio M, Viscomi MT (2017): Autophagy Inhibition Favors Survival of Rubrospinal Neurons After Spinal Cord Hemisection. *Mol Neurobiol* 54, 4896–4907
- Bjørkøy G, Lamark T, Pankiv S, Øvervatn A, Brech A, Johansen T (2009): Monitoring Autophagic Degradation of p62/SQSTM1. *Methods Enzymol* 451, 181–197
- Bordi M, Berg MJ, Mohan PS, Peterhoff CM, Alldred MJ, Che S, Ginsberg SD, Nixon RA (2016): Autophagy flux in CA1 neurons of Alzheimer hippocampus: Increased induction overburdens failing lysosomes to propel neuritic dystrophy. *Autophagy* 12, 2467–2483
- Breen KT, Anderson SR, Steele MR, Calkins DJ, Bosco A, Vetter ML (2016): Loss of fractalkine signaling exacerbates axon transport dysfunction in a chronic model of glaucoma. *Front Neurosci* 10, 526
- Burke RE, O’Malley K (2013): Axon degeneration in Parkinson’s disease. *Exp Neurol* 246, 72–83
- Burman C, Ktistakis NT (2010): Autophagosome formation in mammalian cells. *Semin Immunopathol* 32, 397–413
- Calkins DJ, Horne PJ (2012): The cell and molecular biology of glaucoma: Axonopathy and the brain. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 53, 2482–2484
- Castillo K, Nassif M, Valenzuela V, Rojas F, Matus S, Mercado G, Court FA, Van Zundert B, Hetz C (2013): Trehalose delays the progression of amyotrophic lateral sclerosis by enhancing autophagy in motoneurons. *Autophagy* 9, 1308–1320
- Chan EYW, Kir S, Tooze SA (2007): siRNA screening of the kinome identifies ULK1 as a multidomain modulator of autophagy. *J Biol Chem* 282, 25464–25474

- Chan EYW, Longatti A, McKnight NC, Tooze SA (2008): Kinase-Inactivated ULK Proteins Inhibit Autophagy via Their Conserved C-Terminal Domains Using an Atg13-Independent Mechanism. *Mol Cell Biol* 29, 157–171
- Chan EYW, Longatti A, McKnight NC, Tooze SA (2009): Kinase-inactivated ULK proteins inhibit autophagy via their conserved C-terminal domains using an Atg13-independent mechanism. *Mol Cell Biol* 29, 157–71
- Cheng H-C, Kim SR, Oo TF, Kareva T, Yarygina O, Rzhetskaya M, Wang C, During M, Tallochy Z, Tanaka K, et al. (2011): Akt Suppresses Retrograde Degeneration of Dopaminergic Axons by Inhibition of Macroautophagy. *J Neurosci* 31, 2125–2135
- Cheng XT, Zhou B, Lin MY, Cai Q, Sheng ZH (2015): Axonal autophagosomes recruit dynein for retrograde transport through fusion with late endosomes. *J Cell Biol* 209, 377–386
- Ciechanover A, Kwon YT a. (2015): Degradation of misfolded proteins in neurodegenerative diseases: therapeutic targets and strategies. *Exp Mol Med* 47, e147
- Clarke JP, Mearow K (2016): Autophagy inhibition in endogenous and nutrient-deprived conditions reduces dorsal root ganglia neuron survival and neurite growth in vitro. *J Neurosci Res* 94, 653–670
- Coleman M (2005): Axon degeneration mechanisms: Commonality amid diversity. *Nat Rev Neurosci* 6, 889–898
- Conforti L, Gilley J, Coleman MP (2014): Wallerian degeneration: An emerging axon death pathway linking injury and disease. *Nat Rev Neurosci* 15, 394–409
- Costello F, Coupland S, Hodge W, Lorello GR, Koroluk J, Pan YI, Freedman MS, Zackon DH, Kardon RH (2006): Quantifying axonal loss after optic neuritis with optical coherence tomography. *Ann Neurol* 59, 963–969
- Cuervo AM (2010): Chaperone-mediated autophagy: Selectivity pays off. *Trends Endocrinol Metab* 21, 142–150
- Dauer W, Przedborski S (2003): Models and mechanisms - Dauer 2003. *Neuron* 39, 889–909

- DeBosch BJ, Heitmeier MR, Mayer AL, Higgins CB, Crowley JR, Kraft TE, Chi M, Newberry EP, Chen Z, Finck BN, et al. (2016): Trehalose inhibits solute carrier 2A (SLC2A) proteins to induce autophagy and prevent hepatic steatosis. *Sci Signal* 9, ra21
- Deng S, Wang M, Yan Z, Tian Z, Chen H, Yang X, Zhuo Y (2013): Autophagy in Retinal Ganglion Cells in a Rhesus Monkey Chronic Hypertensive Glaucoma Model. *PLoS One* 8, 1–12
- Dite TA, Langendorf CG, Hoque A, Galic S, Rebello RJ, Ovens AJ, Lindqvist LM, Ngoei KRW, Ling NXY, Furic L, et al. (2018): AMP-activated protein kinase selectively inhibited by the type II inhibitor SBI-0206965. *J Biol Chem* 293, 8874–8885
- Driver JA, Logroscino G, Gaziano JM, Kurth T (2009): Incidence and remaining lifetime risk of Parkinson disease in advanced age. *Neurology* 72, 432–438
- Dureau P, Legat L, Neuner-Jehle M, Bonnel S, Pecqueur S, Abitbol M, Dufier J-L (2000): Quantitative analysis of subretinal injections in the rat. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 238, 608–614
- Egan DF, Chun MGH, Vamos M, Zou H, Rong J, Miller CJ, Lou HJ, Raveendra-Panickar D, Yang CC, Sheffler DJ, et al. (2015): Small Molecule Inhibition of the Autophagy Kinase ULK1 and Identification of ULK1 Substrates. *Mol Cell* 59, 285–297
- Eisenberg T, Knauer H, Schauer A, Büttner S, Ruckenstuhl C, Carmona-Gutierrez D, Ring J, Schroeder S, Magnes C, Antonacci L, et al. (2009): Induction of autophagy by spermidine promotes longevity. *Nat Cell Biol* 11, 1305–1314
- Erllich S, Alexandrovich A, Shohami E, Pinkas-Kramarski R (2007): Rapamycin is a neuroprotective treatment for traumatic brain injury. *Neurobiol Dis* 26, 86–93
- Ferree AW, Trudeau K, Zik E, Benador IY, Twig G, Gottlieb RA, Shirihai OS (2013): MitoTimer probe reveals the impact of autophagy, fusion, and motility on subcellular distribution of young and old mitochondrial protein and on relative mitochondrial protein age. *Autophagy* 9, 1887–1896
- Fimia GM, Stoykova A, Romagnoli A, Giunta L, Di Bartolomeo S, Nardacci R, Corazzari M, Fuoco C, Ucar A, Schwartz P, Gruss P, Piacentini M, Chowdhury K, Cecconi F. (2007): Ambra1 regulates autophagy and development of the nervous system. *Nature* 447, 1121–1125

- Fischer LR, Glass JD (2007): Axonal degeneration in motor neuron disease. *Neurodegener Dis* 4, 431–442
- Fischer LR, Culver DG, Tennant P, Davis AA, Wang M, Castellano-Sanchez A, Khan J, Polak MA, Glass JD (2004): Amyotrophic lateral sclerosis is a distal axonopathy: Evidence in mice and man. *Exp Neurol* 185, 232–240
- Friedman LG, Lachenmayer ML, Wang J, He L, Poulouse SM, Komatsu M, Holstein GR, Yue Z (2012): Disrupted Autophagy Leads to Dopaminergic Axon and Dendrite Degeneration and Promotes Presynaptic Accumulation of α -Synuclein and LRRK2 in the Brain. *J Neurosci* 32, 7585–7593
- Fu M meng, Nirschl JJ, Holzbaaur ELF (2014): LC3 Binding to the scaffolding protein jip1 regulates processive dynein-driven transport of autophagosomes. *Dev Cell* 29, 577–590
- Galluzzi L, Baehrecke EH, Ballabio A, et al. (2017): Molecular definitions of autophagy and related processes. *EMBO J* 36, 1811–1836
- George E, Glass J, Griffin J (2018): Axotomy-induced axonal degeneration is mediated by calcium influx through ion-specific channels. *J Neurosci* 15, 6445–6452
- Ghaffarich A, Levin LA (2012): Optic Nerve Disease and Axon Pathophysiology. *Int Rev Neurobiol* 105, 1-17
- Green DR, Galluzzi L, Kroemer G (2011): Mitochondria and the autophagy-inflammation-cell death axis in organismal aging. *Science* 333, 1109–1112
- Hagg T, Oudega M (2006): Neural Degeneration and Regeneration Myelin and Scar-Derived Inhibition. *J Neurotrauma* 23, 264–280
- Hara T, Nakamura K, Matsui M, Yamamoto A, Nakahara Y, Suzuki-Migishima R, Yokoyama M, Mishima K, Saito I, Okano H, Mizushima N (2006): Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature* 441, 885–889
- Hara T, Takamura A, Kishi C, Iemura SI, Natsume T, Guan JL, Mizushima N (2008): FIP200, a ULK-interacting protein, is required for autophagosome formation in mammalian cells. *J Cell Biol* 181, 497–510

- Hernandez D, Torres CA, Setlik W, Cebrián C, Mosharov E V., Tang G, Cheng HC, Kholodilov N, Yarygina O, Burke RE, et al. (2012): Regulation of Presynaptic Neurotransmission by Macroautophagy. *Neuron* 74, 277–284
- Jaeger PA, Coray TW (2009): All-you-can-eat: Autophagy in neurodegeneration and neuroprotection. *Mol Neurodegener* 4, 16
- Jawhar S, Trawicka A, Jenneckens C, Bayer TA, Wirths O (2012): Motor deficits, neuron loss, and reduced anxiety coinciding with axonal degeneration and intraneuronal A β aggregation in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 33, 196.e29-196.e40
- Jiang X, Overholtzer M, Thompson CB, Jiang X, Overholtzer M, Thompson CB (2015): Autophagy in cellular metabolism and cancer Find the latest version: Autophagy in cellular metabolism and cancer. 125, 47–54
- Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T, Kominami E, Ohsumi Y, Yoshimori T (2000): *EMBO J* 19, 5720–5728
- Kanno H, Ozawa H, Sekiguchi A, Yamaya S, Itoi E (2011): Induction of autophagy and autophagic cell death in damaged neural tissue after acute spinal cord injury in mice. *Spine* 36, 1427–1434
- Karanasios E, Stapleton E, Manifava M, Kaizuka T, Mizushima N, Walker SA, Ktistakis NT (2013): Dynamic association of the ULK1 complex with omegasomes during autophagy induction. *J Cell Sci* 126, 5224–5238
- Kaushik S, Cuervo AM (2008): Chaperone-mediated autophagy. *Methods Mol Biol* 445, 227–244
- Kerschensteiner M, Schwab ME, Lichtman JW, Misgeld T (2005): In vivo imaging of axonal degeneration and regeneration in the injured spinal cord. *Nat Med* 11, 572–577
- Kilinc D, Gallo G, Barbee KA (2009): Mechanical membrane injury induces axonal beading through localized activation of calpain. *Exp Neurol* 219, 553–561
- Kim H-Y, Gladyshev VN (2004): Methionine Sulfoxide Reduction in Mammals: Characterization of Methionine-R-Sulfoxide Reductases. *Mol Biol Cell* 15, 3751–3737

- Kim J, Kundu M, Viollet B, Guan K-L (2011): AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol* 13, 132–41
- Kim SH, Munemasa Y, Kwong JMK, Ahn JH, Mareninov S, Gordon LK, Caprioli J, Piri N (2008): Activation of autophagy in retinal ganglion cells. *J Neurosci Res* 86, 2943–2951
- Kim YC, Guan KL (2015): MTOR: A pharmacologic target for autophagy regulation. *J Clin Invest* 125, 25–32
- Kimura T, Arimura N, Fukata Y, Watanabe H, Iwamatsu A, Kaibuchi K (2005): Tubulin and CRMP-2 complex is transported via Kinesin-1. *J Neurochem* 93, 1371–1382
- Klionsky DJ (2008): Autophagy revisited: a conversation with Christian de Duve. *Autophagy* 4, 740–743
- Knoferle J, Koch JC, Ostendorf T, Michel U, Planchamp V, Vutova P, Tonges L, Stadelmann C, Bruck W, Bahr M, Lingor P (2010): Mechanisms of acute axonal degeneration in the optic nerve in vivo. *Proc Natl Acad Sci* 107, 6064–6069
- Koch JC, Lingor P (2016): The role of autophagy in axonal degeneration of the optic nerve. *Exp Eye Res* 144, 81–89
- Koch JC, Knöferle J, Tönges L, Ostendorf T, Bähr M, Lingor P (2010): Acute axonal degeneration in vivo is attenuated by inhibition of autophagy in a calcium-dependent manner. *Autophagy* 6, 658–659
- Koch JC, Knöferle J, Tönges L, Michel U, Bähr M, Lingor P (2011): Imaging of rat optic nerve axons in vivo. *Nat Protoc* 6, 1887–1896
- Koch JC, Tönges L, Michel U, Bähr M, Lingor P. (2014): Viral vector-mediated downregulation of RhoA increases survival and axonal regeneration of retinal ganglion cells. *Front Cell Neurosci* 8, 1–10
- Koike M, Shibata M, Tadakoshi M, Gotoh K, Komatsu M, Waguri S, Kawahara N, Kuida K, Nagata S, Kominami E, et al. (2008): Inhibition of autophagy prevents hippocampal pyramidal neuron death after hypoxic-ischemic injury. *Am J Pathol* 172, 454–469

- Komatsu M, Waguri S, Chiba T, Murata S, Iwata JI, Tanida I, Ueno T, Koike M, Uchiyama Y, Kominami E, Tanaka K (2006): Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature* 441, 880–884
- Komatsu M, Wang QJ, Holstein GR, Friedrich VL, Iwata J -i., Kominami E, Chait BT, Tanaka K, Yue Z (2007): Essential role for autophagy protein Atg7 in the maintenance of axonal homeostasis and the prevention of axonal degeneration. *Proc Natl Acad Sci* 104, 14489–14494
- Koyama-Honda I, Itakura E, Fujiwara TK, Mizushima N (2013): Temporal analysis of recruitment of mammalian ATG proteins to the autophagosome formation site. *Autophagy* 9, 1491–1499
- Ktistakis NT, Tooze SA (2016): Digesting the Expanding Mechanisms of Autophagy. *Trends Cell Biol* 26, 624–635
- Lai Y, Hickey RW, Chen Y, Bayir H, Sullivan ML, Chu CT, Kochanek PM, Dixon CE, Jenkins LW, Graham SH, et al. (2008): Autophagy is increased after traumatic brain injury in mice and is partially inhibited by the antioxidant γ -glutamylcysteinyl ethyl ester. *J Cereb Blood Flow Metab* 28, 540–550
- Lamb CA, Yoshimori T, Tooze SA (2013): The autophagosome: origins unknown, biogenesis complex. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14, 759
- Lazarus MB, Shokat KM (2015): Discovery and structure of a new inhibitor scaffold of the autophagy initiating kinase ULK1. *Bioorganic Med Chem* 23, 5483–5488
- Lazarus MB, Novotny CJ, Shokat KM (2015): Structure of the human autophagy initiating kinase ULK1 in complex with potent inhibitors. *ACS Chem Biol* 10, 257–261
- Lehmann HC, Chen W, Borzan J, Mankowski JL, Höke A (2011): Mitochondrial dysfunction in distal axons contributes to human immunodeficiency virus sensory neuropathy. *Ann Neurol* 69, 100–110
- Li H, Li SH, Yu ZX, Shelbourne P, Li XJ (2001): Huntingtin aggregate-associated axonal degeneration is an early pathological event in Huntington's disease mice. *J Neurosci* 21, 8473–81

- Li HY, Ruan YW, Ren CR, Cui Q, So KF (2014): Mechanisms of secondary degeneration after partial optic nerve transection. *Neural Regen Res* 9, 565–574
- Li J, Kim SG, Blenis J (2014): Rapamycin: One drug, many effects. *Cell Metab* 19, 373–379
- Lin MG, Hurley JH (2016): Structure and function of the ULK1 complex in autophagy. *Curr Opin Cell Biol* 39, 61–68
- Lingor P, Teusch N, Schwarz K, Mueller R, Mack H, Bähr M, Mueller BK (2007): Inhibition of Rho kinase (ROCK) increases neurite outgrowth on chondroitin sulphate proteoglycan in vitro and axonal regeneration in the adult optic nerve in vivo. *J Neurochem* 103, 181–189
- Lingor P, Koch JC, Tönges L, Bähr M (2012): Axonal degeneration as a therapeutic target in the CNS. *Cell Tissue Res* 349, 289–311
- Liu CL, Chen S, Dietrich D, Hu BR (2008): Changes in autophagy after traumatic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 28, 674–683
- Liu X, Huang S, Wang X, Tang B, Li W, Mao Z (2015): Chaperone-mediated autophagy and neurodegeneration: connections, mechanisms, and therapeutic implications. *Neurosci Bull* 31, 407–415
- Luo L, O’Leary DDM (2005): Axon Retraction and Degeneration in Development and Disease. *Annu Rev Neurosci* 28, 127–156
- Maday S (2016): Mechanisms of neuronal homeostasis: Autophagy in the axon. *Brain Res* 1649, 143–150
- Maday S, Holzbaur ELF (2014): Autophagosome biogenesis in primary neurons follows an ordered and spatially regulated pathway. *Dev Cell* 30, 71–85
- Maday S, Wallace KE, Holzbaur ELF (2012): Autophagosomes initiate distally and mature during transport toward the cell soma in primary neurons. *J Cell Biol* 196, 407–417
- Majcher V, Goode A, James V, Layfield R (2015): Autophagy receptor defects and ALS-FTLD. *Mol Cell Neurosci* 66, 43–52
- Malik JMI, Shevtsova Z, Bähr M, Kügler S (2005): Long-term in vivo inhibition of CNS neurodegeneration by Bcl-XL gene transfer. *Mol Ther* 11, 373–381

- Martin KR, Celano SL, Solitro AR, Gunaydin H, Scott M, O'Hagan RC, Shumway SD, Fuller P, MacKeigan JP (2018): A Potent and Selective ULK1 Inhibitor Suppresses Autophagy and Sensitizes Cancer Cells to Nutrient Stress. *iScience* 8, 74–84
- Matsunaga K, Morita E, Saitoh T, Akira S, Ktistakis NT, Izumi T, Noda T, Yoshimori T (2010): Autophagy requires endoplasmic reticulum targeting of the PI3-kinase complex via Atg14L. *J Cell Biol* 190, 511–521
- Matsushita M, Yamamoto R, Mitsui K, Kanazawa H (2009): Altered motor activity of alternative splice variants of the mammalian kinesin-3 protein KIF1B. *Traffic* 10, 1647–1654
- McMahon J, Huang X, Yang J, Komatsu M, Yue Z, Qian J, Zhu X, Huang Y (2012): Impaired Autophagy in Neurons after Disinhibition of Mammalian Target of Rapamycin and Its Contribution to Epileptogenesis. *J Neurosci* 32, 15704–15714
- Menzies FM, Garcia-Arencibia M, Imarisio S, O'Sullivan NC, Ricketts T, Kent BA, Rao M V., Lam W, Green-Thompson ZW, Nixon RA, et al. (2015): Calpain inhibition mediates autophagy-dependent protection against polyglutamine toxicity. *Cell Death Differ* 22, 433–444
- Menzies FM, Fleming A, Caricasole A, Bento CF, Andrews SP, Ashkenazi A, Füllgrabe J, Jackson A, Jimenez Sanchez M, Karabiyik C, et al. (2017): Autophagy and Neurodegeneration: Pathogenic Mechanisms and Therapeutic Opportunities. *Neuron* 93, 1015–1034
- Mizushima N, Komatsu M (2011): Autophagy: Renovation of cells and tissues. *Cell* 147, 728–741
- Mizushima N, Yoshimori T, Ohsumi Y (2011): The Role of Atg Proteins in Autophagosome Formation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 27, 107–132
- Munemasa Y, Kitaoka Y (2015): Autophagy in axonal degeneration in glaucomatous optic neuropathy. *Prog Retin Eye Res* 47, 1–18
- Nangaku M, Sato-Yoshitake R, Okada Y, Noda Y, Takemura R, Yamazaki H, Hirokawa N (1994): KIF1B, a novel microtubule plus end-directed monomeric motor protein for transport of mitochondria. *Cell* 79, 1209–1220

- Neisch AL, Neufeld TP, Hays TS (2017): A STRIPAK complex mediates axonal transport of autophagosomes and dense core vesicles through PP2A regulation. *J Cell Biol* 216, 441–461
- Nikić I, Merkler D, Sorbara C, Brinkoetter M, Kreutzfeldt M, Bareyre FM, Brück W, Bishop D, Misgeld T, Kerschensteiner M (2011): A reversible form of axon damage in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Nat Med* 17, 495–499
- Ohsumi Y, Mizushima N (2004): Two ubiquitin-like conjugation systems essential for autophagy. *Semin Cell Dev Biol* 15, 231–236
- Orimo S, Uchihara T, Nakamura A, Mori F, Kakita A, Wakabayashi K, Takahashi H (2008): Axonal α -synuclein aggregates herald centripetal degeneration of cardiac sympathetic nerve in Parkinson's disease. *Brain* 131, 642–650
- Orsi A, Razi M, Dooley HC, Robinson D, Weston AE, Collinson LM, Tooze SA (2012): Dynamic and transient interactions of Atg9 with autophagosomes, but not membrane integration, are required for autophagy. *Mol Biol Cell* 23, 1860–1873
- Öztürk G, Cengiz N, Erdoğan E, Him A, Oğuz EK, Yenidünya E, Aysit N (2013): Two distinct types of dying back axonal degeneration in vitro. *Neuropathol Appl Neurobiol* 39, 362–376
- Pankiv S, Clausen TH, Lamark T, Brech A, Bruun JA, Outzen H, Øvervatn A, Bjørkøy G, Johansen T (2007): p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J Biol Chem* 282, 24131–24145
- Petherick KJ, Conway OJL, Mpamhanga C, Osborne SA, Kamal A, Saxty B, Ganley IG (2015): Pharmacological inhibition of ULK1 kinase blocks mammalian target of rapamycin (mTOR)-dependent autophagy. *J Biol Chem* 290, 11376–11383
- Proikas-Cezanne T, Takacs Z, Donnes P, Kohlbacher O (2015): WIPI proteins: essential PtdIns3P effectors at the nascent autophagosome. *J Cell Sci* 128, 207–217
- Rabacchi SA, Bonfanti L, Liu XH, Maffei L (1994): Apoptotic cell death induced by optic nerve lesion in the neonatal rat. *J Neurosci* 14, 5292–301

- Ravikumar B, Vacher C, Berger Z, Davies JE, Luo S, Oroz LG, Scaravilli F, Easton DF, Duden R, O’Kane CJ, Rubinsztein DC (2004): Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease. *Nat Genet* 36, 585–95
- Redmann M, Darley-Usmar V, Zhang J (2016): The Role of Autophagy, Mitophagy and Lysosomal Functions in Modulating Bioenergetics and Survival in the Context of Redox and Proteotoxic Damage: Implications for Neurodegenerative Diseases. *Aging Dis* 7, 150
- Ribas VT, Lingor P (2015): Autophagy in degenerating axons following spinal cord injury: Evidence for autophagosome biogenesis in retraction bulbs. *Neural Regen Res* 10, 198–200
- Ribas VT, Schnepf B, Challagundla M, Koch JC, Bähr M, Lingor P (2015): Early and sustained activation of autophagy in degenerating axons after spinal cord injury. *Brain Pathol* 25, 157–170
- Ribas VT, Koch JC, Michel U, Bähr M, Lingor P (2016): Attenuation of Axonal Degeneration by Calcium Channel Inhibitors Improves Retinal Ganglion Cell Survival and Regeneration After Optic Nerve Crush. *Mol Neurobiol* 54, 72–86
- Sahu R, Kaushik S, Clement CC, Cannizzo ES, Scharf B, Follenzi A, Potolicchio I, Nieves E, Cuervo AM, Santambrogio L (2011): Microautophagy of Cytosolic Proteins by Late Endosomes. *Dev Cell* 20, 131–139
- Sarkar S, Davies JE, Huang Z, Tunnacliffe A, Rubinsztein DC (2007): Trehalose, a novel mTOR-independent autophagy enhancer, accelerates the clearance of mutant huntingtin and α -synuclein. *J Biol Chem* 282, 5641–5652
- Sarkar S, Krishna G, Imarisio S, Saiki S, O’Kane CJ, Rubinsztein DC (2008): A rational mechanism for combination treatment of Huntington’s disease using lithium and rapamycin. *Hum Mol Genet* 17, 170–178
- Schaeffer V, Goedert M (2012): Stimulation of autophagy is neuroprotective in a mouse model of human tauopathy. *Autophagy* 8, 1686–1687

- Settembre C, Zoncu R, Medina DL, Vetrini F, Erdin Serkan, Erdin Serpiluckac, Huynh T, Ferron M, Karsenty G, Vellard MC, et al. (2012): A lysosome-to-nucleus signalling mechanism senses and regulates the lysosome via mTOR and TFEB. *EMBO J* 31, 1095–1108
- Shen DN, Zhang LH, Wei EQ, Yang Y (2015): Autophagy in synaptic development, function, and pathology. *Neurosci Bull* 31, 416–426
- Shen S, Kepp O, Kroemer G (2012): The end of autophagic cell death? *Autophagy* 8, 1–3
- Son SM, Shin HJ, Byun J, Kook SY, Moon M, Chang YJ, Mook-Jung I (2016): Metformin facilitates amyloid- β generation by β - And γ -secretases via autophagy activation. *J Alzheimer's Dis* 51, 1197–1208
- Song L, Hennink EJ, Young IT, Tanke HJ (1995): Photobleaching kinetics of fluorescein in quantitative fluorescence microscopy. *Biophys J* 68, 2588–2600
- Stavoe AKH, Hill SE, Hall DH, Colón-Ramos DA (2016): KIF1A/UNC-104 Transports ATG-9 to Regulate Neurodevelopment and Autophagy at Synapses. *Dev Cell* 38, 171–185
- Tanji K, Miki Y, Maruyama A, Mimura J, Matsumiya T, Mori F, Imaizumi T, Itoh K, Wakabayashi K (2015): Trehalose intake induces chaperone molecules along with autophagy in a mouse model of Lewy body disease. *Biochem Biophys Res Commun* 465, 746–752
- Toda H, Mochizuki H, Flores R, Josowitz R, Krasieva TB, LaMorte VJ, Suzuki E, Gindhart JG, Furukubo-Tokunaga K, Tomoda T (2008): UNC-51/ATG1 kinase regulates axonal transport by mediating motor-cargo assembly. *Genes Dev* 22, 3292–3307
- Vahsen BF, Ribas VT, Sundermeyer J, Boecker A, Dambeck V, Lenz C, Shomroni O, Caldi Gomes L, Tatenhorst L, Barski E, et al. (2020): Inhibition of the autophagic protein ULK1 attenuates axonal degeneration in vitro and in vivo, enhances translation, and modulates splicing. *Cell Death Differ* 27, 2810–2827
- Waller A (1851): Experiments on the Section of the Glosso-Pharyngeal and Hypoglossal Nerves of the Frog, and Observations of the Alterations Produced Thereby in the Structure of Their Primitive Fibres. *Edinburgh Med Surg J* 76, 369–376

- Wang B, Dong G, Zhang Q, Yan F, Li Z, Li C, Zhang H, Ma Q, Dai J, Si C, Xiong H (2019): The inhibitor of autophagy SBI-0206965 aggravates atherosclerosis through decreasing myeloid-derived suppressor cells. *Exp Ther Med* 13, 1370–1378
- Wang C-W, Klionsky DJ (2003): The Molecular Mechanism of Autophagy. *Mol Med* 2, 65–76
- Wang JT, Medress ZA, Barres BA (2012): Axon degeneration: Molecular mechanisms of a self-destruction pathway. *J Cell Biol* 196, 7–18
- Wang QJ, Ding Y, Kohtz S, Mizushima N, Cristea IM, Rout MP, Chait BT, Zhong Y, Heintz N, Yue Z (2006): Induction of autophagy in axonal dystrophy and degeneration. *J Neurosci* 26, 8057–8068
- Wang T, Martin S, Papadopulos A, Harper CB, Mavlyutov TA, Niranjana D, Glass NR, Cooper-White JJ, Sibarita J-B, Choquet D, et al. (2015): Control of Autophagosome Axonal Retrograde Flux by Presynaptic Activity Unveiled Using Botulinum Neurotoxin Type A. *J Neurosci* 35, 6179–6194
- Wang Y, Song M, Song F (2018): Neuronal autophagy and axon degeneration. *Cell Mol Life Sci* 75, 2389–2406
- Wei HL, Ma SQ, Li CX (2018): Deficiency of unc-51 like kinase 1 (Ulk1) protects against mice traumatic brain injury (TBI) by suppression of p38 and JNK pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 503, 467–473
- Williams A, Jahreiss L, Sarkar S, Saiki S, Menzies FM, Ravikumar B, Rubinsztein DC (2006): Aggregate-Prone Proteins Are Cleared from the Cytosol by Autophagy: Therapeutic Implications. *Curr Top Dev Biol* 76, 89–101
- Wolf MS, Bayır H, Kochanek PM, Clark RSB (2019): The role of autophagy in acute brain injury: A state of flux? *Neurobiol Dis* 122, 9–15
- Wong PM, Puente C, Ganley IG, Jiang X (2013): The ULK1 complex sensing nutrient signals for autophagy activation. *Autophagy* 2, 124–137
- Wong YC, Holzbaur ELF (2014a): Optineurin is an autophagy receptor for damaged mitochondria in parkin-mediated mitophagy that is disrupted by an ALS-linked mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, E4439–E4448

- Wong YC, Holzbaur ELF (2014b): The regulation of autophagosome dynamics by huntingtin and HAP1 is disrupted by expression of mutant huntingtin, leading to defective cargo degradation. *J Neurosci* 34, 1293–1305
- Wu MY, Song JX, Wang SF, Cai CZ, Li M, Lu JH (2018): Selective autophagy: The new player in the fight against neurodegenerative diseases? *Brain Res Bull* 137, 79–90
- Xie C, Ginet V, Sun Y, Koike M, Zhou K, Li T, Li H, Li Q, Wang X, Uchiyama Y, et al. (2016): Neuroprotection by selective neuronal deletion of Atg7 in neonatal brain injury. *Autophagy* 12, 410–423
- Xie Yangchun, Kang R, Sun X, Zhong M, Huang J, Klionsky DJ, Tang D (2015): Posttranslational modification of autophagy-related proteins in macroautophagy. *Autophagy* 11, 28–45
- Xie Yuxiang, Zhou B, Lin MY, Sheng ZH (2015): Progressive endolysosomal deficits impair autophagic clearance beginning at early asymptomatic stages in FALS mice. *Autophagy* 11, 1934–1936
- Yang R, Gao G, Mao Z, Yang Q (2016): Chaperone-Mediated Autophagy and Mitochondrial Homeostasis in Parkinson's Disease. *Parkinsons Dis* 2016, 1–7
- Yang Y, Fukui K, Koike T, Zheng X (2007): Induction of autophagy in neurite degeneration of mouse superior cervical ganglion neurons. *Eur J Neurosci* 26, 2979–2988
- Yang Y, Chen S, Zhang J, Li C, Sun Y, Zhang L, Zheng X (2014): Stimulation of autophagy prevents amyloid- β peptide-induced neuritic degeneration in PC12 cells. *J Alzheimer's Dis* 40, 929–939
- Yu-shin Sou, Satoshi Waguri, Jun-ichi Iwata, Takashi Ueno, Tsutomu Fujimura TH, Sawada N, Yamada A, Noboru Mizushima, Uchiyama Y, Eiki Kominami KT, Komatsu M (2008): The Atg8 Conjugation System Is Indispensable for Proper Development of Autophagic Isolation Membranes in Mice. *Mol Biol Cell* 19, 1981–1991
- Zhang JN, Michel U, Lenz C, Friedel CC, Köster S, D'Hedouville Z, Tönges L, Urlaub H, Bähr M, Lingor P, Koch JC (2016): Calpain-mediated cleavage of collapsin response mediator protein-2 drives acute axonal degeneration. *Sci Rep* 6, 1–15

- Zhang L, Fu L, Zhang S, Zhang J, Zhao Y, Zheng Y, He G, Yang S, Ouyang L, Liu B (2017): Discovery of a small molecule targeting ULK1-modulated cell death of triple negative breast cancer in vitro and in vivo. *Chem Sci* 8, 2687–2701
- Zhang L, Ouyang L, Guo Y, Zhang J, Liu B (2018): UNC-51-like Kinase 1: From an Autophagic Initiator to Multifunctional Drug Target. *J Med Chem* 61, 6491–6500
- Zhao C, Takita J, Tanaka Y, Setou M, Nakagawa T, Takeda S, Yang HW, Terada S, Nakata T, Takei Y, et al. (2001): Charcot-Marie-Tooth disease type 2A caused by mutation in a microtubule motor KIF1B β . *Cell* 105, 587–597

Danksagung

An erster Stelle möchte ich Herrn **PD Dr. med. J. C. Koch** sowie **Prof. Dr. med. P. Lingor** (2018 an die Technische Universität München gewechselt) für die Möglichkeit danken, dass ich meine Doktorarbeit unter ihrer Leitung durchführen durfte. Über die vielen Anregungen, konstruktiven Diskussionen und die immer freundliche Unterstützung meiner gesamten Arbeit sowie über die wertvollen Erfahrungen im Bereich der experimentellen Forschung bin ich sehr dankbar. Zudem möchte ich mich bei **Prof. Dr. med. C. Stadelmann-Nessler** als Ko-Betreuerin für die hilfreichen Gespräche bedanken.

Mein besonderer Dank gilt **Dr. med. C. A. Böcker**. Die intensive Betreuung, die immer freundlichen und konstruktiven Kritiken, Diskussionen und die Hilfsbereitschaft im gesamten Arbeitsprozess trugen sehr zur Fertigstellung dieser Doktorarbeit bei.

Frau **S. Ceramella** und Frau **E. Barski** als Technische Assistentinnen danke ich für die freundliche Einarbeitung und Hilfestellung in der Methodik der Immunhistochemie.

Zudem möchte ich der **Facility für Innovative Lichtmikroskopie** des **Max-Planck-Instituts Göttingen** für die Unterstützung und Bereitstellung der Technik in der Konfokalmikroskopie danken.