

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

betreut an der
Dr. Senckenbergischen Anatomie
Institut für Anatomie II
Experimentelle Neurobiologie
Kommissarischer Direktor: Prof. Dr. Thomas Deller

Rab6A Immunmarkierung im Gehirn von Maus und Mensch:
Etablierung eines astrozytenspezifischen Markers

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

vorgelegt von
Linda Melzer (geb. Spieß)

aus Moers

Frankfurt am Main, 2020

Dekan: Prof. Dr. Stefan Zeuzem
Referent: Prof. Dr. Amin Derouiche
Korreferent: Prof. Dr. David Slattery
Tag der mündlichen Prüfung: 02.11.2020

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	7
Tabellenverzeichnis	9
Diagrammverzeichnis	10
Abkürzungsverzeichnis	11
1 Einleitung	15
1.1 Astrozyten	15
1.1.1 Definition, Entwicklung und Morphologie	15
1.1.2 Aufgaben und Funktionen.....	20
1.1.3 Astrozytäre Heterogenität und ihre funktionelle Bedeutung.....	24
1.1.4 Verwendete astrozytäre Marker.....	27
1.1.5 Astrozyten-assoziierte Pathologien.....	28
1.2 Rab6A	29
1.2.1 Definition und Morphologie	29
1.2.2 Funktionen im intrazellularen Membrantransport.....	30
1.3 Fragestellung	32
2 Material und Methoden	34
2.1 Materialien	34
2.2 Tiere, Perfusion und Fixierung	35
2.2.1 Kryostatschnitte	36
2.2.2 Vibratomschnitte	36
2.2.3 Hochfrequenzstimulation	36
2.3 Humanes Gewebe	37
2.3.1 Ethische Standards.....	37
2.3.2 Chirurgische Proben	37
2.3.3 Gewebetransport, Vorbereitung und Fixierung	39
2.4 Immunzytochemie	39
2.4.1 Standardrezept	39
2.4.2 Humanes Gewebe	40
2.4.3 Kontrollen	41
2.5 Fluoreszenzmikroskopie	41
2.5.1 Systemvoraussetzungen	41
2.6 Bildanalyse, Befundung und quantitative Analyse	43

2.6.1	Zelluläre Kolo­kalisierung	43
2.6.2	Verblindung	43
2.6.3	Qualitative Auswertung der Rab6A ⁺ -Zellen	45
2.6.4	Quantitative Auswertung der Rab6A ⁺ Strukturen.....	46
2.6.5	Untersuchung von Rab6A und GFAP in HFS-Schnitten	47
2.6.6	Vergleich von publizierten Transkriptomanalysen.....	47
3	Ergebnisse.....	48
3.1	Untersuchungen zum Auftreten von Rab6A <i>in situ</i>	48
3.1.1	Vorhandensein von Rab6A ⁺ Strukturen in allen Hirnregionen	48
3.1.2	Rab6A ⁺ Strukturen unterscheiden sich in Dichte und Intensität....	50
3.2	Lokalisation von Rab6A in Astrozyten	54
3.2.1	Lokalisation von Rab6A in GFAP ⁺ -Astrozyten	54
3.2.2	Morphologie und subzelluläre Lokalisation Rab6A ⁺ Strukturen	56
3.2.3	Lokalisation von Rab6A in astrozytären Endfüßen	58
3.2.4	Lokalisation von Rab6A in perineuronalen Netzen	60
3.3	Lokalisation von Rab6A in allen Astrozyten.....	62
3.3.1	Rab6A in GFAP ⁺ -Astrozyten	62
3.3.2	Rab6A in GS ⁺ -Astrozyten	66
3.3.3	Rab6A in Aldh1L1 ⁺ -Astrozyten.....	72
3.3.4	Rab6A in Sox9 ⁺ -Astrozyten	77
3.4	Klassifikation der Rab6A⁺ Puncta.....	80
3.4.1	Morphologie und subzelluläre Verteilung.....	80
3.4.2	Quantitative Auswertung der Befunde	86
3.5	Rab6A ist spezifisch in Astrozyten lokalisiert	91
3.5.1	Mikroglia	91
3.5.2	NG2-Zellen	101
3.5.3	Oligodendrozyten.....	103
3.5.4	andere Zelltypen.....	106
3.6	Rab6A im humanen Gewebe und klinische Bedeutung	107
3.6.1	Lokalisation von Rab6A im humanen Gewebe	107
3.6.2	Nicht-reaktive und reaktive Astrozyten	109
3.6.3	Korrelation der Glia-Pathologie mit den Diagnosen	111
3.6.4	Rab6A in humanen GFAP ⁺ -Astrozyten	112

3.6.5	Rab6A ⁺ Puncta im humanen Gewebe	116
3.7	Auswirkung der HFS auf Astrozyten und Rab6A	118
3.8	Auswertung der publizierten Transkriptomanalysen.....	127
3.8.1	Darstellung der einzelnen Transkriptomanalysen	127
3.8.2	Fazit zu den Transkriptomanalysen	132
4	Diskussion	133
4.1	Diskussion der Methoden	133
4.1.1	Allgemeines	133
4.1.2	Validität und Reproduzierbarkeit der Befunde	133
4.1.3	Zelluläre Lokalisation, Auswertung und Befundung	135
4.2	Vorkommen und Verteilung von Rab6A in Astrozyten <i>in situ</i> ..	136
4.2.1	Bisherige Analyse der Lokalisation von Rab6A im ZNS in der Literatur.....	136
4.2.2	Sind die Rab6A ⁺ Puncta Rab6A ⁺ Organellen?.....	138
4.2.3	Zellbiologische Interpretation und mögliche Funktionen der Rab6A ⁺ Organellen.....	139
4.2.4	Unterschiedliche Rab6A ⁺ Intensitäten und Dichten	143
4.2.5	Nachweis von Rab6A in allen Astrozyten	145
4.2.6	Rab6A ist in keinem anderen Gliazelltypen lokalisiert	147
4.3	Rab6A im humanen Gewebe	150
4.4	Einfluss der HFS auf Astrozyten und Rab6A.....	153
4.5	Zur Heterogenität der Astrozyten	155
4.5.1	GFAP ⁺ -Astrozyten.....	155
4.5.2	GS ⁺ -Astrozyten	156
4.5.3	Aldh1L1 als pan-astroglialer Marker	157
4.5.4	Sox9 als astrozytenspezifischer Kernmarker	159
4.6	Mögliche klinische Bedeutungen der Befunde.....	160
4.7	Gesamtphysiologische Bedeutung der Gliotransmission	162
4.8	Ausblick.....	163
5	Zusammenfassung.....	166
6	Abstract.....	168
7	Literaturverzeichnis	170
8	Publikationen.....	189

9	Lebenslauf	190
10	Danksagung.....	192
11	Schriftliche Erklärung	193

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 - Spezifische Immunfluoreszenz für Rab6A in allen Hirnregionen	49
Abbildung 2 - Unterschiedliche Dichte der Rab6A ⁺ Strukturen in weißer und grauer Substanz	51
Abbildung 3 - Unterschiedliche Intensität der Rab6A ⁺ Strukturen innerhalb des Hippocampus	53
Abbildung 4 - Lokalisation von Rab6A in GFAP ⁺ -Astrozyten	55
Abbildung 5 - Morphologie und subzellulärer Verteilung von Rab6A in GFAP ⁺ -Astrozyten	57
Abbildung 6 - Rab6A ⁺ Strukturen in perivaskulären astrozytären Fortsätzen ...	59
Abbildung 7 - Rab6A im perineuronalem Netz	61
Abbildung 8 - Alle GFAP ⁺ -Astrozyten sind Rab6A ⁺	63
Abbildung 9 - Lokalisation von GS und Aldh1L1 in GFAP ⁺ /Rab6A ⁺ -Astrozyten	65
Abbildung 10 - Rab6A ist spezifisch in Astrozyten lokalisiert	68
Abbildung 11 - Rab6A ⁺ Strukturen in GS ⁺ perivaskulären astrozytären Fortsätzen	69
Abbildung 12 - Kolokalisation von GS ⁺ /Rab6A ⁺ -Astrozyten und GFAP	71
Abbildung 13 - Vereinzelt Aldh1L1 ⁺ -Zellen sind Rab6A ⁻ und GFAP ⁻	74
Abbildung 14 - Kolokalisation von Aldh1L1 ⁺ /Rab6A ⁺ -Astrozyten mit GFAP	76
Abbildung 15 - Kolokalisation von Sox9 mit Rab6A.....	79
Abbildung 16 - Typ I der Rab6A ⁺ Strukturen	81
Abbildung 17 -Typ II der Rab6A ⁺ Strukturen	82
Abbildung 18 - Typ III der Rab6A ⁺ Strukturen	83
Abbildung 19 - Typ IV der Rab6A ⁺ Strukturen.....	84
Abbildung 20 - Vorgehensweise zur quantitativen Auswertung der Rab6A ⁺ Strukturen.....	87
Abbildung 21 - Doppelimmunfluoreszenz an Mikroglia an Kryostatschnitten ...	92
Abbildung 22 - Doppelimmunfluoreszenz an Mikroglia und Astrozyten an Vibratomschnitten.....	93
Abbildung 23 - Falsch positive Kolokalisation von Iba1 und Rab6A	94

Abbildung 24 - Falsch positive Kolo­kalisierung von Iba1 und Rab6A in Ansatz II	96
Abbildung 25 - Doppelmarkierung mit Iba1 und Rab6A in Ansatz III.....	97
Abbildung 26 - Falsch positive Kolo­kalisierung von Iba1 und Rab6A in Ansatz IV	99
Abbildung 27 - Kolo­kalisierung von NG2 mit Rab6A	102
Abbildung 28 - Kolo­kalisierung von CNPase mit Rab6A	105
Abbildung 29 - Vorkommen von Rab6A im humanen Gewebe	108
Abbildung 30 - Astrozyten im humanen Gewebe	109
Abbildung 31 - Emperipole­sis in humanen Astrozyten	111
Abbildung 32 - Lokalisation von Rab6A in GFAP ⁺ -Astrozyten.....	114
Abbildung 33 - Einige GFAP ⁺ -Astrozyten des Patienten I sind Rab6A ⁻	115
Abbildung 34 - Klassifikation der Rab6A ⁺ Pun­cta im humanen Gewebe.....	117
Abbildung 29 - Intensitätsdichten­unterschiede in der Rab6A ⁺ und GFAP ⁺ Färbung.....	123

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 - Puffer und andere Reagenzien.....	34
Tabelle 2 - Primärantikörper	34
Tabelle 3 - Sekundärantikörper	35
Tabelle 4 - Normalseren und Fluoreszenzfarbstoffe.....	35
Tabelle 5 - Patienteninformation.....	39
Tabelle 6 - Anzahl der untersuchten Astrozyten.....	78
Tabelle 7 - Morphologie und subzelluläre Verteilung der Rab6A ⁺ Strukturen... 85	85
Tabelle 8 - Mittelwerte der quantitativen Auswertung der Rab6A ⁺ Puncta	88
Tabelle 9 - Zellanzahl der untersuchten anderen Gliazelltypen.....	91
Tabelle 10 - Antikörperansätze der Doppelimmunfärbung an Mikroglia	95
Tabelle 11 - Anzahl der untersuchten humanen Astrozyten	112
Tabelle 12 - prozentuales Vorkommen der Typen I-IV in humanen Astrozyten	116
Tabelle 13 - Übersicht zu den Transkriptomanalysen	131

Diagrammverzeichnis

Diagramm 1 - Lokalisation von Rab6A in GFAP ⁺ -Astrozyten	62
Diagramm 2 - Lokalisation von GS in GFAP ⁺ /Rab6A ⁺ -Astrozyten.....	64
Diagramm 3 - Lokalisation von Aldh1L1 in GFAP ⁺ /Rab6A ⁺ -Astrozyten.....	64
Diagramm 4 - Lokalisation von Rab6A in GS ⁺ -Astrozyten	67
Diagramm 5 - Lokalisation von GFAP in GS ⁺ /Rab6A ⁺ -Astrozyten.....	70
Diagramm 6 - Lokalisation von Rab6A in Aldh1L1 ⁺ -Astrozyten	73
Diagramm 7 - Lokalisation von GFAP in Aldh1L1 ⁺ /Rab6A ⁺ -Astrozyten.....	75
Diagramm 8 - Lokalisation von Rab6A in Sox9 ⁺ -Astrozyten	78
Diagramm 9 - Flächen der Rab6A ⁺ Puncta	89
Diagramm 10 - Anzahl der Rab6A ⁺ Puncta pro Typ	90
Diagramm 11 - Lokalisation von Rab6A in Mikrogliazellen.....	98
Diagramm 12 - Lokalisation von Rab6A in NG2-Zellen	101
Diagramm 13 - Lokalisation von Rab6A in Oligodendrozyten	104
Diagramm 14 - Lokalisation von Rab6A in humanen GFAP ⁺ -Astrozyten	113
Diagramm 14 - Vergleich der Intensitäten der inneren und äußeren Molekularschicht je Hemisphäre im Rab6A-Farbkanal.....	121
Diagramm 15 - Vergleich der Intensitäten der jeweils gleichen Molekularschicht zwischen den Hemisphären im Rab6A-Farbkanal.....	122
Diagramm 16 - Vergleich der Intensitäten der inneren und äußeren Molekularschicht je Hemisphäre im im GFAP-Farbkanal	125
Diagramm 17 - Vergleich der Intensitäten der jeweils gleichen Molekularschicht zwischen den Hemisphären im GFAP-Farbkanal.....	126

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
AC	Adenylylcyase
AE	Intensitätseinheiten
Aldh1L1	Aldehyd Dehydrogenase 1, Mitglied L1
AI (647, 488)	Alexa Fluorescein
AMCA	Aminomethylkumarin
AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid
ANP	atriales natriuretisches Peptid
ANOVA	Analysis of variance, Varianzanalyse
ATP	Adenosintriphosphat
BAC	Bacterial Artificial Chromosome
BICD1/2	Bicaudal D 1/2
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CAST	Cytomatrix at the Active Zone-Associated Structural Protein
cc	Corpus callosum
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
CIC	Calcium-induzierte Calcium-Freisetzung
CNPase	2',3'-Cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase
COG	Golgi
COPI	Coat Protein Complex I
ctx	Cortex
Cx	Connexin
Cy3	Cyanine
DAG	Diacylglycerol
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindole
DCV	Dense Core Vesicle
Dy488	Dye Light 488
EAAT	Excitatory Amino-Acid Transporter
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein

ELKS	Protein reich an den Aminosäuren Glutaminsäure [E], Leucin [L], Lysin [K] und Serin [S]
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERC1	ELKS/RAB6-Interacting/CAST Family Member 1
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FCD	Focal cortical disease
FDH	10-Formyltetrahydrofolat Dehydrogenase
fi	Fimbriae
GABA	γ -Aminobuttersäure (Gammaaminobuttersäure)
GARP	Golgi-Associated Retrograde Protein
gc	Granular cell layer
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	Guanine nucleotide Exchange Factor
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein
GFP	Green Fluorescent Protein
GLT1	Glutamat-Transporter
GS	Glutamin Synthetase
GST	Glutathione S-transferase
GTP	Guanosintriphosphat
HFS	Hochfrequenzstimulation
hif	Hippocampal fissur
HMG	High mobility group
Iba1	Ionized calcium binding adaptor molecule 1
IGF-1	Insulin-Like Growth Factor
ILAE	International League Against Epilepsy
IP3	Inositol-1,4,5-Triphosphat
IR	Immunreaktivität
K ⁺	Kalium
kDa	kilo Dalton
KIF	Kinesin Family Member
lac	Stratum lacunosum-moleculare
LDCV	Large Dense Core Vesicles
med. Septum	mediales Septum

luc	Stratum lucidum
mol	molecular cell layer
M.O.M	Mouse-Ig-Blocking Reagent
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
Munc	Mammalian Uncoordinated
NaBH ₄	Natriumborohydrid
NeuN	Fox-3, Rbfox3, or Hexaribonucleotide Binding Protein-3
NG2	Neural/glial antigen 2
NHS	Normal horse serum
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
or	Stratum oriens
P2X-R	Purinozeptoren
PAP	Peripheral Astrocyte Processes
PB	Phosphatpuffer
PDGFRA	Platelet-Derived Growth Factor Receptor A
PFA	Paraformaldehyd
PIP2	Phosphoinositoldiphosphat
PKA	Proteinkinase A
PLC	Phospholipase C
po	Polymorph layer
pyr	Stratum pyramidal
qPCR	Real-time quantitative polymerase chain reaction
Rab	Ras-Related in Brain
Rab6IP	Rab6-Interacting Protein
rad	Stratum radiatum
Ras	Rat sarcoma
Ric1p	Ribosome control protein 1
Rg1p	Rab6A GEF complex partner 1
RYR	Ryanodin-Rezeptor
SLMV	Synaptic-Like Microvesicles
SNAP	Soluble NSF attachment protein
SNARE	Soluble NSF Attachment Protein Receptor
SV	synaptische Vesikel

SVZ	subventrikuläre Zone
TGN	Trans-Golgi Netzwerk
TH	Tyrosin-Hydroxylase
TMF/ARA160	TATA element modulatory factor/androgen receptor-coactivator of 160 kDa
TRAP	Translating ribosome affinity purification
VAMP	Vesicle-Associated Membrane Protein
vGLUT	Vesikulärer Glutamat-Transporter
VNUT	vesikulärer Nukleotidtransporter
VRAC	Volume-Regulated Anion Channel
ZNS	Zentralnervensystem

1 Einleitung

1.1 Astrozyten

1.1.1 Definition, Entwicklung und Morphologie

Im Jahre 1856 verwendete der deutsche Pathologe Rudolf Virchow die Bezeichnung des „Nervenkit“ und prägte von da an den Begriff der Neuroglia.^{1,2} Die Neuroglia des Zentralnervensystems (ZNS), welche 90% der Zellen ausmacht,³ wurde ursprünglich als eine Art „Klebstoff“ angesehen, welche primär als Stütz- und Haltezellen charakterisiert wurden. Aus heutiger Sicht wird deutlich, dass Wissenschaftler sie in ihrer Funktion viele Jahrzehnte unterschätzt haben.

In dieser Dissertation wird sich in erster Linie auf eine Untergruppe der Neurogliazellen, den Astrozyten, konzentriert, welche im Laufe der Jahre immer mehr an Bedeutung gewonnen haben. Aufgrund ihrer strahlenförmigen Fortsätze werden Astrozyten auch als Sternzellen bezeichnet. Sie stellen mit 50% des menschlichen Gehirnvolumens den häufigsten Zelltyp unter den Gliazellen dar^{4,5} und bilden zusammen mit den Oligodendrozyten die Gruppe der Makroglia.

Die Klassifizierung der Astrozyten und ihre definierte Abgrenzung gegenüber anderen Gliazellen legt H.K. Kimelberg⁶ im Jahr 2010 mit acht anerkannten Kriterien dar. Das erste Kriterium spiegelt die fehlende Erregbarkeit wider, welches ein notwendiges, aber nicht ausreichendes Kriterium ist. Wenn eine Zelle erregbar ist, ist sie somit automatisch kein Astrozyt. Als zweites spricht ein sehr negatives Membranpotential, welches durch den transmembranen K^+ -Gradienten zustande kommt für einen Astrozyten. Die Aufnahme der exzitatorischen Aminosäuren GABA und Glutamat durch astrozytenspezifische Transporter ist das dritte Kriterium. Das vierte Kriterium beschreibt das Vorhandensein von GFAP. Dieses Kriterium ist nicht absolut, da Astrozyten aus Cortex und Hippocampus deutlich seltener GFAP exprimieren als die Bergmann-Glia des Cerebellums.⁷ Das nächste Kriterium ist das Vorkommen von Glykogen-Granulat. Das sechste Kriterium besagt, dass die Fortsätze von jeder Zelle Blutgefäße umgeben. Das vorletzte Kriterium gibt an, dass die Fortsätze der Zellen Synapsen umgeben und das letzte Kriterium spricht über die Verknüpfung

mit anderen Astrozyten durch *gap junctions*.⁶ Durch diese acht Kriterien können beispielsweise NG2-Zellen als Astrozyten ausgeschlossen werden, da sie die Kriterien drei und acht nicht erfüllen.⁶

Für die embryonale Entwicklung von Astrozyten werden zwei verschiedene Ursprünge diskutiert; zum einen die Radialgliazellen und zum anderen die migrierten Zellen der subventrikulären Zone (SVZ). Dabei entsteht die Radialglia aus neuronalen Vorläuferzellen, welche ektodermalen Ursprungs sind und aus pluripotenten Zellen des Neuroepithels des Neuralrohres stammen.⁸ Diese entwickeln sich dabei nicht nur zu Astrozyten und Oligodendrozyten, sondern auch zu Neuronen weiter. Sie sind im gesamten, sich entwickelnden ZNS zu finden und erstrecken sich primär von der ventrikulären Zone bis hin zur Oberfläche der Pia mater. In erster Linie dient die Radialglia jedoch als Leitstruktur für Neuronen. Denn vor allem Projektions- und Interneurone nutzen die Radialglia als Wachstumsschiene.⁹ Nach Beendigung der neuronalen Entwicklung wandeln sich einige der Radialgliazellen zu Astrozyten um, wobei nicht bekannt ist welcher Astrozytentyp entsteht.¹⁰ Bei dem zweiten diskutierten Weg differenzieren sich Astrozyten aus Vorläuferzellen der SVZ, die zu einem späteren Zeitpunkt der Entwicklung in tiefere Schichten auswandern.¹¹ Astrozyten lassen sich in Subpopulationen einteilen, welche sich nicht nur in ihrer Verteilung, sondern auch in ihrer Biochemie und Morphologie unterscheiden.¹² Klassifiziert werden die verschiedenen astrozytären Subpopulationen durch astrozytenspezifische Marker, welche die Astrozyten durch Immunzytochemie sichtbar machen.¹³ Dabei nahm Kimelberg⁶ eine Unterteilung in sternförmige und gestreckte Astroglia vor. Die protoplasmatischen und faserigen Astrozyten gehören zur sternförmigen Astroglia und unter gestreckte Astroglia fallen die Müllerzellen der Retina und die Bergmann-Glia des Cerebellums. Im Nachfolgenden werden diese Untergruppen genauer definiert.

Protoplasmatische Astrozyten

Protoplasmatische Astrozyten, auch als Kurzstrahler bekannt, kommen vorwiegend in den Schichten zwei bis sechs des Cortex vor. Sie sind plump und haben drei oder vier kurze GFAP⁺-Fortsätze,¹⁴ welche sich radial vom Zellkörper erstrecken. Sie besitzen einen Durchmesser von 15-25 μm .¹⁵ Die vom Soma aussprossenden Fortsätze weisen meist eine Größe von 30-60 μm ¹⁴ auf und besitzen zahlreiche lamelläre seitliche Verzweigungen.¹⁶ Diese feinen Verzweigungen besetzen 50-60% des zytoplasmatischen Volumens, was ungefähr 5.500 μm^3 ausmacht und bedecken zudem etwa 80% der Zelloberfläche. Somit kann ein einzelner Astrozyt mit all seinen Fortsätzen eine Fläche von bis zu 80.000 μm^2 ausfüllen.¹⁷ Dabei nimmt ein Astrozyt ein Volumen von rund 66.000 μm^3 ein.¹⁷ Ihr Oberflächen-zu-Volumen-Verhältnis beläuft sich zwischen 10 und 20 μm^{-1} . Ihre Dichte beträgt im cerebellaren Cortex 4.000-10.000 mm^{-3} .¹² Im Neuropil nehmen Astrozyten ihre eigenen Domänen ein, sodass jede Stelle im Neuropil durch einen einzelnen Astrozyten versorgt wird. Daraus lässt sich schließen, dass es zwischen den Fortsätzen benachbarter Astrozyten zu einer sehr geringen Überlappung kommt, welche unter 5% liegt.¹⁸ Mit einigen ihrer Endfüße bedecken Astrozyten praktisch die komplette Oberfläche der Blutgefäße des ZNS und umschließen außerdem neuronale Zellkörper, Synapsen und die Pia mater.¹⁹ Humane protoplasmatische Astrozyten weichen stark von den protoplasmatischen Astrozyten der Nagetiere ab. Sie haben einen kleineren Durchmesser von rund 10 μm und bis zu 40 Fortsätze, welche 100-200 μm lang sind.¹⁴ Dabei ist ihr Volumen 27-mal größer als das der Nagetiere, wodurch ein einzelner menschlicher Astrozyt mit bis zu zwei Millionen Synapsen in Verbindung treten kann.¹⁴ Die Anzahl der Astrozyten bleibt weitestgehend gleich und verändert sich im Laufe des Lebens nicht mehr.²⁰

Faserige Astrozyten

Die faserigen Astrozyten, auch als Langstrahler bezeichnet, sind in der weißen Substanz, im Nervus opticus und in der retinalen Nervenfaserschicht von Säugetieren mit vaskularisierter Netzhaut lokalisiert.¹² Ihr Vorkommen ist mit ca. 200.000 Faserastrozyten pro mm^3 in der Commissura anterior bedeutend höher als das der protoplasmatischen Astrozyten.¹² Sie haben kleine Somata von 10-12 μm Durchmesser, welche in Reihen zwischen den axonalen Bahnen

angeordnet sind. Die Fortsätze sind glatt und meist parallel zu den Axonen orientiert und können bei der Maus bis zu 300 μm lang sein.¹⁶ Dabei enden sie entweder perivaskulär oder subpial und verzweigen sich in der Peripherie eher selten.¹² Die faserigen Astrozyten reichen mit ihren Fortsätzen bis in den perinodalen Raum benachbarter Axone und besetzen mit ihren Endfüßen auch die Ranvierschen Schnürringe.²¹ Sie haben eine geschätzte Dichte von 200.000 mm^{-3} und ein Oberflächen-zu-Volumen-Verhältnis von rund 5 μm^{-1} .¹² Im Vergleich zu protoplasmatischen Astrozyten überlappen sich die Fortsätze benachbarter faseriger Astrozyten stark. Sie scheinen mit ihrer Einheitlichkeit und ihrer einfachen Morphologie am Besten in das traditionelle Denken über Astrozyten zu passen. Gewissermaßen, dass ihnen eher eine unterstützende Rolle zukommt und sie nicht bei der Informationsverarbeitung und Modulation synaptischer Aktivität beteiligt sind.¹⁴

Bergmann-Glia

Bergmann-Gliazellen fallen in die Ordnung der gestreckten Glia und kommen im Cerebellum vor.²² Sie sind radial angeordnet und besitzen drei bis sechs Fortsätze. Sie erstrecken sich vom Stratum purkinjense bis zur Pia mater. Von der pialen Oberfläche aus betrachtet, bilden die Fortsätze der Bergmann-Glia Reihen oder Palisaden, die parallel ausgerichtet sind.¹² Durch ihre reich verzweigten Seitenzweige weisen sie eine komplexe morphologische und funktionelle Interaktion sowohl mit den Synapsen als auch mit den Dendriten der Purkinje-Zellen auf. Im Nagetier umgeben circa acht Bergmann-Glia ein Purkinje-Neuron. So wird ein Kanal ums Neuron und dessen Dendriten geformt, wodurch eine einzelne Bergmann-Gliazelle bis zu 8.000 Synapsen kontaktiert.¹⁶ Charakteristisch für die Bergmann-Glia ist ein hohes Oberfläche-zu-Volumen-Verhältnis von mehr als 20 μm^{-1} .²³ Sie nehmen 15-18% des Volumens der Molekularschicht des Cerebellums ein, wobei eine einzelne Bergmann-Gliazelle ein Volumen von rund 3600 μm^3 besitzt.¹²

Müllerzellen

Die Müllerzellen stellen die radiale Glia der Netzhaut dar. Mit den spezialisierten Zweigen ihrer Endigungen, berühren sie praktisch jedes neuronale und nicht-neuronale Element. In der humanen Netzhaut hat eine Gliazelle dabei Kontakt

zu circa 16 Neuronen, beim Nagetier zu ungefähr 30 Neuronen. In den äußeren Kernschichten der Netzhaut, wo die Somata der Photorezeptoren liegen, nehmen die Endigungen der Müllerzellen die Form von velaten Astrozyten an, während sie in den plexiformen Schichten, wo sich die Synapsen der Netzhautneuronen befinden, eher den Endigungen der protoplasmatischen Astrozyten ähneln. Die Endigungen in der zentralen Netzhaut nahe des Nervus opticus ähneln denen der faserigen Astrozyten. Das Volumen der einzelnen Müllerzellen liegt bei der Maus bei $400 \mu\text{m}^3$ und beim Hasen bei $12.000 \mu\text{m}^3$.¹² Die Größe und Form der Müllerzellen hängt von der Spezies, in der sie vorkommen und von der Netzhaut, deren Dicke und Topographie ab.

Weitere Subpopulationen

Interlaminäre Astrozyten befinden sich ausschließlich im Cortex höherer Primaten.²⁴ Die Somata liegen in der Lamina plexiformis (I), von wo aus sich ihre Fortsätze bis in die Schichten III und IV erstrecken können.¹⁴ Jeder interlaminäre Astrozyt besitzt einen langen unverzweigten Fortsatz, welcher die bis zu einem Millimeter große Distanz überwinden kann und bis zu sechs wesentlich kürzeren Fortsätzen, wodurch die Astrozyten untereinander in Kontakt bleiben.¹⁶ Weiterhin gehören die Tanyzyten, welche auf bestimmte Hirnregionen, wie beispielsweise die zirkumventrikulären Organe beschränkt sind und die Pituizyten der Hypophyse dazu.²⁵ Die radialen Astrozyten sind im Hippocampus von Säugetieren auf der Körnerzellschicht und dem Stratum oriens der CA1 Region vorhanden.²⁶⁻²⁸ Die velaten Astrozyten kommen in der Körnerschicht des Cerebellums vor, wo jeder von ihnen mehrere kleine neuronale Körnerzellen mit Velathüllen umgibt.²⁹ Außerdem gibt es noch perivaskuläre und marginale Astrozyten.³⁰⁻³² Die Ependymozyten, welche zwei Pole besitzen, kontaktieren mit einem Pol die Überbleibsel der embryonalen Blutgefäße und auf ihrem anderen Pol befinden sich zusätzlich Mikrovilli und Kinocilien, um den Strom der Zerebrospinalflüssigkeit zu unterstützen.¹²

Der Begriff der *tripartite Synapse* bezeichnet dabei die vielfältigen Interaktionen von Neuronen und Astrozyten an neuronalen Kontaktstellen.³³

1.1.2 Aufgaben und Funktionen

Astrozyten erfüllen eine Vielzahl unterschiedlichster Aufgaben. Dabei lassen sich ihre Funktionen in die Bereiche Entwicklung, Durchblutung, Metabolismus inklusive pH- und Ionen-Regulation, Strukturerehalt und Gliotransmission unterteilen.

Im Cortex, Hippocampus und Cerebellum entsteht die Radialglia aus astroglialen Stammzellen. Diese dienen, wie bereits erwähnt, mit ihren langen Fortsätzen als Führungsschiene für sich entwickelnde Neuronen und differenzieren dann selbst zu reifen Astrozyten. Auch bei der Neuro- und Gliogenese aus astroglialen Stammzellen übernehmen diese eine regulative Funktion. Durch einige biochemische Faktoren lässt sich dabei eine Differenzierung in die eine oder andere Richtung steuern. Für die Neurogenese sind Faktoren wie der *epidermal growth factor* (EGF-2) oder der *insulin-like growth factor* (IGF-1) ausschlaggebend. Für die Gliogenese hingegen sind Faktoren wie *Notch* oder der Kontakt zu unmyelinisierten Axonen entscheidend. Auch in der Entwicklung und Reifung von Synapsen spielen Astrozyten eine wichtige Rolle, denn es wird davon ausgegangen, dass sich Synapsen ohne Astrozyten nicht richtig entwickeln können.³⁴ Dabei kann ein einzelner Astrozyt über 100.000 Synapsen kontaktieren.¹⁸ Astrozyten beteiligen sich auch an der Limitierung und den Abbau bestehender Synapsen. Die Fortsätze der Astrozyten enden auf den Oberflächen von Arteriolen des Gehirns und beeinflussen nicht nur den vaskulären Muskeltonus, sondern auch die lokale Blutströmung, welche entsprechend des anfallenden Bedarfs reguliert wird.³⁵ Durch ihren engen Kontakt zu Gefäßen, Neuronen und Synapsen können Astrozyten Grenzscheiden ausbilden.³⁶ Dazu zählen die Blut-Hirn-Schranke^{37,38} und die Blut-Liquor-Schranke¹⁶. Dadurch beteiligen sich Astrozyten am Austausch von Nährstoffen und Stoffwechselprodukten zwischen Neuronen und Blut.³⁹

Über *gap junction* Kanäle stehen Astrozyten sowohl in physiologischen als auch pathologischen Situationen in engem Kontakt mit Neuronen. Diese Kanäle werden in den Astrozyten durch das Protein Connexin 43 (Cx43) gebildet und gestatten den Austausch von Ionen und Signalmolekülen zwischen dem Zytoplasma von benachbarten Zellen.^{40,41} Astrozyten bilden das Gerüst des Nervensystems und integrieren und vermitteln Informationen, die sie aus ihrer

Umgebung erhalten.¹⁹ Beim *potassium spatial buffering* wird das bei der neuronalen Erregung freiwerdende Kalium durch Astrozyten von Regionen mit hoher K⁺-Konzentration zu Regionen mit niedriger K⁺-Konzentration geleitet.⁴² Dadurch kann eine K⁺-induzierte Depolarisation von Neuronen vermieden werden.

Eine weitere Aufgabe der Astrozyten stellt sich in der Speicherung und Umwandlung von Nährstoffen für Neurone dar. Bei Steigerung der glutamatergen Aktivität erhöhen Astrozyten ihre glykolytische Aktivität durch Aufnahme von Glutamat, welches die Na⁺/K⁺-ATPase und somit die astrozytäre Glykolyse aktiviert. Dies führt zu einer erhöhten Freisetzung von Lactat, was nicht nur als Puffer zwischen dem glykolytischen und oxidativen Metabolismus dient,⁴³ sondern auch als Signalmolekül, welches durch spezifische Monocarboxylat-Transporter von Astrozyten in die Neuronen gelangt.⁴⁴ Der Glykogen-Metabolismus spielt im Gehirn eine Rolle bei der synaptischen Plastizität und beim Lernvorgang. Der Hauptspeicherplatz für Glykogen befindet sich in der Bergmann-Glia, wo sie eher in den Fortsätzen als im Soma lokalisiert sind.⁴⁵

Außerdem regulieren Astrozyten auch die Phagozytose abgestorbener Neurone. Dabei phagozytieren sie nicht nur die zerstörten Neuronen, sondern proliferieren ihrerseits und ändern ihre Morphologie, was mit dem Beginn der Gliose übereinstimmt, um ein Glianarbgewebe zu produzieren.⁴⁶

Obwohl Astrozyten nicht in der Lage sind, Aktionspotentiale zu generieren oder über elektrische Signale zu kommunizieren, können sie untereinander und mit neuronalen Zellen über andere Wege in Verbindung treten.⁴⁷⁻⁴⁹ Sie umschließen die zentralen Synapsen der Neuronen und können über verschiedene Typen von Rezeptoren chemische Signale aus ihrer Umgebung detektieren und auf diese antworten. Beispielfhaft kann es an den Neurotransmittern Glutamat und ATP, welche aus den präsynaptischen Nervenendigungen freigesetzt werden, erläutert werden.⁵⁰ Dabei binden die Transmitter an metabotropen Glutamat- und ATP-Rezeptoren auf nahe gelegenen astrozytären Fortsätzen.⁴³ Im Cerebellum exprimieren Bergmann-Glia AMPA-Rezeptoren, welche direkt durch das von den Purkinje-Fasern freigesetzte Glutamat aktiviert werden können.⁵¹ Dahingegen besitzen Astrozyten des Cortex Glutamat-Rezeptoren vom NMDA-Typ, welche ebenfalls synaptische Signale an Astrozyten übermitteln können.⁵² Weitere

Rezeptoren die aktiviert werden, sind die metabotropen hochaffinen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren.⁵³

Astrozyten sind in der Lage kleine Signalmoleküle, die als Gliotransmitter bezeichnet werden, als Antwort auf die neuronale Aktivität freizusetzen. Zu diesen Gliotransmittern zählen unter anderem Glutamat, GABA, D-Serin und ATP.⁵⁴ Über die Art und Weise, wie die Gliotransmitter aus den Astrozyten freigesetzt werden, wird in der Literatur debattiert. Durch ansteigen der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration kommt es zu einer exozytotischen und non-exozytotischen Freisetzung von Gliotransmittern. Bei der exozytotischen Freisetzung werden die Transmitter in Vesikel geladen und über die Membran freigesetzt. Der non-exozytotische Weg zeichnet sich durch eine Freisetzung der Gliotransmitter über Transporter oder membranständige Kanäle aus. Dieser Weg kann weiterhin unterteilt werden in eine Ca^{2+} -abhängige Freisetzung über Bestrophin-1 und Volumen-regulierte Anionenkanäle (VRAC) und eine Ca^{2+} -unabhängige Freisetzung durch die Öffnung von P2X_7 -Rezeptoren oder Cx43-Hemikanäle.

Die astrozytäre Exozytose unterscheidet sich grundlegend von der neuronalen Exozytose und wird nicht durch spannungsgesteuerte Ca^{2+} -Kanäle, sondern durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren vermittelt.⁵⁵ Diese setzen IP_3 frei, welches durch Bindung an das astrozytäre endoplasmatische Reticulum (ER) die Ca^{2+} -Freisetzung anregt. Astrozyten enthalten vesikuläre Organellen, die mit der Zellmembran fusionieren und ihre Transmitter freigegeben können.⁵⁵ In kultivierten Astrozyten wurden mehrere vesikuläre Kompartimente bestimmt, die einer geregelten Exozytose unterliegen können. Zu diesen Kompartimenten gehören klare, kleine elektronenlucente, den synaptischen Vesikeln ähnliche Mikrovesikel (SLMV),⁵⁶ dense core Vesikel (DCV)⁵⁷ und sekretorische Lysosomen⁵⁸. SLMV ähneln in ihrer Morphologie stark den synaptischen Vesikeln von Nervenendigungen.⁵⁶ Im Unterschied dazu sind sie zwischen 30-300 nm⁵⁹ und teilweise >300 nm⁶⁰ groß. Sie enthalten Glutamat⁶¹ und Serin, sowie den membranständigen Transporter vGLUT und D-Serin.⁶² SLMV findet sich vorwiegend in direkter Nähe zur Zellmembran, neuronalen Dendriten, Endfüßen und in perisynaptischen Endfüßen.⁶² Vergleiche von isolierten SLMV und neuronalen SV haben gezeigt, dass sich die astrozytären SLMV sowohl in der

Zusammensetzung und im Gehalt der Transmitter als auch im Mechanismus der Transmitterbeladung von den neuronalen SV unterscheiden.⁶³ LDCV gelten als wichtigstes vesikuläres Kompartiment für die Speicherung und Freisetzung von Neuropeptiden und Hormonen in neuroendokrinen Zellen und Neuronen.⁶⁴ Astrozytäre DCV kommen in geringerer Anzahl vor und zeigen eine ähnliche Ultrastruktur wie die LDCV,⁶⁵ sie sezernieren vermehrt ATP durch den vesikulären Nukleotidtransporter VNUT.⁴³ Kultivierte Astrozyten sezernieren außerdem Secretogranin II⁶⁶ und III⁶⁷, Chromogranin⁶⁸, ANP⁶⁹ und Neuropeptid Y⁶⁶. Sekretorische Lysosomen setzen vermehrt ATP frei,⁷⁰ aber auch Glutamat,⁴³ Cathepsin D,⁷¹ Rab7 und VNUT⁷². Insgesamt wird angenommen, dass weniger Transmitter aus Astrozyten als aus Neuronen freigesetzt werden.⁷³

Die non-exozytotische Freisetzung kommt beispielsweise durch Ca²⁺-abhängige Membranproteine wie die VRAC zustande. Sie sezernieren Glutamat, Aspartat und Taurin.⁷⁴ Diese Art der Gliotransmission findet sich meist bei pathologischen Zuständen wie einem Schlaganfall⁷⁵ und Depressionen⁷⁶, wenn eine stark verschobene Ionenkonzentration vorliegt. Unter physiologischen Bedingungen setzt der Ca²⁺-aktivierte Chlorid-Kanal Bestrophin-1 GABA aus der Bergmann-Glia⁷⁷ und Glutamat aus Astrozyten des Hippocampus⁷⁸ frei. Diese Kanäle sind in den distalen perisynaptischen Fortsätzen der Astrozyten lokalisiert.⁷⁹ Die Aminosäuren Aspartat und Glutamat werden zusammen mit GABA durch den Kanal transportiert.⁴³ Bestrophin-1 ist nicht nur selektiv in Astrozyten lokalisiert, sondern kann auch in Neuronen des Hippocampus und Cerebellums vorgefunden werden,⁷⁷ wobei seine Funktion in Neuronen unbekannt ist. Weitere Membranproteine, die Gliotransmitter freisetzen können sind die Cx43-Hemikanäle und die purinergen P2X₇-Rezeptoren.⁸⁰ Die Connexine der astrozytären Zellmembran stellen eine Verbindung zwischen Zytoplasma und Extrazellularraum dar. Die Öffnung des Kanals in Astrozyten führt zu einem Ausfluss von Glutamat,⁸⁰ Aspartat⁸⁰ und ATP⁸¹. Die purinergen P2X₇-Rezeptoren bilden nach ATP-Bindung eine große Pore, die für ATP,⁸² Glutamat,⁸³ Aspartat⁸³ und GABA⁴³ permeabel ist. Es wird angenommen, dass das Öffnen der Cx43-Hemikanäle nur nach einer starken Membrandepolarisation stattfindet und sie im Ruhezustand geschlossen sind.⁸⁴ Es wurde gezeigt, dass die Kanäle hauptsächlich unter pathologischen Bedingungen, wie traumatische

Verletzungen, Krampfaktivität und veränderten Sauerstoff- und Glukosekonzentrationen geöffnet sind.⁴¹ Da die non-exozytotische Freisetzung von Gliotransmittern vorwiegend durch pathologische Bedingungen ausgelöst und überwiegend nicht Calcium-abhängig und somit nicht reguliert wird, spielt sie höchstwahrscheinlich eine nebensächliche Rolle in der Gliotransmission.

Es wird deutlich, dass Astrozyten aufgrund ihrer Fähigkeit auf gliale und neuronale Signale zu reagieren eine entscheidende Rolle in der Pathogenese vielzähliger Erkrankungen einnehmen. Dabei sind sie nicht nur für die Pathogenese, sondern auch für die Physiologie des ZNS von großer Bedeutung. Durch die Prozessierung synaptischer Informationen sind Astrozyten an einer Vielzahl höherer Hirnfunktionen beteiligt. Dazu gehören das Erinnerungsvermögen und Lernverhalten,⁸⁵ aber auch andere Prozesse wie Verhaltensmodulation,⁸⁶ Aufmerksamkeit und Wachheit⁸⁷ und die Verarbeitung emotionaler Stimuli⁸⁸. Auch bei der kognitiven Flexibilität,⁸⁹ Feinmotorik, Entscheidungsfindung und zentral gesteuerten Körperfunktionen wie Nahrungsaufnahme⁹⁰ und Schlaf-Homöostase⁹¹ sind Astrozyten beteiligt.

1.1.3 Astrozytäre Heterogenität und ihre funktionelle Bedeutung

Astrozyten bilden eine große und heterogene Gruppe, die sich auf morphologischer, entwicklungsbezogener, funktioneller und molekularer Ebene unterscheiden.

In einigen Regionen des ZNS unterscheidet sich die Morphologie der Astrozyten so dramatisch voneinander, dass sie zur Identifizierung von Grenzen anatomischer Regionen verwendet werden kann.⁹² In der Literatur werden Astrozyten, basierend auf ihrer neuroanatomischen Lokalisation und morphologischen Darstellung, meist in zwei Untergruppen eingeteilt: die protoplasmatischen Astrozyten der grauen und die faserigen Astrozyten der weißen Substanz. Astrozyten entwickeln spezifische Eigenschaften, mit denen sie an umliegenden neuronalen Populationen angepasst sind.⁹³ Sie nehmen eine wichtige Rolle in der Regulation der Synaptogenese ein. Neurone, die mit Astrozyten aus der gleichen Region kultiviert wurden, entwickelten deutlich längere Neuroniten und Synapsen als solche, die mit Astrozyten aus einer anderen Region kultiviert wurden.⁹⁴ Der Prozentsatz der Synapsen die in Kontakt mit Astrozyten treten liegt im Isoortex bei 29% und im Hippocampus bei 57%.⁴

Astrozyten aus verschiedenen Regionen besitzen ausgeprägte strukturelle und funktionale Eigenschaften, die eine klare Anpassung an nahegelegenen Strukturen und Schaltungen annehmen lassen.⁹³ Die Müllerzellen der Netzhaut sind gestreckte Astrozyten, die mit ihren feinen Fortsätzen an der inneren Netzhautoberfläche und den Zellkörpern an der inneren Kernschicht alle Schichten der Netzhaut überspannen. Dabei erleichtern sie die Lichtübertragung von der Innenseite des Auges über die Netzhaut zu den Fotorezeptoren. Außerdem dienen sie als optischer Kanal um die Lichtstreuung, welche bei Durchlaufung mehrerer Neuropil- und Kernschichten entsteht, zu verhindern.⁹⁵ Die Bergmann-Glia exprimiert eine hohe Zahl an Glutamat-Transportern wie EAAT2/GLT1 und EAAT1/GLAST um an der glutamatergen Innervation der Molekularschicht angepasst zu sein. Auch innerhalb einer Region können sich Astrozyten in ihrer Funktion unterscheiden. Astrozyten der chemorezeptiven Regionen der Medulla oblongata reagieren an der ventralen Oberfläche auf Änderungen des pH-Werts, jedoch nicht an der dorsalen.⁹⁶ Auf dem dorsalen Nucleus suprachiasmaticus, dem Hauptzeitgeber des Tagesrhythmus haben Astrozyten auch Einfluss. Während der Nacht sind Astrozyten dort aktiv und dienen dazu die neuronale Aktivität herunterzuregulieren. Neue Befunde ziehen in Betracht, dass Astrozyten selbst durch Freisetzung von Glutamat den Tagesrhythmus regulieren können.⁹⁷ Der Hypothalamus ist essentiell für die Regulation von Hunger- und Durstgefühl. Astrozyten des Nucleus arcuatus reagieren auf die Hormone Leptin, Ghrelin und Insulin und beeinflussen die neuronale Aktivität, regulieren die Glukoseaufnahme über die Blut-Hirn-Schranke und modulieren den Nahrungsverbrauch.^{90,98,99} Astrozyten benachbarter hypothalamischer Nuclei reagieren hingegen nicht auf diese Hormone.

Der Kaliumkanal Kir4.1 ist vorwiegend in Astrozyten der Cortexschichten II, III und IV angereichert, wohingegen Aquaporin 4, GFAP und Cx43 in Schicht I vorkommt.¹⁰⁰ Die Connexine 30 und 43 weisen eine heterogene Expression auf. Cx43 wird besonders in Astrozyten des Hippocampus exprimiert, wohingegen die Expression von Cx30 in Astrozyten des Thalamus und Cerebellum hoch und im Cortex und Hippocampus gering ist.¹⁰¹ Die Expression von Cx43 beginnt pränatal, von Cx30 zwei Wochen postnatal und steigert sich bis zum Erwachsenenalter.¹⁰² Die Unterschiede in der Expression lassen annehmen,

dass die astrozytäre Kapazität für die Kaliumaufnahme, die metabolische Unterstützung von Neuronen und die Aufrechterhaltung eines lokalen neuronalen Netzwerks nicht einheitlich ist. Der Kaliumkanal Kir4.1 wird in Astrozyten des Hippocampus stärker exprimiert als in Astrozyten des Cerebellums.¹⁰³ Der Glutamat-Transporter GLT-1 wird verstärkt von Astrozyten des Hippocampus und Cortex exprimiert, während der Transporter GLAST eher in Astrozyten des Cerebellums angereichert ist.¹⁰⁴ Auch die GABA Transporter (GAT) GAT-1 und GAT-3 zeigen bestimmte zelluläre und subzelluläre Verteilungen im Gehirn. GAT-3 ist der am häufigsten vorkommende GAT in Astrozyten und ist in den Fortsätzen lokalisiert, die an Synapsen und Zellkörper angrenzen, aber auch in denen, die in der Nähe von basalen und apikalen Dendriten liegen.¹⁰⁵ GAT-1 ist eher in den fein verzweigten astrozytären Fortsätzen und reichlich in Neuronen lokalisiert.¹⁰⁶ Auch Entwicklungssignale wie *Sonic hedgehog* regulieren die astrozytäre Diversität. Dabei wird *Sonic hedgehog* im adulten Gehirn von Neuronen exprimiert während Astrozyten Rezeptoren exprimieren um auf das Signal reagieren zu können.¹⁰⁷ Die Bergmann-Glia benötigt ein persistentes *Sonic hedgehog*-Signal von den Purkinjezellen um ihr Genexpressionsprofil aufrechtzuerhalten.⁹³ Im Hippocampus reguliert *Sonic hedgehog* hingegen die astrozytäre Expression von Kir4.1.¹⁰⁸ Weitere Studien haben gezeigt, dass Glykogen überwiegend in astrozytären Fortsätzen lokalisiert ist. Dabei können die höchsten Glykogenwerte im Hippocampus und der Kleinhirnrinde und die niedrigsten im Corpus callosum und im Thalamus verzeichnet werden.⁴⁵

Auch bei verschiedenen Erkrankungen werden Astrozyten auf molekularer Ebene unterschiedlich reguliert. Bei Epilepsie werden die Kanäle wie Kir4.1 und Aquaporin-4 und auch Transporter wie GLT1 signifikant herunterreguliert.¹⁰⁹ Bei Chorea Huntington sind die GABAerge Neuronen des Striatums degeneriert. Bei den Astrozyten des Striatums werden die Kaliumkanäle Kir4.1 herunterreguliert, was zu einem extrazellulären Kaliumanstieg führt.¹¹⁰ Beim Morbus Parkinson setzen Astrozyten im pathologischen Bereich entzündungsfördernde Moleküle frei, welche die dopaminerge Neurodegeneration eventuell verschlimmern könnten.¹¹¹

Zusammenfassend wird deutlich, dass Astrozyten eine bemerkenswert heterogene Population von Zellen darstellen. Durch die unterschiedlichen

funktionellen Eigenschaften können Astrozyten die neuronale Übertragung beeinflussen. Diese Heterogenität spiegelt sich in fast allen Astrozyten unterschiedlicher Hirnregion aber auch innerhalb einer wider. Dabei gibt es neben den ausgeprägten Unterscheidungen auch Hinweise auf kontext- und regionenspezifische Anpassungen der Astrozytenfunktionen. Wenn das Wissen um die Heterogenität der Astrozyten vollends geklärt wäre, könnten grundlegende Eigenschaften des ZNS besser verstanden und die Funktion des Gehirns nach Verletzung oder Krankheit verbessert werden.

1.1.4 Verwendete astrozytäre Marker

Das *Glial fibrillary acidic protein* (GFAP) ist ein Typ-III-Intermediärfilament, welches eine Molekülmasse von etwa 50 kDa und einen Durchmesser von 8-12 nm hat.¹¹² Es gilt als klassischer Biomarker für Astrozyten.¹¹³ GFAP wird vermehrt in der weißen Substanz exprimiert, selten von Astrozyten des Cortex aber immer von der Bergmann-Glia des Cerebellums.⁷

Astrozyten exprimieren auch das Enzym Glutamin Synthetase (GS), welches Glutamat durch Amidierung in die nicht-neuroaktive Aminosäure Glutamin umwandeln kann. Glutamin wird anschließend durch die Astrozyten freigesetzt und kann durch glutamaterge Neuronen aufgenommen werden.¹¹⁴ Es sind dichte Populationen von GS⁺ gefärbten Astrozyten in allen diencephalischen und mesencephalischen Regionen zu finden, welche bekanntermaßen eine schwache GFAP⁺ Markierung zeigen.¹¹⁵ Dies legt die Vermutung nah, dass alle Astrozyten zwar GS enthalten, aber die GFAP⁺ Filamente nur in einem regionenabhängigen Muster vorliegen.

Ein weiterer astrozytärer Marker, der in dieser Arbeit verwendet wurde, gehört zur Familie der Aldehyd Dehydrogenase 1 Mitglied L1 (Aldh1L1), welches auch als 10-formyltetrahydrofolat Dehydrogenase (FDH) bekannt ist.¹¹⁶ Das Protein zeigt sich auch in Astrozyten von erwachsenen Ratten.¹¹⁷ Aldh1L1 ist ein hochspezifischer Marker mit einem beträchtlich breiteren Muster an astrozytärer Expression, als das traditionell für die Markierung von Astrozyten verwendete GFAP.¹⁰⁷ In erster Linie markiert Aldh1L1 den Zellkörper und die fein verzweigten Fortsätze, GFAP hingegen die dicken Hauptfortsätze.

Weiterhin wurde mit dem Transkriptionsfaktor Sox9 gefärbt. Die Sox-Genfamilie besteht aus mehr als zwei Dutzend Genen, die sich in 9 Untergruppen einteilen

lassen. Diese Unterteilung beruht auf dem Vorhandensein verschiedener struktureller Domänen (HMG).¹¹⁸ Sox9 gehört zusammen mit Sox8 und Sox10 zur Untergruppe SoxE.¹¹⁹ Dabei kann Sox9 eine Gesamtlänge von 300-500 Aminosäuren mit HMG-Domänen in der Nähe des N-Terminus und einer Aktivierungsdomäne in der C-terminalen Region aufweisen.¹¹⁸

1.1.5 Astrozyten-assoziierte Pathologien

Eine astrozytäre Erkrankung stellt der Morbus Alexander dar, welcher durch eine dominante Mutation des GFAP-Gens hervorgerufen wird.¹²⁰ Er manifestiert sich als Leukodystrophie mit Neurodegeneration und Myelinveränderungen im Gehirn und Rückenmark. Klinisch werden eine infantile, neonatal juvenile und adulte Form unterschieden. Das zytotoxische Hirnödem, welches auch als präorbider zellulärer Prozess bekannt ist, ist vorwiegend astrozytärer Genese. Es kommt zu einer Zellschwemmung, wobei extrazelluläres Natrium und andere Kationen in Astrozyten angehäuft werden, da die energieabhängigen Mechanismen der Extrusion nicht funktionieren.¹²¹ Ein weiteres Krankheitsbild stellt die Astrogliose dar. Diese tritt als Reaktion auf Infarkte, Tumore und neurodegenerative Prozesse auf.¹²² Die Erkrankung äußert sich durch Hypertrophie und einer verstärkten GFAP-Synthese.¹²³ Die Astrogliose isoliert dabei das geschädigte Gebiet und beschleunigt ein *Remodelling* an dessen Rand.¹²² Auch Gliome, wie das Astrozytom, können gebildet werden. Der Grad der Bösartigkeit wird nach Entnahme einer Gewebeprobe anhand feststehender Kriterien mikroskopisch bestimmt. Auch Epilepsien entstehen durch Beteiligung der Astrozyten. Bei der Epilepsie setzt spontan eine synchrone, langsame Depolarisation von Neuronen ein. Diese Aktivität geht aus glutamatinduzierten, großen postsynaptischen Potentialen hervor. Dabei trägt die Exozytose von Glutamat aus Astrozyten entscheidend zu der neuronalen Funktionsstörung bei.¹²⁴

1.2 Rab6A

1.2.1 Definition und Morphologie

Die Rab-Proteine gehören zur Superfamilie der monomeren Ras-GTPasen und haben ein Molekulargewicht von 20-40 kDa. Es wurden circa 60 Rab-Proteine im menschlichen Genom identifiziert. Aufgrund ihrer strukturellen Beziehungen und hohen Sequenzidentitäten von 80-95% werden sie zu Subfamilien zusammengefasst.¹²⁵ Einer dieser Subfamilien bildet die Rab6-Familie,¹²⁶ die sich in die Subtypen Rab6A und Rab6B unterteilen. Die menschlichen Gene für Rab6A und Rab6B sind auf den Chromosomen 11 und 3 kodiert.¹²⁷ Rab6A erzeugt zwei alternativ gespleißte Varianten, Rab6A und Rab6A',¹²⁸ welche ubiquitär exprimiert werden.¹²⁹ Der funktionelle Unterschied zwischen den beiden Isoformen beruht auf den Aminosäuren Threonin oder Alanin an der 87. Position.¹²⁸ Rab6B wird in Mikroglia, Perizyten und Purkinje-Zellen exprimiert und ist an der zytosolischen Membranseite vom Golgi-Apparat und ER lokalisiert. Es hat eine 91% Übereinstimmung mit Rab6A, wobei die Hauptunterschiede in den Aminosäuren liegen, die in der hypervariablen Region am C-terminalen Ende lokalisiert sind.¹²⁵ Außerdem wurde Rab6C, als eine weitere Isoform des Rab6A, als neue cDNA aus einer humanen fetalen Nierenbibliothek mit einem methylierten DNA-Fragment entdeckt. Dieses Rab6C zeigt eine 97% Übereinstimmung mit dem Rab6A', besitzt aber im Unterschied dazu eine Verlängerung um 46 Aminosäuren am C-terminalen Ende. Es wird im menschlichen Gehirn, den Hoden, der Prostata und der Brust transkribiert ist im Vergleich zu Rab6A' aber seltener anzutreffen und weniger stabil.¹²⁷

Wie alle G-Proteine teilen sich Rab-Proteine eine strukturelle homologe GTP-bindenden Domäne, die es ihnen ermöglicht als molekulare Schalter zwischen einer GTP-gebundenen aktiven Konformation und einer GDP-gebundenen inaktiven Konformation zu wechseln. Ein Guanin-Austauschfaktor (GEF) katalysiert dabei den Übergang vom GDP- zum GTP-gebundenen Zustand.¹³⁰ In Hefe wird GEF durch einen Komplex zwischen den zwei Proteinen, Ric1p und Rg1p reguliert. Ein ähnlicher GEF ist noch nicht für das Rab6 in Säugetieren bekannt.¹³¹

Neben dem GEF gibt es zwei weitere Regionen in den GTPasen, die eine gut geordnete, hydrophobe Schnittstelle formen, die als Switch I und II bezeichnet

werden, an welche Effektorproteine binden können. Analysen haben gezeigt, dass das gereinigte rekombinante Rab6 in mehr als 90% der Fälle in der GTP-gebundenen Form vorliegt. Dies legt nahe, dass die intrinsische Aktivität der Hydrolyse ungewöhnlich niedrig ist, da die meisten Rab-GTPasen in GDP-gebundener Form vorliegen, wenn sie rekombinant exprimiert werden.¹³⁰

1.2.2 Funktionen im intrazellulären Membrantransport

Mitglieder der Rab6-Familie sind im trans-Golgi Netzwerk (TGN), den Zisternen des Golgi-Apparates und in den wandernden tubulovesikulären Organellen, die sich entlang der Mikrotubuli in Richtung plus-Ende bewegen lokalisiert.¹³² Dabei regulieren sie den Transportweg zwischen dem Golgi-Apparat, dem ER, der Plasmamembran und den Endosomen. Eine gute Übersicht über die Funktionen der Rab6-Familie im intrazellulären Membrantransport liefern dabei Goud und Akhmanova¹²⁹. Rab6 spielt eine Rolle im retrograden Transport von Endosomen zum Golgi-Apparat. Das Andocken der von den Endosomen stammenden Vesikel an die TGN-Membran wird durch den menschlichen GARP-Komplex als Effektorprotein reguliert. Dieser interagiert spezifisch und direkt mit den auf dem TGN lokalisierten t-SNAREs wie Syntaxin 6, Syntaxin 16 und Vit1a und den endosomalen v-SNAREs wie VAMP3/Cellubrevin.^{133,134} Neben dem GARP-Komplex sind auch die beiden Effektorproteine TMF/ARA160 und Rab6IP1A/B am Binden der von den Endosomen stammenden Vesikel an die TGN-Membran beteiligt. Dabei bindet TMF/ARA160 ausschließlich an die drei Isoformen des Rab6. Rab6IP1A/B, ein langes zytosolisches Protein, welches an den Golgi-Membranen durch Rab6 bindet,¹²⁹ bindet auch an Rab11, welches auf den Membranen von endosomalen-recycling Kompartimenten vorkommt. Rab6 spielt außerdem eine Rolle bei der Wiederverwertung von Markern wie TGN38/46 und verschiedenen Rezeptoren wie Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren, γ -Adaptin und Transferrin-Rezeptoren.¹²⁹

Rab6 ist auf den Golgi-Membranen lokalisiert, wo es mit verschiedenen Golgines in Interaktion tritt. Es handelt sich um lange *coiled-coil* Proteine, welche eine verlängerte, stäbchenähnliche Konformation einnehmen können. Deren Aufgabe ist es die Struktur der Golgi-Stapel zu erhalten, sich am Vesikeltransport innerhalb des Golgi-Apparats zu beteiligen und als Gerüst für andere Golgi-assoziierte Proteine zu dienen.¹³⁵ Beispiele für solche Golgine im Säugetier ist

Golgin-97¹³⁶ und Giantin¹³⁷. Es wurde jedoch gezeigt, dass Golgine mehrere Rab-Bindungsstellen aufweisen, sodass Rab6 nicht wichtiger als andere Golgi-Rab-Proteine ist. Das könnte erklären, wieso Rab6 nicht essentiell für die Aufrechterhaltung der Golgi-Strukturen ist.¹²⁹

Auch der Vesikeltransport vom Golgi-Apparat zum ER wird durch Rab6 vermittelt. Rab6A aber nicht Rab6A' spielt eine bedeutende Rolle für COPI unabhängiges Recycling, was Golgi-Proteine und bestimmte Toxine über eine direkte Route vom Golgi-Apparat zum ER transportiert.¹³⁸ Die Rab6-Effektorproteine in diesem Transportweg sind zum einen Bicaudal D1/2 und zum anderen der Dynein/Dynactin Komplex.¹³⁸

Auch beim Vesikeltransport vom Golgi-Apparat zur Plasmamembran spielt Rab6 eine Rolle. Eine Verminderung von Rab6A und Rab6A' verzögert aber blockiert nicht die konstitutive Sekretion.¹²⁹ Daran beteiligt ist Bicaudal D1/2, welches durch sein C-terminales Ende an Rab6 und durch seine zentrale Domäne schwach an Kinesin-1 (KIF5B) bindet. KIF5B ist einer der Hauptmotoren, der für den Rab6-Vesikeltransport verantwortlich ist.¹³⁹ Auch der Dynein-Dynactin-Komplex ist mit den Rab6⁺ Vesikeln assoziiert. Dabei bindet es direkt durch die Untereinheit des Dynactin, dem p150^{Glued} und indirekt über den N-terminalen Bereich von BICD1/2 an Rab6.¹⁴⁰ Säugetiere codieren des Weiteren ein Homolog des BICD1/2, das BICDR-1, ein weiteres Rab6-Effektorprotein, welches auch mit dem Dynein-Dynactin-Komplex interagiert. Dabei interagiert es nicht mit Kinesin-1, sondern mit Kinesin-3 (KIF1C). Durch die Überwiegung der Motilität am Minus-Ende der Mikrotubuli sorgt es dafür, dass die Rab6⁺ Vesikel nicht in der Zellperipherie, sondern um die Centrosome akkumulieren.¹²⁹ Die Fusion der Rab6⁺ Vesikel mit der Plasmamembran wird durch das Rab6-Effektorprotein ELKS kontrolliert.¹²⁹ Die kortikalen Stellen von kultivierten Fibroblasten, wo ELKS vorkommt, sind wichtig für die Stabilisierung der Mikrotubuli und für die Befestigung an die Plasmamembran.¹⁴¹ Dennoch ist ELKS nicht essentiell für die Exozytose von Rab6⁺ Vesikeln unterstützt sie aber.¹³² Myosin IIA, ein weiteres Rab6-Effektorprotein, kann durch Rab6 auf die Membranen des Golgi-Apparats und TGN rekrutiert werden und dessen Hemmung beeinträchtigt die Abknospung von Rab6⁺ Vesikeln aus den Golgi- und TGN-Membranen, sowie den antero- und retrograden Transport der Vesikel.¹⁴²

1.3 Fragestellung

Durch immunzytochemische Untersuchungen konnte Keil¹⁴³ erstmalig die Anwesenheit von Rab6 in kultivierten Astrozyten belegen und durch Assoziationsanalysen das TGN, bestehend aus Zisternen und Vesikeln, darstellen und mit anti-Rab6 identifizieren.¹⁴³

Rab6 mit seinen Subtypen A und B gehört der Superfamilie der monomeren Ras-GTPasen an, die den intrazellulären Membran- und Vesikelverkehr regulieren.¹²⁹

Rab6 spielt in HeLa-Zellen beim Transport vesikulärer Organellen vom TGN zur Zellmembran eine wichtige Rolle.¹³² Assoziationsanalysen von Rab6A mit vesikulären Glutamattransportern, Serinracemase und Markern der regulierten Exozytose in kultivierten Astrozyten¹⁴³ deuten darauf hin, dass dieses Rab6A-Organellsystem die ultrastrukturelle Grundlage für die Freisetzung von Gliotransmittern wie D-Serin und Glutamat bildet.

Da Astrozyten *in vivo* in einem komplexen Gewebe mit zahlreichen Zelltypen und Strukturen liegen, können kultivierte Astrozyten ein verändertes Expressionsmuster aufweisen.¹⁴⁴ Gemutmaßt wird außerdem, dass primär kultivierte Astrozyten einen reaktiven Phänotyp oder eine nicht ausgereifte Zelllinie darstellen.¹⁰⁷

Zur Untersuchung, ob Rab6A tatsächlich ein System der Glia-Neuron-Kommunikation im Gehirn darstellt, muss zunächst das Vorkommen von Rab6A *in situ* untersucht werden. Durch immunzytochemische Untersuchungen wird die Kolokalisation von Rab6A mit den etablierten astrozytären Markern GS, GFAP, Aldh1L1 und Sox9 verblindet untersucht.

Anschließend stellt sich die Frage, ob Rab6A in anderen Gliazelltypen lokalisiert ist, weshalb weitere Assoziationsanalysen mit gängigen Markern für Mikroglia (Iba1), Oligodendrozyten (CNPase) und NG2-Zellen (NG2) durchgeführt werden. Weiterhin sollen die Rab6A⁺ Strukturen in Größe und subzellulärem Verteilungsmuster untersucht werden, um eine zellbiologische Interpretation zu ermöglichen. Um die prinzipielle Übertragbarkeit der gewonnenen Ergebnisse auf den Menschen zu überprüfen, werden im Rahmen von Epilepsie-Chirurgie reseziertes Cortex-Gewebe von drei Patienten unterschiedlicher pathologischer Genese untersucht.

Zur weiteren Untersuchung der möglichen Bedeutung von Rab6A in neurophysiologischen Prozessen wird die Hochfrequenzstimulation (HFS), ein etabliertes LTP-Modell verwendet. Es soll untersucht werden, ob es durch die HFS zu einer strukturellen, intrazellulären Veränderung der Astrozyten kommt und diese Änderung Einfluss auf Rab6A ausübt.

Zur abschließenden Bestätigung der immunzytochemischen Untersuchungen werden publizierte Transkriptomanalysen herangezogen, um die mRNA-Expression von Rab6A in Astrozyten zu überprüfen.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

Die verwendeten Puffer, Reagenzien, Antikörper, Normalseren und Fluoreszenzfarbstoffe werden in den folgenden Tabellen systematisch und in alphabetischer Ordnung aufgelistet.

Tabelle 1 - Puffer und andere Reagenzien

Eindeckmedium (Aqua Poly Mount, Polysciences Inc.)
Natriumborohydrid (NaBH ₄ ; 1% in Phosphatpuffer)
Paraformaldehyd 4% (PFA)
Phosphatpuffer 0,1Molar (PB)

Tabelle 2 - Primärantikörper

Name	Wirtsspezies	Hersteller (Katalog-Nr.)	Konzentration
Anti-Aldh1L1	Kaninchen	Sigma (HPA036900)	1:200
Anti-CNPase	Kaninchen	Sigma (C5922)	1:500
Anti-GFAP	Huhn	Chemicon, Millipore (AB5541)	1:500
Anti-GFAP Al488	Maus	Cell Signalling (3655)	1:100
Anti-GS	Ziege	Santa Cruz (sc-6640)	1:500
Anti-Iba1	Ziege	Abcam (AB5076)	1:1000
Anti-NG2	Kaninchen	Merck/Millipore (AB 5320)	1:500
Anti-Rab6A	Maus	Sigma	1:5000
Anti-Sox9	Ziege	R&D Systems (AF3075)	1:500

Tabelle 3 - Sekundärantikörper

Spezifität	Herkunft	Konzentration
Esel-anti-Huhn-AMCA	Jackson Immunoresearch	1:100
Esel-anti-Kaninchen-Alexa 488	Jackson Immunoresearch	1:100
Esel-anti-Maus-Alexa 488	Jackson Immunoresearch	1:100
Esel-anti-Maus-Alexa 647	Jackson Immunoresearch	1:100
Esel-anti-Maus-Cy3	Jackson Immunoresearch	1:1000
Esel-anti-Ziege-Dy 488	Jackson Immunoresearch	1:100
Pferd-anti-Kaninchen-Biotin	Vector Laboratories	1:217
Pferd-anti-Maus-Biotin	Vector Laboratories	1:217
Pferd-anti-Ziege-Biotin	Vector Laboratories	1:217

Tabelle 4 - Normalseren und Fluoreszenzfarbstoffe

Substanz	Hersteller	Konzentration
Bisbenzimidin	Sigma	1:2000
Mouse-Ig-Blocking Reagent (M.O.M.) Laboratories	Vector Laboratories	3%
Normales Pferdeserum (NHS)	Vector Laboratories	1%, 10%
Streptavidin-AI488	Vector Laboratories	1:100
Streptavidin-Cy3	Vector Laboratories	1:1000

2.2 Tiere, Perfusion und Fixierung

Für die Untersuchungen wurden 3 adulte, männliche 8-13 Wochen alte Sprague Dawley Ratten und 5 adulte Mäuse verwendet. Die Organentnahme entsprach dabei den Vorgaben des Tierversuchsgesetzes. Die Tiere wurden mit einer Überdosis Isofluran getötet und mithilfe einer Präparierschere eine Thorakotomie durchgeführt. Nach kurzzeitiger Spülung mit physiologischer Kochsalzlösung wurden die Tiere mit 4% PFA in 0,1M autoklavierten PB durch die Aorta ascendens perfusionsfixiert. Die Nadel wurde für 15 Minuten *in situ* gehalten. Nach Perfusion wurde das Gehirn entnommen. Das Gewebe wurde nachfixiert, sodass eine Fixationsdauer von insgesamt zwei Stunden erreicht wurde. Nach

Abschluss der Fixierung wurden die Gehirne dreimal innerhalb von 20 Minuten in PB gespült.

2.2.1 Kryostatschnitte

Von zwei adulten C57BL/6 Mäusen unbestimmten Geschlechts wurden 12-14 µm dicke Kryostatschnitte angefertigt. Zur Beantwortung der einzelnen Fragestellungen wurden zunächst Vorversuche an den Kryostatschnitten durchgeführt. Nach Etablierung der Einfach-, Doppel- und Dreifachfärbungen an Kryostatschnitten wurden sie an Vibratomschnitten angewendet. Nur die Untersuchung an NG2-Zellen wurde an Kryostatschnitten durchgeführt, was weiter unten diskutiert wird (siehe 4.2.6).

2.2.2 Vibratomschnitte

Die Hauptversuche wurden an drei 10-12 Wochen alten C57BL/6-Mäusen unbestimmten Geschlechts durchgeführt (Zucht und Lieferung durch Firma Janvier, Frankreich). Das Gewebe der drei Tiere wurde vor Herstellung der Vibratomschnitte markiert, sodass diese in den einzelnen Versuchsreihen den einzelnen Tieren zugeordnet werden konnten. Es wurden 100-µm dicke Vibratomschnitte hergestellt, welche in PB im Dunkeln bei 4°C gelagert wurden.

2.2.3 Hochfrequenzstimulation

Die Ratten wurden in einem stereotaktischen Apparat mechanisch fixiert (Kopf instruments, Tujunga, CA, USA). Die rektale Temperatur lag bei 37.0 ± 0.5 °C. Die chirurgischen Eingriffe wurden unter einer tiefen Urethananästhesie durchgeführt (1,25g/Kg Körpergewicht, 250 mg Urethan/ml 0,9%ige Kochsalzlösung) im Einklang mit dem deutschen Gesetz über die Verwendung von Versuchstieren. Zwei kleine Löcher mit einem Durchmesser von 1,5-2,0 mm wurden in die Schädel gebohrt. Eine bipolare Edelstahlelektrode (NE-200, Rhodes Medical, Woodland Hills, CA, USA) wurde in den Tractus perforans eingebracht (Koordinaten von Lambda: L:4,5mm, AP: +0,5 mm, V: -3,5 mm). Die Glas-Mikroelektroden mit einem Außendurchmesser von 1,5 mm wurden auf einer mit 0,9% Kochsalzlösung gefüllten Zeitz Elektrode (München, Germany) gezogen und in das dorsale Blatt der Körnerzellschicht eingebracht (Koordinate von Bregma: L: 2,9 mm, AP: -3,5 mm, V: -3,5 mm). Die HFS wurde für zwei

Stunden durchgeführt. Ein Durchlauf bestand aus acht 400 Hz-Stimuli (500 μ A, 0,1 ms Impulsdauer) im Abstand von zehn Sekunden. Dabei wurde nur eine Hemisphäre stimuliert. Um die LTP-Induktion zu verifizieren, wurde nach der Stimulation zehn Minuten abgeleitet. Danach wurden die Tiere in tiefer Narkose sofort perfundiert und Vibratomschnitte angefertigt.¹⁴⁵ Diese Versuche wurden von Jungenitz et al.¹⁴⁵ wie beschrieben durchgeführt. Drei Vibratomschnitte von Doppelhemisphären (1x50 μ m, 2x100 μ m Dicke), von insgesamt n=3 Versuchstieren wurden von T. Jungenitz und PD Dr. S. Schwarzacher, Institut für Anatomie I - Klinische Neuroanatomie, Dr. Senckenbergische Anatomie der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main, freundlicherweise für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

2.3 Humanes Gewebe

2.3.1 Ethische Standards

Die Untersuchungen wurden in Übereinstimmung mit den ethischen Standards der Deklaration von Helsinki von 1964 durchgeführt. Eine schriftliche Einverständniserklärung wurde von jedem Patienten vor der Operation ausgefüllt. Für die in dieser Dissertation durchgeführten Untersuchungen am humanen Gewebe wurde ein Ethikvotum bei der Ethikkommission des Fachbereichs Medizin der Goethe-Universität Frankfurt am Main eingereicht und von dieser als ausreichend angesehen; es bezieht sich auf die Kooperation mit und das Projekt von PD Dr. Th. Freiman (Zentrum der Neurologie und Neurochirurgie) (Geschäftsnr. 4/09; Projekt-Nr. SNO-09-2014).

2.3.2 Chirurgische Proben

Die präoperative Diagnostik wurde im Zentrum der Neurologie und Neurochirurgie am Universitätsklinikum Frankfurt am Main durchgeführt. Im Hinblick auf die hier durchgeführten Untersuchungen wurden keine Patientenauswahlkriterien angewendet. Das Ziel bei dem zu erhaltenden OP-Material lag für die hier durchgeführten Untersuchungen darin, unverändertes Gewebe zu erhalten. Mit diesem unveränderten Gewebe wurde die Fragestellung nach der möglichen Übertragbarkeit der Befunde aus der Maus auf den Menschen beantwortet. Zur Beantwortung der Fragestellung, ob sich die Befunde

zwischen unverändertem und verändertem Gewebe unterscheiden, wurde zusätzlich neuropathologisches Gewebe verwendet. Operateur war PD. Dr. Th. Freiman. Das Gewebe zur neuropathologischen Beurteilung wurde weiter zentral im diagnostizierten Fokus entnommen und im Institut für Neuropathologie der Universitätsklinik bearbeitet und diagnostiziert. Das hier untersuchte Gewebe stellt peripheres Resektatgewebe oder Zugangsgewebe dar. Es wurden Untersuchungen am temporalen und frontalen Cortex von drei Patienten (männlich, n=3) durchgeführt (Tabelle 5). Patient I weist eine fokale kortikale Dysplasie (Palmini II, ILAE Typ IIa) im temporalen Cortex und der Amygdala sowie eine Hippocampussklerose (ILAE Typ III) auf. Patient II hat eine fokale kortikale Dysplasie im rechten frontalen Cortex (ILAE Typ IIb). Patient III weist ein Gangliogliom des WHO Grades I mit Infiltration des Hippocampus, wobei der Sklerosegrad nicht beurteilbar ist, auf. Hier wurde durch den Cortex ein Zugang zum Gangliogliom geschaffen. Bei einer fokalen kortikalen Dysplasie verursacht eine umschriebene Fehlentwicklung der Großhirnrinde epileptische Anfälle. Diese lassen sich häufig nicht mit Medikamenten oder anderen nicht-invasiven Methoden beseitigen. Bei einem neurochirurgischen Eingriff wird der anfallauslösende Bereich der Großhirnrinde entfernt, sodass die Patienten nach der Operation anfallsfrei werden können. Indikation der Operation von Patient I und II war somit eine Anfallsfreiheit der pharmakoresistenten Epilepsie zu schaffen. Bei einem Gangliogliom handelt es sich um einen Hirntumor, der von Zellen des Gliagewebes abstammt. Diese Tumore sollten nach Möglichkeit komplett reseziert werden. Bei Tumoren des Grads I ist dies eine ausreichende Therapie. Bei höhergradigen Gangliogliomen folgt zumeist eine Radiatio bzw. Chemotherapie.

Tabelle 5 - Patienteninformation

Patient	Alter	Geschlecht	pathologische Diagnose	untersuchtes Resektatgewebe
I	31	M	fokale kortikale Dysplasie (Palmini II, ILAE IIa) temporaler Cortex und Amygdala, Hippocampussklerose (ILAE III)	temporaler Cortex
II	15	M	fokale kortikale Dysplasie (ILAE IIb) frontaler rechter Cortex	frontaler Cortex
III	20	M	Gangliogliom WHO Grad I mit Infiltration des Hippocampus, Sklerosegrad nicht beurteilbar	Zugangscortex

M = männlich

2.3.3 Gewebetransport, Vorbereitung und Fixierung

Unmittelbar nach chirurgischer Resektion wurden die kortikalen Gewebeblöcke in 4% PFA in 0,1M PB gelagert und aus dem Operationsraum zum Labor transportiert. Im Labor wurden die Gewebeblöcke je nach Größe der Vibratomblocke zurechtgeschnitten und nach Wechsel des PFA circa 16 Stunden nachfixiert. Es wurden 100µm-dicke Vibratomschnitte angefertigt und diese bis zur Untersuchung in PB im Dunkeln bei 4°C gelagert.

2.4 Immunzytochemie

2.4.1 Standardrezept

Die immunzytochemischen Färbungen erfolgten nach standardisiertem Ablauf. Das Gewebe wurde für 30 Minuten mit 1% NaBH₄ bei Raumtemperatur vorbehandelt. Dann wurden die Schnitte für je 20 Minuten dreimal in einem großen Volumen PB gespült. Es folgte eine einstündige Inkubation mit einem M.O.M.-Agens bei Raumtemperatur, um Interaktionen zwischen dem Maus-

spezifischem Sekundärantikörper und dem endogenen Immunglobulin-G zu verhindern. Nach fünfminütiger Spülzeit erfolgte eine dreißigminütige Präinkubation mit dem Normalserum der Spezies des Sekundärantikörpers bei Raumtemperatur. Dieser Schritt reduziert die unspezifische Bindung des Primärantikörpers. Nach wiederholtem fünfminütigem Spülen in PB fand die Inkubation des Primärantikörpers nach oben aufgelisteter Verdünnung mit 1% NHS bei 4°C über Nacht statt. Am nächsten Tag wurden die Schnitte für 20 Minuten mit dreimaligem Pufferwechsel nach 5, 10 und 15 Minuten in PB gespült. Danach erfolgte die einstündige Inkubation des Sekundärantikörpers nach oben genannter Verdünnung bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss. Dieser war entweder direkt fluorochrom-konjugiert oder biotinyliert. Wenn ein biotinylierter Sekundärantikörper verwendet wurde, erfolgte nach einem erneuten 20 Minuten dauerndem Spülvorgang mit dreimaligem Pufferwechsel die einstündige Inkubation mit dem fluorochrom-konjugierten Streptavidin. Dies geschah erneut unter Lichtausschluss und bei Raumtemperatur. Zum Schluss wurden die Hirnschnitte für 10 Minuten in PB gespült und in Fluoreszenz-Eindeckmedium eingedeckt.

2.4.2 Humanes Gewebe

Zunächst erfolgte die dreißigminütige Präinkubation mit dem Normalserum der Spezies des Sekundärantikörpers bei Raumtemperatur. Nach fünfminütigem spülen in PB fand die Inkubation des Primärantikörpers nach oben genannter Verdünnung mit 1% NHS bei 4°C über Nacht statt. Am darauffolgenden Tag wurden die Schnitte für 20 Minuten mit dreimaligem Pufferwechsel nach 5, 10 und 15 Minuten in PB gespült. Danach erfolgte die einstündige Inkubation des Sekundärantikörpers nach oben aufgeführter Verdünnung bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss. Dabei handelte es sich um einen direkt fluorochrom-konjugierten Sekundärantikörper. Nach einem weiteren Spülvorgang von 10 Minuten in PB wurde das Gewebe mit dem direkt flurochrom-konjugierten Antikörper GFAP-AI488 über Nacht bei 4°C behandelt. Am nächsten Tag wurde das Gewebe für 10 Minuten in PB gespült und in Fluoreszenz-Eindeckmedium eingedeckt.

2.4.3 Kontrollen

Neben den im Kapitel 3 „Ergebnisse“ dargelegten Befunden und in den dazugehörigen Bildtafeln dargestellten Zellen wird in dieser Arbeit auch Bezug auf Kontrollfärbungen genommen. Diese weichen gewollt vom Standardprotokoll der jeweiligen Immunzytochemie ab, um fortlaufend Hintergrund, immunzytochemische Färbungen selbst und die optischen Filtersysteme zu überprüfen. Zum einen wurden Kontrollen vollständig ohne Immunreagenzien und Fluorochrome zur Erfassung von Autofluoreszenz und Hintergrund der Präparate angefertigt. Diese wurden im Vorhinein vermerkt und an dieser Stelle nicht weiter behandelt. Zum anderen wurden Kontrollfärbungen mit Normalseren, allen Fluorochromen und Sekundärantikörpern jedoch mit nur einem Primärantikörper angefertigt, um die korrekte Trennung der Farbkanäle (Ausschluss von *bleed-through*) sowie die Antikörperselektivität zu gewährleisten. Die Kontrollen wurden nur vereinzelt im Ergebnisteil dargestellt, da sie in erster Linie als Bestätigung einer einwandfreien Immunzytochemie dienen. Zusätzlich wurden alle durchgeführten Experimente mehrmalig wiederholt und sowohl die Kontroll- als auch Hauptpräparate komplett gesichtet und Aufnahmen repräsentativer Zellen angefertigt.

2.5 Fluoreszenzmikroskopie

2.5.1 Systemvoraussetzungen

Hardware

Die Aufnahmen der Präparate erfolgte am Foto-Fluoreszenzmikroskop Axioskop 2 mit der Halogenbeleuchtung HAL 100 der Firma Zeiss (Oberkochen, Deutschland). Zur Fotodokumentation diente die Spot Insight 4 Mega-Pixel B/W Kamera (Diagnostic Instruments, Sterling Heights, Michigan, USA), welche über einen CCD-Chip vom Typ KAI 4021 mit 2048 x 2048 quadratischen Bildpunkten von 7,45 µm Kantenlänge verfügt und monochrom eine Samplingtiefe von 14 Bit erreicht. Die eingesetzten Objektive waren 10x (Luft), 20x (Luft) 100x (numerische Apertur 1,3; Öl).

Software

Adobe Photoshop CS3 Extended

Für die Aufnahmen aus einem Experiment wurde mittels der Software Photoshop CS3 Extended, Version 10.0.1 von Adobe Systems Incorporated (San Jose, Kalifornien, USA) der *cut-off* im Histogramm, d.h. der Hintergrundschwelle („Tonwertkorrektur“) stets identisch eingestellt. Es wurden nur lineare Bildoperationen durchgeführt und auch nur auf das gesamte Bild, nicht selektive Bildausschnitte.

BiaS

Zur Überprüfung der Signifikanzen wurde das Statistikprogramm BiaS für Windows, Version 11 vom epsilon Verlag (Darmstadt, Hessen, Deutschland) verwendet.¹⁴⁶ Die Lizenz wurde dabei freundlicherweise von Herrn Dr. H. Ackermann, Institut für Biostatistik und mathematische Modellierung, Goethe-Universität Frankfurt am Main, zur Verfügung gestellt.

ImageJ

Da durch das Foto-Fluoreszenzmikroskop keine vollständig gleichmäßige Ausleuchtung der aufgenommenen Regionen gewährleistet werden konnte, wurden die Aufnahmen mit der Software ImageJ (NIH, Bethesda, Maryland, USA) bearbeitet. Dabei wurde ein *rolling ball* mit einem Radius von 500 Pixel verwendet um die unterschiedlichen Ausleuchtungen auszugleichen. Zur Präsentation wurden die Rohbilder bearbeitet und strukturiert.

Spot 5.0 Advanced

Die angefertigten Aufnahmen wurden mithilfe des Programms Spot 5.0 Advanced von SPOT Imaging Solutions (Diagnostic Instruments, Sterling Heights, Michigan, USA) übereinander gelagert und abgespeichert. Dabei wurden die einzelnen Farbkanäle zunächst getrennt aufgenommen und anschließend deckungsgleich (*Merge*) zusammengefügt.

Volocity Software

Ein allgemeines Problem bei der Kolokalisationsanalyse subzellulärer fluoreszenzmarkierter Strukturen stellt die optische Verzerrung durch die chromatische Aberration dar. Dieser Abbildungsfehler optischer Linsen ist die Folge der Dispersion des Linsenmaterials und resultiert in der Darstellung verschiedener Spektralfarben in inkongruenten Brennebenen. Dabei besitzt Licht kurzer Wellenlängen einen höheren Brechungsindex als langwelliges Licht und wird an der Linse stärker gebrochen. Daraus resultiert eine Verschiebung fluoreszierender Punkte entlang der z-Achse. Dadurch können kolokalisierende Strukturen fälschlich nicht als solche dargestellt werden. Um das Problem zu umgehen, wurde das optische System mittels α -Tubulin-Immunzytochemie mit Hilfe des Programms Volocity Software (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) kalibriert.¹⁴⁷

2.6 Bildanalyse, Befundung und quantitative Analyse

2.6.1 Zelluläre Kolokalisation

Die Aufnahmen wurden am Foto-Fluoreszenzmikroskop angefertigt, wobei die einzelnen Farbkanäle für die unterschiedlichen Spektren der eingesetzten Antikörper getrennt erfasst und unter Korrektur der chromatischen Aberration durch das Programm Spot 5.0 Advanced zusammengefügt wurden. Die Analyse der Bilddateien erfolgte mit der Software Photoshop CS3 Extended. Zunächst wurde in den Kontrollaufnahmen der einzelnen Experimente das Histogramm so festgelegt, dass die Autofluoreszenz des Hintergrundes und die unspezifischen Bindungen des Sekundärantikörpers einerseits und von der eigentlichen Bildinformation andererseits getrennt wurden. Die festgelegten Werte wurden für die weiteren Aufnahmen desselben Färbedurchgangs übernommen. Die quantitative Auswertung der Doppel- und Dreifachmarkierung wurde verblindet durchgeführt.

2.6.2 Verblindung

Bei den experimentellen Untersuchungen an Astrozyten der Maus wurden Dreifachmarkierungen mit den Antikörpern anti-GFAP, anti-GS und anti-Rab6A einerseits und anti-Aldh1L1, anti-GFAP und anti-Rab6A andererseits

durchgeführt. Außerdem wurden Doppelmarkierungen mit anti-Sox9 und anti-Rab6A durchgeführt. Die anderen Zelltypen wurden jeweils mit ihrem spezifischen Antikörper und anti-Rab6A doppelmarkiert. Am humanen Gewebe wurden die Astrozyten mit den Antikörpern anti-GFAP A1488 und anti-Rab6A doppelmarkiert. Nach Anfertigung der Aufnahmen wurden die Farbkanäle je nach Fragestellung in einer unterschiedlichen Reihenfolge betrachtet und ausgewertet. Zur Auswertung der Aufnahmen wurde die Software Photoshop CS3 Extended verwendet.

Zur Beantwortung der Frage ob Rab6A in GFAP⁺-Astrozyten lokalisiert ist wurden alle mit Ausnahme des Farbkanals, in welchem die GFAP⁺-Astrozyten aufgenommen wurden, in Photoshop unsichtbar gemacht. In den durchgeführten Experimenten an der Maus sind die GFAP⁺-Astrozyten immer im Blaukanal und im humanen Gewebe im Grünkanal dargestellt. Die GFAP⁺-Astrozyten, die „vollständig“ erscheinen (mit offensichtlichem Soma und Hauptfortsätzen im Schnitt) wurden auf einer transparenten Unterlage punktmakiert. In einem zweiten Schritt wurde der zu untersuchende Zielfarbkanal Rab6A, der bei den Untersuchungen an Astrozyten beider Spezies immer im Rotkanal dargestellt wurde, überlagert. Lediglich die punktmakierten Zellen wurden auf eine Koloalisierung der zellulären Antigene untersucht. Dieses Verfahren reduziert die Verzerrung für die Zellmorphologie und den Zelltyp. Die markierten GFAP⁺-Astrozyten konnten so als einfach oder doppelt markiert klassifiziert werden. Bei einer einfachen Markierung sind die GFAP⁺-Astrozyten Rab6A⁻ und bei einer Doppelmarkierung sind diese Rab6A⁺.

Um zu untersuchen, dass nicht nur eine Untergruppe der GFAP⁺-Astrozyten Rab6A⁺ ist, wurden die GFAP⁺/Rab6A⁺-Astrozyten im nächsten Schritt auf ihre Koloalisierung mit GS und Aldh1L1 überprüft. Dafür wurden die Kanäle, welche die markierten GFAP⁺/Rab6A⁺-Astrozyten darstellen weggedreht und der Grünkanal, der in dem einem Experiment GS und in dem anderem Experiment Aldh1L1 anzeigt, eingestellt. Nach Einstellung des *cut-offs* und Überlagerung mit den zuvor markierten GFAP⁺/Rab6A⁺-Astrozyten waren die untersuchten Astrozyten mit GS bzw. Aldh1L1 entweder doppelt oder dreifach markiert.

Da in der Literatur bekannt ist, dass GFAP nicht alle Astrozyten färbt wurde daraufhin die Lokalisation von Rab6A in GS⁺-Astrozyten überprüft. Dabei wurden

die Aufnahmen ein zweites Mal untersucht, wobei nun zuerst der Grünkanal, in welchem die GS⁺-Astrozyten gefärbt sind, eingestellt wurde. Nach Markierung der GS⁺-Astrozyten wurde der Rab6A-Farbkanal eingestellt und über den GS-Farbkanal gelegt und an den zuvor markierten Zellen die Kolokalisation ausgezählt. Nach Überlagerung der zwei Kanäle konnten dann die GS⁺-Astrozyten als Rab6A⁻ oder Rab6A⁺ klassifiziert werden.

Diese GS⁺/Rab6A⁺-Astrozyten wurden dann auf ihre Kolokalisation mit GFAP untersucht. Dabei wurden die GS⁺/Rab6A⁺-Astrozyten markiert und die Farbkanäle weggedreht und der Blaukanal mit den GFAP⁺-Astrozyten eingestellt. Nach Überlagerung dieser Strukturen waren die GS⁺/Rab6A⁺-Astrozyten doppelt oder dreifach markiert.

Da in der Literatur diskutiert wird, ob GS außer Astrozyten noch andere Zelltypen anfärbt, wurde zusätzlich die Lokalisation von Rab6A in den Aldh1L1⁺-Astrozyten untersucht. Dazu wurde identisch wie bei der Untersuchung von Rab6A in GS⁺-Astrozyten vorgegangen. Die Aldh1L1⁺/Rab6A⁺-Astrozyten wurden dann im gleichen Verfahren wie die GS⁺/Rab6A⁺-Astrozyten auf ihre Kolokalisation mit GFAP untersucht.

Auch die Lokalisation von Rab6A in Sox9⁺-Astrozyten der Maus, GFAP⁺-Astrozyten des humanen Gewebes und in anderen Gliazelltypen wie Mikroglia, Oligodendrozyten und NG2-Zellen der Maus wurde untersucht. Im dokumentierten Material wurden am Bildschirm die gut erkennbaren Zellen des jeweiligen Zelltyps identifiziert und markiert. Im nächsten Schritt wurde der Rab6A-Farbkanal eingestellt und über den Farbkanal gelegt, der die Zellen anzeigt und an den zuvor markierten Zellen die Kolokalisation ausgezählt.

Die markierten Zellen aller Untersuchungen wurden in Excel-Dateien notiert, Prozentzahlen ermittelt und eine quantitative Aussage über die Kolokalisation der untersuchten Antikörper getroffen.

2.6.3 Qualitative Auswertung der Rab6A⁺-Zellen

Die auf Rab6A zu untersuchenden Astrozyten wurden mit dem Kriterium fotografiert, möglichst „vollständige“ Zellen (mit offensichtlichem Soma und Hauptfortsätzen im Schnitt) zu zeigen, welche post hoc am Computer untersucht wurden. Dabei wurden 1774 tiff-Bilder mit einer 100x Vergrößerung aufgenommen. Es wurde untersucht ob und wie sich die Rab6A-IR zwischen

dem Zellkörper und den astrozytären Haupt- und Nebenfortsätzen unterscheidet. Die Unterschiede wurden tabellarisch festgehalten und davon ausgehend eine Klassifizierung in vier Typen vorgenommen. Untersuchte Regionen stellen Cortex, Corpus callosum, Hippocampus und Thalamus dar. Das Ergebnis wurde an 14.568 Astrozyten von drei verschiedenen Mäusen gewonnen.

2.6.4 Quantitative Auswertung der Rab6A⁺ Strukturen

Bei der quantitativen Auswertung zur Ermittlung der Flächen der Rab6A⁺ Strukturen wurden pro Typ zehn gut erkennbare GFAP⁺-Astrozyten ausgewählt und untersucht. Mit der Software Photoshop CS3 Extended wurde zunächst der Hintergrundschwellwert eingestellt. Mit dem Programm ImageJ wurde freihand eine *region of interest* (ROI) um den Rab6A⁺-Astrozyten mit seinen GFAP⁺- und GFAP⁻-Fortsätzen gezeichnet und ausgeschnitten. Die Befehlskette *Process* → *Find maxima* mit einer *Noise tolerance* von 25 und dem *output type* auf *maxima with tolerance* wurde eingestellt. Dieser Wert wurde manuell gewählt, da dabei die meisten Rab6A⁺ Puncta auch als einzelne Puncta und nicht als clusterförmige Ansammlung durch das Programm erkannt wurden. Somit konnte das Problem der Berührung oder auch der Verschmelzung der einzelnen Puncta umgangen werden. Anhand dieser Einstellungen wurde ein binäres Bild mit den markierten Maxima erstellt. Mit der Befehlskette *Analyze* → *Analyze Particles* wurde die Größe und Zirkularität bestimmt, mit welcher die Rab6A⁺ Puncta in die Auswertung aufgenommen werden sollten. Dabei lag die Größe in Pixelquadrat zwischen 9 und unendlich und die Zirkularität zwischen 0.00-0.90. Pro ROI wurde mit diesen Einstellungen Minimal-, Maximal- und Mittelwerte sowie die Standardabweichung der Flächen der Rab6A⁺ Puncta und die Anzahl der untersuchten Puncta ermittelt. Anschließend wurden die Flächen der vier Typen auf Signifikanz überprüft. Dafür wurde mit Hilfe des Statistikprogramms BiaS¹⁴⁶ der parameterfreie statistische Kruskal-Wallis-Test mit post-hoc-Test und anschließender Bonferroni-Holm-Korrektur verwendet. Auch die Signifikanz der Anzahl der Rab6A⁺ Puncta pro Typ wurde getestet. Dafür wurde die parametrische univariante Varianzanalyse (ANOVA) genutzt.

2.6.5 Untersuchung von Rab6A und GFAP in HFS-Schnitten

Pro Tier (n= 3 Ratten) wurde je ein Doppelhemisphären-Schnitt untersucht, wobei eine Hemisphäre stimuliert und eine nicht stimuliert wurde.¹⁴⁵ Die Hemisphären wurden verblindet und einzeln untersucht. Die Schnitte wurden doppelimmunggefärbt für GFAP im Grünkanal und Rab6A im Rotkanal. Die Hippocampi der drei Tiere wurden beidseits in 10x Vergrößerung in beiden Kanälen aufgenommen und zu einer Übersicht zusammengefügt. Mit Hilfe der Software ImageJ wurden die Intensitäten im Rab6A- und GFAP-Farbkanal getrennt im Sinne der Densitometrie gemessen. Die Befehlskette *Analyze* → *Measure* wurde für die Messung verwendet. An je acht Stellen der äußeren und inneren Molekularschicht pro Doppelhemisphären-Schnitt wurden stichprobenartig auf beiden Seiten seitengleiche Flächen auf ihre Intensität untersucht. Die Signifikanz wurde mit Hilfe des Statistikprogramms BiaS untersucht und zur Testung die parametrische bifaktorielle Varianzanalyse mit Post-hoc-Test und Bonferroni-Holm-Korrektur verwendet.

2.6.6 Vergleich von publizierten Transkriptomanalysen

Zusätzlich zur immunzytochemischen Untersuchung sollte die mRNA-Expression von Rab6A in Astrozyten untersucht werden. Dafür wurden vier publizierte Transkriptomanalysen verschiedener Forschergruppen anhand ihrer Methodik und Ergebnissen untersucht und zudem untereinander und mit den in dieser Untersuchung gewonnen Ergebnissen verglichen. Untersucht wurden die Transkriptomanalysen von Lovatt et al.,¹⁴⁸ Cahoy et al.,¹⁰⁷ Doyle et al.¹⁴⁹ und Zhang et al.¹⁵⁰.

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchungen zum Auftreten von Rab6A *in situ*

3.1.1 Vorhandensein von Rab6A⁺ Strukturen in allen Hirnregionen

Zu Beginn dieser Arbeit wurde das Vorkommen von Rab6A im Gehirn *in situ* untersucht. Dafür wurden 24 frontal geschnittene Doppelhemisphären von 6 adulten Mäusen beurteilt. Ein Hauptaugenmerk wurde dabei auf die folgenden Regionen gelegt: Hippocampus, Cortex, Corpus callosum und Thalamus. Aber auch Regionen wie Cerebellum, Hypothalamus und Amygdala wurden betrachtet. Die immunzytochemischen Färbungen wurden mindestens dreimal wiederholt, sie sind in ihrem Ergebnis vergleichbar.

Die mit dem anti-Rab6A Antikörper behandelten Hirnschnitte zeigen eine deutliche und spezifische Immunfluoreszenz für Rab6A (Abb. 1B, D, F) im Vergleich zur Kontrollfärbung (Abb. 1A, C, E), bei welcher der anti-Rab6A Antikörper weggelassen wurde. Die Rab6A⁺ Strukturen stellen sich dabei schon bei geringer Vergrößerung gleichmäßig und ubiquitär im gesamten Gehirn dar (Abb.1B, D, F).

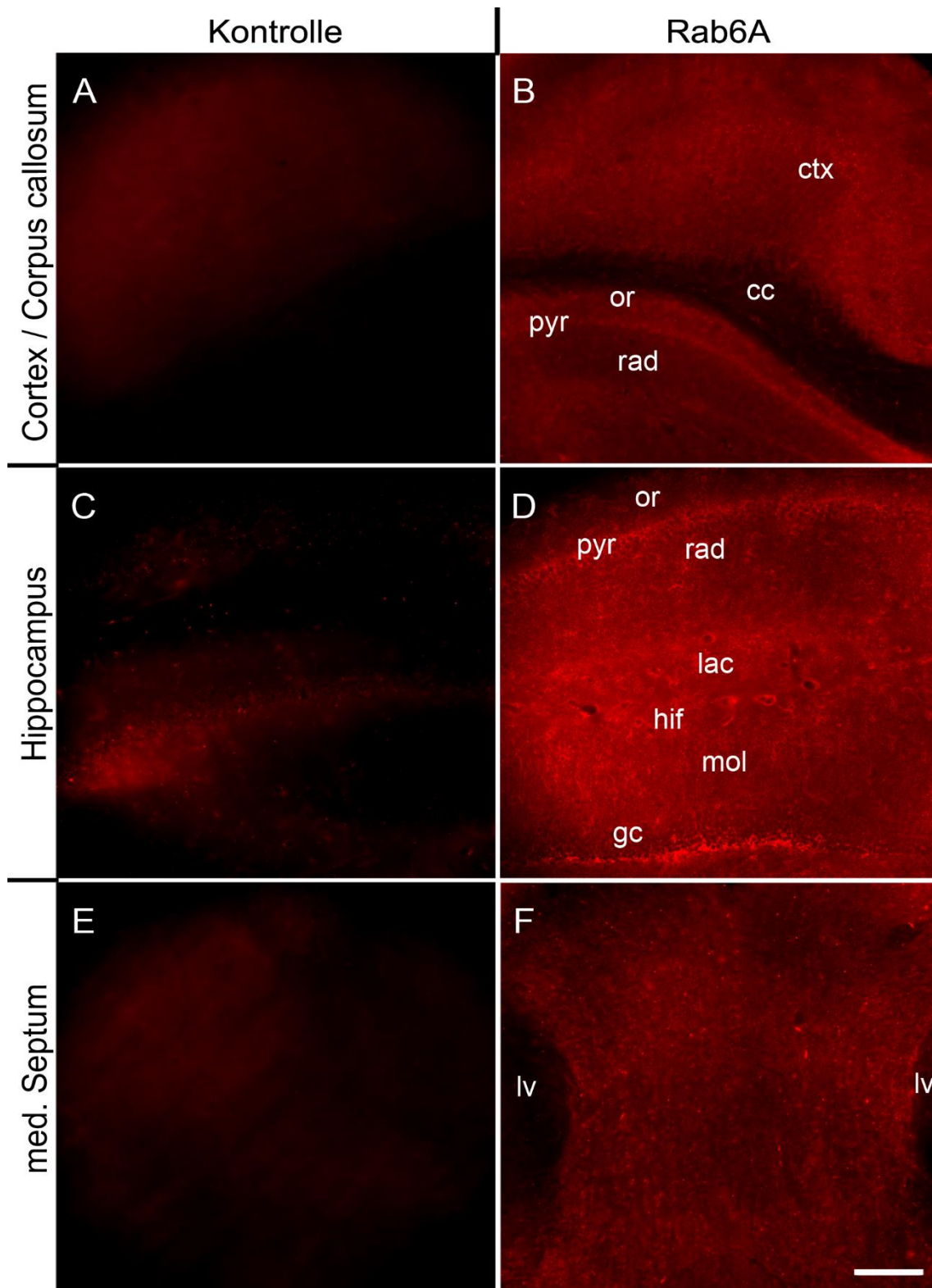


Abbildung 1 - Spezifische Immunfluoreszenz für Rab6A in allen Hirnregionen

Immunocytochemische Färbung von Rab6A in verschiedenen Hirnregionen. Die Untersuchung zeigt eine deutliche und spezifische Immunfluoreszenz für Rab6A im Cortex und Corpus callosum (B), im Hippocampus (D) und medialem Septum

(F). Die Kontrollfärbung dieser Regionen (A, C, E) zeigt keine spezifische Immunfluoreszenz. Schon bei 20x Vergrößerung stellen sich die Rab6A⁺ Strukturen gleichmäßig und ubiquitär im gesamten Gehirn dar. Die dargestellten Regionen sind repräsentativ für alle untersuchten Regionen. cc, Corpus callosum; ctx, Cortex; gc, granular cell layer; hif, hippocampal fissur; lac, Stratum lacunosum-moleculare; med. Septum, mediales Septum; mol, molecular cell layer; or, Stratum oriens; pyr, Stratum pyramidal; rad, Stratum radiatum. Maßstab: 50 µm (F, für A-F).

3.1.2 Rab6A⁺ Strukturen unterscheiden sich in Dichte und Intensität

Während der Auswertung der einzelnen Hirnregionen zeigt sich, dass die Intensität und die Dichte der Rab6A⁺ Strukturen in den untersuchten Hirnregionen unterschiedlich sind. Die unterschiedliche Dichte der Rab6A⁺ Strukturen wird besonders im Vergleich zwischen weißer und grauer Substanz deutlich (Abb. 2), wohingegen die unterschiedliche Intensität innerhalb des Hippocampus ersichtlich wird (Abb. 3).

In der Abbildung 2A ist die Fimbria und die CA3-Region des Hippocampus dargestellt. Es wird deutlich, dass weniger Rab6A⁺ Strukturen in der Fimbria als im Hippocampus vorhanden sind (Abb. 2A). Es zeigt sich außerdem, dass Rab6A geringere Territorien in der weißen als in der grauen Substanz einnimmt. Höhere Vergrößerungen zeigen, dass vereinzelte starke Rab6A⁺ Signale in der weißen Substanz vorkommen (Abb. 2B), während Rab6A in der grauen Substanz eine netzwerkähnliche Struktur bildet (Abb. 2C). Die Dendriten, die durch die CA3-Schicht verlaufen, weisen eine deutliche Aussparung in den Rab6A⁺ Strukturen auf (Abb. 2A, C, Pfeile). Dies kann ein erster Hinweis dafür sein, dass Rab6A nicht mit Neuronen kolokalisiert. Insgesamt deuten diese morphologischen Befunde auf das typische Bild von Astrozyten hin, mit einer Betonung der Markierung ihrer peripheren Fortsätze, sodass die Einzelzellen nicht klar erkennbar, allenfalls angedeutet sind (Abb. 2C, Pfeilspitze).

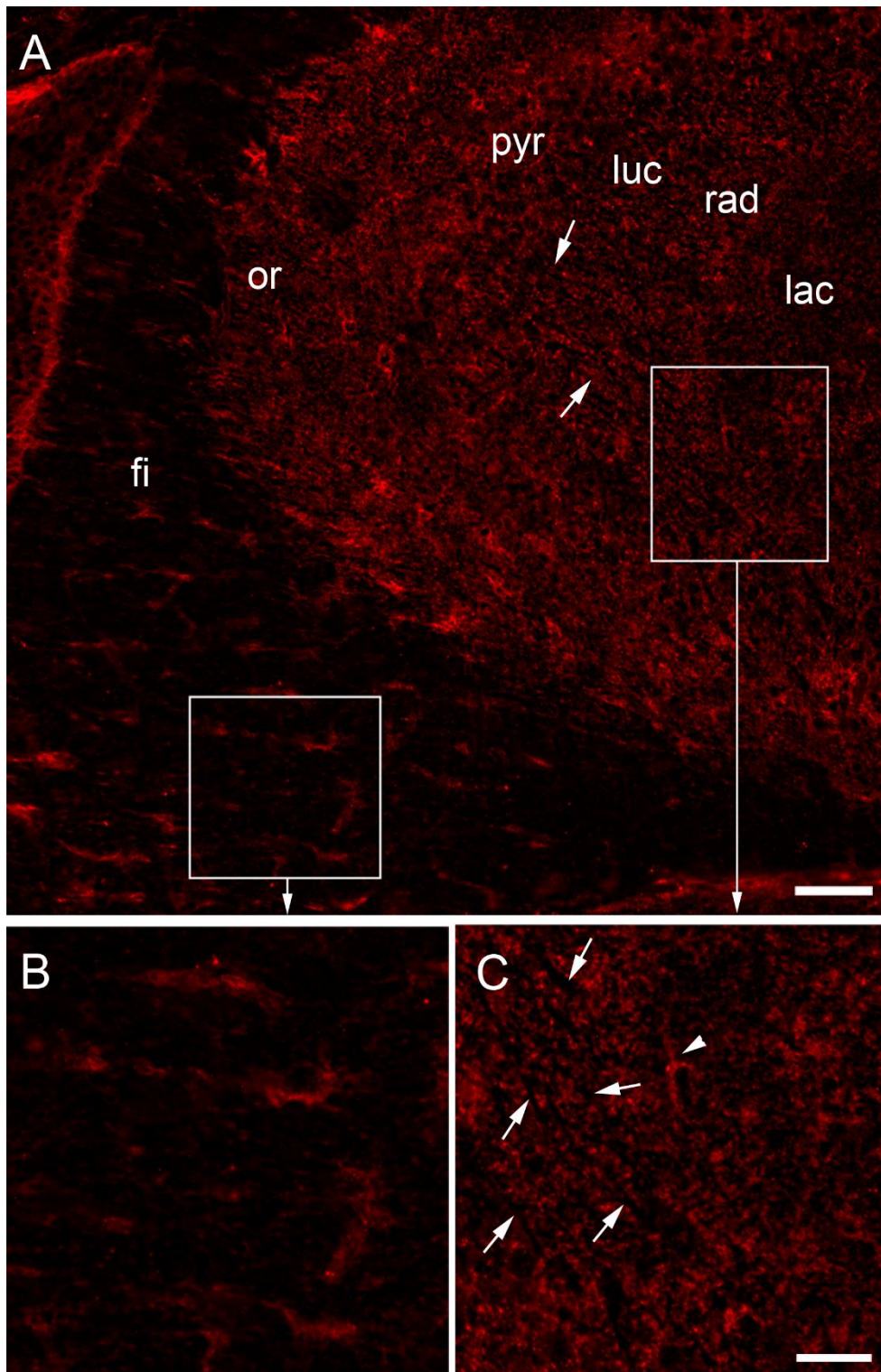


Abbildung 2 - Unterschiedliche Dichte der Rab6A⁺ Strukturen in weißer und grauer Substanz

Immunocytochemische Färbung von Rab6A in der weißen und grauen Substanz. Schon bei 20x Vergrößerung zeigt sich in der weißen Substanz eine geringere Rab6A⁺ Dichte als in der grauen (A). Vergrößerungen zeigen, dass vereinzelte starke Rab6A⁺ Signale in der weißen Substanz vorkommen (B), die aber nicht

wie in der grauen Substanz von einem Rab6A⁺ Netzwerk umgeben sind (C). Innerhalb der CA3-Region zeichnen sich die Aussparungen der Dendriten in der Rab6A⁺ Immunfluoreszenz ab (A, Pfeile), die bei Vergrößerung noch deutlicher erscheinen (C, Pfeile). Auch wird auf das typische Bild von Astrozyten hingedeutet, mit einer Betonung der Markierung ihrer peripheren Fortsätze (C, Pfeilspitze). *fi*, Fimbriae; *lac*, Stratum lacunosum-moleculare; *luc*, Stratum lucidum; *or*, Stratum oriens; *pyr*, Stratum pyramidale; *rad*, Stratum radiatum. Maßstab: 50 μm (A), 3 μm (C, für B und C).

Innerhalb des Hippocampus wird die unterschiedliche Intensität der Rab6A⁺ Strukturen deutlich (Abb. 3A). Der Hippocampus besteht aus mehreren Strukturen, wozu der Gyrus dentatus, das Cornu ammonis und das Subiculum gehören. Das Augenmerk wird an dieser Stelle auf die Subgranularzone des Gyrus dentatus und das Stratum pyramidale des Cornu ammonis gelegt. Die Subgranularzone ist eine schmale Zellschicht, die sich zwischen dem Stratum granulare und dem Hilus befindet. Im Stratum granulare des Gyrus dentatus liegen die Zellkörper der Körnerzellen. In den hier durchgeführten Experimenten sind diese Zellkörper ausgespart (Abb. 3B, Pfeilspitze). Sie scheinen zum Hilus hin von einem Band aus gleichmäßig verteilter Rab6A⁺ Färbung getrennt zu sein. Dabei kommt das Rab6A⁺ Signal mit einer viel höheren Intensität als in benachbarten Schichten, wie dem Hilus oder das Stratum moleculare vor. Dieses intensive Rab6A⁺ gefärbte Band umfasst manche Körnerzellen stärker als andere (Abb.3B). Auch im Stratum pyramidale des Cornu ammonis erscheint das Rab6A⁺ Signal mit einer viel höheren Intensität als in den angrenzenden Schichten des Stratum oriens und des Stratum radiatum (Abb. 1D). Dort liegen die Zellkörper der Pyramidenzellen, die auch ausgespart sind.

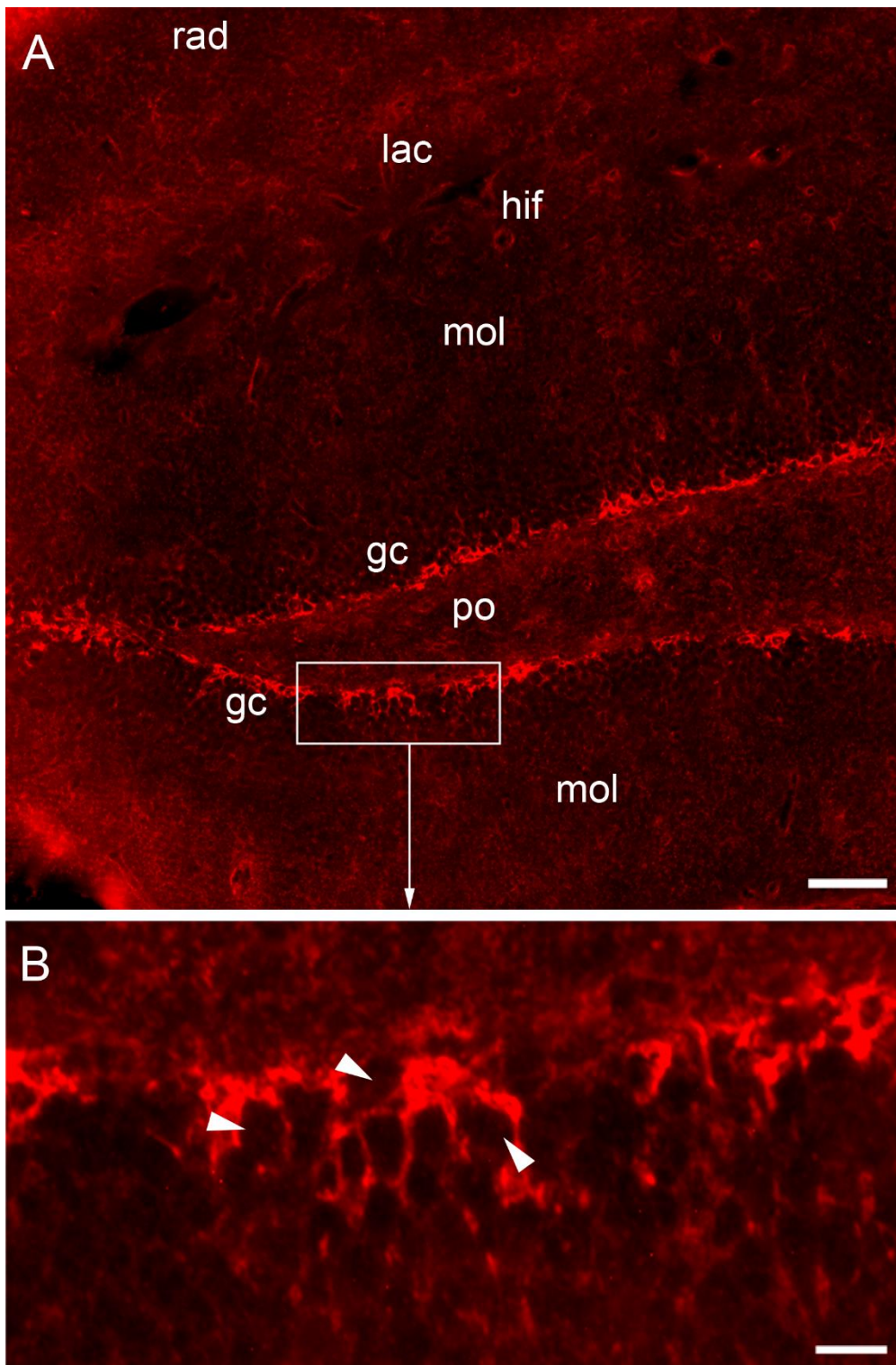


Abbildung 3 - Unterschiedliche Intensität der Rab6A⁺ Strukturen innerhalb des Hippocampus

Immunocytochemische Färbung von Rab6A in Teilen des Hippocampus. Bei 20x Vergrößerung wird die unterschiedliche Intensität der Rab6A⁺ Strukturen im Hippocampus deutlich (A). Vor allem die Subgranularzone des Gyrus dentatus (B) und das Stratum pyramidale weisen eine starke Intensität auf. Dabei sind die

Körnerzellen in der Färbung ausgespart (B, Pfeilspitze). gc, granular cell layer; hif, hippocampal fissur; lac, Stratum lacunosum-moleculare; mol, molecular cell layer; po, polymorph layer; rad, Stratum radiatum.

Maßstab: 50 µm (A), 10 µm (B).

Zusammenfassend wird deutlich, dass die Dichte der Rab6A⁺ Strukturen in der grauen Substanz stärker als in der weißen Substanz ist. Außerdem weisen Bereiche des Hippocampus wie die Subgranularzone und das Stratum pyramidale eine stärkere Intensität als in anderen Bereichen des Hippocampus auf.

3.2 Lokalisation von Rab6A in Astrozyten

3.2.1 Lokalisation von Rab6A in GFAP⁺-Astrozyten

Um die astrozytäre Lokalisation von Rab6A zu bestätigen, wurden die untersuchten Hirnregionen im nächsten Schritt zusätzlich zum anti-Rab6A Antikörper (Abb. 4A) auch mit dem astrozytären Marker anti-GFAP gefärbt (Abb. 4B). Die mit dem anti-Rab6A Antikörper markierten Astrozyten zeigen ein ausnahmslos starkes Signal und lassen bei geringer Vergrößerung ein ubiquitäres Verteilungsmuster der Rab6A⁺ Strukturen erkennen (Abb. 4C). Dies lässt einen ersten Zusammenhang zwischen Rab6A und Astrozyten erahnen.

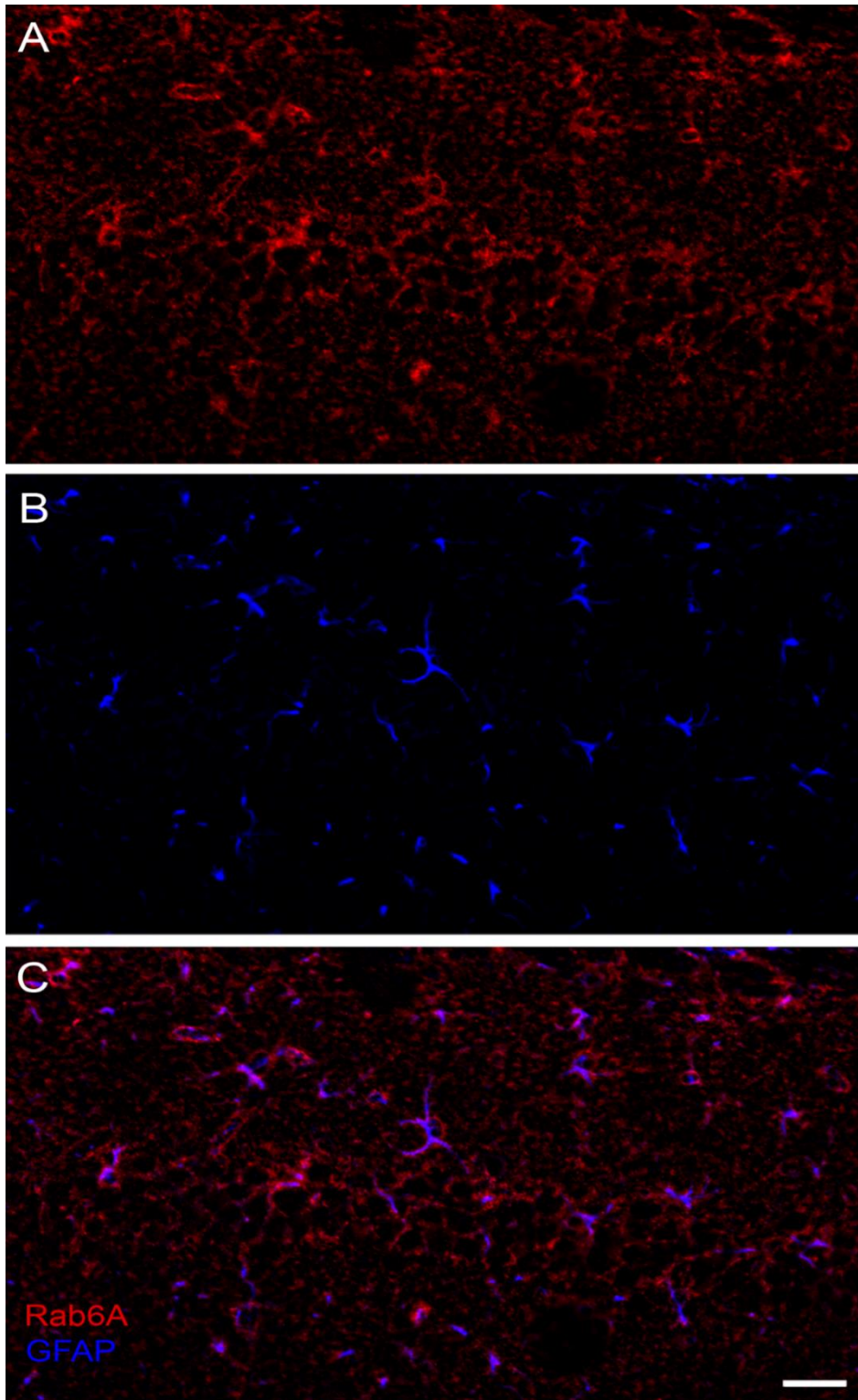


Abbildung 4 - Lokalisation von Rab6A in GFAP⁺-Astrozyten

Immunzytochemische Färbung von Rab6A (rot) und GFAP (blau) in der CA1-Region des Hippocampus. Schon bei 20x Vergrößerung ähneln die Rab6A⁺ Strukturen der typischen Morphologie der Astrozyten (A). Die Überlagerung mit dem astrozytären Marker GFAP (B) zeigt eine deutliche Lokalisation von Rab6A

in GFAP⁺-Astrozyten (C). Dabei zeigen die mit dem anti-Rab6A Antikörper markierten Astrozyten ein ausnahmslos starkes Signal mit einem ubiquitären Verteilungsmuster der Rab6A⁺ Strukturen.

Maßstab: 50 µm (C, für A-C).

3.2.2 Morphologie und subzelluläre Lokalisation Rab6A⁺ Strukturen

Im nächsten Schritt wurde genauer auf die Morphologie und subzelluläre Verteilung der Rab6A⁺ Strukturen eingegangen. Dafür wurden Aufnahmen mit 100x Vergrößerung angefertigt, welche die Lokalisation von Rab6A in GFAP⁺-Astrozyten noch deutlicher zeigt.

Die Rab6A⁺ Strukturen präsentieren sich als zahllose einzelne Puncta, die an Vesikel oder vesikuläre Organellen denken lassen (Abb. 5A), aber auch als teils wabige, teils gradlinig verlaufende Akkumulationen innerhalb des Zellplasmas (Abb. 5C). Rab6A bedeckt das Zytosol und die GFAP⁺-Hauptfortsätze der Astrozyten in unterschiedlichem Ausmaß und zeichnet die damit verbundenen, peripheren Fortsätze nach (Abb. 5C). Es liegt innerhalb des Astrozyten perinukleär und eng an dessen Zellgrenze (Abb. 5B, Pfeil). Auch in den astrozytären Hauptfortsätzen und den fein verzweigten peripheren astrozytären Fortsätzen (PAP) kommen die Rab6A⁺ Strukturen vor (Abb. 5C, Pfeil). Die Rab6A⁺ Strukturen sind im Astrozyten gleichmäßig verteilt und erscheinen weitestgehend gleich groß. Sie sind voneinander abgegrenzt. Darüber hinaus hat jeder Astrozyt sein eigenes Territorium, in dem seine feinen Fortsätze in Kontakt mit der Umgebung treten.

Es zeigt sich, dass GFAP⁺-Astrozyten und ihre Fortsätze von einem gleichmäßigen, über die komplette Zelle verteilten, wolkigen Rab6A⁺ Signal ausgefüllt sind, welches auf feinverwobene, astrozytäre Strukturen, besonders ihrer filigranen, GFAP⁻ peripheren Fortsätzen zurückzuführen ist.

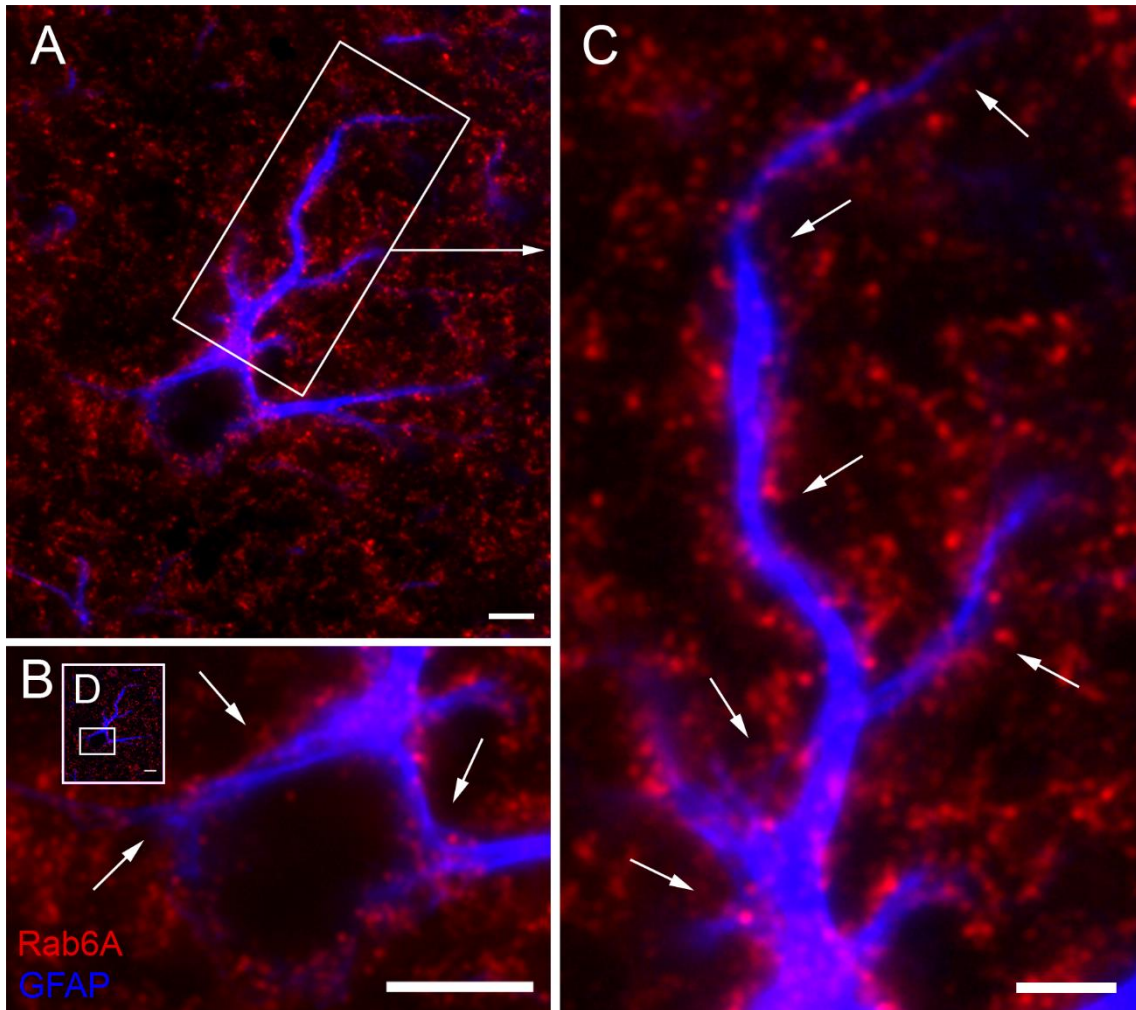


Abbildung 5 - Morphologie und subzellulärer Verteilung von Rab6A in GFAP⁺-Astrozyten

Immunzytochemische Färbung von Rab6A (rot) und GFAP (blau) in der CA1-Region des Hippocampus. Bei höherer Vergrößerung stellen sich zahlreiche Rab6A⁺ Puncta dar, die an Vesikel oder vesikuläre Organellen denken lassen. Es kommt zu einer engen Assoziation und teilweiser Überlagerung mit den GFAP⁺-Hauptfortsätzen (A). Im Ausschnitt zeigt sich, dass die Rab6A⁺ Strukturen am Zellkörper (B, Ausschnitt aus D) den Hauptfortsätzen (C, Ausschnitt aus A) und peripheren astrozytären Fortsätzen lokalisiert sind.

Maßstab: 5 μ m (A,C), 3 μ m (B), 2 μ m (D).

3.2.3 Lokalisation von Rab6A in astrozytären Endfüßen

Die Endfüße der Astrozyten bedecken die Basallamina innerhalb des ZNS, wozu die Blutgefäße, die Pia mater und der Glaskörper im Auge gehören. Dabei wird der gliale Kontakt mit den Blutgefäßen als perivaskuläre astrozytäre Endfüße bezeichnet.

Während der Untersuchung wurden Astrozyten dokumentiert, die nahe den Blutgefäßen lokalisiert sind. Aufgrund der zunehmenden Evidenz für die Wichtigkeit der perivaskulären astrozytären Endfüße in der funktionellen metabolischen Kopplung zwischen Astrozyten und Neuronen,¹⁵¹ wurden an dieser Stelle auch die perivaskulären astrozytären Endfüße untersucht, wobei ebenfalls die unter 3.1.1 angegebenen Hirnregionen genutzt wurden.

Es zeigt sich erwartungsgemäß, dass die Blutgefäße von GFAP⁺-Fortsätzen bedeckt sind (Abb. 6A). Nach Überlagerung mit dem Rab6A-Farbkanal (Abb. 6B) wird deutlich, dass die perivaskulären astrozytären Endfüße systematisch Rab6A⁺ sind und vergleichbare, abgegrenzte Rab6A⁺ Strukturen enthalten (Abb. 6C, Pfeil). Die strukturelle Nähe der Rab6A⁺ Strukturen der astrozytären Endfüße zu den Blutgefäßen lässt eine Wechselwirkung zwischen den Strukturen mit physiologischer Beeinflussung der Blutgefäße vermuten.

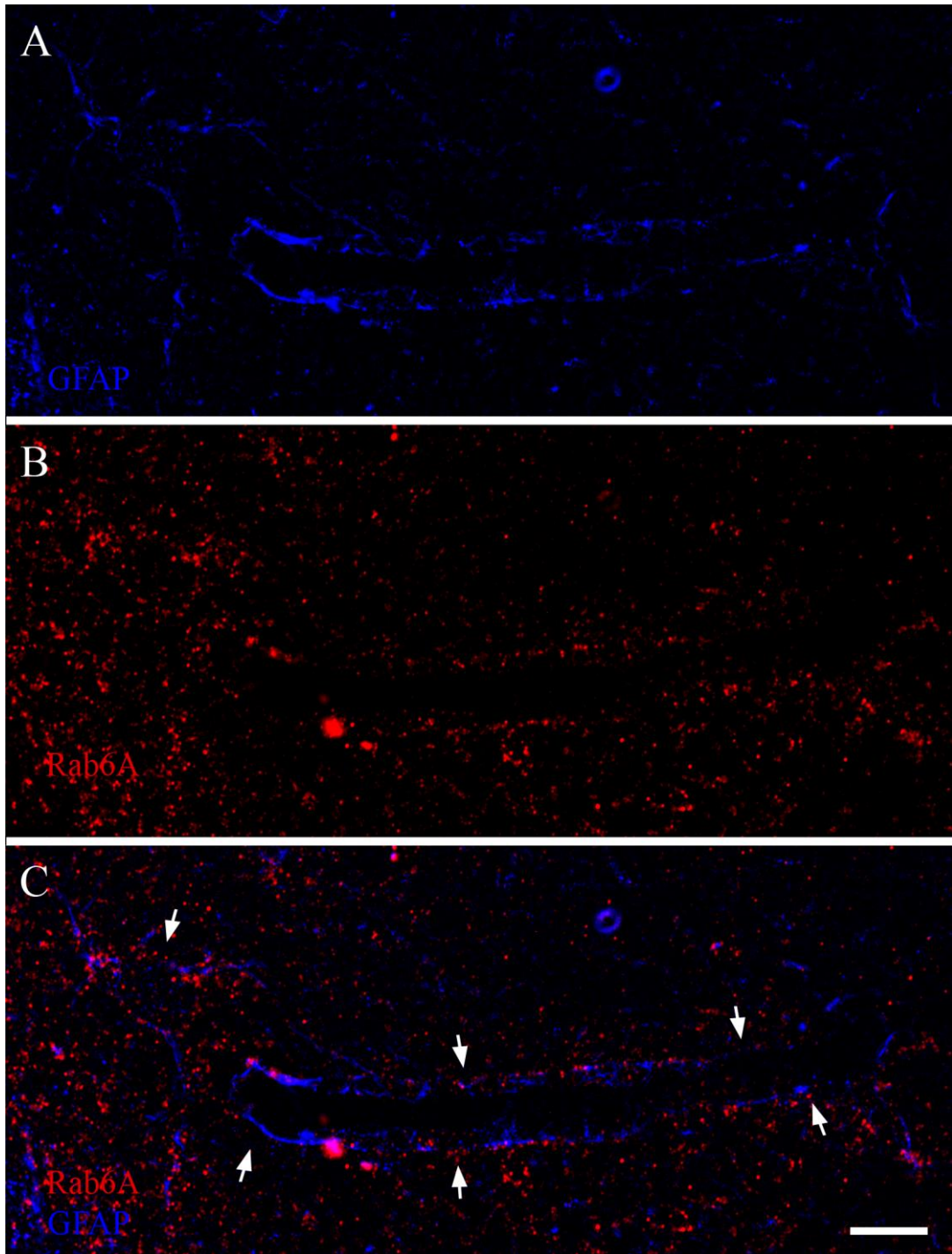


Abbildung 6 - Rab6A⁺ Strukturen in perivaskulären astrozytären Fortsätzen
 Immunzytochemische Färbung von Rab6A (rot) und GFAP (blau) an perivaskulären astrozytären Fortsätzen. Die Blutgefäße sind von GFAP⁺-Fortsätzen bedeckt (A), die nach Überlagerung mit Rab6A (B) eine Kolokalisation aufweisen (C, Pfeil). Die perivaskulären astrozytären Fortsätze sind erwartungsgemäß Rab6A⁺.
 Maßstab: 10 μ m (C, für A-C).

3.2.4 Lokalisation von Rab6A in perineuronalen Netzen

Die Fortsätze von Astrozyten üben intensive strukturelle Beziehungen zu neuronalen Zelloberflächen aus, was als perineuronales Netz bezeichnet wird. Dabei bilden sie regionale, neuronenspezifische und subzelluläre Verteilungsmuster aus.¹⁵² Ein einzelnes Neuron kann netzartige Kontakte von mehreren Astrozyten erhalten und ein einzelner Astrozyt kann sich an den perineuronalen Netzen von mehreren Neuronen beteiligen.¹⁵³ In dieser Untersuchung konnte gezeigt werden, dass die Fortsätze, welche an der Ausbildung des Netzes beteiligt sind, ebenfalls Rab6A⁺ sind (Abb. 7A). Auch hier lässt sich durch die Nähe der Rab6A⁺ Puncta zu den Neuronen (Abb. 7B) ein Zusammenspiel mit physiologischer Beeinflussung der Neuronen erahnen.

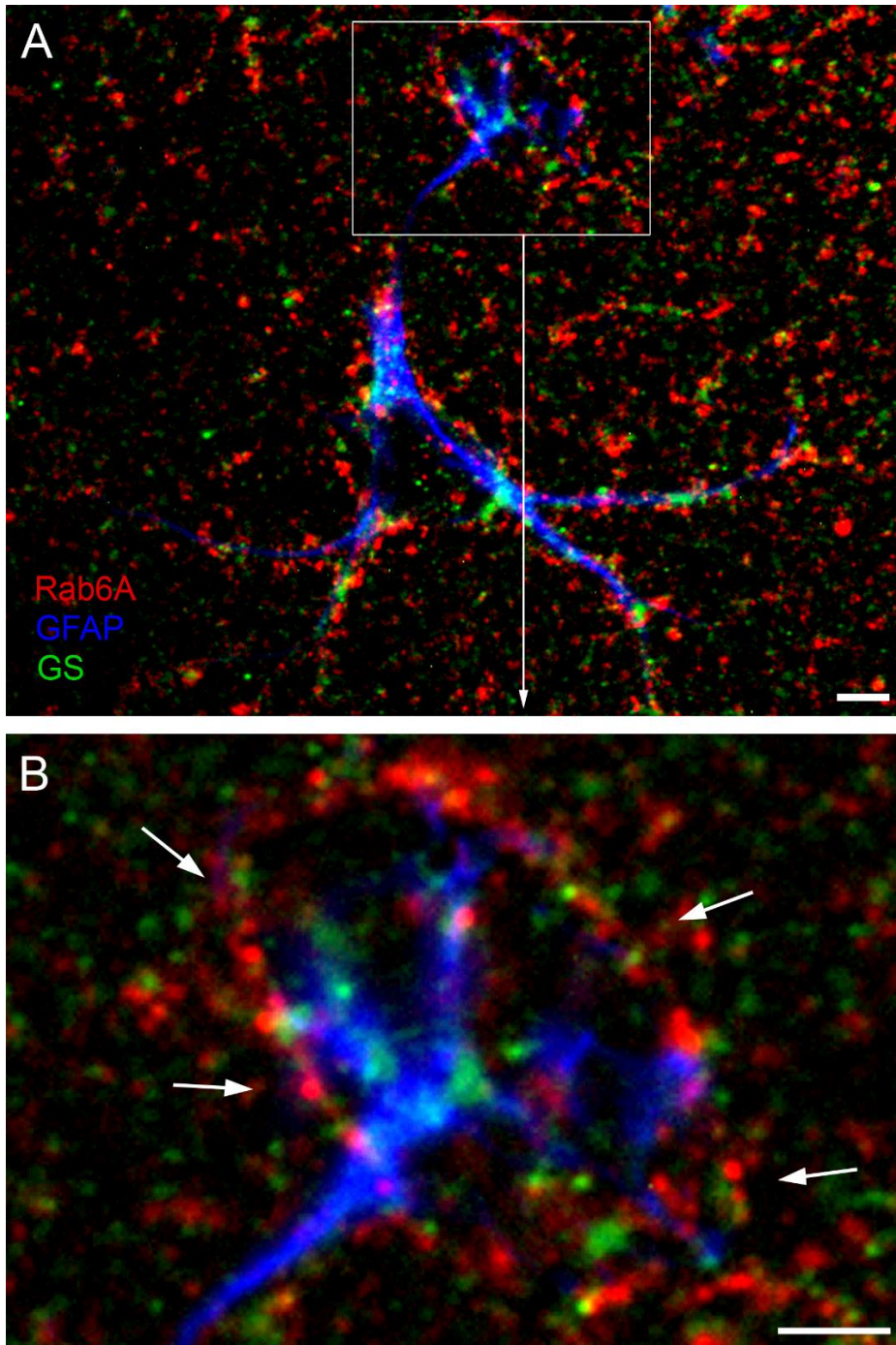


Abbildung 7 - Rab6A im perineuronalen Netz

Immunzytochemische Färbung von Rab6A (rot), GFAP (blau) und GS (Grün) an astrozytären Fortsätzen. Zu sehen ist ein Astrozyt mit seinen GFAP⁺-Fortsätzen (A). Bei höherer Vergrößerung wird deutlich, dass sich der GFAP⁺-Fortsatz ins perineuronale Netz verzweigt, welches erwartungsgemäß Rab6A⁺ ist (B, Pfeil). Auch die fein verzweigten GFAP/GS⁺-Fortsätze sind Rab6A⁺. Maßstab: 5 μ m (A), 1 μ m (B).

3.3 Lokalisation von Rab6A in allen Astrozyten

3.3.1 Rab6A in GFAP⁺-Astrozyten

Zunächst sollte überprüft werden ob die oben genannte Lokalisation von Rab6A in GFAP⁺-Astrozyten auf alle GFAP⁺-Astrozyten zutrifft. Die Auswertung wurde verblindet vorgenommen (siehe 2.2.4). Im dokumentierten Material wurden am Bildschirm im Blaukanal gut erkennbare GFAP⁺-Astrozyten identifiziert und markiert (Abb. 10A). Im nächsten Schritt wurde der Rab6A-Farbkanal eingestellt (Abb. 10A, Rab6A) und über den GFAP-Farbkanal gelegt und nur an den zuvor markierten Zellen die Kolokalisation ausgezählt. Dieses Mehrkanalbild zeigt eine deutliche Lokalisation von Rab6A in GFAP⁺-Astrozyten (Abb. 10A, Merge). Es wurden 12 Doppelhemisphären von drei Tieren untersucht. Zu den untersuchten Regionen gehört der Hippocampus (Abb. 8 A-C), Thalamus, Cortex (Abb. 8 D) und Corpus callosum. Es wurden insgesamt 3746 GFAP⁺-Astrozyten einzeln ausgewertet (Tabelle 6). Die Untersuchung ergibt, dass in den verschiedenen Hirnregionen jeder GFAP⁺-Astrozyt Rab6A⁺ ist (Diagramm 1). Es zeigt sich somit, dass Rab6A in der untersuchten Untergruppe der Astrozyten, die GFAP⁺ sind, lokalisiert ist.

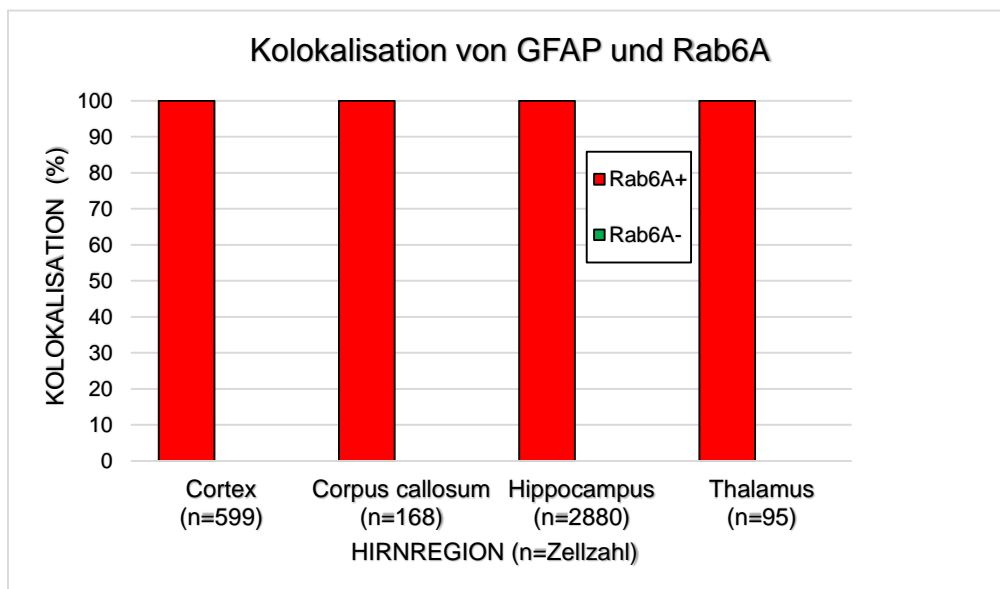


Diagramm 1 - Lokalisation von Rab6A in GFAP⁺-Astrozyten

Jeder untersuchte GFAP⁺-Astrozyt ist Rab6A⁺. Es findet sich kein einziger GFAP⁺/Rab6A⁻-Astrozyt. Alle GFAP⁺-Astrozyten wurden nach Hirnregion einzeln überprüft und stammen aus 12 Schnitten von 3 Tieren (n=Zellzahl).

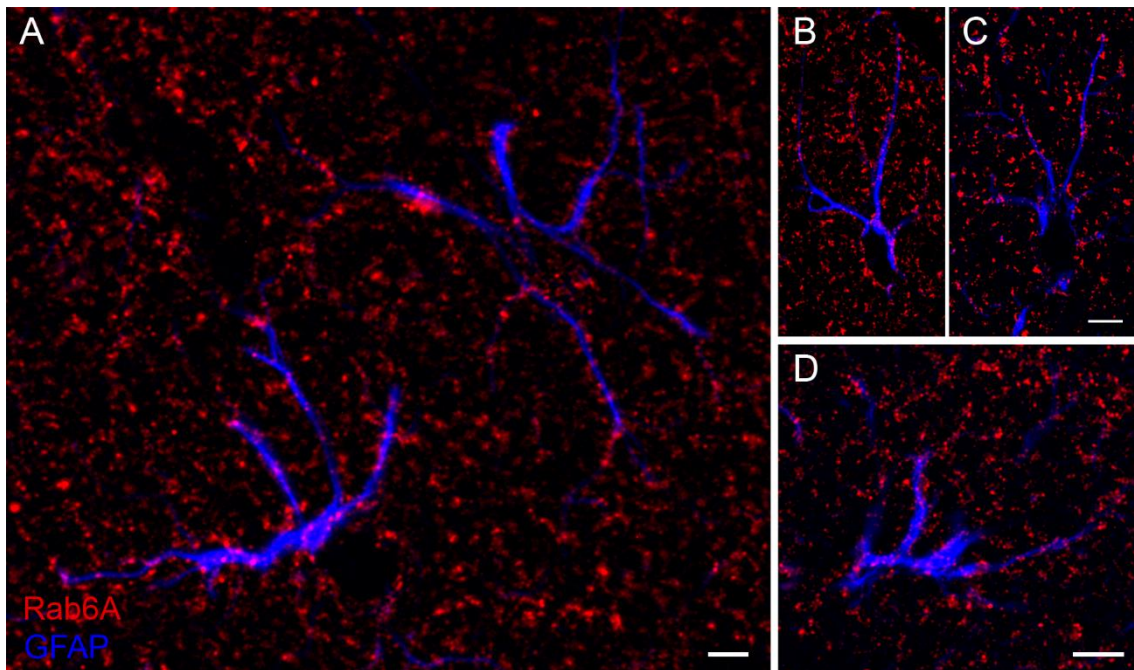


Abbildung 8 - Alle GFAP⁺-Astrozyten sind Rab6A⁺

Immunzytochemische Färbung von Rab6A (rot) und GFAP (blau). Jeder untersuchte GFAP⁺-Astrozyt ist Rab6A⁺. Die dargestellten GFAP⁺/Rab6A⁺-Astrozyten stammen aus verschiedenen Regionen wie Stratum radium (A), Fascia dentata (B, C) und Cortex (D). Ein einzelner Astrozyt bildet durch die Gesamtheit seiner Fortsätze ein Territorium, mit dem er in Kontakt mit der Umgebung tritt, dieses Territorium ist Rab6A⁺ (A).

Maßstab: 5 µm (A; C, für B und C; D).

GS und Aldh1L1 in GFAP⁺/Rab6A⁺-Astrozyten

Um die Möglichkeit zu überprüfen, dass es sich bei den GFAP⁺/Rab6A⁺-Astrozyten um eine bisher unbekannte Untergruppe von GFAP⁺-Astrozyten handelt, wurde eine Dreifachimmunfluoreszenz der GFAP⁺/Rab6A⁺-Astrozyten mit GS zum einen und Aldh1L1 zum anderen vorgenommen. In dem fotodokumentierten Material aus den beiden Dreifachfärbungen wurden in der GS⁺ Färbung 2918 GFAP⁺/Rab6A⁺-Astrozyten ausgewählt, in der Aldh1L1⁺ Färbung 828 GFAP⁺/Rab6A⁺-Astrozyten. Die Überlagerung der einzelnen GFAP⁺/Rab6A⁺-Astrozyten mit GS bzw. Ald1hL1 zeigt, dass alle untersuchten GFAP⁺/Rab6A⁺-Astrozyten GS⁺ (Abb. 9A) bzw. Aldh1L1⁺ (Abb. 9B) sind (Diagramme 2 und 3).

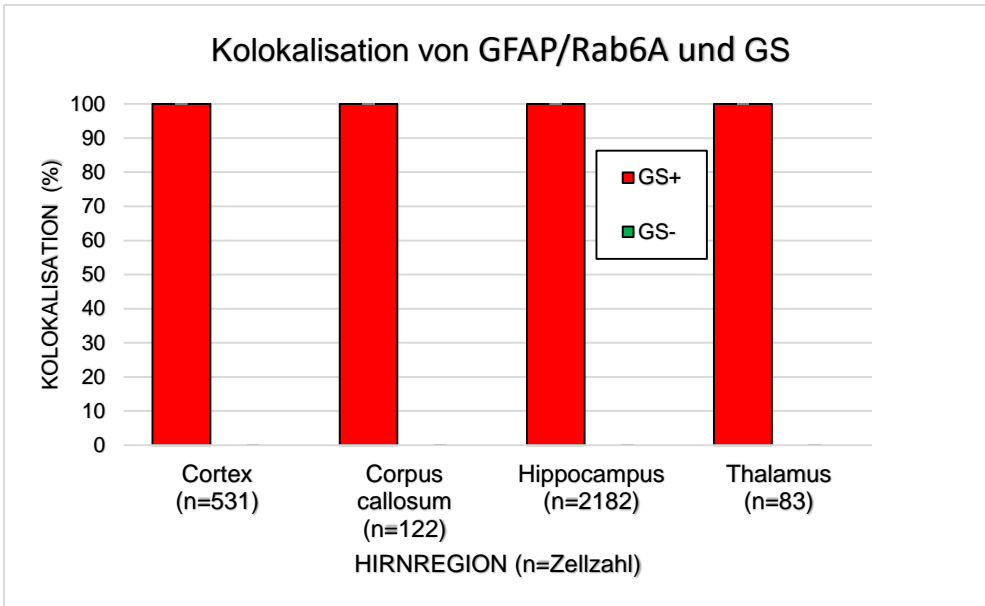


Diagramm 2 - Lokalisation von GS in GFAP⁺/Rab6A⁺-Astrozyten

Jeder untersuchte GFAP⁺/Rab6A⁺-Astrozyt ist GS⁺. Es findet sich kein einziger GFAP⁺/Rab6A⁺/GS⁻-Astrozyt. Alle GFAP⁺/Rab6A⁺-Astrozyten wurden nach Hirnregion einzeln überprüft und stammen aus 6 Schnitten von 3 Tieren (n=Zellzahl).

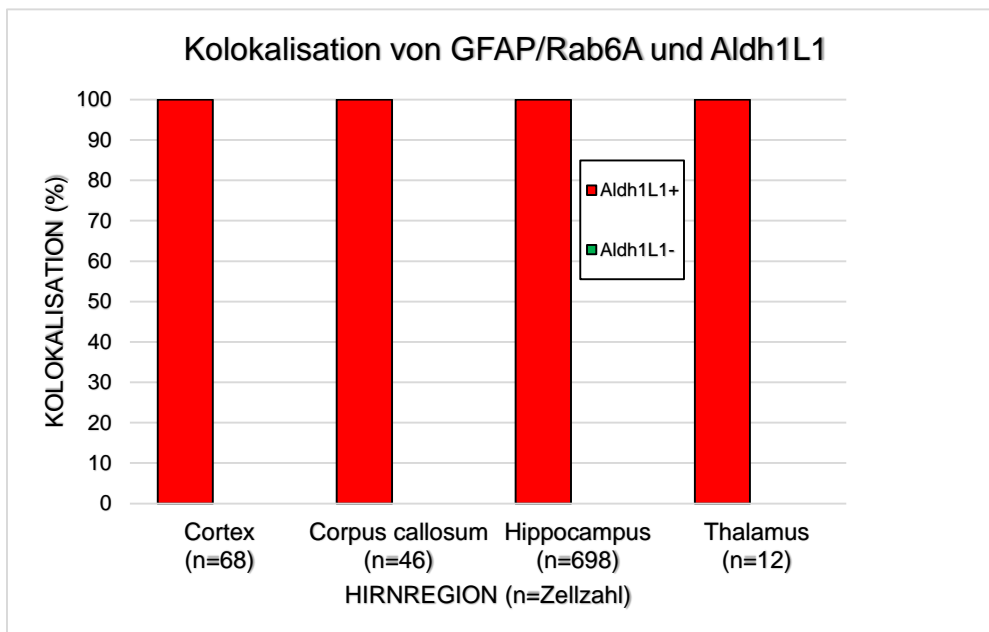


Diagramm 3 - Lokalisation von Aldh1L1 in GFAP⁺/Rab6A⁺-Astrozyten

Jeder untersuchte GFAP⁺/Rab6A⁺-Astrozyt ist Aldh1L1⁺. Es findet sich kein einziger GFAP⁺/Rab6A⁺/Aldh1L1⁻-Astrozyt. Alle GFAP⁺/Rab6A⁺-Astrozyten wurden nach Hirnregion einzeln überprüft und stammen aus 6 Schnitten von 3 Tieren (n=Zellzahl).

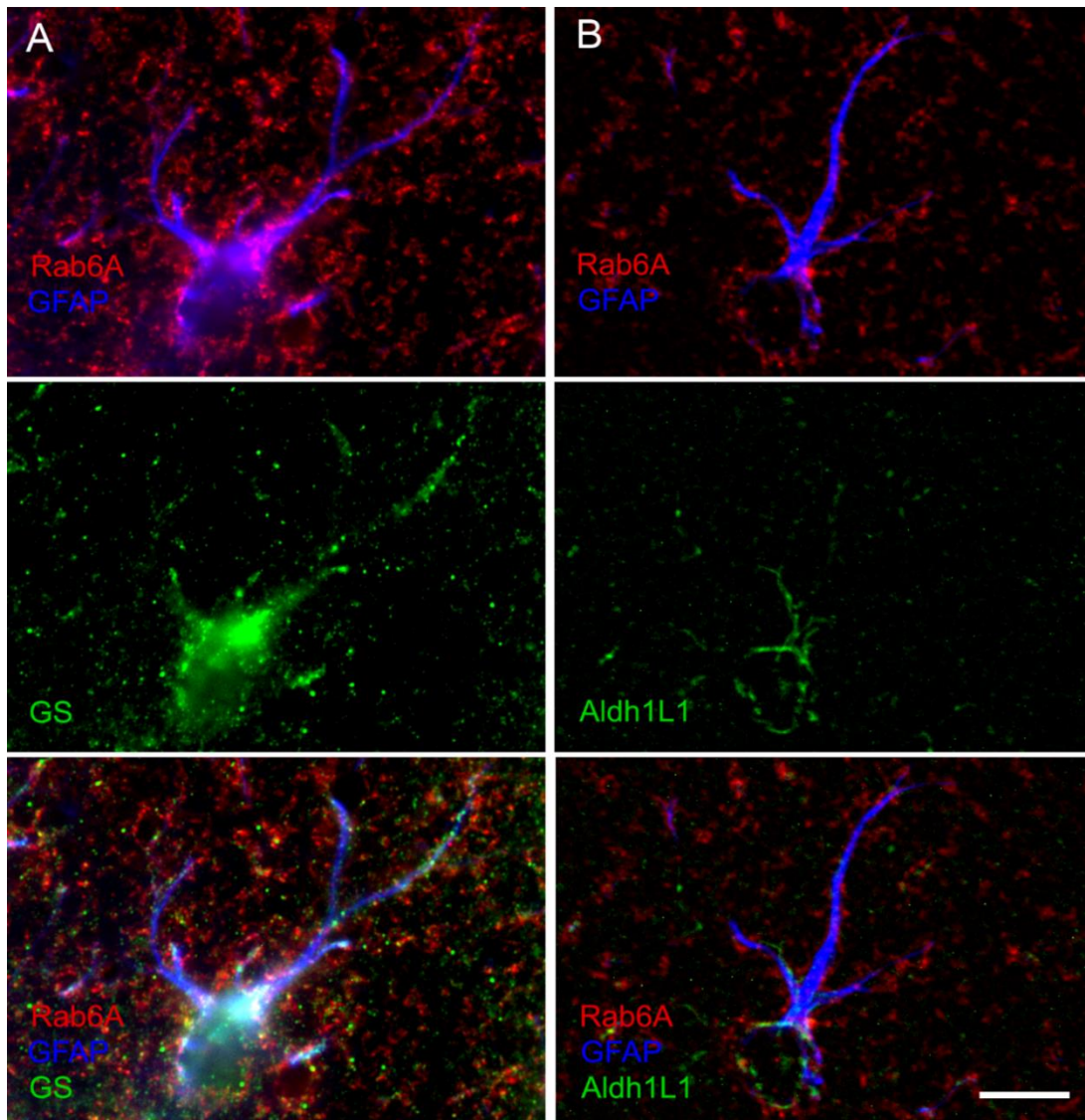


Abbildung 9 - Lokalisation von GS und Aldh1L1 in GFAP⁺/Rab6A⁺-Astrozyten

Immunzytochemische Färbung von Rab6A (rot), GFAP (blau), GS (grün) und Aldh1L1 (grün) an Astrozyten. Es werden je zwei Astrozyten (Reihe A und B) in den entsprechenden Einzelkanalbildern, sowie im überlagerten Mehrkanalbild gezeigt. Spalte A zeigt einen GFAP⁺/Rab6A⁺-Astrozyt des Stratum oriens in Überlagerung mit GS und Spalte B zeigt einen GFAP⁺/Rab6A⁺-Astrozyt des Stratum radiatum in Überlagerung mit Aldh1L1. Jeder der untersuchten GFAP⁺/Rab6A⁺-Astrozyten ist sowohl GS⁺ als auch Aldh1L1⁺.

Maßstab: 10 µm (B, für A und B).

Der Befund, dass alle GFAP⁺/Rab6A⁺-Astrozyten sowohl GS⁺ als auch Aldh1L1⁺ sind, spricht gegen die anfängliche Hypothese, nach der die GFAP⁺/Rab6A⁺-Astrozyten eine bisher unbekannte Untergruppe der GFAP⁺-Astrozyten darstellen. Dies steht im Einklang mit dem Befund, dass 100% der GFAP⁺-Astrozyten Rab6A⁺ sind (Diagramm 1).

3.3.2 Rab6A in GS⁺-Astrozyten

Da in der Literatur bekannt ist, dass GFAP nicht alle Astrozyten markiert und GS als astrozytärer Marker angesehen wird, der alle Astrozyten färbt,¹¹⁵ wurde im nächsten Schritt die Lokalisation von Rab6A in GS⁺-Astrozyten untersucht. Die zu untersuchenden GS⁺-Astrozyten wurden markiert (Abb. 10B) und nach Überlagerung des Rab6A-Farbkanals (Abb. 10B, Rab6A) die mögliche Doppelmarkierung untersucht. Das Mehrkanalbild zeigt dabei eine deutliche Lokalisation von Rab6A in GS⁺-Astrozyten (Abb. 10B, Merge). Es wurden 6 Doppelhemisphären von drei Tieren verwendet. Die untersuchten Regionen sind Cortex, Corpus callosum, Hippocampus und Thalamus. Es wurden insgesamt 3536 GS⁺-Astrozyten einzeln und verblindet ausgewertet (Tabelle 6). Die Untersuchung ergibt, dass in den untersuchten Hirnregionen jeder GS⁺-Astrozyt Rab6A⁺ ist (Diagramm 4). Auch eine immunzytochemische Färbung von Rab6A und GS an perivaskulären astrozytären Fortsätzen wurde durchgeführt (Abb. 11). Der astrozytäre Marker GS, welcher die fein verzweigten Fortsätze der Astrozyten anfärbt, bedeckt die Blutgefäße (Abb. 11A) und zeigt bei Überlagerung mit Rab6A (Abb. 11B) eine erwartungsgemäße Kolokalisation beider Antikörper (Abb. 11C, Pfeil). Hohe Vergrößerungen zeigen dabei deutlich, dass jeder GS⁺ Punkt mit einem Rab6A⁺ Punkt kolokalisiert (Abb. 11D, E). Die Befunde zeigen, dass nicht nur alle untersuchten GFAP⁺-Astrozyten, sondern auch alle untersuchten GS⁺-Astrozyten Rab6A⁺ sind, was keine Selektivität des Proteins für Astrozyten erahnen lässt.

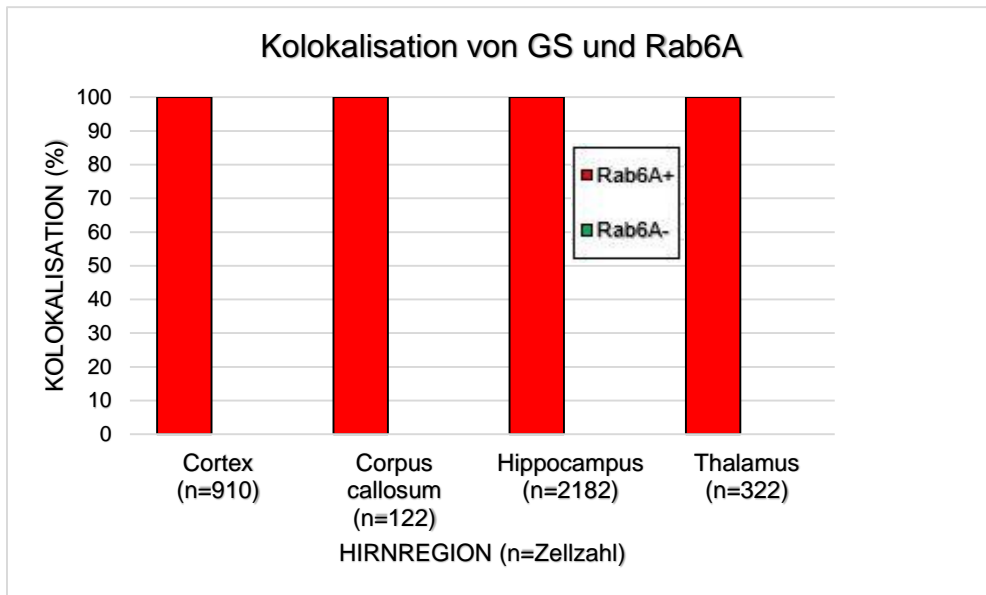


Diagramm 4 - Lokalisation von Rab6A in GS⁺-Astrozyten

Jeder untersuchte GS⁺-Astrozyt ist Rab6A⁺. Keiner der untersuchten GS⁺-Astrozyt ist Rab6A⁻. Alle GS⁺-Astrozyten wurden nach Hirnregion einzeln überprüft und stammen aus 6 Schnitten von 3 Tieren (n=Zellzahl).

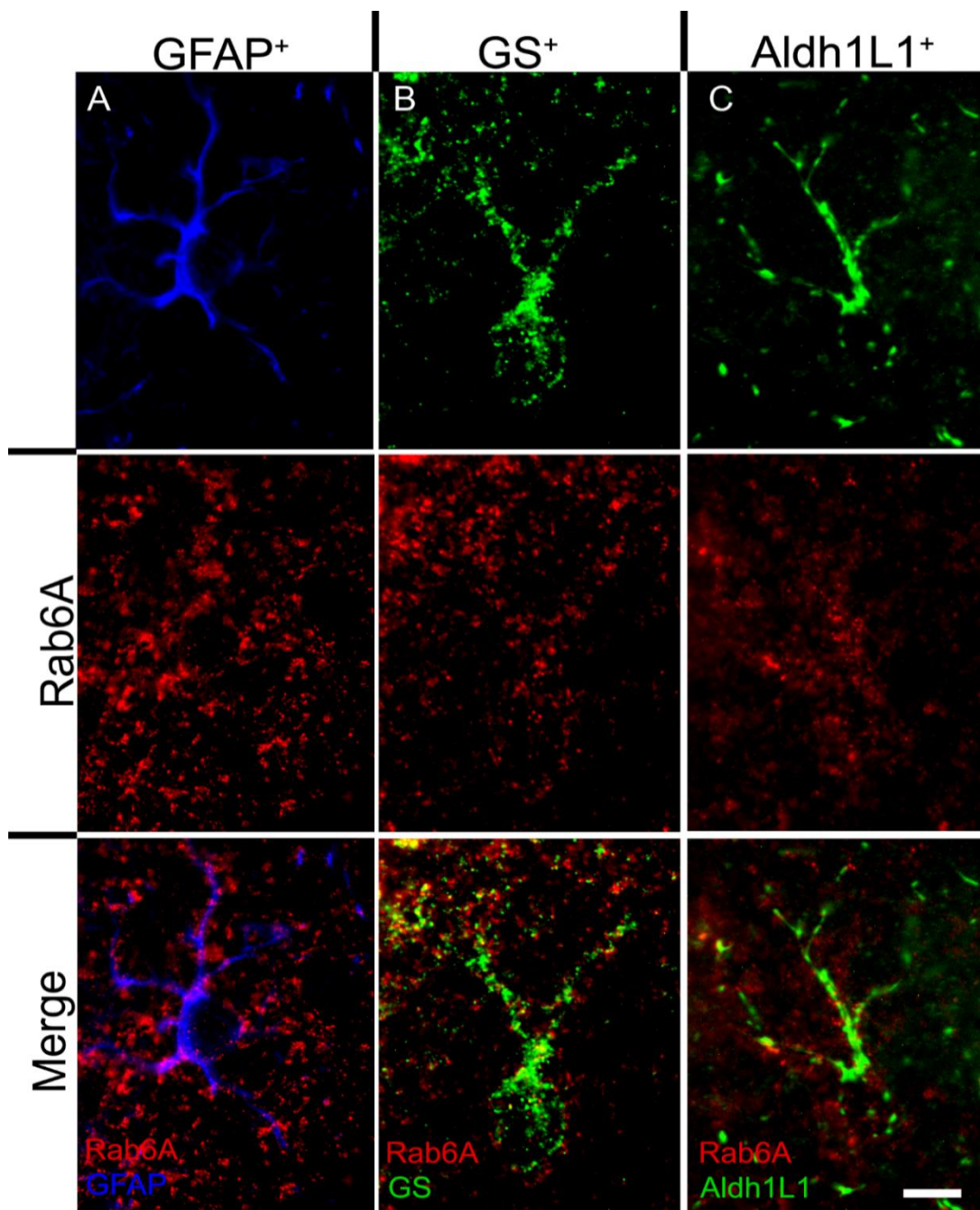


Abbildung 10 - Rab6A ist spezifisch in Astrozyten lokalisiert

Immunzytochemische Färbung von Rab6A (rot), GFAP (blau), GS (grün) und Aldh1L1 (grün) an Astrozyten. Es werden je drei Astrozyten (Reihe A, B, C) in den entsprechenden Einzelkanalbildern, sowie im überlagerten Mehrkanalbild (Merge) gezeigt. Spalte A zeigt einen GFAP⁺-Astrozyt, welcher Rab6A⁺ ist. Spalte B zeigt einen GS⁺-Astrozyten und Spalte C einen Aldh1L1⁺-Astrozyten, der Rab6A⁺ ist.

Maßstab: 10 µm (C, für A-C).

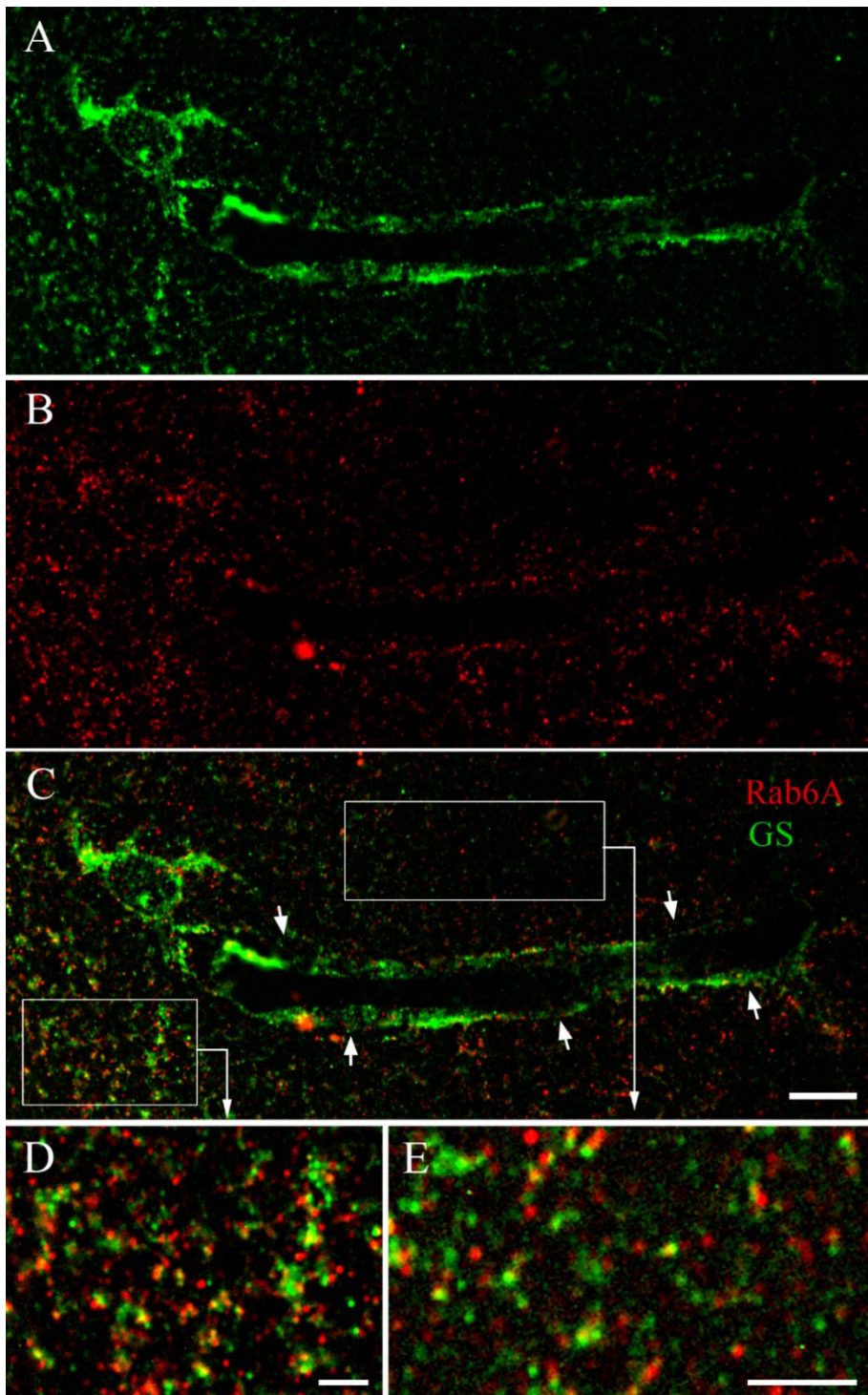


Abbildung 11 - Rab6A⁺ Strukturen in GS⁺ perivaskulären astrozytären Fortsätzen

Immunzytochemische Färbung von Rab6A (rot) und GS (grün) an perivaskulären astrozytären Fortsätzen. Der astrozytäre Marker GS, welcher die fein verzweigten Fortsätze der Astrozyten anfärbt, bedeckt die Blutgefäße (A) und zeigt bei Überlagerung mit Rab6A (B) eine erwartungsgemäße Kolokalisation

beider Antikörper (C, Pfeil). Vergrößerungen zeigen dabei deutlich, dass jeder GS⁺ Punkt mit einem Rab6A⁺ Punkt kolokalisiert (D und E).

Maßstab: 10 µm (C, für A-C), 0,5 µm (D), 1 µm (E).

GFAP in GS⁺/Rab6A⁺-Astrozyten

Als nächstes wurde untersucht, ob die GS⁺/Rab6A⁺-Astrozyten auch GFAP⁺ sind (Diagramm 5). Es wurde in Blindauswertung der Blaukanal, welcher die GFAP⁺ Färbung anzeigt über vorausgewählte GS⁺/Rab6A⁺-Astrozyten gelegt. So wurde überprüft, wieviele dieser Astrozyten doppelt- oder dreifach markiert sind. Von den 3536 blind vorausgewählten GS⁺/Rab6A⁺-Astrozyten sind 2918 GFAP⁺ und 618 GFAP⁻. Im Cortex und Thalamus kommen sowohl GS⁺/Rab6A⁺/GFAP⁺-Astrozyten als auch GS⁺/Rab6A⁺/GFAP⁻-Astrozyten vor (Abb. 12A). Im Hippocampus und Corpus callosum wurden nur GS⁺/Rab6A⁺/GFAP⁺-Astrozyten detektiert (Abb. 12B).

Schlussfolgernd lässt sich sagen, dass nicht alle GS⁺/Rab6A⁺-Astrozyten auch GFAP⁺ sind.

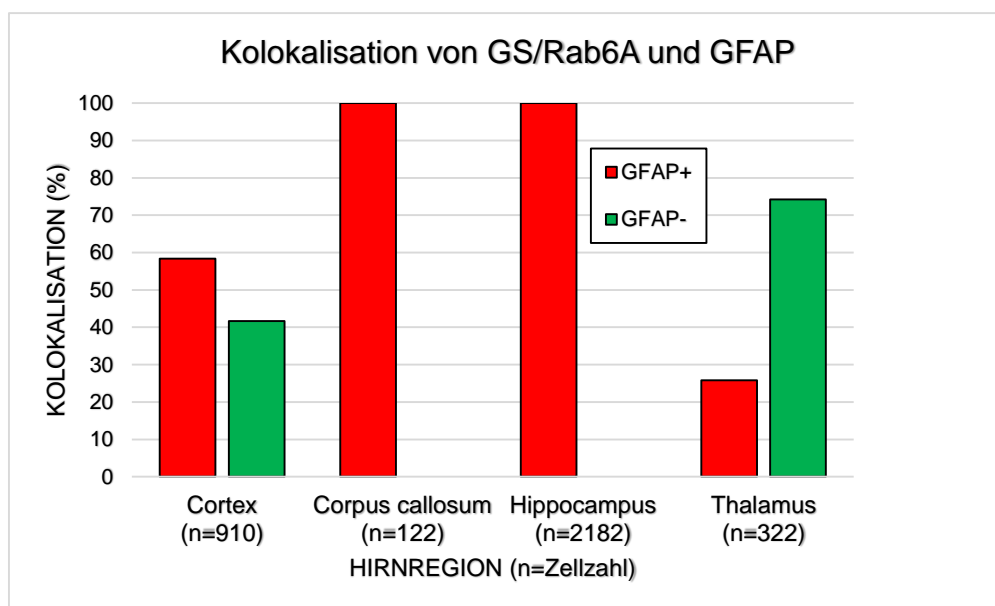


Diagramm 5 - Lokalisation von GFAP in GS⁺/Rab6A⁺-Astrozyten

Im Cortex und Thalamus ist nicht jeder untersuchte GS⁺/Rab6A⁺-Astrozyt GFAP⁺. Im Corpus callosum und Hippocampus ist jeder untersuchte GS⁺/Rab6A⁺-Astrozyt GFAP⁺. Alle GS⁺/Rab6A⁺-Astrozyten wurden nach Hirnregion einzeln überprüft und stammen aus 6 Schnitten von 3 Tieren (n=Zellzahl).

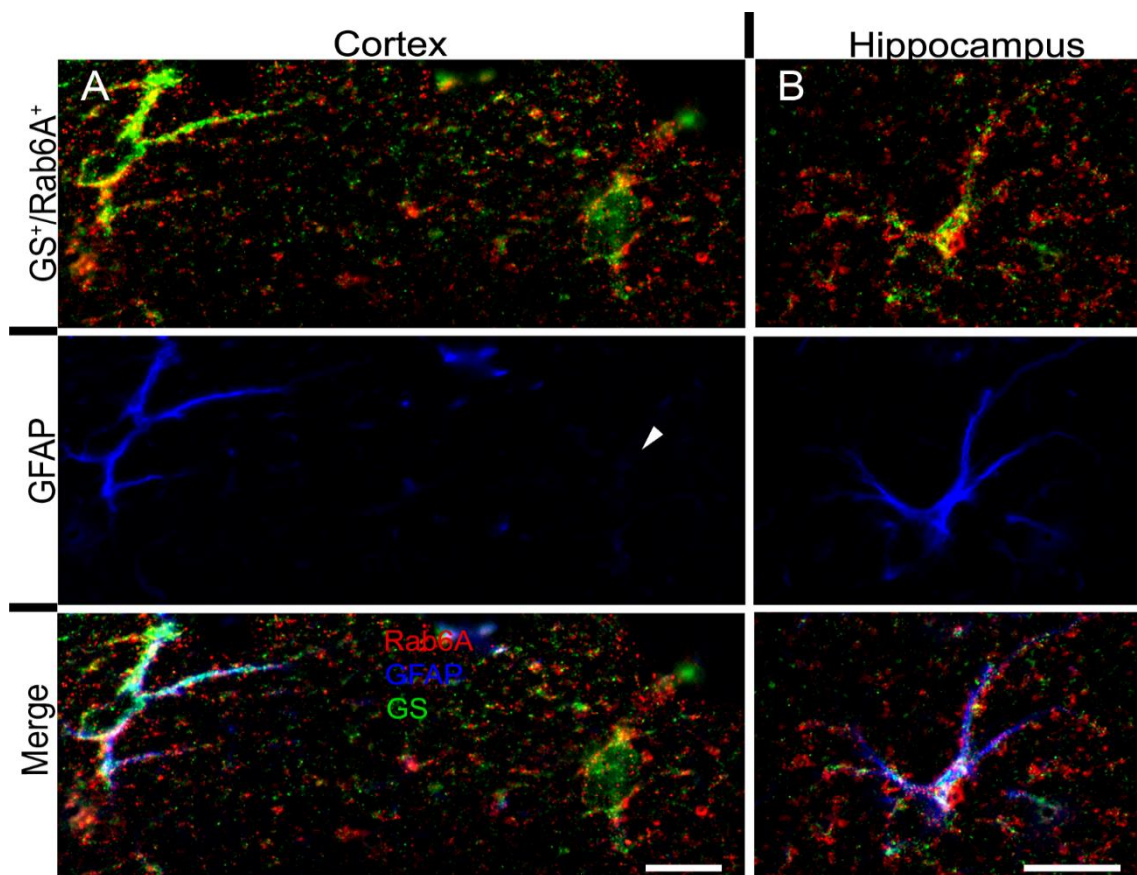


Abbildung 12 - Kolokalisation von GS⁺/Rab6A⁺-Astrozyten und GFAP

Immunzytochemische Färbung von Rab6A (rot), GFAP (blau) und GS (grün) an Astrozyten. Die Astrozyten (Reihe A und B) werden in den entsprechenden Einzelkanalbildern, sowie im überlagerten Mehrkanalbild (Merge) gezeigt. Spalte A zeigt zwei GS⁺/Rab6A⁺-Astrozyten des Cortex. Nach Betrachtung der gleichen Stelle im GFAP-Farbkanal, ist der rechte Astrozyt nicht mehr sichtbar (Pfeilspitze). Das überlagerte Mehrkanalbild zeigt, dass im Cortex sowohl GS⁺/Rab6A⁺/GFAP⁺-Astrozyten (links) als auch GS⁺/Rab6A⁺/GFAP⁻-Astrozyten (rechts) vorkommen. Spalte B zeigt einen GS⁺/Rab6A⁺-Astrozyten des Stratum oriens der CA1-Region. Hier zeigt sich nach Überlagerung mit dem GFAP-Farbkanal, dass im Hippocampus nur GS⁺/Rab6A⁺/GFAP⁺-Astrozyten vorhanden sind.

Maßstab: 10 µm (A und B).

3.3.3 Rab6A in Aldh1L1⁺-Astrozyten

Da in der Literatur diskutiert wird, ob GS neben Astrozyten auch andere Zellen färbt,¹⁵⁴ wurde als nächstes die Lokalisation von Rab6A in Aldh1L1⁺-Astrozyten überprüft. Dabei ist Aldh1L1 laut Cahoy et al.¹⁰⁷ ein pan-astroglialer Marker, der spezifisch alle Astrozyten färbt. Allerdings wurde die Untersuchung von Cahoy et al.¹⁰⁷ von anderen Gruppen nicht systematisch repliziert, jedoch der Marker schon häufig zur astrozytären Färbung genutzt.

In Blindauswertung wurden im Grünkanal, welcher die zu untersuchenden Aldh1L1⁺-Astrozyten anzeigt, markante Astrozyten ausgewählt (Abb. 10C). Im Rab6A-Farbkanal wurde die mögliche Doppelmarkierung überprüft (Abb. 10C, Rab6A). Das Mehrkanalbild zeigt eine deutliche Kolo-kalisation von Aldh1L1⁺-Astrozyten und Rab6A (Abb. 10 C, Merge). Es wurden 6 Doppelhemisphären von drei Tieren verwendet. Die untersuchten Regionen sind Cortex, Corpus callosum, Hippocampus und Thalamus. Es wurden insgesamt 1120 Aldh1L1⁺-Astrozyten einzeln untersucht (Tabelle 6). Die Untersuchung ergab hierbei, dass in den Hirnregionen Cortex, Corpus callosum und Thalamus jeder Aldh1L1⁺-Astrozyt auch Rab6A⁺ ist (Diagramm 6).

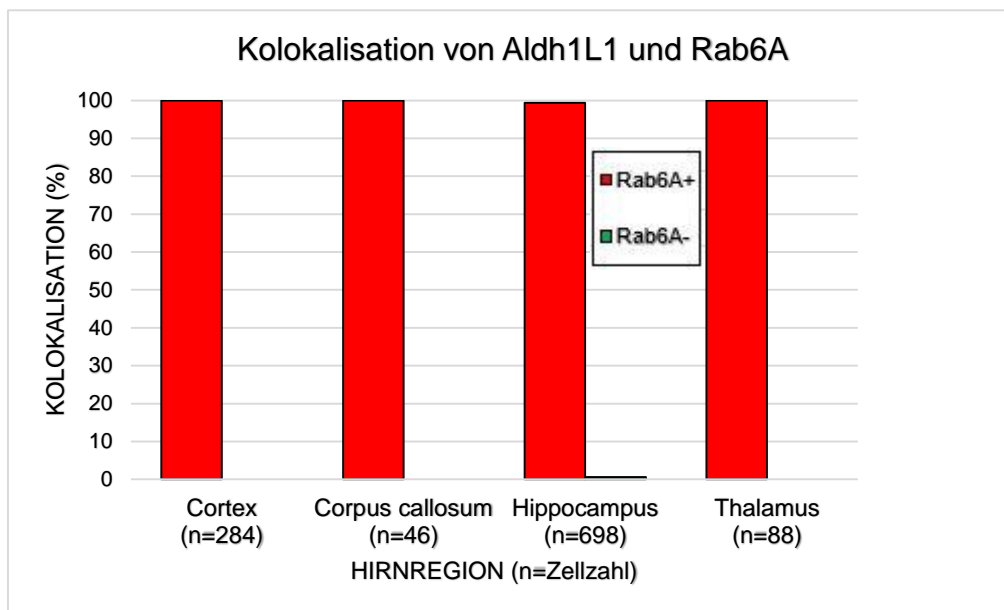


Diagramm 6 - Lokalisation von Rab6A in Aldh1L1⁺-Astrozyten

Jeder untersuchte Aldh1L1⁺-Astrozyt der Regionen Cortex, Corpus callosum und Thalamus ist Rab6A⁺. In diesen Regionen fand sich kein einziger Aldh1L1⁺/Rab6A⁻-Astrozyt. Vier der untersuchten 698 Aldh1L1⁺-Astrozyten des Hippocampus sind Rab6A⁻. Alle Aldh1L1⁺-Astrozyten wurden nach Hirnregion einzeln überprüft und stammen aus 6 Schnitten von 3 Tieren (n=Zellzahl).

Im Hippocampus hingegen sind vier der untersuchten Aldh1L1⁺-Zellen Rab6A⁻. Dies entspricht einem Prozentsatz von 0,57. Die vier Aldh1L1⁺/Rab6A⁻-Zellen kommen allesamt in der Fascia dentata des Hippocampus vor. Sie zeigen ein deutlich abgegrenztes Territorium in dem kein Rab6A vorhanden ist (Abb. 13A, Pfeil). Das wird sowohl in der Nähe des Zellkörpers (Abb. 13B, Pfeil) als auch an den Fortsätzen im vergrößerten Ausschnitt besonders sichtbar (Abb. 13, Pfeil). In direkter Nachbarschaft zu diesen Zellen kommen einige Aldh1L1⁺/Rab6A⁺/GFAP⁺-Astrozyten vor (Abb. 13A, Pfeilspitze).

Mehr als 99% der hier untersuchten Aldh1L1⁺-Astrozyten sind Rab6A⁺, sodass davon ausgegangen werden kann, dass Aldh1L1⁺-Astrozyten Rab6A⁺ sind.

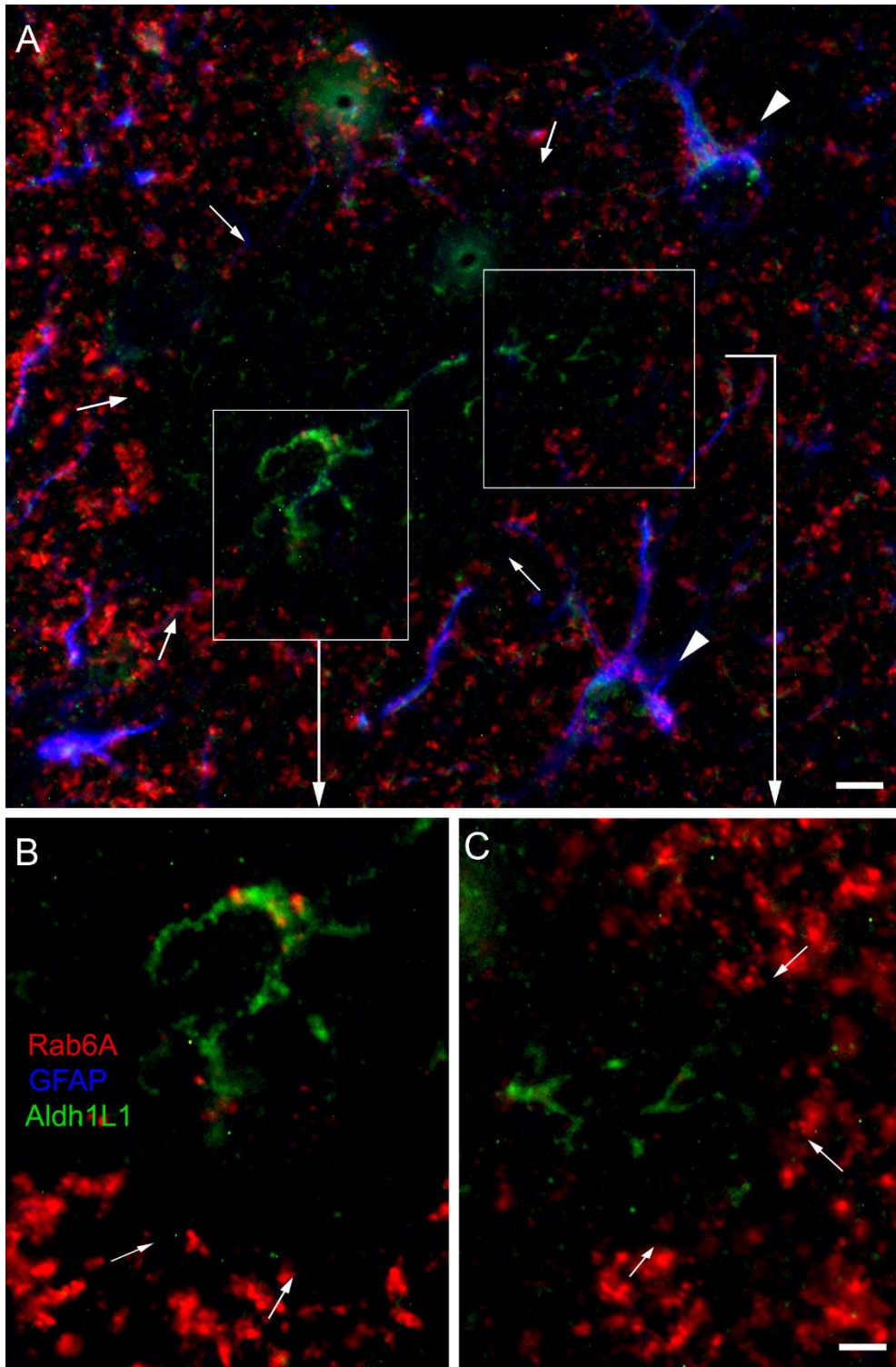


Abbildung 13 - Vereinzelt Aldh1L1⁺-Zellen sind Rab6A⁻ und GFAP⁻
 Immunzytochemische Färbung von Rab6A (rot), GFAP (blau) und Aldh1L1 (grün). In der Fascia dentata des Hippocampus kommen vereinzelt Aldh1L1⁺-Zellen vor, die Rab6A⁻ und GFAP⁻ sind (A). Das Territorium der Aldh1L1⁺-Zelle ist scharf abgegrenzt und Rab6A⁻ (A, Pfeil). In hohen Vergrößerungen des Zellkörpers (B, Pfeil) und der Fortsätze (C, Pfeil) wird diese Grenze noch

deutlicher. In direkter Nachbarschaft sind Aldh1L1⁺/Rab6A⁺/GFAP⁺-Astrozyten lokalisiert (A, Pfeilspitze).

Maßstab: 1 µm (A), 3 µm (C, für B und C).

GFAP in Aldh1L1⁺/Rab6A⁺-Astrozyten

Als nächstes wurde untersucht, ob die untersuchten Aldh1L1⁺/Rab6A⁺-Astrozyten auch GFAP⁺ sind. Es wurde in Blindauswertung der Blaukanal, welcher die GFAP⁺ Färbung anzeigt über vorausgewählte Aldh1L1⁺/Rab6A⁺-Astrozyten gelegt. So wurde überprüft, wieviele Astrozyten doppelt- oder dreifach markiert sind. Von den 1116 blind vorausgewählten Aldh1L1⁺/Rab6A⁺-Astrozyten sind 824 GFAP⁺ und 292 GFAP⁻ (Diagramm 7). Es zeigt sich eine ähnliche Verteilung wie bei den GS⁺/Rab6A⁺-Astrozyten. Im Cortex und Thalamus sind sowohl Aldh1L1⁺/Rab6A⁺/GFAP⁺-Astrozyten als auch Aldh1L1⁺/Rab6A⁺/GFAP⁻-Astrozyten vorhanden (Abb. 14A). Im Hippocampus und Corpus callosum wurden nur Aldh1L⁺/Rab6A⁺/GFAP⁺-Astrozyten detektiert (Abb. 14 B).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass nicht alle Aldh1L1⁺/Rab6A⁺-Astrozyten auch GFAP⁺ sind.

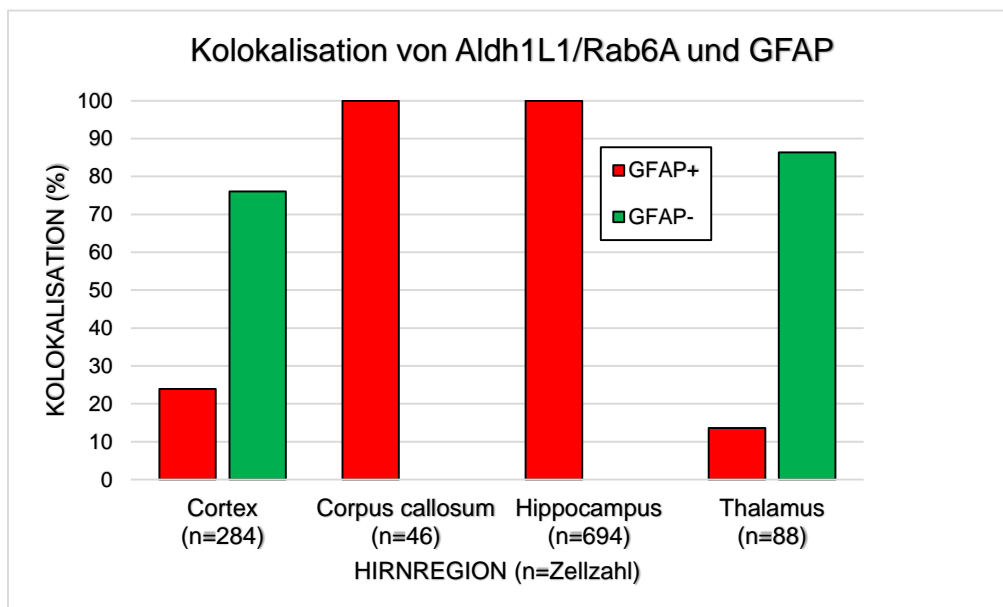


Diagramm 7 - Lokalisation von GFAP in Aldh1L1⁺/Rab6A⁺-Astrozyten

Im Cortex und Thalamus ist nicht jeder untersuchte Aldh1L1⁺/Rab6A⁺-Astrozyt auch GFAP⁺. Im Corpus callosum und Hippocampus ist jeder untersuchte

Aldh1L1⁺/Rab6A⁺-Astrozyt auch GFAP⁺. Alle Aldh1L1⁺/Rab6A⁺-Astrozyten wurden nach Hirnregion einzeln überprüft und stammen aus 6 Schnitten von 3 Tieren (n=Zellzahl).

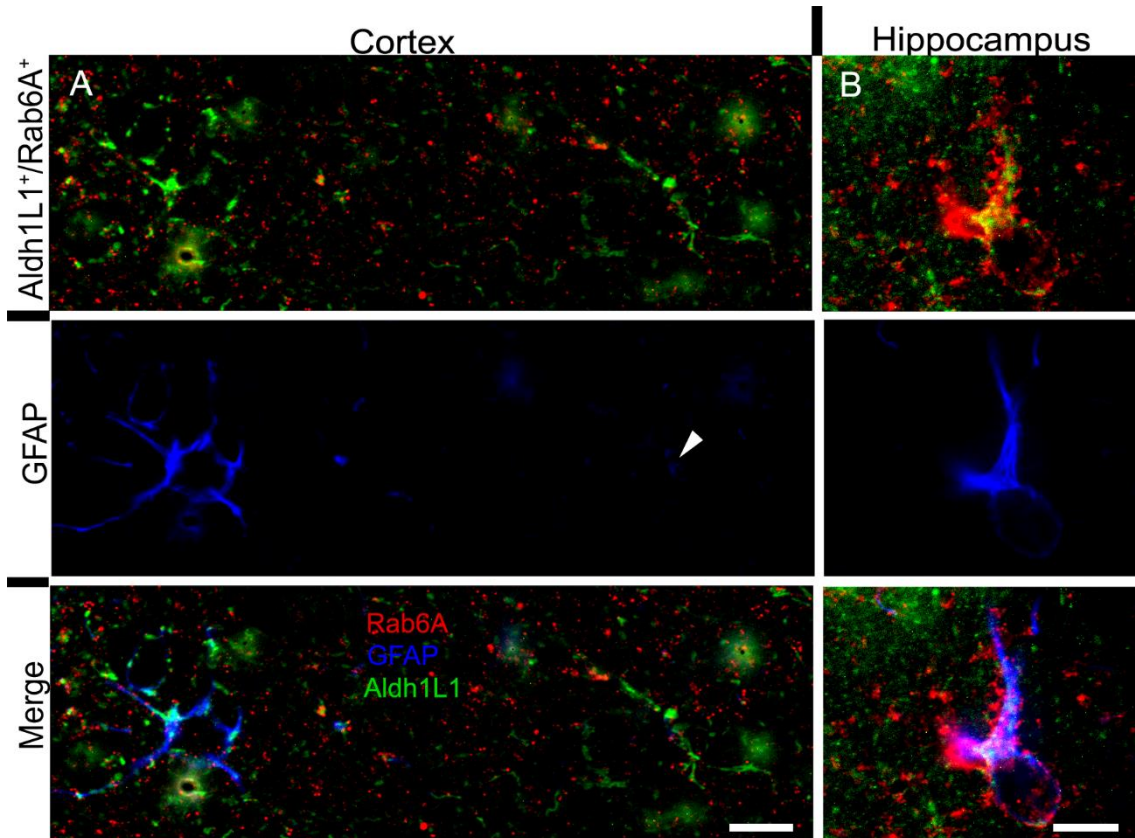


Abbildung 14 - Kolokalisation von Aldh1L1⁺/Rab6A⁺-Astrozyten mit GFAP
Immunzytochemische Färbung von Rab6A (rot), GFAP (blau) und Aldh1L1 (grün). Die Astrozyten (Reihe A und B) werden in den entsprechenden Einzelkanalbildern, sowie im überlagerten Mehrkanalbild (Merge) gezeigt. Spalte A zeigt zwei Aldh1L1⁺/Rab6A⁺-Astrozyten des Cortex. Nach Betrachtung der gleichen Stelle im GFAP-Farbkanal, ist der rechte Astrozyt nicht mehr sichtbar (Pfeilspitze). Das überlagerte Mehrkanalbild zeigt, dass im Cortex sowohl Aldh1L1⁺/Rab6A⁺/GFAP⁺-Astrozyten (links) als auch Aldh1L1⁺/Rab6A⁺/GFAP⁻-Astrozyten (rechts) vorkommen. Spalte B zeigt einen Aldh1L1⁺/Rab6A⁺-Astrozyten des Stratum oriens der CA1-Region. Hier zeigt sich nach Überlagerung mit dem GFAP-Farbkanal, dass im Hippocampus nur Aldh1L1⁺/Rab6A⁺/GFAP⁺-Astrozyten vorhanden sind. Maßstab: 10 µm (A), 5 µm (B).

3.3.4 Rab6A in Sox9⁺-Astrozyten

Nachdem die durchgeführten Untersuchungen nahelegen, dass Rab6A in allen Astrozyten lokalisiert ist, sollte dieser Befund unter Verwendung des Kernmarkers anti-Sox9 zusätzlich validiert werden. Sox9, ein vorwiegend nukleärer Transkriptionsfaktor, wurde als pan-astroglialer Kernmarker veröffentlicht, wobei die Autoren diesen Befund molekularbiologisch überzeugend und ausreichend validiert haben.¹⁵⁵

Es wurden erneut die Regionen Cortex, Corpus callosum, Hippocampus und Thalamus der drei Tiere untersucht. Bei 20x Vergrößerung weisen die morphologischen Befunde im Rab6A Kanal auf das typische Bild von Astrozyten, mit Betonung ihrer peripheren Fortsätze hin. Die Einzelzellen sind nicht klar erkennbar, sondern werden allenfalls angedeutet (Abb. 15A). Die Aussparungen der astrozytären Kerne werden von Sox9 ausgefüllt (Abb. 15B). In Blindauswertung wurden insgesamt 6174 Sox9⁺-Astrozyten einzeln auf Doppelmarkierung mit Rab6A untersucht (Tabelle 6). Alle Sox9⁺-Astrozyten sind Rab6A⁺ (Diagramm 8). Die Untersuchung bekräftigt die oben gewonnenen Ergebnisse, dass Rab6A in allen Astrozyten lokalisiert ist.

Das Sox9 färbt den astrozytären Kern nicht gleichmäßig, sondern weist intranukleäre Aussparungen auf (Abb. 15D, Pfeilspitze). Bei Doppelmarkierung mit Bisbenzimidin akkumuliert es an einzelnen Stellen stärker (Abb. 15E, Pfeilspitze). Bisbenzimidin färbt alle Kerne jeglicher Zellarten, wobei die alleinige Färbung keine Aussage über den Zelltypen macht. Bei Überlagerung der beiden Farbkanäle werden die Sox9⁺ Aussparungen innerhalb des Kerns durch das stark akkumulierte Bisbenzimidin komplementär ausgefüllt (Abb. 15F). Eine mögliche Erklärung liegt darin, dass das Bisbenzimidin vorzugsweise das Heterochromatin anfärbt. Dabei handelt es sich um verdichtetes Chromatin im Zellkern. Die Desoxyribonukleinsäure liegt dabei in gebundener Form vor wodurch die Erbinformation weitgehend inaktiv ist. Sox9 als Transkriptionsfaktor ist wiederum im Euchromatin besonders aktiv. Dies stellt den aufgelockerten Bereich des Zellkerns dar, wo sich die meisten Gene und fast die gesamte (transkriptionelle) Genaktivität befindet. Dadurch ist denkbar, dass Sox9 in manchen Bereichen des Zellkerns Aussparungen aufweist.

Tabelle 6 - Anzahl der untersuchten Astrozyten

	GFAP ⁺	GS ⁺	Aldh1L1 ⁺	Sox9 ⁺
Zellanzahl	3742	3536	1116	6174
Doppelhemisphären	12	6	6	6
Tiere	3	3	3	3

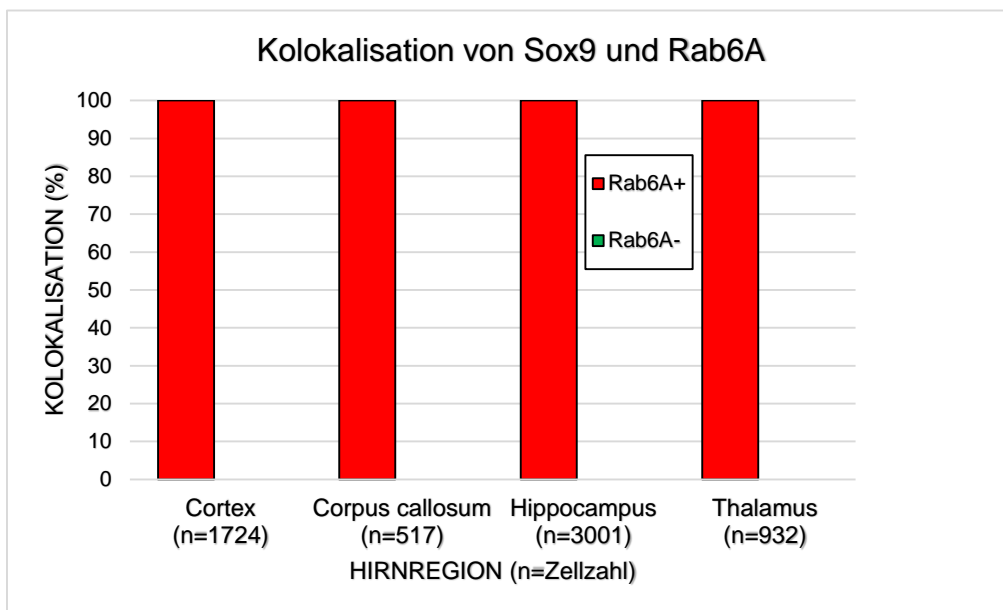


Diagramm 8 - Lokalisation von Rab6A in Sox9⁺-Astrozyten

Jeder untersuchte Sox9⁺-Astrozyt ist Rab6A⁺. Es findet sich kein einziger Sox9⁺/Rab6A⁻-Astrozyt. Alle Sox9⁺-Astrozyten wurden nach Hirnregion einzeln überprüft und stammen aus 6 Schnitten von 3 Tieren (n=Zellzahl).

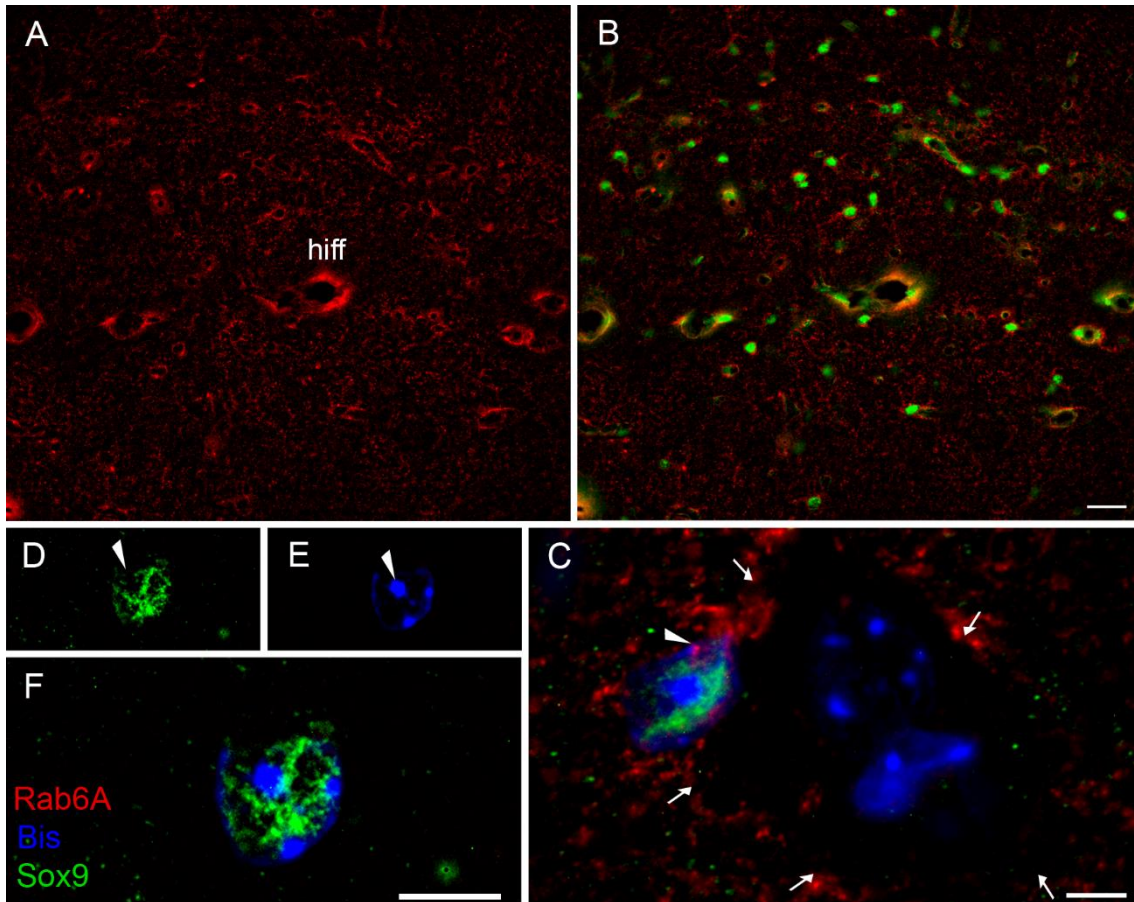


Abbildung 15 - Kolokalisation von Sox9 mit Rab6A

Immunzytochemische Färbung von Rab6A (rot), Bisbenzimidin (blau) und Sox9 (grün). Bei der Färbung mit Rab6A in 20x Vergrößerung (A) werden die Aussparungen in der Kernregion der Astrozyten schon sichtbar. Diese werden durch Sox9 vollständig gefüllt (B). In der Sox9⁺ Färbung kommt es zu Aussparungen innerhalb des Kerns (D, Pfeilspitze). Bei der Färbung mit Bisbenzimidin sind akkumulierte Bereiche sichtbar (E, Pfeilspitze). Die Überlagerung der beiden Kanäle zeigt deutlich, dass die akkumulierten Bereiche des Bisbenzimidins die Aussparungen des Sox9 komplementär ergänzen (F). Bisbenzimidin⁺/ Sox9⁺-Zellen weisen um den mit Bisbenzimidin markierten Kern eine deutliche Rab6A⁻ Aussparung auf, was für eine Abwesenheit von Rab6A in diesen Zellen spricht (Pfeile in C, ein vermutliches Neuron). Demgegenüber ist selbst das dünne perinukleäre Zytoplasma benachbarter Sox9⁺-Astrozyten völlig von Rab6A ausgefüllt (C, Pfeilspitze). hiff, hippocampale fissur. Maßstab: 50 μ m (B, für A und B), 5 μ m (C; F, für D-F).

3.4 Klassifikation der Rab6A⁺ Puncta

3.4.1 Morphologie und subzelluläre Verteilung

Astrozyten unterscheiden sich in Größe und subzellulärem Verteilungsmuster der Rab6A⁺ Strukturen, was besonders in der subzellulären Verteilung zwischen der perinukleären Region, den astrozytären Haupt- und Nebenfortsätzen und den peripheren astrozytären Fortsätzen deutlich wird. Anhand dieser Unterschiede konnte eine Klassifizierung der Rab6A⁺ Strukturen in vier Typen vorgenommen werden, die in absteigender Häufigkeit vorkommen (Tabelle 7).

Die Rab6A⁺ Puncta des Typs I weisen eine gleich groß erscheinende Form auf. Sie verteilen sich gleichmäßig im Astrozyten und sind perinukleär (Abb. 16A-C, Pfeilspitze), an den Hauptfortsätzen (Abb. 16A-C, Pfeil), an den peripheren astrozytären Fortsätzen und der Zellgrenze lokalisiert. Die Rab6A⁺ Puncta des Typs I kommen in dieser Untersuchung am häufigsten vor. Auch das Territorium des Astrozyten zeichnet sich durch Rab6A⁺ Puncta gleichmäßiger Größe ab. Die GS⁺ Markierung dient hier der Sichtbarmachung der peripheren Fortsätze. Man erkennt die alternierende Anordnung der GS⁺ und Rab6A⁺ Puncta und deren Assoziation innerhalb der peripheren Fortsätze, nur an wenigen Stellen erkennt man ihre Verbindung zu den Hauptfortsätzen (Abb. 16A-C).

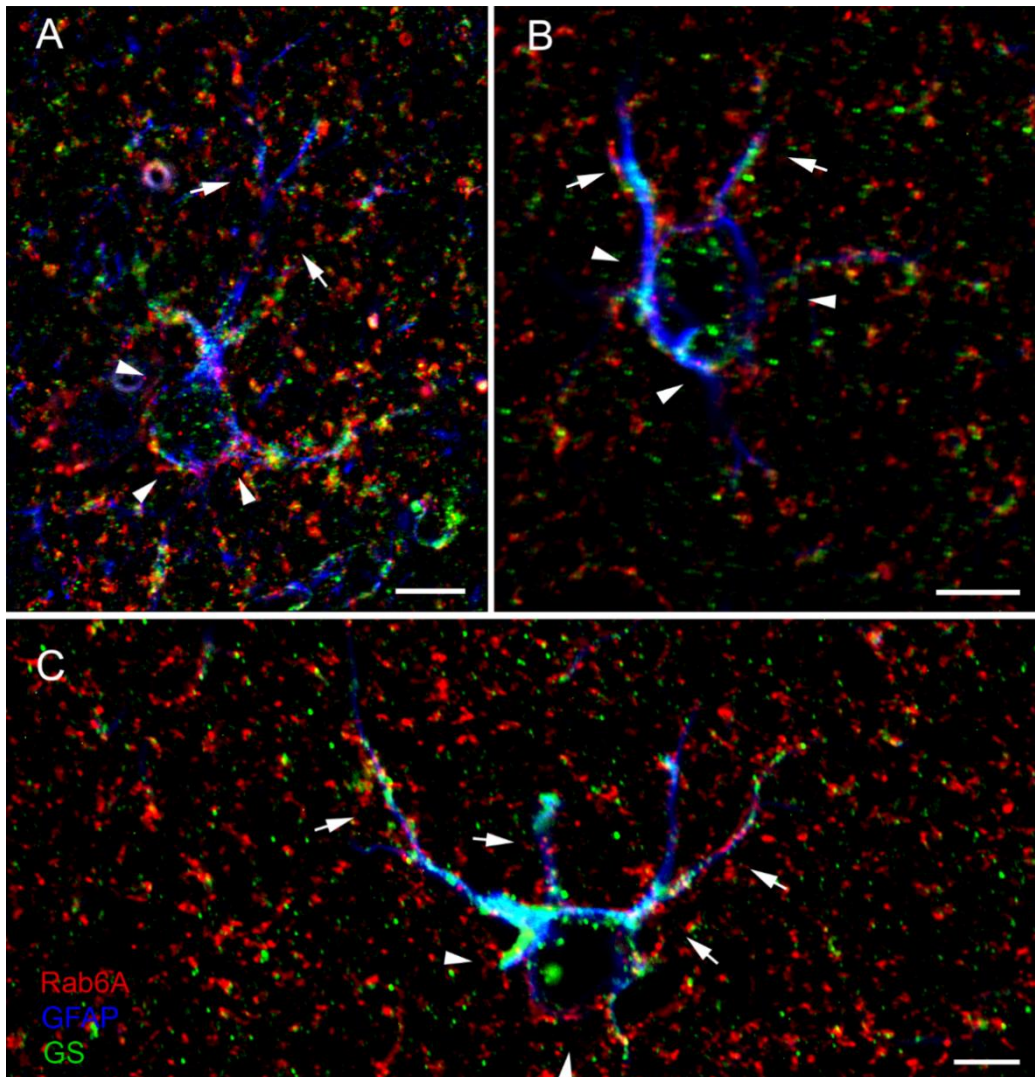


Abbildung 16 - Typ I der Rab6A⁺ Strukturen

Immunzytochemische Färbung von Rab6A (rot), GFAP (blau) und GS (grün).

Typ I zeichnet sich durch gleich groß erscheinende Rab6A⁺ Puncta aus. Diese kommen dabei gleichmäßig perinukleär (A-C, Pfeilspitze) und in den Haupt- und peripheren Fortsätzen (A-C, Pfeil) vor. Die peripheren Fortsätze im astrozytären Territorium sind durch GS⁺ Markierung (grün) identifiziert, nur an wenigen Stellen erkennt man ihre Verbindung zu den Hauptfortsätzen.

Maßstab: 10 µm (A, C), 5 µm (B).

Typ II kommt am zweithäufigsten vor. Auch hier stellt sich die Rab6A⁺ Struktur als eine rundliche, Vesikel-ähnliche Form dar. Die Rab6A⁺ Puncta finden sich wieder perinukleär, an den Haupt- und peripheren Fortsätzen und der Zellgrenze. Im Vergleich zu Typ I gruppieren sich die Puncta des Typs II clusterförmig um die Hauptfortsätze (Abb. 17A-C, Pfeil) und nehmen dabei unterschiedliche Größen

ein. Auch perinukleär finden sich clusterförmige Anordnungen (Abb. 17A, B, Pfeilspitze). Das Territorium des Astrozyten zeichnet sich durch Rab6A⁺ Puncta gleichmäßiger Größe ab.

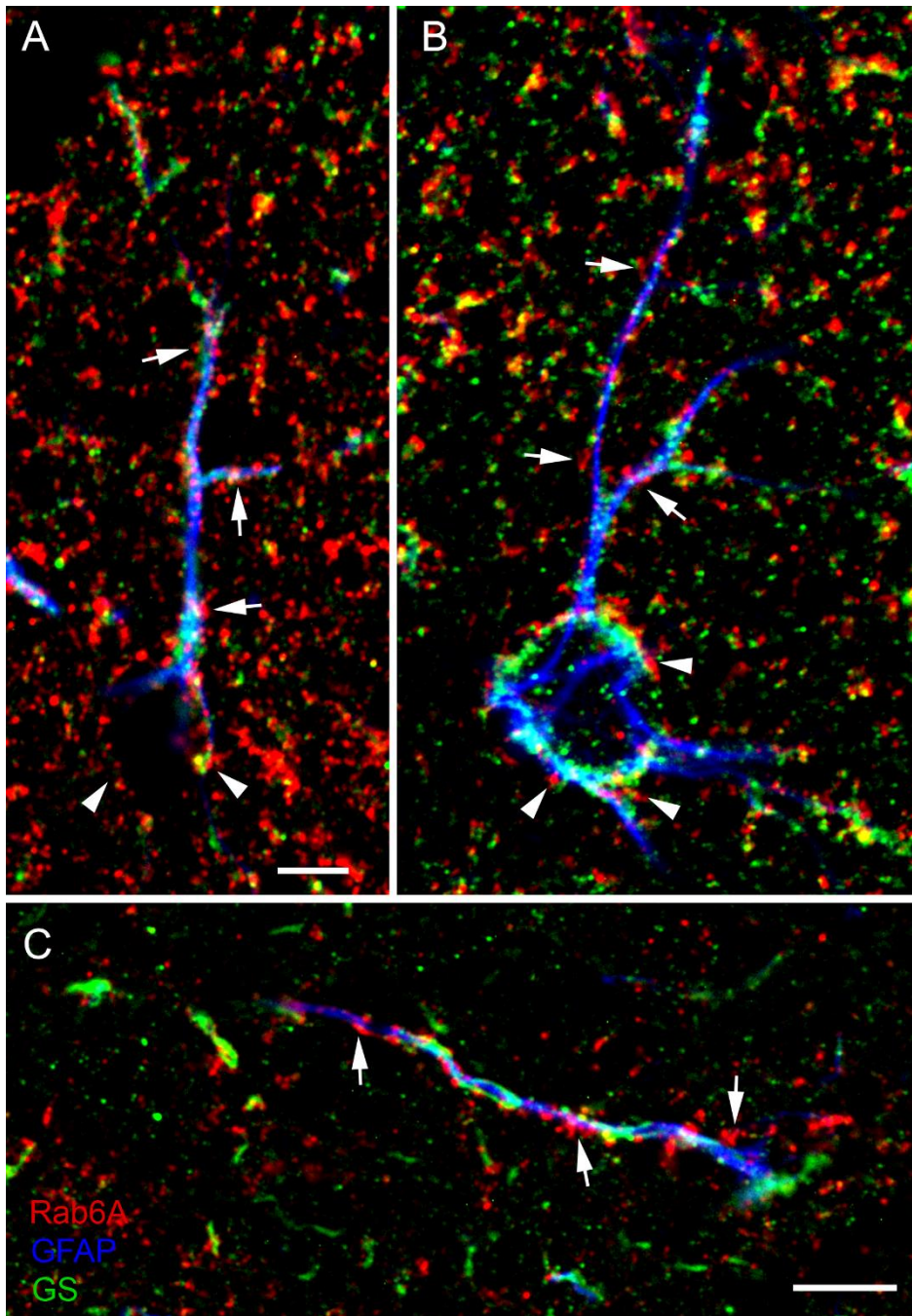


Abbildung 17 -Typ II der Rab6A⁺ Strukturen

Immunzytochemische Färbung von Rab6A (rot), GFAP (blau) und GS (grün).

Typ II zeichnet sich durch Rab6A⁺ Puncta unterschiedlicher Größe aus. Sie kommen clusterförmig in der perinukleären Region (A-C, Pfeilspitze) und in den Haupt- und peripheren Fortsätzen (A-C, Pfeil) vor.

Maßstab: 5 µm (A), 10 µm (C, für B und C).

An einem geringen Anteil der hier untersuchten Astrozyten zeigt sich der Typ III. Hier nimmt Rab6A auch eine rundliche, Vesikel-ähnliche Form an. Das Rab6A⁺ Signal ist jedoch perinukleär und an der Zellgrenze des Astrozyten besonders stark und stellt sich als ungleichmäßig vorkommende Cluster dar (Abb. 18A, B, Pfeilspitze). Die Cluster sind teilweise doppelt oder mehrfach so groß wie direkt benachbarte. An den astrozytären Hauptfortsätzen und den PAP finden sich ebenmäßig verteilte Rab6A⁺ Puncta gleichmäßiger Größe (Abb. 18B, Pfeil); mitunter sind beim Typ III diese Puncta in den Fortsätzen nur spärlich anzutreffen (Abb. 18A, Pfeil). Auch beim Typ III verteilen sich Rab6A⁺ Puncta im astrozytären Territorium.

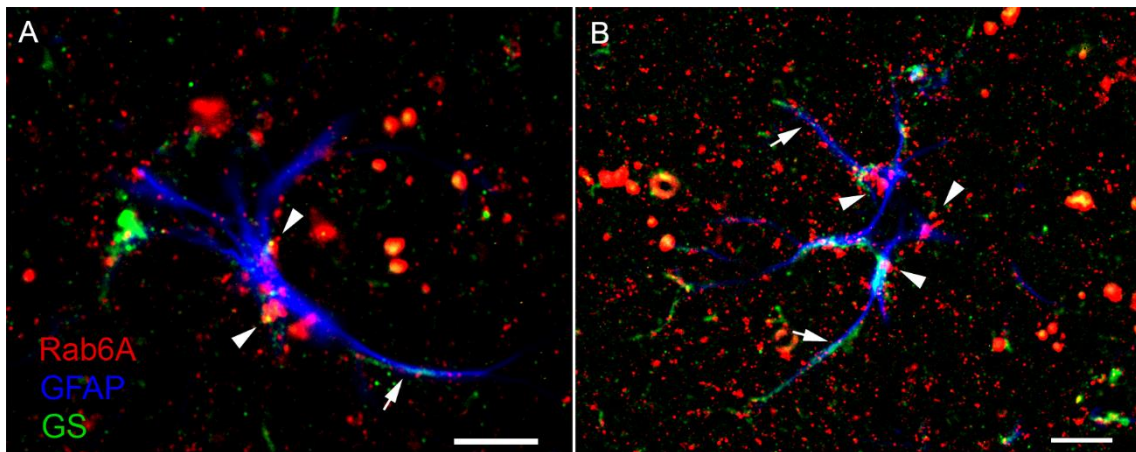


Abbildung 18 - Typ III der Rab6A⁺ Strukturen

Immunzytochemische Färbung von Rab6A (rot), GFAP (blau) und GS (grün).

Typ III der Rab6A-IR zeigt perinukleär ungleichmäßig vorkommende Rab6A⁺ Puncta, wobei benachbarte Puncta teilweise doppelt oder mehrfach so groß erscheinen (B, Pfeilspitze). An den astrozytären Hauptfortsätzen und den PAP finden sich gleichmäßig, mitunter nur spärlich verteilte Rab6A⁺ Puncta gleicher Größe, (A).

Maßstab: 5 µm (A), 10 µm (B).

An einem sehr geringen Anteil der Astrozyten zeigt sich der Typ IV. Hierbei finden sich sowohl an den astrozytären Hauptfortsätzen als auch an den fein verzweigten PAP kaum Rab6A⁺ Puncta (Abb. 19A, B, Pfeil) und daher im Vergleich zu den anderen Typen auch kaum Rab6A⁺ Puncta im astrozytären Territorium. Perinukleär finden sich vereinzelte, stark in der Größe variierende, scharf abgegrenzte Rab6A⁺ Puncta, die auch meist als Cluster zusammengelagert sind und nur auf einer Seite des Kerns liegen (Abb. 19A, B, Pfeilspitze). Auch wenn wenig Puncta vorkommen, sind sie hier offensichtlich größer als bei den Typen I-III.

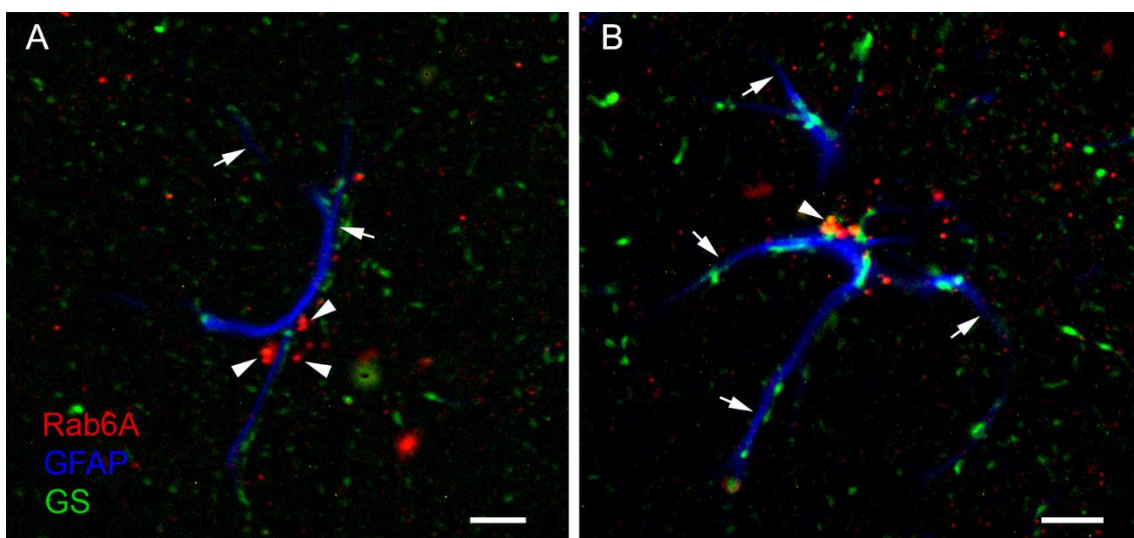


Abbildung 19 - Typ IV der Rab6A⁺ Strukturen

Immunzytochemische Färbung von Rab6A (rot), GFAP (blau) und GS (grün).

Typ IV weist perinukleär ungleichmäßige und in Clustern vorkommende Rab6A⁺ Puncta unterschiedlicher Größe auf, die meist als Cluster zusammengelagert auf nur einer Seite des Kerns vorkommen (A+B, Pfeilspitze). An den Hauptfortsätzen und PAP sind geringe bis wenige Rab6A⁺ Puncta vorhanden (A+B, Pfeil).

Maßstab: 5 µm (A und B).

Tabelle 7 - Morphologie und subzelluläre Verteilung der Rab6A⁺ Strukturen

Typ	Morphologie	subzelluläre Verteilung
I	<ul style="list-style-type: none"> - gleichmäßige Größe - Fläche: 2,5 µm² - Anzahl*: 123 	<ul style="list-style-type: none"> - gleichmäßig verteilt - perinukleär, an den Hauptfortsätzen, PAPs, der Zellgrenze und dem astrozytären Territorium
II	<ul style="list-style-type: none"> - unterschiedliche Größe - Fläche: 3,0 µm² - Anzahl*: 104 	<ul style="list-style-type: none"> - teilweise clusterförmige Gruppierung - perinukleär, an den Hauptfortsätzen, PAPs, der Zellgrenze und dem astrozytären Territorium
III	<ul style="list-style-type: none"> - teilweise doppelt oder mehrfach so groß wie direkt benachbarte Strukturen perinukleär und an der Zellgrenze - gleichmäßige Größe an den Hauptfortsätzen und den PAPs - Fläche: 2,6 µm² - Anzahl*: 107 	<ul style="list-style-type: none"> - ungleichmäßig perinukleär und an der Zellgrenze - gleichmäßig an Hauptfortsätzen, PAPs und astrozytären Fortsätzen - in den Fortsätzen mitunter nur spärlich anzutreffen
IV	<ul style="list-style-type: none"> - große Größen - Fläche: 4,3 µm² - Anzahl*: 9 	<ul style="list-style-type: none"> - Spärlich bis gar nicht in Hauptfortsätzen und PAPs - clusterförmig auf einer Seite des Kerns - kaum im astrozytären Territorium

**Anzahl der Rab6A⁺ Puncta pro ROI*

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Morphologie der Rab6A⁺ Puncta in vier Typen eingeteilt werden kann, wobei eine absteigende Häufigkeit vorliegt. Die Klassifikation ist nicht regionenspezifisch. Sowohl im Endhirn als auch im Thalamus kommen die vier Typen in absteigender Häufigkeit vor. Auch findet sich kein Unterschied zwischen der grauen und weißen Substanz. Die Typen kommen nicht massiert oder kumuliert, sondern zufallsverteilt im Gewebe vor. Eine Nähe zu bestimmten Strukturen wie Gefäße, Pia oder weiße Substanz konnte nicht festgestellt werden. Die Befunde wurden in allen untersuchten Tieren gewonnen und repliziert.

3.4.2 Quantitative Auswertung der Befunde

Zusätzlich zur morphologischen Beschreibung der vier Typen wurde eine quantitative Auswertung der Rab6A⁺ Puncta durchgeführt (siehe 2.6.4). Dabei wurden pro Typ zehn ROI mit gut erkennbaren Rab6A⁺/GFAP⁺-Astrozyten und deren Fortsätze ausgewählt und eingestellt (Abb. 20A). Der Rab6A-Farbkanal wurde isoliert, sodass nur noch die Rab6A⁺ Puncta im Rotkanal sichtbar sind (Abb. 20B). Mittels der Software ImageJ wurden die „lokalen Intensitätsmaxima“ der ROI bestimmt und ein binäres Bild mit den markierten Maxima erstellt (Abb. 20C). Innerhalb der Rab6A⁺ Puncta konnten somit die lokalen Maxima in der Intensität bestimmt und clusterförmig angeordnete Rab6A⁺ Puncta als einzelne Puncta erkannt werden. Nach vorher bestimmten Einstellungen (siehe 2.6.4) wurden die Flächen der Rab6A⁺ Puncta ausgewertet. Die Rab6A⁺ Puncta eines ROI, die in die Auswertung eingeflossen sind wurden rot markiert (Abb. 20D). Die gewonnenen Größen dienen dabei rein zur Unterscheidung der vier Typen, da sie aufgrund der Auflösungsgrenzen nicht zwangsläufig die Punctagröße wiedergeben, welche sich elektronenmikroskopisch bestimmen ließe (siehe 4.2.2).

Pro Typ wurden die Rab6A⁺ Puncta von 10 ROI mit gut erkennbaren Rab6A⁺/GFAP⁺-Astrozyten und deren Fortsätze untersucht. Dabei wurde pro ROI die Minimal-, Maximal- und Mittelwerte sowie die Standardabweichung der Flächen der Rab6A⁺ Puncta ermittelt. Zum Schluss wurden die Mittelwerte der zehn untersuchten ROI gebildet, welche in Tabelle 8 dargestellt sind (Tabelle 8).

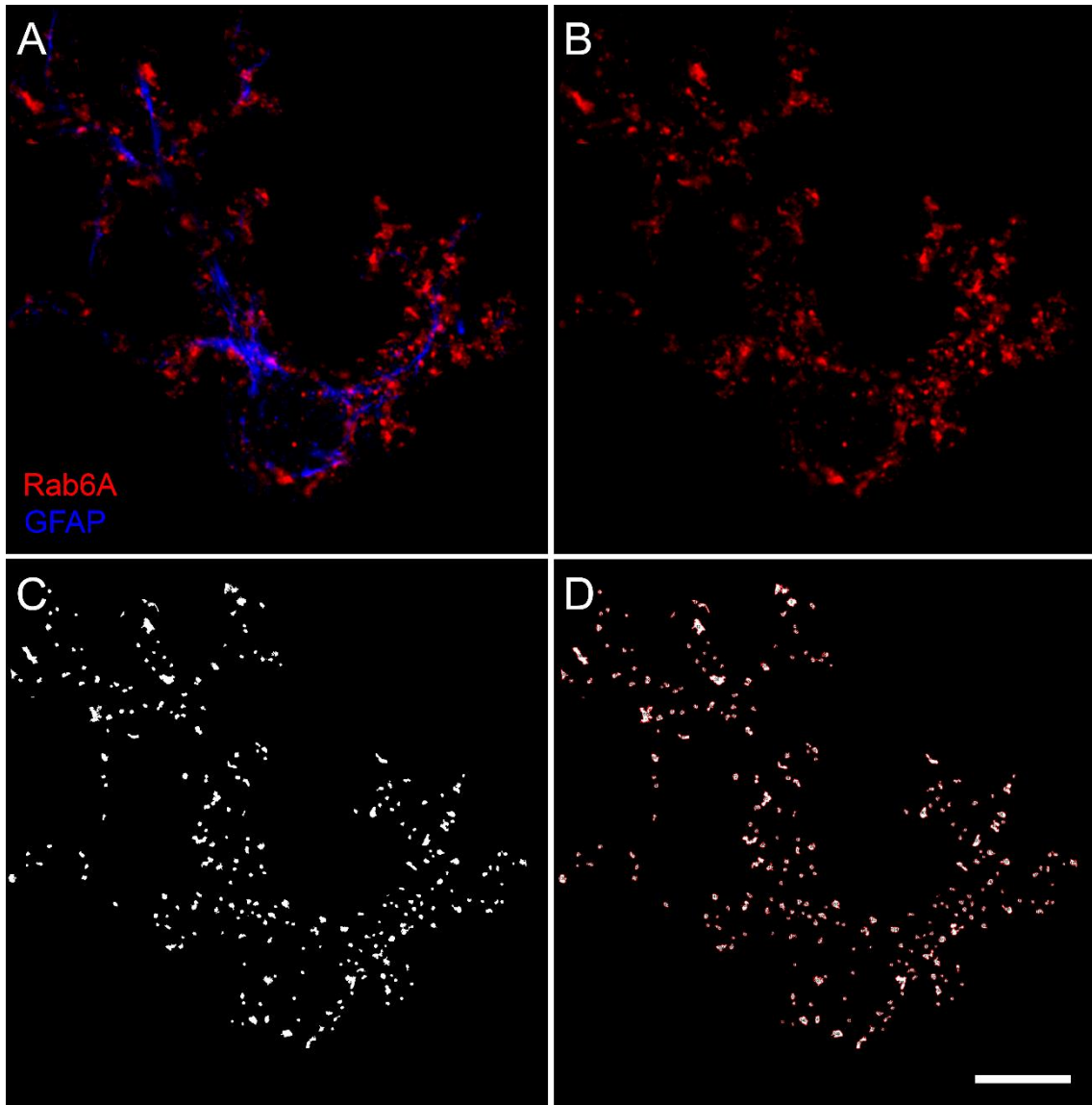


Abbildung 20 - Vorgehensweise zur quantitativen Auswertung der Rab6A+ Strukturen

Immunzytochemische Färbung von Rab6A (rot) und GFAP (blau). Gut erkennbare Rab6A+/GFAP+–Astrozyten und deren Fortsätze wurden als ROI ausgewählt und eingestellt (A). Nach Isolierung des Rab6A-Farbkanals (B), wurden die „lokalen Intensitätsmaxima“ innerhalb der Rab6A+ Färbung bestimmt (C) und eine Auswertung der Rab6A+ Puncta durchgeführt (D). Die roten Umrandungen in D zeigen die Rab6A+ Puncta nach Einstellung der Parameter, die in der Auswertung verwendet wurden.

Maßstab 10 µm (D, für A-D).

Tabelle 8 - Mittelwerte der quantitativen Auswertung der Rab6A⁺ Puncta

Typ	I	II	III	IV
Fläche in μm^2 (\pm SD, min, max)	2,5 (\pm 2,4; 0,3; 15,5)	3,0 (\pm 3,8; 0,4; 21,4)	2,6 (\pm 2,8; 0,5; 17,7)	4,3 (\pm 3,8; 1,5; 11,7)
Anzahl*	123	104	70	9

SD= Standardabweichung, min= Minimum, max= Maximum; *Anzahl der Rab6A⁺ Puncta pro ROI

Quantitative Auswertung der Flächen der Rab6A⁺ Puncta

Im Mittel liegen die Flächen zwischen 2,5 μm^2 und 4,3 μm^2 (Tabelle 8). Dabei haben die Rab6A⁺ Puncta des Typs IV mit 4,3 μm^2 die größten Flächen. Die Flächen der Rab6A⁺ Puncta des Typs III liegen mit einem Mittelwert von 2,6 μm^2 zwischen denen des Typs I mit 2,5 μm^2 und denen des Typs II mit 3,0 μm^2 . Die Minimalwerte der Flächen der Rab6A⁺ Puncta der Typen I bis III liegen mit Werten von 0,3 μm^2 , 0,4 μm^2 und 0,5 μm^2 nah beieinander. Die Flächen der Rab6A⁺ Puncta des Typs IV weist Minimalwerte von 1,5 μm^2 auf, welcher deutlich über den anderen Minimalwerten liegt. Die Maximalwerte liegen zwischen 11,7 μm^2 und 21,4 μm^2 . Dabei haben die Rab6A⁺ Puncta des Typs IV mit 11,7 μm^2 den geringsten Maximalwert. Die Rab6A⁺ Puncta des Typs III liegen mit 17,7 μm^2 zwischen Typ I mit 15,5 μm^2 und Typ II mit 21,4 μm^2 .

Wie in Diagramm 9 dargestellt unterscheiden sich die Rab6A⁺ Puncta des Typs I in ihrer Fläche hochsignifikant von den Rab6A⁺ Puncta der Typen II ($p < 0,002$) und IV ($p < 0,000003$). Die Rab6A⁺ Puncta des Typs I unterscheiden sich nicht signifikant ($p < 0,14$) von denen des Typs III. Eine Tendenz, die einen Unterschied zwischen den Rab6A⁺ Puncta des Typs II mit denen der Typen III und IV erkennen ließe ist denkbar, wird durch das Signifikanzniveau ($p < 0,077$) aber knapp verfehlt. Die Rab6A⁺ Puncta des Typs III unterscheiden sich hochsignifikant von den Rab6A⁺ Puncta des Typs IV ($p < 0,0003$).

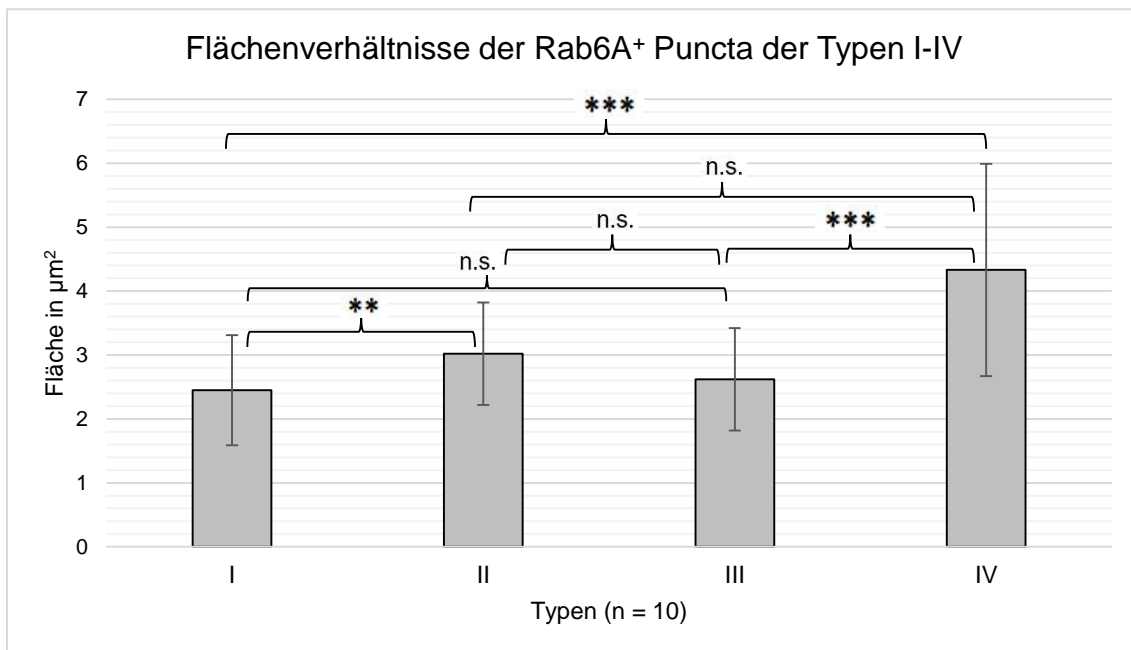


Diagramm 9 - Flächen der Rab6A+ Puncta

Übersicht der Flächen der Rab6A+ Puncta in μm^2 nach Typen unterteilt. Jeder der vier Balken repräsentiert die Messung innerhalb eines Types. Signifikanztest durch Kruskal-Wallis-Test mit post-hoc-Test und anschließender Bonferroni-Holm-Korrektur, (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$ und (***) $p < 0,001$. n.s. nicht signifikant. „n“ entspricht der Anzahl der untersuchten ROI je Typ.

Quantitative Auswertung der Anzahl der Rab6A+ Puncta

Die GFAP+–Astrozyten des Typs I sind im Schnitt mit 123 Rab6A+ Puncta assoziiert (Diagramm 10). Die Anzahl unterscheidet sich nicht signifikant vom Typ II ($p=0,44$), bei dem im Schnitt 104 Rab6A+ Puncta vorkommen. Bei Typ III sind 70 Rab6A+ Puncta mit GFAP+–Astrozyten assoziiert. Die Anzahl unterscheidet sich hochsignifikant zu Typ I ($p > 0,001$) und signifikant zu Typ II ($p < 0,05$). Typ IV hat im Schnitt 9 Rab6A+ Puncta. Die Anzahl unterscheidet sich hochsignifikant zu den Typen I ($p < 0,000001$), II ($p < 0,000001$) und III ($p < 0,00007$).

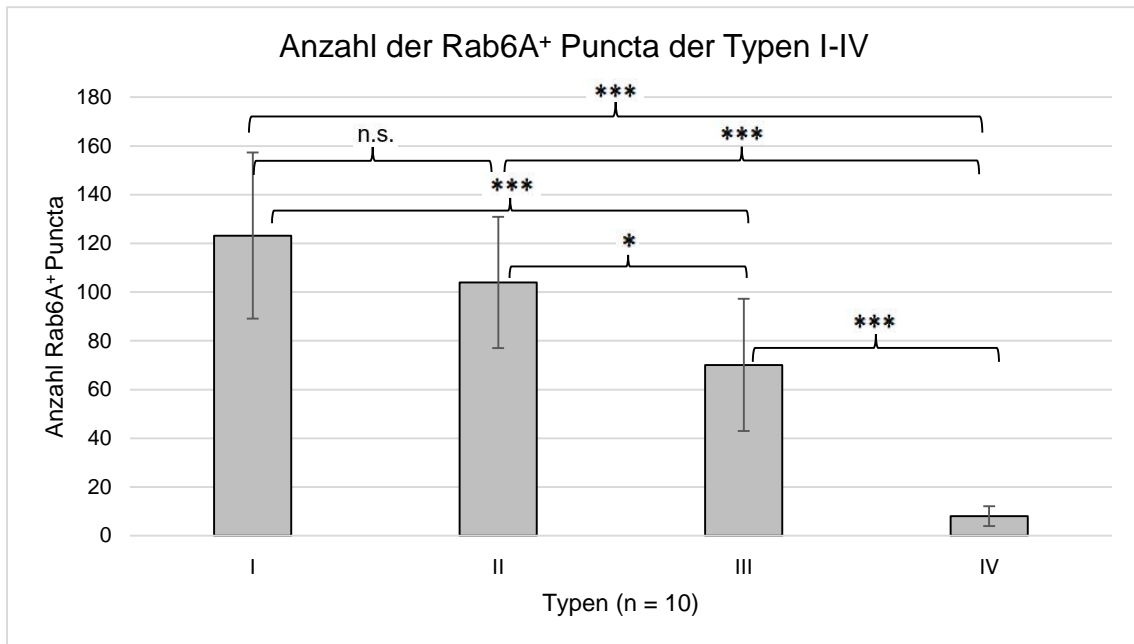


Diagramm 10 - Anzahl der Rab6A+ Puncta pro Typ

Anzahl der Rab6A+ Puncta pro Typ. Jeder der vier Balken repräsentiert die Messung innerhalb eines Types. Signifikanztest parametrischer unifaktorieller Varianzanalyse (ANOVA), (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$ und (***) $p < 0,001$. n.s. nicht signifikant. „n“ entspricht der Anzahl der untersuchten Astrozyten je Typ.

Die anfänglich qualitative Unterteilung der Rab6A+ Strukturen in vier Typen, die anhand von Aufnahmen der Astrozyten vorgenommen wurde, konnte durch die hier durchgeführte quantitative Auswertung und deren Ergebnis bestätigt werden. Die Astrozyten unterscheiden sich nicht nur in Größe und subzellulärem Verteilungsmuster der Rab6A+ Strukturen, sondern auch in der Anzahl der vorkommenden Rab6A+ Strukturen pro Astrozyten, sodass eine Unterteilung in vier Typen als sinnvoll zu erachten ist.

3.5 Rab6A ist spezifisch in Astrozyten lokalisiert

Da die Lokalisation von Rab6A in allen untersuchten Astrozyten bestätigt wurde, sollte nun überprüft werden, ob Rab6A auch in anderen Zelltypen lokalisiert ist. Untersucht wurden Mikrogliazellen, Oligodendrozyten und NG2-Zellen.

3.5.1 Mikroglia

Zunächst wurde die Mikroglia aus mehreren Kryostatschnitten des Isocortex von zwei Mäusen in Doppelmarkierung mit dem spezifischen Mikrogliamarker anti-Iba1 und dem zu untersuchenden anti-Rab6A Antikörper gefärbt und ausgewertet. Da eine Kontrollfärbung ohne den Primärantikörper anti-Rab6A schon in den vorherigen Versuchen durchgeführt wurde und die Astrozyten in der Rab6A⁺ Färbung ansonsten massiv Rab6A⁺ gefärbt waren, wurde an dieser Stelle auf eine erneute Durchführung der Kontrollfärbung verzichtet. Im dokumentierten Material wurden am Bildschirm im Iba1-Farbkanal gut erkennbare Mikrogliazellen identifiziert und markiert. Im nächsten Schritt wurde der Rab6A-Farbkanal eingestellt und über den Iba1-Farbkanal gelegt und nur an den zuvor markierten Zellen die Doppelfärbung ausgewertet. Im Rahmen dieser Färbung wurde die Lokalisation von Rab6A in 511 Mikrogliazellen einzeln überprüft (Tabelle 9). 61,06% der Mikroglia zeigt ein Signal im Rab6A-Farbkanal (Abb. 21A, Pfeilspitze), wohingegen 38,94% kein Signal aufweisen (Abb. 21B). Bei den 61,06% positiven Mikrogliazellen kommen vereinzelte, selten zwei sehr starke, große Signale vor, welche eng perinukleär lokalisiert sind.

Tabelle 9 - Zellanzahl der untersuchten anderen Gliazelltypen

	Iba1 ⁺ Ansatz I	Iba1 ⁺ Ansatz II	Iba1 ⁺ Ansatz III	Iba1 ⁺ Ansatz IV	NG2 ⁺	CNPase ⁺
Zellanzahl	569	166	181	219	299	1385
DH	2	2	2	2	4	6
Tiere	3	3	3	3	2	5

DH = Doppelhemisphäre

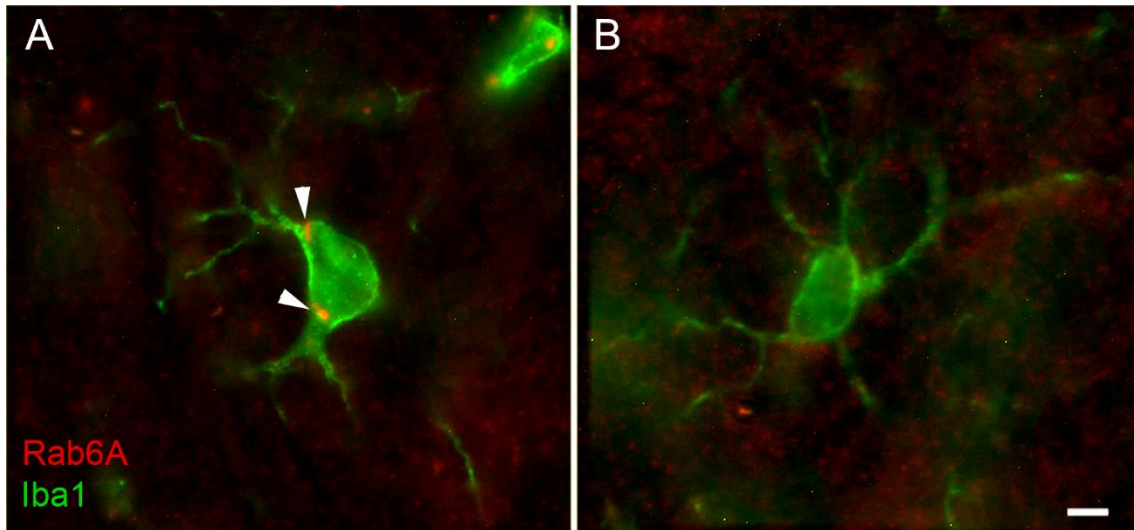


Abbildung 21 - Doppelimmunfluoreszenz an Mikroglia an Kryostatschnitten
 Immunzytochemische Färbung von Rab6A (rot) und Iba1 (grün) an Mikroglia. Rund 61% der untersuchten Mikroglia zeigt ein Signal im Rab6A-Farbkanal (A, Pfeilspitze), wohingegen knapp 39% kein Signal aufweisen (B). Maßstab: 5 µm (B, für A und B).

Laut den obigen Ergebnissen würde Rab6A demnach in zwei Drittel der Mikrogliazellen lokalisiert und in einem Drittel nicht lokalisiert sein. Da es sich um 3D Überlagerungen aus tieferen Schnittschichten handeln könnte wurde der Versuch an Vibratomschnitten wiederholt, die im Gegensatz zu den Kryostatschnitten nicht permeabilisiert wurden. Dabei wurde wie oben bereits beschrieben vorgegangen und zum Vergleich wieder kortikale Mikrogliazellen untersucht. Um zu überprüfen, ob der positive Rab6A Befund in Mikroglia auch in Vibratomschnitte vorkommt, wurde zunächst nur eine geringe Anzahl von insgesamt 58 Mikrogliazellen untersucht. Hier zeigt sich ein ähnliches Ergebnis wie in den Kryostatschnitten. 65,51% der untersuchten Mikroglia weist ein Signal im Rab6A-Farbkanal auf (Abb. 22A, Pfeilspitze) 34,48% hingegen nicht (Abb. 22B). Auffällig an der mikroglialen Rab6A⁺ Markierung ist, dass sich das Signal ähnlich wie im obigen Experiment an Kryostatschnitten darstellt. Auch hier kommt das Signal als ein einzelner, großer Punkt eng perinukleär vor. Weiterhin kommt es nicht gleichmäßig über die Zelle verteilt vor und zeigt auch keine zysternen-ähnliche Anordnung, wie es bei der Funktion, die Rab6A ausübt zu erwarten wäre und bei den Astrozyten zu sehen ist (Abb. 22C).

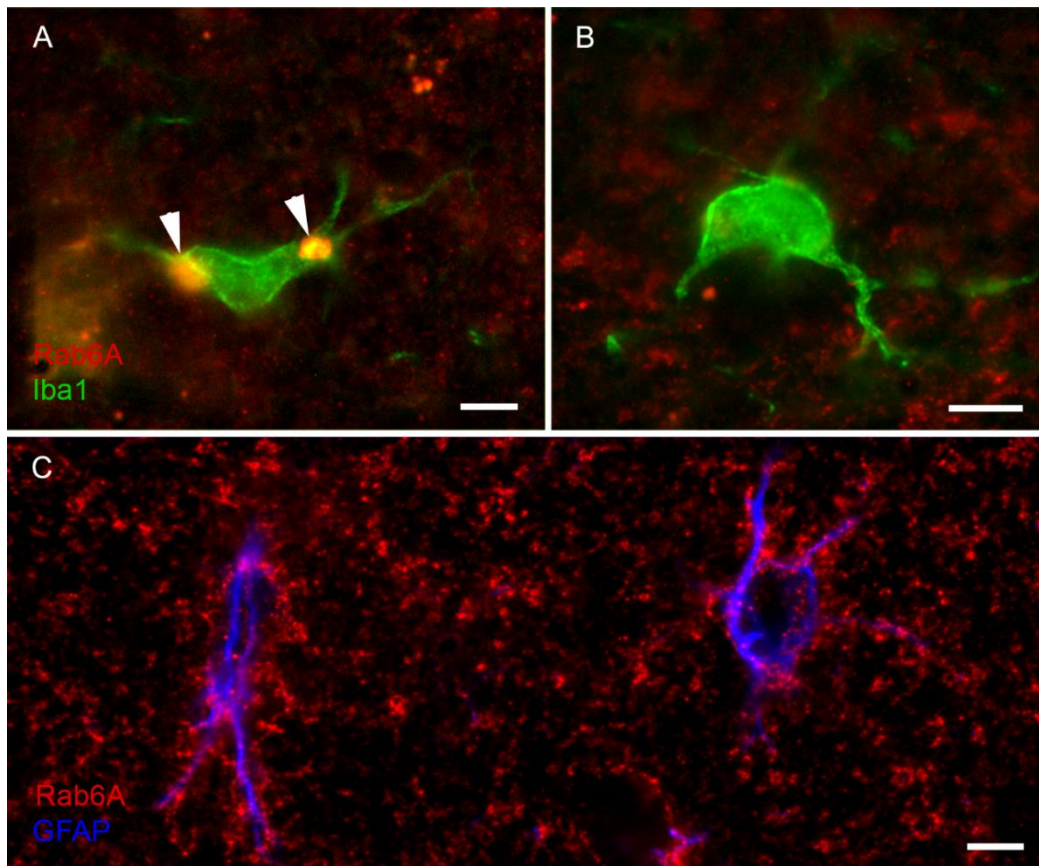


Abbildung 22 - Doppelimmunfluoreszenz an Mikroglia und Astrozyten an Vibratomschnitten

Immunzytochemische Färbung von Rab6A (rot) und Iba1 (grün) an Mikroglia (A und B) und Rab6A (rot) und GFAP (blau) an Astrozyten (C). Auch an Vibratomschnitten zeigt 2/3 der untersuchten Mikroglia ein Signal im Rab6A-Farbkanal (A, Pfeilspitze), wohingegen 1/3 dieses Signal nicht aufweist (B). Auffällig ist, dass sich dieses Signal deutlich zu dem typischen, in Astrozyten vorkommenden Signal unterscheidet (C).

Maßstab: 5µm (A und B), 10 µm (C).

Da sich die Rab6A⁺ Färbung in den Vibratomschnitten der gleichen untersuchten Tiere an Mikroglia bedeutend anders als an Astrozyten darstellt, wurde in einem Wiederholungsversuch zusätzlich eine Kontrolle ohne anti-Rab6A Antikörper angefertigt. Dabei zeigt sich unerwartet auch in der Kontrollfärbung des Rab6A-Farbkanals ein deutliches Signal perinukleär in den Mikrogliazellen (Abb. 23A, Pfeil), welches dem zuvor beobachtetem Signal ähnelt natürlich ohne die astrozytäre Rab6A⁺ Markierung.

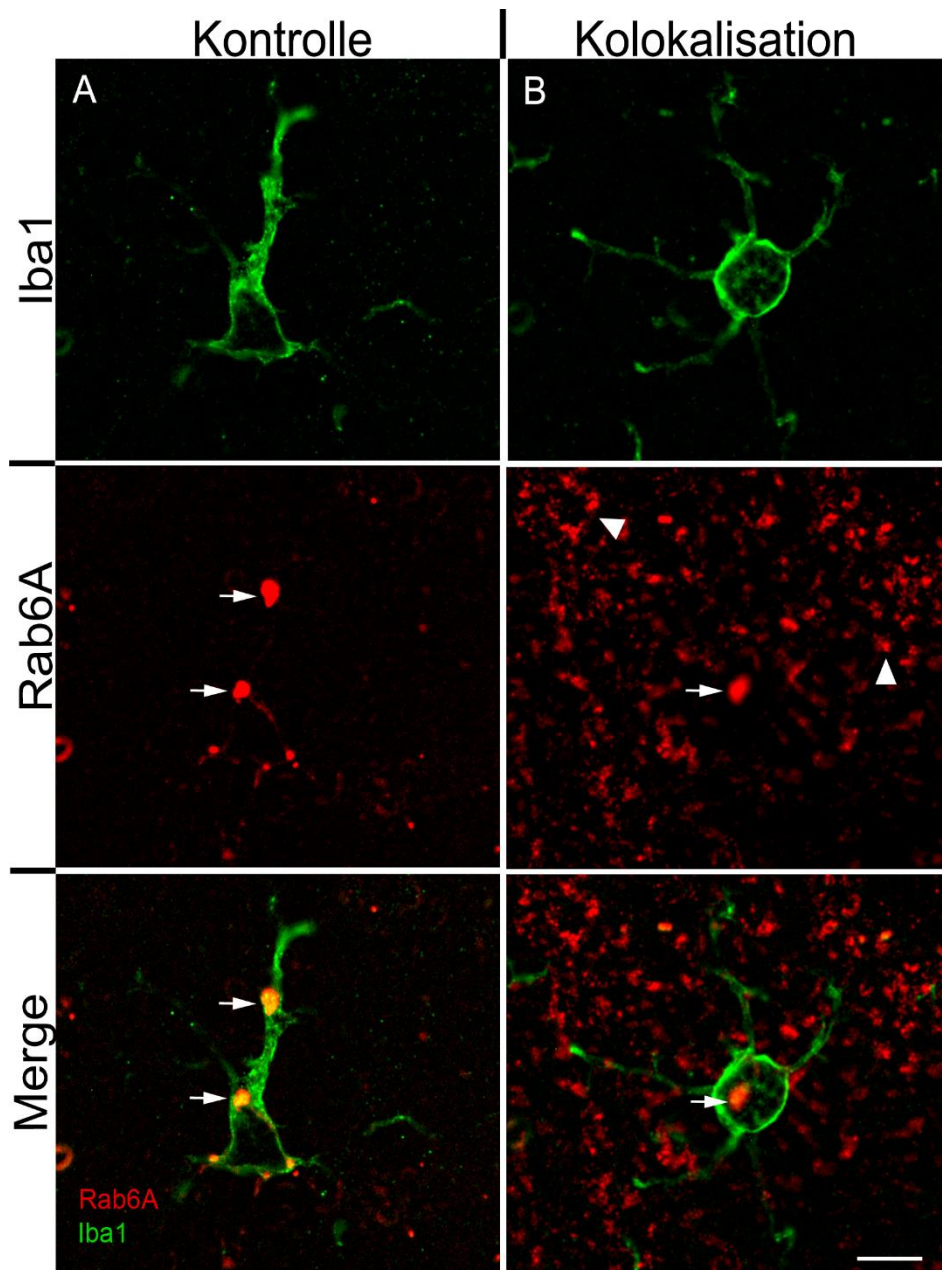


Abbildung 23 - Falsch positive Kolokalisation von Iba1 und Rab6A

Immunzytochemische Färbung von Rab6A (rot) und Iba1 (grün) an Mikroglia.

Spalte A zeigt die entsprechenden Einzelkanalbilder sowie das überlagerte Mehrkanalbild (Merge) der Kontrolle ohne anti-Rab6A Antikörper, Spalte B der Doppelfärbung. Sowohl in der Kontrolle als auch in der Doppelfärbung zeigt sich ein deutliches Rab6A⁺ Signal perinukleär in der Mikrogliazelle (A und B, Pfeil). In der rechten Spalte stellt sich eine intensivere Rab6A⁺ Färbung dar als links, was für ein spezifisches Signal spricht (B, Pfeilspitze).

Maßstab: 10 µm (B, für A und B).

Da sich in der Färbung mit dem anti-Rab6A Antikörper eine intensive Rab6A⁺ Färbung außerhalb der Mikroglia darstellt (Abb. 23B, Pfeilspitze) und das starke, sehr große und untypische Signal sowohl in der Rab6A⁺ Färbung als auch in der Kontrolle ohne anti-Rab6A Antikörper eng perinukleär am Zellkörper vorkommt, kann eine selektive, unspezifische Immunfluoreszenz in Mikroglia vermutet werden. Um diese Annahme weiter zu untersuchen, wurden vier verschiedene Ansätze - mit unterschiedlichen Sekundärantikörper - in verschiedenen Farbkanälen untersucht. Dabei wurde je Ansatz eine Doppelfärbung und eine Kontrollfärbung ohne anti-Rab6A Antikörper durchgeführt. Alle vier Ansätze wurden identisch vorbehandelt und unterscheiden sich nur in der Wahl der Sekundärantikörper (Tabelle 10).

Tabelle 10 - Antikörperansätze der Doppelimmunfärbung an Mikroglia

	Primärantikörper	Sekundärantikörper
Ansatz I	Maus-anti-Rab6A Ziege-anti-Iba1	Esel-anti-Maus-Cy3 Esel-anti-Ziege-Dy 488
Ansatz II		Pferd-anti-MausBiotin + Streptavidin-Cy3 Esel-anti-Ziege-Dy 488
Ansatz III		Esel-anti-Maus-Alexa 647 Pferd-anti-Ziege-Biotin + Streptavidin-Cy3
Ansatz IV		Esel-anti-Maus-Alexa 488 Pferd-anti-Ziege-Biotin + Streptavidin-Cy3

Ansatz I gleicht dabei den oben verwendeten Antikörpern mit selektiver, unspezifischer Rab6A Mikroglia-Markierung (Diagramm 11). In Ansatz II wurden 166 Mikrogliazellen einzeln überprüft und ausgewertet (Tabelle 9). Davon zeigen 21,69% der Zellen das selektive, unspezifische in Mikroglia vorkommende Rab6A⁺ Signal und 78,31% nicht. Bei den 78,31% stellt sich in der Rab6A⁺ Färbung eine deutliche Aussparung der Mikrogliazelle dar (Abb. 24B, Pfeilspitze). Auch in der Kontrolle zeigt sich an vereinzelt Mikrogliazellen dieses selektive, unspezifische Signal (Abb. 24A, Pfeil). Generell wird jedoch deutlich, dass dieses

Signal in den Kontrollen von Ansatz II in weniger Mikrogliazellen vorkommt als in den Kontrollen von Ansatz I.

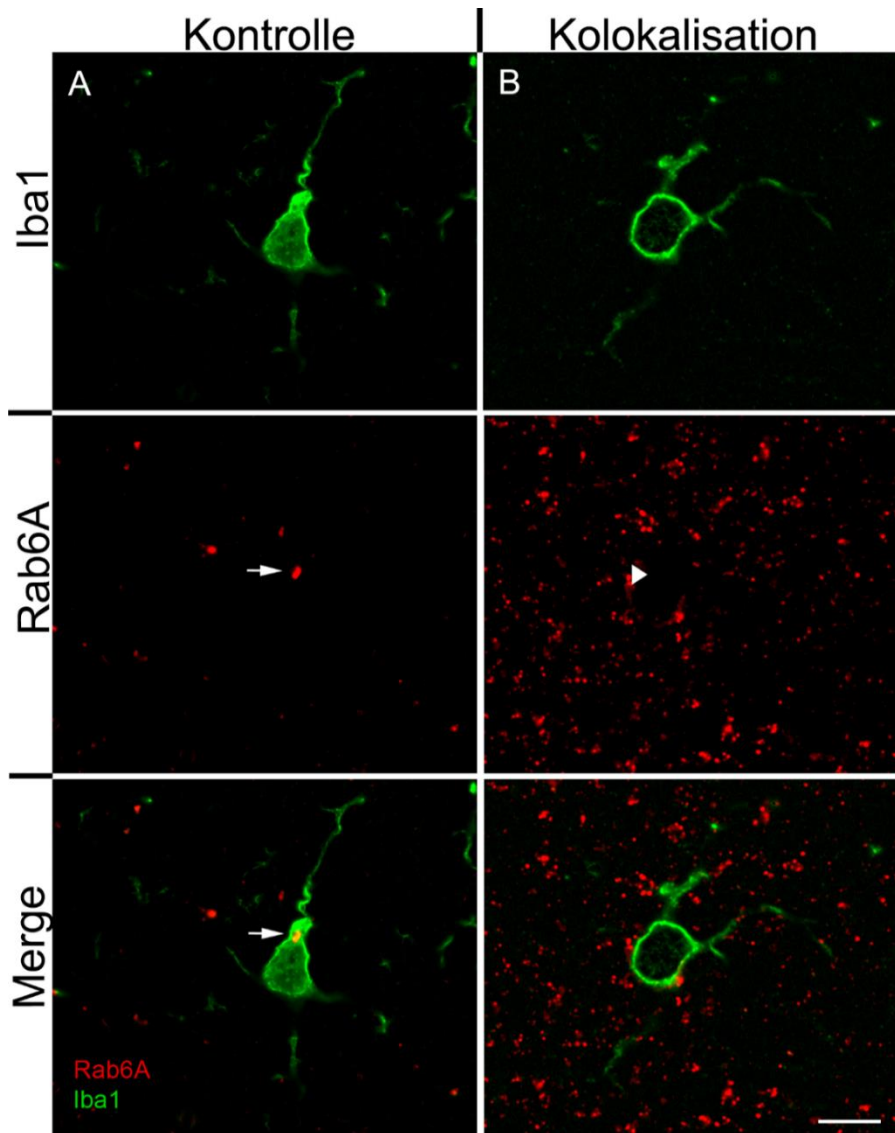


Abbildung 24 - Falsch positive Kokalisation von Iba1 und Rab6A in Ansatz

II

Immunzytochemische Färbung von Rab6A (rot) und Iba1 (grün) an Mikroglia.

Spalte A zeigt die entsprechenden Einzelkanalbilder sowie das überlagerte Mehrkanalbild (Merge) der Kontrolle ohne anti-Rab6A Antikörper, Spalte B der Doppelfärbung. Auch in Ansatz II zeigt die Kontrolle an vereinzelt Mikrogliazellen das selektive, unspezifische Signal (A, Pfeil). In der Doppelfärbung kommt dieses Signal bei 78,31% der Mikrogliazellen nicht vor (B). Bei diesen Befunden zeigt sich eine Aussparung in der Rab6A⁺ Färbung, wo der Zellkörper liegt (B, Pfeilspitze).

Maßstab: 10 µm (B, für A und B).

In Ansatz III wurde die Mikroglia im Rotkanal (Abb. 25, Iba1) und Rab6A im Grünkanal angezeigt (Abb 23, Rab6A). In dieser Färbung stellt sich zum ersten Mal kein selektives, unspezifisches in Mikroglia vorkommendes Rab6A⁺ Signal dar. Es wurden 181 Mikrogliazellen ausgewertet (Tabelle 9), wobei jede untersuchte Mikrogliazelle Rab6A⁻ ist (Diagramm 11). Auch hier zeigt sich die deutliche Aussparung der Mikrogliazelle in der Rab6A⁺ Färbung (Abb. 25, Pfeilspitze). Auch in den untersuchten Mikrogliazellen der Kontrolle zeigt sich kein selektives, unspezifisches Signal.

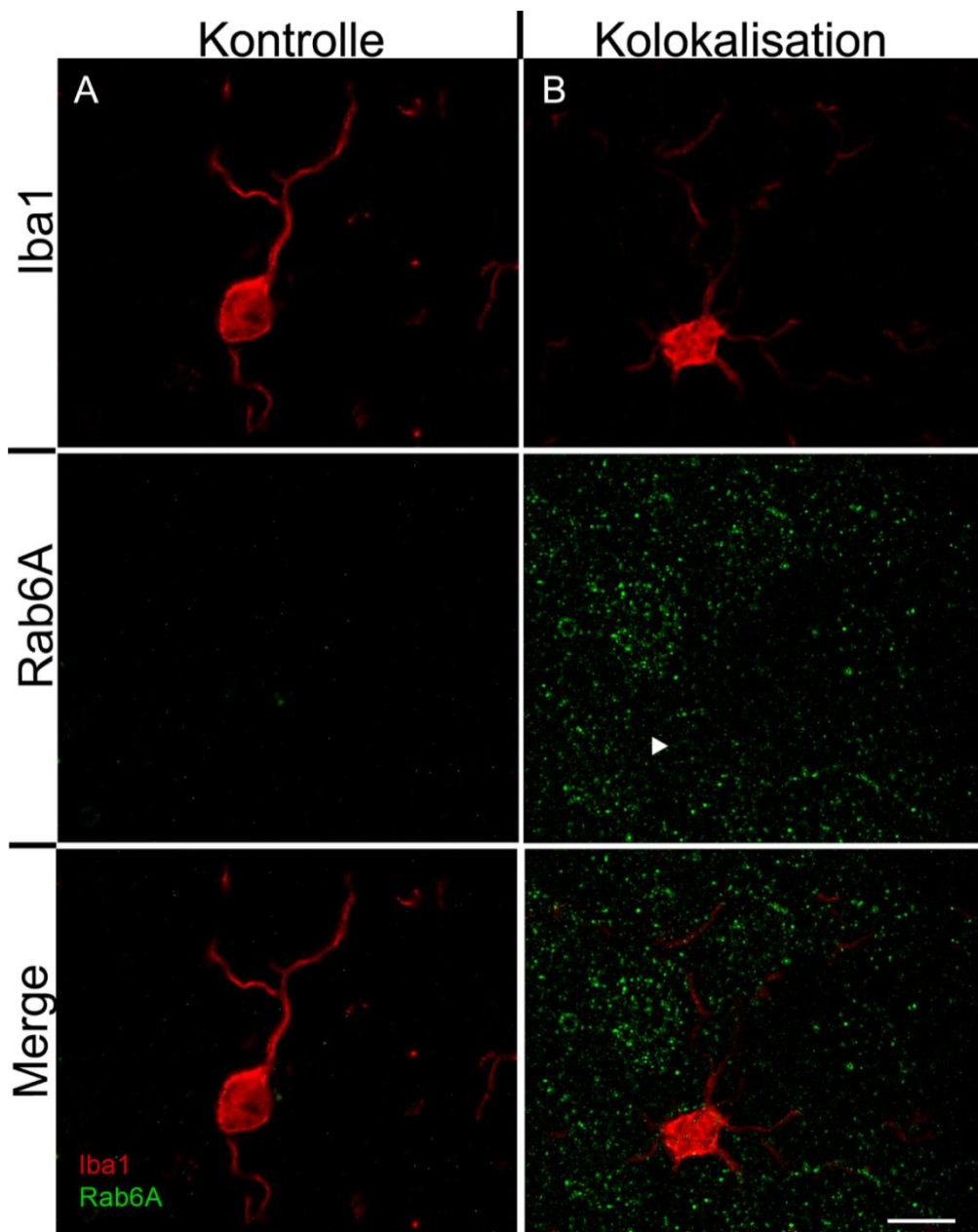


Abbildung 25 - Doppelmarkierung mit Iba1 und Rab6A in Ansatz III

Immunzytochemische Färbung von Rab6A (grün) und Iba1 (rot) an Mikroglia. Spalte A zeigt die entsprechenden Einzelkanalbilder sowie das überlagerte Mehrkanalbild (Merge) der Kontrolle, Spalte B der Kolo-kalisation. In Ansatz III zeigt sich kein selektives, unspezifisches Signal in der Mikroglia (A, B). In der Rab6A⁺ Färbung wird eine deutliche Aussparung der Mikrogliazelle deutlich (B, Pfeilspitze).

Maßstab: 10 µm (B, für A und B).

Im letzten Ansatz wurde Iba1 wie in Ansatz III behandelt, Rab6A wurde jedoch mit einem anderem Sekundärantikörper dargestellt. Von den 219 ausgewerteten Mikrogliazellen (Tabelle 9) zeigen 5% der Zellen ein selektives, unspezifisches Rab6A⁺ Signal (Diagramm 11). Auch hier zeigt sich die deutliche Aussparung der Mikrogliazelle in der Rab6A⁺ Färbung (Abb. 26, Pfeilspitze). Innerhalb der Kontrolle zeigt keine Mikrogliazelle ein selektives, unspezifisches Signal

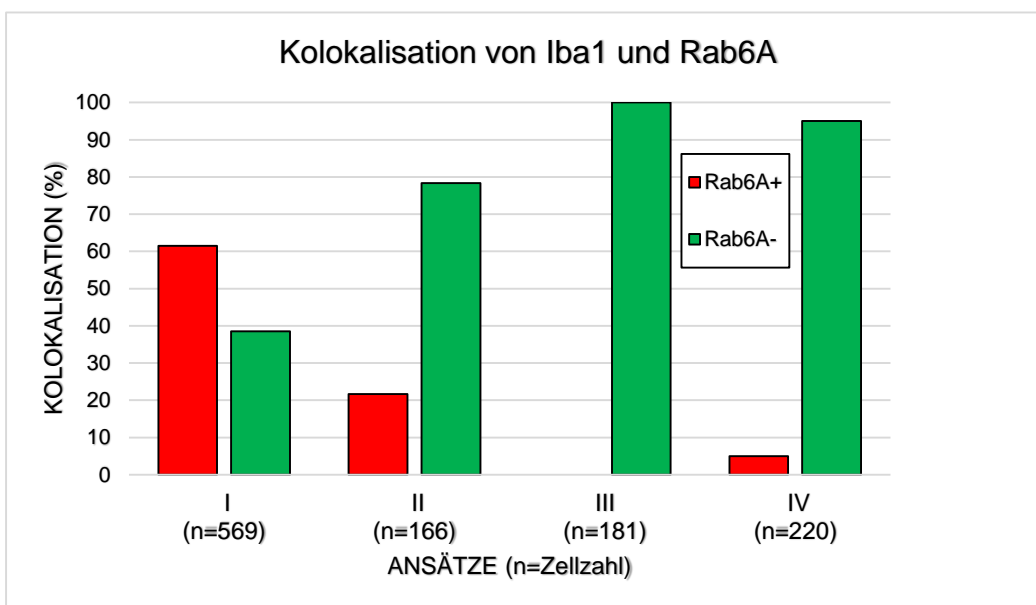


Diagramm 11 - Lokalisation von Rab6A in Mikrogliazellen

In Ansatz I sind 38,49% der Mikroglia Rab6A⁻. In Ansatz II 78,31%, in Ansatz III 100% und in Ansatz IV 95%. Die Ansätze I-IV unterscheiden sich nur durch die verwendeten Sekundärantikörper. Alle Mikrogliazellen wurden einzeln überprüft und stammen aus 8 Schnitten von 5 Tieren (n=Zellzahl).

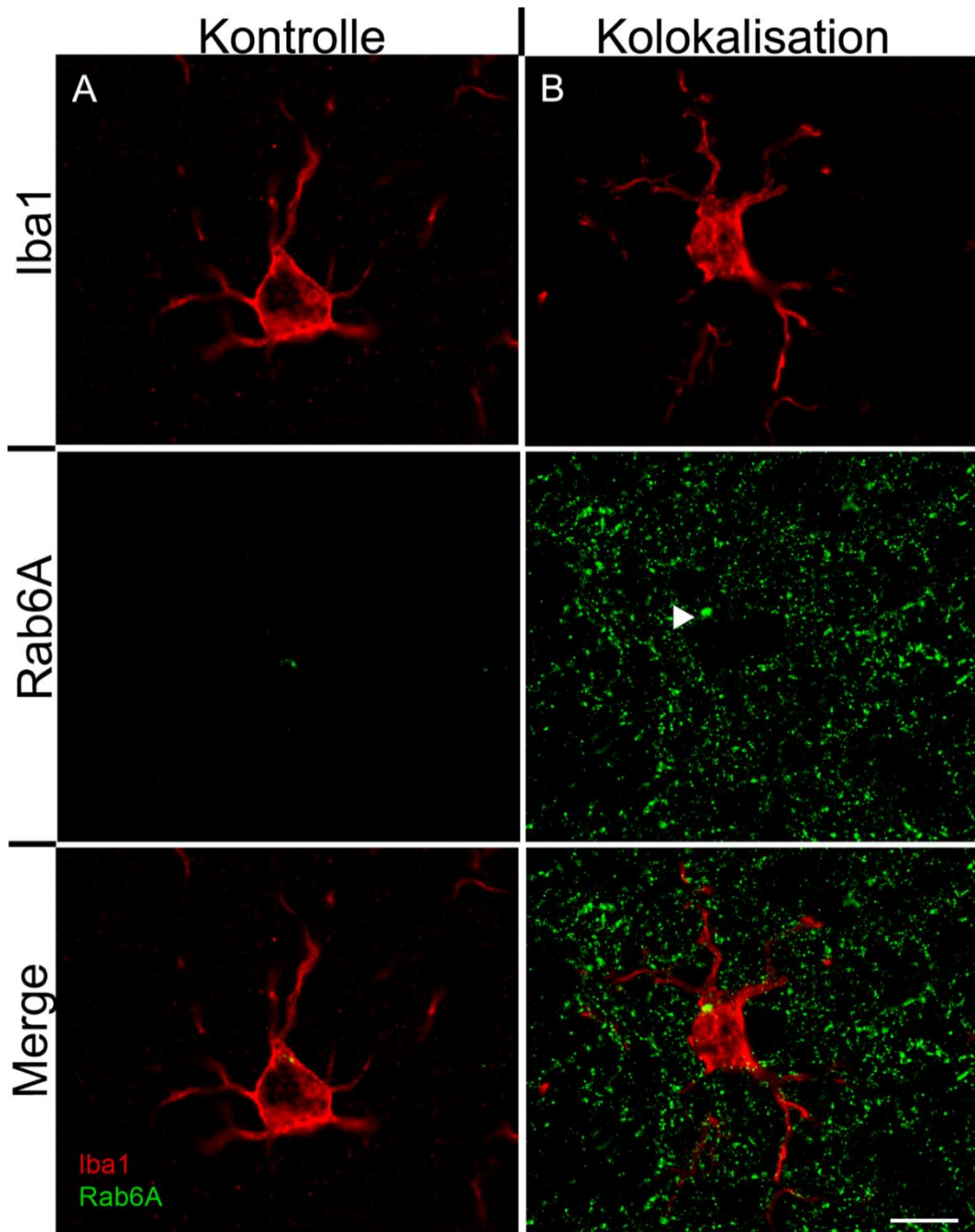


Abbildung 26 - Falsch positive Kolokalisation von Iba1 und Rab6A in Ansatz IV

Immunzytochemische Färbung von Rab6A (grün) und Iba1 (rot) an Mikroglia. Spalte A zeigt die entsprechenden Einzelkanalbilder sowie das überlagerte Mehrkanalbild (Merge) der Kontrolle ohne anti-Rab6A Antikörper, Spalte B der Doppelfärbung. Auch im letzten Ansatz zeigt sich bei 5% der untersuchten Mikrogliazellen ein schwaches, selektives, unspezifisches Signal (B, Pfeilspitze). In der Kontrolle kommt dieses Signal seltener vor. Maßstab 10 μm (B, für A und B).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das Vorkommen des selektiven, unspezifischen Rab6A⁺ Signals in Mikroglia in Abhängigkeit der verwendeten Sekundärantikörper steht. Daher kann nach Durchführung der verschiedenen Färbungen und Kontrollen angenommen werden, dass Rab6A nicht in Mikroglia lokalisiert ist. Dafür spricht zum einen, dass das Rab6A⁺ Signal, welches eng perinukleär lokalisiert ist vereinzelt vorkommt und sich morphologisch völlig von dem Signal in Astrozyten unterscheidet (Abb. 23 A-C). Zum anderen konnten die Befunde mit hochauflösender Mikroskopie und Deconvolution sowie mit Laserscanning-Mikroskopie dahingehend bestätigt werden (Daten nicht gezeigt), sodass angenommen werden kann, dass es sich nicht um 3D Überlagerungen handelt.

3.5.2 NG2-Zellen

Als nächstes wurde die Lokalisation von Rab6A in NG2-Zellen mit dem anti-NG2 Antikörper überprüft. Im dokumentierten Material wurden am Bildschirm im Grünkanal gut erkennbare NG2-Zellen identifiziert und markiert (Abb. 27A). Im nächsten Schritt wurde der Rab6A-Farbkanal eingestellt (Abb. 27B) und über den NG2-Farbkanal gelegt und nur an den zuvor markierten Zellen die Kolokalisation ausgezählt (Abb. 27C). In der Rab6A⁺ Färbung zeigt sich in dem Bereich wo der Zellkörper liegt eine deutliche Aussparung (Abb. 27B, Pfeilspitze). Die Abbildungen 27D und E zeigen weitere Beispiele für Rab6A⁻ NG2-Zellen (Abb. 27D und E). Es wurden die NG2-Zellen mehrerer Kryostatschnitte von zwei Mäusen untersucht und ausgewertet. Es wurden 299 NG2-Zellen des Cortex einzeln überprüft (Tabelle 9), wobei 99% der Zellen Rab6A⁻ und 1% Rab6A⁺ sind (Diagramm 12), sodass man schlussfolgern kann, dass NG2-Zellen des Cortex Rab6A⁻ sind.

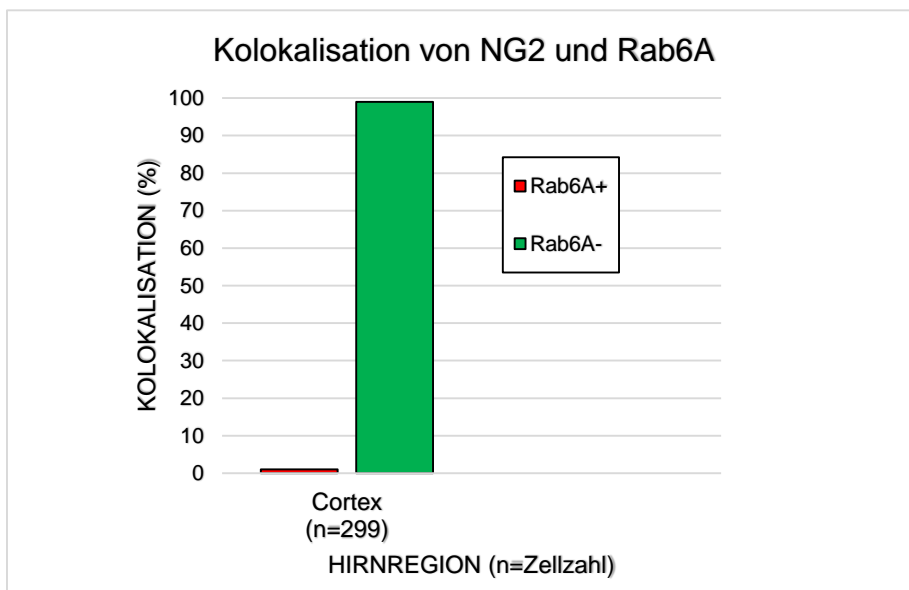


Diagramm 12 - Lokalisation von Rab6A in NG2-Zellen

Im Cortex sind 99% der untersuchten NG2-Zellen Rab6A⁻. Alle NG2-Zellen des Cortex wurden einzeln überprüft und stammen aus 4 Schnitten von 2 Tieren (n=Zellzahl).

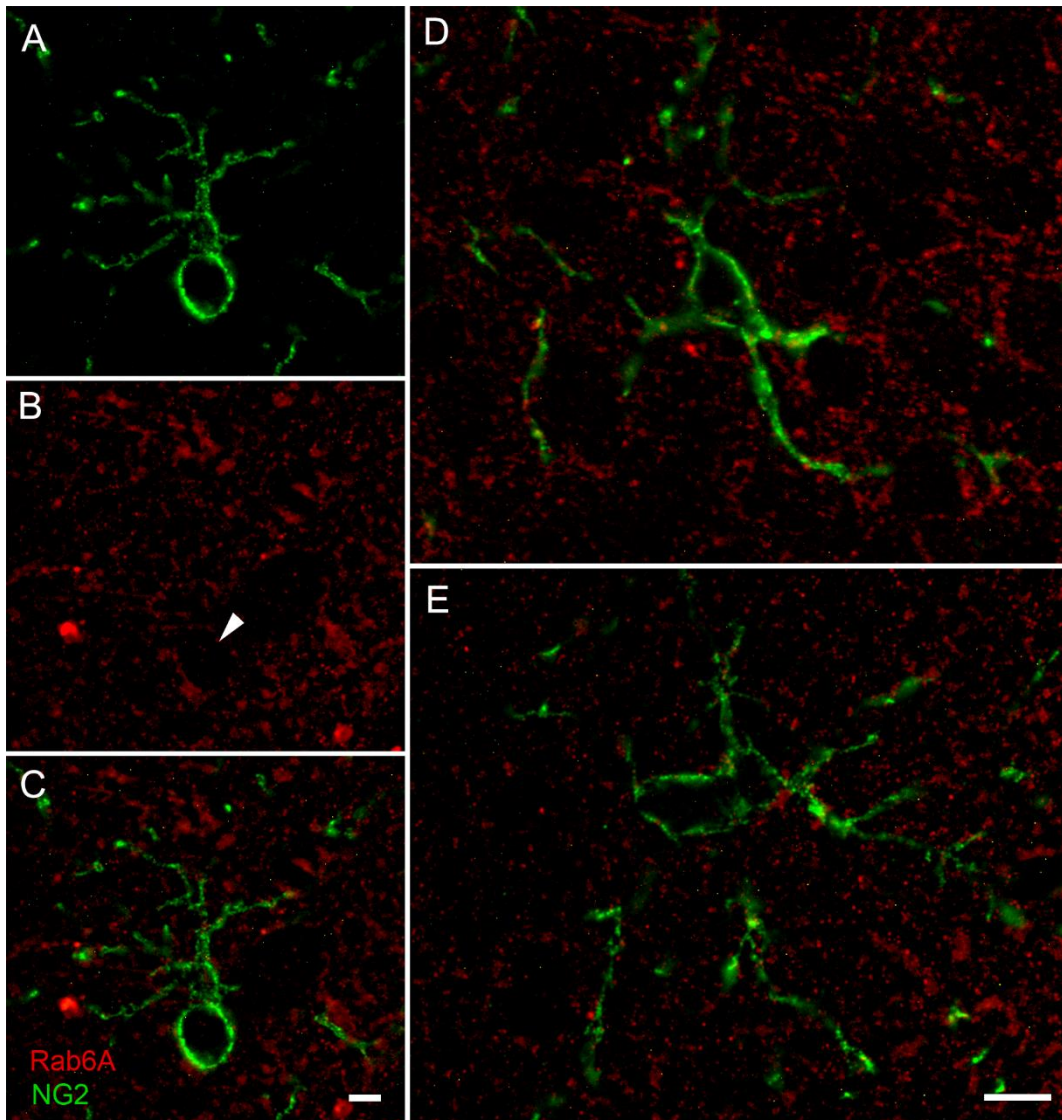


Abbildung 27 - Kolokalisation von NG2 mit Rab6A

Immunzytochemische Färbung von Rab6A (rot) und NG2 (grün) an NG2-Zellen. Die Überlagerung der NG2-Zellen (A) mit dem Rab6A-Farbkanal (B) zeigt keine Kolokalisation der untersuchten Antikörper (C). In der Rab6A⁺ Färbung zeigt sich eine deutliche Aussparung, wo der Zellkörper liegt (B, Pfeilspitze). Die untersuchten NG2-Zellen sind Rab6A⁻ (D und E).

Maßstab: 5 µm (C, für A-C), 5 µm (E, für D und E).

3.5.3 Oligodendrozyten

Als letztes wurde die Kolo-kalisation von Rab6A mit dem Oligodendrozytenmarker CNPase untersucht. Im dokumentierten Material wurden am Bildschirm im Grünkanal gut erkennbare Oligodendrozyten identifiziert und markiert (Abb. 28A). Im nächsten Schritt wurde der Rab6A-Farbkanal eingestellt und über den Oligodendrozyten-Farbkanal gelegt (Abb. 28B) und nur an den zuvor markierten Zellen die Kolo-kalisation ausgewählt (Abb. 28C). In der Rab6A⁺ Färbung wird die Aussparung des Zellkörper deutlich (Abb. 28A, Pfeilspitze). Dieses Ergebnis wurde an Kryostatschnitten und an Vibratomschnitten von fünf Mäusen gewonnen. Dabei wurden 1385 Oligodendrozyten einzeln in den Hirnregionen Cortex, Corpus callosum und Hippocampus untersucht (Tabelle 9), wodurch die Oligodendrozyten der grauen und weißen Substanz weitgehend getrennt untersucht und beurteilt werden können. Im Cortex sind 1,7% der untersuchten Oligodendrozyten Rab6A⁺ und 98,3% Rab6A⁻ (Diagramm 13). Im Corpus callosum sind 0,5% Rab6A⁺ und 99,5% Rab6A⁻. Im Hippocampus sind alle untersuchten Oligodendrozyten Rab6A⁻. Die Oligodendrozyten, die ein Rab6A⁺ Signal aufweisen, haben dieses in der Nähe des Zellkörpers. In der weißen Substanz sind die typischen interfazikulären Oligodendrozyten vorhanden (Abb. 28E) und im Cortex lassen sich bei kleiner Vergrößerung die parallelen Fortsätze gut darstellen (Abb. 28D). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die untersuchten myelinisierende und nicht myelinisierende Oligodendrozyten der weißen und grauen Substanz Rab6A⁻ sind und es sich bei den positiven Oligodendrozyten des Cortex und Corpus callosum um ein falsch positives Ergebnis handelt.

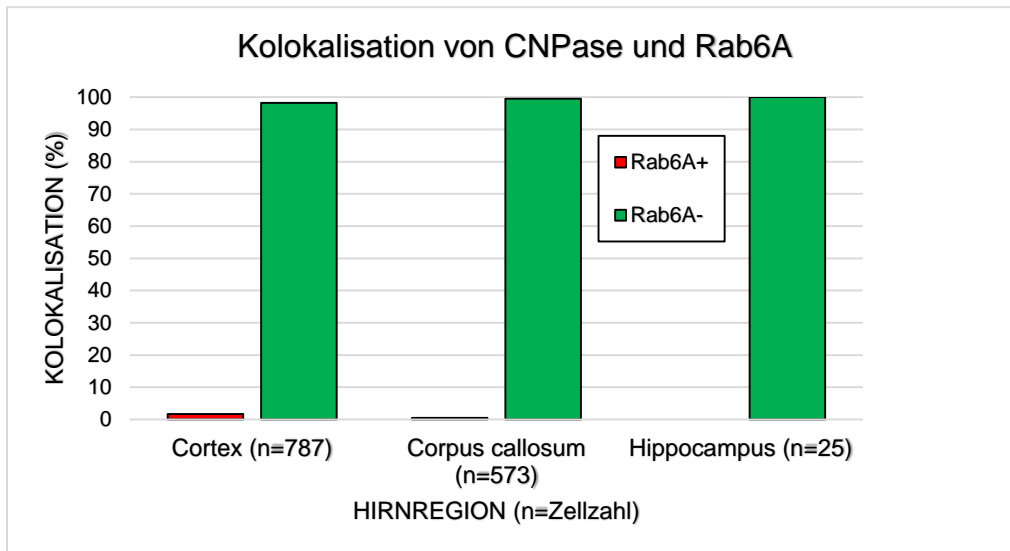


Diagramm 13 - Lokalisation von Rab6A in Oligodendrozyten

Im Cortex sind 98,3%, im Corpus Callosum 99,5% und im Hippocampus alle untersuchten Oligodendrozyten Rab6A⁻. Die Oligodendrozyten wurden nach Hirnregion einzeln überprüft und stammen aus 6 Schnitten von 5 Tieren (n=Zellzahl).

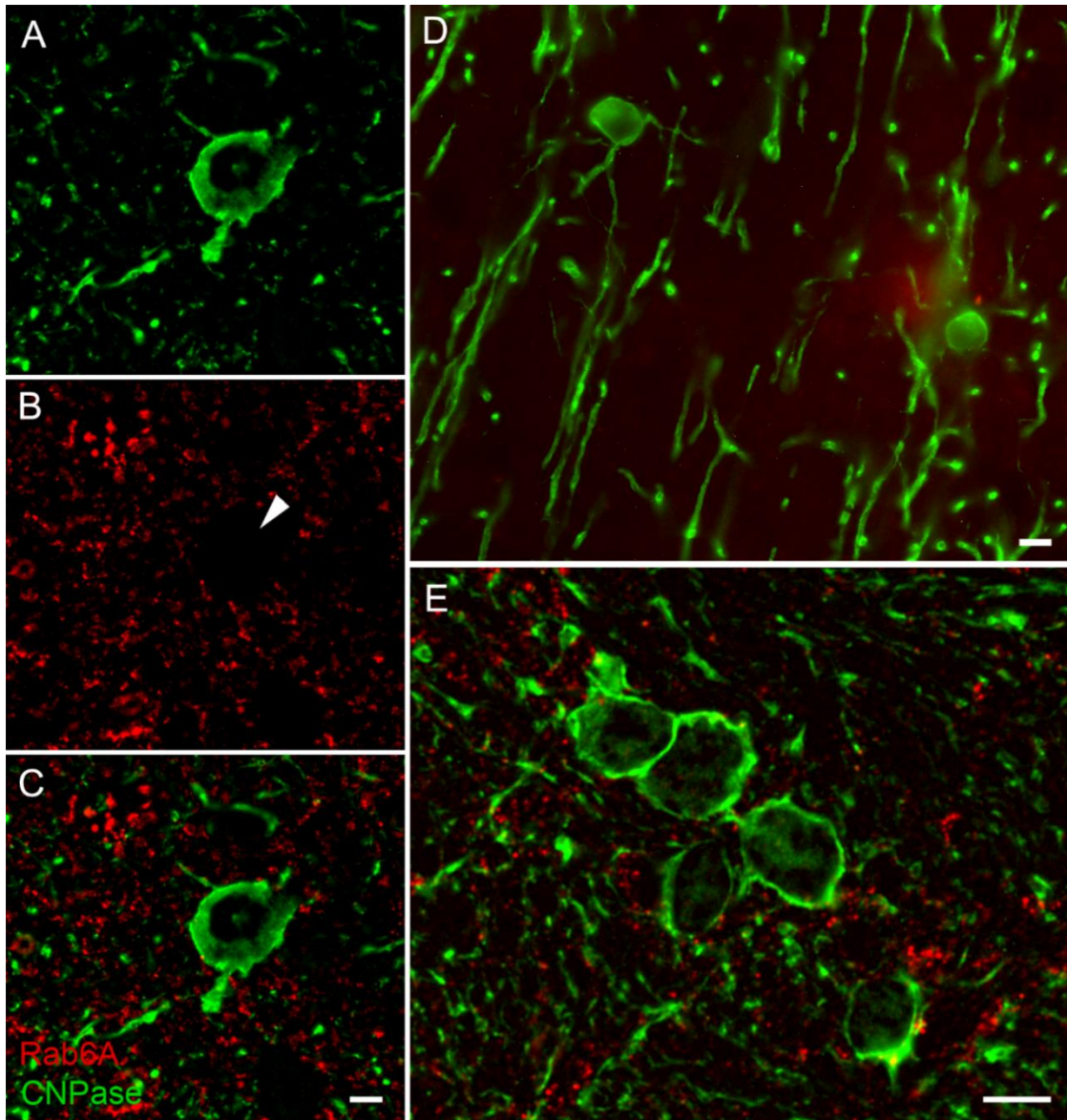


Abbildung 28 - Kolokalisation von CNPase mit Rab6A

Immunzytochemische Färbung von Rab6A (rot) und CNPase (grün) an Oligodendrozyten. Die Überlagerung der Oligodendrozyten (A) mit dem Rab6A-Farbkanal (B) zeigt keine Kolokalisation der untersuchten Antikörper (C). In der Rab6A⁺ Färbung zeigt sich eine deutliche Aussparung wo der Zellkörper liegt (B, Pfeilspitze). Die Oligodendrozyten sind Rab6A⁻ (D) und kommen in der weißen Substanz (hier Corpus callosum) als interfaszikuläre Oligodendrozyten vor (E). Maßstab: 5 µm (C, für A-C; E), 10 µm (D).

3.5.4 andere Zelltypen

Durch die oben durchgeführten Untersuchungen kann eine Lokalisation von Rab6A in den Gliazelltypen Mikroglia, NG2-Zellen und Oligodendrozyten ausgeschlossen werden. Wie unter 3.3.4 erwähnt, wurde auch eine Dreifachfärbung mit Rab6A, Sox9 und Bisbenzimidin durchgeführt. Bisbenzimidin färbt dabei alle Kerne jeglicher Zellarten an, wobei durch die alleinige Anfärbung keine Aussage über den Zelltyp getätigt werden kann. Die Bisbenzimidin⁺/Sox9⁻-Zellen weisen um den Zellkern herum eine deutliche Aussparung an Rab6A auf, was für eine Rab6A⁻-Zelle spricht (siehe Abb. 15C, Pfeil). Hervorgehoben wird dies besonders durch die Nachbarschaft zu Sox9⁺/Bisbenzimidin⁺-Astrozyten, die völlig von Rab6A ausgefüllt und umgeben sind und somit als Rab6A⁺-Astrozyten gewertet werden (siehe Abb. 15C, Pfeilspitze).

Durch die durchgeführten Untersuchungen kann Rab6A schlussfolgernd in allen anderen Zellen als Astrozyten ausgeschlossen werden. Rab6A kann in dieser Arbeit als astrozytenspezifischer Marker im Hirngewebe der Maus etabliert werden.

3.6 Rab6A im humanen Gewebe und klinische Bedeutung

3.6.1 Lokalisation von Rab6A im humanen Gewebe

Um die prinzipielle Übertragbarkeit der gewonnenen Befunde auf den Menschen zu überprüfen, wurde reseziertes Cortex-Gewebe von drei Patienten mit unterschiedlicher pathologischer Genese untersucht (siehe Tabelle 5). Die Untersuchungen ergeben, dass die Rab6A Immunfluoreszenz im humanen Gewebe der drei untersuchten Patienten technisch funktioniert und sich ein deutliches Fluoreszenzsignal gegenüber der Kontrolle darstellt (Abb. 29, Rab6A). Die Kontrollfärbung ohne anti-Rab6A Primärantikörper wurde nur am Gewebe eines Patienten gezeigt, welche repräsentativ für die Kontrollfärbung der anderen beiden Patienten steht. Das Rab6A⁺ Signal erstreckt sich gleichmäßig über die gesamte Schnittfläche der untersuchten Cortex-Gewebe. Die Rab6A Immunfluoreszenz stellt sich wie bei der Maus als Rab6A⁺ Strukturen dar.

Sowohl in den positiven Immunfärbungen als auch in den Kontrollfärbungen zeigt sich ein unspezifisches Signal in Form von sehr großen runden „Herden“. Diese „Herde“ kommen einzeln vor und haben eine starke Intensität. Es handelt sich um die bekannte, natürlich vorkommende Autofluoreszenz des Gewebes, welche technisch schwierig zu unterdrücken, aber leicht vom vorliegenden Rab6A⁺ Fluoreszenzsignal zu unterscheiden ist. Die Autofluoreszenz wurde zur Auswertung der Experimente nicht weiter berücksichtigt. Zum jetzigen Zeitpunkt wurde nur noch überprüft, ob humane Astrozyten Rab6A⁺ sind, wofür GFAP⁺-Astrozyten untersucht wurden. Da an der Maus gezeigt werden konnte, dass Rab6A selektiv in Astrozyten vorkommt wurde an dieser Stelle auf eine Doppelimmunfluoreszenz mit Markern für andere Gliazelltypen wie Mikroglia, Oligodendrozyten und NG2-Zellen verzichtet. Da das Rab6A⁺ Signal im humanen Gewebe dem Signal in der Maus ähnelt, kann die Hypothese aufgestellt werden, dass Rab6A im humanen Gewebe nur in Astrozyten (Abb. 29B, Merge) und in keinem anderem Gliazelltypen lokalisiert ist. Somit kann von einer Übertragbarkeit der Ergebnisse auf das humane Gewebe ausgegangen werden.

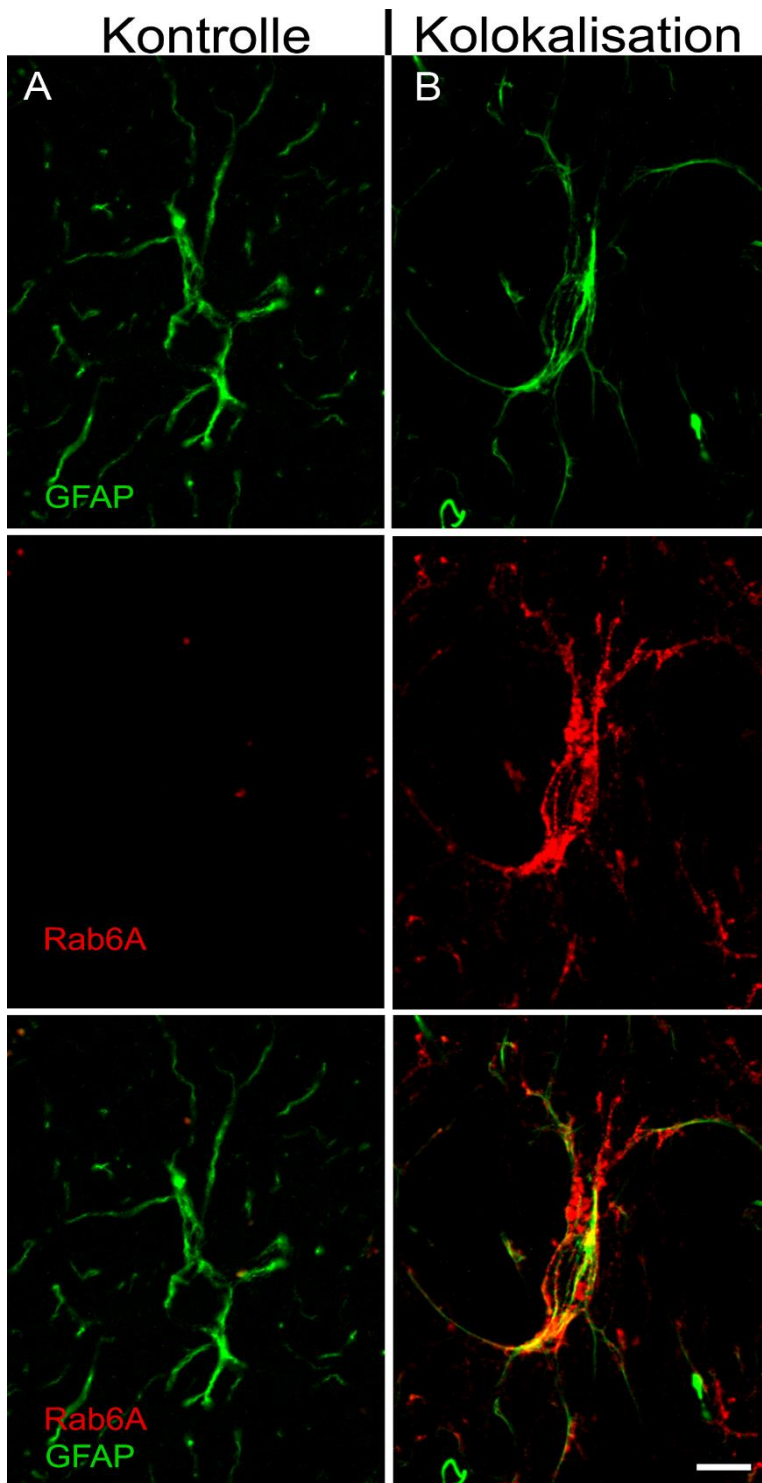


Abbildung 29 - Vorkommen von Rab6A im humanen Gewebe

Immunzytochemische Färbung von Rab6A (rot) und GFAP (grün) im humanen Gewebe des Cortex von Patient 1. Spalte A zeigt die entsprechenden Einzelkanalbilder sowie das überlagerte Mehrkanalbild (Merge) der Kontrollen, Spalte B der Kolokalisation. Die GFAP⁺-Astrozyten des Cortex sind Rab6A⁺. Maßstab: 10 µm (B, für A und B).

3.6.2 Nicht-reaktive und reaktive Astrozyten

Im Gewebe der Patienten I und II konnten sowohl reaktive als auch nicht-reaktive GFAP⁺-Astrozyten detektiert werden. Die qualitativen, morphologischen Kriterien nicht-reaktiver Astrozyten beziehen sich auf die Stärke der Intensität der GFAP⁺ Färbung und die spärliche Verzweigung der astrozytären Fortsätze. Dabei konnte während des Mikroskopierens zunächst beobachtet werden, dass im untersuchten Cortex manche Astrozyten eine starke Intensität und manche eine geringe Intensität in ihrer GFAP⁺ Färbung aufweisen (Abb. 30A). Astrozyten mit starker Intensität (Abb. 30B, Pfeilspitze) und dicker, plumper Fortsätze, die zuweilen wenig verzweigt sind und dadurch gliales, narben- und filz-ähnliches Gewebe bilden (Abb. 30B, Pfeil), wurden als reaktive Astrozyten klassifiziert. Astrozyten mit geringer Intensität und filigraner, lang und reichlich verzweigten Fortsätzen (Abb. 30C, Pfeil) wurden als nicht-reaktive Astrozyten klassifiziert (Abb. 30C, Pfeilspitze).

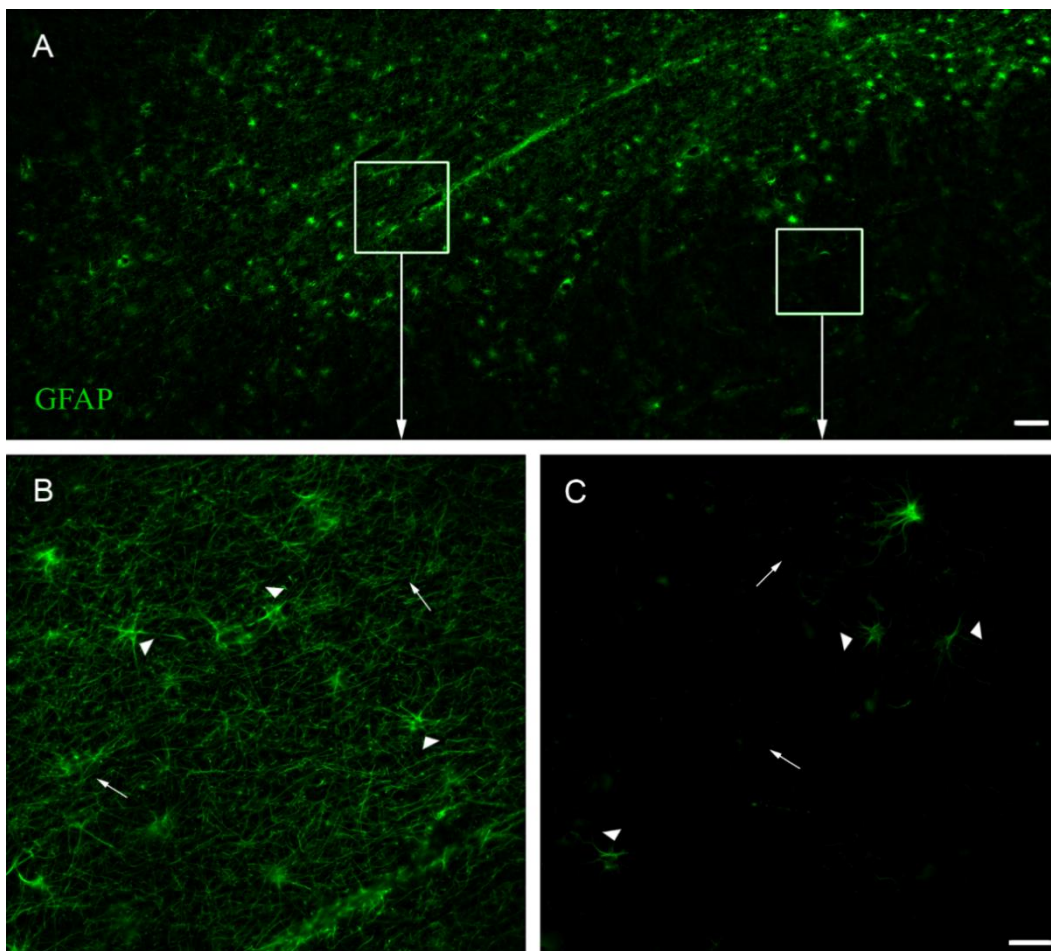


Abbildung 30 - Astrozyten im humanen Gewebe

Immunzytochemische Färbung von GFAP (grün) im humanen Gewebe von Patient II. Bei geringer Vergrößerung des humanen Cortex finden sich sowohl reaktive als auch nicht-reaktive Astrozyten in direkter Umgebung zueinander (A). Die reaktiven Astrozyten weisen dicke, plumpe und kurze Fortsätze auf und bilden dadurch gliales, narben- und filz-ähnliches Gewebe (B, Pfeil). Die Intensität der Rab6A⁺ Färbung ist besonders hoch (B, Pfeilspitze). Die nicht-reaktiven Astrozyten haben viele zarte und stark verzweigte Fortsätze (C, Pfeilspitze). Die Intensität der GFAP⁺ Färbung bei nicht-reaktiven Astrozyten ist im Vergleich zu reaktiven Astrozyten schwächer ausgeprägt (C, Pfeil). Maßstab: 20 µm (A), 50 µm (C, für B und C).

Neben den reaktiven und nicht-reaktiven GFAP⁺-Astrozyten konnte ein weiteres pathologisches Phänomen bei den Astrozyten des Patienten II beobachtet werden. Es kommen zwei Aussparungen im Zellkörper der Astrozyten vor (Abb. 31A, B, Pfeil). In seltenen Fällen lassen sich auch drei Aussparungen finden (Abb. 31D, Pfeil). Diese Morphologie erweckt den Anschein, als besäßen Astrozyten mehr als einen Zellkern. Außerdem sind dicke, plumpe und kurze Fortsätze ersichtlich. Dies könnte den Befund einer Emperipolesis darstellen. Dabei handelt es sich um hämatogene Zellen wie Lymphozyten, Granulozyten, Plasmazellen und Erythrozyten die gelegentlich im Zytoplasma großer Zellen wie Histozyten und Megakaryozyten eingeschlossen werden.¹⁵⁶

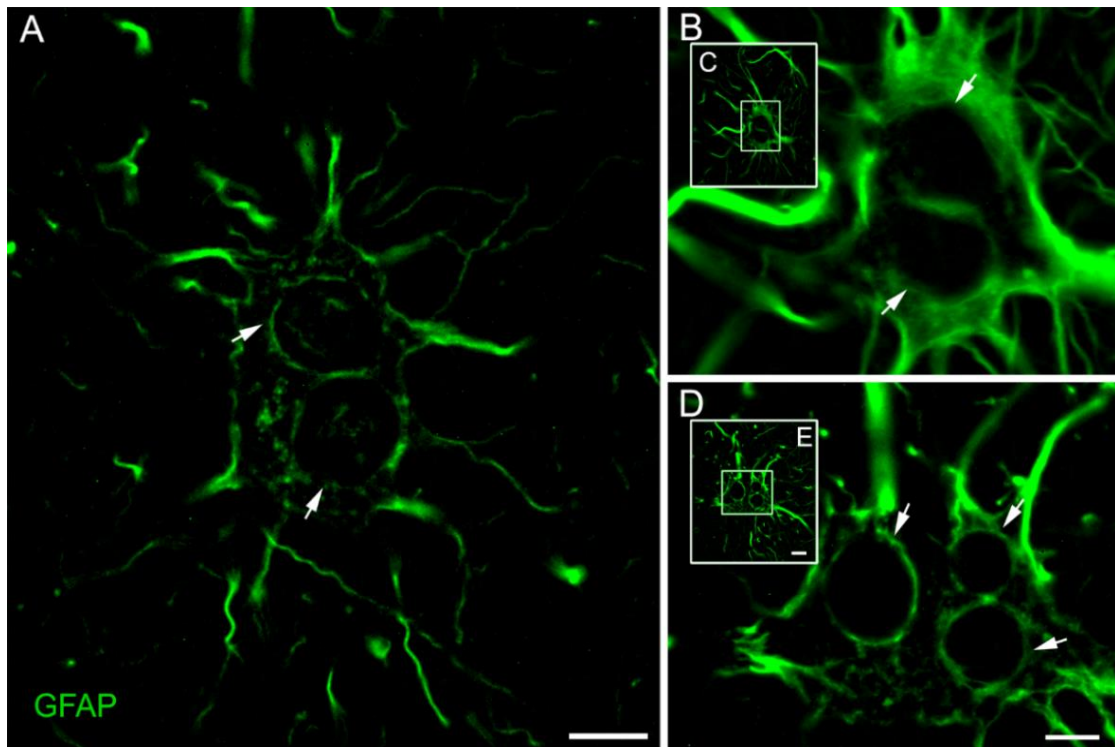


Abbildung 31 - Emperipolesis in humanen Astrozyten

Immunzytochemische Färbung von GFAP im humanen Gewebe. Astrozyten des Patienten II weisen in ihrem Zellkörper zwei Ausparungen (A und B, Pfeil), in seltenen Fällen sogar bis zu drei Ausparungen (D, Pfeil) auf. Diese Astrozyten haben außerdem dicke, plumpe und kurze Fortsätze (A, C, E).

Maßstab: 10 μm (A), 3 μm (D, für B und D), 10 μm (E, für C und E).

3.6.3 Korrelation der Glia-Pathologie mit den Diagnosen

Patient I weist zum Zeitpunkt der Operation eine FCD des Palmi-Typs II, ILAE Typ IIa im temporalen Cortex und der Amygdala sowie einer Hippocampussklerose des Typs ILAE III auf. Untersucht wurde ausschließlich der temporale Cortex. Die FCD bildet die häufigste Gruppe der Malformationen der kortikalen Entwicklung und ist häufig mit einer Epilepsie vergesellschaftet. Es wird angenommen, dass die Dysfunktion von Astrozyten eine Hauptursache für Temporallappen-Epilepsie sein kann.¹⁵⁷ Dabei verlieren Astrozyten das Enzym GS und weisen reduzierte, nach innen gerichtete K^+ -Ströme auf, die zur Erzeugung und Ausbreitung von Anfallsaktivitäten beitragen.¹⁵⁷ Das Vorhandensein von reaktiven Astrozyten bei Patient I könnte somit im Zusammenhang mit der Dysfunktion stehen.

Patient II weist eine FCD des ILAE Typs IIb im rechten frontalen Cortex auf. Auch hier besteht eine Korrelation zwischen der Glia-Pathologie und der Diagnose. Patient III hat ein Gangliogliom des WHO Grades I mit Infiltration des Hippocampus, wobei der Sklerosegrad nicht beurteilbar ist. Hier wurde der Zugangscortex untersucht. Die Erkrankung des Patienten beschränkt sich auf den Hippocampus, sodass der Cortex keine pathologische Diagnose aufweist. Dies steht auch im Zusammenhang mit den ausschließlich nicht-reaktiven Astrozyten, die bei Patient III vorkommen.

3.6.4 Rab6A in humanen GFAP⁺-Astrozyten

Da an Mäusen gezeigt werden konnte, dass Rab6A selektiv und spezifisch in allen Astrozyten vorkommt, wurden an dieser Stelle nur GFAP⁺-Astrozyten repräsentativ für alle Astrozyten untersucht. Die Auswertung der Doppelmarkierung von GFAP und Rab6A wurde verblindet durchgeführt. Im dokumentierten Material wurden am Bildschirm im Grünkanal gut erkennbare GFAP⁺-Astrozyten identifiziert und markiert (Abb. 29, GFAP). Im nächsten Schritt wurde der Rab6A-Farbkanal eingestellt und über den GFAP-Farbkanal gelegt und nur an den zuvor markierten Zellen die Kolo-kalisation ausgewertet (Abb. 29, Merge). Es wurden insgesamt 613 kortikale GFAP⁺-Astrozyten von drei Patienten untersucht. 449 der untersuchten Astrozyten sind nicht-reaktiv und die restlichen 164 reaktiv (Tabelle 11), wobei nur im Gewebe von Patient I und II reaktive Astrozyten vorkommen.

Tabelle 11 - Anzahl der untersuchten humanen Astrozyten

n	Patient I	Patient II	Patient III
nicht-reaktive	204	137	108
reaktive	83	81	-
Summe	287	218	108

n = Zellanzahl

204 nicht-reaktive GFAP⁺-Astrozyten des Patienten I wurden untersucht, wobei alle Rab6A⁺ sind. Von den untersuchten 83 reaktiven GFAP⁺-Astrozyten sind 88% Rab6A⁺ (Abb.32A und B) und 12% Rab6A⁻ (Abb. 33A-D). Beim Patienten II wurden 137 nicht-reaktive GFAP⁺-Astrozyten untersucht, welche alle Rab6A⁺ sind. Die 81 untersuchten reaktiven GFAP⁺-Astrozyten sind alle Rab6A⁺ (Abb. 32C). Beim Patient III kommen keine reaktiven GFAP⁺-Astrozyten vor. Die 118 untersuchten nicht-reaktiven Astrozyten sind alle Rab6A⁺ (Abb. 32D). Somit lässt sich sagen, dass alle untersuchten nicht-reaktiven GFAP⁺-Astrozyten Rab6A⁺ sind. Nur bei den untersuchten reaktiven GFAP⁺-Astrozyten des Patienten I sind 12% Rab6A⁻ (Diagramm 14).

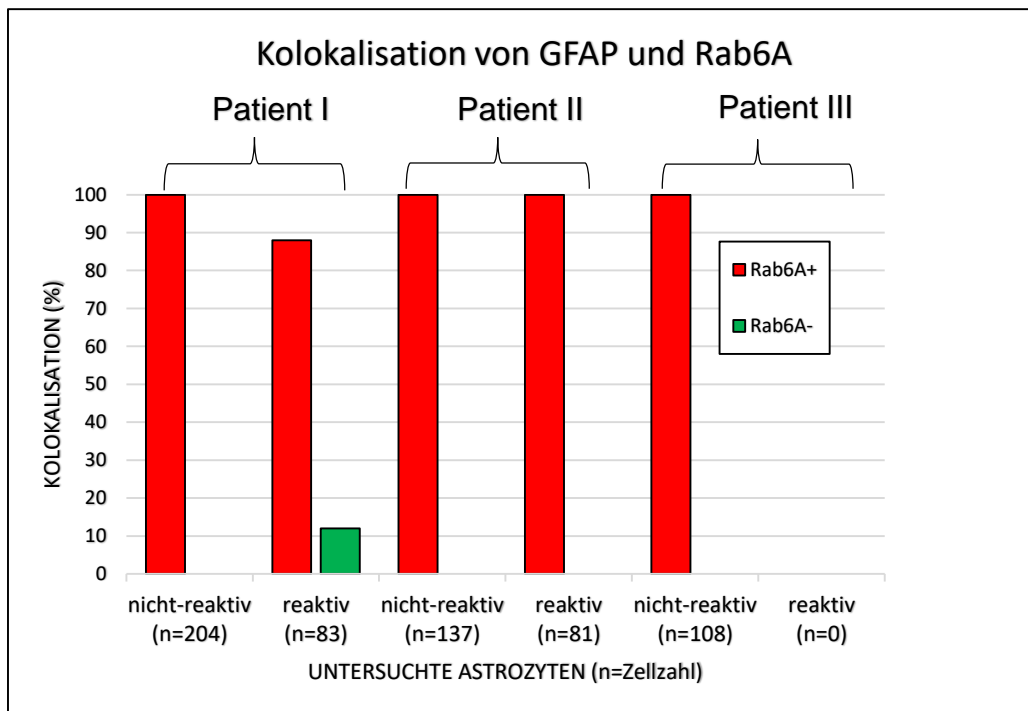


Diagramm 14 - Lokalisation von Rab6A in humanen GFAP⁺-

Patient I: Jeder nicht-reaktive GFAP⁺-Astrozyt ist Rab6A⁺. 88% der reaktiven GFAP⁺-Astrozyten sind Rab6A⁺. Patient II: Jeder nicht-reaktive und reaktive GFAP⁺-Astrozyt ist Rab6A⁺. Patient III: Jeder nicht-reaktive GFAP⁺-Astrozyt ist Rab6A⁺. Reaktive GFAP⁺-Astrozyten wurden bei Patient III nicht identifiziert. Die Astrozyten stammen aus dem Cortex und wurden einzeln und verblindet überprüft (n=Zellzahl).

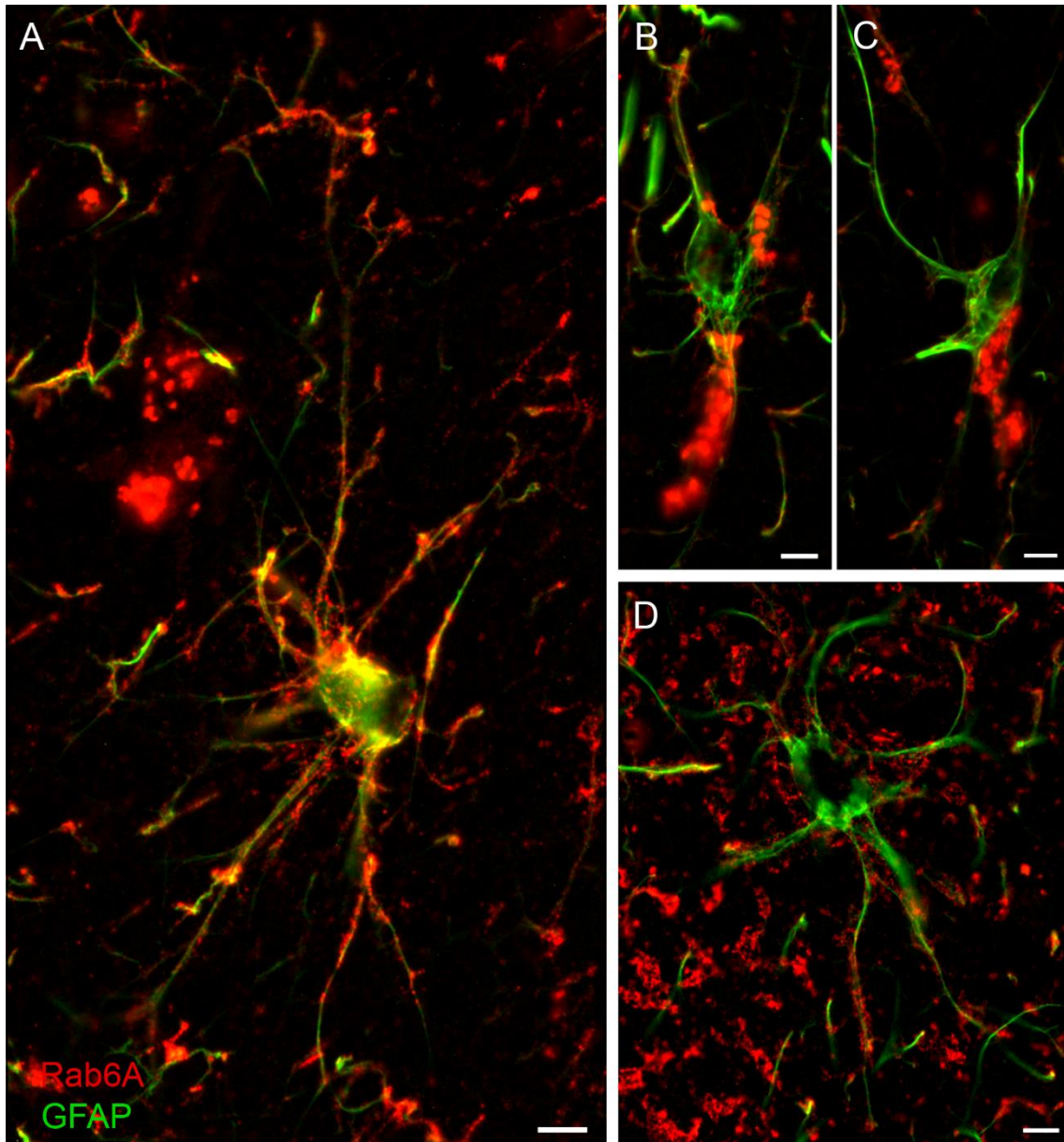


Abbildung 32 - Lokalisation von Rab6A in GFAP⁺-Astrozyten

Immunzytochemische Färbung von Rab6A (rot) und GFAP (grün) in humanen Astrozyten. Jeder untersuchte nicht-reaktive GFAP⁺-Astrozyt (A und B) und 88% der untersuchten reaktiven GFAP⁺-Astrozyten vom Patienten I sind Rab6A⁺. Bei Patient II ist jeder nicht-reaktive und reaktive GFAP⁺-Astrozyt Rab6A⁺ (C). Patient III weist nur nicht-reaktive GFAP⁺-Astrozyten auf, welche Rab6A⁺sind. Maßstab: 10 μ m (A und D), 3 μ m (B), 5 μ m (C).

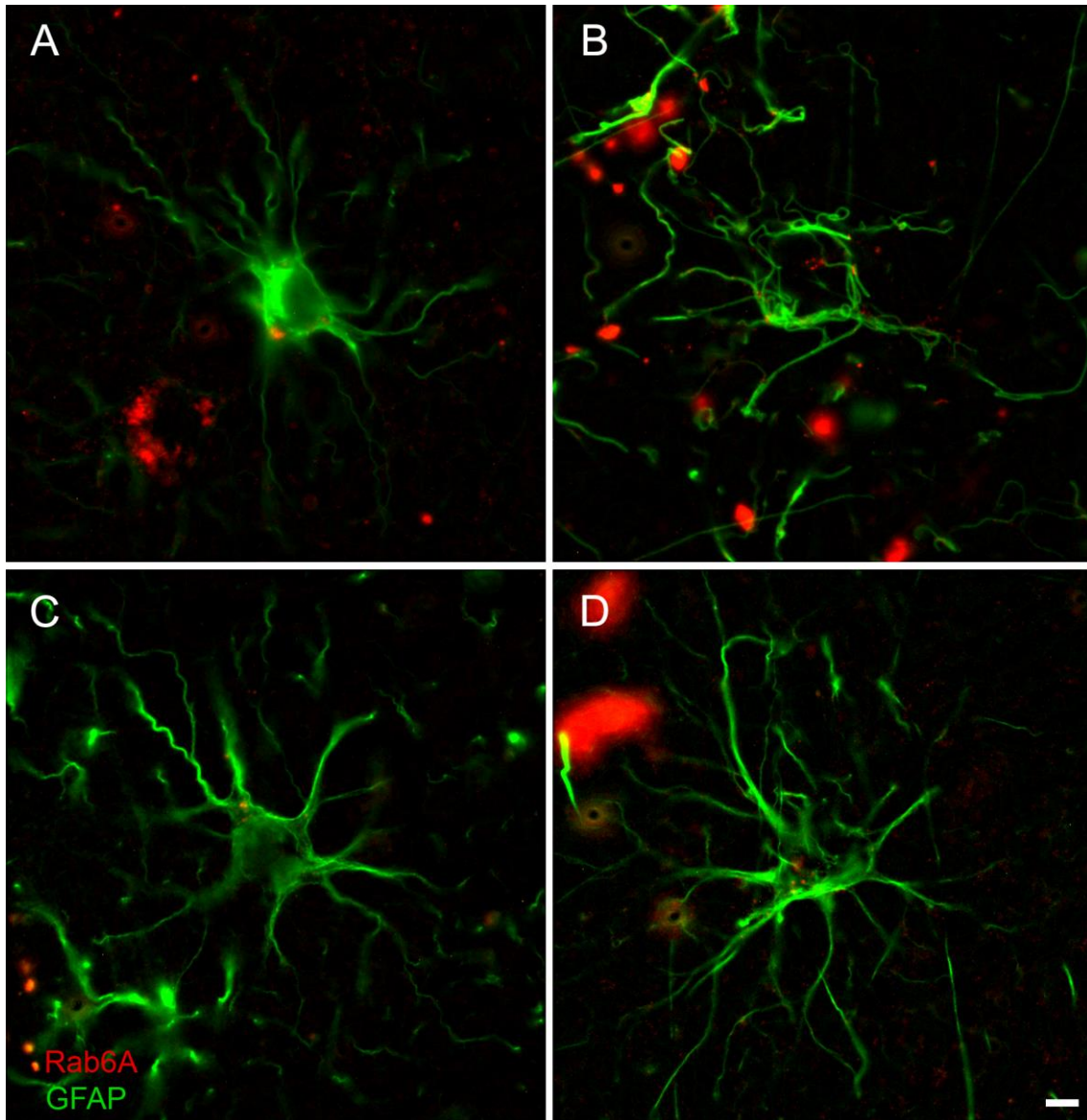


Abbildung 33 - Einige GFAP⁺-Astrozyten des Patienten I sind Rab6A⁻
Immunzytochemische Färbung von Rab6A (rot) und GFAP (grün) in humanen Astrozyten. Nur bei Patient I sind 12% der reaktiven GFAP⁺-Astrozyten Rab6A⁻ (A-D).

Maßstab: 10µm (D, für A-D).

3.6.5 Rab6A⁺ Puncta im humanen Gewebe

Da sich die Astrozyten der Maus in Größe und subzellulärem Verteilungsmuster der Rab6A⁺ Strukturen unterscheiden und in vier Typen unterteilt werden konnten, sollte an dieser Stelle überprüft werden, ob diese Klassifikation auch auf die Astrozyten des humanen Gewebes übertragbar ist. Dabei zeigt sich auch hier die an der Maus etablierte Klassifizierung (Abb. 34A-D). Dabei kommen die vier Typen in den untersuchten reaktiven und nicht-reaktiven Astrozyten der Patienten I-III in unterschiedlicher Häufigkeit vor (Tabelle 12). Bei den nicht-reaktiven Astrozyten des Patienten I kommt Typ I am häufigsten vor. An zweiter Stelle kommt Typ IV, an dritter Stelle Typ II und an letzter Stelle Typ III. Bei den reaktiven Astrozyten des Patienten I kommt wiederum Typ I am häufigsten vor, gefolgt von den Typen III, IV und II. Bei den nicht-reaktiven Astrozyten des Patienten II kommt Typ III am häufigsten vor, gefolgt von den Typen IV, II und I. Bei den reaktiven Astrozyten des Patienten II kommt Typ IV am häufigsten vor, dann Typ III, II und I. Bei Patient III wurden nur nicht-reaktive Astrozyten detektiert, die Typen I bis IV kommen in absteigender Reihenfolge vor.

Tabelle 12 - prozentuales Vorkommen der Typen I-IV in humanen Astrozyten

Typ (in %)	Patient I		Patient II		Patient III
	nicht-reaktive Astrozyten	reaktive Astrozyten	nicht-reaktive Astrozyten	reaktive Astrozyten	nicht-reaktive Astrozyten
I	30	43	16	1	53
II	24	10	20	9	34
III	18	29	35	33	6
IV	28	18	29	57	7

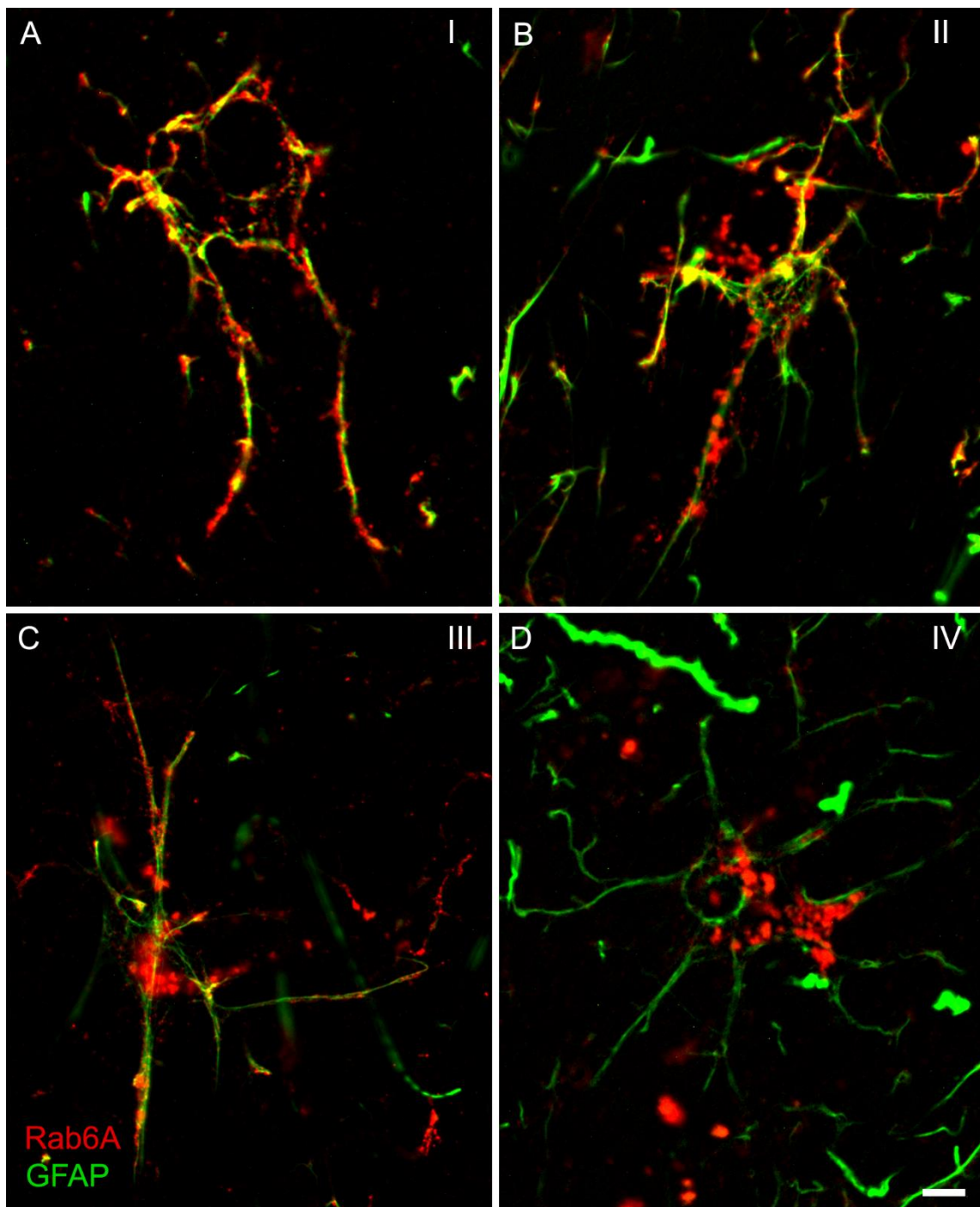


Abbildung 34 - Klassifikation der Rab6A⁺ Puncta im humanen Gewebe
 Immunzytochemische Färbung von Rab6A (rot) und GFAP (grün) im humanen Gewebe. Auch in Astrozyten des humanen Gewebes zeigt sich die zuvor an Mäusen etablierte Klassifizierung der Rab6A⁺ Puncta. Die Typen I (A), II (B), III (C) und IV (D) kommen dabei bei den untersuchten Astrozyten der drei Patienten in unterschiedlicher Häufigkeit vor (siehe Text).

Maßstab: 5 µm (D, für A-D).

Zusammenfassend wird deutlich, dass die Typen I-IV nicht wie bei den Untersuchungen an der Maus strikt in absteigender Häufigkeit angetroffen werden. Nur bei Patient III, wo keine reaktiven Astrozyten detektiert wurden kommen die Typen I-IV in absteigender Häufigkeit vor. Bei den nicht-reaktiven Astrozyten des Patienten I sind die prozentualen Angaben der einzelnen Typen nah beieinander, was bei den nicht-reaktiven Astrozyten des Patienten II nicht der Fall ist, sodass von keiner klaren Korrelation zwischen den Typen I-IV und den nicht-reaktiven Astrozyten ausgegangen werden kann. Auch besteht kein klarer Zusammenhang zwischen den Typen und den reaktiven Astrozyten. Die vier Typen kommen im untersuchten Gewebe nur zufallsverteilt vor. Eine Häufung in bestimmten Regionen des Cortex liegt nicht vor. Auch subpial stellen sich die Typen nicht anders dar. Eine Nähe zu bestimmten Strukturen wie Gefäße oder Neuronen konnte bei keinen der Typen festgestellt werden.

3.7 Auswirkung der HFS auf Astrozyten und Rab6A

Eine der wichtigsten Eigenschaften des Gehirns ist seine Plastizität. Darunter wird die Eigenschaft der aktivitätsabhängigen Modulation des neuronalen Netzwerks und die damit verbundene Beeinflussung von Gedanken, Verhalten und Gefühlen zusammengefasst. Sie nimmt eine zentrale Rolle im Erinnerungsvermögen und Lernverhalten ein, wobei die Langzeitpotenzierung (LTP) eine wichtige Grundlage für die synaptische Plastizität darstellt. Dabei handelt es sich um die andauernde Potenzierung synaptischer Aktivitäten, die von NMDA-Rezeptoren abhängig ist. Es hat sich herausgestellt, dass Astrozyten die Aktivierung dieser Rezeptoren durch die Calcium-abhängige Freisetzung des NMDAR-Koagonisten D-Serin regulieren können.¹⁵⁸ Die repetetive HFS von exzitatorischen Synapsen im Hippocampus führt zu einer LTP. Dabei wird die Stimulationselektrode im Tractus perforans platziert und die Glas-Mikroelektrode in das dorsale Blatt der Körnerzellschicht des Gyrus dentatus.¹⁴⁵ Die glutamatergen Fasern des Tractus perforans terminieren scharf abgegrenzt in der äußeren Molekularschicht. Vorangehend konnte in dieser Untersuchung nachgewiesen werden, dass Rab6A spezifisch und selektiv in Astrozyten lokalisiert ist. Rab6A ist in der zellbiologischen Literatur bekannt als Marker von Vesikeln und Zisternen des TGN.¹²⁹

Die Untersuchungen von Keil¹⁴³ zeigten eine massive Färbung von Rab6A in kultivierten Astrozyten bis in die distalen Zellfortsätze und an die Zellgrenze heran. Weiterhin konnte Keil¹⁴³ durch Assoziationsanalysen mit Markern des TGN die Rab6⁺ Puncta als TGN-Material identifizieren. Die Befunde deuten darauf hin, dass dieses Organellsystem die ultrastrukturelle Grundlage für die Freisetzung von niedermolekularen Gliotransmittern wie D-Serin und Glutamat bildet. Da die Rab6A⁺ Puncta morphologisch stark an Vesikel oder vesikuläre Organellen erinnern (siehe Abb. 5), besteht Grund zu der Annahme, dass die Rab6A⁺ Vesikel mit den Gliotransmitter D-Serin und Glutamat gefüllt sind. Somit besteht die Überlegung, dass es durch die HFS zu einer strukturellen, intrazellulären Veränderung der Astrozyten mit erhöhter Freisetzung von D-Serin oder Glutamat aus Rab6A⁺ Vesikeln kommen kann. Dadurch könnten die NMDA-Rezeptoren verstärkt aktiviert werden, was zu einer stärkeren Langzeitpotenzierung führen könnte. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden Hirnschnitte unter HFS, ein etabliertes LTP-Modell¹⁴⁵ untersucht.

Die HFS wurde für 2 Stunden durchgeführt, wobei ein Durchlauf aus acht 400 Hz-Stimuli im Abstand von zehn Sekunden bestand (siehe 2.2.3). Je eine Hemisphäre wurde stimuliert und die Tiere danach in tiefer Narkose sofort perfundiert und Vibratomschnitte angefertigt. Die Versuche wurden von T. Jungenitz und PD Dr. S. Schwarzacher, Institut für Anatomie I - Klinische Neuroanatomie, Dr. Senckenbergische Anatomie der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main, an drei Ratten durchgeführt. Zur Färbung der Astrozyten wurde der Antikörper anti-GFAP und für Rab6A anti-Rab6A verwendet. Die Hirnschnitte wurden verblindet untersucht und an je acht Stellen der äußeren und inneren Molekularschicht beider Seiten wurden stichprobenartig seitengleiche Flächen in ihren Intensitäten verglichen (detaillierte Vorgehensweise unter 2.6.5).

Zunächst wurde überprüft, ob zwischen den drei Tieren die Intensitäten unterschiedlich sind, um Fehler in den Färbungen auszuschließen. Je Schicht wurden dabei die Intensitäten verglichen und nach Durchführung einer bifaktoriellen Varianzanalyse mit Post-hoc-Test und anschließender Bonferroni-Holm-Korrektur (Daten nicht gezeigt) zeigt sich, dass sich die Intensitäten in den

jeweiligen Schichten zwischen den Tieren nicht signifikant voneinander unterscheiden.

Als nächstes wurde untersucht, ob in der jeweiligen Hemisphäre die Intensitäten in der äußeren und inneren Molekularschicht in der Rab6A⁺ Färbung unterschiedlich sind. Die äußere Molekularschicht ist dabei unabhängig der Stimulation signifikant intensiver gefärbt als die ipsilaterale innere Molekularschicht (Diagramm 14). Auf der stimulierten Seite weist die äußere Molekularschicht eine Intensität von $13,06 \times 10^4$ Intensitätseinheiten (AE) und die innere Molekularschicht $7,59 \times 10^4$ AE auf. Die äußere Molekularschicht der unstimulierten Seite hat eine Intensität von $8,27 \times 10^4$ AE und die innere Molekularschicht $5,4 \times 10^4$ AE. Anhand der Werte kann nicht nur gezeigt werden, dass die äußere Molekularschicht unabhängig von Stimulation eine signifikant höhere Intensität als die innere Molekularschicht der ipsilateralen Hemisphäre aufweist, sondern auch, dass sich die Intensitäten der jeweils gleichen Molekularschicht zwischen den Hemisphären unterscheidet (Diagramm 15). Die gesamte Molekularschicht der stimulierten Seite erscheint intensiver gefärbt als die kontralaterale Seite (Abb. 29B und C), was bei höherer Vergrößerung noch deutlicher wird (Abb 29F und G). Dies kann nicht nur qualitativ, sondern auch quantitativ mittels Varianzanalyse dargestellt werden. Die Intensität der äußeren Molekularschicht ist auf der stimulierten Hemisphäre signifikant höher als auf der unstimulierten Seite. Auch die innere Molekularschicht der stimulierten Seite ist signifikant intensiver gefärbt als die der unstimulierten Seite.

Zusammenfassend wird gezeigt, dass durch die HFS eine signifikante Erhöhung der Intensität im Rab6A-Farbkanal der stimulierten Seite zustande kommt. Dabei liegt die Intensitätszunahme in der äußeren Molekularschicht bei circa 58% und in der inneren Molekularschicht bei circa 41% verglichen zur unstimulierten Seite.

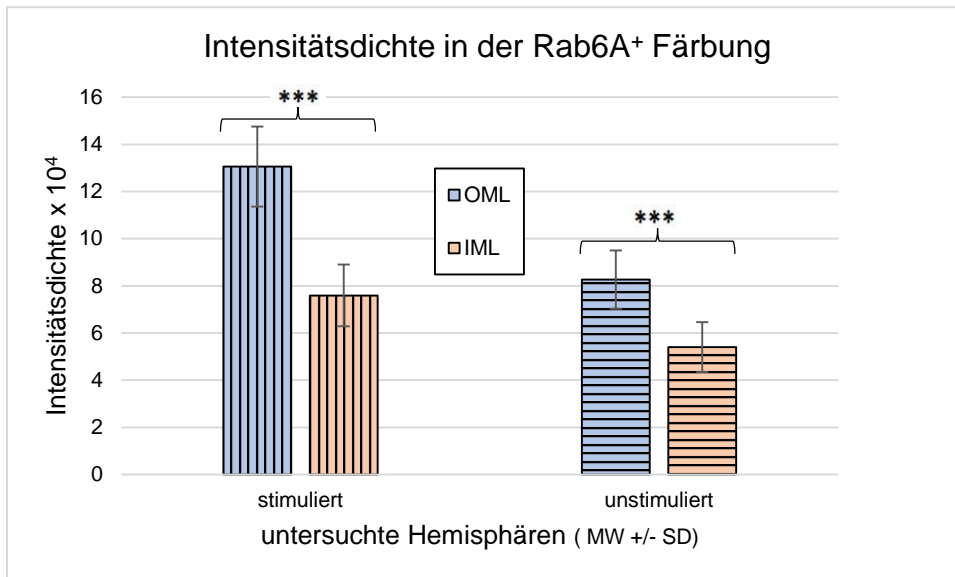


Diagramm 15 - Vergleich der Intensitäten der inneren und äußeren Molekularschicht je Hemisphäre im Rab6A-Farbkanal

*Die äußere Molekularschicht der jeweiligen Hemisphäre ist signifikant intensiver gefärbt als die ipsilaterale innere Molekularschicht. Es wurden die Intensitäten der äußeren und inneren Molekularschicht derselben Hemisphären in der Rab6A⁺ Färbung miteinander verglichen. Übersicht der Mittelwerte der acht Stellen pro Molekularschicht je Tier (24 Stellen pro Schicht) +/- Standardabweichung. Signifikanztest durch bifaktorielle Varianzanalyse mit Post-hoc-Test und Bonferoni-Holm Korrektur, (***) $p < 0,001$. IML, innere Molekularschicht; MW, Mittelwert; OML, äußere Molekularschicht; SD, Standardabweichung.*

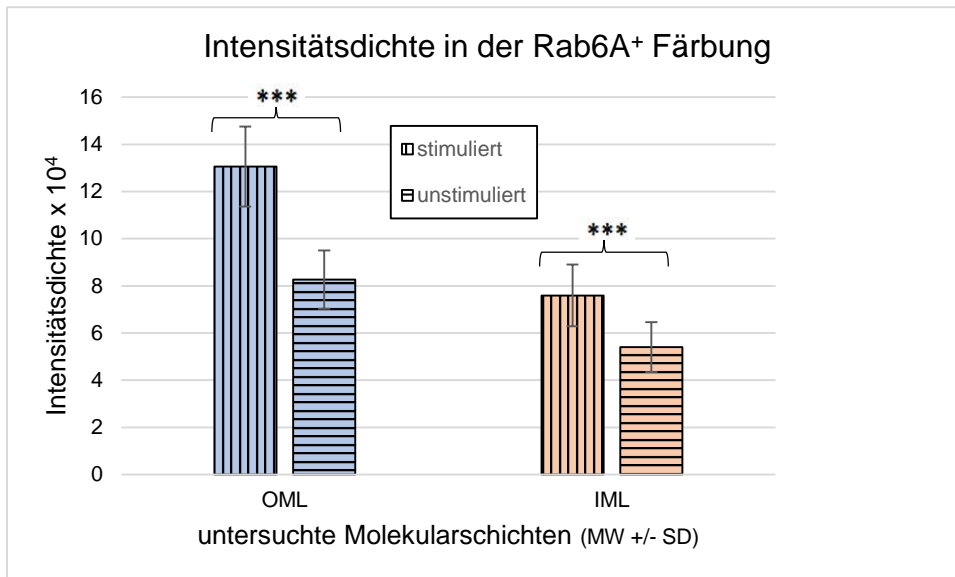


Diagramm 16 - Vergleich der Intensitäten der jeweils gleichen Molekularschicht zwischen den Hemisphären im Rab6A-Farbkanal

Die äußere Molekularschicht der stimulierten Hemisphäre ist signifikant intensiver gefärbt als die äußere Molekularschicht der kontralateralen, unstimulierten Seite. Das Ergebnis ist auf die inneren Molekularschicht übertragbar. Es wurden die Intensitäten der gleichen Molekularschichten zwischen den Hemisphären der Rab6A+ Färbung miteinander verglichen. Übersicht der Mittelwerte der acht Stellen pro Molekularschicht je Tier (24 Stellen pro Schicht) +/- Standardabweichung. Signifikanztest durch bifaktorielle Varianzanalyse mit Post-hoc-Test und Bonferoni-Holm Korrektur, (***) $p < 0,001$. IML, innere Molekularschicht; MW, Mittelwert; OML, äußere Molekularschicht; SD, Standardabweichung.

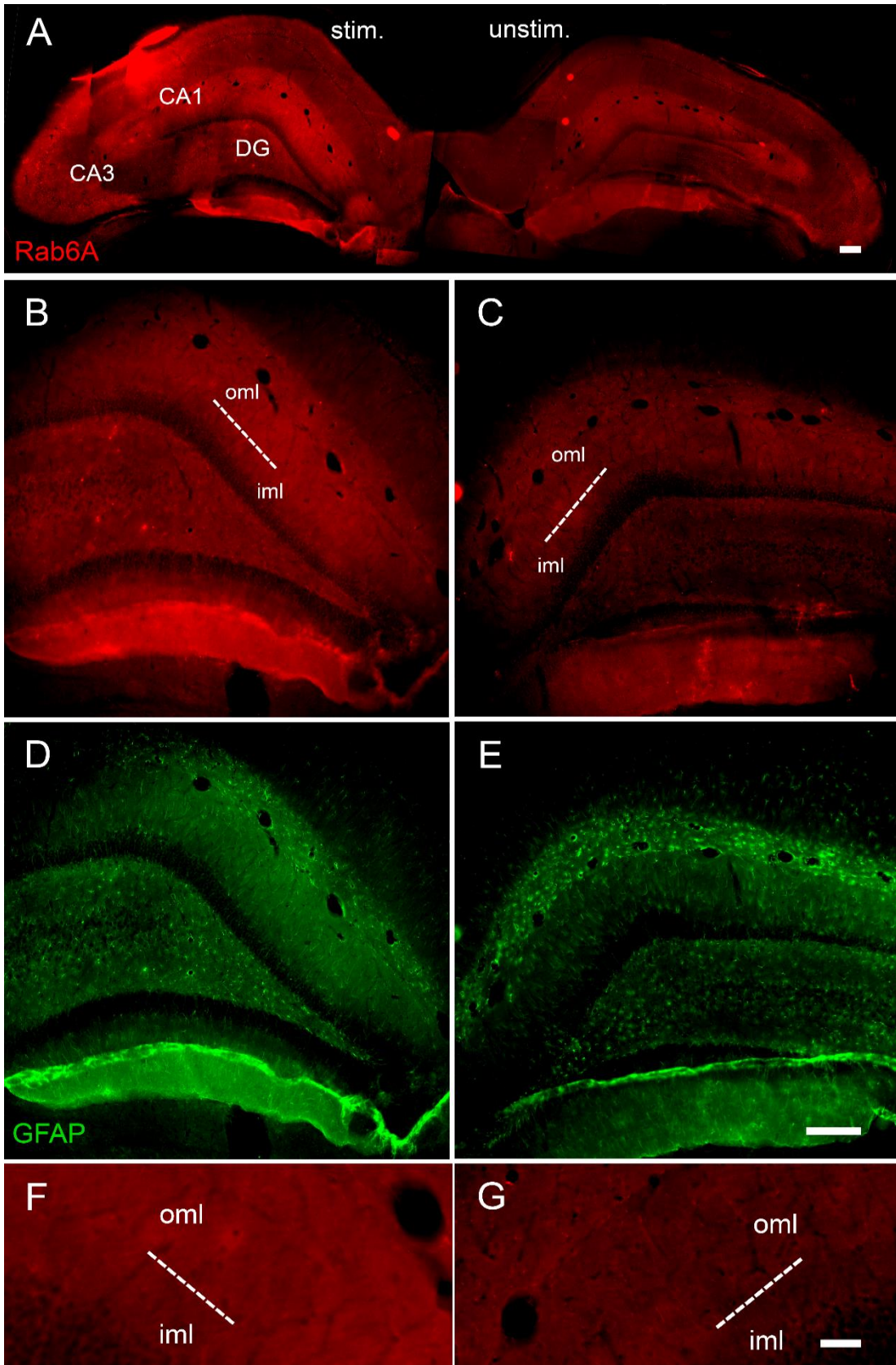


Abbildung 35 - Intensitätsdichtenunterschiede in der Rab6A⁺ und GFAP⁺ Färbung

Immunzytochemische Färbung von Rab6A (rot) und GFAP (grün) an den

Hippocampi einer Doppelhemisphäre. Übersicht einer Doppelhemisphäre im Rab6A-Farbkanal (A) mit Knick im unteren Blatt der FD der stimulierten Seite (in der Messung nicht berücksichtigt). Schon bei 10x Vergrößerung zeigt sich eine intensivere Färbung der stimulierten Hemisphäre (B) gegenüber der unstimulierten, kontralateralen Hemisphäre (C) im Rab6A-Farbkanal. In höherer Vergrößerung wird dies noch deutlicher (F, G). Auch im GFAP-Farbkanal wird eine intensivere Färbung der stimulierten Hemisphäre (D) gegenüber der unstimulierten, kontralateralen Hemisphäre deutlich (E). Die gestrichelte Linie in B, C, F und G zeigt die Grenze zwischen oml und iml. CA, Cornu ammonis; DG, Gyrus dentatus; iml, innere Molekularschicht; oml, äußere Molekularschicht. Maßstab: 100 µm (A), 75 µm (E, für B-E), 5 µm (G, für F+G).

Die oben durchgeführten Untersuchungen wurden an dieser Stelle in der GFAP⁺ Färbung wiederholt. Dazu wurde auch hier zunächst untersucht, ob in der jeweiligen Hemisphäre die Intensitäten in der äußeren und inneren Molekularschicht in der Rab6A⁺ Färbung unterschiedlich sind. Das Ergebnis zeigt, dass die äußere Molekularschicht unabhängig der Stimulation signifikant intensiver als die ipsilaterale innere Molekularschicht gefärbt ist (Diagramm 16). Auf der stimulierten Seite hat die äußere Molekularschicht eine Intensität von $6,7 \times 10^4$ AE und die innere Molekularschicht $4,44 \times 10^4$ AE. Die äußere Molekularschicht der unstimulierten Seite hat eine Intensität von $4,92 \times 10^4$ AE und die innere Molekularschicht $3,46 \times 10^4$ AE. Anhand der Ergebnisse wird nicht nur deutlich, dass die äußere Molekularschicht unabhängig von Stimulation eine signifikant höhere Intensität als die innere Molekularschicht der ipsilateralen Hemisphäre aufweist, sondern auch, dass sich die Intensitäten der jeweils gleichen Molekularschicht zwischen den Hemisphären unterscheidet (Diagramm 17). Dies steht im Einklang mit den publizierten Ergebnissen von Steward et al.¹⁵⁹, die eine Steigerung der GFAP-Expression nach unilateraler Stimulation des entorhinalen Cortex nachweisen konnten.

Die gesamte Molekularschicht der stimulierten Seite erscheint intensiver gefärbt als die kontralaterale Seite (Abb. 29D und E), was auch quantitativ mittels Varianzanalyse gezeigt werden konnte. Die Intensität der äußeren Molekularschicht ist auf der stimulierten Seite signifikant höher als auf der

unstimulierten Seite. Auch die innere Molekularschicht der stimulierten Seite ist signifikant intensiver gefärbt als die der unstimulierten Seite.

Schlussfolgernd wird deutlich, dass durch die HFS eine signifikante Erhöhung der Intensität im GFAP-Farbkanal der stimulierten Seite zustande kommt. Dabei liegt die Intensitätszunahme in der äußeren Molekularschicht bei circa 36% und in der inneren Molekularschicht bei circa 28% verglichen zur unstimulierten Seite. Vergleicht man die Intensitäten der beiden Farbkanäle miteinander ergeben sich folgende Befunde: unabhängig der Stimulation ist die Intensität im Rab6A-Farbkanal in jeder untersuchten Schicht höher als in der jeweiligen Schicht im GFAP-Farbkanal. Dennoch steigt in beiden Farbkanälen die Intensität nach Stimulation deutlich gegenüber der unstimulierten Seite an. Die Intensitätszunahme ist dabei im Rab6A-Farbkanal stärker als im GFAP-Farbkanal.

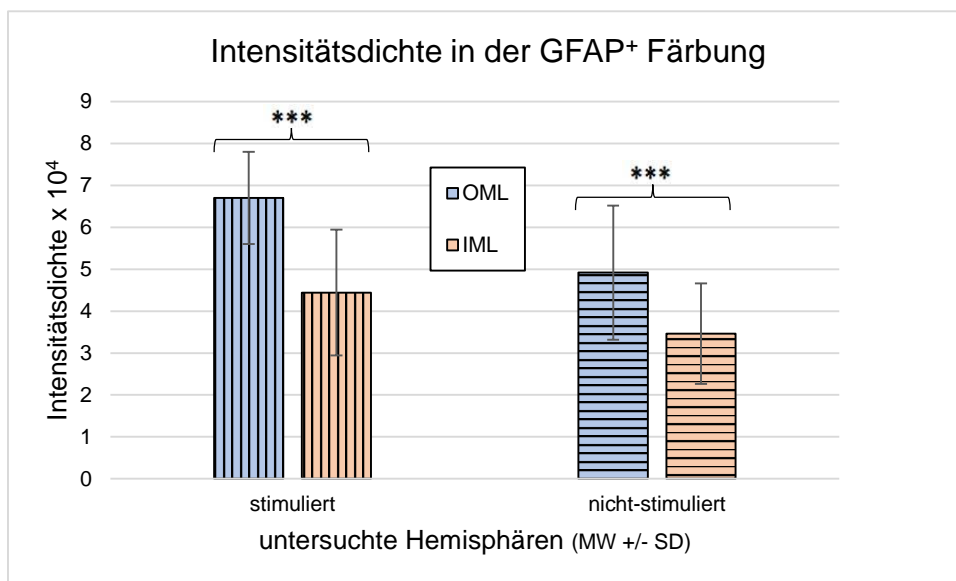


Diagramm 17 - Vergleich der Intensitäten der inneren und äußeren Molekularschicht je Hemisphäre im GFAP-Farbkanal

*Die äußere Molekularschicht ist unabhängig der Hemisphäre signifikant intensiver gefärbt als die ipsilaterale innere Molekularschicht. Es wurden die Intensitäten in der äußeren und inneren Molekularschicht derselben Hemisphäre in der GFAP-Färbung miteinander verglichen. Übersicht der Mittelwerte der acht Stellen pro Molekularschicht je Tier (24 Stellen pro Schicht) +/- Standardabweichung. Signifikanztest durch bifaktorielle Varianzanalyse mit Post-hoc-Test und Bonferoni-Holm Korrektur, (***) $p < 0,001$. IML, innere*

Molekularschicht; MW, Mittelwert; OML, äußere Molekularschicht; SD, Standardabweichung.

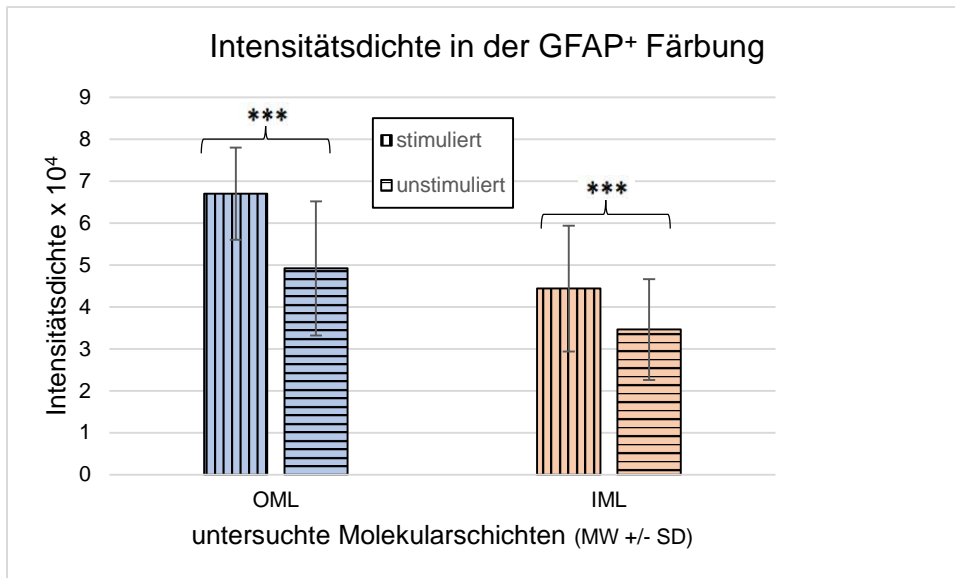


Diagramm 18 - Vergleich der Intensitäten der jeweils gleichen Molekularschicht zwischen den Hemisphären im GFAP-Farbkanal

Die stimulierte Hemisphäre ist signifikant intensiver gefärbt als die kontralaterale, unstimulierte Seite. Die Intensitäten der gleichen Molekularschichten der (un-)stimulierten Hemisphären in der GFAP-Färbung wurden miteinander verglichen. Übersicht der Mittelwerte der acht Stellen pro Molekularschicht je Tier (24 Stellen pro Schicht) +/- Standardabweichung. Signifikanztest durch bifaktorielle Varianzanalyse mit Post-hoc-Test und Bonferoni-Holm Korrektur, (***) $p < 0,001$. IML, innere Molekularschicht; MW, Mittelwert; OML, äußere Molekularschicht; SD, Standardabweichung.

3.8 Auswertung der publizierten Transkriptomanalysen

Neben der immunzytochemischen Untersuchung wurde die mRNA-Expression von Rab6A in Astrozyten untersucht. Dafür wurden vier publizierte Transkriptomanalysen untersucht. Die Hauptzelltypen des Gehirns exprimieren ein unterschiedliches Repertoire an Genen. Genomweite Transkriptionsanalysen haben sich als wichtiges Werkzeug zum besseren Verständnis der Entwicklung und Funktion von definierten Zelltypen etabliert. Sie finden Verwendung bei der Identifizierung von zelltypspezifischen Markern, die zur Entwicklung von Maschinen beitragen, welche zelltypspezifische genetische Manipulationen erlauben, die metabolische Arbeitsteilung zwischen verschiedenen Zelltypen aufdecken und neue zellspezifische Funktionen vorschlagen¹⁵⁰.

Im *Gene Expression Nervous System Atlas* (GENSAT) wird das Gensymbol für Rab6A als 2610028L11Rik, AA419671 und Rab6 bezeichnet.

3.8.1 Darstellung der einzelnen Transkriptomanalysen

Im Folgenden werden die Materialien und Methoden erläutert, mit denen die Forschergruppen in den hier untersuchten Transkriptomanalysen gearbeitet haben. Danach werden die für diese Arbeit relevanten Ergebnisse kurz wiedergegeben und beurteilt (Tabelle 13).

Voranstellend soll schon an dieser Stelle gesagt werden, dass keiner der vier genannten Transkriptomanalysen eine eindeutige Aussage zu Rab6A trifft. Die in den Publikationen verwendeten Genom-Chips lassen allenfalls indirekt eine Aussage zu Rab6A zu, da das Rab6 nur allgemein und Rab6B spezifisch untersucht wurde, aber keine spezifische Rab6A Sonde erwähnt wird.

Die erste Transkriptomanalyse, die in dieser Dissertation untersucht wurde, wurde von Lovatt et al.¹⁴⁸ durchgeführt. Der Cortex der 10-12 Wochen alten GFAPGFP-Mäuse wurde freipräpariert, es wurden drei Tiere perfundiert (n= 3). Vor der Zellsortierung mittels FACS wurden die Astrozyten mit dem Primärantikörper Kaninchen anti-GLT1 und die Neurone mit Maus anti-MAP2 markiert. Die Zellen wurden durch Zellsortiersysteme sortiert, sodass ein Vergleich zwischen GLT1⁺/GFAP-GFP⁺-Astrozyten, GLT1⁻/GFAP-GFP⁻-Zellen und Thy1-YFP⁺-Neurone durchgeführt werden konnte. Die RNA wurde extrahiert und mittels *Affymetrix GeneChip Mouse Genome 430 2.0*. ausgewertet.

Die Daten wurden durch den MAS5-Algorithmus normalisiert, indem die Sondensätze aussortiert wurden, die entweder nur in einer Probe vorkamen oder deren Intensität geringer als 100 AE war. Dadurch wurde die Anzahl der Sondensätze von 45.101 auf 19.369 reduziert. In den veröffentlichten Ergebnissen der Forschergruppe wurden keine Angaben zu den Genen Rab6, Rab6A oder Rab6B getroffen. Somit kann keine Aussage zum Vorkommen der Gene in Astrozyten formuliert werden.

Die zweite Transkriptomanalyse, die untersucht wurde, wurde von der Forschergruppe um Cahoy et al.¹⁰⁷ durchgeführt. Die Vorderhirne von sechs bis acht Wildtyp- oder S100 β -EGFP Mäusen unterschiedlichen Alters wurden dissoziiert. Die Astrozyten wurden mittels FACS und *Immunopanning* und die Neurone nur mittels *Immunopanning* isoliert. Die EGFP-Zellen setzen sich aus Neurone und zu einem geringen Anteil aus endothelialen Zellen zusammen. Auch Oligodendrozyten, myelinisierende Oligodendrozyten und oligomere Procyanidine (OPCS) wurden voneinander getrennt. In der Auswertung wurde zwischen kultivierten Astrozyten, 7-, 17- und einen Tag alten Astrozyten und 17-Tage alten Astrozyten der grauen Substanz unterschieden. Bei den Neuronen wurde zwischen 7- und 17-Tage alten Neuronen und Neuronen, die frei von endothelialen Zellen sind unterschieden. Ausgewertet wurde die RNA mittels *Affymetrix GeneChip Mouse Genome 430 2.0*. Die Proben, die biologische Replikate des gleichen gereinigten Zelltyps und Entwicklungsstadium darstellen, wurden gruppiert und in eine Hauptliste von Sondensätzen, die konsistent in mindestens einer Zellpopulation exprimiert wurden, erstellt. Die 45.037 Sondensätze wurden weiterhin gefiltert, wobei nur Sondensätze verwendet wurden, deren MAS 5.0 Intensität bei mehr als 200 AE in mindestens 2/3 der Proben liegt. Die 20.932 Sondensätze repräsentieren dabei 12.416 Gene.¹⁰⁷ Die Genexpression von Rab6 in den drei gewonnenen und untersuchten Rab6-Proben ist in allen untersuchten Zelltypen vorhanden. Bei den vier gewonnenen und untersuchten Rab6B-Proben hingegen unterscheidet sich die Genexpression des Rab6B in den untersuchten Zellen. Die Rab6B-Genexpression ist in allen Neuronen unterschiedlichen postnatalen Alters vorhanden. Bei den kultivierten Astrozyten, den 17-Tage alten Astrozyten, den 17-Tage alten Astrozyten der grauen Substanz und den einen Tag alten

Astrozyten ist es in der Hälfte der Proben vorhanden und in der anderen Hälfte nicht. Bei den 7-Tage alten Astrozyten ist es in $\frac{3}{4}$ der Proben vorhanden und in $\frac{1}{4}$ nicht. Bei den OPCs, den Oligodendrozyten und den myelinisierenden Oligodendrozyten ist die Rab6B-Genexpression in $\frac{3}{4}$ vorhanden und in $\frac{1}{4}$ nicht. Die Forschergruppe um Cahoy et al.¹⁰⁷ untersuchte weiterhin, in welchen Zelltypen die Rab6- und Rab6B-Gene statistisch gesehen angereichert sind. Wenn die Gene um mehr als das 1,5-fache in den Zelltypen vorkommen, wurden sie aufgelistet. Die Zelltypen wurden einzeln nach dem Alter und als Gesamtheit des Zelltyps untersucht. Rab6 kommt mit dem Faktor 1,9 und Rab6B mit 3,9 in Neuronen vor. Das Rab6B-Gen kommt im Vergleich von unreifen (P7-P8) zu reifen Astrozyten (P17) mit dem Faktor 2,0 in unreifen Astrozyten vor. Im Vergleich von *in vivo* mit kultivierten Astrozyten, kommt das Rab6B-Gen mit dem Faktor 2,0 in *in vivo* Astrozyten vor.

Im Vergleich von myelinisierenden Oligodendrozyten zu OPCs, kommt das Rab6-Gen mit dem Faktor 1,7 und das Rab6B-Gen mit dem Faktor 2,1 in myelinisierenden Oligodendrozyten vor. Im Vergleich von myelinisierenden Oligodendrozyten zu neu gebildeten Oligodendrozyten kommt das Rab6B-Gen mit dem Faktor 2,0 in myelinisierenden Oligodendrozyten vor. Im Hinblick auf die anfangs formulierte Frage, sagen diese Ergebnisse aus, dass das Rab6-Gen in Astrozyten und das Rab6B-Gen in größeren Mengen in unreifen (P7-P8) als in reifen Astrozyten (P17) vorhanden ist. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass auch diese Studie keine Aussage über die Differenzierung von Rab6, Rab6A und Rab6B trifft.

In den Analysen von Doyle et al.¹⁴⁹ wurden die gesamten Gehirne von 8-12 Wochen alten BAC-transgenen Aldh1L1-Mäusen untersucht. Es wurde die TRAP-affinitätsgereinigte mRNA von 4 Tieren (n= 4) mit ungebundener affinitätsgereinigter mRNA von zwei Tieren (n= 2) verglichen. Die Zellisolierung wurde mittels *Immunopanning* durchgeführt. Ausgewertet wurde die RNA mittels *Affymetrix GeneChip Mouse Genome 430 2.0*. Die Sondensätze wurden gefiltert, sodass die schwachen Signale mit einer Intensität von weniger als 50 AE und jene, die als monoklonaler Hintergrund identifiziert wurden nicht berücksichtigt wurden. Es wurden verschiedene Zellen, wie Purkinje-Zellen, Granularzellen des Cerebellums, Golgi-Zellen, Stern- und Korbzellen, unipolare Bürstenzellen,

Oligodendrozyten, Bergmann-Glia und Neurone untersucht. Dabei konnte das Rab6-Gen nur in drei Proben der kortikalen Prepronociceptin-(PNOC)-Neuronen nachgewiesen werden. Die Untersuchung trifft keine Aussage zur Differenzierung von Rab6, Rab6A und Rab6B, lediglich Rab6 wurde erwähnt, welches nicht in Astrozyten vorkommt.

Die letzte untersuchte Transkriptomanalyse wurde von Zhang et al.¹⁵⁰ durchgeführt. Dabei wurden die Cortices von 3-12 BAC-transgenen Mäusen unbestimmten Alters verwendet, die EGFP unter der Kontrolle von regulatorischen Sequenzen in Aldh1L1-BAC exprimiert. Astrozyten, Neurone Mikroglia, Oligodendrozyten, Perizyten und endotheliale Zellen wurden mittels *Immunopanning* und *FACS* sortiert. Die Vorgehensweise zur Filterung der Sondensätze wurde nicht geschildert. Die Expressionsniveauschätzung wurde als Fragmente pro Transkriptsequenz pro Million kartierter Fragmente (FPKM) angegeben. Die Analyse wurde mittels *Affymetrix GeneChip Mouse Genome 430 2.0* durchgeführt. Es wurden dabei mehr als 22.000 Gene untersucht, wobei die Untersuchung des Rab6-Gens zeigt, dass der FPKM-Wert in Neuronen am größten und in Mikroglia am geringsten ist. Nach den Neuronen ist der FPKM-Wert absteigend in neugebildeten Oligodendrozyten, myelinisierenden Oligodendrozyten, OPCs, endothelialen Zellen und Astrozyten vorhanden. Dabei ist der FPKM-Wert in Neuronen circa zweimal so hoch wie in Astrozyten. Die Untersuchung des Rab6B-Gens zeigte, dass der FPKM-Wert in Neuronen am höchsten und in endothelialen Zellen am geringsten ist. Nach den Neuronen ist der FPKM-Wert absteigend in OPCs, myelinisierenden Oligodendrozyten, neugebildeten Oligodendrozyten, Mikroglia und Astrozyten vorhanden. Der FPKM-Wert in Neuronen ist dabei 4,5-fach höher als in OPCs und 10-fach höher als in Astrozyten. Auch hier wurde nicht zwischen den einzelnen Rab6-Formen unterschieden. Die Studie gibt an, dass Rab6B in Neuronen sehr stark und Rab6 in Astrozyten sehr schwach vorkommt.

Tabelle 13 - Übersicht zu den Transkriptomanalysen

Publikation	Gewebe	Alter	n=	Zellisolierung	Genom-Chip	Untergrenze (Signal AE)	Rab6 in A.	Rab6A in A.	Rab6B in A.
Lovatt et al. ¹⁴⁸	Cortex	10-12 Wochen	3	FACS, Vergleich von GFAP-GFP ⁺ /GLT ⁺ -Astrozyten zu GFAP-GFP ⁺ /GLT1-Zellen	Affymetrix GeneChip Mouse Genome 430 2.0	100 oder nur 1x pro Probe vorhanden	-	-	-
Cahoy et al. ¹⁰⁷	Vorderhirn	1-17 Tage	8	FACS, S100 β -EGFP Mäuse	Affymetrix GeneChip Mouse Genome 430 2.0	200 in 2/3 der Proben	+++	-	+++
Doyle et al. ¹⁴⁹	Gesamtes Gehirn	8-12 Wochen	7	TRAP-affinitätsgereinigter mRNA von BAC-transgenen Aldh1L1 Mäusen	Affymetrix GeneChip Mouse Genome 430 2.0	50	x	-	-
Zhang et al. ¹⁵⁰	Cortex	Keine Angabe	1-12	BAC-transgene Mäuse	Affymetrix GeneChip Mouse Genome 430 2.0	Nicht angegeben	+	-	+

n= Tiere, -: keine Aussage, x: nicht vorhanden, +: sehr gering vorhanden, ++: gering vorhanden, +++: stärker vorhanden

3.8.2 Fazit zu den Transkriptomanalysen

Zusammenfassend aus den oben dargestellten Materialien, Methoden und Ergebnissen der vier vorgestellten Transkriptomanalysen lassen sich einige Kernaussagen formulieren. Wie anfangs bereits erwähnt, nimmt keiner der Transkriptomanalysen eine Differenzierung der Gene in Rab6, Rab6A und Rab6B vor. Somit bestätigen die untersuchten Analysen die Ergebnisse dieser Dissertation zwar nicht, stehen aber auch nicht im Widerspruch dazu. Die geringfügige Aussagekraft der Transkriptomanalysen in Bezug auf diese Dissertation resultieren aus den methodischen Schwächen der Ansätze der Analysen, die Rab6A nicht in Betracht ziehen. Da alle vier Publikationen mit demselben Affimetrix-Chip gearbeitet haben, lässt sich daraus die Schlussfolgerung ziehen, dass dieser keine Differenzierung zwischen Rab6, Rab6A und Rab6B zulässt. Des Weiteren besteht die Annahme, dass mit Rab6 eine Sequenz gemeint ist, die nicht zwischen den Unterformen unterscheidet. Aus den Transkriptomanalysen kann jedoch geschlossen werden, dass das Rab6B-Gen nicht oder nur gering in Astrozyten exprimiert wird.^{107,150} Dafür spricht auch, dass in der Analyse von Doyle et al.¹⁴⁹ das Rab6B-Gen methodisch nicht in Astrozyten nachgewiesen werden konnte. Aus den Transkriptomanalysen kann weiterhin geschlossen werden, dass das Rab6B-Gen hauptsächlich in Neuronen exprimiert wird. Dafür spricht, dass in der Studie von Cahoy et al.¹⁰⁷ das Gen einzig in Neuronen in allen untersuchten Sonden vorhanden ist. Auch die Untersuchung von Zhang et al.¹⁵⁰ spricht deutlich für eine neuronenspezifische Expression des Rab6B-Gens.

4 Diskussion

Mit den in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Rab6A ubiquitär und gleichmäßig im gesamten Mausgehirn vorkommt. Es ist in allen Astrozyten lokalisiert und in allen anderen Gliazelltypen abwesend. Rab6A stellt sich als astrozytenspezifischer Marker dar. Eine prinzipielle Übertragbarkeit der Befunde auf den Menschen ist anzunehmen, wodurch zusätzliche Hinweise für mögliche physiologische und pathophysiologische Beteiligungen der Befunde bestehen.

4.1 Diskussion der Methoden

4.1.1 Allgemeines

Zunächst wurde untersucht, ob es sich bei der in den Untersuchungen beschriebenen Immunreaktivität um Rab6A handelt. Dies lässt sich in erster Linie mit der Diskussion der Spezifität der hier angewandten Methode erörtern. Dabei wird zum Vergleich zusätzlich die bereits publizierte Literatur herangezogen. Außerdem gilt es später zu diskutieren, inwieweit die Befunde ausreichen, um Rab6A als astrozytenspezifischen Marker zu etablieren. Auch soll darauf eingegangen werden, welche medizinischen Überlegungen sich durch das Vorkommen von Rab6A im humanen Gewebe entwickeln lassen. Die Ergebnisse dieser Dissertation sollen dabei vor dem Hintergrund der bisherigen Erkenntnisse über die Funktionen des Rab6A diskutiert werden, um daraus resultierende Fragestellungen und Vorgehensweisen zu formulieren.

4.1.2 Validität und Reproduzierbarkeit der Befunde

Die Spezifität der Ergebnisse hängt von zwei unabhängigen Kriterien ab: der Spezifität des Antikörpers und der verwendeten Methodik. Nutzt man die Immunfluoreszenz für die Untersuchung wissenschaftlicher Fragestellungen, besteht die Gefahr, dass die genutzten Antikörper unspezifisch sein könnten. So können Antikörper unter unterschiedlichen Bedingungen nicht nur verschiedene Färbungen verursachen, sondern auch bis zu einem gewissen Grad an unerwünschte Epitope binden. Dies kann sowohl die Befundung als auch die Interpretation der erhaltenen Daten signifikant erschweren. Die Charakterisierung der Antikörperspezifität erfordert den Nachweis, dass der

Antikörper nur an das Protein bindet, welches das immunogene Peptid enthält. Sonst bestünde die Möglichkeit, dass es sich bei der hier dargestellten Rab6A-Immunfluoreszenz, die zur Grundlage der Diskussion genommen wird, um eine unspezifische Bindung des verwendeten Rab6A-Primärantikörpers handelt. Dagegen spricht, dass Keil¹⁴³ in einem Experiment die Antigenspezifität der verwendeten anti-Rab6 (Kaninchen, Santa Cruz; 1:50-1:2000) und anti-Rab6A (Maus, Lifespan Biosciences Clon Nr.3G3; 1:5000) Antikörper untersucht hat. Dabei erkannte er eine weitgehend räumliche Assoziation von Rab6⁺ und Rab6A⁺ Puncta, welche in einigen Zellbereichen sogar Pixel-genau kolokalisiert sind. Die subzelluläre Lokalisation in Zellkultur¹⁴³ und in der vorliegenden Arbeit stehen im Einklang mit zuvor publizierten Lokalisationen. Grigoriev et al.¹³² zeigte unter Nutzung der GFP-Technik, dass Rab6 für den Transport vesikulärer Organellen vom TGN zur Zellmembran in HeLa-Zellen bedeutend ist. Der verwendete Maus anti-Rab6 Antikörper erkennt dabei Rab6A und Rab6A'.¹³² Das Muster der Färbung ähnelt dem Muster der hier durchgeführten Färbung. Echard et al.¹²⁸ zeigten mittels RT-PCR von der Gesamt-RNA aus einer Vielzahl von adulten humanen Geweben, dass Rab6A ubiquitär exprimiert wird. Auch dort ähnelt die Färbung den hier durchgeführten und fotodokumentierten Färbungen. Mit Hilfe von Immunoblots oder Immunpräzipitation kann die Spezifität des Antikörpers für ein bestimmtes Protein bestimmt werden.¹⁶⁰ Der Rab6A Antikörper zeigt in der Produktliteratur im Western Blot eine monospezifische Bande bei der erwarteten Molekülmasse. In den hier durchgeführten Färbungen zeigt er das erwartete Verteilungsmuster, sodass er insgesamt als spezifisch angesehen werden kann.

Um die Spezifität des verwendeten Detektionssystem zu überprüfen sind Kontrollen unerlässlich. Um zunächst zu zeigen, dass die Färbung spezifisch auf den Primärantikörper zurückzuführen ist, wurden Kontrollen erstellt, die bis auf das Weglassen des Rab6A-Primärantikörpers identisch wie das Experiment behandelt wurden. Im Anschluss wurden beide Färbungen unter denselben mikroskopischen Bedingungen aufgenommen und miteinander verglichen. Zum anderen wurden unterschiedliche Sekundärantikörper und Fluochrome zur Darstellung der Rab6A Immunreaktivität verwendet, die einander vergleichbare

Befunde lieferten. Bei der Durchführung der Doppel- und Dreifachimmunfluoreszenz wurde ein *bleed-through* der Kanäle ausgeschlossen. Ein weiterer Faktor, der für die Validität der Ergebnisse spricht, ist die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Alle Untersuchungen, mit Ausnahme von Testreihen und Voruntersuchungen wurden mehrmals durchgeführt. Etabliert wurden die Ergebnisse durch immunzytochemische Untersuchungen an Mäusen (n=5), Ratten (n=3) und humanem Gewebe (n=3 Patienten). Es wurden insgesamt über 10.000 Astrozyten einzeln und verblindet ausgewertet. Die hier dargestellten Aufnahmen zeigen dabei eine Auswahl repräsentativer Zellen der jeweiligen Experimente.

4.1.3 Zelluläre Lokalisation, Auswertung und Befundung

Ziel der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung liegt in der visuellen Beurteilung der räumlichen Beziehung zwischen den untersuchten Proteinen. Dadurch können Aussagen zu möglichen Interaktionen getroffen werden. In dieser Arbeit wurde die zelluläre Lokalisation von Rab6A in Astrozyten und anderen Gliazelltypen untersucht. Im überlagerten Mehrkanalbild kommt es zur Farbänderung in deckungsgleichen Bereichen.

Die quantitative Auswertung wurde verblindet und manuell nach aufgestellten Kriterien durchgeführt (siehe 2.6.2). Dabei liegt es primär im Auge des Betrachters zelluläre Lokalisationen zu erkennen und als solche zu beschreiben. Die Auswertung der lichtmikroskopisch erstellten Aufnahmen erfolgte nach standardisiertem Muster. Die Analyse erfolgte an den Zellkörpern, den Hauptfortsätzen und den peripheren astrozytären Fortsätzen. Als Kolokalisation der verwendeten Antikörper wurde der Farbumschlag der Einzelfarben Rot und Grün zu Gelb und Rot, Grün und Blau zu Weiß gewertet. Fluoreszenzsignale, welche aus überlagernden Zellebenen stammen, könnten zu einer falschen Interpretation der Kolokalisation führen. Durch die durchgeführte Methodik konnte jedoch gewährleistet werden, dass die Antikörper nur auf der Oberfläche der 100 µm dicken Vibratomschnitte die Antigene markieren. Da die Vibratomschnitte nicht permeabilisiert sind, können die Antikörper eine maximale Eindringtiefe von 2-3 µm erreichen, sodass Fluoreszenzsignale aus tieferliegenden Zellebenen die Auswertung nicht beeinflussen können. Durch die

Verblindung wird der Einfluss von Vorannahmen und Erwartungen eliminiert, sodass falsch-positive Ergebnisse minimiert werden können.

4.2 Vorkommen und Verteilung von Rab6A in Astrozyten *in situ*

4.2.1 Bisherige Analyse der Lokalisation von Rab6A im ZNS in der Literatur

Insgesamt gibt es wenig Literatur, die Auskünfte über die genaue Lokalisation von Rab6A und dessen Kolokalisation mit anderen Strukturen im ZNS gibt. Huang et al.¹⁶¹ wiesen durch Immunhistochemie in Kombination mit konfokaler Mikroskopie und Immunoblotting eine zelltypspezifische und lichtabhängige Expression von Rab6 in der Retina von C57BL/6 Mäusen und Sprague Dawley Ratten nach.¹⁶¹ Dabei trafen sie keine Aussage zur Subtyp-Spezifität des Rab6. Durch Vergleich der Immunfärbungen von Rab6 und GS, einem Müllerzellmarker, nahm die Forschergruppe an, dass Rab6 nicht in Müllerzellen lokalisiert ist, ohne jedoch zu einer Schlussfolgerung zur zellulären Rab6 Lokalisation zu kommen. Die veröffentlichten Abbildungen schließen eine Kolokalisation von Rab6 und GS nicht sicher aus, da einige Bereiche deckungsgleich erscheinen. Die in dieser Dissertation gewonnenen Ergebnisse zeigen hingegen eine deutliche Lokalisation von Rab6A in über 3000 untersuchten GS⁺-Astrozyten (siehe Tabelle 6), was für eine Lokalisation von Rab6A in allen GS⁺-Astrozyten spricht.

Scheper et al.¹⁶² untersuchten mit Hilfe von Immunhistochemie und semiquantitativem Western Blot die Expression von Rab6 im Hippocampus und im entorhinalen und temporalen Cortex von zehn Alzheimer-Patienten und sechs Kontrollpersonen. Auch hier wurde keine Differenzierung in die Subtypen Rab6A und Rab6B vorgenommen. Die Immunhistochemie zeigte, dass eine Rab6 Immunfluoreszenz im Cortex von Alzheimer-Patienten nachweisbar ist und dabei prominent die Neuronen der untersuchten Hirnregion anfärbt. Die Forschergruppe verwendete den polyklonalen Kaninchen anti-Rab6 Antikörper (Santa Cruz, CA).¹⁶² Laut Herstellerinformation erkennt und bindet der anti-Rab6 Antikörper alle Isoformen von Rab6 (Rab6A, Rab6A', Rab6B), wohingegen der in der vorliegenden Arbeit verwendete anti-Rab6A Antikörper rein spezifisch für Rab6A ist. Keil¹⁴³ zeigte, dass der anti-Rab6 Antikörper (Santa Cruz) eine höhere Spezifität für Rab6B besitzt, da bei wesentlich geringerer Konzentration (1:2000)

der anti-Rab6 Antikörper die Rab6B⁺ intraneuronale Strukturen im Hirnschnitt markiert und erst in höheren Konzentrationen (1:50) auch eine Affinität zu Rab6A aufweist. Die Rab6⁺ und Rab6A⁺ Strukturen unterscheiden sich in Form und Größe, sind bei hoher Konzentration des anti-Rab6 Antikörpers jedoch assoziiert und in einigen Zellbereichen sogar Pixel-genau kolokalisiert.¹⁴³ Zusammenfassend legen die Befunde nahe, dass der polyklonale Rab6 Antikörper (Santa Cruz, CA) eine höhere Spezifität für Rab6B aufweist und erst in stark erhöhter Konzentration andere Rab6 Isoformen markiert. Da in der Literatur Rab6B als Neuronen-spezifische Form angesehen wird^{129,125} kann angenommen werden, dass Scheper et al.¹⁶² den Subtyp Rab6B verwendet haben. Dies steht im Einklang mit den Transkriptomanalysen von Cahoy et al.¹⁰⁷ und Zhang et al.¹⁵⁰, die eine neuronale Expression von Rab6B nachgewiesen haben. Auch Opdam et al.¹²⁵ wiesen durch Northern Blot ein gewebe- und zelltypspezifisches Expressionsmuster für Rab6B in neuronalem Gewebe und Zellen auf, wobei sie Rab6B auch mit Mikroglia in Verbindung gebracht haben. Durch die hier untersuchten und publizierten, zelltyp-spezifischen Transkriptomanalysen lassen sich keine eindeutigen Aussagen zu Rab6A formulieren (siehe 3.8). Da das Rab6-Gen in der Literatur mitunter auch als Rab6A-Gen bezeichnet wird, ist fraglich, ob die veröffentlichten Ergebnisse der Transkriptomanalysen mit dem Rab6-Gen auch das Rab6A-Gen miteinschließen. Dagegen spricht, dass die Rab6-Expression laut Transkriptomanalysen in Neuronen deutlich höher als in Astrozyten sei.^{107,150} In den hier durchgeführten Untersuchungen konnte Rab6A als spezifisches, selektiv in allen Astrozyten vorkommendes Protein etabliert werden. Auch die Dreifachfärbung mit Rab6A, Sox9 und Bisbenzimidin zeigte keine Rab6A⁺/Bisbenzimidin⁺/Sox9⁻ Zellen, was für eine nicht-astrozytäre Zelle sprechen würde (siehe 3.3.4). Keine der Transkriptomanalysen nimmt eine Differenzierung der Gene in Rab6 und Rab6A vor. Die in den Publikationen verwendeten Genom-Chips lassen allenfalls indirekt eine Aussage zu Rab6A zu, da Rab6 nur allgemein und Rab6B spezifisch untersucht wurde, aber keine spezifische Rab6A Sonde erwähnt wird. Somit bestätigen die untersuchten Transkriptomanalysen die Ergebnisse dieser Dissertation zwar nicht spezifisch, stehen aber auch nicht im Widerspruch dazu. Die geringfügige Aussagekraft der

Transkriptomanalysen in Bezug auf die vorliegenden immunzytochemischen Lokalisationen resultieren aus den methodischen Schwächen der Ansätze der Analysen, die Rab6A nicht spezifisch in Betracht ziehen.

Aus den genannten Überlegungen wird deutlich, dass Rab6A in Bezug auf seine zentralnervöse Kolo-kalisation zu Zellen und anderen Strukturen ein wenig untersuchtes Protein ist. Weiterführend ist es wichtig die Genom-Chips anhand der unterschiedlichen Gensequenzen von Rab6 und Rab6A¹²⁹ zu überarbeiten. Somit könnte die Lokalisation von Rab6A in Astrozyten auch durch Transkriptomanalysen bestätigt werden, was die Validität des Befundes weiter steigern würde.

4.2.2 Sind die Rab6A⁺ Puncta Rab6A⁺ Organellen?

Die mit dem anti-Rab6A Antikörper markierten Astrozyten zeigen alle ein ausnahmslos starkes Signal und lassen bei geringer Vergrößerung ein ubiquitäres Verteilungsmuster der Rab6A⁺ Strukturen über alle Hirnregionen erkennen (siehe Abb. 4). Bei höherer Vergrößerung stellen sich zahllose Rab6A⁺ Puncta dar, welche Zytosol und Fortsätze mit heterogener Verteilungsdichte ausfüllen (siehe Abb. 5). Diese Puncta kommen einzeln oder als unregelmäßig auftretende prägnante Akkumulationen vor. Die Rab6A⁺ Strukturen können auch teils wabig teils parallel und gradlinig verlaufen. Es stellt sich die Frage, um was es sich bei den Rab6A⁺ Puncta handelt.

Für die Beurteilung der durch das Fluoreszenzmikroskop betrachteten Rab6A⁺ Strukturen muss berücksichtigt werden, dass die fluoreszierenden Strukturen in Form und Größe dem ursprünglich markierten Antigen nicht entsprechen. Nach optischer Anregung der immunzytochemisch markierten Rab6A⁺ Strukturen erzeugt das fluoreszierende Antigen eine erleuchtete Umgebung, welche aufgrund der Auflösungsgrenze des optischen Systems nicht vom zentralen fluoreszierenden Antigen abgegrenzt werden kann. Die bei höherer Vergrößerung dargestellten zahlreichen Rab6A⁺ Puncta erinnern in ihrer Form an Vesikel, die stellenweise in prägnanten Akkumulationen zu Clustern vorkommen. Teilweise imponieren die Rab6A⁺ Puncta als verschlungene und wulstige Strukturen, welche stark an das Bild von größeren vesikulären Organellen wie z.B. Zisternen erinnern. Da es sich um subzelluläre Strukturen am Rande der Auflösungsgrenze des optischen Systems handelt, ist die

Etablierung einer geeigneten Terminologie erschwert, weswegen diese Strukturen im vorliegendem Ergebnisteil neutral als „Puncta“ bezeichnet wurden, um keine Vorannahmen zu treffen.

Vesikel sind sehr kleine, rundlich bis ovale Bläschen, die von einer Membran umgeben sind. Sie sind u.a. für den Transport von Stoffen verantwortlich, wozu beispielsweise die exozytotischen und endozytotischen Vesikel gehören. Vesikuläre Organellen weisen keine rundliche Form auf, sondern kommen als tubuläre, cisternartige oder auch verzweigte Vesikel vor. Eine Alternative wäre, dass Rab6A z.B. zytoplasmatisch vorliegt, an anderen Organellen oder auch als Protein ans Zytoskelett gebunden ist. Das kann durch das alleinige betrachten mittels Lichtmikroskop nicht bestimmt werden. Da jedoch bekannt ist, dass Mitglieder der Rab6-Familie an der Regulation des Membrantransports beteiligt und mit membrangebundenen Organellen assoziiert sind,^{132,129} können die Rab6A⁺ Strukturen hier durchgehend als Vesikel oder vesikuläre Organellen bezeichnet werden, auch ohne dies für Astrozyten gesondert im Elektronenmikroskop nachzuweisen. Auch die Untersuchungen von Keil¹⁴³ unterstützen diese Hypothese, da er durch Assoziationsanalyse von Rab6, Trans-Golgi p230 und TGN38 zeigen konnte, dass es sich um Rab6⁺ Vesikel handelt, die Material des TGN darstellen.

4.2.3 Zellbiologische Interpretation und mögliche Funktionen der Rab6A⁺ Organellen

Astrozyten unterscheiden sich in Größe und subzellulärem Verteilungsmuster der Rab6A⁺ Strukturen, was besonders zwischen dem Zytoplasma, den astrozytären Haupt- und Nebenfortsätzen deutlich wird. Die Rab6A⁺ Verteilung wurde in dieser Arbeit deskriptiv in vier Typen unterteilt, die in der Maus in absteigender Häufigkeit vorkommen (siehe Tabelle 7). Quantitativ wurden pro Typ zehn gut erkennbare GFAP⁺-Astrozyten ausgewählt und die Flächen der Rab6A⁺ Puncta ermittelt (siehe 2.6.4). Dabei dient die Größenbestimmung rein zur Unterscheidung der Typen, da die gemessenen Organellengrößen aufgrund der Auflösungsgrenze systematisch fehlerbehaftet sind. Die Größen müssen zu einem späteren Zeitpunkt elektronenmikroskopisch ermittelt und ausgewertet werden.

Typ I weist eine gleichmäßige subzelluläre Verteilung der Rab6A⁺ Puncta perinukleär, in den Hauptfortsätzen und den angedeuteten GFAP⁻ peripheren Fortsätzen auf. Dabei bedecken zahlreiche einzelne, einigermaßen gleichmäßig verstreut liegende Rab6A⁺ Puncta den Astrozyten und lassen in ihrer Form an kleine Vesikel denken. Mit einer Fläche von 2,5 µm² sind sie die kleinsten Rab6A⁺ Vesikel und unterscheiden sich signifikant vom Typ II und hochsignifikant vom Typ IV. Zum Typ III wird das Signifikanzniveau knapp verfehlt. Die Rab6A⁺ Puncta des Typs II imponieren perinukleär als verschlungene und wulstige Strukturen, die an Zisternen erinnern. An den Hauptfortsätzen und den angedeuteten GFAP⁻ peripheren Fortsätzen zeigen sie sich in einer clusterförmigen Gruppierung, die an zahlreiche, aus Zisternen abknospende Vesikeln denken lassen. Die Rab6A⁺ Puncta des Typs II erscheinen mit einer Fläche von 3,0 µm² größer als die des Typs I und III aber kleiner als die des Typs IV. Durch die Signifikanztestung konnte dies nur bedingt belegt werden. Sie sind signifikant größer als die Rab6A⁺ Vesikel des Typs I aber nicht als die Rab6A⁺ Vesikel der Typen III und IV. Typ III scheint mit seiner Größenverteilung von 2,6 µm² zwischen Typ I und Typ II zu liegen. Im Zytoplasma imponieren die Rab6A⁺ Puncta als Cluster, die wiederum an zahlreiche Zisternen und abknospenden Vesikel erinnern. An den Zellfortsätzen gleichen sie den gleichmäßig verteilten, kleineren Rab6A⁺ Puncta vom Typ I, bei denen es sich um einzelne Vesikel handeln könnte. Insgesamt unterscheiden sich die Rab6A⁺ Puncta des Typs III in ihrer Größe signifikant zum Typ IV, jedoch nicht zu den Typen I und II. Typ IV weist spärlich verteilte, kleine Rab6A⁺ Puncta in den Hauptfortsätzen und clusterförmig verschmolzene Rab6A⁺ Puncta perinukleär auf. An den Hauptfortsätzen erinnern die Rab6A⁺ Puncta an kleinere Einzelvesikel, wohingegen sie perinukleär an zusammengesetzte, größere Strukturen wie dem Golgi-Apparat erinnern. Sie sind mit 4,3 µm² deutlich größer als die Strukturen der anderen Typen. Dies konnte im Vergleich zu den Typen I und III hochsignifikant gezeigt werden, im Vergleich zu Typ II jedoch nicht.

Die GFAP⁺-Astrozyten des Typs I assoziieren im Schnitt mit 123 Rab6A⁺ Puncta, in den Typen III und IV sind signifikant weniger Rab6A⁺ Puncta vorhanden. Typ II hat im Schnitt 104 Vesikel in einem Astrozyten, was signifikant mehr als in Typ III und hochsignifikant mehr als in Typ IV ist. Die Anzahl der Rab6A⁺ Vesikel in

Typ III unterscheidet sich mit 107 Vesikel hochsignifikant von Typ IV, wo im Mittel 9 große Cluster in einem Astrozyten lokalisiert sind. Dabei handelt es sich um nicht weiter auflösbare, größere Strukturen, die wahrscheinlich zusammengesetzt sind, denkbar wären beispielsweise Golgi-Apparate, bzw. mit diesen assoziierten Zisternen des TGN.

Zusammenfassend wird deutlich, dass die Rab6A⁺ Strukturen nicht nur in ihrer Größenverteilung und Form heterogen sind, sondern sich auch in ihrer Anzahl deutlich unterscheiden. Besonders die clusterförmigen Ansammlungen und die Anordnung als verschlungene und wulstige Strukturen erschweren die optische Ausdifferenzierung einzelner Strukturen, was die Untersuchung der Größen signifikant beeinflusst. Dennoch können auf Grundlage der subzellulären Verteilung und der Anzahl der Strukturen empirisch-deskriptiv eine Unterteilung in vier Typen vorgenommen werden. Die stark variierenden Größen der Organellen sprechen dabei für ein komplexes biologisches System mit multifaktorieller Genese.¹⁶³ Schon in Zellen nicht-neuronalem Gewebes konnten elektronenmikroskopisch TGN-zugehörige Organellen beschrieben werden,¹⁶⁴⁻¹⁶⁶ die eine Inhomogenität aufweisen. Diese Morphologie könnte den hier gestellten lichtmikroskopischen Befunden von Vesikeln und größeren Zisternen in Astrozyten entsprechen. Auch durch Brunkhorst¹⁶⁷ wurden TGN-ähnliche Organellen elektronenmikroskopisch mit einem Antikörper gegen das von Astrozyten sezernierte Glykoprotein Reelin markiert. Keil¹⁴³ konnte anhand von morphologischen Charakteristika und durch immunzytochemische Doppelmarkierungen an kultivierten Astrozyten zeigen, dass die beobachteten Rab6A⁺ Vesikel und Zisternen Teil des TGN und gleichzeitig Exozytose-Organellen darstellen. Die Rab6A⁺ Exozytose-Organellen könnten durch Fragmentation und durch Abknospung von größeren Zisternen des TGN entstehen. Anhand der von Keil¹⁴³ dargestellten Befunde lässt sich außerdem vermuten, dass zunächst größere TGN-Zisternen bis weit in die Zellperipherie transportiert werden und kleine Vesikel erst dort abknopsen und der Exozytose zugeführt werden. Die große Varianz in Form und Größe der Rab6A⁺ Organellen spricht dafür, dass es sich um ein Vesikelsystem handelt, welches sich über Golgi-Apparat, Zisternen des TGN, bis zu den feinsten peripheren Fortsätzen der Astrozyten erstreckt.

Die Astrozyten und ihre Rab6A⁺ Vesikel der Typen I-IV kommen in allen untersuchten Hirnregionen der Maus in absteigender Häufigkeit (I-IV) vor. Einzelne Typen sind nicht regionenspezifisch vorhanden und zeigen auch keine Unterschiede zwischen grauer und weißer Substanz. Sie kommen weder massiert noch kumuliert, sondern eher zufallsverteilt im Gewebe vor. Dabei kann keine systematische Nähe zu bestimmten Strukturen wie Gefäßen, Zellschichten (im Hippocampus) oder Pia festgestellt werden. Diese Beobachtungen wiederholen sich in den untersuchten Tieren. Funktionell wäre denkbar, dass die vier Typen eine Momentaufnahme der Aktivität des Astrozyten widerspiegeln. So könnte Typ I einen aktiven Astrozyten zeigen, welcher gerade die zum Beispiel mit Transmitter beladenen Rab6A⁺ Vesikel freisetzt. Typ IV könnte dagegen einen inaktiven Astrozyten widerspiegeln, welcher nur einen Bruchteil seiner Rab6A⁺ Vesikel sezerniert. Dafür spricht, dass die meisten Rab6A⁺ Vesikel des Typs IV perinukleär lokalisiert sind und das TGN die Rab6A⁺ Vesikel noch nicht nach peripher transportiert hat.

Auch auf das untersuchte humane Gewebe kann die an der Maus etablierte Klassifizierung übertragen werden. Anders als in der Maus kommen die Typen I-IV, außer bei den nicht-reaktiven GFAP⁺-Astrozyten des Patienten III, nicht in absteigender Häufigkeit vor. Dies könnte damit zusammenhängen, dass es sich bei dem untersuchten Gewebe des Patienten III um weitgehend unverändertes Zugangsgewebe im Sinne einer Kontrolle handelt. Dabei kann man aufgrund der Morphologie annehmen, dass die GFAP⁺-Astrozyten nicht pathologisch verändert sind. Bei den anderen Patienten wurde zwar qualitativ zwischen reaktiven und nicht-reaktiven GFAP⁺-Astrozyten unterschieden, was jedoch auf morphologischer und nicht biochemischer Grundlage basiert. Daher kann nicht sicher ausgeschlossen werden, dass einige der untersuchten nicht-reaktiven GFAP⁺-Astrozyten nicht doch bereits pathologisch verändert sind. Bei Typ IV könnte es sich, wie oben bereits beschrieben, um einen inaktiven Astrozyten handeln. Andererseits könnte es sich um Astrozyten handeln, die nicht in der Lage sind Rab6A⁺ Vesikel zu sezernieren, wodurch die Glia-Neuron-Kommunikation gestört sein könnte, was zu astrozytenassoziierte Pathologien führen oder auf andere Pathologien Einfluss nehmen könnte.

4.2.4 Unterschiedliche Rab6A⁺ Intensitäten und Dichten

Schon bei geringer Vergrößerung erscheint die Dichte der Rab6A⁺ Strukturen in der weißen Substanz geringer als in der grauen (siehe Abb. 2). Dies kann durch die unterschiedlichen Morphologien bedingt sein, welche die Astrozyten verschiedener Hirnregionen aufweisen. Astrozyten der weißen Substanz haben glatte Fortsätze die in der Peripherie wenig verzweigt sind. Im Vergleich zu protoplasmatischen Astrozyten überlappen sich die Fortsätze benachbarter Faserastrozyten stark.

Innerhalb des Hippocampus unterscheidet sich die Intensität der Rab6A⁺ Strukturen stark voneinander (siehe Abb. 3). Schon bei geringer Vergrößerung wird eine stärkere Intensität in der Subgranularzone des Gyrus dentatus und im Stratum pyramidale des Cornu ammonis als in benachbarten Schichten innerhalb des Hippocampus deutlich. Nicht nur wegen der unterschiedlichen Rab6A⁺ Intensitäten, sondern auch durch das Vorhandensein von adulten Stammzellen ist die Subgranularzone für die Forschung von großer Bedeutung. Lange Zeit wurde angenommen, dass im adulten Gehirn keine neuen Neurone entstehen und somit untergegangene Neurone nicht ersetzt werden können. Über Jahrhunderte galt das menschliche Gehirn somit als nicht regenerationsfähig. Durch die Forschung der letzten Jahrzehnte konnte jedoch gezeigt werden, dass auch im adulten Gehirn Stammzellen existieren, die proliferieren und sich weiter zu Neuronen differenzieren können.^{168,169} Dies prägte die Bezeichnung der adulten Neurogenese, was die Fähigkeit der Neubildung von Nervenzellen im adulten Gehirn bezeichnet. Die Entdeckung und die daraus folgende Erforschung von adulten Stammzellen im humanen ZNS verändert die heutige Sicht auf die Regenerationsfähigkeit des Gehirns maßgeblich. Im Laufe der Jahre konnten mehrere proliferative Zonen im ZNS identifiziert werden. Bei der subventrikulären Zone des lateralen Ventrikels und der Subgranularzone des Gyrus dentatus handelt es sich um die am meist beforschten und maßgeblichen Stammzellregionen des ZNS.¹⁷⁰ Aber auch in der Amygdala,¹⁷¹ dem Neocortex¹⁷² und dem Striatum¹⁷³ befinden sich proliferative Zonen.

Eine Stammzelle teilt sich kontinuierlich und produziert entweder zwei neue Stammzellen oder nur eine Tochterzelle. Aufgrund dieser Fähigkeit werden Stammzellen als multipotente Zellen bezeichnet, da sie aus einer einzigen

Stammzelle verschiedene Zelltypen hervorbringen können. Das zeigt wiederum, dass eine Stammzelle definitionsgemäß noch nicht differenziert ist. Heterotrope Transplantationsexperimente haben gezeigt, dass die neurogene Aktivität von adulten Stammzellen vorwiegend von ihrer extrazellulären Umgebung abhängig ist.¹⁷⁴ Einfluss auf die neurogene Aktivität haben klassische Entwicklungssignale wie *Notch*, *Bone Morphogenetic Proteins*, *Eph/ephrins*, *Noggin* und *Sonic hedgehog*.¹⁷⁵ Durch die Neurogenese werden bestimmte Zellgruppen zeitlebens erneuert, was eine neue Grundlage zur Untersuchung von regenerativen Therapieverfahren bietet. Ein klinisches Beispiel stellt die Behandlung der Parkinson-Krankheit dar. Morbus Parkinson gilt als unheilbare neurodegenerative Erkrankung, die durch das vorwiegende Absterben der dopaminproduzierenden Nervenzellen in der Substantia nigra gekennzeichnet ist.¹⁷⁶ Für die Heilung der Parkinson-Erkrankung müssten sich die adulten Stammzellen des Gehirns in Dopamin-produzierende Zellen differenzieren, sodass abgestorbene Zellen im Gehirn von Parkinson-Patienten ersetzt werden und wieder ausreichend Dopamin produziert wird. Dazu müssten jedoch die Mechanismen verstanden werden, die die Entwicklung der Zellen steuern. Die hier gewonnenen Ergebnisse zeigen, dass sowohl die Subgranularzone als auch das Stratum pyramidale satt von Rab6A⁺ Vesikeln ausgefüllt ist. An dieser Stelle wären weiterführende Untersuchungen an Stammzellen indiziert. Dabei sollte überprüft werden, inwieweit Rab6A in den adulten Stammzellen lokalisiert ist und ob es eine Auswirkung auf die Differenzierung adulter Stammzellen hat. Dafür müssten die adulten Stammzellen mit Immuno-Markern angefärbt und auf eine Kolokalisation dieser Marker mit Rab6A überprüft werden. Sox2 könnte zum Färben der adulten Stammzellen verwendet werden, da es eine hohe Expression in embryonalen und adulten Stammzellen aufweist.¹⁷⁷ NeuroD ein Transkriptionsfaktor, der als Differenzierungsindikator der Neurogenese angesehen wird, dient als neuronales Bestimmungsgen.¹⁷⁷ CD24 markiert die unreifen Neuronen und Ependymzellen. Zur Markierung der unreifen Astrozyten können die Antikörper GFAP, Vimentin und S100 β verwendet werden. Zur Markierung von Oligodendrozyten kann Olig2 verwendet werden. Des Weiteren haben Stolt et al.¹⁷⁸ gezeigt, dass Sox9 zuerst in neuronalen Stammzellen und später stark in Astrozyten des ZNS exprimiert wird, was sich mit den Ergebnissen

von Sun et al.¹⁵⁵ deckt. Es ist für die Entwicklung von Oligodendrozyten und Astrozyten essentiell.¹⁷⁸ Sox9 trägt dazu bei, dass neuronale Stammzellen von der Neurogenese zur Gliogenese wechseln.¹⁷⁸ Nach Anfärben der Zellen mit den genannten Markern könnte mittels quantitativer Auswertung die Rab6A⁺ Zellen klassifiziert werden.

4.2.5 Nachweis von Rab6A in allen Astrozyten

Keil¹⁴³ konnte durch seine Untersuchungen eine Lokalisation von Rab6A in kultivierten Astrozyten zeigen. Da kultivierte Astrozyten ein verändertes Expressionsmuster aufweisen können,¹⁴⁴ wurde in dieser Dissertation die Lokalisation von Rab6A in Astrozyten *in situ* untersucht.

Zuerst wurde das prinzipielle Vorliegen von Rab6A in GFAP⁺-Astrozyten untersucht. Da alle untersuchten GFAP⁺-Astrozyten Rab6A⁺ sind, konnte der Zellkulturbefund repliziert werden. Um zu überprüfen, ob es sich bei den GFAP⁺/Rab6A⁺-Astrozyten um eine bisher unbekannte Untergruppe von GFAP⁺-Astrozyten handelt, wurde eine Dreifachimmunfluoreszenz zur Darstellung der GFAP⁺/Rab6A⁺-Astrozyten mit GS zum einen oder Aldh1L1 zum anderen vorgenommen. Dabei zeigt sich, dass alle untersuchten GFAP⁺/Rab6A⁺-Astrozyten sowohl GS⁺ als auch Aldh1L1⁺ sind. Dies legt nahe, dass die GFAP⁺/Rab6A⁺-Astrozyten keine Untergruppe der GFAP⁺-Astrozyten darstellen, was wiederum im Einklang mit dem Befund steht, dass 100% der GFAP⁺-Astrozyten Rab6A⁺ sind (siehe Diagramm 1). Zudem zeigen die Befunde, dass alle GFAP⁺-Astrozyten nicht nur Rab6A⁺ sondern auch GS⁺ und Aldh1L1⁺ sind, was eine astrozytäre Heterogenität verdeutlicht (siehe Diagramm 2 und 3).

Da mit Ausnahme des Hippocampus (Maus) die GFAP⁺-Astrozyten in allen Regionen nur eine Untergruppe aller Astrozyten darstellen,⁷ wurde die Lokalisation von Rab6A in GS⁺-Astrozyten untersucht. Wenn auch kontrovers diskutiert (siehe 4.5.2) wurde an dieser Stelle von der Annahme, dass GS als spezifischer Marker alle Astrozyten färbt ausgegangen. Alle untersuchten GS⁺-Astrozyten sind Rab6A⁺. Als nächstes konnte gezeigt werden, dass alle GS⁺/Rab6A⁺-Astrozyten des Hippocampus und Corpus callosum (Faserastrozyten) GFAP⁺ sind, wohingegen im Cortex und Thalamus die GS⁺/Rab6A⁺-Astrozyten sowohl GFAP⁺ als auch GFAP⁻ sein können. Dabei

steht das Corpus callosum stellvertretend für die weiße Substanz. Dies bestätigt frühere Befunde zur Astrozytenmarkierung mit GFAP und GS.⁷ Des Weiteren markiert GS besonders die peripheren, sehr filigranen Fortsätze an der Grenze der lichtmikroskopischen Auflösung. Rab6A⁺ Vesikel finden sich überall und in hoher Dichte in diesen Fortsätzen (siehe Abb. 11). Mögliche funktionelle Bedeutung könnte dabei in der Freisetzung von Inhalten aus beladenen Rab6A⁺ Vesikeln über diese Fortsätze liegen.

Ebenso sind alle untersuchten Aldh1L1⁺-Astrozyten des Cortex, Corpus callosum und Thalamus Rab6A⁺. Im Hippocampus sind vier der 698 untersuchten Aldh1L1⁺-Zellen Rab6A⁻. Bei weiterer Untersuchung der Aldh1L1⁺/Rab6A⁺-Astrozyten mit GFAP zeigt sich ein ähnliches Ergebnis wie bei der Untersuchung der GS⁺/Rab6A⁺-Astrozyten. Im Thalamus und Cortex sind die untersuchten Aldh1L1⁺/Rab6A⁺-Astrozyten sowohl GFAP⁺ als auch GFAP⁻, im Hippocampus und Corpus callosum hingegen nur GFAP⁺. Vier der 698 untersuchten hippocampalen Aldh1L1⁺-Astrozyten sind sowohl Rab6A⁻ als auch GFAP⁻. Dies entspricht 0,57%, die restlichen 99,43% der untersuchten Aldh1L1⁺-Astrozyten sind Rab6A⁺ und GFAP⁺. Diese vier Zellen sind scharf von der Umgebung abgegrenzt und weiträumig von Rab6A ausgespart. Benachbarte Aldh1L1⁺-Astrozyten sind massiv Rab6A⁺ gefärbt (siehe Abb. 13), was auf eine biologische Abweichung hindeutet, da die weiteren hippocampalen Astrozyten, die in diesem Experiment untersucht wurden diesen Befund nicht aufweisen. Auch bei der Untersuchung der Lokalisation von Rab6A und GFAP in den 2182 hippocampalen GS⁺-Astrozyten konnte kein derartiges Vorkommen nachgewiesen werden. Auch in keiner der anderen untersuchten Hirnregionen konnte ein Rab6A⁻-Astrozyt detektiert werden. Stützt man sich nun auf die Annahme, dass sowohl GS als auch Aldh1L1 ein Marker für alle Astrozyten ist, muss davon ausgegangen werden, dass jeder GS⁺-Astrozyt auch Aldh1L1⁺ ist und umgekehrt. Da in den durchgeführten Experimenten jeder hippocampale Astrozyt sowohl GS⁺ als auch GFAP⁺ ist und es unter den 2182 untersuchten hippocampalen Astrozyten keinen GS⁺/GFAP⁻-Astrozyten gibt, können unter der genannten Vorannahme keine Aldh1L1⁺/GFAP⁻-Astrozyten im Hippocampus existieren. Wäre dies doch der Fall, was bei 0,57% der Aldh1L1⁺-Astrozyten eine sehr geringe Wahrscheinlichkeit ist, so würde die genannte Annahme nicht

zutreffen. Zur weiteren Bestätigung, dass es keine Aldh1L1⁺-Astrozyten gibt die Rab6A⁻ und GFAP⁻ sind, sollte in einem weiteren Schritt eine Dreifachimmunfluoreszenz mit Aldh1L1, GS und dem astrozytären Kernmarker Sox9 durchgeführt werden. Sox9 gilt nach neuem Stand der Literatur als astrozytenspezifischer Kernmarker,¹⁵⁵ sodass durch eine quantitative Auswertung überprüft werden könnte, ob jeder Sox9 markierte Astrozyt tatsächlich Aldh1L1⁺ und GS⁺ ist. In der hier durchgeführten Doppelfärbung mit Sox9 und Rab6A sind alle untersuchten Sox9⁺-Astrozyten Rab6A⁺. Schlussfolgernd lässt sich sagen, dass Rab6A spezifisch und selektiv in allen Astrozyten vorkommt. Dazu zählen nicht nur GFAP⁺-Astrozyten, sondern auch GS⁺- und Aldh1L1⁺-Astrozyten, die als pan-astrogliale Marker gelten.^{115,107} Auch durch den neu etablierten, astrozytenspezifischen Kernmarker Sox9¹⁵⁵ konnte Rab6A als ein in allen Astrozyten vorkommendes Protein und astrozytenspezifischer Marker bestätigt werden.

4.2.6 Rab6A ist in keinem anderen Gliazelltypen lokalisiert

Rab6A in Mikroglia

Zunächst wurde die Lokalisation von Rab6A in kortikaler Mikroglia aus mehreren Kryostatschnitten von zwei Mäusen untersucht. Auf eine Kontrollfärbung ohne Erstantikörper anti-Rab6A wurde an dieser Stelle verzichtet (siehe 3.5.1). Zweidrittel der Mikroglia zeigt dabei ein Signal im Rab6A-Farbkanal, wohingegen Eindrittel kein Signal aufweist. Bei den positiven Mikrogliazellen kommen vereinzelte, selten zwei sehr starke, große Signal eng perinukleär vor. Da es sich um 3D Überlagerungen aus tieferen Schnittschichten handeln könnte wurde der Versuch an Vibratomschnitten wiederholt, die im Gegensatz zu Kryostatschnitten nicht permeabilisiert sind. Auch dieser Versuch zeigt eine ähnliche Verteilung des Rab6A⁺ Signals. Da sich das Signal auch hier als ein einzelner, großer Punkt eng perinukleär darstellt und nicht gleichmäßig über die Zelle verteilt vorkommt, wie es an Astrozyten gezeigt wurde, wurde in einem Wiederholungsversuch zusätzlich eine Kontrolle ohne Rab6A-Antikörper angefertigt. Dabei zeigt sich unerwartet auch in der Kontrollfärbung des Rab6A-Farbkanals ein deutliches Signal perinukleär in den Mikrogliazellen. Das Vorkommen des Signals sowohl in der Rab6A⁺ Färbung als auch in der Kontrollfärbung ohne anti-Rab6A Antikörper spricht für eine selektive, unspezifische Immunfluoreszenz in Mikroglia. Um diese

Annahme weiter zu untersuchen, wurden vier verschiedene Ansätze - mit unterschiedlichen Sekundärantikörpern in verschiedenen Farbkanälen untersucht. Dabei zeigt sich, dass bei den verwendeten Antikörperansätze die falsch-positive Kolo-kalisation von Iba1 und Rab6A geringer wird. Diese Befunde legen nahe, dass das Vorkommen des selektiven, unspezifischen Rab6A⁺ Signals in Mikroglia von den verwendeten Sekundärantikörper abhängig ist. Dafür spricht, dass sich die Morphologie des Signals nicht mit der bekannten, typischen Morphologie des Rab6A deckt, welche durch die durchgeführten Untersuchungen etabliert und auf mehrere Arten validiert wurde (siehe 4.1.2). Einige Überlegungen, wie das unspezifische, selektiv in Mikroglia vorkommende Signal zustande kommen könnte sollen diskutiert werden. Die Sekundärantikörper zum Färben von Rab6A, welche in den Ansätzen drei und vier verwendet wurden, unterscheiden sich von den Sekundärantikörpern der ersten beiden Ansätze durch eine Präadsorption gegen Rattenspezifische Immunglobuline. Das legt die Vermutung nahe, dass der Sekundärantikörper Esel-anti-Maus-Cy3 (Ansatz I) unspezifisch an Komponenten der Mausschnitte bindet, was zum unspezifischen, selektiv in Mikrogliazellen vorkommenden Signal führt.

Dieses unspezifische Signal zeigt sich auch in den Untersuchungen an Astrozyten und Oligodendrozyten, was jedoch keinen Einfluss auf die Auswertung hatte, da sich das unspezifische Signal nicht in den untersuchten Zellen, sondern außerhalb und von diesen entfernt darstellt, was die Vermutung nahelegt, dass dort nicht gefärbte Mikroglia lokalisiert ist. Des Weiteren ist der Hintergrund-Signal-Abstand so groß gewesen, dass das unspezifische Signal zum Hintergrund gezählt und nicht in die Auswertung aufgenommen wurde. Auch die Verwendung von unterschiedlich vorbehandelten Hirnschnitten beeinflusst die Ergebnisse. Die Auflösung zwischen Vibratomschnitten und Kryostatschnitten ist aufgrund der unterschiedlichen Vorbehandlung verschieden. Die Zellen brechen durch das Schockgefrieren und anschließende Auftauen auseinander, sodass die Antikörper in tiefere Schichten des Hirnschnitts eindringen und an Epitopen unterschiedlicher Tiefen binden können. Auch durch die Verwendung von Triton X-100 wird die Permeabilität der Kryostatschnitte erhöht, sodass die Antikörper tiefer penetrieren können. Auch

die Dicke der Schnitte entscheidet, wie tief ein Antikörper vordringen kann. Die Kryostatschnitte sind meist zwischen 12-14 μm dick wohingegen die Vibratomschnitte eine Dicke von 100 μm haben. Da die Vibratomschnitte nicht permeabilisiert wurden, dringen die Antikörper in geringere Tiefen von circa 2-3 μm in die Hirnschnitte ein. Durch diese Vorbehandlungen wird das Auftreten von Überlagerungen durch 3D-Projektion minimiert. Daraus lässt sich schließen, dass die Vibratomschnitte mit ihrer geringeren Antikörper-Penetration einer konfokalen Mikroskopie ohne Streulicht aus anderen parafokalen Ebenen ähneln. Die z-Auflösung der Vibratomschnitte ist dadurch höher und es lassen sich genauere Aussagen über eine mögliche zelluläre Lokalisation treffen. Bei den Kryostatschnitten kann durch das Auftreten von Überlagerungen und dem Streulicht aus anderen parafokalen Ebenen keine genauen Aussagen getroffen werden, wodurch es häufiger zu falsch positiven Ergebnissen kommen kann. Schlussfolgernd legen die Befunde nahe, dass Rab6A nicht in Mikrogliazellen lokalisiert ist.

Rab6A in NG2-Zellen

Es wurde die Lokalisation von Rab6A in NG2-Zellen an mehreren Kryostatschnitten von zwei Mäusen untersucht. Drei der 299 untersuchten NG2-Zellen zeigen ein Rab6A⁺ Signal, wohingegen die restlichen NG2-Zellen Rab6A⁻ sind. Die Untersuchung an Vibratomschnitten zeigt zwar eine Rab6A⁺ Färbung jedoch kein NG2⁺ Signal auf (Daten nicht gezeigt). Da dieses Problem auch bei Wiederholung der Färbung auftritt, ist ein Verfahrensfehler unwahrscheinlich. Die Kryostatschnitte wurden einer milden, kurzzeitigen 10-15-minütiger Fixierung unterzogen. Die Vibratomschnitte wurden hingegen über zwei Stunden fixiert, sodass die Dauer der Fixierung das NG2-Epitop für den verwendeten Antikörper unkenntlich gemacht oder zerstört haben könnte, sodass eine Auswertung der Lokalisation von Rab6A in NG2-Zellen in Vibratomschnitten somit nicht möglich ist. Durch die eindeutigen Ergebnisse, die an Kryostatschnitten gewonnen wurden, scheint die Lokalisation von Rab6A in NG2-Zellen ausgeschlossen, weshalb eine erneute Untersuchung an kürzer fixierten Geweben nicht notwendig erscheint.

Rab6A in Oligodendrozyten

Es wurde die Lokalisation von Rab6A in insgesamt 1385 Oligodendrozyten der weißen und grauen Substanz einzeln überprüft und ausgewertet. Dabei sind im Cortex 98,3% und im Corpus callosum 99,5% der untersuchten Oligodendrozyten Rab6A⁺. Bei den positiven Oligodendrozyten könnte es sich um ein falsch positives Ergebnis handeln. Die Untersuchungen wurden sowohl an Kryostat- als auch an Vibratomschnitten durchgeführt. Wie bereits erwähnt kommt es bei Kryostatschnitten zu einer stärkeren Antikörper-Penetration in tiefere Hirnschichten, wodurch es zu Überlagerungen aus anderen parafokalen Ebenen kommt, was die Befunde negativ beeinflussen und Ergebnisse verfälschen kann. Die falsch positiven Befunde können jedoch auch durch periphere, fein verzweigte astrozytäre Fortsätze zustande kommen, die voll von Rab6A⁺ Puncta sind und eng an benachbarte Oligodendrozyten liegen. Schlussfolgernd wird deutlich, dass die in der vorliegenden Arbeit gezeigte Rab6A Immunfluoreszenz, mit verschiedenen astrozytären Markern wie GFAP, GS, Aldh1L1 und Sox9 assoziiert ist und keine Lokalisation von Rab6A in anderen Gliazelltypen wie Mikroglia, NG2-Zellen und Oligodendrozyten vorkommt. Diese Ergebnisse lassen eine astrozytäre Expression und Sekretion des Proteins annehmen, sodass im Rahmen dieser Studie Rab6A einerseits als gleichmäßig und ubiquitär im gesamten Gehirn vorkommendes Protein nachgewiesen werden und andererseits als astrozytenspezifischer Marker etabliert werden kann.

4.3 Rab6A im humanen Gewebe

Um die prinzipielle Übertragbarkeit der gewonnenen Befunde auf den Menschen zu überprüfen, wurde reseziertes Cortex-Gewebe von drei Patienten unterschiedlicher pathologischer Genese untersucht. An Mäusen konnte gezeigt werden, dass Rab6A selektiv und spezifisch in allen Astrozyten vorkommt, weshalb im humanen Gewebe GFAP⁺-Astrozyten repräsentativ für alle Astrozyten untersucht wurden. Da in Mäusen Rab6A in keinen anderen Gliazelltypen lokalisiert ist, wurde an dieser Stelle auf eine Kolokalisationsanalyse von Rab6A und Markern für andere Gliazelltypen verzichtet. Anhand der Morphologie und der Intensität der GFAP⁺ Färbung können die GFAP⁺-Astrozyten in reaktive und nicht-reaktive Astrozyten unterteilt

werden. Rab6A ist in allen untersuchten nicht-reaktiven GFAP⁺-Astrozyten lokalisiert, sodass nahegelegt werden kann, dass die Befunde der Maus auf den Menschen übertragbar sind.

Zusätzlich soll diskutiert werden, inwieweit die pathologischen Befunde der untersuchten Patienten in Zusammenhang mit der Rab6A⁺ Immunfluoreszenz stehen. Der erste Patient weist zum Zeitpunkt der Operation eine FCD des Palmis Typs II, ILAE Typ IIA im temporalen Cortex und Amygdala sowie eine Hippocampussklerose des Typs ILAE III auf. Untersucht wurde hierbei der temporale Cortex. Der zweite Patient weist eine FCD des ILAE Typs IIb im rechten frontalen Cortex auf. Bei Auswertung des Gewebes stellte sich ein Befund dar, bei dem es sich um eine Emperipolesis handeln könnte. Unter bestimmten physiologischen und pathologischen Bedingungen werden gelegentlich hämatogene Zellen wie Lymphozyten, Granulozyten, Plasmazellen und Erythrozyten im Zytoplasma großer Zellen wie Histozyten und Megakaryozyten eingeschlossen.¹⁵⁶ Dieses Phänomen wurde dabei von Humble et al.¹⁷⁹ als Emperipolesis bezeichnet. Raine et al.¹⁸⁰ berichteten erstmals über das Auftreten einer Emperipolesis wobei Oligodendrozyten in hypertrophen Astrozyten der weißen Substanz eines Patienten mit multipler Sklerose lokalisiert waren.¹⁸⁰ Nachfolgend durchgeführte Studien zeigten, dass die Emperipolesis in verschiedenen pathologischen Zuständen neben akuten demyelinisierenden Krankheiten wie Multiple Sklerose und auch in nicht-demyelinisierenden Erkrankungen wie Hirnhypoxie, Hirninfarkt und vererbten Leukodystrophien auftreten kann.¹⁸⁰⁻¹⁸² Auch bei der Rosai-Dorfman-Erkrankung, einer seltenen Erkrankung aus der Gruppe der Histozytosen, kommt die Emperipolesis vor.¹⁵⁶ In der hepatischen und hypoglykämischen Enzephalopathie zeigt sich die Emperipolesis in der weißen Hirnsubstanz.¹⁸³ Obwohl der genaue Mechanismus, die Ätiologie und die Bedeutung der Emperipolesis nicht völlig geklärt sind, wird eine akute und subakute Schädigung der weißen Substanz als wesentlich für das Auftreten angesehen.¹⁸³ Zum einen wird angenommen, dass es die Phagozytose von neu gebildeten Oligodendrozyten durch reaktive Astrozyten repräsentiert,¹⁸⁴ ein entgegengesetzter Standpunkt stellt den Mechanismus als Schutz von proliferierenden Oligodendrozyten durch hypertrophe Astrozyten dar.¹⁸² Die letztere Hypothese wird auch durch Nishie et al.¹⁸³ unterstützt, die herausfanden,

dass die invaginierten Oligodendrozyten innerhalb des astrozytären Zytoplasmas gegen Phagozytose durch Makrophagen geschützt waren.¹⁸³

Das Gewebe des dritten Patienten weist ein Gangliogliom des WHO Grades I mit Infiltration des Hippocampus auf, der Sklerosegrad ist nicht beurteilbar. Durch den Cortex wurde ein Zugang zum Gangliogliom präpariert, wobei das Zugangsgewebe untersucht wurde.

In den untersuchten Hirnschnitten aller drei Patienten kommen nicht-reaktive GFAP⁺-Astrozyten vor, die alle Rab6A⁺ sind. Bei den Patienten I und II kommen neben nicht-reaktiven auch reaktive Astrozyten vor, wobei 12% der reaktiven Astrozyten des Patienten I Rab6A⁻ sind. Die reaktiven Astrozyten des Patienten II sind alle Rab6A⁻. Beim Patienten III wurden keine reaktiven Astrozyten detektiert, was sich dadurch erklären lässt, dass es sich um Zugangsgewebe zur eigentlichen Läsion handelt, sodass davon ausgegangen werden kann, dass das Gewebe nicht pathologisch verändert ist und die Astrozyten nicht-reaktiv sind, auch wenn Entzündungsmediatoren und gesteigerte Aktivitäten auch über eine Entfernung wirken können.

Astrozyten spielen in der Entwicklung und Reifung der Synapsen eine wichtige Rolle, denn es wird davon ausgegangen, dass sich Synapsen ohne Astrozyten nicht korrekt entwickeln können.³⁴ Die Rab6A⁻ reaktiven Astrozyten könnten in Zusammenhang mit der FCD Typ IIa stehen, bei der neben der kortikalen Strukturanormalität auch dysmorphe Neurone vorkommen. Durch die fehlende Abknospung von Rab6A⁺ Vesikeln könnte den Neuronen für die Entwicklung wichtige Substanzen wie beispielsweise die Gliotransmitter Glutamat und D-Serin¹⁸⁵ oder Reelin¹⁶⁷ fehlen. Gegen diese Hypothese spricht, dass bei der FCD Typ IIb auch dysmorphe Neurone beobachtet werden, jedoch jeder reaktive Astrozyt des Patienten II Rab6A⁺ ist.

Auch das prozentuale Vorkommen der Rab6A⁺ Typen unterscheidet sich zwischen den reaktiven und nicht-reaktiven Astrozyten, sodass kein Zusammenhang zwischen den Typen und der Erkrankung ersichtlich ist.

Zusammenfassend wird deutlich, dass sich sowohl die Morphologie der Rab6A⁺ Organellen als auch das eigentliche Vorhandensein von Rab6A bei verschiedenen Pathologien (FCD und Gangliogliom) prinzipiell unterscheiden kann. Durch die geringe Fallzahl (n=3) kann allerdings keine signifikante Aussage

zu deren Relation oder gar zu einer möglichen pathologischen Bedeutung getroffen werden. Dafür müssten in systematischen Studien Gruppen von ausreichend vielen Proben von Patienten mit vergleichbarer Pathologie auf Rab6A untersucht und miteinander verglichen werden.

4.4 Einfluss der HFS auf Astrozyten und Rab6A

In dieser Arbeit konnte vorangehend nachgewiesen werden, dass Rab6A spezifisch und selektiv in Astrozyten lokalisiert ist. Da in der zellbiologischen Literatur Rab6A als Marker von Vesikeln und Zisternen des TGN bekannt ist¹²⁹ und Keil¹⁴³ durch Assoziationsanalysen mit Markern des TGN die Rab6⁺ Puncta als TGN-Material identifizieren konnte, deuten die Befunde darauf hin, dass dieses Organellsystem die ultrastrukturelle Grundlage für die Freisetzung von niedermolekularen Gliotransmittern wie D-Serin und Glutamat bildet. Da die repetitive HFS von exzitatorischen Synapsen im Hippocampus zu einer Langzeitpotenzierung führt, die von NMDA-Rezeptoren abhängig ist und Astrozyten die Aktivierung dieser Rezeptoren durch die Calcium-abhängige Freisetzung des NMDAR-Koagonisten D-Serin regulieren können,¹⁵⁸ besteht Grund zu der Annahme, dass es durch die HFS zu einer strukturellen, intrazellulären Veränderung der Astrozyten mit erhöhter Freisetzung von D-Serin oder Glutamat aus Rab6A⁺ Vesikeln kommt.

Die folgenden Befunde stellen sich sowohl im Rab6A- als auch im GFAP-Farbkanal dar. Vergleicht man die Intensitäten der jeweils gleichen Molekularschichten zwischen den Hemisphären wird deutlich, dass die äußere Molekularschicht der stimulierten Hemisphäre signifikant intensiver gefärbt ist als die äußere Molekularschicht der kontralateralen, unstimulierten Seite. Das gleiche Ergebnis zeigt sich im Seitenvergleich der inneren Molekularschichten. Der Vergleich der äußeren und inneren Molekularschicht der jeweiligen Hemisphäre zeigt, dass die äußere Molekularschicht signifikant intensiver als die ipsilaterale, innere Molekularschicht gefärbt ist. Die erhöhte GFAP⁺ Intensität in der äußeren Molekularschicht der stimulierten Seite gegenüber der unstimulierten steht im Einklang mit der anfänglichen Hypothese, dass es durch die HFS zu einer strukturellen, intrazellulären Veränderung der Astrozyten kommt. Dies stimmt auch mit den publizierten Ergebnissen von Steward et al.¹⁵⁹ überein, die eine Steigerung der GFAP-Expression nach unilateraler Stimulation

des entorhinalen Cortex nachweisen konnten. Durch die intrazellulären Veränderungen der Astrozyten könnte es zu einer gesteigerten Abknospung von Rab6A⁺ Vesikel kommen, was im Einklang mit der erhöhten Rab6A⁺ Intensität stünde. Die erhöhten Rab6A⁺ und GFAP⁺ Intensitäten in der inneren Molekularschicht der stimulierten Seite gegenüber der unstimulierten, kontralateralen Seite lässt sich auf abzweigende Fasern des Tractus perforans zurückführen.¹⁸⁶ Da ein einzelner Astrozyt mit all seinen Fortsätzen eine Fläche von bis zu 80.000 μm^2 einnehmen kann¹⁷ ist es wahrscheinlich, dass die Astrozyten der äußeren Molekularschicht mit einigen Fortsätzen in der inneren Molekularschicht enden, wodurch es in dieser zu einer Intensitätssteigerung kommen kann. Vergleicht man die Rab6A⁺ und GFAP⁺ Intensitäten qualitativ miteinander, könnte von einer Korrelation in der Steigerung der Intensitäten ausgegangen werden. Da Rab6A auch die submikroskopischen peripheren Fortsätze anfärbt erscheint die gesamte Molekularschicht der Fascia dentata gleichmäßig und ubiquitär gefärbt, wohingegen GFAP nur die Hauptfortsätze färbt und die Bereiche zwischen den Astrozyten ungefärbt bleibt. Dadurch ist ein quantitativer Vergleich der beiden Intensitäten erschwert, an dieser Stelle aber auch nicht notwendig.

Die Hochfrequenzstimulation wird vom entorhinalen Cortex über den Tractus perforans in die Körnerzellschicht des Gyrus dentatus geleitet. Axone aus dem lateralen Anteil des entorhinalen Cortex terminieren im äußeren Drittel, Axone aus dem medialen Anteil im mittleren Drittel der Molekularschicht. Dabei übermitteln die Afferenzen verschiedene Aspekte von Informationen an den Gyrus dentatus; die lateralen sensorische Informationen und die medialen räumliche Lokalisationen und limbische Signale.¹⁸⁷ Savtchouk et al.¹⁸⁸ identifizierten präsynaptische NMDA-Rezeptoren als einen Grund für die unterschiedliche Informationsverarbeitung. Schon frühere Untersuchungen zeigten, dass von Astrozyten freigesetztes Glutamat die Afferenzen vom entorhinalen Cortex zum Gyrus dentatus verstärken.¹⁸⁹ Der Effekt schien durch präsynaptische NMDA-Rezeptoren vermittelt zu werden, die die Wahrscheinlichkeit der Transmitterfreisetzung erhöhten und zusätzlich die Glutamatrezeptor-Untereinheit GluN2b enthielten.¹⁹⁰ Einige präsynaptische NMDA-Rezeptoren können ohne vorherige Depolarisation und in Abwesenheit

von Aktionspotenzialen der Axone aktiviert werden. Dies ist aufgrund der zusätzlich im Rezeptorkanal vorhandenen, atypischen GluN3a-Untereinheit möglich.¹⁸⁸ Die Kombination von Patch-Clamp Elektrophysiologie und hochauflösender Immunogold-Elektronenmikroskopie in Wildtyp- und GluN3a-Knockout Mäusen zeigte, dass die Wahrscheinlichkeit einer erhöhten Glutamatfreisetzung schaltkreisspezifisch ist und nur bei den Axonen aus dem medialen Anteil des entorhinalen Cortex anzutreffen war.¹⁸⁸ Grund dafür liegt im anatomischen Unterschied der beiden Faserbahnen: die präsynaptischen NMDA-Rezeptoren, die die GluN3a-Untereinheiten enthalten, kommen nur im medialen Anteil des entorhinalen Cortex vor und werden durch Astrozyten aktiviert. Diese Ergebnisse legen nahe, dass eine selektive Modulation des medialen Anteils des entorhinalen Cortex unter Mitwirkung von Astrozyten vorliegt. Es stellt sich die Frage, ob die Abknospung von Rab6A⁺ Vesikel an einer Selektivität im Speziellen und an der Langzeitpotenzierung im Allgemeinen beteiligt ist.

4.5 Zur Heterogenität der Astrozyten

4.5.1 GFAP⁺-Astrozyten

Es ist etabliert, dass GFAP nicht alle Astrozyten markiert. Es wird vermehrt von Astrozyten der weißen Substanz und weniger von Astrozyten des Cortex exprimiert aber von allen Bergmann-Gliazellen des Cerebellums und allen Astrozyten des Hippocampus.⁷ In den vorliegenden Untersuchungen zeigen sich alle GFAP⁺-Astrozyten sowohl GS⁺ als auch Aldh1L1⁺. Andersherum sind jedoch nicht alle untersuchten GS⁺- oder Aldh1L1⁺-Astrozyten GFAP⁺. Im Cortex und Thalamus sind sowohl GFAP⁺/GS⁺-Astrozyten als auch GFAP⁻/GS⁺-Astrozyten vorhanden. Im Hippocampus und Corpus callosum, welches stellvertretend für die weiße Substanz steht, finden sich nur GFAP⁺/GS⁺-Astrozyten, sodass geschlussfolgert werden kann, dass sich in der weißen Substanz nur GFAP⁺/GS⁺-Astrozyten befinden, d.h. dass alle Faserastrozyten GFAP⁺/GS⁺ sind. Selbiges Ergebnis zeigt die Doppelfärbung von GFAP und Adlh1L1. Im Thalamus und Cortex finden sich sowohl GFAP⁺/Aldh1L1⁺-Astrozyten als auch GFAP⁻/Aldh1L1⁺-Astrozyten. Im Hippocampus und Corpus callosum sind wiederum nur GFAP⁺/Aldh1L1⁺-Astrozyten. Die GFAP⁺-Astrozyten stellen somit

eine Untergruppe der Astrozyten dar und sind sowohl GS⁺ als auch Aldh1L1⁺. Auch kann davon ausgegangen werden, dass alle GFAP⁺-Astrozyten Sox9⁺ sind, da Sox9 ein astrozytenspezifischer Kernmarker ist, der alle Astrozyten anfärbt.¹⁵⁵

4.5.2 GS⁺-Astrozyten

Da die Glutamin Synthetase von vielen Forschern als pan-astroglialer Marker angesehen wird,¹¹⁵ wurde GS auch in dieser Arbeit zur Darstellung von Astrozyten verwendet. Sie färbt den astrozytären Zellkörper, die Hauptfortsätze und besonders die filigranen, GFAP⁻ peripheren Fortsätze an.

Anlauf und Derouiche¹¹⁵ haben die Lokalisation von GS in verschiedenen Zellen diskutiert. Forscher, die eine Lokalisation von GS in Oligodendrozyten beschrieben haben, haben sich hauptsächlich auf die wenig überzeugende Morphologie der Zellen in der grauen Substanz verlassen.¹¹⁵ Auch die Untersuchung dreier Studien zur Koloalisation von GS mit oligodendroglialen Markern können nicht adäquat miteinander verglichen werden, da verschiedene Antisera verwendet wurden und unterschiedliche Morphologien und deren Interpretationen deutlich werden.¹¹⁵ Die neuronale Lokalisation von GS wurde in allen Studien unbestritten ausgeschlossen.¹¹⁵ Weitere Ergebnisse zeigten sich in den Untersuchungen von Theofilas et al.¹⁹¹ Die Untersuchungen wurden an Cx43-GFP Mäusen durchgeführt; wobei GFP als Marker für das Connexin43-Transgen nicht alle Astrozyten markiert, wie in der GS-Doppelmarkierung zu sehen ist. Im Hippocampus und Neocortex der Maus wurden durch Doppelmarkierungen mit GFP/GS und GFP/GFAP zwei verschiedene Populationen beschrieben. Zum einen die GS⁺/GFP⁺, zum anderen GS⁺/GFP⁻-Zellen.¹⁹¹ Dabei wurden die GS⁺/GFP⁻-Astrozyten des Hippocampus in der Literatur anfänglich als „komplexe Zellen“ oder auch „GluR-Zellen“ bezeichnet und als unreife Astrozyten angesehen.^{192,193} Später wurden diese „komplexen Zellen“ als NG2-Zellen identifiziert, welche sich deutlich von Astrozyten unterscheiden.¹⁹⁴⁻¹⁹⁶

Im Rahmen der hier durchgeführten Untersuchungen kristallisieren sich verschiedene Populationen von Astrozyten heraus. Im Cortex und Thalamus der Maus kommen GS⁺/GFAP⁺- als auch GS⁺/GFAP⁻-Astrozyten vor, jedoch keine GS⁻/GFAP⁺-Astrozyten. Im Hippocampus und Corpus callosum gibt es nur

GS⁺/GFAP⁺-Astrozyten. Somit legen die Ergebnisse nahe, dass die untersuchten Astrozyten alle GS⁺ sind. Es wurden keine GS⁺-Zellen detektiert, die sich von der markanten astrozytären Morphologie unterscheiden, sodass anzunehmen ist, dass GS in Astrozyten lokalisiert ist und auch nur diese in immunzytochemischen Untersuchungen anfärbt.

In weiterführenden Untersuchungen sollte die Kolo-kalisation von GS mit Aldh1L1 und Sox9, welche beide als pan-astrogliale Marker angesehen werden,^{107,155} untersucht werden, da dies wesentlich zur Etablierung von GS als pan-astroglialen Marker beitragen würde.

In der Literatur wird außerdem angegeben, dass den Astrozyten des Thalamus meist die klassischen astrozytären Marker wie GFAP, Aldh1L1 und Cx43 fehlen und stattdessen teilweise den oligodendroglialen Transkriptionsfaktor Olig2 koexprimieren.¹⁰¹ Diese Aussagen können durch die hier gewonnenen Ergebnisse nicht bestätigt werden. Im Thalamus wurden die Astrozyten durch die verwendeten Marker GFAP, GS, Aldh1L1 und Sox9 sichtbar gemacht und verblindet gezählt. Dabei enthalten alle den Marker GS, Aldh1L1 und Sox9, nur ein Teil der Astrozyten enthält den Marker GFAP.

4.5.3 Aldh1L1 als pan-astroglialer Marker

Um zusätzlich neue astrozytenspezifische Marker zu charakterisieren, untersuchte die Arbeitsgruppe Cahoy et al.¹⁰⁷ die von ihnen erstellte Genexpressionsdatenbank (siehe 3.8) zur Identifizierung von astrozytenspezifischen Genen mit dem höchsten Level der mRNA-Expression, dem breitesten Muster an ISH-Markierungen im gesamten Gehirn und Proteinen, von denen erwartet wird, dass sie in der ganzen Zelle und nicht nur in Subkompartimente exprimiert werden. Ein solches Gen, das diese Kriterien erfüllt, war das Aldh1L1-Gen.¹⁰⁷ Somit beschrieben Cahoy et al.¹⁰⁷ Aldh1L1 erstmals als einen pan-astroglialen Marker. In ihren Untersuchungen wurden Kryostatschnitte von S100β-EGFP-Mäusen und Ratten verwendet. Als Primärantikörper wurde ein Kaninchen-Serum gegen Ratte-Aldh1L1 in einer Verdünnung von 1:1000 über zwei Nächte bei 4°C verwendet. Als Sekundärantikörper wurde Ziege-anti-Kaninchen Alexa 594 oder Alexa 488 (1:500) für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurde die Lokalisation von Aldh1L1 in Astrozyten (GFAP), Neuronen, Oligodendrozyten

und NG2-Zellen untersucht. Dabei kamen Cahoy et al.¹⁰⁷ zu dem Ergebnis, dass Aldh1L1 nicht nur die GFAP⁺-Astrozyten, sondern auch GFAP⁻-Astrozyten markiert und die anderen untersuchten Zelltypen nicht anfärbt. Zuletzt wurde eine BAC-Aldh1L1-EGFP-Maus, welche von dem GENSAT-Projekt generiert wurde,¹⁹⁷ untersucht. Dort wurde nachgewiesen, dass alle Zellen, die das EGFP-Transgen exprimieren auch endogenes Aldh1L1 exprimieren.¹⁰⁷ Dass der Marker Aldh1L1 keine anderen Zelltypen als Astrozyten anfärbt, wird in den Untersuchungen nicht überzeugend und vollständig dargelegt. Durch die geringe Vergrößerung der gezeigten Doppelimmunfärbungen und den nicht gezeigten Einzelaufnahmen ist es nicht ersichtlich, ob andere Zelltypen wie Neurone, NG2-Zellen oder Oligodendrozyten Aldh1L1⁺ sind. Es wird nicht deutlich wie viele Astrozyten, Neurone, NG2-Zellen und Oligodendrozyten untersucht wurden. Dadurch wird nicht klar, ob die gezeigten Ergebnisse nur einen Ausschnitt der möglichen Aldh1L1⁺-Zellen darstellen oder an einer großen Anzahl von Zellen gewonnen wurde. Es ist nicht ersichtlich, ob die Auswertung verblindet durchgeführt wurde. Des Weiteren geben die Autoren nicht an, nach welchen Kriterien sie eine Zelle als Aldh1L1⁺ oder Aldh1L1⁻ identifiziert haben. Die Untersuchungen von Cahoy et al.¹⁰⁷ wurden von anderen Gruppen nicht systematisch repliziert, jedoch der Marker schon häufig zur astrozytären Färbung genutzt. Laut Cahoy et al.¹⁰⁷ färbt Aldh1L1 den astrozytären Zellkörper, sowie die Haupt- und die filigranen, peripheren Fortsätze. Die in dieser Arbeit durchgeführte systematische Auszählung von 1116 Aldh1L1⁺-Zellen des Cortex, Corpus callosum, Hippocampus und Thalamus bestätigen die Ergebnisse von Cahoy et al.¹⁰⁷, da die Aldh1L1⁺-Zellen den Astrozyten in ihrer Morphologie ähneln. Im Cortex und Thalamus der Maus kommen Aldh1L1⁺/GFAP⁺- und Aldh1L1⁺/GFAP⁻-Astrozyten vor, Aldh1L1⁻/GFAP⁺-Astrozyten sind nicht vorhanden. Im Hippocampus und Corpus callosum gibt es nur Aldh1L1⁺/GFAP⁺-Astrozyten und keine Aldh1L1⁺/GFAP⁻- oder Aldh1L1⁻/GFAP⁺-Astrozyten. Um die Hypothese, dass Aldh1L1 ein pan-astroglialer Marker ist, zu bekräftigen, sollte in einer weiterführenden Untersuchung die Kolo-kalisation von Aldh1L1 mit dem astrozytenspezifischen Kernmarker Sox9¹⁵⁵ untersucht werden. In den hier durchgeführten Untersuchungen zeigen sich außerdem vereinzelte (2-3) Interneurone des Cortex und des Hippocampus als Aldh1L1⁺ (Daten nicht

gezeigt), was im Widerspruch zu den Annahmen von Cahoy et al.¹⁰⁷ steht. Nach Durchführung weiterer Experimente mit verschiedenen Sekundärantikörpern und Kontrollen ohne Verwendung des anti-Aldh1L1 Antikörpers kann jedoch davon ausgegangen werden, dass diese Interneurone zwar grünfluoreszierend, aber nicht immunfluoreszierend sind. Um dennoch zu überprüfen, ob Aldh1L1 in Interneurone vorkommt, könnte in einem weiteren Experiment die Kolo-kalisation von Aldh1L1 und neuronalem Marker wie NeuN untersucht werden.¹⁵⁰ Außerdem könnten vorliegende Transkriptomanalysen von Neuronen, NG2-Zellen und Oligodendrozyten auf das Aldh1L1-Gen untersucht werden.

4.5.4 Sox9 als astrozytenspezifischer Kernmarker

In den hier durchgeführten Untersuchungen an Astrozyten wurde als letztes der Marker Sox9 verwendet. Die Forschergruppe um Sun et al.¹⁵⁵ hat Sox9 als einen neuen astrozytenspezifischen Kernmarker klassifiziert. Dabei wurden Kryostatschnitte von 2-4 Monaten alten C57BL/6-, BAC-GLT1-EGFP-, BAC-Aldh1L1-EGFP-, Sox9-EGFP- und PDGFRA-EGFP-Mäusen und kortikale chirurgische Proben von Patienten mit hippocampalen Missbildungen untersucht.¹⁵⁵ Als Primärantikörper wurde Maus anti-GFAP, Kaninchen anti-Sox9 und Ziege anti-Sox9 und als Sekundärantikörper konjugierte Antikörper verwendet. Zunächst wurden Hirnschnitte der GLT1-EGFP Maus mit den anti-Sox9 Antikörpern verschiedener Hersteller inkubiert. Da erwartet wurde, dass Sox9 als Transkriptionsfaktor hauptsächlich im Kern lokalisiert ist, wurde DAPI zum gegenfärben der Kerne verwendet. Die meisten untersuchten GLT1⁺-Zellen der Hirnregionen zeigten dabei eine Sox9⁺ Färbung des Nukleus, welche mit der DAPI⁺ Färbung kolokalisierte. Zusätzlich wurden Hirnschnitte einer Sox9-EGFP Maus mit GLT1 gefärbt. Dabei fand die Forschergruppe heraus, dass 90,53% der GLT1⁺-Zellen Sox9⁺ und 90,13% der Sox9⁺-Zellen GLT1⁺ waren. Die Durchflusszytometrie-Analyse dokumentierte die Existenz einer kleinen Population von Sox9⁺/GLT1⁻-Zellen, welche wahrscheinlich aufgrund der Kontamination durch die subependymale Zone entstanden war. Mehrere Studien zeigten außerdem, dass GLT1 auch durch eine kleine Anzahl von Oligodendrozyten und Neuronen exprimiert werden kann.^{198,199} Als nächstes wurden Hirnschnitte einer BAC-GLT1-EGFP Maus mit Sox9 und GFAP gefärbt, wobei gezeigt werden konnte, dass Sox9⁺-Zellen auch GLT1 und GFAP

exprimieren. Auch wurden Hirnschnitte einer BAC-Aldh1L1-EGFP transgenen Maus mit Sox9 gefärbt und mittels konfokaler Analyse ausgewertet. Dabei stellte sich heraus, dass Sox9⁺-Zellen auch Aldh1L1 exprimieren. Zusätzlich wurde eine Sox9-EGFP Reporter-Maus untersucht. Auch dort zeigte sich eine Übereinstimmung der Sox9 Immunreaktivität mit dem EGFP⁺ Signal. Während der embryonalen Entwicklung wird Sox9 durch neurale Stammzellen exprimiert und spielt eine Schlüsselrolle in der Spezifizierung der glialen Abstammung, welche sowohl Astrozyten als auch Oligodendrozyten miteinschließt. Deshalb untersuchte die Forschergruppe, ob Sox9 auch Neurone oder Oligodendrozyten im adulten Mausgehirn anfärbt. Dafür wurden Schnitte einer GLT1-EGFP-Maus gegen Sox9 und den neuronenspezifischen Kernmarker NeuN gefärbt, eine Kolokalisation lag nicht vor. Auch die Überprüfung des alternativen neuronalen Kernmarkers HuD und des dopaminergen und adrenergen neuronalen Markers TH in der Sox9-EGFP-Reporter-Maus zeigte keine Kolokalisation mit Sox9. Die Anfärbung von Oligodendrozyten in Hirnschnitten der PDGFRA-EGFP-Maus zeigte keine Kolokalisation mit Sox9. Die Untersuchung am humanen Gewebe zeigte eine Kolokalisation zwischen GS⁺- und GFAP⁺-Astrozyten und Sox9. Da Sox9 als astrozytenspezifischer Kernmarker von den Autoren überzeugend dargestellt und ausreichend validiert wurde, wurde der Marker auch in diesen Untersuchungen verwendet. Somit kann angenommen werden, dass alle Astrozyten aus allen untersuchten Hirnregionen erfasst und eine Lokalisation von Rab6A in diesen untersucht und nahegelegt werden konnte.

4.6 Mögliche klinische Bedeutungen der Befunde

Die im Rahmen dieser Untersuchung erhobenen Befunde lassen eine astrozytäre Expression des Rab6A vermuten. Weiterhin konnte Rab6A als astrozytenspezifischer Marker etabliert werden.

Durch ihre Fähigkeit auf gliale und neuronale Signale zu reagieren nehmen Astrozyten eine entscheidende Rolle in der Pathogenese vielzähliger Erkrankungen ein. Aber nicht nur für die Pathogenese, sondern auch für die Physiologie des ZNS spielen Astrozyten durch ihre Sekretionsprozesse eine wichtige Rolle. Durch die Prozessierung synaptischer Informationen sind Astrozyten an einer Vielzahl höherer Hirnfunktionen beteiligt. Dazu gehören beispielsweise das Erinnerungsvermögen und Lernverhalten, welches im

Hippocampus moduliert wird.⁸⁵ Es ist bekannt, dass erhöhte Acetylcholin-Werte im Hippocampus mit einer erfolgreichen Kodierung assoziiert sind und Störungen des cholinergen Systems zu einer gestörten Gedächtnisbildung führen können. Durch Freisetzung des Acetylcholins aus den cholinergen septohippocampalen Projektionen wird eine langanhaltende GABAerge Hemmung von hippocampalen dentalen Körnerzellen *in vivo* und *in vitro* verursacht. Diese Hemmung wird durch die cholinerge Aktivierung von Hilus-Astrozyten verursacht, die eine glutamaterge Erregung von hilar-inhibitorischen Interneuronen verursachen.^{85,200-2003} Ein interessanter Punkt stellt dabei die Tatsache dar, dass Glutamat, das von Astrozyten freigesetzt wird, spezifische Wirkungen auf einige, aber nicht auf andere neuronale Elemente innerhalb der gleichen Region haben können.¹⁸⁹ Dieses Phänomen wurde auch von Perea et al.²⁰⁴ beschrieben. Schon dort entdeckte die Forschergruppe, dass Astrozyten selektive Signale zu spezifischen Typen von Interneuronen im visuellen Cortex führen können.²⁰⁴ Mit diesen Informationen stellt sich die Frage, durch welche Mechanismen die Astrozyten erkennen, welche Typen von Interneuronen sie aktivieren sollen und welche nicht. Die Unterbrechung der Freisetzung von Gliotransmittern aus Astrozyten kann dabei selektiv das neuartige Objekterkennungsgedächtnis, jedoch nicht andere Arten des Gedächtnisses beeinträchtigen.²⁰⁵ Auch an anderen Prozessen wie Verhaltensmodulation,⁸⁶ Aufmerksamkeit und Wachheit⁸⁷ und die Verarbeitung emotionaler Stimuli⁸⁸ sind Astrozyten beteiligt. Die Aktivierung der NMDA-Rezeptoren wird durch eine Glutamatbindungsstelle und einer ausgeprägten, unabhängig regulierten, koagonistischen Bindungsstelle gesteuert. In den meisten Hirnregionen ist der NMDAR-Coagonist das von Astrozyten freigesetzte D-Serin. Die hippocampalen Astrozyten bekommen die von der Wachheit abhängige Aktivität der septalen cholinergen Fasern durch den $\alpha 7$ -nicotinischen Acetylcholin-Rezeptor mit und sezernieren nach dessen Aktivierung D-Serin. Astrozyten nehmen auch eine wichtige Rolle in der kognitiven Flexibilität,⁸⁹ Feinmotorik und Entscheidungsfindung ein. Die Fähigkeit zwischen zwei relevanten Aufgaben zu wechseln ist abhängig vom medialen präfrontalen Cortex. Bei Patienten mit Stimmungsstörungen²⁰⁶ und Schizophrenie²⁰⁷ ist diese kognitive Flexibilität beeinträchtigt. Astrozyten sind durch das astrozytenspezifische Calcium-bindende Protein S100 β an der

kognitiven Flexibilität beteiligt und erhöhen die Phasenamplitudenkopplung zwischen Theta- und Gamma-Schwingungen.²⁰⁶ Aber auch an zentral gesteuerten Körperfunktionen wie dem Gastrointestinaltrakt sind Astrozyten beteiligt. Die Astrozyten des Hypothalamus reagieren auf Hormone wie Leptin, Ghrelin und Insulin und regulieren die neuronale Aktivität durch Freisetzung von ATP, wodurch der Nahrungsverbrauch kontrolliert wird.⁹⁰ Dies könnte ein mögliches Ziel für die Therapie von Essstörungen und Appetitlosigkeit darstellen. Auch an der Schlaf-Homöostase, welche durch Akkumulation von Adenosin reguliert wird sind Astrozyten beteiligt.⁹¹ Durch Freisetzung von ATP, Adenosin und Glutamat regulieren Astrozyten die kortikalen Zustände und induzieren den Übergang in langsame neuronale Schwingungen, die mit Schlaf assoziiert sind.²⁰⁸ Insgesamt wird deutlich, dass Astrozyten und ihre Gliotransmitter an vielen wichtigen Funktionen beteiligt sind.

4.7 Gesamtphysiologische Bedeutung der Gliotransmission

Durch die Gliotransmission haben Astrozyten einen wichtigen Einfluss auf die Physiologie des ZNS. Durch die Aufnahme von Glutamat in die Astrozyten kann die synaptische und extrasynaptische Transmission sowohl gefördert als auch inhibiert werden.²⁰⁹ Astrozyten sind dabei nicht nur an der Beseitigung von Glutamat, sondern auch am Abtransport von GABA aus dem extrazellulären Raum beteiligt.²¹⁰ Weitere von Astrozyten ausgeschüttete Moleküle, welche die synaptische Transmission beeinflussen sind ATP,²¹¹ D-Serin,²¹² Aspartat und Taurin²¹³. Dabei ist ATP nicht nur wichtig für die Homöostase des Schlafes, da es Adenosin⁹¹ produziert, sondern auch für die Weiterleitung der Ca²⁺-Wellen, die in den Astrozyten generiert werden.²¹¹ D-Serin wirkt dabei auf die Glycin-Stelle der NMDA-Rezeptoren und ist für die Langzeitpotenzierung notwendig.¹⁵⁸

Die freigesetzten Gliotransmitter können dabei entweder durch Exozytose oder über Ionenkanäle der Plasmamembran freigesetzt werden. In der Theorie ist die Freisetzung durch Membrankanäle oder Transporter energetisch günstiger, als einen Botenstoff in ein Vesikel zu verpacken und häufig gegen einen elektrochemischen Gradienten zu transportieren. Dahingegen hat die Freisetzung über Kanäle andere Limitationen, beispielsweise, dass eine große Anzahl von Transmittern nicht zusammen freigesetzt werden kann. Dies ist bei der Verpackung in Vesikel nicht der Fall. Es können kleinere Transmitter über

einen längeren Zeitraum freigegeben werden. Dabei werden aber zeitliche Präzision und maximale Spitzenkonzentrationen aufgegeben. Diese zwei Mechanismen können daher verschiedene funktionelle Konsequenzen haben.²¹⁴ Rab6A dient der Regulation des retrograden Vesikeltransports vom Golgi-Apparat zum ER,¹²⁶ endosomalen¹³² sowie Intra-Golgi Transport. Schon Keil¹⁴³ legt die Vermutung nahe, dass die beobachteten Rab6A⁺ Vesikel und Zisternen Teile des TGN sind und gleichzeitig Exozytose-Organellen darstellen. Dies ist durch die Doppelmarkierung mit Markern des TGN und der regulierten Exozytose anzunehmen. Dabei ist Rab6A mit Synaptobrevin II assoziiert, welches für die Fusion der Vesikel mit der Zellmembran nötig ist. Auch konnten verschiedene Gliotransmitter wie D-Serin und Glutamat mit den Rab6A⁺ Vesikeln in Astrozyten in Kultur in Verbindung gebracht werden.¹⁴³ Wenn man nun annimmt, dass die in Kultur gewonnenen Ergebnisse auf *in situ* übertragbar sind, könnten die astrozytären, vom TGN stammenden Rab6A⁺ Exozytose-Organellen ein weiteres System der Glia-Neuron-Kommunikation bilden.

4.8 Ausblick

Es konnte gezeigt werden, dass Rab6A spezifisch und selektiv in allen Astrozyten vorkommt und auch in Astrozyten des humanen Gewebes lokalisiert ist. Es ist anzunehmen, dass Rab6A ein neuer astrozytenspezifischer Marker ist.

Der biochemische Nachweis von Rab6A in Astrozyten erfolgte im Rahmen dieser Dissertation nicht. Die hier untersuchten Transkriptomanalysen lassen allenfalls indirekt eine Aussage zur mRNA-Expression von Rab6A zu, da Rab6 nur allgemein und Rab6B spezifisch untersucht wurde, aber keine spezifische Rab6A Sonde erwähnt wird. Somit müsste in einem weiteren Schritt das Transkriptom von Astrozyten *in vivo* und *in vitro* auf eine Expression von Rab6A-mRNA untersucht werden. Durch den Einsatz von Live-Mikroskopie könnte der Weg der Rab6A⁺ Vesikel durch die Astrozyten verfolgt und ihr Zielort definiert werden. Die Rab6A⁺ Verteilung wurde deskriptiv, anhand der subzellulären Verteilung und Größe, in vier Typen unterteilt. Dabei diente die Bestimmung der Größe rein zur Unterscheidung der Typen, da aufgrund der Auflösungsgrenze die Organellengröße nicht eindeutig wiedergegeben werden kann. Elektronenmikroskope können Objekte von 10 nm erkennen und haben damit eine deutlich höhere Auflösung als Lichtmikroskope, die Objekte von etwa 200

nm darstellen können.²¹⁵ Durch die Untersuchung der Rab6A⁺ Vesikel mittels Elektronenmikroskopie könnten die definitiven Organellengrößen ermittelt werden. Keil¹⁴³ legte an Zellkultur und frisch dissoziierten Astrozyten nahe, dass Rab6⁺ Vesikel als Exozytosevesikel ein Teil des TGN bilden. In einem weiteren Schritt müssten die zuvor an kultivierten Astrozyten gezeigten Kollokalisierungen auch *in situ* nachgewiesen werden, um die physiologische und pathophysiologische Bedeutung für das ZNS zu klären. Auch zur Heterogenität der Astrozyten konnten einige Aussagen formuliert werden. So konnte bestätigt werden, dass GFAP nicht alle Astrozyten markiert, was in der Literatur allgemein bekannt ist.⁷ Auch legen die Ergebnisse dieser Arbeit nahe, dass die Glutamin Synthetase als pan-astroglialer Marker angesehen werden kann. Da diese Annahme noch immer stark diskutiert wird, müsste in einer weiteren Untersuchung die Kollokalisierung von GS mit Aldh1L1 und Sox9, welche beide als pan-astrogliale Marker angesehen werden,^{107,150} untersucht werden.

Zur weiteren Untersuchung der möglichen Bedeutung von Rab6A in neurophysiologischen Prozessen wurde die Hochfrequenzstimulation, ein etabliertes LTP-Modell, verwendet. Durch die Stimulation könnte es zu einer strukturellen, intrazellulären Veränderung der Astrozyten mit erhöhter Freisetzung von D-Serin oder Glutamat aus Rab6A⁺ Vesikeln kommen, was zu einer positiven Beeinflussung des Lernverhaltens führen könnte. Die Untersuchung zeigt einen signifikanten Anstieg der Rab6A⁺ Intensität in der gesamten Molekularschicht der Fascia dentata der stimulierten Seite im Vergleich zur unstimulierten. Da Astrozyten die Aktivierung der NMDA-Rezeptoren durch die Freisetzung von D-Serin regulieren können, müsste die Kollokalisierung von Rab6A und D-Serin in Abhängigkeit von der HFS in weiteren Studien untersucht werden. Somit kann der Frage nachgegangen werden, ob die vermehrte Expression von Rab6A⁺ Vesikel zu einem gesteigertem Lernverhalten führen kann. Um die Glia-Neuron-Kommunikation weiter zu untersuchen könnte in einem weiteren Schritt die Lokalisation von Rab6A an den Kontaktstellen zwischen den Ranvierschen-Schnürringen der astrozytären Fortsätze untersucht werden. So kann überprüft werden, ob die Rab6A⁺ Vesikel die Erregungsleitung innerhalb des Axons beeinflussen. Um die prinzipielle Übertragbarkeit der gewonnenen Befunde auf den Menschen zu überprüfen, wurden die im Rahmen

von Epilepsie-Chirurgie resezierten Cortex-Gewebe von drei Patienten unterschiedlicher pathologischer Genese untersucht. Rab6A ist im massiven Ausmaß in humanen Astrozyten lokalisiert, was die Vermutung nahelegt, dass die zuvor an der Maus gewonnenen Ergebnisse auf den Menschen übertragbar sein könnten. Auf Zusammenhänge zwischen den pathologischen Befunden und der subzellulären Verteilung und Größe der Rab6A⁺ Strukturen kann nicht geschlossen werden. Dafür müssten in systematischen Studien Gruppen von ausreichend vielen Proben von Patienten mit vergleichbarer Pathologie auf Rab6A untersucht und miteinander verglichen werden.

5 Zusammenfassung

Astrozyten erfüllen verschiedene Funktionen im Zentralnervensystem, welche sich in die Bereiche Entwicklung, Durchblutung, Metabolismus, Strukturerehalt und Gliotransmission unterteilen lassen. Astrozyten sind an der synaptischen Informationsverarbeitung beteiligt und wirken an zahlreichen höheren Hirnfunktionen mit. Durch Regulation der synaptischen Transmission und Plastizität sind Astrozyten am Lernverhalten und Erinnerungsvermögen, sowie an der Verhaltensmodulation und Verarbeitung emotionaler Reize involviert. Im Zuge dieser zahlreichen Funktionen können Astrozyten auf externe Stimuli mit der gezielten Freisetzung von Gliotransmittern reagieren.

In kultivierten Astrozyten konnte Keil¹⁴³ das TGN, bestehend aus Zisternen und Vesikeln, darstellen und mit anti-Rab6 identifizieren. Rab6 mit seinen Subtypen A und B gehört der Superfamilie der monomeren Ras-GTPasen an, die den intrazellulären Membran- und Vesikelverkehr regulieren. Rab6 spielt in HeLa-Zellen beim Transport vesikulärer Organellen vom TGN zur Zellmembran eine wichtige Rolle. Assoziationsanalysen von Rab6A mit vesikulären Glutamattransportern, Serinracemase und Markern der regulierten Exozytose in kultivierten Astrozyten¹⁴³ deuten darauf hin, dass dieses Rab6A-Organellsystem die ultrastrukturelle Grundlage für die Freisetzung von Gliotransmittern wie D-Serin und Glutamat bildet.

Zur Untersuchung, ob Rab6A tatsächlich ein System der Glia-Neuron-Kommunikation im Gehirn darstellt, war es zunächst unabdingbar das Vorkommen von Rab6A *in situ* zu untersuchen. Die durchgeführten immunzytochemischen Färbungen an Hirnschnitten der Maus zeigen das gleichmäßige und ubiquitäre Vorkommen von Rab6A in allen untersuchten Hirnregionen. Durch verblindet durchgeführte Kollokalisationsanalysen von Rab6A mit den etablierten astrozytären Markern Glutaminsynthetase (GS), *Glial fibrillary acidic protein* (GFAP), Aldh1L1 und Sox9 konnte eine Lokalisation von Rab6A in allen Astrozyten gezeigt werden. Weitere Analysen schließen die Lokalisation von Rab6A in Mikroglia (Iba1), NG2-Zellen (NG2) und Oligodendrozyten (CNPase) aus. Die Astrozyten unterscheiden sich in Größe und subzellulärem Verteilungsmuster der Rab6A⁺ Strukturen, wonach eine

Kategorisierung in vier Typen vorgenommen wurde. Anhand der Einteilung kann vermutet werden, dass größere Rab6A⁺ TGN-Zisternen bis weit in die Zellperipherie transportiert werden und kleine Rab6A⁺ Vesikel erst dort ausknospen und der Exozytose zugeführt werden. Zur Frage der möglichen astrozytären Subpopulationen konnte gezeigt werden, dass alle untersuchten Astrozyten GS⁺, Aldh1L1⁺, Sox9⁺ und Rab6A⁺ sind, jedoch nicht GFAP⁺.

Um die prinzipielle Übertragbarkeit der gewonnenen Befunde auf den Menschen zu überprüfen, wurde reseziertes Cortex-Gewebe von drei Patienten mit unterschiedlicher pathologischer Genese untersucht. Rab6A ist im massiven Ausmaß in humanen Astrozyten lokalisiert, was nahelegt, dass die zuvor an der Maus gewonnenen Ergebnisse auf den Menschen übertragbar sind.

Die mögliche funktionelle Bedeutung von astrozytärem Rab6A im Gehirn wurde an HFS-Schnitten untersucht. Die Untersuchung zeigt einen signifikanten Anstieg der Rab6A⁺ Intensität in der gesamten Molekularschicht der Fascia dentata der stimulierten im Vergleich zur unstimulierten Seite. Da die HFS ein etabliertes LTP-Modell darstellt, könnte es infolge dieser zu einer strukturellen, intrazellulären Veränderung der Astrozyten mit erhöhter Freisetzung von D-Serin oder Glutamat aus Rab6A⁺ Vesikeln kommen, was das Lernverhalten beeinflussen könnte. Die dargestellten Ergebnisse legen eine Auswirkung der HFS auf Rab6A nahe.

Zur Bestätigung der immunzytochemischen Untersuchungen wurde die mRNA-Expression von Rab6A in Astrozyten bereits publizierter Transkriptomanalysen untersucht. Die in den Publikationen verwendeten Genom-Chips treffen allenfalls indirekt eine Aussage zu Rab6A, da Rab6 allgemein und nur Rab6B spezifisch untersucht wurde, jedoch keine spezifische Rab6A Sonde erwähnt wird.

Zusammenfassend kann Rab6A als spezifisches und selektiv in Astrozyten vorkommendes Protein dargestellt und als neuer astrozytärer Marker etabliert werden, der auch Astrozyten des humanen Gewebes markiert. Durch die gewonnenen Befunde kann in nachfolgenden Studien die mögliche Bedeutung von Rab6A in neuropathologischen und neurophysiologischen Prozessen untersucht werden.

6 Abstract

Astrocytes fulfil various functions in the central nervous system, which can be divided into the areas of development, blood circulation, metabolism, structure maintenance and gliotransmission. Astrocytes are involved in synaptic information processing and participate in numerous higher brain functions. By regulating synaptic transmission and plasticity, astrocytes are involved in learning behavior and memory, as well as behavioral modulation and processing of emotional impulses. In the course of these numerous functions, astrocytes can react to external stimuli with the targeted release of gliotransmitters.

In cultured astrocytes, Keil¹⁴³ was able to represent the TGN, consisting of cisterns and vesicles, and identify it with anti-Rab6. Rab6 with its subtypes A and B belongs to the superfamily of monomeric Ras-GTPases, which regulate intracellular membrane and vesicle traffic. In HeLa cells, Rab6 plays an important role in the transport of vesicular organelles from the TGN to the cell membrane. Association analyses of Rab6A with vesicular glutamate transporters, serine racemase and markers of regulated exocytosis in cultured astrocytes¹⁴³ suggest that this Rab6A organelle system forms the ultrastructural basis for the release of gliotransmitters such as D-serine and glutamate.

In order to investigate whether Rab6A actually represents a system of glia-neuron communication in the brain, it was first essential to investigate the presence of Rab6A in situ. The immunocytochemical staining of mouse brain slices performed as part of this study showed the uniform and ubiquitous presence of Rab6A in all investigated brain regions. A blinded colocalization analysis of Rab6A with the established astrocytic markers glutamine synthetase (GS), glial fibrillary acidic protein (GFAP), Aldh1L1, and Sox9 showed a localization of Rab6A in all astrocytes. Further analyses of Rab6A with markers of other glial cell types exclude the localization of Rab6A in microglia (Iba1), NG2 cells (NG2) and oligodendrocytes (CNPase). Furthermore, the astrocytes differ in size and subcellular distribution pattern of the Rab6A+ structures, according to which they were categorized into four types. Based on the classification it can be assumed that larger Rab6A+ TGN cisterns are transported far into the cell periphery and that small Rab6A+ vesicles are budded out there and are introduced into exocytosis. Regarding the question of possible astrocytic subpopulations, it could

be shown that all examined astrocytes are GS+, Aldh1L1+, Sox9+ and Rab6A+, but not GFAP+.

In order to examine the principle transferability of the findings to humans, resected cortex tissue of three patients with different pathological genesis was examined within the framework of epilepsy surgery. Rab6A is massively localized in human astrocytes, suggesting that the results obtained in mice are transferable to humans.

Radiofrequency stimulation, an established LTP model, could lead to structural intracellular changes in astrocytes with increased release of D-serine or glutamate from Rab6A+ vesicles, leading to a positive effect on learning behavior. The study shows a significant increase in Rab6A+ intensity in the entire molecular layer of the fascia dentata of the stimulated side compared to the unstimulated side, suggesting an influence of stimulation on the release of Rab6A+ vesicles. To confirm the immunocytochemical investigations, the mRNA expression of Rab6A in astrocytes of already published transcriptome analyses was investigated. The genome chips used in the publications make at most an indirect statement about Rab6A, since Rab6 was examined in general and Rab6B only specifically, but no specific Rab6A probe is mentioned.

In summary, Rab6A can be presented as a specific protein selectively present in all astrocytes and established as a new astrocytic marker localized in human astrocytes. Based on these findings, the possible role of Rab6A in neuropathological and neurophysiological processes can be investigated in subsequent studies.

7 Literaturverzeichnis

1. Kettenmann H, Verkhratsky A. Neuroglia: the 150 years after. *Trends Neurosci.* 2008;31(12):653–659.
2. Somjen GG. Nervenkitz: notes on the history of the concept of neuroglia. *Glia.* 1988;1(1):2–9.
3. He F, Sun YE. Glial cells more than support cells? *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39(4):661–665.
4. Ventura R, Harris KM. Three-dimensional relationships between hippocampal synapses and astrocytes. *J Neurosci.* 1999;19(16):6897–6906.
5. Schikorski T, Stevens CF. Quantitative fine-structural analysis of olfactory cortical synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(7):4107–4112.
6. Kimelberg HK. Functions of mature mammalian astrocytes: a current view. *Neuroscientist.* 2010;16(1):79–106.
7. Walz W, Lang MK. Immunocytochemical evidence for a distinct GFAP-negative subpopulation of astrocytes in the adult rat hippocampus. *Neurosci Lett.* 1998;257(3):127–130.
8. Verkhratsky A, Orkand RK, Kettenmann H. Glial calcium: homeostasis and signaling function. *Physiol Rev.* 1998;78(1):99–141.
9. Noctor SC, Flint AC, Weissman TA, Dammerman RS, Kriegstein AR. Neurons derived from radial glial cells establish radial units in neocortex. *Nature.* 2001;409(6821):714–720.
10. Goldman JE. Lineages of astrocytes and oligodendrocytes. In: Kettenmann H, Ransom BR, eds. *Neuroglia*. 3rd ed. Oxford: Oxford University Press; 2013:72–84.
11. Marshall CAG, Suzuki SO, Goldman JE. Gliogenic and neurogenic progenitors of the subventricular zone: who are they, where did they come from, and where are they going? *Glia.* 2003;43(1):52–61.
12. Reichenbach A, Wolburg H. Astrocytes and ependymal glia. In: Kettenmann H, Ransom BR, eds. *Neuroglia*. 3rd ed. Oxford: Oxford University Press; 2013:35–49.

13. Rossi D. Astrocyte physiopathology: At the crossroads of intercellular networking, inflammation and cell death. *Prog Neurobiol.* 2015;130:86–120.
14. Oberheim NA, Wang X, Goldman S, Nedergaard M. Astrocytic complexity distinguishes the human brain. *Trends Neurosci.* 2006;29(10):547–553.
15. Privat A, Gimenez-Ribotta M, Ridet JC. Morphology of astrocytes. In: Kettenmann H, Ransom BR, eds. *Neuroglia*. 3rd ed. Oxford: Oxford University Press; 2013:3–22.
16. Verkhratsky A, Butt A. Morphology of glial cells. In: Verkhratsky A, Butt A, eds. *Glial Neurobiology*. Hoboken: John Wiley & Sons;2007:21–23.
17. Ogata K, Kosaka T. Structural and quantitative analysis of astrocytes in the mouse hippocampus. *Neuroscience.* 2002;113(1):221–233.
18. Bushong EA, Martone ME, Jones YZ, Ellisman MH. Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains. *J Neurosci.* 2002;22(1):183–192.
19. Nedergaard M, Ransom B, Goldman SA. New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain. *Trends Neurosci.* 2003;26(10):523–530.
20. Levison SW, Young GM, Goldman JE. Cycling cells in the adult rat neocortex preferentially generate oligodendroglia. *J. Neurosci. Res.* 1999;57(4):435–446.
21. Raine CS. On the association between perinodal astrocytic processes and the node of Ranvier in the C.N.S. *J Neurocytol.* 1984;13(1):21–27.
22. Das GD. Differentiation of Bergmann glia cells in the cerebellum: a golgi study. *Brain Res.* 1976;110(2):199–213.
23. Grosche J, Kettenmann H, Reichenbach A. Bergmann glial cells form distinct morphological structures to interact with cerebellar neurons. *J. Neurosci. Res.* 2002;68(2):138–149.
24. Colombo JA, Yáñez A, Puissant V, Lipina S. Long, interlaminar astroglial cell processes in the cortex of adult monkeys. *J. Neurosci. Res.* 1995;40(4):551–556.

25. Bruni JE, Clattenburg RE, Millar E. Tanycyte ependymal cells in the third ventricle of young and adult rats: a Golgi study. *Anat Anz.* 1983;153(1):53–68.
26. Liuzzi FJ, Miller RH. Radially oriented astrocytes in the normal adult rat spinal cord. *Brain Res.* 1987;403(2):385–388.
27. Miller RH, Liuzzi FJ. Regional specialization of the radial glial cells of the adult frog spinal cord. *J Neurocytol.* 1986;15(2):187–196.
28. Feig SL, Haberly LB. Surface-associated astrocytes, not endfeet, form the glia limitans in posterior piriform cortex and have a spatially distributed, not a domain, organization. *J Comp Neurol.* 2011;519(10):1952–1969.
29. Valverde F, Lopez-Mascaraque L. Neuroglial arrangements in the olfactory glomeruli of the hedgehog. *J Comp Neurol.* 1991;307(4):658–674.
30. Braak E. On the fine structure of the external glial layer in the isocortex of man. *Cell Tissue Res.* 1975;157(3):367–390.
31. Schnitzer J. Retinal astrocytes: their restriction to vascularized parts of the mammalian retina. *Neurosci Lett.* 1987;78(1):29–34.
32. Schnitzer J. Astrocytes in the guinea pig, horse, and monkey retina: their occurrence coincides with the presence of blood vessels. *Glia.* 1988;1(1):74–89.
33. Araque A, Parpura V, Sanzgiri RP, Haydon PG. Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci.* 1999;22(5):208–215.
34. Slezak M, Pfrieder FW. New roles for astrocytes: regulation of CNS synaptogenesis. *Trends Neurosci.* 2003;26(10):531–535.
35. Stobart JL, Anderson CM. Multifunctional role of astrocytes as gatekeepers of neuronal energy supply. *Front Cell Neurosci.* 2013;7:38.
36. Reichenbach A. Attempt to classify glial cells by means of their process specialization using the rabbit retinal Müller cell as an example of cytotopographic specialization of glial cells. *Glia.* 1989;2(4):250–259.
37. Kim JH, Kim JH, Park JA, et al. Blood-neural Barrier: Intercellular Communication at Glio-Vascular Interface. *BMB Reports.* 2006;39(4):339–345.

38. Brightman MW, Reese TS. Junctions between intimately apposed cell membranes in the vertebrate brain. *J Cell Biol.* 1969;40(3):648–677.
39. Allaman I, Bélanger M, Magistretti PJ. Astrocyte-neuron metabolic relationships: for better and for worse. *Trends Neurosci.* 2011;34(2):76–87.
40. Dermietzel R, Hertberg EL, Kessler JA, Spray DC. Gap junctions between cultured astrocytes: immunocytochemical, molecular, and electrophysiological analysis. *J. Neurosci.* 1991;11(5):1421–1432.
41. Giaume C, Leybaert L, Naus CC, Sáez JC. Connexin and pannexin hemichannels in brain glial cells: properties, pharmacology, and roles. *Front Pharmacol.* 2013;4:88.
42. Newman EA. Inward-rectifying potassium channels in retinal glial (Muller) cells. *J. Neurosci.* 1993;13(8):3333–3345.
43. Gundersen V, Storm-Mathisen J, Bergersen LH. Neuroglial Transmission. *Physiol Rev.* 2015;95(3):695–726.
44. Pellerin L. How astrocytes feed hungry neurons. *Mol Neurobiol.* 2005;32(1):59–72.
45. Oe Y, Baba O, Ashida H, Nakamura KC, Hirase H. Glycogen distribution in the microwave-fixed mouse brain reveals heterogeneous astrocytic patterns. *Glia.* 2016;64(9):1532–1545.
46. Guénard V, Frisch G, Wood PM. Effects of axonal injury on astrocyte proliferation and morphology in vitro: implications for astrogliosis. *Exp Neurol.* 1996;137(2):175–190.
47. Aschner M, Sonnewald U, Tan KH. Astrocyte modulation of neurotoxic injury. *Brain Pathol.* 2002;12(4):475–481.
48. Perea G, Araque A. Glial calcium signaling and neuron-glia communication. *Cell Calcium.* 2005;38(3-4):375–382.
49. Perea G, Araque A. Properties of synaptically evoked astrocyte calcium signal reveal synaptic information processing by astrocytes. *J. Neurosci.* 2005;25(9):2192–2203.
50. Bezzi P, Carmignoto G, Pasti L, et al. Prostaglandins stimulate calcium-dependent glutamate release in astrocytes. *Nature.* 1998;391(6664):281–285.

51. Matsui K, Jahr CE, Rubio ME. High-concentration rapid transients of glutamate mediate neural-glia communication via ectopic release. *J. Neurosci.* 2005;25(33):7538–7547.
52. Lalo U, Pankratov Y, Kirchhoff F, North RA, Verkhratsky A. NMDA receptors mediate neuron-to-glia signaling in mouse cortical astrocytes. *J. Neurosci.* 2006;26(10):2673–2683.
53. Zorec R, Araque A, Carmignoto G, Haydon PG, Verkhratsky A, Parpura V. Astroglial excitability and gliotransmission: an appraisal of Ca²⁺ as a signalling route. *ASN Neuro.* 2012;4(2).
54. Araque A, Carmignoto G, Haydon PG, Oliet SHR, Robitaille R, Volterra A. Gliotransmitters travel in time and space. *Neuron.* 2014;81(4):728–739.
55. Klyachko VA, Jackson MB. Capacitance steps and fusion pores of small and large-dense-core vesicles in nerve terminals. *Nature.* 2002;418(6893):89–92.
56. Bergersen LH, Gundersen V. Morphological evidence for vesicular glutamate release from astrocytes. *Neuroscience.* 2009;158(1):260–265.
57. Calegari F, Coco S, Taverna E, et al. A regulated secretory pathway in cultured hippocampal astrocytes. *J Biol Chem.* 1999;274(32):22539–22547.
58. Li D, Ropert N, Koulakoff A, Giaume C, Oheim M. Lysosomes are the major vesicular compartment undergoing Ca²⁺-regulated exocytosis from cortical astrocytes. *J. Neurosci.* 2008;28(30):7648–7658.
59. Bowser DN, Khakh BS. Two forms of single-vesicle astrocyte exocytosis imaged with total internal reflection fluorescence microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(10):4212–4217.
60. Chen X, Wang L, Zhou Y, Zheng LH, Zhou Z. "Kiss-and-run" glutamate secretion in cultured and freshly isolated rat hippocampal astrocytes. *J. Neurosci.* 2005;25(40):9236–9243.
61. Liu T, Sun L, Xiong Y, et al. Calcium triggers exocytosis from two types of organelles in a single astrocyte. *J. Neurosci.* 2011;31(29):10593–10601.
62. Bergersen LH, Morland C, Ormel L, et al. Immunogold detection of L-glutamate and D-serine in small synaptic-like microvesicles in adult hippocampal astrocytes. *Cereb Cortex.* 2012;22(7):1690–1697.

63. Martineau M, Shi T, Puyal J, et al. Storage and uptake of D-serine into astrocytic synaptic-like vesicles specify gliotransmission. *J. Neurosci.* 2013;33(8):3413–3423.
64. Burgoyne RD, Morgan A. Secretory granule exocytosis. *Physiol Rev.* 2003;83(2):581–632.
65. Vardjan N, Zorec R. Excitable astrocytes: Ca²⁺- and cAMP-regulated exocytosis. *Neurochem Res.* 2015;40(12):2414–2424.
66. Prada I, Marchaland J, Podini P, et al. REST/NRSF governs the expression of dense-core vesicle gliosecretion in astrocytes. *J Cell Biol.* 2011;193(3):537–549.
67. Paco S, Pozas E, Aguado F. Secretogranin III is an astrocyte granin that is overexpressed in reactive glia. *Cereb Cortex.* 2010;20(6):1386–1397.
68. Hur YS, Kim KD, Paek SH, Yoo SH. Evidence for the existence of secretory granule (dense-core vesicle)-based inositol 1,4,5-trisphosphate-dependent Ca²⁺ signaling system in astrocytes. *PLoS ONE.* 2010;5(8):e11973.
69. Paco S, Margelí MA, Olkkonen VM, et al. Regulation of exocytotic protein expression and Ca²⁺-dependent peptide secretion in astrocytes. *Journal of Neurochemistry.* 2009;110(1):143–156.
70. Pryazhnikov E, Khiroug L. Sub-micromolar increase in Ca(2+)(i) triggers delayed exocytosis of ATP in cultured astrocytes. *Glia.* 2008;56(1):38–49.
71. Zhang Z, Chen G, Zhou W, et al. Regulated ATP release from astrocytes through lysosome exocytosis. *Nat Cell Biol.* 2007;9(8):945–953.
72. Sawada K, Echigo N, Juge N, et al. Identification of a vesicular nucleotide transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(15):5683–5686.
73. Südhof TC. Calcium control of neurotransmitter release. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012;4(1):a011353.
74. Haskew-Layton RE, Rudkouskaya A, Jin Y, Feustel PJ, Kimelberg HK, Mongin AA. Two distinct modes of hypoosmotic medium-induced release of excitatory amino acids and taurine in the rat brain in vivo. *PLoS ONE.* 2008;3(10):e3543.
75. Zhang Y, Zhang H, Feustel PJ, Kimelberg HK. DCPIB, a specific inhibitor of volume regulated anion channels (VRACs), reduces infarct size in

- MCAo and the release of glutamate in the ischemic cortical penumbra. *Exp Neurol*. 2007;210(2):514–520.
76. Basarsky TA, Feighan D, MacVicar BA. Glutamate release through volume-activated channels during spreading depression. *J. Neurosci*. 1999;19(15):6439–6445.
 77. Lee S, Yoon BE, Berglund K, et al. Channel-mediated tonic GABA release from glia. *Science*. 2010;330(6005):790–796.
 78. Park H, Han KS, Oh SJ, et al. High glutamate permeability and distal localization of Best1 channel in CA1 hippocampal astrocyte. *Mol Brain*. 2013;6:54.
 79. Woo DH, Han KS, Shim JW, et al. TREK-1 and Best1 channels mediate fast and slow glutamate release in astrocytes upon GPCR activation. *Cell*. 2012;151(1):25–40.
 80. Ye ZC, Wyeth MS, Baltan-Tekkok S, Ransom BR. Functional hemichannels in astrocytes: a novel mechanism of glutamate release. *J. Neurosci*. 2003;23(9):3588–3596.
 81. Cotrina ML, Lin JH, Alves-Rodrigues A, et al. Connexins regulate calcium signaling by controlling ATP release. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(26):15735–15740.
 82. Suadicani SO, Brosnan CF, Scemes E. P2X7 Receptors Mediate ATP Release and Amplification of Astrocytic Intercellular Ca²⁺ Signaling. *J. Neurosci*. 2006;26(5):1378–1385.
 83. Duan S, Anderson CM, Keung EC, Chen Y, Chen Y, Swanson RA. P2X₇ receptor-mediated release of excitatory amino acids from astrocytes. *J. Neurosci*. 2003;23(4):1320–1328.
 84. Contreras JE, Sáez JC, Bukauskas FF, Bennett MV. Gating and regulation of connexin 43 (Cx43) hemichannels. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(20):11388–11393.
 85. Pabst M, Braganza O, Dannenberg H, et al. Astrocyte intermediaries of septal cholinergic modulation in the hippocampus. *Neuron*. 2016;90(4):853–865.

86. Oliveira JF, Sardinha VM, Guerra-Gomes S, Araque A, Sousa N. Do stars govern our actions? Astrocyte involvement in rodent behavior. *Trends Neurosci.* 2015;38(9):535–549.
87. Papouin T, Dunphy JM, Tolman M, Dineley KT, Haydon PG. Septal cholinergic neuromodulation tunes the astrocyte-dependent gating of hippocampal NMDA receptors to wakefulness. *Neuron.* 2017;94(4):840–854.e7.
88. Perea G, Sur M, Araque A. Neuron-glia networks: integral gear of brain function. *Front Cell Neurosci.* 2014;8:378.
89. Brockett AT, Kane GA, Monari PK, et al. Evidence supporting a role for astrocytes in the regulation of cognitive flexibility and neuronal oscillations through the Ca²⁺ binding protein S100 β . *PLoS ONE.* 2018;13(4):e0195726.
90. Kim JG, Suyama S, Koch M, et al. Leptin signaling in astrocytes regulates hypothalamic neuronal circuits and feeding. *Nat Neurosci.* 2014;17(7):908–910.
91. Halassa MM, Florian C, Fellin T, et al. Astrocytic modulation of sleep homeostasis and cognitive consequences of sleep loss. *Neuron.* 2009;61(2):213–219.
92. Emsley JG, Macklis JD. Astroglial heterogeneity closely reflects the neuronal-defined anatomy of the adult murine CNS. *Neuron Glia Biol.* 2006;2(3):175–186.
93. Farmer WT, Murai K. Resolving astrocyte heterogeneity in the CNS. *Front Cell Neurosci.* 2017;11:300.
94. Morel L, Chiang MSR, Higashimori H, et al. Molecular and functional properties of regional astrocytes in the adult brain. *J. Neurosci.* 2017;37(36):8706–8717.
95. Franze K, Grosche J, Skatchkov SN, et al. Muller cells are living optical fibers in the vertebrate retina. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(20):8287–8292.
96. Gourine AV, Kasymov V, Marina N, et al. Astrocytes control breathing through pH-dependent release of ATP. *Science.* 2010;329(5991):571–575.

97. Brancaccio M, Edwards MD, Patton AP, et al. Cell-autonomous clock of astrocytes drives circadian behavior in mammals. *Science*. 2019;363(6423):187–192.
98. Fuente-Martín E, García-Cáceres C, Argente-Arizón P, et al. Ghrelin regulates glucose and glutamate transporters in hypothalamic astrocytes. *Sci Rep*. 2016;6:23673.
99. García-Cáceres C, Quarta C, Varela L, et al. Astrocytic insulin signaling couples brain glucose uptake with nutrient availability. *Cell*. 2016;166(4):867–880.
100. Zeisel A, Muñoz-Manchado AB, Codeluppi S, et al. Brain structure. Cell types in the mouse cortex and hippocampus revealed by single-cell RNA-seq. *Science*. 2015;347(6226):1138–1142.
101. Griemsmann S, Höft SP, Bedner P, et al. Characterization of panglial gap junction networks in the thalamus, neocortex, and hippocampus reveals a unique population of glial cells. *Cereb Cortex*. 2015;25(10):3420–3433.
102. Kunzelmann P, Schröder W, Traub O, Steinhäuser C, Dermietzel R, Willecke K. Late onset and increasing expression of the gap junction protein connexin30 in adult murine brain and long-term cultured astrocytes. *Glia*. 1999;25(2):111–119.
103. Boisvert MM, Erikson GA, Shokhirev MN, Allen NJ. The aging astrocyte transcriptome from multiple regions of the mouse brain. *Cell Rep*. 2018;22(1):269–285.
104. Lehre KP, Danbolt NC. The number of glutamate transporter subtype molecules at glutamatergic synapses: chemical and stereological quantification in young adult rat brain. *J. Neurosci*. 1998;18(21):8751–8757.
105. Boddum K, Jensen TP, Magloire V, et al. Astrocytic GABA transporter activity modulates excitatory neurotransmission. *Nat Commun*. 2016;7:13572.
106. Scimemi A. Structure, function, and plasticity of GABA transporters. *Front Cell Neurosci*. 2014;8:161.
107. Cahoy JD, Emery B, Kaushal A, et al. A transcriptome database for astrocytes, neurons, and oligodendrocytes: a new resource for

- understanding brain development and function. *J. Neurosci.* 2008;28(1):264–278.
108. Farmer WT, Abrahamsson T, Chierzi S, et al. Neurons diversify astrocytes in the adult brain through sonic hedgehog signaling. *Science.* 2016;351(6275):849–854.
 109. Ohno Y, Tokudome K, Kunisawa N, et al. Role of astroglial Kir4.1 channels in the pathogenesis and treatment of epilepsy. *Ther Targets Neurol Dis.* 2015;2:e476.
 110. Tong X, Ao Y, Faas GC, et al. Astrocyte Kir4.1 ion channel deficits contribute to neuronal dysfunction in Huntington's disease model mice. *Nat Neurosci.* 2014;17(5):694–703.
 111. Chinta SJ, Woods G, Demaria M, et al. Cellular senescence is induced by the environmental neurotoxin paraquat and contributes to neuropathology linked to Parkinson's disease. *Cell Rep.* 2018;22(4):930–940.
 112. Yen SH, Dahl D, Schachner M, Shelanski ML. Biochemistry of the filaments of brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1976;73(2):529–533.
 113. Eng LF, Vanderhaeghen JJ, Bignami A, Gerstl B. An acidic protein isolated from fibrous astrocytes. *Brain Research.* 1971;28(2):351–354.
 114. Robinson SR. Neuronal expression of glutamine synthetase in Alzheimer's disease indicates a profound impairment of metabolic interactions with astrocytes. *Neurochemistry International.* 2000;36(4-5):471–482.
 115. Anlauf E, Derouiche A. Glutamine synthetase as an astrocytic marker: its cell type and vesicle localization. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2013;4:144.
 116. Anthony TE, Heintz N. The folate metabolic enzyme ALDH1L1 is restricted to the midline of the early CNS, suggesting a role in human neural tube defects. *J Comp Neurol.* 2007;500(2):368–383.
 117. Neymeyer V, Tephly TR, Miller MW. Folate and 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase (FDH) expression in the central nervous system of the mature rat. *Brain Research.* 1997;766(1-2):195–204.
 118. Kamachi Y, Kondoh H. Sox proteins: regulators of cell fate specification and differentiation. *Development.* 2013;140(20):4129–4144.

119. Stolt CC, Wegner M. SoxE function in vertebrate nervous system development. *Int J Biochem Cell Biol.* 2010;42(3):437–440.
120. Brenner M, Johnson AB, Boespflug-Tanguy O, Rodriguez D, Goldman JE, Messing A. Mutations in GFAP, encoding glial fibrillary acidic protein, are associated with Alexander disease. *Nat Genet.* 2001;27(1):117–120.
121. Liang D, Bhatta S, Gerzanich V, Simard JM. Cytotoxic edema: mechanisms of pathological cell swelling. *Neurosurg Focus.* 2007;22(5):E2.
122. Pekny M, Wilhelmsson U, Pekna M. The dual role of astrocyte activation and reactive gliosis. *Neurosci Lett.* 2014;565:30–38.
123. Buffo A, Rite I, Tripathi P, et al. Origin and progeny of reactive gliosis: A source of multipotent cells in the injured brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(9):3581–3586.
124. Tian GF, Azmi H, Takano T, et al. An astrocytic basis of epilepsy. *Nat Med.* 2005;11(9):973–981.
125. Opdam FJ, Echard A, Croes HJ, et al. The small GTPase Rab6B, a novel Rab6 subfamily member, is cell-type specifically expressed and localised to the Golgi apparatus. *J Cell Sci.* 2000;113(15):2725–2735.
126. Stenmark H, Olkkonen VM. The Rab GTPase family. *Genome Biol.* 2001;2(5):reviews3007.1.
127. Young J, Ménétrey J, Goud B. RAB6C is a retrogene that encodes a centrosomal protein involved in cell cycle progression. *J Mol Biol.* 2010;397(1):69–88.
128. Echard A, Opdam FJM, de Leeuw HJP, et al. Alternative splicing of the human Rab6A gene generates two close but functionally different isoforms. *Mol Biol Cell.* 2000;11(11):3819–3833.
129. Goud B, Akhmanova A. Rab6 GTPase. In: Li G, Segev N, eds. *Rab GTPases and membrane Trafficking*. Sharjah: Bentham Science Publishers; 2012:34–46.
130. Bergbrede T, Pylypenko O, Rak A, Alexandrov K. Structure of the extremely slow GTPase Rab6A in the GTP bound form at 1.8Å resolution. *J Struct Biol.* 2005;152(3):235–238.

131. Siniossoglou S, Peak-Chew SY, Pelham HR. Ric1p and Rgp1p form a complex that catalyses nucleotide exchange on Ypt6p. *EMBO J.* 2000;19(18):4885–4894.
132. Grigoriev I, Splinter D, Keijzer N, et al. Rab6 regulates transport and targeting of exocytotic carriers. *Dev Cell.* 2007;13(2):305–314.
133. Mallard F, Tang BL, Galli T, et al. Early/recycling endosomes-to-TGN transport involves two SNARE complexes and a Rab6 isoform. *J Cell Biol.* 2002;156(4):653–664.
134. Pérez-Victoria FJ, Bonifacino JS. Dual roles of the mammalian GARP complex in tethering and SNARE complex assembly at the trans-golgi network. *Mol Cell Biol.* 2009;29(19):5251–5263.
135. Goud B, Gleeson PA. TGN golgins, Rabs and cytoskeleton: regulating the Golgi trafficking highways. *Trends Cell Biol.* 2010;20(6):329–336.
136. Barr FA. A novel Rab6-interacting domain defines a family of Golgi-targeted coiled-coil proteins. *Curr Biol.* 1999;9(7):381–384.
137. Rosing M, Ossendorf E, Rak A, Barnekow A. Giantin interacts with both the small GTPase Rab6 and Rab1. *Exp Cell Res.* 2007;313(11):2318–2325.
138. Young J, Stauber T, del Nery E, Vernos I, Pepperkok R, Nilsson T. Regulation of microtubule-dependent recycling at the trans-Golgi network by Rab6A and Rab6A'. *Mol Biol Cell.* 2005;16(1):162–177.
139. Short B, Preisinger C, Schaletzky J, Kopajtich R, Barr FA. The Rab6 GTPase regulates recruitment of the dynactin complex to Golgi membranes. *Curr Biol.* 2002;12(20):1792–1795.
140. Matanis T, Akhmanova A, Wulf P, et al. Bicaudal-D regulates COPI-independent Golgi-ER transport by recruiting the dynein-dynactin motor complex. *Nat Cell Biol.* 2002;4(12):986–992.
141. Lansbergen G, Grigoriev I, Mimori-Kiyosue Y, et al. CLASPs attach microtubule plus ends to the cell cortex through a complex with LL5 β . *Dev Cell.* 2006;11(1):21–32.
142. Miserey-Lenkei S, Chalancon G, Bardin S, Formstecher E, Goud B, Echard A. Rab and actomyosin-dependent fission of transport vesicles at the Golgi complex. *Nat Cell Biol.* 2010;12(7):645–654.

143. Keil F. *Astrozytäre Rab6+ Exozytosevesikel des Trans-Golgi Netzwerks: Immunzytochemische Untersuchungen zur Bedeutung eines Systems der Glia-Neuron-Kommunikation* [Dissertation]. Frankfurt am Main: Goethe-Universität, Deutschland; 2019.
144. Foo LC, Allen NJ, Bushong EA, et al. Development of a method for the purification and culture of rodent astrocytes. *Neuron*. 2011;71(5):799–811.
145. Jungenitz T, Radic T, Jedlicka P, Schwarzacher SW. High-frequency stimulation induces gradual immediate early gene expression in maturing adult-generated hippocampal granule cells. *Cereb Cortex*. 2014;24(7):1845–1857.
146. Ackermann H. *Bias für Windows. Handbuch Version 10. 1989-2014*. Darmstadt: Epsilon-Verlag; 2014.
147. Anlauf E, Derouiche A. A practical calibration procedure for fluorescence colocalization at the single organelle level. *J Microsc*. 2009;233(2):225–233.
148. Lovatt D, Sonnewald U, Waagepetersen HS, et al. The transcriptome and metabolic gene signature of protoplasmic astrocytes in the adult murine cortex. *J. Neurosci*. 2007;27(45):12255–12266.
149. Doyle JP, Dougherty JD, Heiman M, et al. Application of BACarray for comparative analysis of CNS cell types. *Cell*. 2008;135(4):749–762.
150. Zhang Y, Chen K, Sloan SA, et al. An RNA-sequencing transcriptome and splicing database of glia, neurons, and vascular cells of the cerebral cortex. *J. Neurosci*. 2014;34(36):11929–11947.
151. Kacem K, Lacombe P, Seylaz J, Bonvento G. Structural organization of the perivascular astrocyte endfeet and their relationship with the endothelial glucose transporter: A confocal microscopy study. *Glia*. 1998;23(1):1–10.
152. Brückner G, Brauer K, Härtig W, et al. Perineuronal nets provide a polyanionic, glia-associated form of microenvironment around certain neurons in many parts of the rat brain. *Glia*. 1993;8(3):183–200.
153. Derouiche A, Härtig W, Brauer K, Brückner G. Spatial relationship of lectin-labelled extracellular matrix and glutamine synthetase-immunoreactive

- astrocytes in rat cortical forebrain regions. *J Anat.* 1996;189(Pt 2):363–372.
154. Xin W, Mironova YA, Shen H, et al. Oligodendrocytes support neuronal glutamatergic transmission via expression of glutamine synthetase. *Cell Rep.* 2019;27(8):2262–2271.
155. Sun W, Cornwell A, Li J, et al. SOX9 Is an astrocyte-specific nuclear marker in the adult brain outside the neurogenic regions. *J. Neurosci.* 2017;37(17):4493–4507.
156. Andriko JA, Morrison A, Colegial CH, Davis BJ, Jones RV. Rosai-Dorfman disease isolated to the central nervous system: a report of 11 cases. *Mod Pathol.* 2001;14(3):172–178.
157. Bedner P, Dupper A, Hüttmann K, et al. Astrocyte uncoupling as a cause of human temporal lobe epilepsy. *Brain.* 2015;138(Pt 5):1208–1222.
158. Henneberger C, Papouin T, Oliet SHR, Rusakov DA. Long-term potentiation depends on release of D-serine from astrocytes. *Nature.* 2010;463(7278):232–236.
159. Steward O, Torre ER, Phillips LL, Trimmer PA. The process of reinnervation in the dentate gyrus of adult rats: time course of increases in mRNA for glial fibrillary acidic protein. *J. Neurosci.* 1990;10(7):2373–2384.
160. Burry RW. Specificity controls for immunocytochemical methods. *J Histochem Cytochem.* 2000;48(2):163–166.
161. Huang W, Wu G, Wang GY. Cell type-specific and light-dependent expression of Rab1 and Rab6 GTPases in mammalian retinas. *Vis Neurosci.* 2009;26(5-6):443–452.
162. Scheper W, Hoozemans JJM, Hoogenraad CC, Rozemuller AJM, Eikelenboom P, Baas F. Rab6 is increased in Alzheimer's disease brain and correlates with endoplasmic reticulum stress. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2007;33(5):523–532.
163. Buzsáki G, Mizuseki K. The log-dynamic brain: how skewed distributions affect network operations. *Nat Neurosci.* 2014;15(4):264–278.
164. Geuze HJ, Slot JW, Schwartz AL. Membranes of sorting organelles display lateral heterogeneity in receptor distribution. *J Cell Biol.* 1987;104(6):1715–1723.

165. Ladinsky MS, Kremer JR, Furcinitti PS, McIntosh JR, Howell KE. HVEM tomography of the trans-Golgi network: structural insights and identification of a lace-like vesicle coat. *J Cell Biol.*1994,127(1):29–38.
166. Marsh BJ, Howell KE. The mammalian Golgi-complex debates. *Nat Rev Mol Cell Biol.*2002,3(10)789–795.
167. Brunkhorst R. *Morphologische Analyse der Wechselbeziehungen zwischen Reelin und Astrozyten* [Dissertation]. Frankfurt am Main: Goethe-Universität, Deutschland; 2012.
168. Altman J, Das GD. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol.* 1965;124(3):319–335.
169. Gould E. How widespread is adult neurogenesis in mammals? *Nat Rev Neurosci.* 2007;8(6):481–488.
170. Lie DC, Song H, Colamarino SA, Ming GI, Gage FH. Neurogenesis in the adult brain: new strategies for central nervous system diseases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2004;44:399–421.
171. Bernier PJ, Bédard A, Vinet J, Lévesque M, Parent A. Newly generated neurons in the amygdala and adjoining cortex of adult primates. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(17):11464–11469.
172. Nakayama D, Matsuyama T, Ishibashi-Ueda H, et al. Injury-induced neural stem/progenitor cells in post-stroke human cerebral cortex. *European Journal of Neuroscience.* 2010;31(1):90–98.
173. Dayer AG, Cleaver KM, Abouantoun T, Cameron HA. New GABAergic interneurons in the adult neocortex and striatum are generated from different precursors. *J Cell Biol.* 2005;168(3):415–427.
174. Göritz C, Frisén J. Neural stem cells and neurogenesis in the adult. *Cell Stem Cell.* 2012;10(6):657–659.
175. Alvarez-Buylla A, Lim DA. For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain. *Neuron.* 2004;41(5):683–686.
176. Braak H, Braak E. Pathoanatomy of Parkinson's disease. *J Neurol.* 2000;247(2):3–10.
177. Zhang J, Jiao J. Molecular biomarkers for embryonic and adult neural stem cell and neurogenesis. *Biomed Res Int.* 2015;2015.

178. Stolt CC, Lommes P, Sock E, Chaboissier MC, Schedl A, Wegner M. The Sox9 transcription factor determines glial fate choice in the developing spinal cord. *Genes Dev.* 2003;17(13):1677–1689.
179. Humble JG, Jayne WHW, Pulvertaft RJV. Biological interaction between lymphocytes and other cells. *Br J Haematol.* 1956;2(3):283–294.
180. Raine CS, Scheinberg L, Waltz JM. Multiple sclerosis. Oligodendrocyte survival and proliferation in an active established lesion. *Lab Invest.* 1981;45(6):534–546.
181. Ghatak NR. Occurrence of oligodendrocytes within astrocytes in demyelinating lesions. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1992;51(1):40–46.
182. Wu E, Raine CS. Multiple sclerosis. Interactions between oligodendrocytes and hypertrophic astrocytes and their occurrence in other, nondemyelinating conditions. *Lab Invest.* 1992;67(1):88–99.
183. Nishie M, Mori F, Houzen H, Yamaguchi J, Jensen PH, Wakabayashi K. Oligodendrocytes within astrocytes ("emperipolesis") in the cerebral white matter in hepatic and hypoglycemic encephalopathy. *Neuropathology.* 2006;26(1):62–65.
184. Prineas JW, Kwon EE, Goldenberg PZ, Cho ES, Sharer LR. Interaction of astrocytes and newly formed oligodendrocytes in resolving multiple sclerosis lesions. *Lab Invest.* 1990;63(5):624–636.
185. Harada K, Kamiya T, Tsuboi T. Gliotransmitter release from astrocytes: functional, developmental, and pathological implications in the brain. *Front Neurosci.* 2015;9:499.
186. Steward O, Wallace CS, Lyford GL, Worley PF. Synaptic activation causes the mRNA for the IEG arc to localize selectively near activated postsynaptic sites on dendrites. *Neuron.* 1998;21(4):741–751.
187. Ferbinteanu J, Holsinger RMD, McDonald RJ. Lesions of the medial or lateral perforant path have different effects on hippocampal contributions to place learning and on fear conditioning to context. *Behav. Brain Res.* 1999;101(1):65–84.
188. Savtchouk I, Di Castro MA, Ali R, Stubbe H, Luján R, Volterra A. Circuit-specific control of the medial entorhinal inputs to the dentate gyrus by

- atypical presynaptic NMDARs activated by astrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019;116(27):13602–13610.
189. Jourdain P, Bergersen LH, Bhaukaurally K, et al. Glutamate exocytosis from astrocytes controls synaptic strength. *Nat Neurosci*. 2007;10(3):331–339.
 190. Pérez-Otaño I, Rodríguez-Moreno A. Presynaptic NMDARs and astrocytes ally to control circuit-specific information flow. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019;116(27):13166–13168.
 191. Theofilas P, Steinhäuser C, Theis M, Derouiche A. Morphological study of a connexin 43-GFP reporter mouse highlights glial heterogeneity, amacrine cells, and olfactory ensheathing cells. *J Neurosci Res*. 2017;95(11):2182–2194.
 192. Steinhäuser C, Jabs R, Kettenmann H. Properties of GABA and glutamate responses in identified glial cells of the mouse hippocampal slice. *Hippocampus*. 1994;4(1):19–35.
 193. Akopian G, Kressin K, Derouiche A, Steinhäuser C. Identified glial cells in the early postnatal mouse hippocampus display different types of Ca²⁺ currents. *Glia*. 1996;17(3):181–194.
 194. Matthias K, Kirchhoff F, Seifert G, et al. Segregated expression of AMPA-type glutamate receptors and glutamate transporters defines distinct astrocyte populations in the mouse hippocampus. *J. Neurosci*. 2003;23(5):1750–1758.
 195. Karram K, Goebbels S, Schwab M, et al. NG2-expressing cells in the nervous system revealed by the NG2-EYFP-knockin mouse. *Genesis*. 2008;46(12):743–757.
 196. Wallraff A, Odermatt B, Willecke K, Steinhäuser C. Distinct types of astroglial cells in the hippocampus differ in gap junction coupling. *Glia*. 2004;48(1):36–43.
 197. Heintz N. Gene Expression Nervous System Atlas (GENSAT). *Nat Neurosci*. 2004;7(5):483.
 198. Schmitt A, Asan E, Püschel B, Jöns T, Kugler P. Expression of the glutamate transporter GLT1 in neural cells of the rat central nervous

- system: Non-radioactive in situ hybridization and comparative immunocytochemistry. *Neuroscience*. 1996;71(4):989–1004.
199. Berger UV, DeSilva TM, Chen W, Rosenberg PA. Cellular and subcellular mRNA localization of glutamate transporter isoforms GLT1a and GLT1b in rat brain by in situ hybridization. *J Comp Neurol*. 2005;492(1):78–89.
 200. Navarrete M, Perea G, Fernandez de Sevilla D, et al. Astrocytes mediate in vivo cholinergic-induced synaptic plasticity. *PLoS Biol*. 2012;10(2):e1001259.
 201. Takata N, Mishima T, Hisatsune C, et al. Astrocyte calcium signaling transforms cholinergic modulation to cortical plasticity in vivo. *J Neurosci*. 2011;31(49):18155–18165.
 202. Bezzi P, Gundersen V, Galbete JL, et al. Astrocytes contain a vesicular compartment that is competent for regulated exocytosis of glutamate. *Nat Neurosci*. 2004;7(6):613–620.
 203. Volterra A, Meldolesi J. Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. *Nat Rev Neurosci*. 2005;6(8):626–640.
 204. Perea G, Yang A, Boyden ES, Sur M. Optogenetic astrocyte activation modulates response selectivity of visual cortex neurons in vivo. *Nat Commun*. 2014;5:3262.
 205. Lee HS, Ghetti A, Pinto-Duarte A, et al. Astrocytes contribute to gamma oscillations and recognition memory. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(32):E3343–E3352.
 206. Piguet C, Cojan Y, Sterpenich V, Desseilles M, Bertschy G, Vuilleumier P. Alterations in neural systems mediating cognitive flexibility and inhibition in mood disorders. *Hum Brain Mapp*. 2016;37(4):1335–1348.
 207. Thoma P, Wiebel B, Daum I. Response inhibition and cognitive flexibility in schizophrenia with and without comorbid substance use disorder. *Schizophr Res*. 2007;92(1-3):168–180.
 208. Clasadonte J, Scemes E, Wang Z, Boison D, Haydon PG. Connexin 43-mediated astroglial metabolic networks contribute to the regulation of the sleep-wake cycle. *Neuron*. 2017;95(6):1365–1380.

209. Elmariah SB, Oh EJ, Hughes EG, Balice-Gordon RJ. Astrocytes regulate inhibitory synapse formation via Trk-mediated modulation of postsynaptic GABAA receptors. *J. Neurosci.* 2005;25(14):3638–3650.
210. Ransom B, Behar T, Nedergaard M. New roles for astrocytes (stars at last). *Trends Neurosci.* 2003;26(10):520–522.
211. Coco S, Calegari F, Pravettoni E, et al. Storage and release of ATP from astrocytes in culture. *J Biol Chem.* 2003;278(2):1354–1362.
212. Mothet JP, Pollegioni L, Ouanounou G, Martineau M, Fossier P, Baux G. Glutamate receptor activation triggers a calcium-dependent and SNARE protein-dependent release of the gliotransmitter D-serine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(15):5606–5611.
213. Kimelberg HK, Goderie SK, Higman S, Pang S, Waniewski RA. Swelling-induced release of glutamate, aspartate, and taurine from astrocyte cultures. *J. Neurosci.* 1990;10(5):1583–1591.
214. Sahlender DA, Savtchouk I, Volterra A. What do we know about gliotransmitter release from astrocytes? *Philos Trans R Soc Lond, B, Biol Sci.* 2014;369(1654):20130592.
215. Liu YT, Tao CL, Lau PM, Zhou ZH, Bi GQ. Postsynaptic protein organization revealed by electron microscopy. *Curr Opin Struct Biol.* 2019;54:152–160.

8 Publikationen

Kongress-Abstract, XIV European Meeting on Glial Cells in Health and Disease;
Posterabstract, Porto, Portugal, 2019:

Spieß L, Freiman TM, Derouiche A.:

Rab6A immunolabelling in mouse and human brain: Establishing an astrocyte-specific marker. *Glia* **67**,S1:E351.

Kongress-Abstract, Cold Spring Harbour - Meeting "Novel Insights into Glia Function & Dysfunction"; Vortrag, Suzhou, China, 2018:

Brunkhorst R, Bock H, Keil F, Spieß L, Derouiche A.:

Ultrastructure of an abundant astrocyte Rab6A+ organelle system for reelin and gliotransmitter release.

9 Lebenslauf

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

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

10 Danksagung

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

11 Schriftliche Erklärung

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

Rab6A Immunmarkierung im Gehirn von Maus und Mensch:

Etablierung eines astrozytenspezifischen Markers

im Institut für Anatomie II - Experimentelle Neurobiologie, Dr. Senckenbergische Anatomie der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main unter Betreuung und Anleitung von Prof. Dr. Amin Derouiche ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Darüber hinaus versichere ich, nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben.

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

Vorliegende Ergebnisse der Arbeit werden in folgendem Publikationsorgan veröffentlicht:

Spieß L, Freiman TM, Derouiche A, 2019:

Rab6A immunolabelling in mouse and human brain: Establishing an astrocyte-specific marker. *Glia* **67**,S1:E351.

(Kongress-Abstract, XIV European Meeting on Glial Cells in Health and Disease)

(Ort, Datum)

(Unterschrift)