

Aus dem Institut für Neuro- und Sinnesphysiologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Prof. Dr. Nikolaj Klöcker

Alterungsprozess im dorsalen Striatum: physiologische und
pathophysiologische Korrelate

Untersuchung der Genexpression und der synaptischen Plastizität

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
vorgelegt von

Susanne Elisabeth Sabine Schönfeld

2019

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. Nikolaj Klöcker

Erstgutachterin: Prof. Dr. Olga Sergeeva

Zweitgutachter: Prof. Dr. Georg Kojda

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht

Chepkova A.N., Schönfeld S., Sergeeva O.A., *Age-Related Alterations in the Expression of Genes and Synaptic Plasticity Associated with Nitric Oxide Signaling in the Mouse Dorsal Striatum* (2015). *Neural Plasticity*, Volume 2015, 14 Seiten.

Zusammenfassung

Das prozedurale Gedächtnis sowie das Erlernen impliziter Inhalte hängen maßgeblich von der synaptischen Plastizität des dorsalen Striatum ab. Die vorgelegte Dissertation behandelt Veränderungen der Genexpression und der kortikostriatalen synaptischen Plastizität im dorsalen Striatum von Mäusen unterschiedlicher Altersklassen (junge Tiere: 2 bis 3 Monate alt, alte Tiere: 18 bis 24 Monate alt). Es konnte mittels Fluoreszenzmikroskopie und *real-time* RT-PCR ein deutlicher Anstieg von GFAP-exprimierenden Astrozyten und glialen Markern gezeigt werden. Mithilfe eines Gen *arrays* und *real-time* RT-PCR wurde ein signifikanter Anstieg der Expression von Genen, die in den Immun- und Redox-Status involviert sind, beobachtet. Außerdem wurde eine verminderte Genexpression der neuronalen Stickstoffmonoxid(NO)-Synthase (nNOS) sowie der Rezeptoren für Dopamin und Glutamat (N-Methyl-D-Aspartat(NMDA)-type) im Alter nachgewiesen. In der Feldpotenzialanalyse ergab sich bei alten Tieren eine signifikante Abnahme der chemisch induzierten NO-abhängigen Langzeit-Depression. Weiterhin konnte nach 2 Stunden Inkubation von Hirnschnitten mit Dexamethason die Hochregulierung von Lipocalin 2 (Lcn2), einem Marker für Entzündung und Alterungsprozesse, und die verminderte Genexpression von nNOS gezeigt werden. Im Gegensatz zu primären Kulturen blieben nach der Feldpotenzialanalyse von akuten Hirnschnitten Veränderungen der Erregbarkeit nach Applikation von Dexamethason aus. Die Ergebnisse dieser Studie lassen vermuten, dass die altersabhängigen Veränderungen der kortikostriatalen Plastizität durch zunehmende Neuroinflammation, zunehmenden oxidativen Stress sowie eine altersabhängig veränderte NO-Signalkaskade bedingt sein könnten. Diese Ergebnisse leisten nicht nur einen Beitrag zur Altersforschung, sondern verbessern auch unser Verständnis der Mechanismen neurodegenerativer Erkrankungen.

Abstract

Implicit memory and procedural learning are dependent on synaptic plasticity in the dorsal striatum. This dissertation describes age-related alterations in the expression of genes and corticostriatal plasticity in the dorsal striatum of mice of different age groups (young mice 2-3 months, old mice 18-24 months). By using fluorescence microscopy and real-time RT-PCR a significant increase of GFAP-expressing astrocytes and glial markers was shown. Transcriptional upregulation of the genes encoding for inflammatory and oxidative stress markers could be detected using gene array and real-time RT-PCR. Furthermore, a reduced expression of neuronal nitric oxide synthase (nNOS) as well as receptors for dopamine and glutamate (N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-type) could be identified. Field potential recordings revealed a decrease of chemically induced NO-dependent long-term depression. After 2 hours incubation of corticostriatal slices with dexamethasone a significant increase of the inflammation- and aging- marker Lipocalin 2 and a significant decrease of nNOS was detected. In contrast to primary dissociated cultures, no difference in excitability (corticostriatal field potentials) or in chemically induced long-term depression (LTD) was observed after exposure of brain slices to dexamethasone. This study suggests that age-related alterations in corticostriatal synaptic plasticity may be caused by increasing neuroinflammation and oxidative stress as well as an altered NO-signaling pathway. The results of this study advance not only our knowledge on brain plasticity during aging but also contribute to the understanding of mechanisms of neurodegenerative disorders.

Abkürzung	Entsprechung
Abb.	Abbildung
ACh	Acetylcholin
aCSF	artifizielle zerebrospinale Flüssigkeit
B2m	Beta-2-Mikroglobulin
bd	<i>burst duration</i>
b/m	<i>bursts per minute</i>
°C	Grad Celcius
Ca ²⁺	Kalzium
CaCl ₂	Kalziumchlorid
CB1	Cannabinoid-Rezeptor 1
cDNA	<i>complementary DNA</i>
cGMP	Zyklisches Guanylmonophosphat
cm	Zentimeter
co	Kontrollmessung
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Ct	<i>cycle threshold</i>
DHPG	3,5-Dihydroxyphenylglycin
Dm	Dexamethason
DNA	Desoxyribonukleinsäure
D1-Rezeptor	Dopamin-1-Rezeptoren
D2-Rezeptor	Dopamin-2-Rezeptoren
DPBS	<i>Dulbeccos</i> Phosphatpuffersalz
E	Effizienz
EDAC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
eNOS	Endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
ERDF	<i>endothelial derived relaxation factor</i>
EZR	Extrazellulärraum
g	Gramm
GABA	gamma-Aminobuttersäure
GAPDH	Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFAP	Saures Gliafaserprotein
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GLT-1	Glutamat-Transporter 1
Gpx	Glutathionperoxidasen
GS	Glutaminsynthase
Gusß	Glucoronidase beta
HFS	Hochfrequenzstimulation
HKG	<i>Housekeeping</i> -Gen
Hsp90	Hitze-Schock-Protein 90
Hz	Hertz
IBA1	kalziumbindendes Protein IBA-1
ib ISI	<i>interburst interspike interval</i>
iNOS	Induzierbare Stickstoffmonoxidsynthase
K ⁺	Kalium
KCL	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
kHz	Kilohertz
l	Liter
Lcn2	Lipocalin 2
LTD	Langzeit-Depression
LTP	Langzeit-Potenzierung
MAG	Myelin-assoziiertes Glykoprotein
MEA	Multielektrodenarray
Mg ²⁺	Magnesium
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
mGluR	metabotrope Glutamatrezeptoren
MHC1	Haupthistokompatibilitätskomplex
mm	Millimeter
mg	Milligramm
min	Minute

ml	Milliliter
mmol	Mol
mRNA	Millimol
MSN	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
mΩ	<i>medium spiny neuron</i>
n	Milliohm
ng	Anzahl der Versuche
nm	Nanogramm
nmol	Nanometer
NaCl	Nanomol
NaHCO ₃	Natriumchlorid
NBM	Natriumbikarbonat
NO	Neurobasalmedium
NMDA	Stickstoffmonoxid
nNOS	N-Methyl-D-Aspartat
NR1/Grin1	Neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase
O ₂	Untereinheit des NMDA-Rezeptors
PB	Sauerstoff
PBS	Phosphatpuffer
PBS-T	Phosphatpuffersalz
PCR	Phosphatpuffersalz mit Triton-X100
PDE-Inhibitor	Polymerase-Kettenreaktion
pH	Phosphodiesteraseinhibitor
pmol	pH-Wert
PKG	Pikomol
qPCR	Proteinkinase G
qRT-PCR	<i>real-time</i> (Echtzeit)/ <i>quantitative</i> PCR
r	<i>real-time/quantitative</i> Reverse-Transkriptase-PCR
r ²	Maß für synchrone neuronale Entladung
RT-PCR	linearer Regressionskoeffizient
ROS	Reverse-Transkriptase PCR
s	Reaktive Sauerstoffspezies
S100β	Sekunde
s/b	kalzium- und-zinkbindendes Protein S100β
Scd	<i>spikes per burst</i>
sGC	Stearoyl-CoA-Desaturase
s/m	Lösliche Guanylatzyklase
SN DA Neurone	<i>spikes per minute</i>
TAE-Puffer	Dopamin-freisetzende Neurone der Substantia nigra
Txnip	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
V	<i>thioredoxin-interacting protein</i>
WT	Volt
ZNS	Wildtyp-Maus
µm	Zentrales Nervensystem
µmol	Mikrometer
%	Mikromol
	Prozent

1. EINLEITUNG	1
1.1 CORPUS STRIATUM.....	1
1.1.1 <i>MEDIUM SPINY NEURONS</i> (MSN), INTERNEURONE UND TRANSMITTER	2
1.1.2 FUNKTION DES CORPUS STRIATUM.....	2
1.2 DIE BASALGANGLIEN	3
1.3 PHYSIOLOGISCHE ALTERUNGSPROZESSE UND PATHOPHYSIOLOGIEN	5
1.4 HISTOLOGISCHE KORRELATE DES ALTERUNGSPROZESSES	7
1.5 MOLEKULARE KORRELATE DES ALTERUNGSPROZESSES.....	9
1.6 DER GASOTRANSMITTER STICKSTOFFMONOXID (NO).....	11
1.7 KORTIKOSTRIATALE SYNAPTISCHE PLASTIZITÄT	12
1.8 WIRKUNG VON DEXAMETHASON IM STRIATUM	14
1.9 ZIELSETZUNG DER ARBEIT	15
2. MATERIAL UND METHODEN	16
2.1 ALLGEMEINE RICHTLINIEN	16
2.2 HISTOLOGIE	16
2.2.1 ANFERTIGUNG DER STRIATALEN SCHNITTE.....	16
2.2.2 QUANTIFIZIERUNG VON GFP-EXPRIMIERENDEN ASTROZYTEN.....	18
2.2.3 IMMUNHISTOCHEMIE ZUM NACHWEIS VON LCN2.....	19
2.3 KONVENTIONELLE PCR, REAL-TIME RT-PCR UND PCR-ARRAY.....	21
2.3.1 KONVENTIONELLE PCR.....	21
2.3.2 ENTWICKLUNG DER PRIMER	22
2.3.3 GELELEKTROPHORESE.....	23
2.3.4 <i>REAL-TIME/QUANTITATIVE</i> RT-PCR (qRT-PCR)	24
2.3.5 PCR-ARRAY.....	30
2.4 FELDPOTENZIALANALYSE	31
2.5 MULTIELEKTRODENARRAY (MEA)	33
2.5.1 KULTIVIERUNG VON NEURONEN AUF DEM MEA	34
2.5.2 MESSUNG	36
2.6 STATISTISCHE ANALYSE	36
3. ERGEBNISSE	37
3.1 HISTOLOGISCHE KORRELATE DES ALTERUNGSPROZESSES UND DEREN MOLEKULARE VALIDIERUNG.....	37
3.2 PCR-ARRAY UND VALIDIERUNG DURCH qRT-PCR.....	40
3.2.1 MOLEKULARE MARKER FÜR OXIDATIVEN STRESS	41
3.2.2 MOLEKULARE MARKER FÜR IMMUNOLOGISCHE PROZESSE UND ENTZÜNDUNG.....	42
3.2.3 MOLEKULARE KORRELATE DER NO-SIGNALKASKADE.....	43
3.3 WIRKUNG VON DEXAMETHASON IM STRIATUM	46
3.3.1 qRT-PCR.....	46
3.3.2 Immunhistochemie von Lcn2.....	46
3.3.3 FELDPOTENZIALANALYSE	47
3.4 MEA.....	49
3.4.1 MESSUNG IN HEPESLÖSUNG	49
3.4.2 MESSUNGEN IN NEUROBASALMEDIUM.....	52
4. DISKUSSION.....	55
4.1 HISTOLOGISCHE KORRELATE DES ALTERUNGSPROZESSES	56
4.2 MOLEKULARE KORRELATE DES ALTERUNGSPROZESSES	59
4.2.1 MARKER FÜR OXIDATIVEN STRESS	59
4.2.2 MARKER FÜR IMMUNOLOGISCHE UND ENTZÜNDLICHE PROZESSE.....	62
4.3 VERÄNDERUNGEN DES NO-STOFFWECHSELS.....	65
4.4 VERÄNDERUNGEN DER SYNAPTISCHEN PLASTIZITÄT.....	66
4.5 WIRKUNG VON DEXAMETHASON IM STRIATUM	67

4.6 SCHLUSSFOLGERUNG	70
4.7 AUSBLICK	70
<u>5. LITERATUR- UND QUELLVERZEICHNIS</u>	<u>72</u>

1. EINLEITUNG

Die Beeinträchtigung des Lernens und des Gedächtnisses im Alter werden häufig in Bezug auf die kognitiven Fähigkeiten und das Lernen von expliziten Inhalten betrachtet. Dafür werden hauptsächlich die zellulären Mechanismen und die synaptische Plastizität im Hippocampus untersucht.

In der folgenden Studie soll das prozedurale Gedächtnis im dorsalen Striatum im Mittelpunkt stehen. Das Erlernen impliziter Inhalte hängt maßgeblich von der synaptischen Plastizität des dorsalen Striatum ab. Im prozeduralen Gedächtnis werden Handlungsabläufe gespeichert, um ein Leben lang automatisch ablaufen zu können. Zu diesen Fähigkeiten gehören zum Beispiel Radfahren, Gehen, Autofahren, Erlernen eines Instruments und Tanzen. Im Alter fällt das Erlernen von impliziten Inhalten wie zum Beispiel das Klavierspielen schwerer als in jungen Jahren. Diese Arbeit wird sich mit den Veränderungen des prozeduralen Gedächtnisses im Alter beschäftigen.

1.1 Corpus Striatum

Das Corpus Striatum umfasst subkortikale Kerngebiete bestehend aus Nucleus accumbens, Nucleus caudatus und dem Putamen. Zum ventralen Striatum gehört der Nucleus accumbens. Das dorsale Striatum wird durch den Nucleus Caudatus und das Putamen gebildet. Die beiden letzteren Kerngebiete werden durch die Capsula interna voneinander getrennt, sind allerdings durch Streifen grauer Substanz verbunden und werden daher zusammen als Striatum bezeichnet (von lateinisch *striatus*: gestreift). In der vorliegenden Arbeit wird mit Zellmaterial aus dem dorsalen Striatum gearbeitet.

Die Erforschung der genauen Funktion des Corpus Striatum ist aus medizinischer Sicht sehr wichtig. Es können Veränderungen in der kortikostriatalen synaptischen Aktivität sowohl in Verbindung mit dem normalen Alterungsprozess als auch im Rahmen schwerwiegender Erkrankungen wie Morbus Parkinson, Morbus Huntington, Zwangsstörungen und Suchterkrankungen beobachtet werden.

1.1.1 *Medium spiny neurons* (MSN), Interneurone und Transmitter

Das Corpus Striatum weist größtenteils Neurone auf, die über *γ-aminobutyric-acid* (GABA, dt. *γ*-Aminobuttersäure) inhibierend wirken. Die Mehrheit der Neurone im Striatum sind MSN (Di Filippo et al., 2009). MSN weisen typischerweise ein kleines Zellsoma und große dendritische Ausläufer auf (Calabresi et al., 2000). Sie werden vornehmlich in zwei Hauptgruppen, je nach Genexpression und axonaler Projektion, unterteilt. Man unterscheidet striatonigrale MSN, die den direkten Weg der Basalganglienschleife bedienen, und striatopallidale MSN, die den indirekten Weg einschlagen (Kreitzer & Malenka, 2008). Weiterhin gibt es eine kleinere Population an unterschiedlichen Interneuronen, die durch verschiedene Neurotransmitter Projektionsneurone innervieren. Dazu gehören zum Beispiel Neuropeptide wie Neuropeptid Y und Somatostatin, biogene Amine wie Acetylcholin (ACh), das lösliche Gas Stickstoffmonoxid (NO), aber auch die Aminosäure GABA (Kreitzer & Malenka, 2008).

MSN erhalten kortikale Afferenzen und sind für den Informationsfluss zur Ausgangsstation der Basalganglien verantwortlich. Dieser Informationsfluss wird maßgeblich durch die Dopaminausschüttung aus der Substantia nigra kontrolliert und von cholinergen und nitriergen Interneuronen des Striatum moduliert. Das Zusammenspiel von Neurotransmittern bewirkt entweder die Hemmung oder die Aktivierung des kortikostriatalen Informationsfluss (Chepkova et al., 2015).

1.1.2 Funktion des Corpus Striatum

Das Corpus Striatum spielt als Eingangsstation der Basalganglien eine zentrale Rolle in der Verarbeitung von motorischen Afferenzen aus dem Kortex. Allerdings gelangen nicht nur Afferenzen aus dem Motorkortex ins Striatum, sondern auch ausgehend von dem sensorischen, cingulären und dem assoziativen Kortex (Albin et al., 1989; Graybiel et al., 1994). Dies deutet darauf hin, dass dem Striatum keine ausschließlich motorische Funktion zugewiesen werden kann. So wird angenommen, dass das Striatum eine wichtige Rolle sowohl in der Gedächtnisbildung, dem assoziativen Lernen, der visuellen

Wiedererkennung (Calabresi et al., 2000) als auch bei der Verhaltensbildung, dem auf Belohnung basierenden Lernen und bei Suchterkrankungen eine Rolle spielt (Di Filippo et al., 2009; Mahon et al., 2004). Dies wird auch durch die Entdeckung von Langzeit-Potenzierung (LTP) und Langzeit-Depression (LTD) im Striatum untermauert (Calabresi et. al 1992; Calabresi et al., 1992; Lovinger et al., 1993).

1.2 Die Basalganglien

Die Basalganglien werden aus fünf bilateral angeordneten und subkortikal gelegenen Kerngebieten gebildet. Sie spielen eine wichtige Rolle für Motorik und Kognition.

Um eine Bewegung auszuführen, werden die motorischen Nervenimpulse des Kortex unter anderem in den Basalganglien modifiziert, bis sie an der ausführenden Muskulatur schließlich die Bewegung bewirken. Die Basalganglien sind maßgeblich an der Steuerung des Bewegungsausmaßes beteiligt: Bewegungsfördernde und bewegungshemmende Einflüsse werden exakt festgelegt und können komplexe Bewegungsabläufe genau modellieren (Obeso et al., 2008). Krankheiten, die mit einer Störung des Bewegungsausmaßes einhergehen, fallen durch Hyper- oder Hypokinesie auf. Beim Morbus Parkinson kommt es zum Beispiel zu einer Hypokinesie.

Die Eingangsstationen der Basalganglien werden durch das Corpus Striatum und den im Diencephalon gelegenen Nucleus subthalamicus gebildet (DeLong & Wichmann, 2007). Sie erhalten exzitatorische glutamaterge Afferenzen vom sensomotorischen Kortex und dem Thalamus (Kreitzer & Malenka, 2008). Weiterhin gehören zu den Basalganglien der Globus Pallidus und die Substantia nigra. Den Globus Pallidus kann man in eine pars medialis und eine pars lateralis gliedern, die Substantia nigra in eine zellreichere pars compacta und eine zellärmere pars reticularis. Die Ausgangsstation der Basalganglien bilden der Globus Pallidus medialis und die Substantia nigra Pars reticularis. Sie werden zusammen auch Pallidum-mediale-Komplex genannt und empfangen fördernde und hemmende Afferenzen. Ausgehend vom Corpus Striatum wird

eine monosynaptische inhibitorische Leitungsbahn direkt zur Ausgangsstation der Basalganglien und eine exzitatorische polysynaptische indirekte Leitungsbahn über den lateralen Globus Pallidus und die Substantia nigra zur Ausgangsstation beschrieben (DeLong & Wichmann, 2007). Man spricht von einem direkten und einem indirekten Weg: Der direkte Weg weist eine hohe Dichte an Dopamin-1-Rezeptoren (D1R) auf und inhibiert die Hemmung der exzitatorischen thalamokortikalen Projektionen, wodurch Bewegung gefördert wird. Die inhibitorische Aktivität des Pallidum-mediale-Komplexes wird somit moduliert. Im Gegensatz dazu weist der indirekte Weg vornehmlich Dopamin-2-Rezeptoren (D2R) auf, inhibiert die thalamokortikalen Projektionen und verhindert folglich Bewegung (Kreitzer & Malenka, 2008). Dopamin aus der Substantia nigra pars compacta beeinflusst, welcher der beiden Wege gefördert wird. Die Axone der nigralen Neurone führen zu einem großen Teil zum Striatum: Man bezeichnet dies als nigrostriatalen dopaminergen Pfad. Wird Dopamin ausgeschüttet, wird über D1-Rezeptoren der direkte Weg aktiviert und so die Leitung über den indirekten Weg gehemmt (DeLong & Wichmann, 2007). Dopamin bewirkt also an D1-Rezeptoren eine Exzitation und an D2-Rezeptoren eine Inhibition. Insgesamt gilt, dass die Substantia nigra eine bewegungsfördernde Wirkung durch Dopaminausschüttung im Striatum hat. Vom Pallidum-mediale-Komplex gelangt die modifizierte Information zum Thalamus und darauffolgend zurück zum Kortex oder direkt zum Hirnstamm. Eine vereinfachte Darstellung dieser Verschaltung wird in Abbildung 1 (Abb. 1) gezeigt.

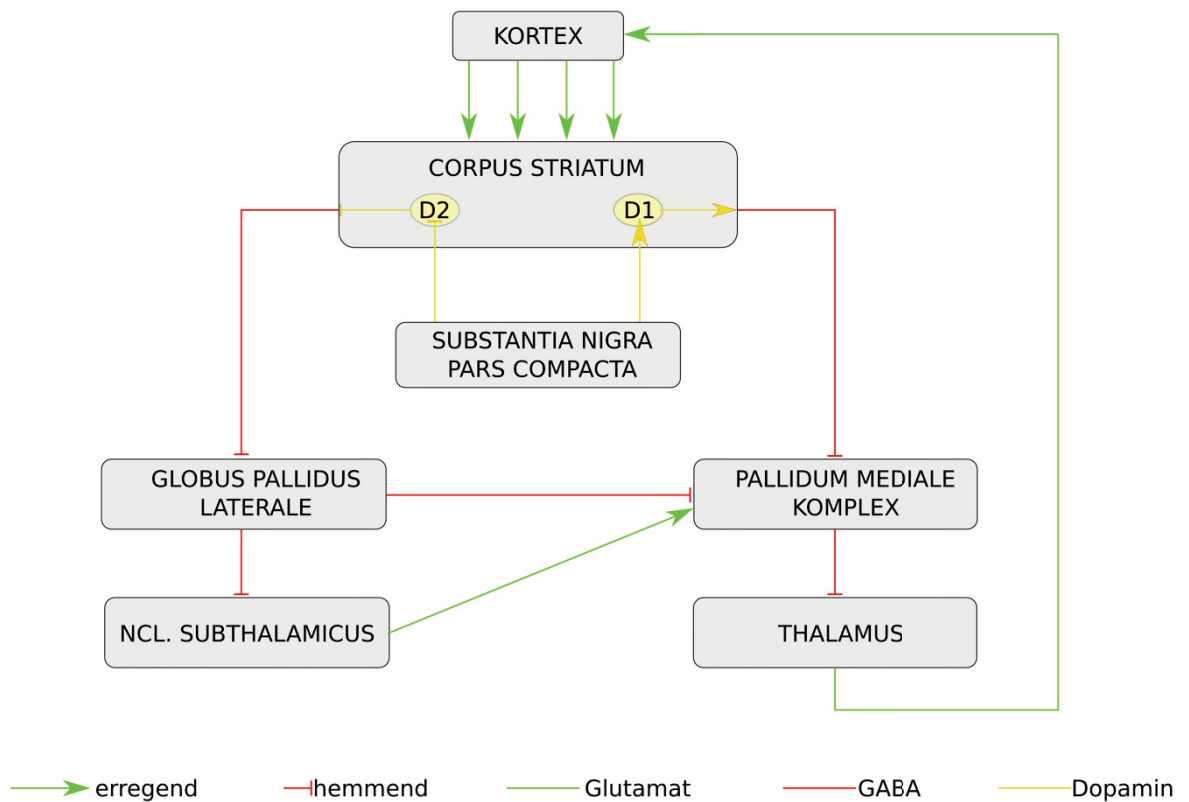


Abb. 1: Die Basalganglienschleife (DeLong & Wichmann, 2007)

1.3 Physiologische Alterungsprozesse und Pathophysiologien

Der physiologische Alterungsprozess des Gehirns geht mit der Atrophie des Cortex (S M Resnick et al., 2000; S M Resnick et al., 2003; Thambisetty et al., 2010), einer verminderten Durchblutung, einer gestörten Neurotransmission und einer kognitiven Einschränkung einher (Portugal et al., 2015). Diese alterstypischen Veränderungen können gehäuft bei altersabhängigen Erkrankungen wie zum Beispiel Morbus Alzheimer oder Morbus Parkinson beobachtet werden. Diese beiden neurodegenerativen Erkrankungen sind eng mit dem Altersprozess verknüpft, da sie vor allem nach dem fünfzigsten Lebensjahr auftreten und das Altern selbst einen der größten Risikofaktoren der Erkrankung darstellt.

Beim Morbus Parkinson kommt es durch den Untergang dopaminerger Zellen in der Substantia nigra pars compacta sowie der Verringerung der D1- und D2-Rezeptordichte im Striatum zu einer verminderten Dopaminkonzentration (Ossowska, 1993). Die verminderte Dopamin-Freisetzung wird mit motorischen

Defiziten in Verbindung gebracht (R Cham et al., 2008; R Cham et al., 2007). Die typische Symptomtrias besteht aus Rigor (Steifheit), Tremor (Zittern) und Akinese (Bewegungsarmut) (Duda et al., 2016). Es bestehen Schwierigkeiten bei der Initiierung von Bewegungen, es herrschen ein abnormer Muskeltonus und ein Unvermögen ungewollte Bewegungen zu unterdrücken. Die Ätiopathogenese des idiopathischen Parkinsonsyndroms, das 80 bis 90 % der Fälle ausmacht, ist multifaktoriell und bisher noch nicht hinreichend geklärt. Zu der multifaktoriellen Genese tragen wahrscheinlich ein vorzeitiger Alterungsprozess, oxidativer Stress, Neuroinflammation, eine beeinträchtigte Calciumhomöostase, genetische Aspekte und umweltbedingte Aspekte wie Toxine bei (Deleidi & Gasser, 2013; Gasser et al., 1994; Olanow, 1999; Sulzer & Surmeier, 2013). Auch im Rahmen des physiologischen Alterungsprozesses wird ein Zelluntergang von dopaminergen Neuronen beobachtet, allerdings nicht in dem Ausmaß, dass er parkinsonoide Symptome hervorruft (Albin et al., 1989). Die übrigen Fälle werden durch sekundäre Parkinsonsyndrome oder atypische Parkinsonsyndrome hervorgerufen. Ursächlich für sekundäre Parkinsonsyndrome kann zum Beispiel die virale Enzephalitis oder eine traumatische Hirnerkrankung sein. Atypische Parkinsonsyndrome können durch eine andere neurodegenerative Erkrankungen, wie zum Beispiel die Multi-Systematrophie, verursacht werden.

Beim Morbus Alzheimer kommt es zu einem progredienten Verlust der Gedächtnisleistung. Zuerst werden vor allem Erinnerungen, die im Kurzzeitgedächtnis gespeichert werden, unzugänglich für die Betroffenen. Im weiteren Verlauf werden auch Langzeiterinnerungen vergessen (Galton & Hodges, 1999). Der Hauptrisikofaktor für den sporadisch auftretenden Morbus Parkinson ist das Alter und somit auch die typischen altersbedingten Veränderungen im ZNS wie oxidativer Stress und Neuroinflammation. Die Manifestation der Erkrankung wird meist erst nach dem 65. Lebensjahr beobachtet. Das Risiko zu erkranken steigt ab dem 65. Lebensjahr alle 5 Jahre um das Doppelte an (Haass et al., 1993). Bei der familiären Demenz, die ungefähr 1 % der Demenzerkrankungen ausmacht, treten die Symptome meist schon vor dem 50. Lebensjahr auf (Haass et al., 1993). Die Pathologie wird durch Ablagerung fehlgefalteter Proteine im Gehirn ausgelöst. Dabei handelt es sich um β -Amyloid, phosphoryliertes tau-Protein und α -Synuclein, die durch das Ubiquitin-Proteasom fehlgefaltet wurden (Jellinger, 2008).

Der physiologische Alterungsprozess geht mit einer Dysfunktion der Basalganglien einher und führt zu sensomotorischen Beeinträchtigungen. Es kommt zu Störungen der Feinmotorik, der Balance und des Gangbildes (Marchand et al., 2011). Als zelluläres Korrelat werden eine zunehmende Atrophie der Basalganglien (Kalpouzos et al., 2012; Langenecker et al., 2007), eine Akkumulation von Eisen in den Basalganglien und Veränderungen in den Dopamin-Signalwegen beobachtet (Marchand et al., 2011).

1.4 Histologische Korrelate des Alterungsprozesses

Astrozyten sind sternförmige Gliazellen und übersteigen die Zahl an Neuronen im ZNS um das 5- bis 10-fache (Cotrina & Nedergaard, 2002). Sie übernehmen im ZNS Stütz- und Haltefunktion, beteiligen sich an der Ausbildung der Blut-Hirn-Schranke und sorgen für die optimale metabolische Umgebung der Nervenzellen. Viele Jahre beschränkte man ihr Aufgabengebiet auf die oben genannten Punkte. Mittlerweile werden den Astrozyten auch weitere Aufgaben zugeordnet und es ist allgemein anerkannt, dass sie in viele Aspekte physiologischer und pathologischer Prozesse involviert sind (Hol & Pekny, 2015; Ransom & Ransom, 2012).

Astrozyten halten durch die Aufnahme von Kalium (K^+) aus dem Extrazellulärraum (EZR) nach Neuronenaktivität die Ionenhomöostase aufrecht (Ransom & Ransom, 2012). Sie spielen eine wichtige Rolle in der Regulation der interstitiellen Homöostase im Gehirn (Simard et al., 1999). Es wird diskutiert, ob der ödemreduzierende Effekt von Glukokortikoiden durch erhöhte Ca^{2+} -Signalvermittlung der Astrozyten erzielt werden kann (Simard et al., 1999). Den Neurotransmitter Glutamat nehmen sie nach dessen Freisetzung durch Neurone auf und wandeln ihn in Glutamin, das wiederum die Neurone aufnehmen und als Energiequelle nutzen können, um (Ransom & Ransom, 2012). Astrozyten spielen weiterhin eine Rolle in der synaptischen Signalvermittlung (Ransom & Ransom, 2012). Sie bilden viele Zellkontakte mit anderen Zelltypen des Gehirns aus. Zum Beispiel mit Neuronen, Endothelzellen und benachbarten Astrozyten. Jeder Astrozyt verfügt über mehr als 50000 *gap junctions* (Yamamoto et al., 1990) und kann so mit anderen Zellen kommunizieren. Durch elektrische Potenzialänderung akkumuliert Ca^{2+} in der

Zelle und wird über *gap junctions* an benachbarte Zellen weitergeleitet. Die Ca^{2+} -Ströme können lange Strecken durch verschiedene Zellen zurücklegen und die Ca^{2+} -Konzentration von Neuronen und Mikroglia verändern (Nedergaard, 1994).

Im Alter steigt die Astrozytenzahl an (Linnemann & Skarsfelt, 1994; Nichols et al., 1993). Die Zellen werden sowohl hypertroph als auch hyperplastisch. Außerdem weisen die Zellen eine auf das Doppelte gesteigerte Expression von Säuem Gliafaserprotein (GFAP) auf (Cotrina & Nedergaard, 2002). GFAP gilt als charakteristisches Protein der Astrozyten. Es ist wichtiger Bestandteil des Intermediärfilaments und verantwortlich für mechanische Festigkeit und Form der Gliazellen.

Immunologisch betrachtet weist das ZNS einige Besonderheiten im Vergleich zum restlichen Organismus auf. Es existiert kein lymphatisches System und die Expression der Haupthistokompatibilitätskomplexe 1 und 2 sind im gesunden Gehirn nur gering vertreten. Dies weist darauf hin, dass eine professionelle Antigenpräsentation im Gehirn eher nicht stattfindet (Lynch, 2010). Mikrogliazellen stellen die wichtigsten Vertreter des Immunsystems im ZNS dar. Sie nehmen bei Inflammation zu, begünstigen die Entstehung von Glianarben und sind durch Ausschüttung des Zytokins Interleukin 1 an der Proliferation von Astrozyten beteiligt. Ein Marker für Mikroglia und Makrophagen im ZNS ist das kalziumbindende Adaptermolekül IBA-1 (Szabo & Gulya, 2013).

Als weiterer glialer Marker ist S100 β zu nennen. Es ist wie IBA ein kalziumbindendes Protein. Die S100-Familie konnte bisher in vielen verschiedenen Gewebearten nachgewiesen werden, wobei S100 β im ZNS vor allem von Astrozyten exprimiert wird. S100 β wirkt parakrin auf Neurone. Es stimuliert die Proliferation der Neurone sowie die Expression von GFAP und gilt als wichtiger Mediator bei Interaktionen zwischen Gliazellen und Neuronen. (Hov et al., 2017; Reeves et al., 1994)

Lipocalin 2 (Lcn2) kann ebenfalls in Astrozyten nachgewiesen werden. Ursprünglich wurde Lcn2 als Akute-Phase-Protein in Neutrophilen Granulozyten nachgewiesen. Lcn2 kann in verschiedensten Zellarten unter pathologischen Umständen wie Karzinomkrankungen, Intoxikationen, Infektionen und Entzündung nachgewiesen werden. (Abella et al., 2015)

1.5 Molekulare Korrelate des Alterungsprozesses

Hohes Alter ist mit einem generellen Anstieg proinflammatorischer Zytokine und oxidativem Stress assoziiert (Cevenini et al., 2010). Eine der wichtigsten Theorien über den Alterungsprozess ist die Freie-Radikale-Theorie (Harman, 2003). Sie besagt, dass das Altern das Ergebnis von oxidativem Stress ist, der innerhalb einer Lebenszeit durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) verursacht worden ist. Der wichtigste Ursprung für das Auftreten von ROS sind Elektronen, die durch undichte Stellen aus dem Mitochondrium austreten und darauffolgend an der Bildung von Hyperoxiden und Wasserstoffperoxiden beteiligt sind (Linford et al., 2006). Durch das fehlende Vermögen, all diese Radikale abzufangen, kommt es im weiteren Verlauf zur Schädigung von DNA, Lipiden und Proteinen. Zum Abfangen von freien Radikalen gibt es einige körpereigene Antioxidationssysteme. Diese erfüllen die Aufgabe, das überlebenswichtige Reduktions- und Oxidationsgleichgewicht in der Zelle aufrecht zu erhalten. Zu den wichtigsten gehören Glutathionabhängige Glutathionperoxidasen (Gpx), Thioredoxin, Nicotinamidadenindinukleotid-phosphate (NADPH/NADH), Ascorbinsäure wie Vitamin C, Tocopherole wie Vitamin E und Ubichinon 10 (Q10) (Tadros et al., 2014). Wenn diese antioxidanten Systeme abnehmen und der Organismus zusätzlich vermehrt oxidativem Stress ausgeliefert ist, wird der Prozess des Alterns beschleunigt (Sohal & Weindruch, 1996).

Im Folgenden wird ein Überblick der wichtigen Marker für oxidativen Stress und Entzündung gegeben. In der vorliegenden Studie wurden diese Marker im Hinblick auf eine vermehrte oder verminderte Expression untersucht.

Cyba, auch p22^{phox} genannt, ist eine Untereinheit von Cytochrom b₅₅₈, das wiederum zu der NAD(P)H-Oxidase gehört (Fukui et al., 1997). Cyba ist maßgeblich am Elektronentransport von NAD(P)H-Oxidase zum Sauerstoffmolekül beteiligt und somit an der Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies (Avogaro et al., 2003). Cyba kann als Marker für oxidativen Stress verwendet werden.

Zu der Familie der Glutathionperoxidasen (Gpx) gehören verschiedene Enzymisoforme, die sich nur gering in ihren Eigenschaften voneinander

unterscheiden. Allen gemein ist, dass sie glutathionabhängig die Reduktion von Peroxiden katalysieren und zu dem wichtigsten Redox-System des Körpers gehören (Tadros et al., 2014). Es konnte bereits an Mäusen und Ratten nachgewiesen werden, dass das Gen, das für Gpx6 kodiert, im Alter hochreguliert wird. Dies soll wahrscheinlich dem Alterungsprozess entgegenwirken (Tadros et al., 2014).

Die Stearoyl-CoA-Desaturase (Scd) ist ein Enzym, das in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums die Bildung von einfach ungesättigten Fettsäuren aus langkettigen gesättigten Fettsäuren katalysiert. Für diesen Vorgang werden die beiden Polypeptide NADH-Cytochrom b5 und Cytochrom b5 benötigt. Man nimmt an, dass Scd eine wichtige Rolle im Fettstoffwechsel und Energiehaushalt spielt (Wang et al., 2008). Außerdem ist das Verhältnis von gesättigten zu ungesättigten Fettsäuren möglicherweise ein Risikofaktor für die Entwicklung von kardiovaskulären Erkrankungen, Übergewicht, neurologischen Erkrankungen und Tumorerkrankungen (Ntambi & Miyazaki, 2004), da ungesättigte Fettsäuren sensibler für Schädigung durch oxidativen Stress sind (Arranz et al., 2013).

Txnip (*thioredoxin-interacting protein*) ist ein ubiquitär vorkommendes Protein, das die Thiol-Oxidoreduktase Thioredoxin an sich bindet und somit hemmt (Junn et al., 2000). Thioredoxin spielt eine wichtige Rolle im Redox-System. Es fängt freie Radikale ab. Durch die Hemmung von Thioredoxin fördert Txnip oxidativen Stress und reguliert den zellulären Redox-Zustand (Chen et al., 2010). Es ergaben sich Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen einer diabetogenen Stoffwechsellaage und der vermehrten Expression von Txnip. So wurde in einer Studie festgestellt, dass Txnip bei erhöhten Blutglukosewerten drastisch im Pankreas ansteigt (Shalev et al., 2002), und in einer anderen, dass Txnip möglicherweise den Zelltod von β -Zellen im Pankreas induziert (Minn et al., 2005).

B2m (β 2-Mikroglobulin) stellt die kleine lösliche Untereinheit des Haupthistokompatibilitätskomplex 1 (MHC1) dar und spielt eine wichtige Rolle in der Immunantwort. Der MHC1-Proteinkomplex befindet sich auf nahezu jeder kernhaltigen Zelle des Organismus und ist verantwortlich für die

Antigenpräsentation von intrazellulären Peptiden gegenüber CD8+ zytotoxischen T-Zellen (VanGuilder Starkey et al., 2012). Dieser Mechanismus dient zum einen zur Abwehr gegen körperfremdes Material und zum anderen zum Schutz von gesunden Zellen durch Killerzellen.

Irgm ist eine mit dem Immunsystem assoziierte GTPase und reguliert die Resistenz im Körper gegen intrazelluläre Pathogene, wie zum Beispiel *Mycobacterium tuberculosis* und *Toxoplasma gondii*, durch verschiedene Mechanismen (Taylor et al., 2004). Dazu gehört unter anderem die Regulation von T-Zell Lymphozyten (H. Xu et al., 2010).

1.6 Der Gasotransmitter Stickstoffmonoxid (NO)

Einer der Hauptmodulatoren der striatalen neuronalen Aktivität ist Stickstoffmonoxid (NO). NO gehört zu der Gruppe der Gasotransmitter und ist als Gas im Körper an der interzellulären Kommunikation beteiligt. NO ist frei durchgängig an biologischen Membranen und kann endokrine, parakrine und autokrine Wirkung haben. Im Jahr 1987 wurde entdeckt, dass NO als *endothelial derived relaxation factor* (ERDF) eine relaxierende Wirkung auf Blutgefäße hat (Palmer et al., 1987).

Seitdem wurden drei verschiedene Formen von NO-Synthasen erforscht: Die endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS), die induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) und die neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase (nNOS) (West & Tseng, 2011). Erstere bewirkt in den Gefäßen eine Relaxation der Gefäßwandmuskulatur und führt so zu einer Vasodilatation. Die iNOS ist keine konstitutiv produzierte NO-Synthase und spielt eine Rolle bei der Immunabwehr durch Makrophagen. Die nNOS ist im ZNS weit verbreitet und kommt reichlich im dorsalen Striatum vor. Die eNOS konnte ebenfalls im Striatum nachgewiesen werden. Es wird angenommen, dass der lokale Blutfluss im Striatum durch Freisetzung von NO kontrolliert wird und dass NO so auch Einfluss auf benachbarte Nervenzellen hat (Doreulee et al., 2003).

NO wird im Striatum vor allem von nNOS-positiven Interneuronen gebildet. Die Synthese wird durch glutamaterge kortikostriatale und dopaminerge

nigrostriatale Leitungsbahnen stimuliert. Diese aktivieren gleichzeitig N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)- und D1-Rezeptoren, die wiederum die NO-Synthese fördern (Chepkova et al., 2015). NO diffundiert daraufhin an die lösliche Guanylatzyklase (sGC), die sich in hoher Konzentration in den Dendriten der MSN befindet. Sobald NO gebunden ist, produziert die sGC den *second messenger* zyklisches Guanylmonophosphat (cGMP). Die durchgehende Erhöhung von intrazellulärem cGMP steigert die neuronale Erregbarkeit und erleichtert die kortikostriatale Leitung (West & Tseng, 2011). Phosphodiesterasen (PDE's) bauen cGMP wieder ab. Dieser Vorgang kann durch PDE-Inhibitoren wie zum Beispiel Zaprinast verhindert werden. Zaprinast ist dadurch in der Lage die synaptische Plastizität zu beeinflussen (Calabresi et al., 1999). NO reguliert also durch seinen Rezeptor sGC und dessen Produkt cGMP die Kurz- und Langzeitplastizität an kortikostriatalen Synapsen in MSN (Calabresi et al., 1999; Chepkova et al., 2015; Sergeeva et al., 2007).

1.7 Kortikostriatale synaptische Plastizität

Langzeit-Potenzierung (LTP) und Langzeit-Depression (LTD) stellen Formen der synaptischen Plastizität dar. Synaptische Plastizität spielt eine große Rolle für Gedächtnisbildung und Lernen und wird somit vor allem in Hirnregionen wie dem Hippocampus beobachtet. Auf neuronaler Ebene bedeutet synaptische Plastizität Umbauprozesse synaptischer Verbindungen. Das heißt, dass häufig genutzte Leitungsbahnen ausgebaut und seltener genutzte Verschaltungen aufgehoben werden. Im Rahmen der LTP wird die synaptische Kopplung stabilisiert und somit die Antwort auf eine elektrische Aktivierung gesteigert. Bei der LTD wird durch seltenere Nutzung von Verschaltungen die Kopplung abgeschwächt.

Beide Formen der synaptischen Plastizität sind im Striatum von Mäusen nachgewiesen worden (Calabresi et al., 2000; Chepkova et al., 2015). Ob nun LTP oder LTD entsteht, hängt neben der Dopaminausschüttung maßgeblich von der Modulation durch die Neurotransmitter ACh und NO ab (Centonze et al., 2003; Chepkova et al., 2015)

In frühen *in vitro* Studien wurde LTD als die überwiegende Form der synaptischen Plastizität an kortikostriatalen Synapsen nachgewiesen. LTD konnte NMDA-unabhängig bei physiologischer Magnesium (Mg^{2+})-Konzentration durch Hochfrequenzstimulation (HFS) reproduziert werden (Calabresi et al., 2000). Auf die Membrandepolarisation folgt ein intrazellulärer Anstieg von Ca^{2+} -Ionen in postsynaptischen striatalen Neuronen und Ca^{2+} -abhängige Kinasen werden aktiviert. Weiterhin werden metabotrope Glutamatrezeptoren (mGluR) der Gruppe 1, D1- und D2-Rezeptoren aktiviert (Calabresi et al., 2000). LTD kann auch durch chemische Aktivierung der Gruppe 1 mGluR(1/5) mit dem spezifischen Agonisten 3,5-dihydroxyphenylglycine (DHPG) ausgelöst werden (Chepkova et al., 2009; Bellone et al., 2008; Sergeeva et al., 2007). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass HFS-LTD sowie DHPG-induzierte LTD auf eine funktionierende NO-cGMP-Proteinkinase G (PKG)-Signalkaskade angewiesen sind (Calabresi et al., 1999; Sergeeva et al., 2007).

In dieser Studie wird das DHPG-induzierte LTD im dorsalen Striatum durch Aktivierung der mGluR1 in Bezug auf Veränderungen in der Ausprägung bei jungen und alten Mäusen untersucht. Metabotrope Glutamatrezeptoren spielen eine wichtige Rolle in der Modulation neuronaler Erregbarkeit, synaptischer Plastizität und Neurodegeneration durch ihre Verbindung zu intrazellulären *second messenger* Systemen (Chepkova et al., 2009; Gubellini et al., 2004). Frühe Stadien von Morbus Parkinson gehen mit einer erhöhten Glutamatfreisetzung einher (Chepkova et al., 2009; Senkowska & Ossowska, 2003). Daher ist es von großer Bedeutung, das Verständnis für glutamaterge Signalkaskaden und die synaptische Plastizität in dieser Hirnregion zu erweitern. Zur Entwicklung des LTD_{DHPG} ist die Synthese von NO und die Aktivierung von Cannabinoid-Rezeptoren nötig (Sergeeva et al., 2007). Sergeeva et al. haben herausgefunden, dass der NO-Synthase-Inhibitor N ω -nitro-L-Arginin (NL-Arg) ein durch Cannabinoid-Rezeptor-1-Agonist ACEA ausgelöstes LTD_{DHPG} verhindert. Daraus resultiert die Annahme, dass NO in der Entwicklung der LTD_{DHPG} eine übergeordnete Rolle spielt im Vergleich zur Aktivierung des Cannabinoid-Rezeptors-1 (Sergeeva et al., 2007).

1.8 Wirkung von Dexamethason im Striatum

Diese Arbeit beschäftigt sich unter anderem mit dem experimentell beeinflussbaren Alterungsprozess durch Dexamethason. Dexamethason ist ein synthetisch hergestelltes Steroidhormon, das in der Medizin als Immunsuppressivum eingesetzt wird. Es wirkt ungefähr fünfundzwanzigfach stärker als das natürlich vorkommende Cortisol und wird zum Beispiel zur Behandlung von rheumatischen Erkrankungen, Lungenerkrankungen wie Asthma, Dermatosen, anaphylaktischem Schock, Hirnödem und als Supportivum zur Chemotherapie verwendet. Bei Langzeitbehandlung kommt es zu den typischen Nebenwirkungen der Glukokortikoide wie Osteoporose, Hypertension, Stammfettsucht, Hirsutismus und Muskelatrophie.

Es gibt Hinweise auf eine Fehlregulation des negativen Rückkopplungsmechanismus im Alter bei erhöhten Cortisolkonzentrationen im Blut. Dies äußert sich durch eine verspätete Beendigung der Cortisolausschüttung und eine damit verlängerte Exposition von Gewebe mit Cortisol (E R De Kloet et al., 1998). Es wird angenommen, dass die vermehrte Sekretion von Glukokortikoiden altersabhängige neurodegenerative Prozesse im Hippocampus fördern (E R De Kloet et al., 1998). Diese Prozesse beinhalten Atrophie, erhöhte Vulnerabilität nach schädlichen Stimuli und Zelluntergang (E R De Kloet et al., 1998). Bei Menschen mit einem Hyperkortisolismus konnte eine Verminderung der kognitiven Fähigkeiten innerhalb von vier Jahren nachgewiesen werden (Lupien et al., 1994). Weiterhin konnte ein vermindertes Volumen des Hippocampus, der eine hohe Glukokortikoidrezeptordichte aufweist, bei Menschen, die über einen längeren Zeitraum einem erhöhtem Cortisolspiegel durch Morbus Cushing (León-Carrión et al., 2009), einer Depression (Sheline, Wang, Gado, Csernansky, & Vannier, 1996) oder einer Posttraumatischen Belastungsstörung (Gurvits et al., 1996), ausgesetzt waren, im MRT festgestellt werden. Auch im Striatum konnten durch Dexamethason bedingte neurodegenerative Prozesse bis hin zur Apoptose beobachtet werden (Haynes et al., 2001).

1.9 Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit werden die altersabhängigen Veränderungen der Expression von Genen im dorsalen Striatum untersucht. Es werden Gene analysiert, die in den NO-Stoffwechsel sowie in Entzündungs-, Immunitäts- und Redoxprozesse involviert sind.

Da in vielen Studien gezeigt wurde, dass NO einen der wichtigsten Neuromodulatoren im Striatum darstellt, interessiert uns nun, ob auch weitere Gene, die in den NO-Stoffwechsel involviert sind, im Alter verändert im Striatum vorkommen und potenzielle Rückschlüsse auf ihre Bedeutung im Hinblick auf den Alterungsprozess zulassen.

Darüber hinaus werden die Astrozytenzahl, gliale Marker und Marker für oxidativen Stress sowie Entzündung in verschiedenen Altersklassen analysiert.

Zusätzlich wird im Hinblick auf mögliche pharmakologische Strategien zur Modulation des Alterungsprozesses die Wirkung von Dexamethason auf das Corpus Striatum auf molekularer und elektrophysiologischer Ebene untersucht. Dazu wird auf molekularer Ebene mithilfe von qRT-PCR die Genexpression von Lcn2, GFAP, NR1/Grin1 (Untereinheit des NMDA-Rezeptors), nNOS, Dopamin-1-Rezeptor und dem Lcn2-Rezeptor 24P3R nach Inkubation mit Dexamethason ermittelt. Auf elektrophysiologischer Ebene wird durch Feldpotenzialanalyse die Auswirkung von Dexamethason auf DHPG-induzierte LTD analysiert. Außerdem wird die Aktivität der Neurone des Corpus Striatum nach Inkubation mit Dexamethason durch Anwendung des Multielektrodenarrays (MEA) untersucht.

Ziele dieser Arbeit sind folglich:

1. Ermittlung der histologischen Korrelate des Alterungsprozesses im Corpus Striatum
2. Ermittlung der molekularen Korrelate des Alterungsprozesses im Corpus Striatum
3. Ermittlung der Wirkung von Dexamethason im Corpus Striatum auf molekularer und elektrophysiologischer Ebene.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Allgemeine Richtlinien

Alle Versuche wurden gemäß der aktuellen Richtlinien für Tierversuche des Landesamtes für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz (LANUV) Nordrhein-Westfalen sowie des deutschen Tierschutzgesetzes (TierSchG) durchgeführt. Die Organentnahmen fanden im S1-Labor des Instituts für Neurophysiologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf statt. Die Projektnummer lautet O58/91. Der Nachweis über die Fachkunde im Umgang mit Versuchstieren („Versuchstierkundlicher Übungsschein mit Fachkundennachweis gemäß §9 des geltenden Tierschutzgesetzes“) liegt durch Frau Prof. Dr. Sergeeva vor.

2.2 Histologie

2.2.1 Anfertigung der striatalen Schnitte

Für die histologische Untersuchung von striatalem Gewebe der Maus wurden transgene männliche Mäuse FVB/N-Tg (GFAPGFP) 14 Mes/J von *Jackson Laboratories* (Bar Harbor, Maine, USA, *stock#003257*) bezogen. Die Tiere zeichnen sich durch die Genexpression von grün fluoreszierendem Protein (GFP) unter der Kontrolle des Promotors von GFAP aus. Durch die simultane Expression von GFP mit GFAP erlaubt GFP die Visualisierung von Astrozyten im Gehirn (Zhuo et al., 1997). Bei Bestrahlung mit blauem oder ultraviolettem Licht emittiert GFP grünes Licht und kann so Dichte, Anzahl und Formation von Astrozyten unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar machen.

Die Versuchstiere wurden in Gruppen von 2 bis 6 Tieren in der Tierversuchsanlage der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf gehalten. Sie durchlebten einen zwölfstündigen Tag mit Licht und eine zwölfstündige Nacht in Dunkelheit. Es wurde ein ad-libitum-Zugang zu Nahrung und Wasser zur Verfügung gestellt. Vier verschiedene Altersgruppen wurden in dieser Studie untersucht: Gruppe 1 sind junge Mäuse im Alter von 2 bis 3 Monaten, Gruppe 2 sind jugendliche Mäuse im Alter von 6 bis 7 Monaten, Gruppe 3 sind

erwachsene Mäuse im Alter von 12 bis 13 Monaten und Gruppe 4 besteht aus alten Mäusen im Alter von 18 bis 24 Monaten.

Nach der Dekapitation durch Frau Prof. Dr. Sergeeva wurde das Gehirn entnommen und das Cerebellum mit einem glatten Skalpellschnitt abgetrennt. Es wurde ein ca. 2 mm dickes Gewebestück von der dorsalen Cortexoberfläche abgeschnitten und der Gehirnblock mit Gewebekleber auf einer Metallplattform befestigt. Danach wurden von der ventralen Gehirnhälfte horizontale Schnitte (400 µm dick) mithilfe eines Vibratoms (*Vibroslicer*, Campden Instruments, Loughborough, Großbritannien) hergestellt. Die Schnitte, die Striatum und Hippocampus enthielten (Abb. 2), wurden in ein Behältnis mit modifizierter eiskalter artifizieller zerebrospinaler Flüssigkeit (aCSF) eingebracht. Die Hälfte dieser Schnitte wurde direkt für histologische Untersuchung vorbehandelt und zur Analyse der Genexpression verwendet. Die andere Hälfte wurde in einer standardisierten aCSF für elektrophysiologische Experimente behalten. Diese wurden nach mindestens zwei Stunden Inkubationszeit durchgeführt. Elektrophysiologische Messungen zur Untersuchung der Auswirkung von Dexamethason (DM) wurden nach 2 bis 6 Stunden Inkubation mit DM durchgeführt. Die Kontrollgruppe und die mit DM behandelten Schnitte wurden abwechselnd gemessen. Für die *messenger* Ribonukleinsäure (mRNA)-Aufreinigung wurden beide Gruppen gleichzeitig bearbeitet.

aCSF-Lösung (in mmol)

- 125 Natriumchlorid (NaCl)
- 1,8 Kaliumchlorid (KCL)
- 1,2 Kaliumdihydrogenphosphat (KH₂PO₄)
- 2,4 Kalziumchlorid (CaCl₂)
- 1,2 Magnesiumchlorid (MgCl₂)
- 26 Natriumbikarbonat (NaHCO₃)
- 10-D-Glukose
- gesättigt mit 95 % Sauerstoff (O₂), 5 % Kohlenstoffdioxid (CO₂) mit einem pH von 7,4

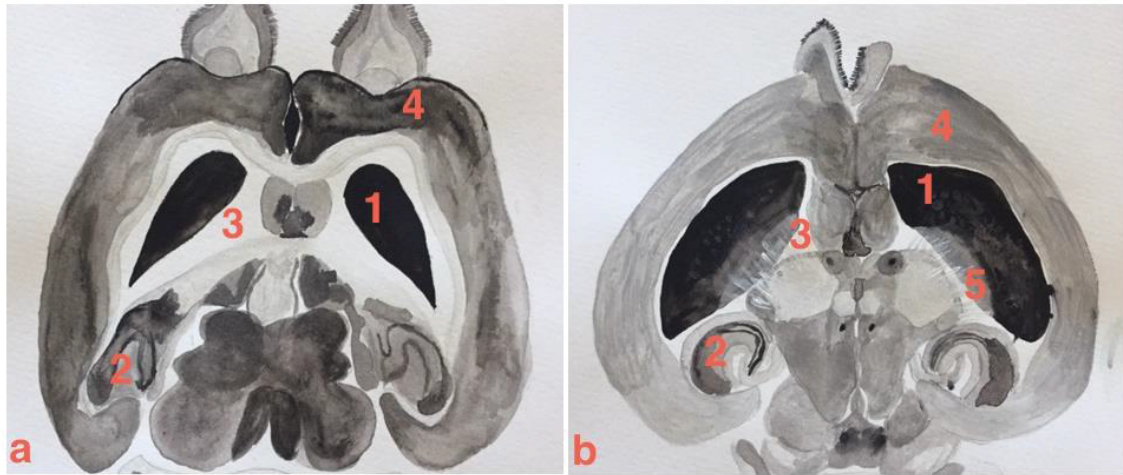


Abb. 2a und 2b: Skizzierung eines horizontalen Hirnschnittes der Maus. 1. Corpus Striatum, 2. Hippocampus, 3. lateraler Ventrikel, 4. Cortex, 5. Globus pallidus lateralis

2.2.2 Quantifizierung von GFP-exprimierenden Astrozyten

Die kortikostriatalen Schnitte, die zur histologischen Untersuchung der Astrozytenzahl verwendet wurden, wurden über Nacht in 0,1 M Phosphatpuffer mit einem pH von 7,4 fixiert. Nach der Fixierung wurden sie für 30 Minuten in 0,1 M Phosphatpuffer, der 4 % Paraformaldehyd enthielt, postfixiert (Yanovsky et al., 2011). Eine Stunde bevor die Präparate auf einen Objektträger aufgezoogen wurden, wurde der Gewebeabschnitt in 20 % Saccharoselösung eingelegt und anschließend mithilfe von Parafilm auf den gefrorenen Saccharoseblock aufgetragen. Mit dem Kryotom der Firma Leica (Modell SM2000R, Wetzlar, Deutschland) konnten bei -20 °C 25 µm dünne Schnitte gewonnen werden, die anschließend auf den mit Gelatine beschichteten Objektträger aufgezoogen werden konnten.

2 l 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,4)

- 22,97 g wasserfreies Dinatriumhydrogenphosphat
- 5,2 g Natriumdihydrogenphosphat x H₂O
- mit destilliertem Wasser auf 2 l auffüllen

20 ml 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDAC)-Puffer

- 20 mg N-Hydroxysuccinimid 98 %
- 800 mg EDAC
- mit 0,1 M Phosphatpuffer auf 20 ml auffüllen

100 ml Saccharoselösung

- 20 g Saccharose
- mit Phosphatpuffer auf 100 ml auffüllen

Die Schnitte wurden mit dem konventionellen Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axioskop 2 plus, Wetzlar, Deutschland) ausgewertet und fotografiert. Es wurden nur die Astrozyten gezählt, deren Zellkörper scharf im Fokus waren und sich durch die Intensität der Fluoreszenz, im Gegensatz zum schwarzen Hintergrund, klar und deutlich abhoben. Pro Schnitt wurden die GFP-positiven Zellen in jeweils 1 bis 2 zufällig ausgewählten quadratischen Feldern von 300 µm ausgezählt. Pro Tier wurden Zellen in 4 bis 10 verschiedenen Schnitten gezählt und von dieser Zahl der Durchschnitt gebildet. Diese durchschnittlichen Werte wurden zwischen den unterschiedlichen Altersgruppen mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests statistisch verglichen.

2.2.3 Immunhistochemie zum Nachweis von Lcn2

Lcn2 wird von aktivierten Astrozyten unter entzündlichen Prozessen freigesetzt. Um Lcn2 in den histologischen Präparaten des Corpus Striatum von alten und jungen Mäusen sichtbar zu machen, wurde eine immunhistochemische Färbung mit einem *goat-anti-mouse-Lcn2*-Antikörper durchgeführt (*mouse Lipocalin-2/NGAL antibody* AF1857, R&D Systems, Minneapolis, USA). In Experimenten mit Dexamethason wurde diese Färbung in Hirnschnitten von Wild Typ (WT) Mäusen durchgeführt, daher verwenden wir den polyklonalen *rabbit-anti-S100*-Antikörper AB868 (Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich) für die Astrozyten Identifikation. Für die neuronale Identifikation benutzen wird den *chicken-MAP-2(microtubule-associated protein 2)*-Antikörper (AB5543, Merk Millipore, CA, USA). Das zu untersuchende Gewebe wurde zunächst dreimal in Phosphatpuffersalz (PBS) mit Triton-X 100 (PBS-T) gewaschen.

Triton-X 100 erleichtert den Zugang des Antikörpers ins Zellinnere durch Erhöhung der Permeabilität des Gewebes. Die Markierung von Lcn2 und S100 β im Corpus Striatum erfolgte durch die indirekte Methode beziehungsweise Zwei-Schritt-Methode. Der polyklonale Antikörper, der an Lcn2 bindet, ist nicht direkt mit einem Markerenzym verbunden, sondern reagiert mit einem zweiten Antikörper, der allerdings an ein Fluorophor gebunden ist und somit durch Fluoreszenz sichtbar gemacht werden kann. Es wurden jeweils 2 μ l der Primärantikörper Anti-Lcn2 und Anti-S100 mit 500 μ l PBS-T gemischt und auf die Gewebeprobe aufgetragen. Nach einer Einwirkungsdauer von 12 Stunden wurden die Reste durch 3 Waschschrte mit PBS-T ausgewaschen. Als Sekundärantikörper wurde *donkey-anti-goat* Texas Red (Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich, verdünnt 1:200) für Lcn2 und *donkey-anti-rabbit* AF488 (verdünnt 1:500, Invitrogen/Life technologies, USA) für S100 verwendet. Zusätzlich haben wir in manchen Versuchen dritte Antikörper (*chicken*-MAP-2, 1:500) mit Anti-Lcn2 und Anti-S100 Antikörpern gemischt und über Nacht auf die Gewebeproben aufgetragen. *Chicken*-MAP-2 wurde am zweiten Tag mit Hilfe des Sekundärantikörpers *goat-anti-chicken* AF647 (1:500, Invitrogen/Life technologies, USA) visualisiert. Nach einer Einwirkungsdauer von 90 Minuten wurden die Reste des Sekundärantikörpers in 3 Waschschrten mit PBS ausgewaschen und die Schnitte mit Deckgläsern und Aqua-Poly/Mount (Polisciences, Warrington, PA) abgedeckt.

2l 0,01 M Phosphatpuffersalz (PBS)

- 1800 ml destilliertes Wasser
- 200 ml 0,1 M Phosphatpuffer
- 18 g NaCl

1l 0,01 M Phosphatpuffersalz mit Triton-X 100 (PBS-T)

- 8 ml Triton TM x100
- mit 0,01 M PBS auf 1 l auffüllen

2.3 Konventionelle PCR, *real-time* RT-PCR und PCR-*array*

In dieser Arbeit wurde mithilfe des PCR-*arrays* „Mouse Nitric Oxide Signaling Pathway“ (SA Bioscience, A Quiagen Company, Venlo, Niederlande) der NO-Signalweg im Striatum bei Mäusen verschiedenen Alters untersucht und verglichen. Gene, die im *array* signifikant erhöht waren, wurden mit *real-time* Reverse Transkriptase (RT)-PCR zur Kontrolle erneut untersucht. Die hierzu verwendeten Primer wurden in einem Testlauf mit konventioneller PCR und darauffolgender Gelelektrophorese auf ihre zu erwartende Ampliconlänge hin untersucht.

2.3.1 Konventionelle PCR

Die PCR wurde mit folgendem Standard-PCR-Ansatz durchgeführt.

100 µl PCR-Reaktionsansatz

- 10 µl Polymerase-Pufferlösung
- 10 µl Desoxy-Nukleotide 200 pM
- 1,5-3 mM Magnesiumchlorid (MgCl₂)
- 1 µl Taq-Polymerase
- 1 µl Primer up 10-100 pM
- 1 µl Primer lo 10-100 pM

Der Standard-Ansatz wurde mit nukleasefreiem Wasser (Promega, Fitchburg, Wisconsin, USA) auf 100 µl aufgefüllt. Die Polymerase-Pufferlösung, die Taq-Polymerase, das MgCl₂ und die Desoxy-Nukleotide wurden von Qiagen (Venlo, Niederlande) erworben. Die PCR wurde mit dem Thermocycler *master cycler* (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) durchgeführt.

Die MgCl₂-Konzentration wurde für jede PCR ermittelt. Die optimale Temperatur für die Hybridisierung ergab sich aus dem Cytosin- und Guanin Gehalt des Primers, also aus seiner Länge. Die optimale Temperatur lag bei 50 °C.

2.3.2 Entwicklung der Primer

Folgende Primer (Tabelle 1) wurden nach unten genannten Protokollen (Tabelle 2) hergestellt. Die restlichen Primer wurden mithilfe von Primer Express (ABI PRISM, Pleasanton, Kalifornien, USA) entwickelt. Die Primer wurden durch MWG-Biotech (Ebersberg, Deutschland) hergestellt.

Gen	GenBank Nummer	sense primer	antisense primer	Amplicon (bp)	r ²	E
Aass	NM_013930	CTCTGGCTCCCAAGCACATC	CCCAAATCAGACAGGCTT CT	151	0,98	1,8
Aif1 / Iba1	NM_0194672	GTCTTGAAGCGAATGCTG G	CATTCTCAAGATGGCAGAT C	157	0,96	2,4
Als2	NM_028717.6	GAGAGCTTTTGCTAATGGGA TGG	GCCTGGCAACCTCTCTGG T	162	0,95	2,1
B2m	NM_009735.3	ACTGACCGGCTGTATGCTA	CAGTCTCAGTGGGGTGA AT	244	0,99	2,2
CB1R	NM_007726	GTGGGCAGCCTGTTCTCA	CATGGGGCTTGGTCAGG	401	0,99	1,9
Cyba	NM_007806.3	CATCGTGGCTACTGCTGGA C	TGGACCCCTTTTCTCTT T	116	0,96	2,2
D1R/Drd1a	XM_00651684 8	CAGAACTGTGACACAAGGT GAGC	CTGGCAATTCTTGGCATGG ACTG	177	0,99	1,6
D2R	NM_010077	GCAGTCCGAGCTTTCAGAG CC	GCTATACGGGCTCTCTCT GG	206	0,98	1,9
GapdH	NM_00100130 3	TGTGTCCGTCGTGGATCTGA	TTGCTGTTGAACTCGCAGG AG	150	0,99	1,9
GFAP	XR_388347	ACCAGCTTACGGCCAACAG TG	TGTCTATACGCAGCCAGGT TGTTCC	138	0,995	2,14
GLT-1	KC825358	CTCACTGACTGTGTTGGTG	GAGGTGCCACCAGAACTTT C	457	0,99	2,1
GluI/GS	NM_008131	CACTACCGGGCCTGCTTGT AT	GCATGGCCTTGGTGATAA GTTG	249	0,99	2
GluN1/NR1/Grin1	NM_008169	GCTGTACCTGCTGGACCGC T	GCAGTGAGGAAGCCACTA TGATC	219	0,99	1,9
GluN2A/ (NR2A)	NM_008170.2	GGTCTGCATCGACATCC	GTGAGCCACAGCCATGA CT	162	0,99	1,8
GluN2B (NR2B)	NM_008171	GCTACAACACCCACGAGAA GAG	GAGAGGGTCCACGCTTTC C	314	0,97	2,5
GluN2C (NR2C)	NM_010350.2	GCTTCTGCATCGACATCC	CCATGTCTGCCCGCTTGTA	150	0,98	1,8
Gpx6	NM_145451.3	GCCAGAAGTTGTGGGGTT C	TCCATACTCATAGACGGTG CC	129	0,98	2,2
Hsp90	NM_008302.3	GTGCGAGTCGGACTTGGTC CG	TGCCTGAAAGGCAAAGGT CTCC	123	0,99	1,8
Irgm1	NM_008326.1	ACGAAGACGCGACTGAGT ACT	CAGAGGCAATGATGAATAA GTCAC	182	0,99	2,2
Lcn2	NM_008491.1	CCAGTTCGCCATGGTATTT	GGGTGAAACGTTCCCTCAG T	113	0,98	2,3
MAG	NM_010758.2	GAGACATCCCAACTCAGG GAGAC	TGTGCGGGACTTGAAGAC CA	290	0,99	1,9
mGluR1	NM_016976	CCATTTGTCTTACCCG	GTCATGATCTTGTAGTTGC T	246	0,97	2
mGluR5	NM_00108141 4	GGATATAATGCATGACTATC CA	GTCATGATTTTGTAGTTGC T	232	0,98	2
eNOS	NM_008713.4	GCAAGACAGACTACACGAC ATTGA	GAGTACCTCGTCCCGGTA GA	112	0,94	2,1
nNOS	NM_008712.2	AGTTTTTGCAACAGCGACA	GCAGGTCTCTCTCTGTA GATATG	121	0,99	1,9
Pea15a	NM_011063	CAAGGAGGACATCCCAAGT	CTTCAGCACACGGGTTCTG TA	184	0,98	2
Scd1	NM_009127	TCTTGTCCCTATAGCCCAAT CCAG	AGCTCAGAGCGGTGTTTC AA	130	0,98	2,3
Scd2	NM_009128	AGTGTGCTCGTGAGCCTGT G	CCTGCAGATCCATGTCCAG CTA	140	0,99	1,9
Scd3	NM_024450.2	TCACACCGTGAACCTGAG ATTGT	TGCTTGCTCTGCCTTTGA CCTAT	160	0,99	2
S100β	NM_009115.3	GCCCTCATTGATGTCTTCCA	GAGAGAGCTCGTTGTTGAT AAGCT	101	0,93	1,9
Txnip	NM_023719.2	CAAGTTCGGCTTCGAGCTTC	ACACTTACCTTGCCAATGG C	379	0,98	1,9

Tabelle 1: Aufzählung der verwendeten Primer. Die Primer werden mit der GenBank-Nummer und der Amplicon-Länge aufgeführt. Für jedes Primerpaar wurde der lineare Regressionskoeffizient r^2 und die Effizienz E bestimmt.

Primer	Protokoll
Cyba	(Jawien et al., 2012)
GAPDH	(Vandesompele, De, Pattyn, Poppe, & Al., 2002)
Gpx6	(Gornicka et al., 2011)
IBA-1	(Nandi et al., 2012)
Irgm1	(H. Xu et al., 2010)
MAG	(Fröb et al., 2012)
Scd 1-3	(Vandesompele et al., 2002)
S100 β	(Sandhir, Onyszchuk, & Berman, 2008)
Txnip	(Chen et al., 2010)

Tabelle 2: Protokolle der Primer. Es werden die Publikationen, die als Quelle dienen, aufgeführt.

2.3.3 Gelelektrophorese

Nach dem Testlauf mit konventioneller PCR wurde die Ampliconlänge des Primers mittels Gelelektrophorese ausgewertet. Durch Auftragen der Proben auf Agarosegel wurden die einzelnen DNA-Moleküle unter Anlage von elektrischer Spannung ihrer Größe nach aufgetrennt.

150 ml 2 %-iges Agarosegel

- 3 g Agarose
- 150 ml Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer) 0,5x

1 l 50 x TAE-Puffer-Stocklösung

- 242 g Trishydroxymethylaminomethan (TRIS)
- 57,1 ml konzentrierte Essigsäure
- 100 ml Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) 0,5 M mit einem pH von 8
- mit destilliertem Wasser auf 1 l auffüllen

Die Agarose wurde in dem TAE-Puffer aufgekocht und daraufhin wurde *Gel Red Nucleic Acid Stain* der Firma Biotium (Hayward, Kalifornien, USA) hinzugegeben. *Gel Red* interkaliert mit der DNA und verändert dadurch sein Absorptionsspektrum, was eine stärkere Anregung durch UV-Licht bewirkt. Die Proben wurden mit *Blue Orange 6x Loading Dye* von Promega (Fitchburg, Wisconsin, USA) vermischt. Als Marker wurde die 100 Basenpaare DNA-Leiter von Promega (Fitchburg, Wisconsin, USA) verwendet. Dieser Marker zeigte die Basenpaarlänge in einem Bereich von 100 bis 1500 Basenpaaren an.

Unter der Spannung von ungefähr 110 bis 130 V bewegten sich die DNA-Moleküle aufgrund ihrer negativen Ladung auf die positiv geladene Anode hin. Besonders kleine Fragmente durchliefen die Poren des Gels schneller und befanden sich am Ende der Gelelektrophorese nah an der Anode. Das Ergebnis wurde unter Einwirkung von UV-Licht fotografiert. In Abb. 3 wird ein Beispielbild gezeigt.

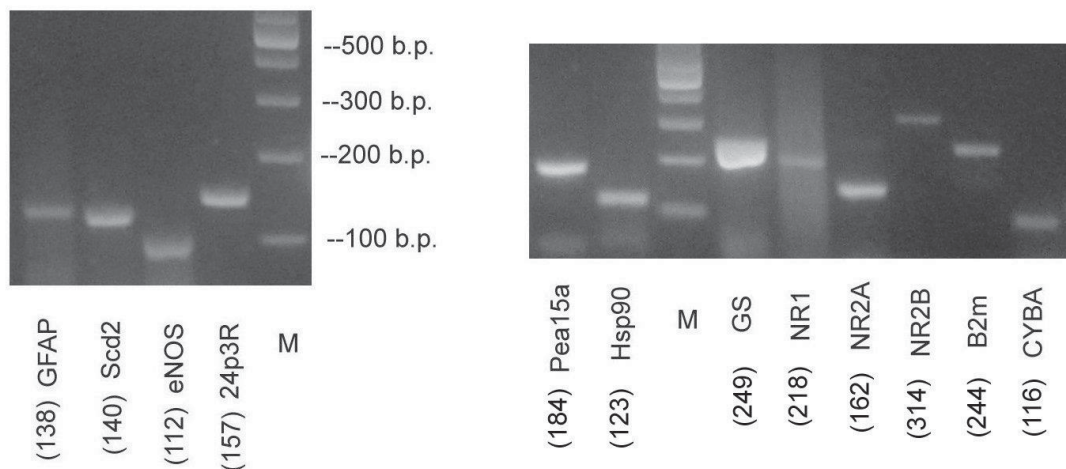


Abb. 3: Gelelektrophorese. M bezeichnet die 100 Basenpaare DNA-Leiter, die als Größenmarker herangezogen wird. Die erwartete PCR Produktgröße (in Basenpaaren b.p.) ist in Klammern neben dem Namen des Transkriptes angegeben.

2.3.4 Real-time/quantitative RT-PCR (qRT-PCR)

Um die aktuellen Transkriptionsvorgänge in einem Gewebe darzustellen, ist es sinnvoll, statt DNA die *messenger* Ribonukleinsäure (mRNA) zu vervielfältigen. In unserem Fall konnte durch Quantifizierung der mRNA, die Genexpression

von Genen, die in den NO-Signalweg im Striatum involviert sind, ermittelt werden.

Die *real-time/quantitative* PCR (qPCR) beruht genau wie die konventionelle PCR auf dem Prinzip der exponentiellen Amplifikation von DNA. Bei der qPCR werden die Produkte allerdings nicht mithilfe von Gelelektrophorese ausgewertet, sondern in Echtzeit simultan mit der Vervielfältigung ermittelt und am Ende der PCR auf dem Bildschirm des Thermocyclers angezeigt.

Die Kombination dieser beiden Methoden wurde als qRT-PCR bei Genen, die im *PCR-array* altersabhängig signifikant verändert vorlagen, angewandt. Zusätzlich untersuchten wir die Expression von Genen, die für die striatale Plastizität von Bedeutung sind, wie die der Dopamin-Rezeptoren, der mGluR's und des Cannabinoid-Rezeptor 1 (CB1). Außerdem wurde die Expression von Genen, die mit oxidativem Stress und dem Immunstatus assoziiert werden, untersucht.

2.3.4.1 Isolierung von mRNA und Transkription in cDNA

Die Isolierung erfolgte mit dem *Quickprep Micro mRNA Purification kit* (GE Healthcare, Buckinghamshire, Großbritannien). Die Gewinnung von cDNA aus mRNA erfolgte mit dem *first strand cDNA Synthesis kit* (Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) und wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Als Produkt der reversen Transkription entstand intronfreie complementary DNA (cDNA). Es wurden 8 µl purifizierte mRNA zu 7 µl Reaktionsmix des *first strand cDNA Synthesis kit* hinzugefügt. Nach Inkubation von einer Stunde bei 37 °C wurde die Reverse-Transkriptase-Reaktion durch Einfrieren auf -20 °C gestoppt.

2.3.4.2 Fluoreszenzdetektion

Die Fluoreszenzdetektion wurde mit dem *SYBR Green Master mix kit* (Applied Biosystems, US) realisiert. SYBR Green ist ein Cyanin-Farbstoff, der zur

Detektion von doppelsträngiger DNA genutzt wird. Der Farbstoff interkaliert mit der DNA und bildet einen fluoreszierenden DNA-Komplex, der blaues Licht absorbiert und grünes Licht emittiert (Holzapfel & Wickert, 2007). Das Absorptionsmaximum liegt bei $\lambda_{\max} = 494 \text{ nm}$. Die Fluoreszenzmessung fand am Ende jedes Elongationszyklus statt. Mit dieser Methode kann nicht zwischen verschiedenen PCR-Produkten unterschieden werden. Sie ist sehr sensitiv, aber wenig spezifisch (Holzapfel & Wickert, 2007). Daher wurde im Anschluss an die PCR stets eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Mithilfe der Analyse der Länge der DNA-Fragmente konnten diese auf ihre Spezifität hin untersucht werden. Abb. 4 zeigt eine beispielhafte Schmelzkurvenanalyse.

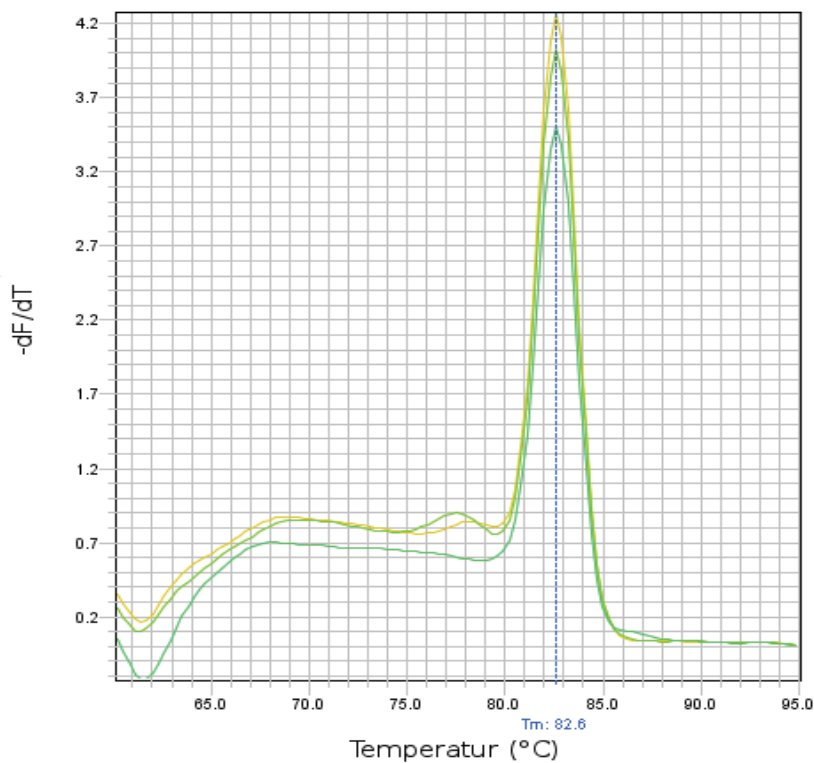


Abb. 4: Schmelzkurve nach Amplifikation des DNA-Fragments von TXNIP: Das Produkt wurde kontinuierlich bis auf 95 °C erhitzt und die entstehende Fluoreszenz wurde gemessen. Die Abbildung zeigt auf der x-Achse die Temperatur und auf der y-Achse die Fluoreszenzänderung pro Zeit (dF/dT). Die Fluoreszenz ist bei einer Temperatur von 82,6 °C bei diesem Produkt am höchsten.

2.3.4.3 qRT-PCR-Protokoll

Die qRT-PCR wurde in optischen *MicroAmp* Platten mit 96 Spalten, die jeweils ein totales Volumen von 10 μl , bestehend aus SYBR *Green* PCR *Master mix*

(Applied Biosystems, Carlsbad, Kalifornien, USA), cDNA (100 bis 150 ng) und den Primern, enthalten, durchgeführt. Die Experimente wurden mit einer *StepOne real time* PCR-Maschine (Applied Biosystems, Carlsbad, Kalifornien, USA) durchgeführt.

Folgendes Protokoll wurde benutzt:

- Initiale Inkubation für 2 min bei 50 °C, um Uracil-DNA-Glycosidase zu aktivieren
 - 10 min bei 95 °C um Uracil-DNA-Glycosidase zu hemmen und die AmpliTaq Gold Polymerase zu aktivieren
 - 15 s bei 95 °C zur Denaturierung
 - 2 min bei 50 °C zum *Annealing*
 - 1 min bei 60 °C zur Elongation
- } 40 Zyklen

Die Uracil-DNA-Glycosidase ist im PCR Ansatz enthalten, um Verunreinigungen durch zuvor stattgefundene Experimente entgegenzuwirken. Sie entfernt am Anfang der neuen Untersuchung alle Uracil-Reste aus DNA-Molekülen, die aus einer vorherigen PCR stammen und den Reaktionsansatz kontaminieren könnten.

2.3.4.4 Berechnung der Effizienz (E) mittels absoluter Quantifizierung

Um die Effizienz E der PCR zu bestimmen, wurde für jedes benutzte Primerpaar eine Standardkurve aus unterschiedlichen Verdünnungsstufen hergestellt. Die DNA-Proben wurden schrittweise bis 1:64 verdünnt. Die Standardkurve wurde aus den *cycle threshold* (Ct)-Werten der verschiedenen Verdünnungen berechnet.

Der Ct-Wert entspricht der Anzahl der Zyklen, die nötig sind, damit das echte Fluoreszenzsignal signifikant das Hintergrundrauschen der Fluoreszenz übersteigt (Holzapfel & Wickert, 2007; Michael Walter Pfaffl, 2004). In der Startphase der PCR ist die DNA-Menge am geringsten und die Wahrscheinlichkeit, dass sich DNA, Primer und DNA-Polymerase treffen, gering. Zum Ende der PCR ist die Menge an Zielsequenz so stark angestiegen, dass die DNA-Fragmente hybridisieren und so die PCR hemmen. Man spricht

von der Plateauphase. Zwischen Startphase und Plateauphase befindet sich die exponentielle Phase, in der unter optimalen Verhältnissen ein Anstieg der DNA pro Zyklus um den Faktor 2 beobachtet werden kann. In der Realität gilt als guter Wert für E ein Bereich zwischen 1,7 bis 1,9, der Schwankungen von 1,5 bis 2,0 aufweisen kann (Michael Walter Pfaffl, 2004). Der Beginn der exponentiellen Phase wird zur Quantifizierung genutzt und als Ct-Wert beschrieben (Holzapfel & Wickert, 2007; Michael Walter Pfaffl, 2004). In Abb. 5 wird eine exemplarische Standardkurve gezeigt. Bei der Standardkurve wird der Ct-Wert gegen den Logarithmus der Menge der eingesetzten DNA aufgetragen.

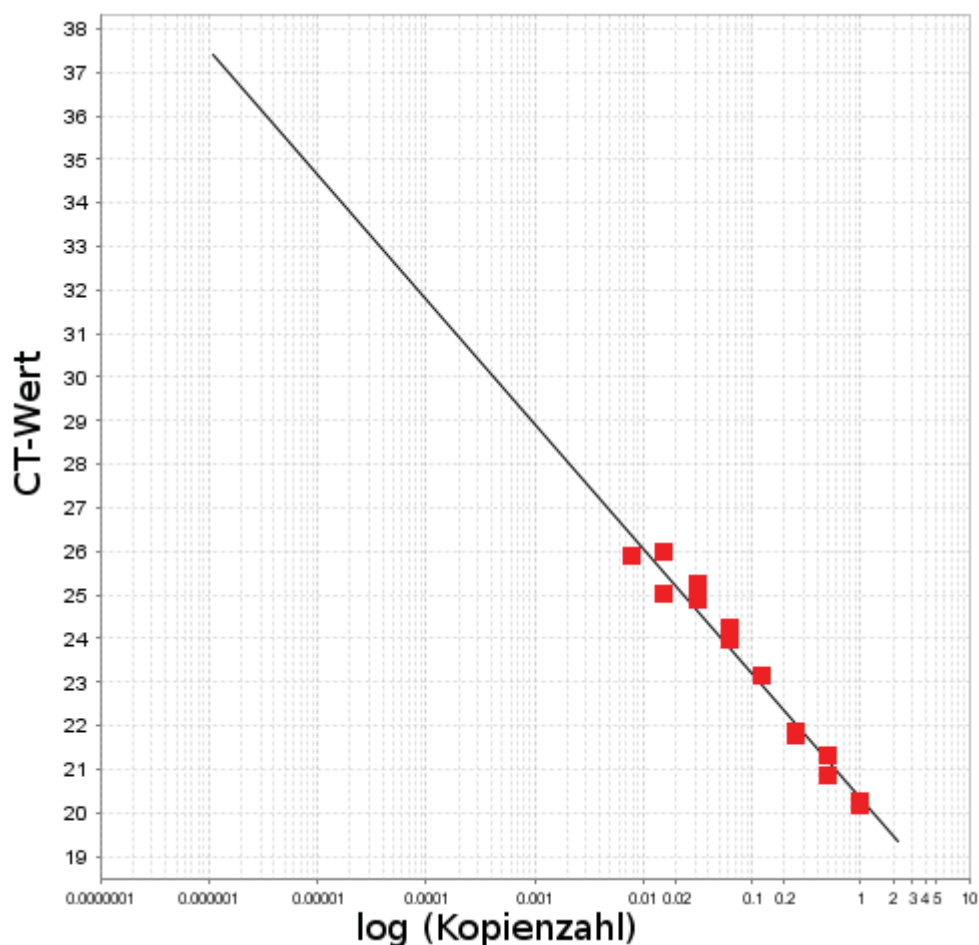


Abb. 5: Standardkurve der Expression von 24p3r: Die Standardkurve ergibt sich aus der Verdünnungsreihe der Probe bis zu 1:64. Auf der x-Achse wird der Logarithmus der Kopienzahl von 24p3r gezeigt. Die y-Achse bildet den errechneten CT-Wert ab.

Die Bestimmung der Standardkurve wurde pro Primerpaar zweifach durchgeführt. Aus der Steigung der Standardkurve kann E der qRT-PCR

bestimmt werden (Pfaffl, 2001). Die Effizienz berechnet sich aus folgender Formel:

$$E = 10^{(-1/\text{Steigung})}$$

Zusätzlich zur Effizienz wurde der lineare Regressionskoeffizient r^2 für jedes Primerpaar bestimmt.

2.3.4.5 Relative Quantifizierung

Bei der relativen Quantifizierung wird die Expression der Zielsequenz zu der Expression eines *Housekeeping*-Gens (HKG) normalisiert. Das HKG ist ein Referenzgen, das sich durch eine ubiquitäre und homogene Expression auszeichnet (Michael Walter Pfaffl, 2004) und leicht zu detektieren ist. Auch bei Krankheit, Stress oder unter Medikamenteneinfluss sollte die Expression nicht variieren (Holzapfel & Wickert, 2007). Der Vorteil dieser Normalisierung besteht darin, dass Fehler in der experimentellen Probe, wie zum Beispiel Variationen in der Menge der Ausgangs-DNA, gleichermaßen das HKG und die Zielsequenz betreffen und sich in den nachfolgenden Berechnungen gegenseitig aufheben (Michael Walter Pfaffl, 2004). In der vorliegenden Arbeit wurde als HKG β -Aktin gewählt, das zu den gebräuchlichsten HKG zählt.

Die Ermittlung des Expressionsunterschieds zwischen HKG und Zielgen erfolgte nach der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode (Michael Walter Pfaffl, 2004; Pfaffl, 2001; Sergeeva et al., 2003; Yanovsky et al., 2011).

$$\Delta Ct = Ct (\text{Zielgen}) - Ct (\beta\text{-Aktin})$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (6\text{-}24 \text{ Monate alte Mäuse}) - \Delta Ct (2\text{-}3 \text{ Monate alte Mäuse})$$

Der relative Unterschied in der Genexpression zwischen den Altersgruppen (Ratio) und normalisiert zum HKG berechnet sich aus folgender arithmetischen Formel:

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Durchschnittliche $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Werte der jungen Mäuse wurden als 100 % angesehen und die Werte der anderen 3 Altersgruppen als prozentualer Anteil im Vergleich zu dieser Gruppe berechnet (Chepkova et al., 2015).

2.3.5 PCR-array

Um Veränderungen im NO-Signalweg im Alter zu untersuchen, wurde das PCR array „*Mouse Nitric Oxide Signaling Pathway*“ (SA Bioscience, A Qiagen Company, Venlo, Niederlande) verwendet. Durch ein PCR-array kann das Expressionsprofil von sehr vielen Genen gleichzeitig ermittelt werden. Es stellt ein nützliches Werkzeug zur Untersuchung von komplexen biologischen Prozessen, wie zum Beispiel dem Altern, dar (Park et al., 2009).

Das array enthielt in den Proben A1 bis G12 die gebrauchsfertigen PCR-Primer für 84 Gene, die in den NO-Stoffwechsel involviert sind oder mit oxidativem Stress und antioxidanter Abwehr assoziiert sind. Inbegriffen sind zum Beispiel Gene, die zur NO-Synthese und zu dem Superoxidmetabolismus beitragen; außerdem Gene, die an der Antwort auf oxidativen Stress teilhaben und durch NO entweder induziert oder gehemmt werden.

Weiterhin waren in H01 bis H12 einige Kontrollen enthalten. In H01 bis H05 befanden sich folgende HKG: β -Aktin, B2m, Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), Hitze-Schock-Protein 90 (Hsp90) und Glucoronidase β (Gus β). Die Ergebnisse der RTq-PCR konnten entweder zu dem durchschnittlichen C_t -Wert von bis zu fünf HKG normalisiert werden oder zu dem C_t -Wert eines HKG. Die Ermittlung des HKG wurde mittels t-Test durchgeführt. Der t-Test wurde auf den individuellen 2^{-C_t} -Wert jedes HKG angewandt. Diese Methode hatte sich bereits in anderen Studien, die mit einem PCR-array arbeiteten, bewährt (Schmittgen & Livak, 2008; Tanaka et al., 2012). β -Aktin zeigte die geringste Differenz in der Genexpression zwischen jungen (3 Monate) und alten (18 Monate) Mäusen und den besten Signifikanzwert (p-Wert).

Aufschluss über Kontamination mit genomischer DNA erbrachte Probe H6. Die genomische DNA Kontrolle enthielt ein Primer-Set, das nichttranskribierte genomische DNA mit hoher Sensitivität erkannte. Bei einem Wert $C_t^{GDC} < 30$

wurde von einer Kontamination ausgegangen und die Analyse musste nach Reinigung der RNA-Proben wiederholt werden.

Von H10 bis H12 befanden sich positive PCR Kontrollen (PPC), um die Effektivität der Polymerasekettenreaktion zu testen. Der Wert sollte $C_t^{PPC} = 20 \pm 2$ betragen. Höhere Werte oder Werte mit größerer Variabilität stellten ein Indiz für die Anwesenheit von Hemmstoffen der Polymerasekettenreaktion dar.

In den Proben H07 bis H09 befand sich die Reverse Transkriptionskontrolle (RTC). Ein Wert von $C_t^{RTC} - C_t^{PPC} > 5$ zeigte eine Einschränkung der Reverse Transkriptase Reaktion an. Die Qualität und Reinheit der RNA sollte daraufhin überprüft werden.

Ein *array* wurde ohne cDNA getestet und diente als Negativkontrolle. So wurde die Temperatur T_m ermittelt, bei der die Primer denaturierten. Amplifizierte PCR-Produkte, die persistierende Primer-Artefakte in der Schmelzkurvenanalyse, eine T_m unter 75°C oder eine doppelgipflige Schmelzkurvenanalyse zeigten, wurden aus der Studie ausgeschlossen. Dazu gehörten *Epx*, *Gpx2*, *Gpx5*, *Hmgb1*, *Idh1*, *Naxal* und *Txnrd2*.

2.4 Feldpotenzialanalyse

Die Feldpotenzialableitung wurde von Frau Dr. Chepkova durchgeführt. Nach mindestens zweistündiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde ein einzelner Schnitt, der vorher wie in 2.2.1 beschrieben behandelt wurde, in die Ableitkammer überführt. Die Kammer wurde kontinuierlich mit aCSF, das eine Flussgeschwindigkeit von 1,5 bis 2 ml/min aufwies, versorgt. Die Temperatur innerhalb der Ableitkammer betrug 32°C .

Zur Erzeugung des Feldpotenzials wurde eine bipolare Stimulationselektrode aus Nickel und Chrom auf die subkortikale weiße Substanz an der Grenze zwischen Cortex und Striatum positioniert (Abb.2 und Abb.6). Zur Registrierung wurden Mikropipetten, die mit aCSF gefüllt waren, mit einem Abstand von 0,3 mm von der Stimulationselektrode im Striatum platziert. Mit diesem Versuchsaufbau konnten kortikostriatale Feldpotenziale mit einem niederohmigen Widerstand von 2 bis 4 m Ω an den Mikropipetten gemessen werden. Nach einer initialen Testphase von Stimulus und Antwort wurde die Intensität des Stimulus so angepasst, dass die postsynaptische Antwort 50 bis

60 % des maximal erreichbaren Wertes betrug. Dieser Wert wurde mit einer Stimulationsfrequenz von 0,033 Hz erreicht. Die Experimente wurden entweder mit hochfrequenter elektrischer Stimulation oder einem chemischen Stimulus durchgeführt. Zur chemischen Stimulation wurde DHPG (Abcam, Cambridge, Großbritannien), ein spezifischer Agonist an mGluR 1, verwendet.

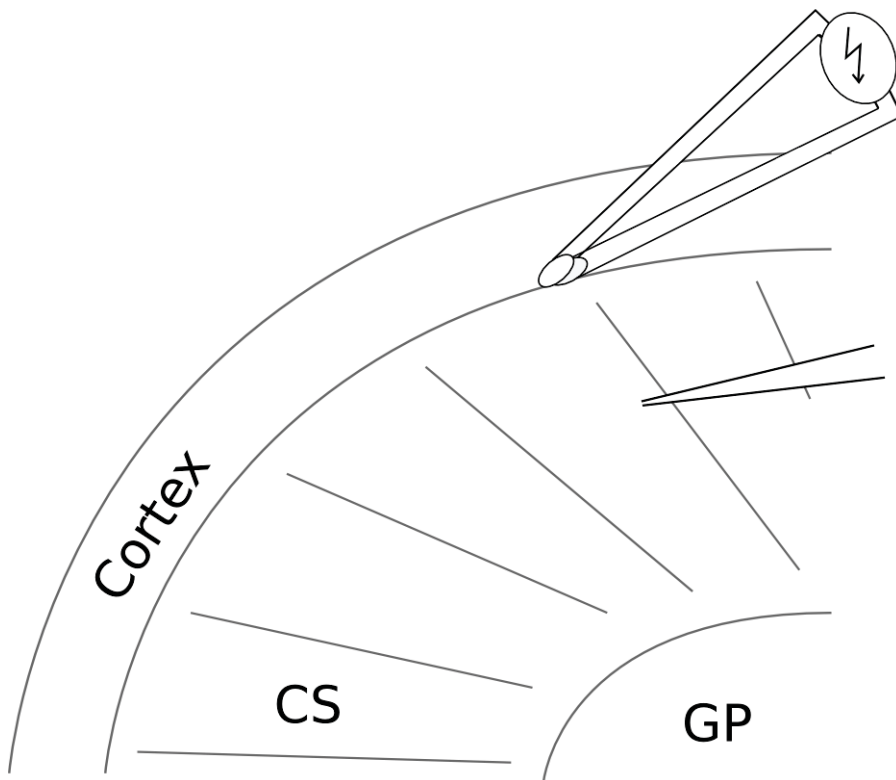


Abb. 6: Schematische Zeichnung der Stimulationselektrode und der Messelektrode: Die bipolare Stimulationselektrode aus Nickel und Chrom befindet sich an der Grenze zwischen Cortex und Corpus Striatum (CS). Die mit aCSF gefüllte Mikropipette befindet sich 0,3 mm von der Stimulationselektrode entfernt im Striatum. An das Striatum grenzt der Globus pallidus (GP).

Aufbau des Experiments

- 15-20 min Kontrollaufnahme
- DHPG: 10 min Perfusion mit 100 μ M DHPG
- 60 min Kontrollaufnahme

Die Signale wurden verstärkt (Axoclamp) und mithilfe der Software Clampex von pClamp (beides von Axon Instruments, Molecular Devices, Sunnyvale, Kalifornien, USA) bei 10 kHz digitalisiert. Danach wurden sie mit der Software Clampfit und dem Programm Excel offline am PC analysiert.

Es wurde der Durchschnitt von 10 aufeinander folgenden Signalantworten, die innerhalb von 5 min aufgenommen wurden, errechnet. Der postsynaptische

Antwortwert setzte sich aus dem Durchschnitt des minimal erreichten Wertes, der von Beginn des positiven Gipfels bis hin zu der Negativierung des Gipfels gemessen wurde, und aus dem Durchschnitt des maximal erreichten Wertes, der von der Negativierung des Gipfels bis hin zur vollen Ausprägung des positiven Gipfels gemessen wurde, zusammen. Die gesamten Messungen wurden zur Grundlinie normalisiert und gegen die Zeit aufgetragen. Als Grundlinie wurde der Mittelwert, der zu Beginn jedes Experiments in der 15- bis 20-minütigen Kontrollaufnahme ermittelt worden war, festgelegt.

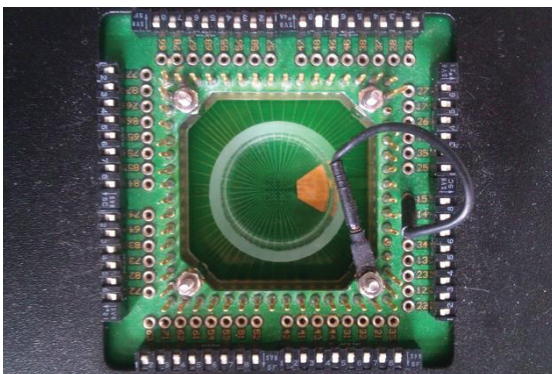
2.5 Multielektrodenarray (MEA)

Das MEA hat sich innerhalb der letzten dreißig Jahre zu einer Standardmethode der Elektrophysiologie entwickelt. Eine Vielzahl an erregbaren Zellen kann mittels MEA untersucht werden: zentrale und periphere Neuronen, Herzzellen, Retinazellen und Muskelzellen.

In der vorliegenden Arbeit wurde mithilfe von MEA die Auswirkung von Dexamethason auf die neuronale Aktivität im Corpus Striatum *in vitro* gemessen.

Dazu wurde das StandardMEA (Multichannel Systems, Reutlingen, DE) verwendet. Dieses ist 5 x 5 cm groß und trägt auf seiner Oberfläche 60 Elektroden, die zusammen ein Elektrodenraster bilden. In Abb. 7 erkennt man, dass sich rechts und links jeweils 14 Elektroden und oben und unten jeweils 16 Elektroden auf dem MEA befinden.

a)



b)

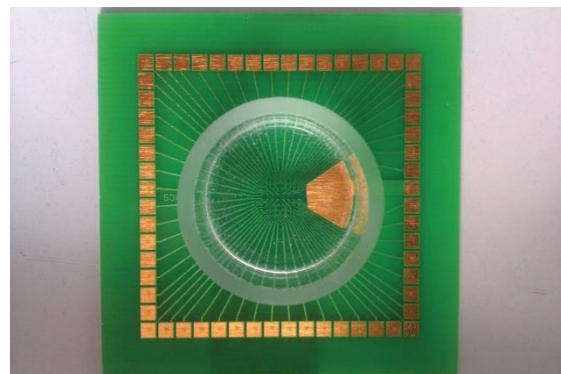


Abb. 7: MEA a) Multielektrodenarray b) Kultivierungskammer und Elektroden

In der Mitte des MEA befindet sich eine kreisrunde Zellkulturkammer mit einem Radius von einem Zentimeter. Die Elektroden bestehen aus tausend 0,1 µm breiten Titannitritrohren. Der Widerstand wird durch die enorme Oberfläche der vielen Rohre verringert und gewährleistet bessere Leitung. Die einzelnen Kanäle zur Ableitung können manuell ein- und ausgeschaltet werden.

2.5.1 Kultivierung von Neuronen auf dem MEA

Zur Entnahme des striatalen Gewebes wurden Wildtyp-Mäuse der Reihe C57 Black 6 am ersten postnatalen Tag nach den Vorschriften des deutschen Tierschutzgesetzes von Frau Prof. Dr. Sergeeva präpariert. Die Tiere wurden aus der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben (ZETT) der Universität Düsseldorf erworben.

Nach der Dekapitation wurde das Gehirn entnommen und der olfaktorische Cortex mit einem glatten Skalpellsschnitt abgetrennt. Der nächste 2 mm dicke Schnitt enthielt Corpus Striatum (Abb. 8). Mithilfe eines Mikroskops und zwei Pinzetten wurde das Gewebe entnommen. Die extrahierten Zellen bestanden aus Corpus Striatum und Globus Pallidus, da diese bei sehr jungen Tieren schlecht voneinander getrennt werden können.

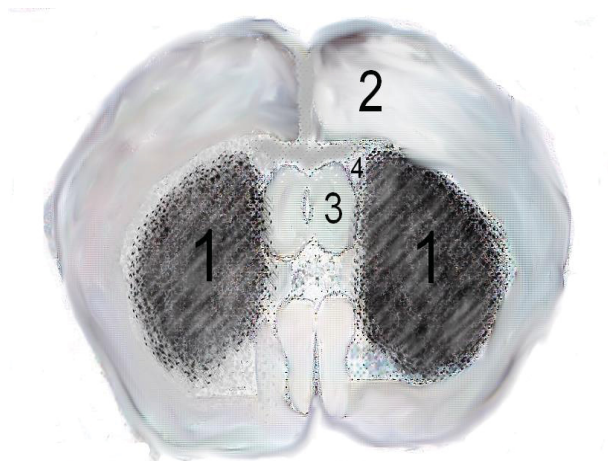


Abb. 8: Koronarschnitt des Gehirns einer Maus. 1. Corpus Striatum, 2. Cortex, 3. Thalamus, 4. Ventrikel

Das Gewebe wurde mit einem Skalpell zerkleinert. Um den Gewebeverbund zu trennen, wurde das Gemisch aus striatalen Zellen mit der Endopeptidase Trypsin für 20 min bei 37 °C in einen Heizblock mit Rüttelfunktion gestellt.

Danach war das Gewebe auf den Grund des Eppendorfgefäßes gesunken, sodass das Trypsin möglichst ohne Aufnahme von Gewebe abpipettiert werden konnte.

Darauf folgten zwei Reinigungsschritte. Der erste beinhaltete eine Reinigung der Zellen mit *Dulbeccos Phosphate Buffered Saline* 10x (DPBS) (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA). Diese Stocklösung wurde 1:10 verdünnt. DPBS wurde in das Eppendorfgefäß pipettiert und wieder ohne Gewebe abpipettiert. Dieselbe Prozedur wurde danach mit MV10-Lösung vollzogen.

50 ml MV10-Lösung

- 43 ml *Minimum Essential Medium* x1, keine Verdünnung
- 5 ml *Fetal Bovine Serum*
- 500 µl Insulin x100 Stocklösung (um diese zu erhalten, wurde Insulin vom Rind 1:4 verdünnt zu 25 mM, 10 mg/ml)
- 500 µl Glutamin 200 mM
- 500 µl *Hepes Hemisodium Salt* 1 mM
- 500 µl 60 %-ige Glukoselösung

Sobald keine größeren Gewebepartikel mehr sichtbar waren, wurde das Gewebe bei 2000 Umdrehungen pro Minute für 6 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und verworfen, der Rückstand wurde mit 100 bis 200 µl MV10-Lösung verdünnt, gut gemischt und auf das MEA pipettiert. Die Kulturen wurden bei 37 °C in den Brutschrank gestellt und nach 12 bis 24 Stunden wurde die MV10-Lösung durch Neurobasalmedium ersetzt.

50 ml Neurobasalmedium

- 1 ml B27 10x *Supplement* (Invitrogen AG, Carlsbad, Kalifornien, USA)
- 500 µl Penicillin Streptomycin, 5000 *units/ml* Penicillin, 5000 µg/ml Streptomycin (Invitrogen AG, Carlsbad, Kalifornien, USA)
- 125 µl Glutamin 200 mM
- 48,375 ml Neurobasal Tm Medium (Invitrogen AG, Carlsbad, Kalifornien, USA)

Pro MEA wurden ungefähr 1,6 ml Neurobasalmedium verwendet. Nach 6 bis 7 Tagen *in vitro* konnte die Versuchsreihe begonnen werden.

2.5.2 Messung

Das MEA wurde während eines Versuchs durch eine Temperaturkontrolle bei einer Temperatur von 37 °C gehalten. Eine Messung dauerte 2 Minuten.

Mithilfe des MEA konnten Aktionspotenziale unter verschiedenen Bedingungen gemessen werden. Die extrazellulären Potenzialänderungen wurden amplifiziert, gefiltert und durch einen Computer digitalisiert. Mit dem Programm MC Rack wurden die Aufzeichnungen als Impulse dargestellt.

Die Beschaffenheit des digitalisierten Aktionspotentials eines einzelnen Neurons ist während eines Versuchs reproduzierbar und spezifisch für dieses bestimmte Neuron. Sie hängt auch von seiner Lage in Relation zur detektierenden Elektrode ab. Je kleiner der Abstand eines Neurons zur Elektrode, desto besser ist das Signal.

200 ml Hepes-Aufzeichnungslösung

- 1,75 g NaCl 150 mM
- 0,49-0,5 g Hepes Hemisodium Salt 10 mM
- 0,36 g Glukose 10 mM
- 1,5 ml KCl 3,5 mM
- 1,5 ml CaCl 2 mM
- Ampuwa (Wasser für Injektionslösungen)

2.6 Statistische Analyse

Die statistische Analyse der Daten des Gen *arrays*, der PCR und der elektrophysiologischen Untersuchungen wurde mit der Software *GraphPad Prism5* durchgeführt. Die Darstellung der Daten erfolgte durch den Mittelwert \pm

den Standardfehler. Die Daten jeder Gruppe wurden aus Schnitten, die von mindestens vier verschiedenen Tieren stammten, erhoben.

Um die Analyse der Genexpression zu realisieren, wurde eine einfache Varianzanalyse (ANOVA) mit dem Dunnett's Test und dem Mann-Whitney-U-Test durchgeführt.

Die elektrophysiologischen Daten wurden mit dem Abhängigen t-Test und dem Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test für zusammengehörige Paare analysiert.

Um die Verteilung von LTD zu LTP zu ermitteln, wurden der Chi-Quadrat-Test und der Exakte Test nach Fisher herangezogen.

Die statistische Analyse der Ergebnisse der Wirkung von Dexamethason auf die Neurone im Corpus Striatum wurde in Excel mit dem Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test durchgeführt.

Zur Ermittlung der Genexpression von GFAP im Striatum wurden die durchschnittlichen Werte zwischen den unterschiedlichen Altersgruppen mithilfe von Excel statistisch verglichen.

3. ERGEBNISSE

3.1 Histologische Korrelate des Alterungsprozesses und deren molekulare Validierung

Die Genexpression von GFAP wurde mithilfe von fluoreszierendem GFP unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Zur Validierung wurde anschließend zusätzlich der GFAP-mRNA-Gehalt mittels qRT-PCR analysiert.

Die Anzahl der unter dem Lichtmikroskop untersuchten Schnitte wurden mit n (number) angegeben. Von den 12 untersuchten Tieren waren 5 Tiere 18 Monate alt ($n = 47$) und 7 Tiere 2 bis 3 Monate alt ($n = 94$). Die Zählung der GFP-positiven fluoreszierenden Zellen ergab, dass die Zahl GFAP-exprimierender Zellen im Striatum von alten Tieren dreifach höher war als bei jungen Tieren ($7,8 \pm 0,4$ pro Feld bei alten Tieren, $2,7 \pm 0,7$ pro Feld bei jungen Tieren, $p < 0,005$, Mann-Whitney-U-Test) (Abb.9).

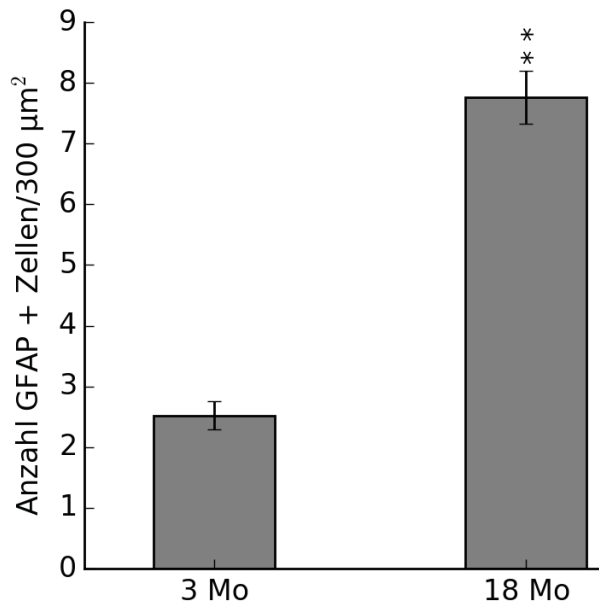


Abb. 9: Anzahl der GFAP+-Zellen: GFAP+-Zellen/300 μm^2 im Corpus Striatum bei alten (18 Monate) und jungen (3 Monate) Tieren

In Abb. 10 werden die fluoreszierenden GFAP-exprimierenden Astrozyten im Corpus Striatum der Maus gezeigt.

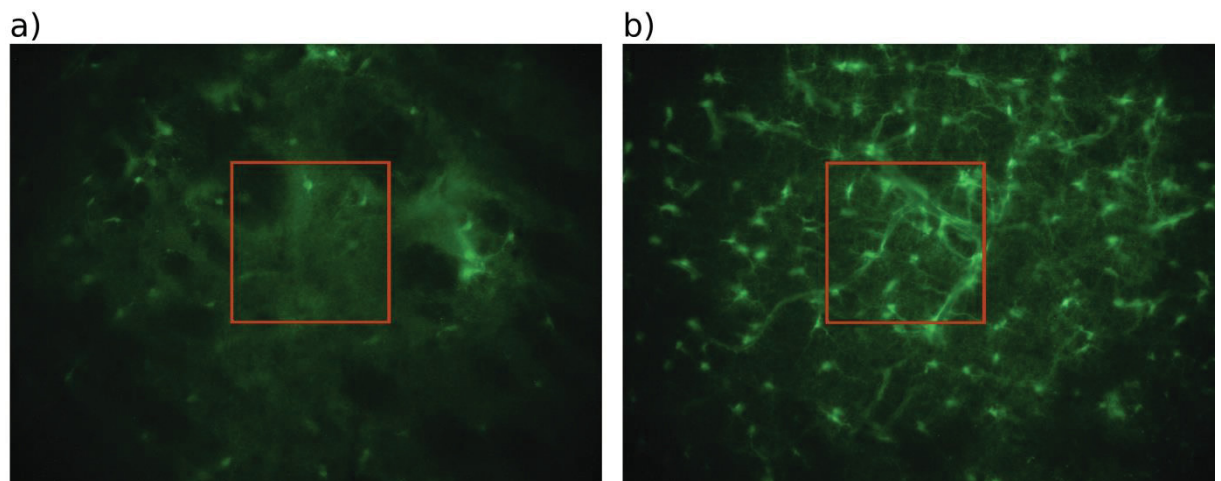


Abb. 10: Fluoreszierende GFAP-exprimierende Astrozyten im Corpus Striatum der Maus. Aufnahme mit Fluoreszenzmikroskop a) 2 Monate alt b) 18 Monate alt. Der rot umrandete Ausschnitt stellt ein Feld von 300 μm^2 dar.

Die vermehrte Genexpression von GFAP wurde zusätzlich mittels qRT-PCR nachgewiesen. Als Referenzgen wurde β -Aktin verwendet. Es wurden Mäuse im Alter von 18 Monaten ($n = 4$), 12 Monaten ($n = 4$), 6 Monaten ($n = 8$) und 3 Monaten ($n = 8$) untersucht. Die Analyse des mRNA-Gehalts ergab eine auf

mehr als das Doppelte gesteigerte Expression von GFAP bei den 18 Monate alten Tieren im Vergleich zu den 3 Monate alten Tieren ($p = < 0,05$, Mann-Whitney-U-Test). In Abb. 11 erkennt man, dass bei 3 Monate alten Mäusen ein geringerer GFAP-Gehalt als bei 6 und 12 Monate alten Mäusen nachgewiesen werden konnte.

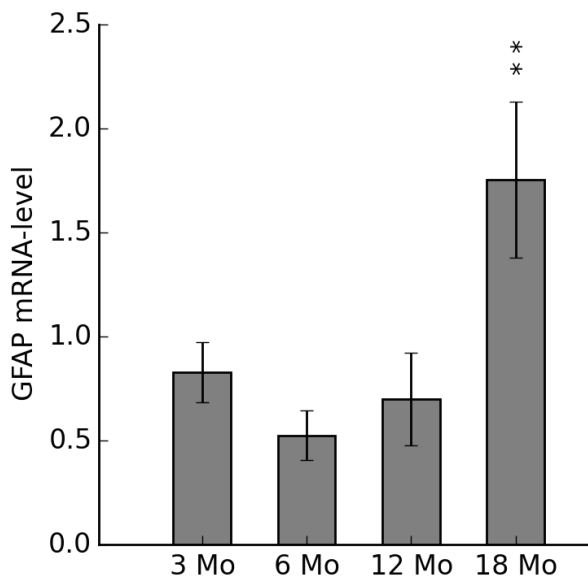


Abb. 11: GFAP mRNA-level im Corpus Striatum von Mäusen in verschiedenen Altersklassen. Bei 18 Monate alten Tieren hat sich der GFAP-Gehalt um mehr als das Doppelte gesteigert im Vergleich zu den 3 Monate alten Tieren. Bei 6 und 12 Monate alten Tieren konnte ein geringerer GFAP-Gehalt als bei 3 Monate alten Tieren nachgewiesen werden.

Weiterhin ergab die qRT-PCR, dass auch andere gliale Marker wie S100 β und IBA1 im Corpus Striatum im Alter erhöht vorlagen. Das mRNA-level von S100 β überschritt bei alten Mäusen deutlich den Wert von jungen Mäusen ($p < 0,01$, junge Tiere $n = 9$, alte Tiere $n = 12$, Mann-Whitney-U-Test). Auch das für Makrophagen und Mikroglia spezifische kalziumbindende Protein IBA1 erwies sich im Alter als signifikant erhöht ($p < 0,05$, junge Tiere $n = 10$, alte Tiere $n = 10$, Mann-Whitney-U-Test).

Der Glutamat-Transporter 1 (GLT-1), die Glutamin-Synthase (GS) und der oligodentroytäre Marker Myelin-assoziiertes Glykoprotein (MAG) zeigte keinen Unterschied in der Expression bei jungen und alten Tieren.

3.2 PCR-array und Validierung durch qRT-PCR

Zur grafischen Veranschaulichung der Ergebnisse des PCR-arrays konnten 31 der 84 Gene ausgewählt und mit dem Analyseprogramm des PAMM-062Z-array in einem Cluster-Diagramm (Abb. 12) dargestellt werden. Die Proben wurden automatisch in zwei unterschiedliche Altersgruppen aufgeteilt (junge Tiere: n = 8, alte Tiere: n = 7). Bestimmte Gene wurden durch Linien auf der linken Seite der Abbildung zu Gruppen verbunden, die als koregulierte Gene angesehen wurden.

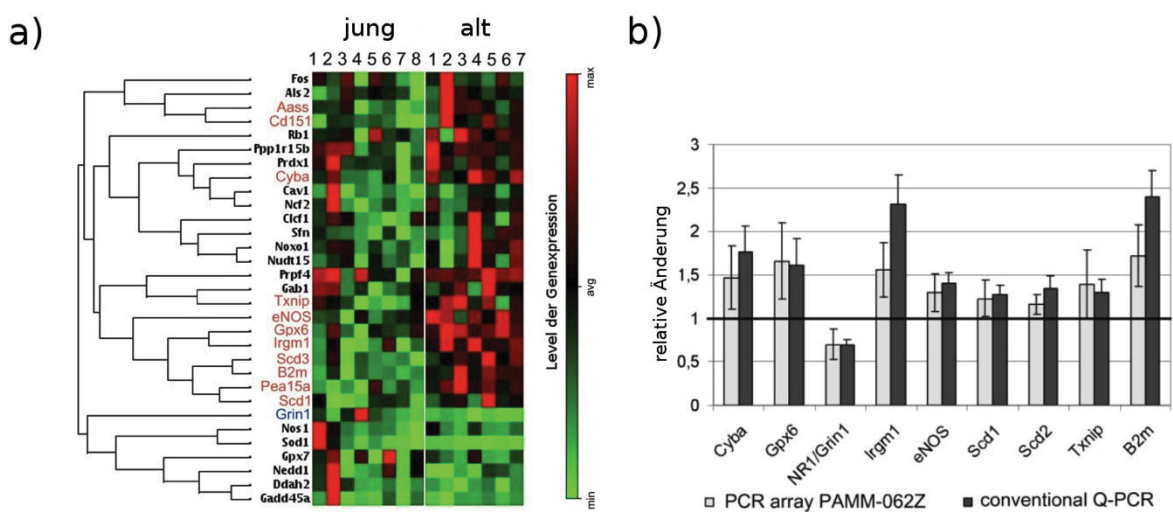


Abb. 12: 12a) Cluster-Diagramm des PCR-arrays PAMM-062Z: Die rot hinterlegten Gene wurden im Alter signifikant hochreguliert und die blau hinterlegten Gene wurden im Alter signifikant weniger exprimiert. 12b) Validierung des PCR-arrays mittels qRT-PCR: In der Validierung mittels qRT-PCR waren eNOS, Txnip, Aass und Pea15 nicht signifikant verändert.

In Abb. 12a wird deutlich, dass Gene wie Txnip, Scd2, Gpx6 und Cyba, die alle bei oxidativem Stress eine Rolle spielen, im Gen-array im Alter signifikant erhöht vorlagen. Zusätzlich erhöht waren Gene wie B2m und Irgm1, die in die Immunantwort involviert sind. Die Untereinheit NR1/Grin1 des NMDA-Rezeptors wurde im Gen-array bei alten Tieren vermindert exprimiert. In Abbildung 12b werden Gene aufgeführt, deren gesteigerte oder verminderte Expression sowohl im PCR-array als auch bei der Validierung des arrays mithilfe von qRT-PCR nachgewiesen werden konnte. Allerdings konnten in der Validierung des arrays keine signifikant veränderten mRNA-Level für eNOS, Txnip, Aass und Pea15a bestätigt werden.

3.2.1 Molekulare Marker für Oxidativen Stress

Die statistische Auswertung der Gene, die mit oxidativem Stress in Verbindung stehen, erfolgte mit der einfachen Varianzanalyse (ANOVA) mithilfe des Dunnett's Test und des Mann-Whitney-U-Test. Zusätzlich zu den erhöhten glialen Markern ließen sich Marker für erhöhten oxidativen Stress nachweisen. Txnip, das die Thiol-Oxidoreduktase Thioredoxin hemmt, konnte im PCR-array signifikant erhöht bei alten Tieren nachgewiesen werden. Bei der Validierung mithilfe von qRT-PCR blieb die Signifikanz aus, allerdings konnte eine Tendenz zu erhöhten Werten im Alter gefunden werden. Cyba, das eine Untereinheit der NAD(P)H-Oxidase darstellt, lag bei alten Tieren (n = 7) im Vergleich zu jungen Tieren (n = 8) signifikant erhöht vor (Abb.13). Die Glutathionperoxidase Gpx6 war ebenfalls bei alten Tieren (n = 8) im Gegensatz zu jungen Tieren (n = 9) signifikant erhöht. Die Stearoyl-CoA-Desaturase Scd2, die sich in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums befindet und eine wichtige Rolle im Fett- und Energiestoffwechsel spielt, zeigte ein signifikant erhöhter mRNA-Level bei alten Tieren (n = 9, junge Tiere n = 8). Abb. 13 gibt einen Überblick über die Gene, die mit oxidativem Stress in Verbindung stehen.

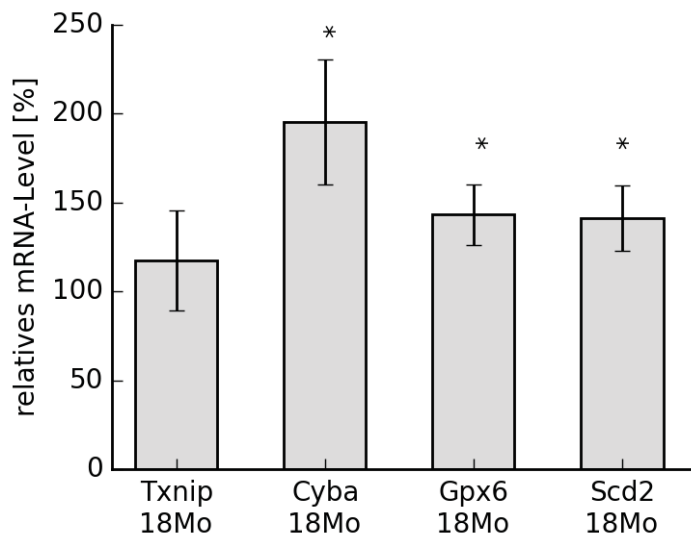


Abb. 13: Überblick über Gene, die in den Redox-Status involviert sind: Die Abbildung zeigt, dass alle der oben aufgeführten Gene im Striatum von alten Mäusen angestiegen sind. Cyba, Gpx6 und Scd2 sind signifikant angestiegen ($p < 0,05$). Die Daten stehen in Relation zu den Daten der jungen Tiere (3 Monate alt), die als 100 % angesehen werden.

3.2.2 Molekulare Marker für immunologische Prozesse und Entzündung

Die statistische Auswertung erfolgte ebenfalls mit der einfachen Varianzanalyse (ANOVA) mithilfe des Dunnett's Test und des Mann-Whitney-U-Test. Irgm1 ist eine mit dem Immunsystem assoziierte GTPase, die die Resistenz des Körpers gegen intrazelluläre Pathogene reguliert. Bei alten Tieren ($n = 9$) im Vergleich zu jungen Tieren ($n = 7$) lag das mRNA-Level von Irgm1 deutlich erhöht ($p < 0,001$) vor.

Auch Lcn2, das von Zellen des ZNS als Antwort auf entzündliche Prozesse, Infektionen oder Verletzungen freigesetzt wird, wies bereits bei Mäusen im mittleren Alter von 12 bis 13 Monaten ($n = 6$) eine signifikante Erhöhung des mRNA-Levels auf ($p < 0,05$) (Abb. 14). Bei alten Tieren (18 Monate, $n = 9$) konnte im Vergleich zu jungen Tieren ($n = 8$) ebenfalls eine signifikante Steigerung der Lcn2-Expression gezeigt werden ($p < 0,01$). Abb. 15 gibt einen Überblick über den Anstieg der Marker für immunologische Prozesse und Entzündung im Alter.

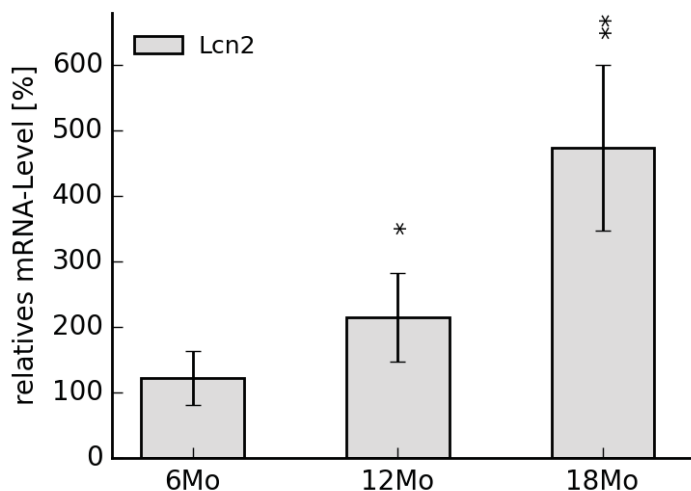


Abb. 14: Anstieg des relativen mRNA-Level von Lcn2: Die Abbildung zeigt, dass der mRNA-Gehalt von Lcn2 mit dem Alter deutlich angestiegen ist. Die Daten stehen in Relation zu den Daten der jungen Tiere (3 Monate alt), die als 100 % angesehen werden.

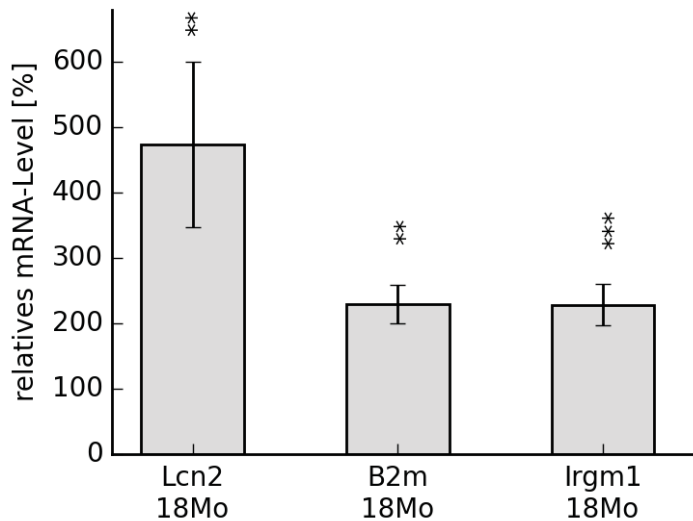


Abb. 15: Überblick über die Marker für immunologische Prozesse und Entzündung: Es wird sichtbar, dass die Marker für immunologische Prozesse und Entzündung im Striatum von alten Mäusen im Vergleich zu jungen Mäusen deutlich angestiegen sind. Die Daten stehen in Relation zu den Daten der jungen Tiere (3 Monate alt), die als 100 % angesehen werden.

3.2.3 Molekulare Korrelate der NO-Signalkaskade

Die Analyse der Rezeptoren und Enzyme, die durch den NO-Signalweg in die synaptische Plastizität des Corpus Striatum involviert sind, erfolgte mittels qRT-PCR. Die statistische Analyse der Daten wurde für alle Werte durch die einfache Varianzanalyse (ANOVA) mithilfe des Dunnett's Test und des Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Es wurde eine Tendenz zu einem niedrigeren mRNA-Level für alle Untereinheiten des NMDA-Rezeptors im Alter aufgezeigt (Abb.16). Eine signifikante Abnahme wurde allerdings nur bei NR1 (Grin1) beobachtet. In der Altersgruppe der 6 Monate alten Tiere wurde bereits eine deutliche Abnahme des mRNA-Levels, das für NR1 (Grin1) kodiert, festgestellt ($p < 0,001$, $n = 7$, junge Tiere $n = 11$). Interessanterweise nahm NR1 (Grin1) am stärksten in der Altersgruppe der 12 Monate alten Tiere ab ($p < 0,001$, $n = 4$, n junge Tiere = 11) und nahm dann in der Altersgruppe der 18 Monate alten Tiere wieder etwas zu. Allerdings zeigte sich im Vergleich zu den jungen Tieren immer noch eine signifikante Abnahme des mRNA-Levels ($p < 0,05$, $n = 4$) (Abb. 16 und Abb. 17).

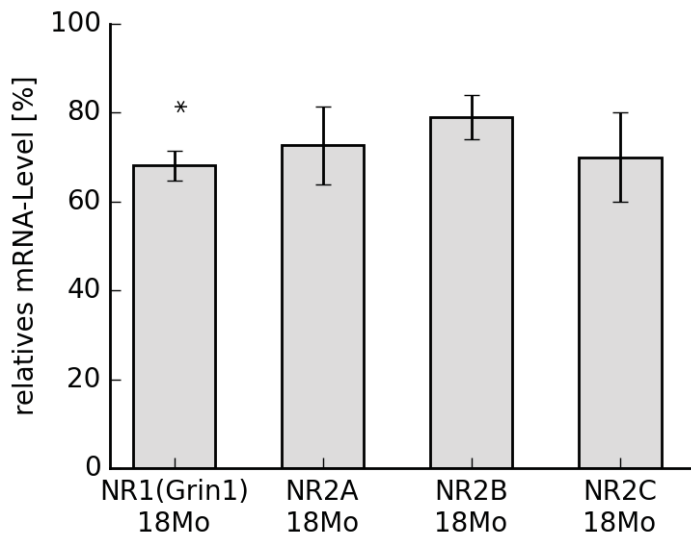


Abb.16: Überblick über die Abnahme des mRNA-Gehalts der Untereinheiten des NMDA-Rezeptors im Striatum: Eine abnehmende Tendenz ist bei allen Untereinheiten zu verzeichnen, allerdings nahm nur NR1 (Grin1) signifikant ab. Die Werte werden in Relation zu den Werten der jungen Tiere (3 Monate alt), die als 100 % angesehen werden, gezeigt.

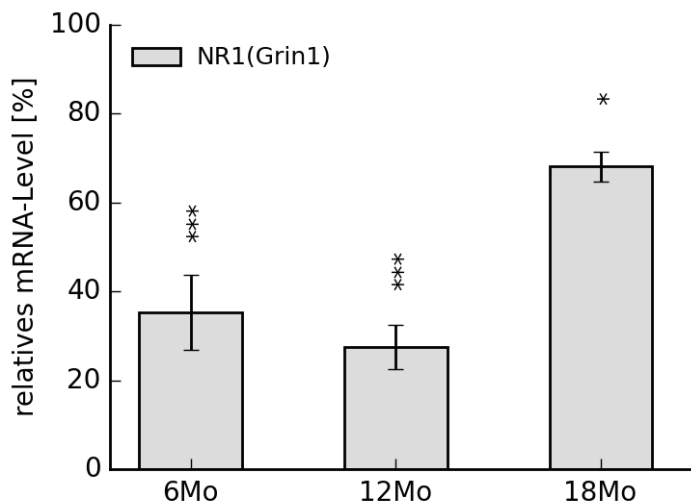


Abb.17: Verlauf des mRNA-Gehalts von NR1 (Grin1): Auffällig ist, dass der mRNA-Gehalt in der mittelalten Altersklasse (6 Monate bis 12 Monate) am stärksten abnimmt und dann wieder etwas ansteigt, aber immer noch signifikant bei den alten Tieren (18 Monate) erniedrigt ist. Die Werte werden in Relation zu den Werten der jungen Tiere (3 Monate alt), die als 100% angesehen werden, gezeigt.

Der D1-Rezeptor stellte sich in der qRT-PCR-Analyse bei alten Tieren signifikant erniedrigt dar ($p < 0,05$, $n = 4$, im Vergleich zu jungen Tiere $n = 8$). Bei dem D2-Rezeptor konnte eine Tendenz zur Abnahme der mRNA-Level von alten Tieren beobachtet werden. Die Werte erreichten jedoch keine Signifikanz.

Bei mGluR1, mGluR5 und CB1R wurden keine signifikanten Veränderungen festgestellt.

Allerdings konnte im Striatum von alten Mäusen eine signifikante Reduzierung der nNO-Synthase ermittelt werden. Bereits im Alter von 12 Monaten war die Abnahme signifikant ($p < 0,05$, $n = 6$, junge Tiere $n = 6$). Bei Mäusen im Alter von 18 Monaten zeigte sich die qRT-PCR-Analyse ebenfalls signifikant ($p < 0,05$, $n = 7$). Im Gegensatz zu den ermittelten Werten für die nNO-Synthase stiegen die Werte für die eNO-Synthase im Alter. Der Anstieg war zwar nicht signifikant, aber eine ansteigende Tendenz war deutlich sichtbar. Folglich wurde im Striatum alter Mäuse entgegengesetzte Veränderungen in der Expression der zwei wichtigsten Enzyme, die für die NO-Synthase zuständig sind, festgestellt.

Zusammenfassend erkennt man in Abb. 18 eine Abnahme des D1-Rezeptors, des NMDA-Rezeptors und der nNO-Synthase. Der D1-Rezeptor und der NMDA-Rezeptor sind die wichtigsten Rezeptoren für die Aktivierung der NO-Synthase durch striatale nitriergende Neurone.

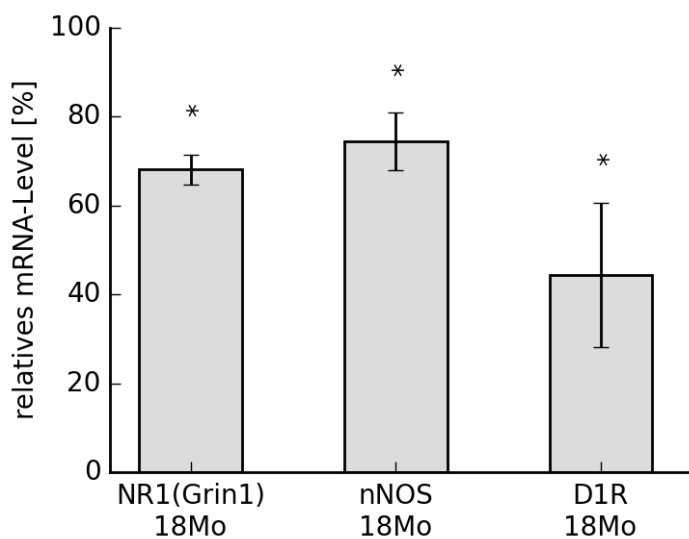


Abb. 18: Signifikante Abnahme von NR1 (Grin1), nNO-Synthase und D1-Rezeptor im Striatum alter Mäuse: Zusätzlich zu der Abnahme der nNO-Synthase nahmen auch der NMDA1-Rezeptor und der D1-Rezeptor ab, die eine wichtige Rolle bei der Aktivierung der NO-Synthase durch striatale nitriergende Neurone spielen. Die Werte werden in Relation zu den Werten der jungen Tiere (3 Monate alt), die als 100 % angesehen werden, gezeigt.

3.3 Wirkung von Dexamethason im Striatum

3.3.1 qRT-PCR

In der qRT-PCR konnte in der Untersuchung von Schnitten des Corpus Striatum nach 2 bis 6 Stunden Inkubation mit Dexamethason eine signifikante Hochregulierung von Lcn2 ($p < 0,05$, $n = 5$) und eine signifikante Abnahme der Expression von nNO-Synthase ($p < 0,05$, $n = 5$) nachgewiesen werden (Abb. 19). Zusätzlich wurde die Expression von GFAP, NR1(Grin1), dem Dopamin-1-Rezeptor und dem Lcn2-Rezeptor 24P3R nach Inkubation mit Dexamethason untersucht. Es zeigte sich allerdings keine signifikante Veränderung.

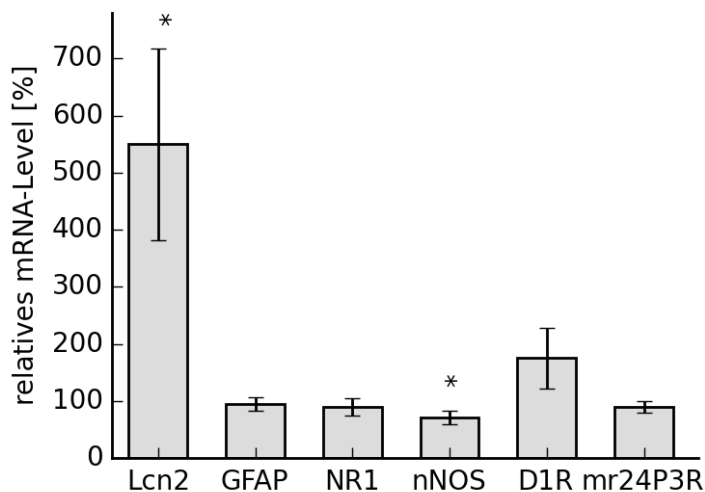


Abb. 19: Wirkung von Dexamethason auf die Genexpression: Nach Inkubation von 2 bis 6 Stunden mit Dexamethason konnte beobachtet werden, dass Lcn2 und nNO-Synthase signifikant verändert vorlagen. Die Daten werden in Relation zu der unbehandelten Kontrolle gezeigt, wobei die Kontrolle als 100 % angesehen wird.

3.3.2 Immunhistochemie zum Nachweis von Lcn2

Nach immunhistochemischer Färbung der horizontalen Hirnschnitte mit dem *goat-anti-mouse-Lcn2*-Antikörper zeigte sich unter dem Konfokalmikroskop nach Inkubation über einen Zeitraum von insgesamt 4 Stunden bei Raumtemperatur kein Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und den mit Dexamethason behandelten Schnitten. S100 β -positive Gliazellen sowie weitere

Zellen, die am wahrscheinlichsten Neurone darstellen, konnten durch immunhistochemische Färbung visualisiert werden (Abb. 20).

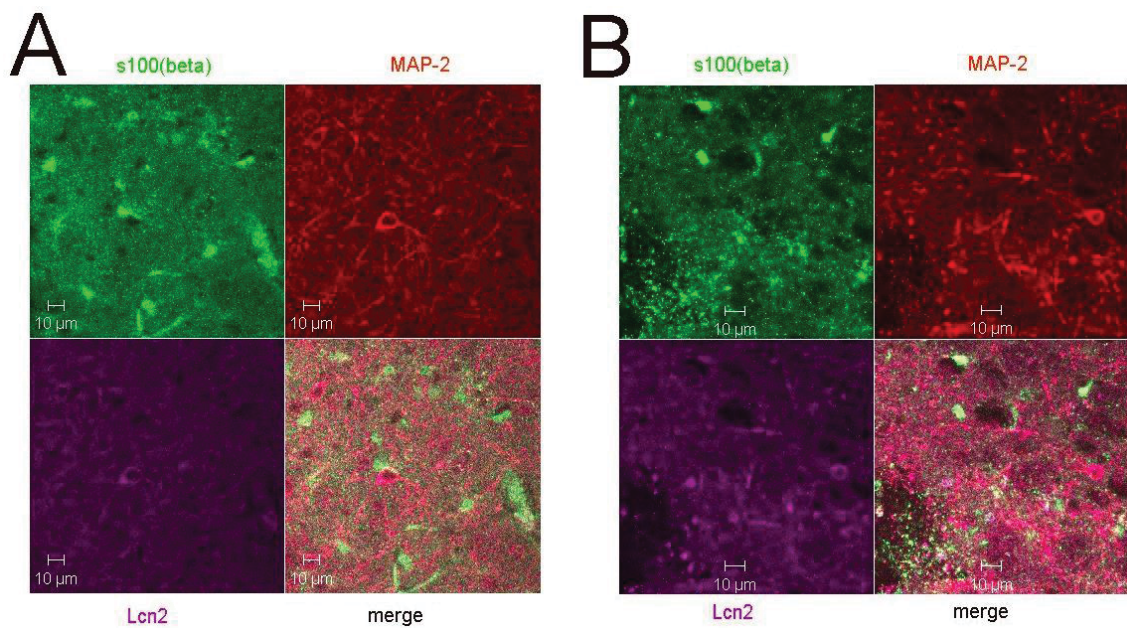


Abb. 20: a) Kontrollgruppe. b) Nach Zugabe von 10 µM Dexamethason. Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen Lcn2-positiven Zellen in der Kontrollgruppe und mit Dexamethason bearbeiteten horizontalen Hirnschnitten. MAP-2 stellt einen neuronalen Marker dar. Lcn2 ist überwiegend mit Neuronal Marker MAP-2 kolokalisiert, die S100(beta)-Färbung macht Gliazellen sichtbar.

3.3.3 Feldpotenzialanalyse

Zur Untersuchung von altersabhängigen Veränderungen der synaptischen Plastizität wurden Feldpotenzialableitungen von Frau Dr. Chepkova durchgeführt. Es wurde der postsynaptisch gemessene N2-Peak (Abb. 21) zur Auswertung verwendet.

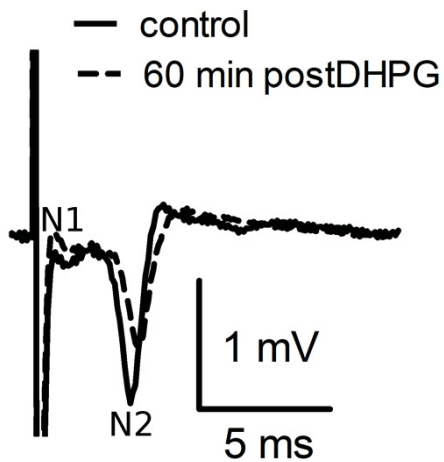


Abb. 21: Darstellung des Feldpotenzials. Zur Analyse des Feldpotenzials wurde der N2-Peak zur Auswertung verwendet.

Die Feldpotenzialanalyse von DHPG-induziertem LTD bei jungen Tieren (2 bis 3 Monate, $n = 6$, Schnitte = 8) und alten Tieren (12 bis 24 Monate, $n = 7$, Schnitte = 8) ergab einen signifikant ($p < 0,001$, abhängiger t-Test) erniedrigten N2-Peak bei den jungen Tieren und somit ein verstärktes LTD (Abb. 22).

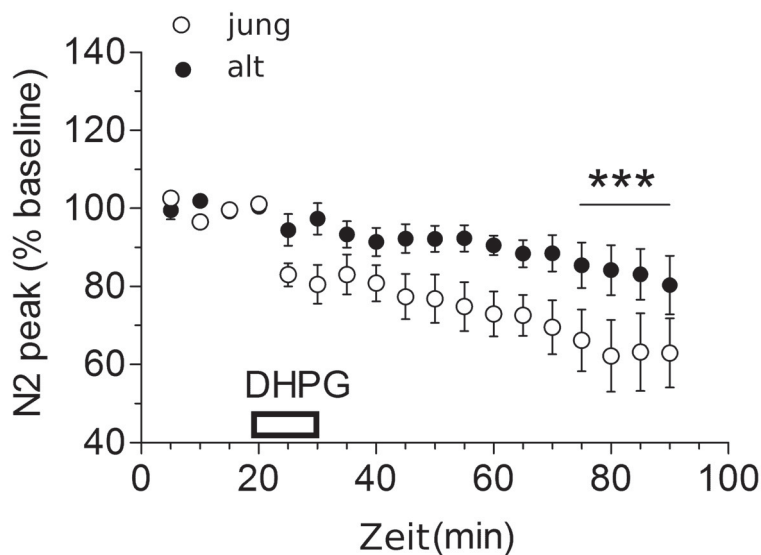


Abb. 22: Vergleich des DHPG-induzierten LTD bei jungen und alten Tieren. Bei jungen Tieren ergab sich ein signifikant erniedrigter N2-Peak und somit ein verstärktes LTD.

Bei der Untersuchung von DHPG-induziertem LTD bei jungen Tieren ($n = 6$, Schnitte = 6) nach einer Inkubation mit Dexamethason von 2 bis 6 Stunden

wurde im Vergleich mit der Kontrollgruppe (n = 5, Schnitte = 5) keine signifikante Veränderung der LTD beobachtet (Abb. 23).

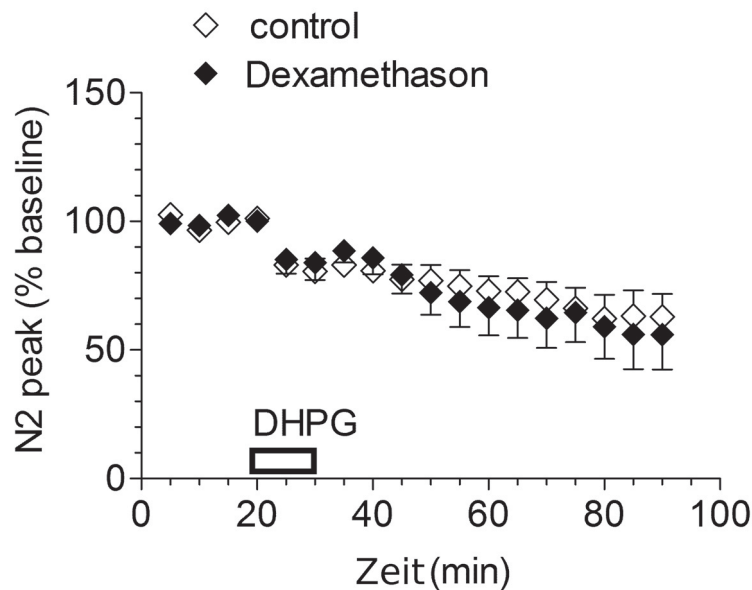


Abb. 23: DHPG-induzierte LTD nach Inkubation mit Dexamethason bei jungen Tieren. Es konnte keine signifikante Veränderung der DHPG-induzierten LTD bei den Schnitten, die mit Dexamethason behandelt wurden, im Vergleich zu den unbehandelten Schnitten festgestellt werden.

3.4 MEA

3.4.1 Messung in Hepeslösung

Die unmittelbare Wirkung von Dexamethason auf die Aktivität der Neurone im Corpus Striatum wurde mithilfe des MEA untersucht. Des Weiteren wurde der Effekt des Glukokortikoid-Rezeptor-Antagonisten Mifepriston auf die Dexamethason-Wirkung evaluiert. Es wurden 11 *in vitro* Kulturen verwendet und 6 verschiedene Parameter pro Messung ermittelt. Bei den Parametern handelte es sich um *spikes/min* (s/m), *bursts/min* (b/m), *interburst-interspike-intervall* (ib ISI) *spikes/burst* (s/b), *burst duration* (bd) und r (ein Maß für synchrone neuronale Entladung). Es wurden insgesamt 13 Experimente durchgeführt. In 6 Experimenten wurde Dexamethason in Anwesenheit von Mifepriston appliziert, in 13 Experimenten wurde ausschließlich die Wirkung von Dexamethason untersucht. Die Messungen fanden zwischen Tag 6 und Tag 42

nach Kultivierung des Zellmaterials statt. Jede Messung dauerte 2 Minuten. Die statistische Auswertung wurde für alle Messungen in Hepeslösung mit dem Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test sowie dem t-Test durchgeführt. In Abb. 24 wird ein exemplarisches Messprotokoll für die Messungen in Hepes mit Dexamethason dargestellt.

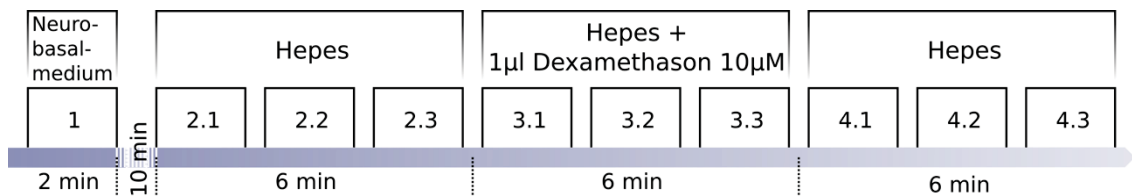


Abb. 24: Messprotokoll der Messungen mit Dexamethason in Hepeslösung

Die Messungen ergaben nach Applikation von Dexamethason eine signifikante Veränderung der Frequenz (*ib ISI*). Nach Zugabe von Dexamethason verringerte sich die *ib ISI* im Durchschnitt auf $41,35 \pm 4,9 \%$ ($p < 0,005$, $n = 13$). Die *burst duration* verringerte sich ebenfalls signifikant. Im Durchschnitt nahm die *burst duration* auf $78,9 \pm 7,0 \%$ ($p < 0,05$, $n = 13$) ab (Abb. 25). Nach Zugabe von Mifepriston sowie Dexamethason nimmt die *burst duration* deutlich zu.

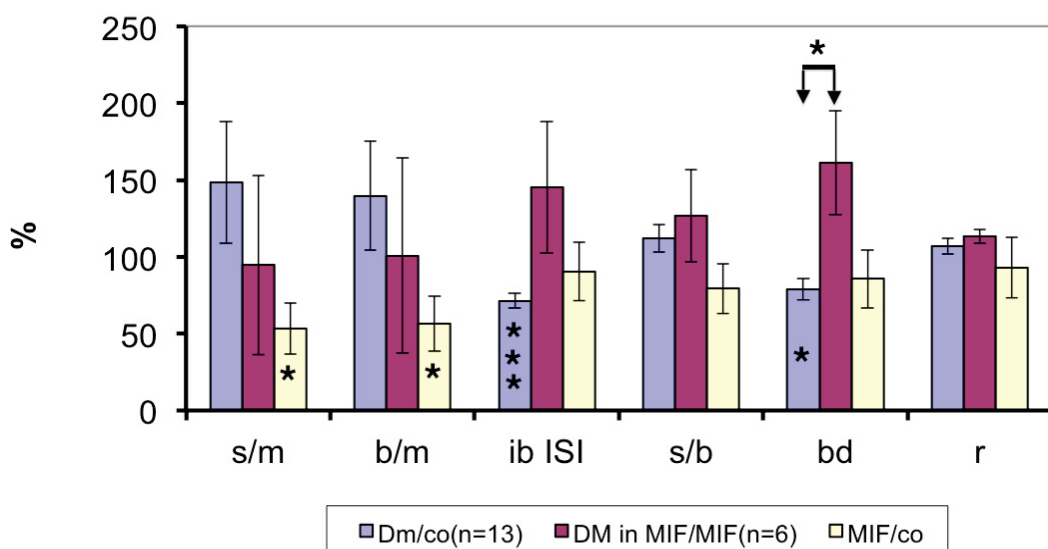


Abb. 25: Aktivitätsänderungen 1. Veränderungen der sechs gemessenen Parameter nach Zugabe von Dexamethason im Vergleich zur Kontrollmessung vor Applikation von Dexamethason, 2. Veränderungen nach Zugabe von Dexamethason zusätzlich zu Mifepriston

im Vergleich zur Messung nur mit Mifepriston, 3. Veränderungen nach Zugabe von Mifepriston im Vergleich zur Kontrollmessung.

Weiterhin verringerten sich die *spikes/min* nach Applikation von Mifepriston signifikant ($53,06 \pm 16,60$, $p < 0,05$, $n = 6$) im Vergleich zur Kontrollmessung. Die *bursts/min* verringerten sich ebenfalls signifikant auf $56,56 \pm 18,06$ ($p < 0,05$, $n = 6$) nach Applikation von Mifepriston im Vergleich zur Kontrollmessung.

Interessant ist, dass es nach Entfernung des Dexamethasons zu einer Erholung der zuvor signifikant verringerten *burst duration* ($86 \pm 9,70$ %, $p = 0,19$, $n = 13$) kommt. Die Frequenz (ib ISI) zeigt ebenfalls eine deutliche Zunahme nach Entfernung von Dexamethason und liegt im Vergleich zur Kontrollmessung 1 immer noch signifikant verändert vor ($79,01 \pm 7,97$ %, $p = 0,02$, $n = 13$). Dies zeigt Abb. 26.

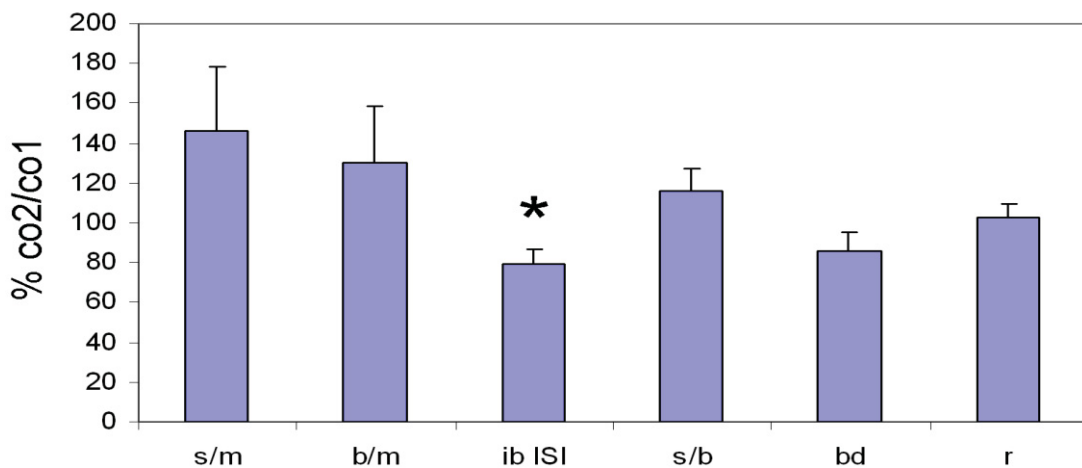


Abb. 26: Aktivitätsänderungen in der Kontrollmessung 2 nach Entfernung von Dexamethason im Vergleich zu Kontrollmessung 1: Es wird eine Tendenz zur Erholung, der zuvor signifikant veränderten Parameter (Frequenz/ib ISI und burst duration), beobachtet.

Im Ausschnitt eines Spikemusters (Abb. 27) erkennt man deutlich, dass sich die *burst duration* nach Zugabe von Dexamethason verkürzte und nach Entfernung von Dexamethason wieder zunimmt.

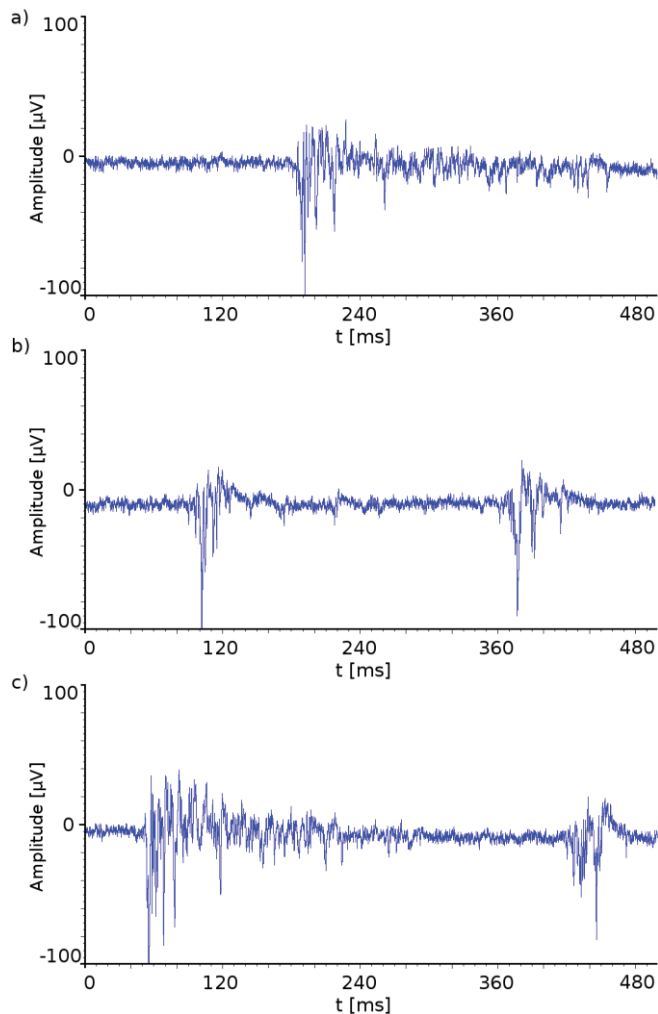


Abb. 27: Ausschnitt des Spikemusters aus Kanal 72, MEA 20290. 25a) Hepeslösung vor Applikation von Dexamethason 25b) Hepeslösung + Dexamethason 10 μ M 25c) Hepeslösung nach Applikation von Dexamethason

3.4.2 Messungen in Neurobasalmedium

In einer zweiten Versuchsreihe zur Bestimmung der Dexamethasonwirkung auf die Neuronenaktivität im Corpus Striatum wurden erneut die bereits oben aufgeführten sechs Parameter untersucht. Allerdings wurde statt Hepeslösung Neurobasalmedium für die Messungen verwendet. Außerdem wurden Änderungen der Aktivität nach 2 Stunden Inkubation mit Dexamethason betrachtet. Es wurden 7 Kulturen nach einer Kultivierungsphase von 6 bis 20 Tagen untersucht. Jede Messung dauerte 120 Sekunden. Die statistische Auswertung der Signifikanz wurde für alle Messungen in Neurobasalmedium

mit dem t-Test und dem Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test durchgeführt. Folgendes Messprotokoll wurde verwendet (Abb. 28).

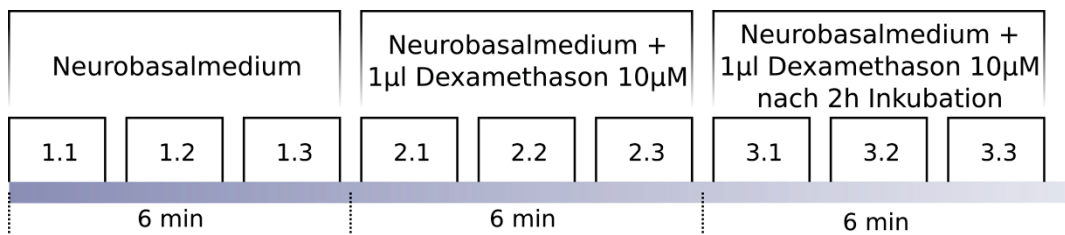


Abb. 28: Messprotokoll der Messungen in Neurobasalmedium

Die Effekte von Dexamethason nach 2 Stunden Inkubation (Messung 3) zeigten, dass die *spikes/min* verglichen mit der ersten Messung im Medium (Messung 1) um $41.7 \pm 19,4 \%$ ($p < 0.05$, $n = 7$) gestiegen waren (Abb. 29 a). Weiterhin nahm die *burst duration* auf $67,48 \pm 16,1 \%$ ($p < 0,05$, $n = 7$) ab. Vergleicht man Abb. 29b mit Abb. 29c erkennt man die Zunahme der *spikes/min* nach Inkubation mit Dexamethason.

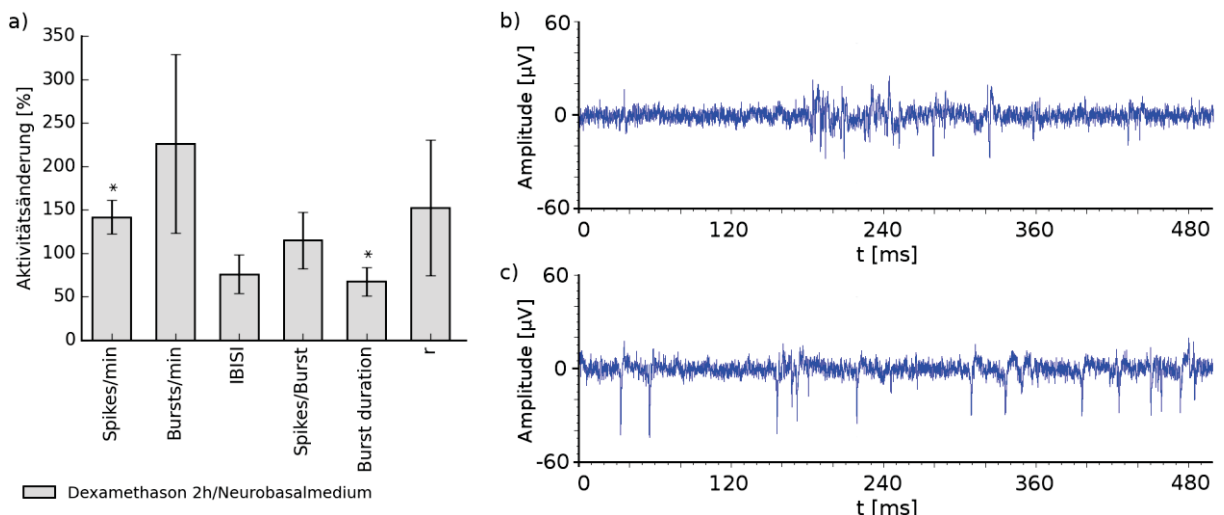


Abb. 29: Vergleich von Messung 3 mit Messung 1 a) Aktivitätsänderung der Neurone im Corpus Striatum nach 2h Inkubation von Dexamethason im Neurobasalmedium im Vergleich zur Kontrollmessung vor Applikation von Dexamethason. b) Messung 1 in Neurobasalmedium Kanal 22, Kultur 20290, c) Messung 3 nach 2 Stunden Inkubation mit Dexamethason, Kanal 22, Kultur 20290.

Weiterhin wurde die Akutwirkung von Dexamethason im Neurobasalmedium mit den Veränderungen nach 2 Stunden Inkubation mit Dexamethason verglichen. Ein Parameter war signifikant verändert. Die *spikes/min* stiegen auf $180.7 \pm 32,7 \%$ ($p < 0.05$, $n = 7$). Vergleicht man Abb. 30b mit 30c, erkennt man die Zunahme der *spikes/min* deutlich.

In Abb. 31 erkennt man die stetige Zunahme der *spikes/min* von Messung 1 bis Messung 3.

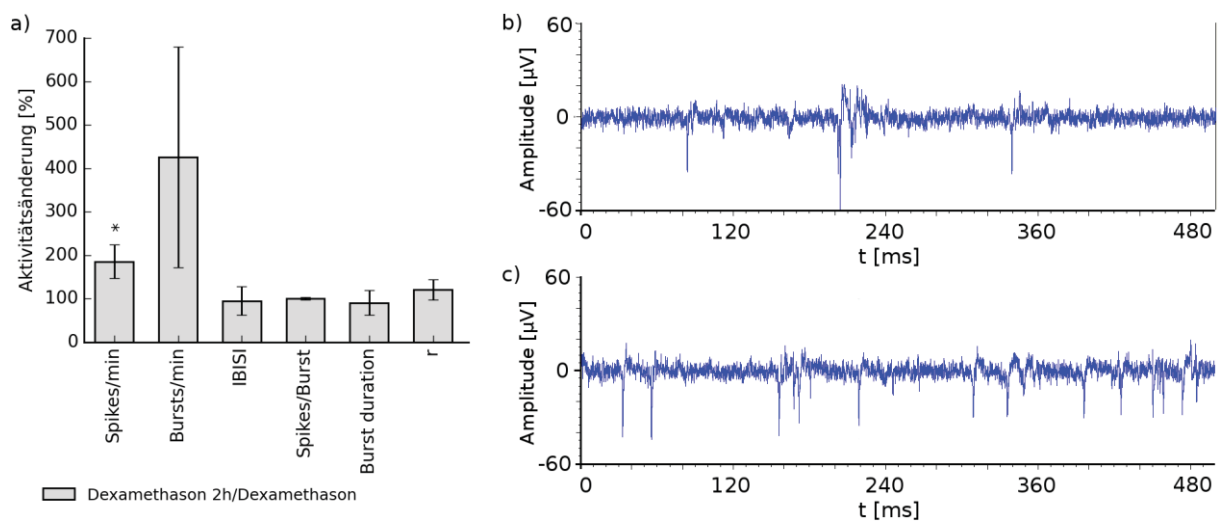


Abb. 30: Vergleich von Messung 3 mit Messung 2 a) Aktivitätsänderung der Neurone im Corpus Striatum nach 2 Stunden Inkubation von Dexamethason im Neurobasalmedium (Messung 3) im Vergleich zu Messung 2 unmittelbar nach Zugabe von Dexamethason in Neurobasalmedium. b) Messung 2: Dexamethason in Neurobasalmedium Kanal 22, Kultur 20290, c) Messung 3 nach 2 Stunden Inkubation von Dexamethason, Kanal 22, Kultur 20290.

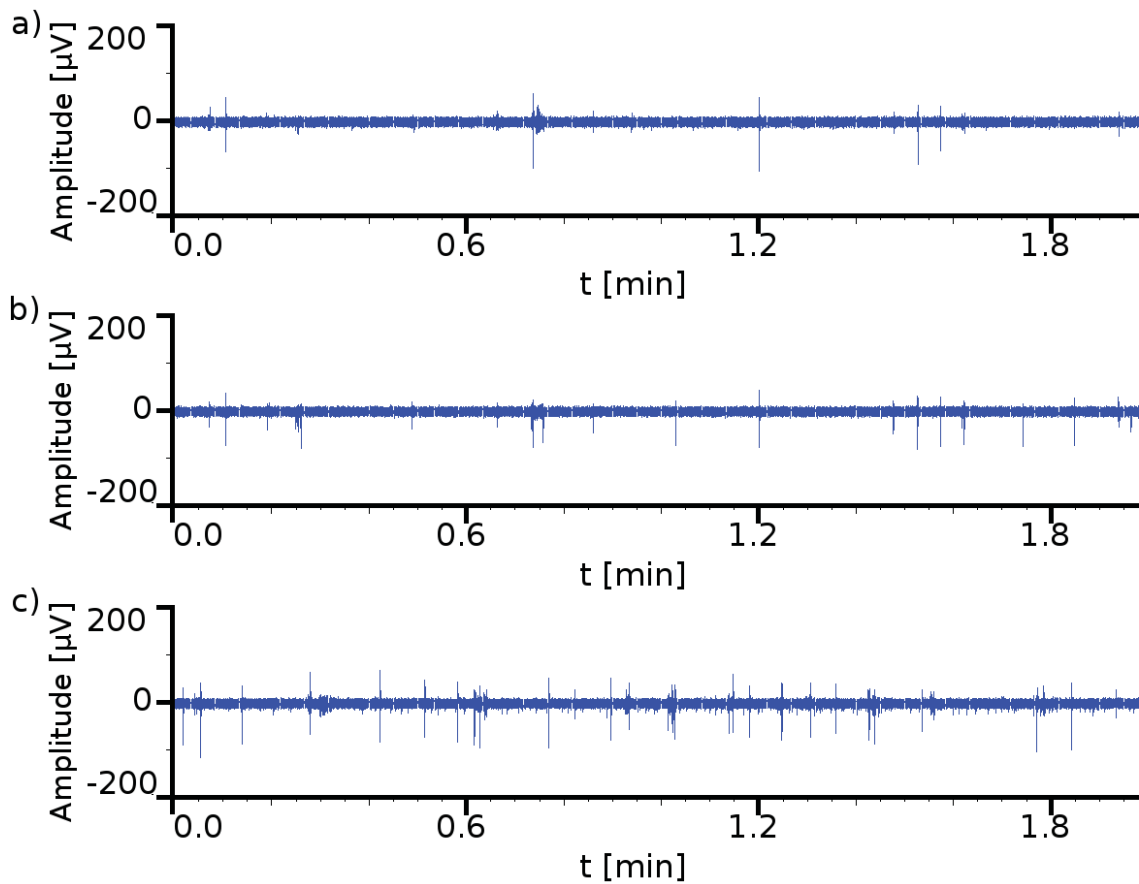


Abb. 31: Ausschnitt des Spikemusters aus Kanal 22, Kultur 20290 a) Neurobasalmedium vor Applikation von Dexamethason (Messung 1); b) Neurobasalmedium unmittelbar nach Applikation von Dexamethason (Messung 2); c) Neurobasalmedium nach 2 Stunden Inkubation mit Dexamethason (Messung 3).

4. DISKUSSION

Diese Studie zeigt, dass die Expression von glialen Markern (GFAP, IBA-1, S100 β) altersabhängig im dorsalen Striatum der Maus ansteigt. Zusätzlich ist ein Anstieg der Gene, die den Immunstatus (Lcn2, B2m, Irgm1) und den Redoxstatus (Txnip, Cyba, Gpx6, Scd2) regulieren, durch den Alterungsprozess zu beobachten. Weiterhin wird festgestellt, dass die Expression von Genen, die in die NO-abhängige synaptische Plastizität (NR1, nNOS, D1R) involviert sind, abnimmt.

Nach 2- bis 6-stündiger Inkubation mit Dexamethason wird Lcn2 im dorsalen Striatum der Maus hochreguliert. Die nNO-Synthase wird nach Inkubation mit Dexamethason weniger exprimiert. Diese Änderungen der Genexpression weisen eine Ähnlichkeit mit physiologischen Alterungsprozessen auf. Allerdings

zeigen elektrophysiologische Untersuchungen keine für das Alter relevanten Änderungen auf synaptischer Ebene. Nach Inkubation mit Dexamethason findet keine signifikante Abnahme der DHPG-induzierten LTD statt.

In der MEA-Versuchsreihe zeigt sich, dass Dexamethason eine unmittelbare Wirkung auf die Aktivität der Neurone im Striatum hat. Zusammenfassend gilt, dass sowohl bei den Messungen in Hepeslösung als auch in Neurobasalmedium die Aktivität der Neuronen nach Zugabe von Dexamethason tendenziell zunimmt. Experimente mit Mifepriston zeigen, dass die Interaktion mit dem Glukokortikoid-Rezeptor den Mechanismus für diese Wirkung darstellt. Ein Vergleich zwischen Hirnschnitt- und Kulturelektrophysiologie ergab prinzipielle Unterschiede: An der kortikostriatalen Synapse spielt der Glukokortikoid-Rezeptor keine signifikante Rolle (Dexamethason hat keinen Einfluss auf evozierte Feldpotenziale oder LTD-DHPG), während an der striatalen/pallidalen Primärkultur durch Dexamethason die spontane Entladungsfrequenz erhöht wird.

4.1 Histologische Korrelate des Alterungsprozesses

Im Alter steigt die Astrozytenzahl und somit auch die Expression glialer Marker wie GFAP bei Nagetieren stark an (Cevenini et al., 2010; Linnemann & Skarsfelt 1994; Nichols et al., 1993). Dies wurde bereits in zahlreichen Studien beschrieben und deckt sich mit den Ergebnissen dieser Studie. Die Zahl der GFAP-exprimierenden Zellen im Striatum von alten Mäusen war in der Auszählung der fluoreszierenden Zellen signifikant erhöht. Der GFAP-mRNA-Level von 18 Monate alten Tieren war im Vergleich zu dem GFAP-m-RNA-Level von 3 Monate alten Tieren ebenfalls signifikant erhöht. Es stellt sich die Frage, ob, und wenn ja, inwieweit die an Nagetieren erhobenen Daten auf den menschlichen Organismus übertragbar sind. Histologisch betrachtet präsentiert sich die Morphologie der protoplasmatischen Astrozyten der grauen Substanz bei Menschen, Ratten, Mäusen und Makaken mit runden Somata und vielen dünnen sternförmig angeordneten Ausläufern sehr ähnlich. Die Morphologie der Astrozyten bei Menschen mit Morbus Parkinson und mit 1(Methyl)-4(Phenyl)-1,2,3,6-Tetrahydropyridin (MPTP) behandelten Makaken zeichnet sich im Gegensatz zu mit 6-Hydroxydopamin (6-OHDA) behandelten Ratten durch

deutlich längere Fortsätze mit komplexerer Verzweigung aus. Mit MPTP und 6-OHDA wird durch Zerstörung von dopaminergen Neuronen in der Substantia nigra ein experimenteller parkinsonoider Zustand erreicht. Das Soma vergrößert sich bei allen Spezies, die Ausläufer hypertrophieren und die Astrozytenzahl nimmt zu (Charron et al., 2014). Diese Veränderungen sind Indizien für reaktive Astrogliose und stehen in Zusammenhang mit immunologischen Prozessen, die zu Neurodegeneration führen. Die Korrelation von Alter und Ausprägung neurodegenerativer Erkrankungen wie zum Beispiel Morbus Parkinson und Morbus Alzheimer deutet darauf hin, dass der natürliche Alterungsprozess und pathologische neurodegenerative Veränderungen einen ähnlichen Pathomechanismus aufweisen (Yap et al., 2009). Charron et al. zeigen in ihrer Studie, dass die Astrozytenzahl in post mortem entnommenen humanem Gewebe des Striatum und des Putamen von Patienten mit Parkinson ansteigt, allerdings nicht signifikant. Dabei muss beachtet werden, dass dies unter Umständen auf die Qualität der Schnitte, den Abstand zum Todeszeitpunkt sowie die chronische polymedikamentöse Behandlung zurückzuführen ist. Insgesamt ist die ungeprüfte Anwendung von Ergebnissen aus Studien mit Nagetieren auf den menschlichen Organismus als kritisch zu bewerten. Die Steigerung der Astrozytenzahl, im Sinne einer erhöhten Genexpression von GFAP, konnte auch bei gealterten Patienten, ohne klinische Hinweise auf eine neurodegenerative Erkrankung, bei der Untersuchung von Gehirnschnitten post mortem nachgewiesen werden (Pardo et al., 2013).

Pathologisch veränderte Astrozyten führen, gemäß deren Funktion unter physiologischen Umständen wie in Kapitel 1.4 beschrieben, unter anderem zu einem gestörten Metabolismus sowie einer gestörten Freisetzung von Neurotransmittern, einer gestörten Ionen- sowie Wasserhomöostase, gesteigertem oxidativem Stress, gesteigerter Produktion von Entzündungsmediatoren, Störung der Blut-Hirn-Schranke und beeinträchtigter Zellkommunikation (Ferrer, 2017; Pekny et al., 2016). Als aktivierte Astrozyten zeigen sie zwei funktional gegensätzliche Phänotypen auf. Einer dieser Phänotypen setzt antiinflammatorisch wirkende Zytokine und Chemokine frei und fördert neuronales und gliales Überleben. Der andere Phänotyp hingegen setzt proinflammatorische Botenstoffe frei und fördert neurotoxische und neurodegenerative Prozesse (John et al., 2003; Lee et al., 2015).

Reaktive Astrozyten können also den Zustand des Alterns beziehungsweise einer neurodegenerativen Erkrankung sowohl verbessern als auch verschlechtern. Der Regulationsmechanismus der Ausprägung oder Polarisierung der unterschiedlichen Phänotypen ist nicht hinreichend geklärt. Studien weisen darauf hin, dass Lcn2 eine entscheidende Rolle in der Ausprägung dieser beiden Phänotypen spielen könnte, da es den proinflammatorischen Weg fördert und den antiinflammatorischen Weg hemmt (Jang et al., 2013; Jha et al., 2015). Lcn2 wies in unserer Studie bereits bei Mäusen im mittleren Alter einen signifikant erhöhten Anstieg des mRNA-Levels auf und stieg bei alten Mäusen weiter an. Außerdem nimmt die Lcn2-Expression unter Zugabe von reaktiven Sauerstoffspezies wie H₂O₂ zu. Aus diesem Grund wird Lcn2 als Marker für entzündliche Prozesse und oxidativen Stress vorgeschlagen (Roudkenar et al., 2007).

Im ZNS wird Lcn2 von reaktiven Astrozyten, aktivierter Mikroglia, Endothelzellen und Neuronen als Antwort auf entzündliche Prozesse, Infektionen oder Verletzungen freigesetzt (Jha et al., 2015).

In der qRT-PCR haben wir zusätzlich zur Steigerung der Astrozytenzahl die signifikante Erhöhung der glialen Marker IBA-1 und S100 β nachgewiesen. IBA-1 ist ein kalziumbindendes Protein und wird als Marker für Mikroglia verwendet. Es ist spezifisch für Mikroglia und wird sowohl von aktivierter als auch von inaktivierter Mikroglia exprimiert (Calcia et al., 2016). Der Anstieg von IBA-1 im Alter wurde bereits im Hippocampus von Mäusen beschrieben (Sandhir et al., 2008), was das Ergebnis dieser Studie stützt. Die Mikroglia ist durch ein entzündliches Milieu an der Entstehung von Glianarben beteiligt und fördert durch Ausschüttung von Interleukin-1 die Proliferation von Astrozyten (Cotrina & Nedergaard, 2002). Diese im normal alternden Gehirn beschriebenen Veränderungen, wie Steigerung der Astrozytenzahl und Ausbildung von Glianarben, ähneln einem frühen Stadium von Astroglie, allerdings ohne erkennbares pathologisches Korrelat (Cotrina & Nedergaard, 2002).

Astroglie kommt bei vielen neurodegenerativen Erkrankungen wie Multiple Sklerose, Alzheimer, Korsakoff-Syndrom und Parkinson vor. Im Rahmen der Astroglie kommt es durch den Verlust von Neuronen zur Aktivierung von Astrozyten, die in den frei gewordenen Raum proliferieren und Glianarben bilden.

Das kalzium- und zinkbindende Protein S100 β stellt einen Marker für aktivierte Astrozyten dar. Eine erhöhte Expression im Alter und nach Verletzungen wurde ebenfalls im Hippocampus von Mäusen nachgewiesen (Sandhir et al., 2008). Dieses Ergebnis deckt sich mit dem Ergebnis unserer Studie und weist auf eine Hochregulierung von S100 β im Alter und bei pathologischen Veränderungen hin. In geringen Konzentrationen hat S100 β einen positiven Effekt auf das ZNS, indem es unter anderem die Proliferation von Nerven bewirkt, in höheren Konzentrationen fördert S100 β allerdings Neuroinflammation, Apoptose und abnorme Nervenproliferation (Cirillo et al., 2015; Hov et al., 2017; Reeves et al., 1994). Das humane S100 β -Gen liegt am distalen Ende des Chromosoms 21 und ist folglich bei Menschen mit Down Syndrom dreifach im Erbgut vorhanden (Reeves et al., 1994). Zusätzlich konnten erhöhte Expressionen von S100 β bei Menschen mit Morbus Alzheimer nachgewiesen werden (Sheng et al., 1994). Diese beiden Beobachtungen wurden bereits miteinander in Verbindung gebracht, da Menschen mit Down Syndrom in einem jungen Alter eine Art von Demenz entwickeln können, die der Alzheimer Demenz ähnelt. In einer 2015 erschienenen Studie wurde S100 β als Ziel für die medikamentöse Behandlung von Alzheimer untersucht. Dazu wurde der S100 β -Blocker Pentamidin eingesetzt. Pentamidin blockiert die Interaktion von S100 β mit dem Tumorsuppressorgen 53 und verhindert so die Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen und die Aktivierung von iNOS (Cirillo et al., 2015). Weiterhin wurde S100 β kürzlich als Biomarker für die Alzheimer Demenz sowie des akut auftretenden Delirs durch Nachweis im Liquor diskutiert (Hov et al., 2017).

4.2 Molekulare Korrelate des Alterungsprozesses

4.2.1 Marker für oxidativen Stress

Es gibt zahlreiche Hinweise darauf, dass ansteigender oxidativer Stress im Laufe des Lebens ein zentraler Mechanismus des Alterns ist (Muller et al., 2007). Dabei kommt es sowohl zur Hochregulierung von Genen, die oxidativen Stress vermitteln, als auch zur Hochregulierung von Genen, die für die

Reparatur von DNA-Abschnitten zuständig sind und antioxidante Wirkung haben (Bishop et al., 2010).

Diese Studie zeigt, dass im Alter eine deutliche Hochregulierung von Genen, die mit oxidativem Stress in Verbindung stehen, beobachtet werden kann. Dazu gehören Gene, die mit der Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (Cyba) assoziiert werden, die antioxidante Funktion (Gpx6) übernehmen, die das Redox-Gleichgewicht regulieren (Txnip) und mit der Lipidmembransensitivität gegenüber Oxidation (Scd2) in Zusammenhang stehen. Diese Ergebnisse stimmen mit den Ergebnissen aus anderen Studien überein (Andrade et al., 2012; Avogaro et al., 2003; Tadros et al., 2014; Tanaka et al., 2012).

Cyba oder phox²² gehört zu einer der membrangebundenen Untereinheiten der NAD(P)H-Oxidase (Babior, 2004). Im Körper kommt die NAD(P)H-Oxidase zum Beispiel in professionellen Phagozyten wie Neutrophilen, Eosinophilen, Monozyten und Makrophagen zur Abwehr von körperfremdem Material vor (Babior, 2004). Im Alter ist Cyba ein Marker für oxidativen Stress und stellt nach dem Mitochondrium eine wichtige intrazelluläre Quelle für Reaktive Sauerstoffspezies dar (Babior, 2004; Dikalov, 2011). Das Zusammenspiel von hochreguliertem Cyba und somit vermehrter NAD(P)H-Oxidase-Aktivität und mitochondrialer Dysfunktion führt zu einer stark gesteigerten Konzentration an Reaktiven Sauerstoffspezies. Außerdem gibt es Hinweise, dass sich diese beiden Hauptquellen für die intrazellulären Reaktiven Sauerstoffspezies unter bestimmten Umständen zusätzlich gegenseitig stimulieren und es zu einer Art Teufelskreis mit immer höher gesteigerter Bildung von Reaktiven Sauerstoffspezies kommt (Dikalov, 2011). Zusätzlich zur Hochregulierung von NAD(P)H-Oxidase im Alter konnte dasselbe Phänomen bei verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen bereits beobachtet werden. Bei Alzheimer wurde über vermehrte NAD(P)H-Oxidase-Aktivität der Mikroglia, die vor allem aus Immunzellen besteht und im erkrankten Hirn für die Entstehung einer entzündlichen Umgebung verantwortlich ist, berichtet (Wilkinson & Landreth, 2006). Auch bei kardiovaskulären Erkrankungen und Tumorleiden scheint eine gesteigerte NAD(P)H-Aktivität eine Rolle zu spielen (Lassègue et al., 2012; Morré & Morré, 2003).

Gpx6 gehört zu der Familie der Glutathionperoxidasen, die glutathionabhängig

die Reduktion von Peroxiden und Wasserstoffperoxiden katalysieren und eines der wichtigsten Redox-Systeme des Körpers bilden (Tadros et al., 2014). Über Gpx6 selbst ist wenig bekannt, allerdings wurde über eine signifikante altersbedingte Hochregulierung in der Cochlea von Ratten und Mäusen berichtet (Tadros et al., 2014). Da die Glutathionperoxidasen durch Reduktion von Reaktiven Sauerstoffspezies dem oxidativen Stress entgegenwirken, wird angenommen, dass die Hochregulierung in der Cochlea dem altersabhängigen Hörverlust vermindern soll. Die Hochregulierung von Gpx6 im Striatum von alten Mäusen kann auf einen kompensatorischen Prozess hinweisen um dem Alterungsprozess entgegenzuwirken.

Die Stearoyl-CoA-Desaturase 2 (Scd2) ist ein Enzym, dessen Genexpression bisher vor allem im peripheren und zentralen Nervensystem von Nagetieren beobachtet werden konnte (Lengi & Corl, 2012). Dieses Enzym scheint spezifisch für Nagetiere zu sein und konnte bisher im menschlichen Genom nicht nachgewiesen werden (Lengi & Corl, 2012). Allerdings wurde bereits von zwei Isoformen des Enzyms Scd2 beim Menschen berichtet. Die Existenz von Scd1 konnte vornehmlich in Fettgewebe aufgezeigt werden und Scd5 wurde im Gehirn und im Pankreas nachgewiesen (Castro et al., 2011). Scd2 katalysiert die Bildung von einfach ungesättigten Fettsäuren aus gesättigten Fettsäuren (Lengi & Corl, 2012). Diese Reaktion weist als Ergebnis zum Beispiel Palmitoyl-CoA und Oleoyl-CoA auf. Oleat ist ein wichtiger Bestandteil des Myelin und die Synthese durch Scd2 spielt wahrscheinlich eine wichtige Rolle im gesunden Hirn und in der Entwicklung von Myelin (Garbay et al., 1998). Mehrfach ungesättigte Fettsäuren sind oxidativem Stress gegenüber viel vulnerabler als gesättigte Fettsäuren, wobei einfach ungesättigte Fettsäuren und gesättigte Fettsäuren durch oxidativen Stress nahezu ungefährdet sind (Arranz et al., 2013). Demnach würden durch eine Hochregulierung von Scd2 die Lipidmembranen nicht anfälliger für Schädigung durch oxidativen Stress werden. In Bezug auf die Studie von Garbay et al. (1998) könnte die vermehrte Bildung von Oleat als kompensatorischer Prozess zur Stärkung des Myelins im Alter verstanden werden. Eine kürzlich erschienene Studie betrachtet den Metabolismus von Sphingolipiden im Hippocampus von jungen und alten Mäusen und bestätigt eine Hochregulierung von Scd2 im Alter. Allerdings wird postuliert, dass die einfach ungesättigten Fettsäuren, die durch die

Hochregulierung von Scd2 entstehen, durch den Alterungsprozess deutlich betroffen sind und eventuell mit der kognitiven Beeinträchtigung im Alter in Verbindung gebracht werden sollten. (Vozella et al., 2017)

Txnip (*thioredoxin-interacting protein*) ist ein Protein, das die Thiol-Oxidoreduktase Thioredoxin an sich bindet und dadurch hemmt (Junn et al., 2000). Thioredoxin fängt freie Radikale ab und wirkt oxidativem Stress entgegen. Durch die Hemmung von Thioredoxin fördert Txnip also oxidativen Stress (Chen et al., 2010). Txnip wurde in der Validierung durch qRT-PCR im Gegensatz zu den Ergebnissen des *arrays* als nicht signifikant erhöht nachgewiesen. Allerdings konnte trotzdem eine Erhöhung des mRNA-Levels festgestellt werden. Die Erhöhung von Txnip weist auf ein entzündliches Milieu, das den Alterungsprozess fördert, hin. Dieser Zusammenhang wird durch eine 2015 veröffentlichte Studie, die über eine Erhöhung von Txnip bei zentraler Presbyakusis im auditorischen Kortex von alten Ratten berichtet, gestützt (Sun et al., 2015).

Es wäre sehr interessant zu beobachten, ob sich die gesteigerte Genexpression dieser Gene durch vermehrte Aufnahme von Antioxidantien und kalorischer Restriktion manipulieren lassen würde und so den Alterungsprozess verändern könnte. Die veränderte Expression bestimmter altersfördernder Gene der Maus und die Reduktion der abnehmenden Kognition durch Aufnahme von Antioxidantien konnte bereits in einigen Studien nachgewiesen werden (Bishop et al., 2010; Park et al., 2009)

4.2.2 Marker für immunologische und entzündliche Prozesse

Sowohl der physiologische Alterungsprozess als auch neurodegenerative Prozesse im Rahmen von Erkrankungen wie Alzheimer und Morbus Parkinson gehen mit Neuroinflammation einher. Als treibende Kraft hinter der Entstehung der Neuroinflammation wird die Aktivierung von Mikroglia angesehen (Yin et al., 2016). In der vorliegenden Studie konnte nachgewiesen werden, dass einige Marker für immunologische Prozesse und Entzündung im Striatum von alten Mäusen stark hochreguliert vorkommen. Dazu gehören B2m, Lcn2 und

Irgm1.

Die kleine lösliche Untereinheit des MHC1 B2m liegt schon bei Mäusen im Alter von 6 bis 7 Monaten deutlich erhöht im Striatum vor. Dieses Ergebnis deckt sich mit anderen Studien, die B2m im Alter erhöht im Hippocampus bei Mäusen und Ratten nachwiesen (Smith et al., 2015; VanGuilder Starkey et al., 2012). Der hochregulierte MHC1-Signalweg wurde vor allem in aktivierter Mikroglia und postsynaptisch an exzitatorischen Synapsen beobachtet (VanGuilder Starkey et al., 2012). Zusätzlich zu einer wichtigen Funktion in der Immunantwort spielen MHC1 und B2m eine Rolle in der synaptischen Plastizität und Konnektivität. Eine erhöhte Expression des Proteinkomplexes wird als charakteristische Veränderung im Alterungsprozess angesehen. Sie geht sowohl mit kognitiven Einbußen in Form von hippocampaler Dysfunktion als auch mit elektrophysiologischen Korrelaten in Form von Veränderung der synaptischen Plastizität einher (Smith et al., 2015; VanGuilder Starkey et al., 2012). Auch exogen zugeführtes B2m führte zu einer Reduktion der hippocampalen Funktion bei jungen Mäusen (Smith et al., 2015). Bei Alzheimer und HIV-Demenz konnte erhöhtes B2m im Blut nachgewiesen werden (Brew et al., 1996; Carrette et al., 2003). Diese ganzen Indizien sprechen eher für einen pathologischen Wert von erhöhtem B2m im Alter und es wurde bereits vorgeschlagen, dass B2m als mögliches medikamentöses Ziel zur Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen in Betracht gezogen werden könnte (Smith et al., 2015).

Ein weiterer Marker für immunologische Prozesse und Entzündung ist Lcn2. Lcn2 wird im ZNS von reaktiven Astrozyten, aktivierter Mikroglia, Endothelzellen und Neuronen als Antwort auf entzündliche Prozesse, Infektionen oder Verletzungen freigesetzt (Jha et al., 2015). Bei Hirnblutungen wird Lcn2 vor allem von Lcn2-positiven Astrozyten zum Abtransport des Eisens freigesetzt (Zha et al., 2016). Weiterhin ist Lcn2 als ein von Fettgewebe freigesetztes Zytokin, das Substanzen wie Steroide, Lipopolysaccharide und Fettsäuren transportieren kann, und als Biomarker für rheumatologische Erkrankungen bekannt (Abella et al., 2015). Lcn2 wird zur Verlaufskontrolle der Therapie und Progression von Multipler Sklerose diskutiert (Marques et al., 2012). Marques et al. wiesen einen erhöhten Lcn2-Spiegel bei aktiver Multipler Sklerose im Liquor

und in Astrozyten nach, der durch Behandlung mit Natalizumab reversibel war. Als autokriner Modulator bewirkt Lcn2 morphologische Veränderungen der Astrozyten, wie reaktive Astroglie bis hin zur Apoptose (Lee et al., 2015). Wie schon im Kapitel 4.1 über gliale Marker angemerkt, könnte Lcn2 auch eine entscheidende Rolle in der Ausprägung der beiden Phänotypen von Astroglie spielen, da es eventuell den proinflammatorischen Weg fördert und den antiinflammatorischen Weg hemmt (Jang et al., 2013; Jha et al., 2015). Ob nun Lcn2 eher positive oder negative Auswirkungen hat, wird kontrovers diskutiert. Bisher wurde reaktive Astroglie eher als hinderlich für synaptische Plastizität und die umliegenden Neurone gewertet. In einer 2014 publizierten Studie wird postuliert, dass Lcn2 als „*help-me*“-Signal von verletzten Neuronen ausgeschüttet wird und durch Lcn2 aktivierte Mikroglia Neurone vor Glucose- und Sauerstoffmangel schützen sowie Neuroplastizität fördern kann (Xing et al., 2014). Xing et al. sprechen Lcn2 auch eine möglicherweise neuroprotektive Wirkung durch Aktivierung der Astrozyten zu. Dies wird durch die astrozytäre Ausschüttung von Faktoren die das neurovaskuläre *Remodeling* fördern, erklärt (Xing et al., 2014). Lcn2 ist also ein wichtiger Modulator und Biomarker, der sowohl bei Dysregulation der metabolischen Homöostase als auch bei entzündlichen und immunologischen Prozessen erhöht ist.

Die mit dem Immunsystem assoziierte GTPase Irgm1 zeigte sich im Striatum alter Mäuse signifikant erhöht. Irgm1 reguliert im Körper die Resistenz gegen intrazelluläre Pathogene wie zum Beispiel *Mycobacterium tuberculosis* und *Toxoplasma gondii* durch die Regulation von T-Zell Lymphozyten (Taylor et al., 2004; H. Xu et al., 2010). In der von H. Xu et al. (2010) publizierten Studie wurde bei Irgm1-*knock-out*-Mäusen eine Resistenz gegen experimentell induzierte Autoimmunenzephalitis, die in Experimenten als Korrelat zu Multipler Sklerose gilt, festgestellt. Dieses Phänomen lässt sich am wahrscheinlichsten auf eine verringerte proliferative Kapazität der CD4⁺-T-Zellen und dadurch eine verringerte autoimmun vermittelte Entzündung und Demyelinisierung des ZNS zurückführen. Das spricht dafür, dass Irgm1 das Überleben von autoreaktiven T-Zellen vermittelt und dessen Hemmung eventuell als potenzielle therapeutische Strategie gegen Multiple Sklerose in Betracht gezogen werden kann. (H. Xu et al., 2010). Weiterhin findet man in der Literatur Hinweise auf einen protektiven Effekt von Irgm1 im Gehirn nach durch Sepsis induzierter

Gehirnschädigung (Huang et al., 2017).

4.3 Veränderungen des NO-Stoffwechsels

Der Gasotransmitter NO wird im dorsalen Striatum vor allem von nNOS-positiven Interneuronen gebildet (Ledo et al., 2015). Die Synthese wird durch glutamaterge kortikostriatale und dopaminerge nigrostriatale Leitungsbahnen stimuliert. Durch die Aktivierung der NO-cGMP-PDE-Kaskade wird die neuronale Erregbarkeit gesteigert, die kortikostriatale Erregbarkeit erleichtert und NO wirkt somit als wichtiger Modulator der synaptischen Plastizität an den kortikostriatalen Synapsen im Striatum (Calabresi et al., 1999; Chepkova et al., 2015; Sergeeva et al., 2007; West & Tseng, 2011). In unserer Studie konnten wir zeigen, dass das m-RNA-Level von nNOS im Alter signifikant abnimmt. Diese Erkenntnis deckt sich mit anderen Studien (Cha et al., 2000; J. Xu et al., 2011; Yamada et al., 1996). Eine altersabhängige Veränderung von NO-abhängigen Prozessen kann eine Abnahme von Gedächtnis- und Lernleistungen bedeuten (Ledo et al., 2015). Eine erhöhte Konzentration von NO sowie auch eine erniedrigte Konzentration werden mit neurotoxischen Prozessen und Neurodegeneration in Verbindung gebracht (Gupta et al., 2014; Nelson et al., 2003). NO inhibiert, falls im Übermaß vorhanden, die mitochondriale Atmungskette sowie die DNA-Synthese und nitrosyliert einige Proteine (zum Beispiel Parkin und α -Synuclein), die mit der Entstehung von M. Parkinson in Verbindung gebracht werden (Gupta et al., 2014). Weiterhin kann NO reaktive Stickstoffspezies generieren und verursacht dadurch oxidativen Stress (J. Xu et al., 2011).

Mit den negativen Effekten von NO wird die Aktivität der iNOS in Verbindung gebracht. Eine Aktivierung der iNOS erfolgt vor allem im Rahmen von entzündlichen und immunologischen Prozessen. Im Alter konnte bei Ratten eine Hochregulierung der iNOS im Hippocampus beobachtet werden. Eine Ergänzung der Ernährung durch Procyanidin aus dem Lotussamen bewirkt im Hippocampus von Ratten eine Verminderung der iNOS-Aktivität und eine verbesserte nNOS-Sensitivität mit gesteigerter NO/ zyklisches Guaninmonophosphat (cGMP)-Signalkaskade (J. Xu et al., 2011).

4.4 Veränderungen der synaptischen Plastizität

Bei der Feldpotenzialanalyse ergab sich bei jüngeren Tieren ein verstärktes LTD_{DHPG} im Vergleich zu den alten Mäusen. LTD_{DHPG} wird durch die chemische Aktivierung der Gruppe 1 der metabotropen Glutamat-Rezeptoren unter Mitwirken von NO (Chepkova et al., 2009; Sergeeva et al., 2007) und Aktivierung des Cannabinoid-Rezeptors CB1 (Sergeeva et al., 2007) ausgelöst. In der Untersuchung mit qRT-PCR zeigte sich keine altersabhängig veränderte Genexpression von mGluR und CB1R. Dies impliziert, dass die verminderte LTD im Alter unabhängig von der Genexpression der Rezeptoren ist.

Das verminderte Vermögen von alten Mäusen, ein LTD_{DHPG} zu entwickeln, könnte auf eine Veränderung in der NO/cGMP/ProteinkinaseG(PKG)-Signalkaskade hinweisen, da LTD_{DHPG} bei jungen Tieren von NO und der Synthese von cGMP abhängig ist (Sergeeva et al., 2007). Ein weiteres Indiz für eine Beeinträchtigung des NO-cGMP-PKG-Signalwegs als Ursache für ein verringertes LTD_{DHPG} im Alter liefert das 2015 angewandte Studiendesign, das getestet hat, ob der Phosphodiesterase 5 (PDE5)-Inhibitor Zaprinast durch Hemmung der Hydrolyse von cGMP einer Verringerung des LTD_{DHPG} entgegenwirkt. Bei Mäusen im Alter von 6 Monaten und im Alter von 12 Monaten wurde durch vorherige Applikation von Zaprinast eine verstärkte Ausprägung des LTD_{DHPG}, wie es für Mäuse im Alter von 2 bis 3 Monaten üblich ist, festgestellt (Chepkova et al., 2015).

Durch die verringerte Anzahl an nNOS-positiven Neuronen und somit weniger NO wird die verminderte Effizienz des NO-cGMP-PKG-Signalwegs weiter unterstützt. Eine Abnahme des LTD_{DHPG} spricht für eine Abnahme der synaptischen Plastizität und somit für eine verringerte Lern- und Gedächtnisleistung.

Elektrisch-evozierte synaptische Plastizität (HFS-LTD) ist im Alter nicht vermindert (Chepkova et al., 2015), was in diesem Fall gegen eine Beeinträchtigung des NO-cGMP-PKG-Signalweg spräche, da HFS-LTD ebenfalls NO-abhängig entsteht. Dies wird auf die unterschiedliche Lokalisation des NO-cGMP-PKG-Signalwegs bei LTD_{DHPG} und HFS-LTD und eine mögliche altersabhängige unterschiedliche Sensitivität bezüglich prä- und postsynaptischen Regulationsmechanismen von NO zurückgeführt (Chepkova

et al., 2015). Bei LTD_{DHPG} ist der NO-abhängige Signalweg präsynaptisch lokalisiert, bei HFS-LTD postsynaptisch (Calabresi et al., 1999; Sergeeva et al., 2007).

HFS-LTP benötigt die Aktivierung von NMDA und D1-Rezeptoren (Calabresi et al., 2000). Durch Aktivierung der beiden Rezeptoren wird die NO-Synthese gesteuert und der NO-cGMP-PKG-Signalweg in Gang gesetzt (Chepkova et al., 2015).

In dieser Arbeit konnte eine Verminderung des mRNA-Levels der NMDA-Rezeptor Untereinheit NR1 und des Dopamin-1-Rezeptors beobachtet werden. Man könnte nun also eine Abnahme der HFS-LTP im Alter vermuten. Dies bestätigte sich nicht. Es wurde eher eine Zunahme bei den jugendlichen Tieren im Vergleich zu den jungen Tieren gesehen. Im Alter nahm die HFS-LTP wieder leicht ab, zeigte sich aber weiterhin höher als bei den jungen Tieren. Als Erklärung könnte man eine gesteigerte Aktivierung von D1-Rezeptoren als Kompensation für die Abnahme der Anzahl von D1-Rezeptoren im Alter anbieten (Chepkova et al., 2015).

4.5 Wirkung von Dexamethason im Striatum

Kortikosteroid-Rezeptoren im Gehirn wurden bisher vor allem im Hippocampus untersucht. Dabei wurde vornehmlich über zwei verschiedene Typen von Rezeptoren berichtet. Zum einen über den Mineralokortikoid-Rezeptor, der insbesondere bei einem niedrigen Cortisolspiegel aktiviert wird und positive Effekte auf die neuronale Plastizität hat und zum anderen über den Glukokortikoid-Rezeptor, der eher bei einem höheren Cortisolspiegel aktiviert wird und zu neuronalem Zelluntergang und Einschränkung der neuronalen Plastizität führt (Sousa et al., 2008). Da Glukokortikoidrezeptoren auch im Striatum nachgewiesen wurden (Defiore & Turner, 1983), wurde in dieser Studie mittels qRT-PCR, Feldpotenzialanalyse und MEA die Wirkung von Dexamethason auf die Expression bestimmter Marker für den Alterungsprozess und die Aktivität der Neuronen im Striatum von Mäusen untersucht.

Nach Behandlung der Hirnschnitte mit Dexamethason konnte eine signifikante Erhöhung des Entzündungsmarkers Lcn2 und eine signifikante Abnahme der nNO-Synthase-Gen Transkription im dorsalen Striatum durch qRT-PCR nachgewiesen werden. Diese für den Alterungsprozess typischen Veränderungen stützen die These, dass durch Dexamethason ein künstlicher Alterungsprozess provoziert werden kann. Die anderen untersuchten Parameter (D1-Rezeptor, NR1, GFAP und der Lcn2-Rezeptor mr24P3R) wiesen in der qRT-PCR Untersuchung von natürlich gealtertem Gewebe eine altersbedingte Veränderung in der Expression auf. Diese Veränderungen konnten nach zweistündiger Inkubation mit Dexamethason nicht beobachtet werden. Es wäre möglich, dass eine volle Ausprägung alterstypischer Veränderungen erst nach längerer Inkubation mit Dexamethason oder höheren Dosen erreicht werden kann. Interessant wäre es daher, einen derartigen Versuchsaufbau in der Zukunft zu konzipieren. In einer kürzlich veröffentlichten Arbeit wurde durch einmalig hochdosierte Dexamethasonapplikation im Hippocampus von Ratten gezeigt, dass vor allem ältere Tiere besonders vulnerabel auf Dexamethason reagieren (Tescic et al., 2017). Es wäre also weiterhin interessant, das Gewebe von älteren Mäusen nach Dexamethasonapplikation auf eine weitere Erhöhung von altersabhängigen Markern zu untersuchen.

In der Feldpotenzialanalyse ergab sich nach Inkubation mit Dexamethason des Gewebes junger Mäuse keine signifikante Veränderung. Das künstliche Altern durch Dexamethason und die erwarteten Effekte auf LTD blieben aus. Dies könnte an einer zu geringen Dosis des applizierten Dexamethasons liegen oder an der kurzen Inkubationszeit. Die meisten Studien untersuchten den chronischen Effekt von Dexamethason in Bezug auf degenerative Veränderungen und Apoptose.

In der MEA-Versuchsreihe konnte gezeigt werden, dass Dexamethason eine unmittelbare Wirkung auf die Aktivität der Neurone im Striatum hat. Außerdem sind die Nervenzellen in der Lage, nach Auswaschung des Dexamethasons zu ihrem ursprünglichen Aktivitätsmuster zurückzukehren. Insgesamt zeigt sich nach Dexamethasonapplikation eine Zunahme der Aktivität. Diese Tendenz ist sowohl in Hepeslösung als auch im Neurobasalmedium zu beobachten. Im

Neurobasalmedium zeigt sich eine umso stärkere Zunahme der Feuerfrequenz, je länger die Neurone mit Dexamethason in Kontakt waren. Vergleicht man die Aktivität in Hepeslösung mit der im Neurobasalmedium ergeben sich Unterschiede. Die Hepeslösung besteht aus Elektrolyten, Glukose und Wasser. Neurobasalmedium enthält zur Optimierung der Kultivierung von Neuronen Zusatzstoffe wie Penicillin, Streptomycin und Glutamin.

Die Tendenz zur Aktivitätszunahme der Neurone nach Dexamethasonzugabe kann mit dem Wirkungsmechanismus von Cortisol als Stresshormon in Verbindung gebracht werden. Die Zweidimensionalität der Vernetzung der Neurone im MEA-Versuch ist sicherlich kritisch zu betrachten. Eine dreidimensionale Vernetzung, die der in-vivo-Vernetzung näher kommt, wurde bereits in anderen MEA-Experimenten umgesetzt und als vorteilhaft befunden (Heuschkel et al., 2002)

Die zirkadiane Cortisolhypersekretion durch einen gestörten negativen Rückkopplungsmechanismus im Alter wird als ein initiiender Einfluss für vereinzelte Fälle von Morbus Alzheimer diskutiert (Notarianni, 2013). Eine andere Studie untersuchte die Wirkung der pränatalen und postnatalen Gabe von Dexamethason bei Ratten. Es wurde ein Anstieg der Apoptoserate von neuronalem Gewebe im Hippocampus beobachtet (Zuloaga et al., 2012). Zusammenfassend kann eine basale Cortisolerhöhung als Risikofaktor für die Entwicklung von kognitiven Defiziten und Morbus Alzheimer angesehen werden (Notarianni, 2013). Die physiologische Aktivierung von Kortikosteroidrezeptoren im Gehirn wird allgemein als förderlich für Lernprozesse und das Gedächtnis angesehen. Dauerhaft erhöhte Cortisolkonzentrationen führen allerdings zu einer erhöhten Vulnerabilität von neuronalem Gewebe. Dabei wird angenommen, dass die Aktivierung des Mineralokortikoidrezeptors eher als Voraussetzung für einen positiven Effekt auf die neuronale Plastizität gilt. Dagegen wird die Aktivierung des Glukokortikoidrezeptors durch pathologisch hohe Cortisolspiegel als schädlich für die neuronale Plastizität bewertet. (E. Ron De Kloet et al., 1999; Sousa et al., 2008).

4.6 Schlussfolgerung

In der vorliegenden Dissertation konnte gezeigt werden, dass altersabhängig im dorsalen Striatum Neuroinflammation und oxidativer Stress zunehmen. Die synaptische Plastizität hingegen nimmt im Alter ab. Die Ergebnisse der Studie lassen vermuten, dass die verminderte kortikostriatale synaptische Plastizität durch einen gestörten NO-cGMP-PKG-Signalweg bedingt ist. Neuroinflammation und oxidativer Stress beeinträchtigen die rezeptorabhängigen Signalkaskaden.

4.7 Ausblick

Diese Studie im Bereich der Grundlagenforschung sollte dazu dienen, den Alterungsprozess des Menschen besser zu verstehen und mögliche Angriffspunkte zur Verzögerung des Alterns beziehungsweise zur Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen zu liefern. Wie schon in Kapitel 4.1 angedeutet, ist es kritisch zu bewerten, ob man Daten, die anhand des Organismus Maus erhoben wurden, auf den Organismus Mensch übertragen kann (Leist & Hartung, 2013). Die Verwendung von humanen embryonalen Stammzellen wäre eine Möglichkeit, um an humanen Zellen zu forschen. Allerdings ist es problematisch, dass es sich bei humanen embryonalen Stammzellen um juvenile Zellen handelt, die bezüglich des natürlichen Alterungsprozesses nur bedingt zu validen Erkenntnissen führen. Durch die experimentelle Herbeiführung des Alterungsprozesses durch Dexamethason oder H_2O_2 lassen sich nicht alle Alterungsprozesse sicher reproduzieren. Weiterhin werfen die Verwendung sowie die Gewinnung von embryonalen Stammzellen ethische Probleme auf. Die Erkenntnis, dass ausdifferenzierte humane Zellen, wie zum Beispiel ein Fibroblast, zu einer pluripotenten Stammzelle umprogrammiert werden können, eröffnet neue Möglichkeiten (Playne & Connor, 2017; Takahashi et al., 2007). Ebenfalls kritisch zu bewerten ist die zweidimensionale Anfertigung von Zellkulturen. Die Vernetzung der Neuronen unter diesen vereinfachten Bedingungen kommt der dreidimensionalen Vernetzungen *in vivo* nicht nahe genug (Hofrichter et al., 2017). Es ist davon auszugehen, dass Kultivierungsartefakte sowie

Verletzungen der Neurone einkalkuliert werden müssen. Es bleibt noch zu beachten, dass wesentliche Ergebnisse dieser Arbeit auf mRNA-Quantifizierung basieren. Die entdeckten striatalen Marker für das Altern müssen in Zukunft mit Hilfe von Western-Blots und Immunhistochemie weiter validiert werden.

5. LITERATUR- UND QUELLVERZEICHNIS

- Abella, V., Scotece, M., Conde, J., Gómez, R., Lois, A., Pino, J., Gualillo, O. (2015). The potential of lipocalin-2/NGAL as biomarker for inflammatory and metabolic diseases. *Biomarkers : Biochemical Indicators of Exposure, Response, and Susceptibility to Chemicals*, 20(8), 565–71.
- Albin, R. L., Young, A. B., & Penney, J. B. (1989). The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends in Neurosciences*, 12(10), 366–75.
- Andrade, L. N. de S., Nathanson, J. L., Yeo, G. W., Menck, C. F. M., & Muotri, A. R. (2012). Evidence for premature aging due to oxidative stress in iPSCs from Cockayne syndrome. *Human Molecular Genetics*, 21(17), 3825–34.
- Arranz, L., Naudí, A., De la Fuente, M., & Pamplona, R. (2013). Exceptionally old mice are highly resistant to lipoxidation-derived molecular damage. *Age (Dordrecht, Netherlands)*, 35(3), 621–35.
- Avogaro, A., Pagnin, E., & Calò, L. (2003). Monocyte NADPH oxidase subunit p22(phox) and inducible hemeoxygenase-1 gene expressions are increased in type II diabetic patients: relationship with oxidative stress. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 88(4), 1753–9.
- Babior, B. M. (2004). NADPH oxidase. *Current Opinion in Immunology*, 16(1), 42–7.
- Bellone, C., Lüscher, C., & Mamei, M. (2008). Mechanisms of synaptic depression triggered by metabotropic glutamate receptors. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, 65(18), 2913–23.
- Bishop, N. A., Lu, T., & Yankner, B. A. (2010). Neural mechanisms of ageing and cognitive decline. *Nature*, 464(7288), 529–535.
- Brew, B. J., Dunbar, N., Pemberton, L., & Kaldor, J. (1996). Predictive markers of AIDS dementia complex: CD4 cell count and cerebrospinal fluid concentrations of beta 2-microglobulin and neopterin. *The Journal of Infectious Diseases*, 174(2), 294–8.
- Calabresi, P., Centonze, D., Gubellini, P., Marfia, G. A., Pisani, A., Sancesario, G., & Bernardi, G. (2000). Synaptic transmission in the striatum: from plasticity to neurodegeneration. *Progress in Neurobiology*, 61(3), 231–65.
- Calabresi, P., Gubellini, P., Centonze, D., Sancesario, G., Morello, M., Giorgi, M., Bernardi, G. (1999). A critical role of the nitric oxide/cGMP pathway in corticostriatal long-term depression. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 19(7), 2489–99.
- Calabresi, P., Maj, R., Pisani, A., Mercuri, N. B., & Bernardi, G. (1992). Long-

- term synaptic depression in the striatum: physiological and pharmacological characterization. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 12(11), 4224–33.
- Calabresi, P., Pisani, A., Mercuri, N. B., & Bernardi, G. (1992). Long-term Potentiation in the Striatum is Unmasked by Removing the Voltage-dependent Magnesium Block of NMDA Receptor Channels. *The European Journal of Neuroscience*, 4(10), 929–935.
- Calcia, M. A., Bonsall, D. R., Bloomfield, P. S., Selvaraj, S., Barichello, T., & Howes, O. D. (2016). Stress and neuroinflammation: a systematic review of the effects of stress on microglia and the implications for mental illness. *Psychopharmacology*, 233(9), 1637–50.
- Carrette, O., Demalte, I., Scherl, A., Yalkinoglu, O., Corthals, G., Burkhard, P., Sanchez, J.-C. (2003). A panel of cerebrospinal fluid potential biomarkers for the diagnosis of Alzheimer's disease. *Proteomics*, 3(8), 1486–94.
- Castro, L. F. C., Wilson, J. M., Gonçalves, O., Galante-Oliveira, S., Rocha, E., & Cunha, I. (2011). The evolutionary history of the stearyl-CoA desaturase gene family in vertebrates. *BMC Evolutionary Biology*, 11, 132.
- Centonze, D., Gubellini, P., Pisani, A., Bernardi, G., & Calabresi, P. (2003). Dopamine, acetylcholine and nitric oxide systems interact to induce corticostriatal synaptic plasticity. *Reviews in the Neurosciences*, 14(3), 207–16.
- Cevenini, E., Caruso, C., Candore, G., Capri, M., Nuzzo, D., Duro, G., Vasto, S. (2010). Age-related inflammation: the contribution of different organs, tissues and systems. How to face it for therapeutic approaches. *Current Pharmaceutical Design*, 16(6), 609–18.
- Cha, C. I., Sohn, S. G., Chung, Y. H., Shin, C., & Baik, S. H. (2000). Region-specific changes of NOS-IR cells in the basal ganglia of the aged rat. *Brain Research*, 854(1-2), 239–44.
- Cham, R., Perera, S., Studenski, S. A., & Bohnen, N. I. (2007). Striatal dopamine denervation and sensory integration for balance in middle-aged and older adults. *Gait & Posture*, 26(4), 516–25.
- Cham, R., Studenski, S. A., Perera, S., & Bohnen, N. I. (2008). Striatal dopaminergic denervation and gait in healthy adults. *Experimental Brain Research*, 185(3), 391–8.
- Charron, G., Doudnikoff, E., Canron, M. H., Li, Q., Ve´ga, C., Marais, S., Bezard, E. (2014). Astrocytosis in parkinsonism: Considering tripartite striatal synapses in physiopathology? *Frontiers in Aging Neuroscience*, 6(SEP), 1–12.
- Chen, J., Fontes, G., Saxena, G., Poitout, V., & Shalev, A. (2010). Lack of

- TXNIP protects against mitochondria-mediated apoptosis but not against fatty acid-induced ER stress-mediated beta-cell death. *Diabetes*, 59(2), 440–7.
- Chepkova, A. N., Fleischer, W., Kazmierczak, T., Doreulee, N., Haas, H. L., & Sergeeva, O. a. (2009). Developmental alterations of DHPG-induced long-term depression of corticostriatal synaptic transmission: Switch from NMDA receptor-dependent towards CB1 receptor-dependent plasticity. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, 459(1), 131–141.
- Chepkova, A. N., Schönfeld, S., & Sergeeva, O. A. (2015). Age-related alterations in the expression of genes and synaptic plasticity associated with nitric oxide signaling in the mouse dorsal striatum. *Neural Plasticity*, 2015, 458123.
- Cirillo, C., Capoccia, E., Iuvone, T., Cuomo, R., Sarnelli, G., Steardo, L., & Esposito, G. (2015). S100B Inhibitor Pentamidine Attenuates Reactive Gliosis and Reduces Neuronal Loss in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *BioMed Research International*, 2015, 508342.
- Cotrina, M. L., & Nedergaard, M. (2002). Astrocytes in the aging brain. *Journal of Neuroscience Research*, 67(1), 1–10.
- De Kloet, E. R., Oitzl, M. S., & Joëls, M. (1999). Stress and cognition: Are corticosteroids good or bad guys? *Trends in Neurosciences*, 22(10), 422–426.
- De Kloet, E. R., Vreugdenhil, E., Oitzl, M. S., & Joëls, M. (1998). Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. *Endocrine Reviews*, 19(3), 269–301.
- Defiore, C. H., & Turner, B. B. (1983). [3H]corticosterone binding in the caudate-putamen. *Brain Research*, 278(1-2), 93–101.
- Deleidi, M., & Gasser, T. (2013). The role of inflammation in sporadic and familial Parkinson's disease. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, 70(22), 4259–73.
- DeLong, M. R., & Wichmann, T. (2007). Circuits and circuit disorders of the basal ganglia. *Archives of Neurology*, 64(1), 20–24.
- Di Filippo, M., Picconi, B., Tantucci, M., Ghiglieri, V., Bagetta, V., Sgobio, C., Calabresi, P. (2009). Short-term and long-term plasticity at corticostriatal synapses: implications for learning and memory. *Behavioural Brain Research*, 199(1), 108–18.
- Dikalov, S. (2011). Cross talk between mitochondria and NADPH oxidases. *Free Radical Biology & Medicine*, 51(7), 1289–301.
- Doreulee, N., Sergeeva, O. A., Yanovsky, Y., Chepkova, A. N., Selbach, O.,

- Gödecke, A., Haas, H. L. (2003). Cortico-striatal synaptic plasticity in endothelial nitric oxide synthase deficient mice. *Brain Research*, 964(1), 159–63.
- Duda, J., Pötschke, C., & Liss, B. (2016). Converging roles of ion channels, calcium, metabolic stress, and activity-pattern of substantia nigra dopaminergic neurons in health and Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry*, 139 Suppl 1:156-178.
- Ferrer, I. (2017). Diversity of astroglial responses across human neurodegenerative disorders and brain aging. *Brain Pathology*, 27(5), 645–674.
- Fröb, F., Bremer, M., Finzsch, M., Kichko, T., Reeh, P., Tamm, E. R., Wegner, M. (2012). Establishment of myelinating Schwann cells and barrier integrity between central and peripheral nervous systems depend on Sox10. *Glia*, 60(5), 806–19.
- Fukui, T., Ishizaka, N., Rajagopalan, S., Laursen, J. B., Capers, Q., Taylor, W. R., Griendling, K. K. (1997). p22phox mRNA expression and NADPH oxidase activity are increased in aortas from hypertensive rats. *Circulation Research*, 80(1), 45–51.
- Galton, C. J., & Hodges, J. R. (1999) The spectrum of dementia and its treatment. *Journal of the Royal College of Physicians of London*, 33(3), 234–9.
- Garbay, B., Boiron-Sargueil, F., Shy, M., Chbihi, T., Jiang, H., Kamholz, J., & Cassagne, C. (1998). Regulation of oleoyl-CoA synthesis in the peripheral nervous system: demonstration of a link with myelin synthesis. *Journal of Neurochemistry*, 71(4), 1719–26.
- Gasser, T., Wszolek, Z. K., Trofatter, J., Ozelius, L., Uitti, R. J., Lee, C. S., Breakefield, X. O. (1994). Genetic linkage studies in autosomal dominant parkinsonism: evaluation of seven candidate genes. *Annals of Neurology*, 36(3), 387–96.
- Gornicka, A., Morris-Stiff, G., Thapaliya, S., Papouchado, B. G., Berk, M., & Feldstein, A. E. (2011). Transcriptional profile of genes involved in oxidative stress and antioxidant defense in a dietary murine model of steatohepatitis. *Antioxidants & Redox Signaling*, 15(2), 437–45.
- Graybiel, A. M., Aosaki, T., Flaherty, A. W., & Kimura, M. (1994). The basal ganglia and adaptive motor control. *Science (New York, N.Y.)*, 265(5180), 1826–31.
- Gubellini, P., Pisani, A., Centonze, D., Bernardi, G., & Calabresi, P. (2004). Metabotropic glutamate receptors and striatal synaptic plasticity: implications for neurological diseases. *Progress in Neurobiology*, 74(5),

271–300.

- Gupta, S. P., Yadav, S., Singhal, N. K., Tiwari, M. N., Mishra, S. K., & Singh, M. P. (2014). Does Restraining Nitric Oxide Biosynthesis Rescue from Toxins-Induced Parkinsonism and Sporadic Parkinson's Disease? *Molecular Neurobiology*, *49*(1), 262–275.
- Gurvits, T. V., Shenton, M. E., Hokama, H., Ohta, H., Lasko, N. B., Gilbertson, M. W., Pitman, R. K. (1996). Magnetic resonance imaging study of hippocampal volume in chronic, combat-related posttraumatic stress disorder. *Biological Psychiatry*, *40*(11), 1091–9.
- Haass, C., Hung, A. Y., Schlossmacher, M. G., Oltersdorf, T., Teplow, D. B., & Selkoe, D. J. (1993). Normal cellular processing of the beta-amyloid precursor protein results in the secretion of the amyloid beta peptide and related molecules. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *695*, 109–16.
- Harman, D. (2003). The free radical theory of aging. *Antioxidants & Redox Signaling*, *5*(5), 557–61.
- Haynes, L. E., Griffiths, M. R., Hyde, R. E., Barber, D. J., & Mitchell, I. J. (2001). Dexamethasone induces limited apoptosis and extensive sublethal damage to specific subregions of the striatum and hippocampus: implications for mood disorders. *Neuroscience*, *104*(1), 57–69.
- Heuschkel, M. O., Fejtl, M., Raggenbass, M., Bertrand, D., & Renaud, P. (2002). A three-dimensional multi-electrode array for multi-site stimulation and recording in acute brain slices. *Journal of Neuroscience Methods*, *114*(2), 135–48.
- Hofrichter, M., Nimtz, L., Tigges, J., Kabiri, Y., Schröter, F., Royer-Pokora, B., Fritsche, E. (2017). Comparative performance analysis of human iPSC-derived and primary neural progenitor cells (NPC) grown as neurospheres in vitro. *Stem Cell Research*, *25*, 72–82.
- Hol, E. M., & Pekny, M. (2015). Glial fibrillary acidic protein (GFAP) and the astrocyte intermediate filament system in diseases of the central nervous system. *Current Opinion in Cell Biology*, *32*, 121–30.
- Holzappel, B., & Wickert, L. (2007). Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). Methoden und Anwendungsgebiete. *Biologie in Unserer Zeit*, *37*(2), 120–126.
- Hov, K. R., Bolstad, N., Idland, A.-V., Zetterberg, H., Blennow, K., Chaudhry, F. A., Watne, L. O. (2017). Cerebrospinal Fluid S100B and Alzheimer's Disease Biomarkers in Hip Fracture Patients with Delirium. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders Extra*, *7*(3), 374–385.
- Huang, Q., Chen, B., Li, Y., & Li, X. (2017). [Role of immune-related GTPase

- M1 in cortical neurons autophagy of mice with sepsis-induced brain injury]. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao. Yi Xue Ban = Journal of Central South University. Medical Sciences*, 42(12), 1353–1360.
- Jang, E., Kim, J.-H., Lee, S., Kim, J.-H., Seo, J.-W., Jin, M., Suk, K. (2013). Phenotypic polarization of activated astrocytes: the critical role of lipocalin-2 in the classical inflammatory activation of astrocytes. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 191(10), 5204–19.
- Jawien, J., Toton-Zuranska, J., Gajda, M., Niepsuj, A., Gebaska, A., Kus, K., Korbut, R. (2012). Angiotensin-(1-7) receptor Mas agonist ameliorates progress of atherosclerosis in apoE-knockout mice. *Journal of Physiology and Pharmacology : An Official Journal of the Polish Physiological Society*, 63(1), 77–85.
- Jellinger, K. A. (2008). Neuropathological aspects of Alzheimer disease, Parkinson disease and frontotemporal dementia. *Neuro-Degenerative Diseases*, 5(3-4), 118–21.
- Jha, M. K., Lee, S., Park, D. H., Kook, H., Park, K.-G., Lee, I.-K., & Suk, K. (2015). Diverse functional roles of lipocalin-2 in the central nervous system. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 49, 135–56.
- John, G. R., Lee, S. C., & Brosnan, C. F. (2003). Cytokines: powerful regulators of glial cell activation. *The Neuroscientist : A Review Journal Bringing Neurobiology, Neurology and Psychiatry*, 9(1), 10–22.
- Junn, E., Han, S., & Im, J. (2000). Vitamin D3 up-regulated protein 1 mediates oxidative stress via suppressing the thioredoxin function. *Journal of Immunology*, 64(12):6287-95.
- Kalpouzos, G., Persson, J., & Nyberg, L. (2012). Local brain atrophy accounts for functional activity differences in normal aging. *Neurobiology of Aging*, 33(3), 623.e1–623.e13.
- Kreitzer, A. C., & Malenka, R. C. (2008). Striatal plasticity and basal ganglia circuit function. *Neuron*, 60(4), 543–54.
- Langenecker, S. A., Briceno, E. M., Hamid, N. M., & Nielson, K. A. (2007). An evaluation of distinct volumetric and functional MRI contributions toward understanding age and task performance: a study in the basal ganglia. *Brain Research*, 1135(1), 58–68.
- Lassègue, B., San Martín, A., & Griendling, K. K. (2012). Biochemistry, physiology, and pathophysiology of NADPH oxidases in the cardiovascular system. *Circulation Research*, 110(10), 1364–90.
- Ledo, A., Lourenço, C. F., Caetano, M., Barbosa, R. M., & Laranjinha, J. (2015). Age-associated changes of nitric oxide concentration dynamics in the central nervous system of Fisher 344 rats. *Cellular and Molecular*

- Neurobiology*, 35(1), 33–44.
- Lee, S., Jha, M. K., & Suk, K. (2015). Lipocalin-2 in the Inflammatory Activation of Brain Astrocytes. *Critical Reviews in Immunology*, 35(1), 77–84.
- Leist, M., & Hartung, T. (2013). Inflammatory findings on species extrapolations: humans are definitely no 70-kg mice. *ALTEX*, 30(2), 227–30.
- Lengi, A. J., & Corl, B. A. (2012). Regulation of the bovine SCD5 promoter by EGR2 and SREBP1. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 421(2), 375–9.
- León-Carrión, J., Atutxa, A. M., Mangas, M. A., Soto-Moreno, A., Pumar, A., Leon-Justel, A., Leal-Cerro, A. (2009). A clinical profile of memory impairment in humans due to endogenous glucocorticoid excess. *Clinical Endocrinology*, 70(2), 192–200.
- Linford, N. J., Schriener, S. E., & Rabinovitch, P. S. (2006). Oxidative damage and aging: spotlight on mitochondria. *Cancer Research*, 66(5), 2497–9.
- Linnemann, D., & Skarsfelt, T. (1994) Regional changes in expression of NCAM, GFAP, and S100 in aging rat brain. *Neurobiology of Aging*, 15(5), 651–5.
- Lovinger, D. M., Tyler, E. C., & Merritt, A. (1993). Short- and long-term synaptic depression in rat neostriatum. *Journal of Neurophysiology*, 70(5), 1937–49.
- Lupien, S., Lecours, A. R., Lussier, I., Schwartz, G., Nair, N. P., & Meaney, M. J. (1994). Basal cortisol levels and cognitive deficits in human aging. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 14(5 Pt 1), 2893–903.
- Lynch, M. A. (2010). Age-related neuroinflammatory changes negatively impact on neuronal function. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 1:6.
- Mahon, S., Deniau, J.-M., & Charpier, S. (2004). Corticostriatal plasticity: life after the depression. *Trends in Neurosciences*, 27(8), 460–7.
- Marchand, W. R., Lee, J. N., Suchy, Y., Garn, C., Johnson, S., Wood, N., & Chelune, G. (2011). Age-related changes of the functional architecture of the cortico-basal ganglia circuitry during motor task execution. *NeuroImage*, 55(1), 194–203.
- Marques, F., Mesquita, S. D., Sousa, J. C., Coppola, G., Gao, F., Geschwind, D. H., Palha, J. A. (2012). Lipocalin 2 is present in the EAE brain and is modulated by natalizumab. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 6, 33.
- Michael Walter Pfaffl. (2004). Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. Retrieved February 24, 2016, from <http://www.gene-quantification.de/pfaffl-biospektrum-2004.pdf>

- Minn, A. H., Hafele, C., & Shalev, A. (2005). Thioredoxin-interacting protein is stimulated by glucose through a carbohydrate response element and induces beta-cell apoptosis. *Endocrinology*, *146*(5), 2397–405.
<http://doi.org/10.1210/en.2004-1378>
- Morré, D. J., & Morré, D. M. (2003). Cell surface NADH oxidases (ECTO-NOX proteins) with roles in cancer, cellular time-keeping, growth, aging and neurodegenerative diseases. *Free Radical Research*, *37*(8), 795–808.
- Muller, F. L., Lustgarten, M. S., Jang, Y., Richardson, A., & Van Remmen, H. (2007). Trends in oxidative aging theories. *Free Radical Biology & Medicine*, *43*(4), 477–503.
- Nandi, S., Gokhan, S., Dai, X.-M., Wei, S., Enikolopov, G., Lin, H., Stanley, E. R. (2012). The CSF-1 receptor ligands IL-34 and CSF-1 exhibit distinct developmental brain expression patterns and regulate neural progenitor cell maintenance and maturation. *Developmental Biology*, *367*(2), 100–13.
- Nedergaard, M. (1994). Direct signaling from astrocytes to neurons in cultures of mammalian brain cells. *Science (New York, N.Y.)*, *263*(5154), 1768–71.
- Nelson, E. J., Connolly, J., & McArthur, P. (2003). Nitric oxide and S-nitrosylation: excitotoxic and cell signaling mechanism. *Biology of the Cell*, *95*(1), 3–8.
- Nichols, N. R., Day, J. R., Laping, N. J., Johnson, S. A., & Finch, C. E. GFAP mRNA increases with age in rat and human brain. *Neurobiology of Aging*, *14*(5), 421–9.
- Notarianni, E. (2013). Hypercortisolemia and glucocorticoid receptor-signaling insufficiency in Alzheimer's disease initiation and development. *Current Alzheimer Research*, *10*(7), 714–31.
- Ntambi, J. M., & Miyazaki, M. (2004). Regulation of stearoyl-CoA desaturases and role in metabolism. *Progress in Lipid Research*, *43*(2), 91–104.
- Obeso, J. A., Rodríguez-Oroz, M. C., Benitez-Temino, B., Blesa, F. J., Guridi, J., Marin, C., & Rodriguez, M. (2008). Functional organization of the basal ganglia: Therapeutic implications for Parkinson's disease. *Movement Disorders*, *23*(S3), S548–S559.
- Olanow, C. W. (1999). A rational approach to the treatment of early Parkinson's disease. *Parkinsonism & Related Disorders*, *5*(4), 217–20.
- Ossowska, K. (1993). Disturbances in neurotransmission processes in aging and age-related diseases. *Polish Journal of Pharmacology*, *45*(2), 109–31.
- Palmer, R. M., Ferrige, A. G., & Moncada, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, *327*(6122), 524–6.

- Pardo, L. M., Rizzu, P., Francescato, M., Vitezic, M., Leday, G. G. R., Sanchez, J. S., Heutink, P. (2013). Regional differences in gene expression and promoter usage in aged human brains. *Neurobiology of Aging*, *34*(7), 1825–1836.
- Park, S.-K., Kim, K., Page, G. P., Allison, D. B., Weindruch, R., & Prolla, T. A. (2009). Gene expression profiling of aging in multiple mouse strains: identification of aging biomarkers and impact of dietary antioxidants. *Aging Cell*, *8*(4), 484–95.
- Pekny, M., Pekna, M., Messing, A., Steinhäuser, C., Lee, J. M., Parpura, V., Verkhratsky, A. (2016). Astrocytes: a central element in neurological diseases. *Acta Neuropathologica*, *131*(3), 323–345.
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, *29*(9), e45.
- Playne, R., & Connor, B. (2017). Understanding Parkinson's Disease through the Use of Cell Reprogramming. *Stem Cell Reviews*, *13*(2), 151–169.
- Portugal, E. M. M., Vasconcelos, P. G. T., Souza, R., Lattari, E., Monteiro-Junior, R. S., Machado, S., & Deslandes, A. C. (2015). Aging process, cognitive decline and Alzheimer's disease: can strength training modulate these responses? *CNS & Neurological Disorders Drug Targets*, *14*(9), 1209–13.
- Ransom, B. R., & Ransom, C. B. (2012). Astrocytes: multitasking stars of the central nervous system. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *814*, 3–7.
- Reeves, R. H., Yao, J., Crowley, M. R., Buck, S., Zhang, X., Yarowsky, P., Hilt, D. C. (1994). Astrocytosis and axonal proliferation in the hippocampus of S100b transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *91*(12), 5359–63.
- Resnick, S. M., Goldszal, A. F., Davatzikos, C., Golski, S., Kraut, M. A., Metter, E. J., Zonderman, A. B. (2000). One-year age changes in MRI brain volumes in older adults. *Cerebral Cortex (New York, N.Y. : 1991)*, *10*(5), 464–72.
- Resnick, S. M., Pham, D. L., Kraut, M. A., Zonderman, A. B., & Davatzikos, C. (2003). Longitudinal magnetic resonance imaging studies of older adults: a shrinking brain. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *23*(8), 3295–301.
- Roudkenar, M. H., Kuwahara, Y., Baba, T., Roushandeh, A. M., Ebishima, S., Abe, S., Fukumoto, M. (2007). Oxidative stress induced lipocalin 2 gene expression: addressing its expression under the harmful conditions. *Journal of Radiation Research*, *48*(1), 39–44.

- Sandhir, R., Onyszchuk, G., & Berman, N. E. J. (2008). Exacerbated glial response in the aged mouse hippocampus following controlled cortical impact injury. *Experimental Neurology*, 213(2), 372–80.
- Schmittgen, T. D., & Livak, K. J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nature Protocols*, 3(6), 1101–8.
- Senkowska, A., & Ossowska, (2003) K. Role of metabotropic glutamate receptors in animal models of Parkinson's disease. *Polish Journal of Pharmacology*, 55(6), 935–50.
- Sergeeva, O. A., Chepkova, A. N., Doreulee, N., Eriksson, K. S., Poelchen, W., Mönnighoff, I., Haas, H. L. (2003). Taurine-induced long-lasting enhancement of synaptic transmission in mice: role of transporters. *The Journal of Physiology*, 550(Pt 3), 911–9.
- Sergeeva, O. A., Doreulee, N., Chepkova, A. N., Kazmierczak, T., & Haas, H. L. (2007). Long-term depression of cortico-striatal synaptic transmission by DHPG depends on endocannabinoid release and nitric oxide synthesis. *The European Journal of Neuroscience*, 26(7), 1889–94.
- Shalev, A., Pise-Masison, C., & Radonovich, M. (2002). Oligonucleotide microarray analysis of intact human pancreatic islets: identification of glucose-responsive genes and a highly regulated TGFbeta signaling pathway. *Endocrinology*, 143(9):3695-8.
- Sheline, Y. I., Wang, P. W., Gado, M. H., Csernansky, J. G., & Vannier, M. W. (1996). Hippocampal atrophy in recurrent major depression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(9), 3908–13.
- Sheng, J. G., Mrak, R. E., & Griffin, W. S. (1994). S100 beta protein expression in Alzheimer disease: potential role in the pathogenesis of neuritic plaques. *Journal of Neuroscience Research*, 39(4), 398–404.
- Simard, M., Couldwell, W. T., Zhang, W., Song, H., Liu, S., Cotrina, M. L., Nedergaard, M. (1999). Glucocorticoids-potent modulators of astrocytic calcium signaling. *Glia*, 28(1), 1–12.
- Smith, L. K., He, Y., Park, J.-S., Bieri, G., Snethlage, C. E., Lin, K., Villeda, S. A. (2015). β 2-microglobulin is a systemic pro-aging factor that impairs cognitive function and neurogenesis. *Nature Medicine*, 21(8), 932–7.
- Sohal, R. S., & Weindruch, R. (1996). Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science (New York, N.Y.)*, 273(5271), 59–63.
- Sousa, N., Cerqueira, J. J., & Almeida, O. F. X. (2008). Corticosteroid receptors and neuroplasticity. *Brain Research Reviews*, 57(2), 561–70.
- Sulzer, D., & Surmeier, D. J. (2013). Neuronal vulnerability, pathogenesis, and

- Parkinson's disease. *Movement Disorders : Official Journal of the Movement Disorder Society*, 28(1), 41–50.
- Sun, H.-Y., Hu, Y.-J., Zhao, X.-Y., Zhong, Y., Zeng, L.-L., Chen, X.-B., Kong, W.-J. (2015). Age-related changes in mitochondrial antioxidant enzyme Trx2 and TXNIP-Trx2-ASK1 signal pathways in the auditory cortex of a mimetic aging rat model: changes to Trx2 in the auditory cortex. *The FEBS Journal*, 282(14), 2758–74.
- Szabo, M., & Gulya, K. (2013). Development of the microglial phenotype in culture. *Neuroscience*, 241, 280–95.
- Tadros, S. F., D'Souza, M., Zhu, X., & Frisina, R. D. (2014). Gene expression changes for antioxidants pathways in the mouse cochlea: relations to age-related hearing deficits. *PloS One*, 9(2), e90279.
- Takahashi, K., Okita, K., Nakagawa, M., & Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from fibroblast cultures. *Nature Protocols*, 2(12), 3081–3089.
- Tanaka, C., Coling, D. E., Manohar, S., Chen, G.-D., Hu, B. H., Salvi, R., & Henderson, D. (2012). Expression pattern of oxidative stress and antioxidant defense-related genes in the aging Fischer 344/NHsd rat cochlea. *Neurobiology of Aging*, 33(8), 1842.e1–14.
- Taylor, G., Feng, C., & Sher, A. (2004). p47 GTPases: regulators of immunity to intracellular pathogens. *Nature review Immunology*, 4(2):100-9
- Tesic, V., Perovic, M., Zaletel, I., Jovanovic, M., Puskas, N., Ruzdijic, S., & Kanazir, S. (2017). A single high dose of dexamethasone increases GAP-43 and synaptophysin in the hippocampus of aged rats. *Experimental Gerontology*, 98, 62–69.
- Thambisetty, M., Wan, J., Carass, A., An, Y., Prince, J. L., & Resnick, S. M. (2010). Longitudinal changes in cortical thickness associated with normal aging. *NeuroImage*, 52(4), 1215–1223.
- Vandesompele, J., De, P., Pattyn, F., Poppe, B., & Al., E. (2002). Lipogenic gene isoforms in mouse mammary glands. *Genetics and Molecular Research. Biochemical Journal*, 333, 17-25.
- VanGuilder Starkey, H. D., Van Kirk, C. A., Bixler, G. V, Imperio, C. G., Kale, V. P., Serfass, J. M., Freeman, W. M. (2012). Neuroglial expression of the MHCII pathway and PirB receptor is upregulated in the hippocampus with advanced aging. *Journal of Molecular Neuroscience : MN*, 48(1), 111–26.
- Vozella, V., Basit, A., Misto, A., & Piomelli, D. (2017). Age-dependent changes in nervonic acid-containing sphingolipids in mouse hippocampus. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1862(12), 1502–1511.

- Wang, J., Yu, L., Wang, H., Gao, Y., Schrementi, J. P., Porter, R. K., Qian, Y. (2008). Identification and characterization of hamster stearyl-CoA desaturase isoforms. *Lipids*, 43(3), 197–205.
- West, A. R., & Tseng, K. Y. (2011). Nitric Oxide-Soluble Guanylyl Cyclase-Cyclic GMP Signaling in the Striatum: New Targets for the Treatment of Parkinson's Disease? *Frontiers in Systems Neuroscience*, 5, 55.
- Wilkinson, B. L., & Landreth, G. E. (2006). The microglial NADPH oxidase complex as a source of oxidative stress in Alzheimer's disease. *Journal of Neuroinflammation*, 3, 30.
- Xing, C., Wang, X., Cheng, C., Montaner, J., Mandeville, E., Leung, W., Lo, E. H. (2014). Neuronal Production of Lipocalin-2 as a Help-Me Signal for Glial Activation. *Stroke*, 45(7), 2085–2092.
- Xu, H., Wu, Z.-Y., Fang, F., Guo, L., Chen, D., Chen, J. X., Yan, S. S. (2010). Genetic deficiency of Irgm1 (LRG-47) suppresses induction of experimental autoimmune encephalomyelitis by promoting apoptosis of activated CD4+ T cells. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 24(5), 1583–92.
- Xu, J., Rong, S., Xie, B., Sun, Z., Deng, Q., Bao, W., Liu, L. (2011). Changes in the Nitric Oxide System Contribute to Effect of Procyanidins Extracted from the Lotus Seedpod Ameliorating Memory Impairment in Cognitively Impaired Aged Rats. *Rejuvenation Research*, 14(1), 33–43.
- Yamada, K., Noda, Y., Komori, Y., Sugihara, H., Hasegawa, T., & Nabeshima, T. (1996). Reduction in the number of NADPH-diaphorase-positive cells in the cerebral cortex and striatum in aged rats. *Neuroscience Research*, 24(4), 393–402.
- Yamamoto, T., Ochalski, A., Hertzberg, E. L., & Nagy, J. I. (1990). On the organization of astrocytic gap junctions in rat brain as suggested by LM and EM immunohistochemistry of connexin43 expression. *The Journal of Comparative Neurology*, 302(4), 853–83.
- Yanovsky, Y., Li, S., Klyuch, B. P., Yao, Q., Blandina, P., Passani, M. B., Sergeeva, O. A. (2011). L-Dopa activates histaminergic neurons. *The Journal of Physiology*, 589(Pt 6), 1349–66.
- Yap, L.-P., Garcia, J. V., Han, D., & Cadenas, E. (2009). The energy–redox axis in aging and age-related neurodegeneration. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 61(14), 1283–1298.
- Yin, F., Sancheti, H., Patil, I., & Cadenas, E. (2016). Energy metabolism and inflammation in brain aging and Alzheimer's disease. *Free Radical Biology & Medicine*. 100:108-122.
- Zhao, J., Xi, G., Wu, G., Keep, R. F., & Hua, Y. (2016). Deferoxamine

- Attenuated the Upregulation of Lipocalin-2 Induced by Traumatic Brain Injury in Rats. *Acta Neurochirurgica. Supplement*, 121, 291–4.
- Zhuo, L., Sun, B., Zhang, C. L., Fine, A., Chiu, S. Y., & Messing, A. (1997). Live astrocytes visualized by green fluorescent protein in transgenic mice. *Developmental Biology*, 187(1), 36–42.
- Zuloaga, D. G., Carbone, D. L., Quihuis, A., Hiroi, R., Chong, D. L., & Handa, R. J. (2012). Perinatal dexamethasone-induced alterations in apoptosis within the hippocampus and paraventricular nucleus of the hypothalamus are influenced by age and sex. *Journal of Neuroscience Research*, 90(7), 1403–12.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Sergeeva und Herrn Prof. Dr. Haas für die Überlassung des Themas und die herausragende Betreuung.

Weiterhin möchte ich mich ganz herzlich bei Frau Dr. Chepkova für die gute Zusammenarbeit und die hilfreichen Erklärungen auf dem Gebiet der Feldpotenzialanalyse bedanken. Frau Anette Scherer möchte ich für die besonders freundliche und nette Atmosphäre im Labor sowie die Einarbeitung in die wissenschaftliche Methodik danken.

Vor allem möchte ich mich bei meinen Eltern, meinen Geschwistern und Marius Kriegerowski bedanken, die mich auf meinem Weg durch das Studium und der Dissertation begleitet und immer unterstützt haben.