

Aktivitätsinduzierte Expressionsänderungen von
GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten im alten Gehirn

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der
Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Marion Christina Stangl
Geboren am 10.08.1976 in Horb a. N.

29. November 2004

Gutachter:

1. Priv.-Doz. Dr. med. Christoph Redecker
2. Prof. Dr. med. Ernst Rüdiger Köhling
3. Prof. Dr. med. Bernhard Blanz

Tag der öffentlichen Verteidigung: 03.01.2006

Abkürzungsverzeichnis

ABC	Avidin-Biotin-Komplex
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
CA1	Cornu ammonis, Region 1
CA2	Cornu ammonis, Region 2
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CCD	Charged-coupled device
CL218,872	GABA _A α 1 bevorzugender partieller Agonist
CREB	cAMP response element binding protein
c-Fos	Cellular FOS, Kernprotein; Proto-Onkogen
Cl ⁻	Chlorid
DG	Gyrus dentatus
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DAB	Diaminobenzidinhydrochlorid
FL	Front limb (vorderfußrepräsentierender Kortex)
FBNF1	Fischer- und Brown Norway Ratten
FR	Frontaler motorischer Kortex
GABA	γ -Aminobuttersäure
GFAP	Saures Gliafaserprotein
5-HT ₃	5-Hydroxytryptamin (Serotonin)
HL	Hind limb (hinterpfotenrepräsentierender Kortex)
JunB	Transkriptionsfaktor
KOx24	Zinkfingerprotein
LTP	Langzeitpotenzierung
NGS	Normal goat serum
NIH	Imaging Programm
NeuN	Anti-neuronal nuclei
Par1	Primärer somatosensorischer Kortex
Par2	Sekundärer somatosensorischer Kortex
PBS	Phosphatgepufferte Normalsalzlösung
PB	Phosphatpuffer
ROD	Relative optische Dichte

- 1. ZUSAMMENFASSUNG**
 - 2. EINLEITUNG**
 - 3. ZIELE DER ARBEIT**
 - 4. MATERIAL UND METHODEN**
 - 4.1 VERSUCHSTIERE**
 - 4.2 EXPERIMENTELLES DESIGN**
 - 4.3 GEWEBEGEWINNUNG**
 - 4.3.1 Transkardiale Perfusion und Gewebeaufbewahrung*
 - 4.3.2 Perfusionslösungen*
 - 4.3.3 Herstellung der Hirnschnitte*
 - 4.4 FÄRBEMETHODEN**
 - 4.4.1 Immunhistochemische Färbung*
 - 4.4.2 Färbung der GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten*
 - 4.4.3 NeuN-Färbung*
 - 4.4.4 Färbemedien*
 - 4.5 AUSWERTUNG DER IMMUNHISTOCHEMISCHEN PRÄPARATE**
 - 4.6 STATISTISCHE AUSWERTUNG**
 - 5. ERGEBNISSE**
 - 5.1 EXPRESSION DER GABA_A-REZEPTOR-UNTEREINHEITEN IM HIRN ALTER RATTEN**
 - 5.1.1 Neokortikale Expression*
 - 5.1.2 Hippokampale Expression*
 - 5.2 VERÄNDERUNGEN DER EXPRESSION VON GABA_A-REZEPTOR-UNTEREINHEITEN NACH TRANSFER IN EINE REIZREICHE UMGEBUNG**
 - 5.2.1 Neokortikale Veränderungen*
 - 5.2.2 Hippokampale Veränderungen*
-

6. DISKUSSION

**6.1 VERTEILUNG DER EXPRESSIONSÄNDERUNGEN DER GABA_A-REZEPTOR-
UNTEREINHEITEN IM NEOKORTEX**

**6.2 EXPRESSION DER GABA_A-REZEPTOR-UNTEREINHEITEN IN DER
HIPPOKAMPUSFORMATION**

6.3 FUNKTIONELLE AUSWIRKUNGEN

**6.4 REKAPITULATION EINES JUVENILEN EXPRESSIONSMUSTERS DER GABA_A-
REZEPTOR-UNTEREINHEITEN**

6.5 KLINISCHE AUSWIRKUNGEN

7. SCHLUSSFOLGERUNGEN

8. LITERATURVERZEICHNIS

9. ANHANG

9.1 LEBENSLAUF

9.2 DANKSAGUNG

9.3 EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG

1. Zusammenfassung

Der natürliche Vorgang des Alterns wird allgemein mit einer charakteristischen Abnahme der kognitiven und sensomotorischen Leistung in Verbindung gebracht. Einiges deutet darauf hin, dass Aktivität diesen Prozess verlangsamt oder zumindest günstig beeinflusst. Experimentelle Studien an alten Ratten zeigten eine altersabhängige Verkleinerung der rezeptiven Felder, die mit einer zunehmenden sensomotorischen Leistungsminderung einhergeht. Dieser Vorgang konnte durch die Haltung in einer reizreichen Umgebung rückgängig gemacht werden. In der vorliegenden Studie wurde die Auswirkung eines stimulierenden Umfeldes auf die Expression der GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten im Gehirn alter Ratten analysiert. Im Alter von 33 Monaten wurden die Versuchstiere aus der Standardkäfighaltung für drei Monate in ein anregendes Milieu transferiert, wohingegen die Kontrollgruppe weiterhin unter Standardbedingungen gehalten wurde. Im Anschluss daran wurden die Tiere transkardial perfundiert und das Gewebe weiter aufgearbeitet. Die Expression der GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten wurde immunhistochemisch untersucht. Die regionale Verteilung der Untereinheiten $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 5$ und $\gamma 2$ wurde semiquantitativ anhand optischer Dichtemessungen analysiert. Diese Untersuchungen zeigten bei Tieren der reizreichen Umgebung einen signifikanten Anstieg der Expression der $\alpha 3$ - und $\alpha 5$ -Untereinheiten im Vergleich zu Tieren der Standardkäfighaltung. Diese Heraufregulation war für die $\alpha 3$ -Rezeptor-Untereinheit am ausgeprägtesten und betraf vorwiegend den primären und sekundären somatosensorischen Kortex (Par1 und Par2) sowie den Vorder- (FL) und Hinterpfotenrepräsentierenden (HL) Kortex. Die Untereinheiten $\alpha 1$, $\alpha 2$ und $\gamma 2$ zeigten keine signifikanten Veränderungen. In der Hippokampusformation wurde ebenfalls keine Modifikation beobachtet. Diese Studie zeigt eine signifikante aktivitätsinduzierte Plastizität der kortikalen GABA_A-Rezeptoren im Gehirn sehr alter Ratten. Der Anstieg der $\alpha 3$ - und $\alpha 5$ -Rezeptor-Untereinheiten, welcher vor allem in den ersten postnatalen Tagen zu finden sind, deutet auf die Rekapitulation eines juvenilen Expressionsmusters hin. Diese Veränderungen könnten zu der sensomotorischen Plastizität beitragen, die bei sehr alten Ratten nach einer Haltung in einer reizreichen Umgebung gefunden wurden.

„Was man in seiner Jugend erwirbt, dient im Kampf gegen das Elend des hohen Alters. Und wenn du willst, dass dein Alter sich aus Weisheit nähre, so Sorge dafür, solange du jung bist, dass es in deinem Alter nicht an Nahrung mangelt“.

(Leonardo da Vinci, Codex Atlanticus 109).

2. Einleitung

Der Begriff Altern bezeichnet gemäß Wikipedia (Enzyklopädie) zum einen „im Laufe der Zeit seine Beschaffenheit ändern“ und zum anderen „etwas aktiv beeinflussen, dass es seine Beschaffenheit ändert“. Es gibt heute keine einheitliche Theorie über das Altern. Der Alterungsprozess ist ein natürlicher biologischer Vorgang, dem alle Lebewesen unterworfen sind. Er beginnt beim Menschen ca. um das 30. Lebensjahr mit relativ großen interindividuellen Schwankungen. Wahrscheinlich ist der Abbauprozess des Organismus bereits genetisch vorprogrammiert und in unserem Erbmateriale gespeichert. Im Alter nimmt nicht nur die Muskelsubstanz ab, sondern auch die Nerven und das Gehirn sind langsamen degenerativen Veränderungen unterworfen, denen keiner entgehen kann. Vor allem die nicht genutzten Fähigkeiten unterliegen einem bevorzugten, schnellen und unaufhaltsamen Abbau. Auch umweltbedingte Faktoren spielen bei der Alterung eine große Rolle.

Alterungsprozesse zeigen insbesondere im hohen Alter eine große interindividuelle Variabilität, welche auch im hohen Alter stark ausgeprägt ist (Birren 1988, Schaie 1989, Lehr 1991a). Bis ins höchste Lebensalter hinein unterscheiden sich Gleichaltrige in ihrem Gesundheitszustand und in ihrer Alltagskompetenz (Bergi 1990, Franke 1985, Lehr 1991b).

Weiterhin werden die Alterungsprozesse in frühen Lebensabschnitten beeinflusst. Die Ausbildung spezifischer Fähigkeiten und Fertigkeiten sowie spezifischer Formen psychischer Auseinandersetzungen mit Aufgaben und Belastungen trägt zur individuellen Kompetenz-, Erlebens- und Verhaltensstruktur im Alter bei. In der Gerontologie hat die methodische Erfassung von Alltagsaktivitäten innerhalb von Geriatrie und Sozial- bzw. Verhaltenswissenschaften schon seit längerer Zeit große Bedeutung (Katz, 1983; Oswald und Gunzelmann, 1991). Wesentliche Aspekte des Alltagsverhaltens und Alltagslebens im Alter wurden auch in der gerontologischen Freizeitforschung bearbeitet (Schmitz-Scherzer, 1974; Tokarski, 1991).

Es fand sich eine gewisse Verengung des Lebensraums nach dem Ende der Berufstätigkeit, da jetzt die eigene Wohnung bzw. das eigene Haus fast ausschließlicher Ort eigener Betätigung ist. Eine Verminderung der Aktivität wird somit z. B. durch die enge Bindung älterer Menschen an ihre Wohnung ausgedrückt. Im Bundesdurchschnitt halten sich alte Menschen während vier Fünftel der Tageszeit (16 Stunden) in ihrer Wohnung auf. Bewohner von Alten- und Pflegeheimen verbringen sogar annähernd 90% eines Tages im Haus (Saup, 1986). Diese empirischen Befunde werden auch in der wissenschaftlichen Diskussion oft als Beleg für den generellen Rückgang der Aktivitäten mit dem und durch das Alter gesehen (Havighurst et al., 1968; Cantilli und Shmelzer, 1971; Herlyn, 1990). Es hat sich jedoch herausgestellt, dass Aktivität im Alter degenerative Prozesse aufhalten kann. Eine Aufrechterhaltung der intellektuellen Aktivität scheint das mentale Altern günstig zu beeinflussen (Tubiana 2002). Auch vermindern körperlich Aktivität und geistige Anforderungen Krankheiten und verbessern die Gesundheit und Funktionsfähigkeit des Körpers (Petermans 2001, Marom-Klibansky und Drory 2002, Hjort 2000).

In tierexperimentellen Studien wurde ebenfalls gezeigt, dass Aktivität altersabhängige degenerative Prozesse aufhalten kann. Sehr alte Ratten wurden für eine kurze Zeit in eine reizreichen Umgebung transferiert und dort mit mehr Zuwendung, mehr Platz und abwechslungsreicherem Futter gehalten.

Untersuchungen zeigten, dass es nach Haltung in einem stimulierenden Milieu zu einer Reduktion altersbedingter Veränderungen kam. Z.B. fand sich eine signifikante Verminderung der GFAP-positiven-Astrozyten, welche neben dem Pigment Lipofuszin ein bedeutendes Alterungszeichen im Gehirn darstellen (Braak 1979, Hilbig et al. 2002; Murphy 1993). Auch kam es zu einer Stagnation der altersabhängigen Verringerung der synaptischen Dichte (Saito et al. 1994). Des Weiteren steigerte der Aufenthalt in einer anregenden Umgebung die Neuroneogenese im Gyrus dentatus des Hippokampus. (Kempermann et al. 1998b, Kempermann et al. 1997). Die mit dem Alter zunehmende Lipofuszinanreicherung war dort ebenfalls vermindert (Kempermann et al. 2002).

Nicht nur morphologische Veränderungen der Gehirnstruktur, sondern auch funktionell bessere Leistungen werden durch Aktivität hervorgerufen. Die nach Aufenthalt in einer reizreichen Umgebung durchgeführten Verhaltensexperimente zeigten eine deutliche Verbesserung kognitiver Funktionen. Aber auch sensomotorische Funktionen besserten sich. Alte Ratten der reizreichen Haltungsbedingungen konnten im Vergleich zu ihren Kontrollgruppen z. B. wieder über schmale Stangen laufen und zeigten eine deutliche Verbesserung ihrer Wendigkeit und Agilität (Godde et al. 2002, Dupont et al. 2001).

Die Regulation sensomotorischer und kognitiver Leistungen unseres Gehirns ist wesentlich von einem intakten Gleichgewicht exzitatorischer und inhibitorischer Neurotransmission abhängig. GABA (γ -Aminobuttersäure) ist der bedeutendste inhibitorische Neurotransmitter im zentralen Nervensystem (Hevers und Luddens 1998). Über 20-50% aller neuronalen Synapsen nutzen GABA als Transmitter (Chu et al. 1990, Bloom und Iversen 1971) und sind somit ubiquitär (De Blas 1996, Laurie et al. 1992, Wisden et al. 1992).

GABA zeigt seine Wirkung über zwei unterschiedliche Rezeptoren: den ionotropen GABA_A-Rezeptor und den metabotropen GABA_B-Rezeptor. Am GABA_A-Rezeptor führt GABA über eine Konformationsänderung zur Öffnung eines intrinsischen Ionenkanals; daraufhin kommt es zum Einstrom von Chlorid in die Zelle mit konsekutiver Hyperpolarisation der postsynaptischen Membran und zu einer Erhöhung des inhibitorischen Tonus (Whiting 1999).

Die GABA_A-Rezeptoren regulieren die Exzitabilität des Gehirns (Olsen und Avoli 1997, Fritschy et al. 1999), und modulieren dadurch kognitive Fähigkeiten, Vigilanz, Lernen und Gedächtnis (Sarter et al. 1988, Izquierdo und Medina 1991). Darüber hinaus beeinflussen sie Angstverhalten (Nutt et al. 1990, Pratt 1992), die zirkadianen Rhythmik (Turek und Van Reeth 1988) sowie das Ess- und Trinkverhalten (Cooper, 1989).

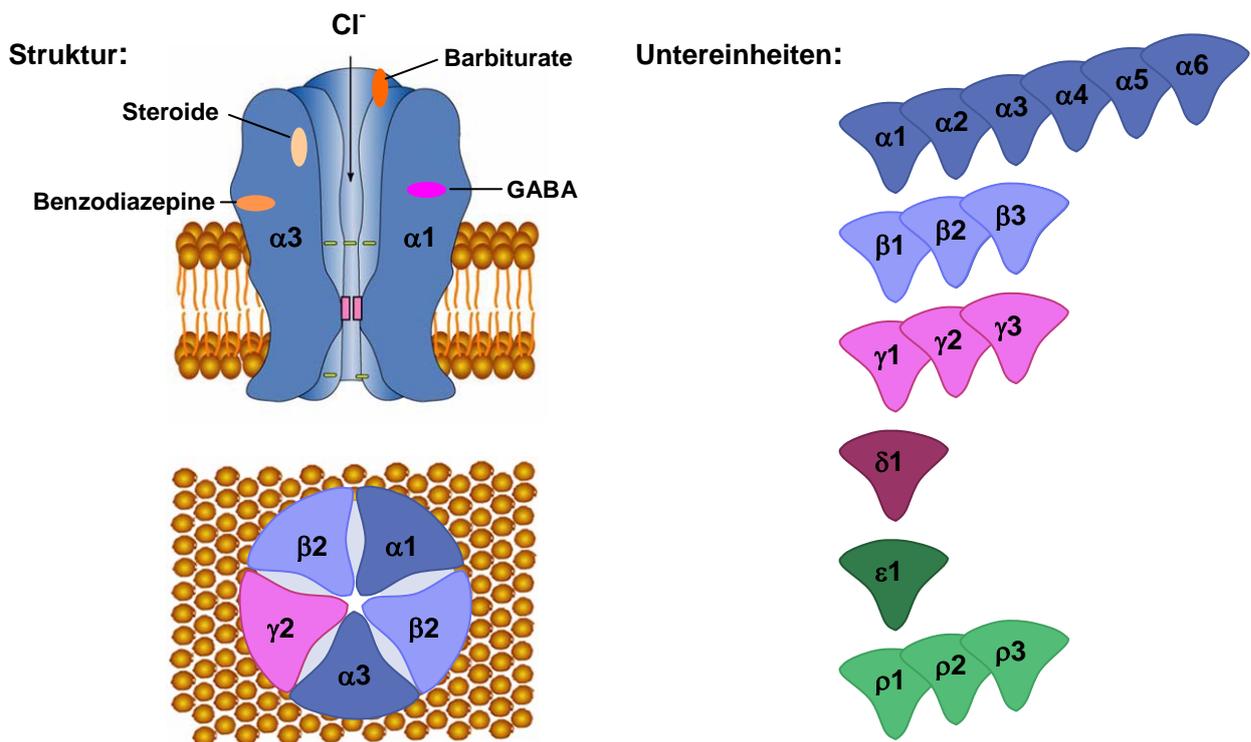


Abb. 1: Schematische Darstellung eines GABA_A-Rezeptors in der Zellmembran. Das Pentamer besteht aus je fünf Untereinheiten, häufig aus einer Kombination der α-, β- und γ-Untereinheit. Dieses Pentamer bildet einen ligandengesteuerten Ionenkanal. Die wichtigsten Bindungsstellen sind schematisch eingezeichnet.

Der GABA_A-Rezeptor (Abb. 1) ist Mitglied einer Familie von ligandengesteuerten Ionenkanälen, welche den nicotinergeren Acetylcholin-Rezeptor, den 5-HT₃-Rezeptor und den strychninsensitiven Glycinrezeptor einschließen (Bertrand und Changeux, 1995).

Eine Gemeinsamkeit dieser Rezeptoren stellt die Bildung homo- und heterooligomerer Komplexe aus mehreren Untereinheiten dar (Hevers und Luddens 1998). Der GABA_A-Rezeptor ist wie die anderen Rezeptoren der Familie aus 5 Untereinheiten zusammengesetzt und zeigt sich somit als ein Pentamer (Nayeem et al. 1994, Tretter et al. 1997, Wisden und Seeburg 1992). In weiteren Studien wurde festgestellt, dass eine GABA_A-Rezeptor-Gen-Familie mit unterschiedlichen Klassen von Untereinheiten existiert, von denen mittlerweile mindestens 20 bekannt sind: α 1-6; β 1-4; γ 1-3; δ , ϵ , θ , π und ρ 1-3 (Sieghart et al. 1999). Der GABA_A-Rezeptor verfügt somit über eine außerordentlich hohe strukturelle Heterogenität (Fritschy et al. 1994). Die am häufigsten im Gehirn vertretenen Rezeptor-Untereinheiten sind die α -, β - und γ -Untereinheiten; die γ -Untereinheit kann jedoch möglicherweise durch δ - oder ϵ -Untereinheiten ausgetauscht werden (Hevers und Luddens 1998).

In zahlreichen Studien wurde durch immunhistochemische Methoden und mRNA-Lokalisations-Untersuchungen gezeigt, dass für jede GABA_A-Rezeptor-Untereinheit ein spezifisches Verteilungsmuster vorliegt. Auch wurde festgestellt, dass es im Laufe des Lebens zu einer Umstrukturierung der Zusammensetzung des GABA_A-Rezeptors kommt. Im juvenilen Gehirn zeigt sich somit eine andere Expression der einzelnen Rezeptor-Untereinheiten als im jungen erwachsenen und alternden Gehirn (Laurie et al. 1992, Wisden et al. 1992, Fritschy und Mohler 1995). Durch die Zusammensetzung der Untereinheiten könnten die spezifischen elektrophysiologischen und pharmakologischen Eigenschaften der Rezeptorfunktion bestimmt werden. Die Rezeptorfunktion ändert sich somit durch die jeweilige Zusammensetzung der einzelnen Untereinheiten. Der Austausch der α 1-Untereinheit durch die α 2-Untereinheit bewirkt z. B. eine Änderung der Kinetik der GABA_A-Rezeptorkanäle (Lavoie et al. 1997).

Die einzelnen Untereinheiten des GABA_A-Rezeptors zeigen im erwachsenen Gehirn aber auch während der Hirnentwicklung ein spezifisches regionales, zelluläres und auch subzelluläres Verteilungsmuster. Vor allem während der Entwicklung und Reifung ändern sich die regionalen Verteilungsmuster erheblich. So spielen Rezeptoruntereinheiten, die während der Hirnentwicklung und Reifung ubiquitär exprimiert werden im erwachsenen und alternden Gehirn zum Teil nur eine untergeordnete Rolle. Aufgrund dieser altersbedingten Veränderungen der Zusammensetzung des Rezeptors wird unter anderem auch von Veränderungen der Wirkungsweise von Medikamenten ausgegangen, die an den Bindungsstellen des GABA_A-Rezeptors wirken (Naranjo et al. 1995).

3. Ziele der Arbeit

Die vorliegende Studie beschäftigt sich mit der Frage, inwieweit Aktivität die Expression verschiedener GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten im hohen Alter beeinflusst.

Zu diesem Zweck wurden Ratten im Alter von 33 Monaten für weitere 3 Monate aus der Standardkäfighaltung in eine stimulierende reizreiche Umgebung transferiert und die Expression 5 wichtiger GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten immunzytochemisch untersucht.

In dieser Arbeit wurde die Expression der Rezeptoruntereinheiten in verschiedenen motorischen und sensorischen Regionen des Neokortex sowie im Hippokampus ausgewertet, um arealspezifische Expressionsänderungen zu erfassen.

Dabei zeigte sich, dass der Transfer in eine reizreiche Umgebung zu einer Rekapitulation eines juvenilen Expressionsmusters der GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten führt.

4. Material und Methoden

4.1 Versuchstiere

Die Studie wurde an 15 (12 männlichen und 3 weiblichen) Ratten mit einem Körpergewicht zwischen 336 g und 562 g und einem Lebensalter von 33 Monaten durchgeführt. Es handelt sich hierbei um Fischer- und Brown-Norway-Ratten (FBNF1), die von der Firma Harlan (USA) erworben wurden. Die männlichen Tiere dieses Stammes erreichen mit einer Wahrscheinlichkeit von 50 % das Lebensalter von 34,5 Lebensmonaten; im Vergleich dazu erreichen die männlichen Wistar Ratten im Durchschnitt nur 31 Lebensmonate. Die Aufzucht erfolgte streng pathogenfrei unter folgenden Bedingungen: 22-24 °Celsius Raumtemperatur, 60 – 80 % Luftfeuchtigkeit und künstliches Licht, das einen zwölfstündigen Tag-Nacht-Rhythmus erzeugte. Die Tiere hatten freien Zugang zu pelletiertem Trockenfutter (Altromin) und Wasser, das aus Gründen der Keimfreiheit angesäuert war.

4.2 Experimentelles Design

Für diese Studie wurden 2 Versuchsgruppen gebildet: die eine Gruppe bestand aus 7 Tieren, die in eine reizreiche Umgebung transferiert wurde, und die andere Gruppe bestand aus 8 Tieren, die unter Standardbedingungen gehalten wurde. Die Tiere der reizreichen Umgebung wurden die letzten drei Monate ihres Lebens in einem Käfig mit den Maßen 100 x 60 x 80 cm (Länge x Breite x Höhe) untergebracht (Abb. 2a).

Die Innenausstattung dieser neuen Käfige wurde wöchentlich umgestaltet. In ihnen befanden sich an wechselnden Stellen unregelmäßig geformte Styroporblöcke unterschiedlicher Größe, Pappkartons und verschiedenartige hölzerne Leitern (Abb. 2b). Food-Pellets (Trockenfutter) und Sonnenblumenkerne wurden an unterschiedlichen Plätzen verabreicht, um ausgeprägte, explorative Verhaltensweisen zu verstärken.

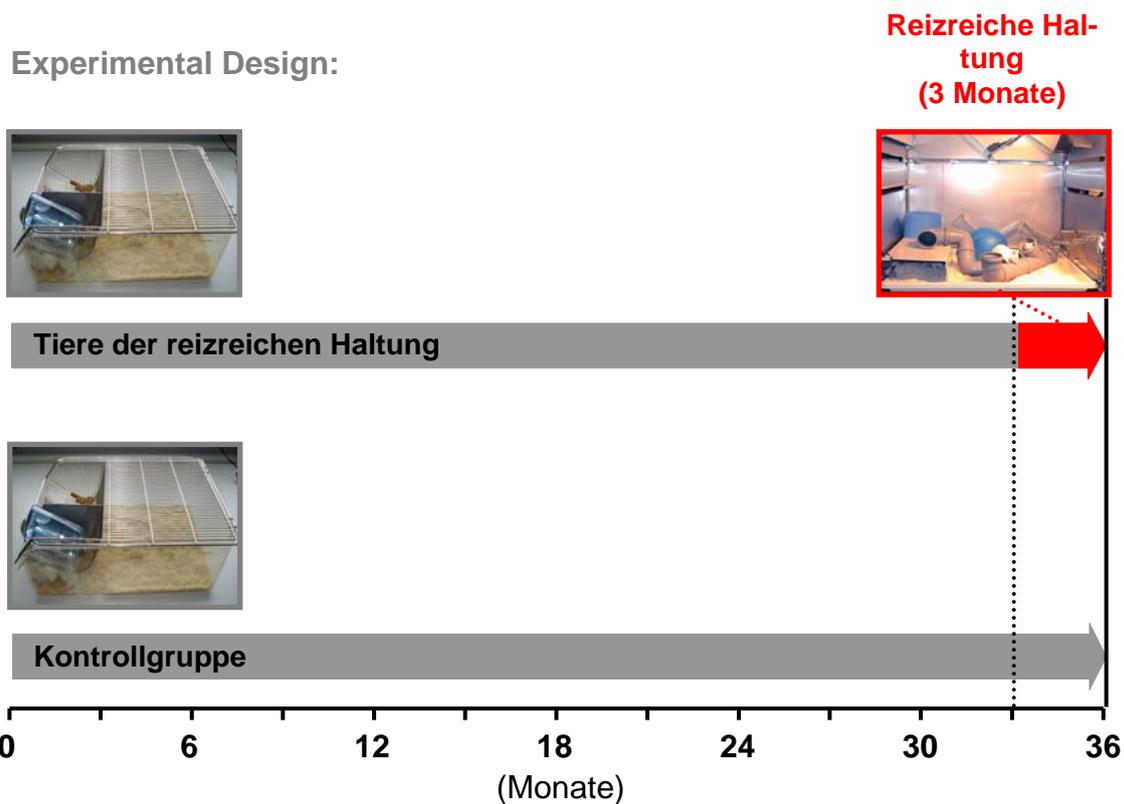


Abb. 2a:

Schematische Darstellung des experimentellen Designs. Der untere Pfeil stellt die Lebensdauer der Tiere unter Standardbedingungen bis zur Perfusion im Alter von 36 Lebensmonaten dar. Der darüber liegende Pfeil zeigt, dass die Tiere bis zum 33. Lebensmonat unter Standardbedingungen gehalten wurden und die letzten drei Monate ihres Lebens bis zur Perfusion in der reizreichen Umgebung zugebracht hatten. Der Eichbalken entspricht 3 Lebensmonaten.



Abb. 2b:
Darstellung der Innenausstattung der Käfige der reizreichen Haltung.

Es wurden jeweils 4-5 Tiere gemeinsam in einem Käfig gehalten. Dadurch waren soziale Interaktionen möglich. Verhaltensänderungen und elektrophysiologische Auswirkungen der reizreichen Umgebung wurden durch Berkefeld und Godde (Berkefeld et al. 1996, Godde et al. 2000, Godde et al. 1996, Godde et al. 1995) beschrieben.

Die 8 Kontrolltiere wurden ebenfalls in 4er Gruppen in Standardkäfigen (54 x 33 x 18,5 cm; Länge x Breite x Höhe) gehalten; diese waren deutlich kleiner als die Käfige der reizreichen Umgebung. Das Futter wurde immer an derselben Stelle deponiert. Im Inneren des Käfigs befanden sich keine Leitern, Styroporblöcke und Pappkartons. Diese Versuchsgruppe wurde somit nicht mit Neuerungen in ihrem Lebensraum konfrontiert.

4.3 Gewebegewinnung

4.3.1 *Transkardiale Perfusion und Gewebeaufbewahrung*

Die transkardiale Perfusion wurde nach dreimonatigem Aufenthalt in der reizreichen Umgebung durchgeführt. Dabei wurde das Gewebe für die immunhistochemische Behandlung nach der Peroxidase-Methode fixiert. Die Tiere wurden in einen Glaszylinder überführt, in dem sich in Äther getränkter Zellstoff befand und in den ein Lachgas-Sauerstoff-Gemisch im Verhältnis von 7 : 3 eingeleitet wurde. Zur Erhaltung der Narkose wurde dem jeweiligen Tier ein Zylinder, welcher ebenfalls in Äther getränkten Zellstoff enthielt, über die Nase gehalten. Das Tier wurde daraufhin in tiefer Narkose in einer Plastischale auf den Rücken gelegt und an allen vier Extremitäten fixiert. Durch einen Medianschnitt wurde die Bauchdecke bis zum Sternum geöffnet, anschließend wurde der Thoraxraum durch Durchtrennen der Rippen von unten nach oben auf beiden Seiten freigelegt. Das Herz wurde frei präpariert und mit Klemmen fixiert. In dem linken Ventrikel wurde mit Hilfe eines Skalpells eine kleine Öffnung geschaffen, durch die ein Katheter bis in die Aorta ascendens vorgeschoben wurde. Der rechte Ventrikel wurde ebenfalls punktiert, um die Lösung aus dem großen Kreislauf wieder entfernen zu können. Daraufhin wurde eine Perfusionspumpe (505s Watson-Marlow, England) an den Katheter angebracht, um mit einer kontinuierlichen Flussgeschwindigkeit von 35 ml/min, zuerst mit 45 ml phosphatgepufferter Normalsalzlösung (PBS) und anschließend mit 300 ml 4 % ige paraformaldehydhaltigem Fixativ (Zamboni) bei 4 °Celsius zu perfundieren.

Nachdem die Perfusion (2 min Spüllösung und 10 min Fixativ) beendet war, wurden die Tiere sofort dekaptiert. Nach Trepanation des Schädels und vorsichtiger Eröffnung der Dura mater wurden die Gehirne entnommen und über Nacht in 50 ml Fixativlösung inkubiert.

Zur Nachfixation wurden die entnommenen Gehirne für 3 Stunden in Zamboni - Lösung gelegt. Anschließend wurden sie 3 - 12 Stunden in 50 ml 10 % iger und daraufhin 24 bis 48 Stunden in 50 ml 30 % iger Saccharose in 0,1 M PBS inkubiert. Die Gehirne wurden in der Lösung liegen gelassen, bis sie darin abgesunken waren, um sie vor Gefrierschäden zu bewahren. Zur weiteren Lagerung wurden die Gehirne wie folgt behandelt: zuerst wurden 40 ml 2-Methylbutan in einem kleinen Gefäß mit Hilfe von Trockeneis auf eine Temperatur von -30 °Celsius gekühlt und die Hirne dann für ca. 30 - 40 Sekunden eingefroren. Um irreparable Gefrierartefakte bei diesem Verfahren zu vermeiden, durfte die -30 °C-Marke nicht unterschritten werden. Die Gehirne wurden in einem Tiefkühlschrank bei -75 °C gelagert.

4.3.2 Perfusionslösungen

Spüllösung: 0,1 M phosphatgepufferte Normalsalzlösung, pH 7,4 (PBS). Diese Lösung wurde bei 4 °C perfundiert, um das Blut aus dem Gefäßsystem zu entfernen. Die Spüllösung setzt sich wie folgt zusammen: 1800 ml Aqua dest. als Puffer, 165 ml Base (42,88 g Na_2HPO_4 anhydriert und 35 ml Säure (13,799 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 79,478 g NaCl, 100 ml Aqua dest.).

Fixationslösung: Die Fixationslösung besteht aus Performaldehyd und Pikrinsäure mit Glutaraldehyd (Fritschy und Mohler 1995). Sie wurde wie folgt hergestellt: 40 g Paraformaldehyd, gelöst in 300 ml Aqua dest. bei 60 °C, 500 ml 0,15 M Phosphatpuffer (PB), pH 7,4, 150 ml gesättigte Pikrinsäure, 200 µl einer 25 % igen Glutaraldehydlösung und 1000 ml Aqua dest.. Die Zusammensetzung lässt sich folgendermaßen beschreiben: 28,5 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ in 800,1 Aqua dest., 8,3 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ in 300 ml Aqua dest. (Somogyi und Takagi 1982).

4.3.3 Herstellung der Hirnschnitte

Die Gehirne wurden bei Raumtemperatur über Nacht in 0,1 molarem Citratpuffer pH 4,5 (Na_2HPO_4 35,6 g/l und Zitronensäure 21,0 g/l im Verhältnis 1 : 1 inkubiert. Anschließend wurden die Gehirne einer Mikrowellenbehandlung bei 650 Watt für 135 sec ausgesetzt. Diese spezifische Vorbehandlung der Gehirne diente zur Verbesserung der Nachweisbarkeit der GABA_A -Rezeptor-Untereinheiten durch spezifische Antikörper (Fritschy et al. 1998a, Loup et al. 1998).

Am Folgetag wurde mit Hilfe eines Skalpells ein Teil des vorderen Hirnpols, der Hirnstamm, das Zerebellum und Teile des Okzipitallappens abgetrennt. Vor dem Schneiden wurden an dem so entstandenen Hirnblock mittels eines Atlases (Zilles) drei koronare Schnittebenen festgelegt: Die erste Schnittebene liegt bei Bregma 0,7 mm bis -0,3 mm, die zweite Schnittebene bei Bregma -1,8 mm bis -2,0 mm und die dritte bei Bregma -2,8 mm bis -3,3 mm. Aus diesen drei Ebenen wurden je sechs Schnitte weiterverarbeitet. Der erste Schnitt wurde immunhistochemisch mit dem neuronalen Marker NeuN (Anti neuronal nuclei Antigen) angefärbt, wohingegen die restlichen fünf Schnitte für den immunhistochemischen Nachweis der GABA_A -Rezeptor-Untereinheiten $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 5$ und $\gamma 2$ verwendet wurden.

Mit einem Gefrierschnittmikrotom (Mikrotom HM400, Heidelberg) wurden 60 μm Hirnschnitte angefertigt. Diese Schnitte wurden mit einem feinen Pinsel von der Klinge genommen und in eiskalte Pufferlösung (PBS 0,1 molar) gelegt.

4.4 Färbemethoden

4.4.1 Immunhistochemische Färbung

Gefärbt wurde nach der Avidin-Biotin-Methode (Abb. 3). Diese immunhistochemische Färbung wird in zwei Schritten durchgeführt. Im ersten Schritt wird das Antigen mit einem spezifischen Antikörper inkubiert. Anschließend wird ein zweiter Antikörper, der gegen das Fc-Fragment des primären Antikörpers (jetzt als Antigen wirkend) gerichtet ist, aufgetragen. Der speziesspezifische Antikörper verfügt mit seinem Fc-Fragment über eine Bindungsstelle für Enzyme. Hierdurch kommt es dann zu der Chromogen-substratreaktion.

Die Avidin-Biotin-Methode nutzt die starke Affinität von Avidin (64 Dalton) für das Vitamin Biotin (244 Dalton) zur Bildung von Komplexen aus enzymmarkierten Avidin-Biotin-Komplexen mit biotinyliertem Sekundärantikörper (ABC-Methode) (Hsu, 1980). Avidin ist ein Glykoprotein aus vier fast identischen Untereinheiten, wovon jede ein Biotinmolekül binden kann. An diesem Komplex findet die Färbereaktion durch Diaminobenzidinhydrochlorid (DAB) als Chromogen und Wasserstoffperoxid als Redoxagens statt.

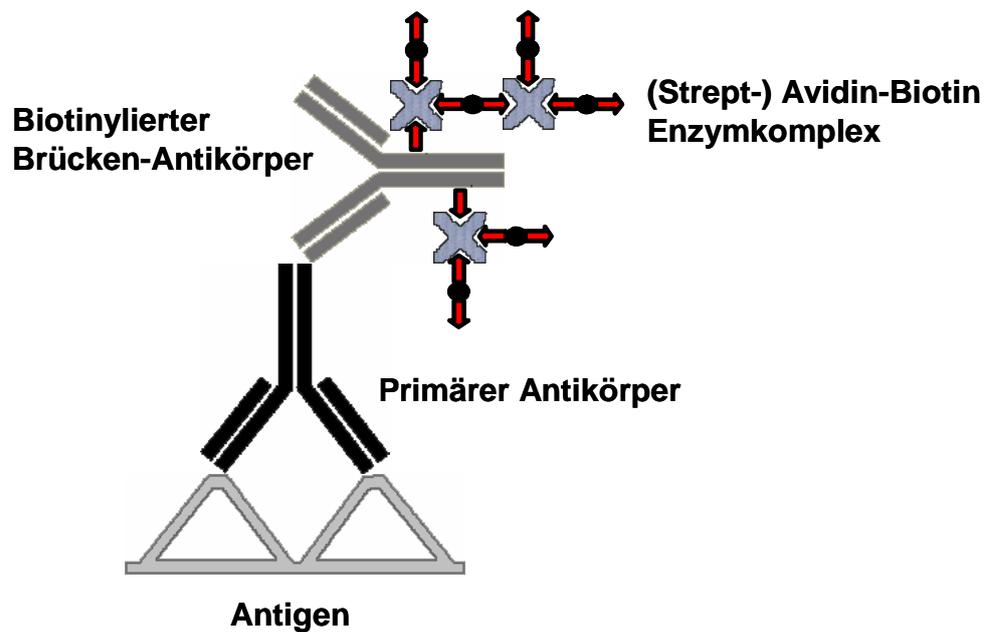


Abb. 3:

Schematische Darstellung der (Strept-)Avidin-Biotin-Methode. Sie nutzt die starke Affinität von Avidin oder Streptavidin für Biotin zur Bildung von Komplexen aus enzymmarkierten Avidin-Biotin-Komplexen mit biotinylierten Sekundär-AK (ABC-Methode). Das Biotin ist kovalent an den AK gebunden mit biotinyliertem Sekundärantikörper (Biotinylierter Brücken-Antikörper). Als Enzym wird am häufigsten Meerrettichperoxidase oder alkalische Phosphatase verwendet.

4.4.2 Färbung der GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten

Zur Färbung der fünf GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 5$ und $\gamma 2$ (Abb. 4) wurden polyklonale speziesspezifische Antikörper verwendet. Diese Antikörper wurden in Voruntersuchungen bereits ausführlich beschrieben (Redecker et al. 2000, Fritschy et al. 1998a, Fritschy und Mohler 1995, Fritschy et al. 1998b). Die frei flottierenden Hirnschnitte wurden in Kunststoffschälchen gelegt, die 4 ml fassende Vertiefungen aufwiesen. Danach wurden sie dreimal in 0,2 molarem Tris-Puffer, pH 7,4 mit Triton gewaschen. Als nächstes wurden die Schnitte mit einem Pinsel vorsichtig in den Vorinkubationspuffer umgesetzt, wobei darauf geachtet wurde, dass diese faltenfrei in der Lösung lagen. Folgende Verdünnungen der primären Antikörperlösungen wurden entsprechend der Affinität der Untereinheiten angesetzt: $\alpha 1$ -Untereinheit: 1 : 20.000; $\alpha 2$ -Untereinheit: 1 : 2.000; $\alpha 3$ -Untereinheit: 1 : 2.000; $\alpha 5$ -Untereinheit: 1 : 4.000 und $\gamma 2$ -Untereinheit (Meerschweinantisera): 1 : 2.000. Die Schnitte inkubierten über Nacht in der primären Antikörperlösung bei 4 °C.

Vor dem nächsten Arbeitsschritt wurden die Schnitte abermals dreimal in der Tris-Triton-Lösung (pH 7,4) gewaschen. Daraufhin wurden sie bei Raumtemperatur für 30 min in einer Lösung aus sekundärem biotinyliertem Antikörper verdünnt und in Tris-Puffer mit 2 % normalen Ziegenserum 1 : 300 (Ziege-anti-Meerschwein, Jackson Immuno-Research, West Grove, PA) inkubiert. Nach diesem Arbeitsschritt erfolgte ein erneuter Waschgang mit Tris-Triton-Puffer pH 7,4, der dreimal wiederholt wurde. 30 min vor Gebrauch wurde der Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex (Vectastain. Elite Kit, Vecastain Laboratories, Burlingame, CA) bei Raumtemperatur angesetzt, um eine Vernetzung der Avidin-Moleküle mit den biotinylierten Peroxidase-Molekülen möglich zu machen. In dem entstandenen Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex inkubierten die Hirnschnitte nun 30 min; anschließend wurden sie nochmals dreimal für 10 min in Tris-Triton-Puffer gewaschen.

Als Farbstoff wurde Diaminobenzidin (DAB) (Sigma, St. Louis, MO) verdünnt in Tris-Triton-Lösung, pH 7,7, verwendet. In die Vertiefungen der Kunststoffschälchen wurde je 2 ml DAB gegeben und darin die Schnitte für 5 min präinkubiert. Die Färbereaktion setzte mit dem Zusatz eines DAB-H₂O₂-Gemisches ein (2 ml/Vertiefung). Um die Faltenbildungen zu vermeiden, wurden die Schnitte während der Färbung vorsichtig mit einem Pinsel bewegt. Das Überführen der Schnitte in kalte PBS-Lösung beendete die Färbereaktion. Die Färbereaktionszeiten lagen zwischen 5-10 min.

Die nun durch die DAB-Färbung charakteristisch braun gefärbten Schnitte wurden noch zweimal in PBS-Lösung gewaschen und daraufhin mit Gelatine auf Objektträger aufgezogen und getrocknet. Zum Entwässern wurden die Schnitte folgendermaßen behandelt: sie wurden für je 3 - 4 min erst in 70 % iges Isopropanol (140 ml Isopropanol, 60 ml Aqua dest.), daraufhin in 96 % iges Isopropanol (192 ml Isopropanol, 8 ml Aqua dest.), anschließend in 100 % iges Isopropanol und zuletzt in Xylol getaucht. Bis zum Eindeckeln der Schnitte blieben sie in Xylol liegen. Zum Eindeckeln wurden die Schnitte mit 2-3 Tropfen Toluol (Entellan; Merck, Darmstadt) beträufelt, bevor das Deckglas blasenfrei aufgebracht wurde.



Abb. 4:
Schematische Darstellung des Färbeprotokolls

4.4.3 NeuN-Färbung

Die NeuN-Färbung (Antineuronal nuclei) hatte den gleichen Ablauf wie die immunhistochemische Färbung der GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 5$ und $\gamma 2$. Es wurden jedoch andere Antikörper genutzt. Als primärer Antikörper wurde in Mäusen kultivierte Antisera im Verhältnis 1 : 1000 und als sekundärer Antikörper wurde ein biotinylierter Ziege-anti-Maus-Antikörper verwendet.

4.4.4 Färbemedien

1. Phosphatpuffer (PBS):

17,5 ml Säure wurden in 500 ml Aqua dest. gegeben. Anschließend wurde mit einer basischen Komponente die saure Komponente auf pH 7,4 titriert und mit Aqua dest. auf 1 l aufgefüllt. Säure: 13,799 g NaH₂PO₄*H₂O, 79,487 g NaCl 1 l H₂O; Base: 28,392 g Na₂HPO₄, 158,957 g NaCl, 1 l H₂O.

2. Tris-Triton:

Diese Lösung diente zum Aufbrechen der Zellmembranen zur Erleichterung der Antikörperbindung. Für die Lösung wurden 0,5 molares Tris (60,55 g/l Aqua dest.) und 1,5 molares NaCl (73,80 g/l Aqua dest.) verwendet. Die Stocklösung wurde 1 : 10 mit HCl auf pH 7,4 bzw. pH 7,7 titriert und 0,05 % Triton X zugegeben.

3. Primäre Antikörperlösung:

Diese Lösung enthielt den primären Antikörper (zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. J. - M. Fritschy, Institut für Pharmakologie, Universität Zürich), welcher mit 32 ml Tris-Triton pH 7,4 und 640 μ l normalem Ziegenserum NGS (normal goat serum, Dianova, Hamburg) vermischt wurde. Das Verhältnis Tris-Triton : NGS betrug 1 : 50. Für die NeuN-Färbung wurde entsprechend der primäre Maus-Antikörper genommen.

4. Sekundäre Antikörperlösung:

Für diese Lösung wurde ein zweiter biotinylierter Antikörper von der Ziege gewonnen, der sich mit seinem F_{ab}-Epitop gegen das Epitop des F_{ac}-Fragmentes des primären Antikörpers richtet: 19 ml Tris-Triton, pH 7,4, 380 µl NGS und 63,3 µl biotinylierter Ziege-anti-Meerschwein-Antikörper (Jackson, Immuno Research, West Grove, PA) mit einer Verdünnung von 1 : 300. NeuN-Färbung: 4 ml Tris-Triton, 80 µl NGS und 13,3 µl biotinylierte Ziege-anti-Maus-Antikörper, Verdünnung 1 : 300.

5. Avidin-Biotin-Reagenz:

Um die Vernetzung des Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplexes zu ermöglichen, wurde eine Lösung aus 22 ml Tris-Triton pH 7,4, 220 µl Avidin und 220 µl gelöste biotinylierte Peroxidase hergestellt.

6. Diaminobenzidinhydrochlorid (DAB):

Aus 200 ml Tris-Triton, pH 7,7 und 2,0 ml DAB wurde eine 0,025 % verdünnte Lösung hergestellt. Die Färbereaktion wurde mittels eines DAB-Wasserstoffperoxid-Peroxidasegemisches mit 0,006 % H₂O₂ ausgelöst.

4.5 Auswertung der immunhistochemischen Präparate

Zur weiteren Aufbereitung und Auswertung der immunhistochemisch gefärbten GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 5$ und $\gamma 2$ wurden die Schnitte auf einen helligkeitsstabilisierenden Beleuchtungstisch (Imaging Research Inc.; Model B90) gelegt und mit einer Charge-Coupled-Device-Kamera (CCD-Kamera Mandi, Y9220) einzeln aufgenommen. Ein Videoprozessor (Hamamatsu, DVS-300) verstärkte das analoge Kamerasignal, welches über einen AD-Wandler digitalisiert wurde. Mit Hilfe eines Imaging Programms (NIH-Image) war es möglich, regionale optische Dichten des immunhistochemischen Reaktionsproduktes zu bestimmen und die Grauwerte der Immunreaktivität farbkodiert darzustellen. Die farbkodierte Darstellung erleichtert das Erkennen der regionalen Expressionsmuster und ist darin der lichtmikroskopischen Untersuchung überlegen.

Zur Hintergrundkorrektur für die Messung der optischen Dichten wurde der Dichtewert im Corpus Callosum – eine Region in der keine GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten exprimiert sind – bestimmt und der gewonnene Wert in sämtlichen Messwerten des entsprechenden Hirnschnittes abgezogen.

Um die optische Dichtemessung durchführen zu können, wurde jeder einzelne Schnitt in folgende zytoarchitektonische Areale anhand des NeuN-gefärbten Schnittes und mit Hilfe des Atlases von Zilles (1992) eingeteilt: der frontale Kortex (FR), der Hinterpfotenrepräsentierende Kortex (HL), der Vorderpfotenrepräsentierende Kortex (FL), der primäre somatosensorische Kortex (Par1), der sekundäre somatosensorische Kortex (Par2) und die Hippokampusformation (Abb. 5).

Der Vorderpfotenrepräsentierende Kortex (FL) war nur in der am weitesten frontal gelegenen Ebene vertreten (Bregma 0,7 mm bis -0,3 mm). Die beiden Ebenen Bregma -1,8 mm bis -2,0 mm und Bregma -2,8 mm bis -3,3 mm repräsentierten die Hippokampusformation. In jedem einzelnen Gehirnschnitt wurde innerhalb dieser zytoarchitektonischen Areale die Messung der optischen Dichtewerte durchgeführt.

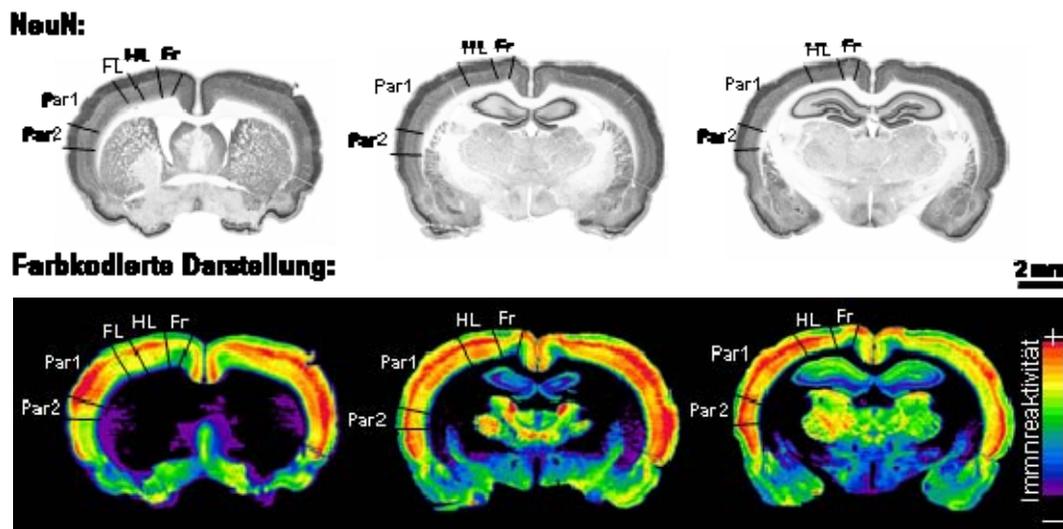


Abb. 5:

Einteilung der zytoarchitektonischen Areale anhand koronarer NeuN-gefärbter Mikroschnitte. Die NeuN-gefärbten Mikroschnitte sind in der oberen Reihe dargestellt. Die untere Zeile zeigt farbkodierte Schnitte, die mit Antikörpern gegen die $\alpha 1$ -Untereinheit des GABA_A-Rezeptors gefärbt wurden. Es sind von rechts nach links drei verschiedene Ebenen dargestellt: Bregma 0,7 mm bis -0,3 mm, Bregma 1,8 mm bis -2,0 mm und Bregma -2,8 mm bis -3,3 mm. Folgende Areale werden gezeigt: frontaler Kortex (Fr), Hinterpfotenrepräsentierender Kortex (HL), Vorderpfotenrepräsentierender Kortex (FL), primärer somatosensorischer Kortex (Par1) und sekundärer somatosensorischer Kortex (Par2). Der Eichbalken beträgt 2 mm.

Zur Erstellung der Messwerte der relativen optischen Dichte (ROD) der GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten diente das Imaging-Programm (NIH).

Die NeuN-gefärbten Schnitte wurden mit einer digitalen Kamera (AxioCam, Zeiss, Jena) aufgenommen und anschließend mit einer Bildaufnahmesoftware (Zeiss Axio Vision 2.05) und einem Imaging-Programm (Adobe Photoshop 5.0) bearbeitet. Dieses Verfahren wurde ebenfalls für die immunhistochemisch gefärbten Schnitte der GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten genutzt.

4.6 Statistische Auswertung

Die gemessenen Werte wurden in ein Tabellenkalkulationsprogramm (Microsoft Excel) übertragen und für die jeweiligen Hirnareale die Mittelwerte und Standardabweichungen (Standardfehler) berechnet. Statistisch signifikante Unterschiede wurden mit dem ungepaarten Student-t-Test ermittelt. Ein p-Wert von $< 0,05$ wurde als signifikant bzw. von $< 0,01$ als hochsignifikant bewertet. Um das unkontrollierte Ansteigen des α -Fehlers beim multiplen Testen zu korrigieren, wurde der Student-t-Test durch die Bonferroni-Holm-Methode ergänzt.

Die Diagramme wurden mit dem Programm Sigma Plot (Version 8.0) erstellt.

5. Ergebnisse

5.1 Expression der GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten im Hirn alter Ratten

Die immunhistochemische Färbung zeigt bei Tieren der Standardhaltung für die jeweiligen GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 5$ und $\gamma 2$ ein spezifisches, regional differentielles Expressionsmuster (Abb. 6 und Abb. 7). Die $\alpha 1$ und $\gamma 2$ Untereinheiten sind im gesamten Kortex mit Betonung auf die Schichten III und IV gleichmäßig verteilt. In den oberen Schichten des Neokortex wird überwiegend die $\alpha 2$ -Rezeptor-Untereinheit gefunden, wohingegen die Untereinheiten $\alpha 3$ und $\alpha 5$ gehäuft in den tieferen Schichten vorkommen. Das Laminierungsmuster der Untereinheiten im sehr alten Gehirn entspricht weitgehend der von Fritschy und Mohler (Fritschy und Mohler 1995) an sechs Monate alten Ratten beschriebenen Verteilung. Die Expressionsmuster werden in folgendem detailliert ausgeführt.

5.1.1 Neokortikale Expression

Die $\alpha 1$ -Untereinheit zeigt zusammen mit der $\gamma 2$ -Untereinheit die stärkste Immunreaktivität im Kortex. Beide Untereinheiten besitzen ein sehr ähnliches Verteilungsmuster. Die Rezeptoruntereinheit $\alpha 1$ ist vorwiegend in den Schichten I, III-IV und IVa zu finden, wohingegen sie in den Schichten II, V und IVb eine sehr geringe Expression aufweist. Die Färbung ist im Neuropil sehr ausgeprägt. Unter hoher Auflösung kann man eine starke Anfärbung des Somas und der Dendriten der Interneurone erkennen, die Pyramidenzellen sind jedoch nur sehr gering gefärbt.

Die $\alpha 2$ -Untereinheit weist im Vergleich zur $\alpha 1$ -Untereinheit ein komplementäres Verteilungsmuster auf. Die Immunreaktivität dieser Rezeptoruntereinheit ist in den Regionen am stärksten, in denen die $\alpha 1$ -Untereinheit keine oder nur eine geringe Reaktivität zeigt. Die $\alpha 1$ -Untereinheit ist wiederum in den Regionen am stärksten vertreten, in denen $\alpha 2$ kaum oder gar nicht auftritt. Die Rezeptor-Untereinheit $\alpha 2$ ist überwiegend in den äußeren Schichten I-IV zu finden; in den Schichten V und VI kommt sie kaum vor. Das Neuropil ist diffus gefärbt. Deutlich angefärbt sind der piriforme Kortex und der Corpus Amygdaloideum.

Die $\alpha 3$ -Untereinheit ist im Gegensatz zur $\alpha 2$ -Untereinheit am stärksten in den Schichten V und VI vorhanden, wohingegen die Schichten I-IV beinahe ungefärbt erscheinen. Zahlreiche Pyramidenzellen sind zusammen mit ihren apikalen Dendriten in hoher Auflösung deutlich zu erkennen. Im Vergleich zu den anderen Untereinheiten zeigt die $\alpha 3$ -Untereinheit eine gewisse Selektivität in ihrer regionalen Verteilung. Im frontalen Kortex (FR) ist die Färbung etwas weniger stark ausgeprägt. Auch der Corpus Amygdaloideum und der piriforme Kortex weisen eine hohe Immunreaktivität auf.

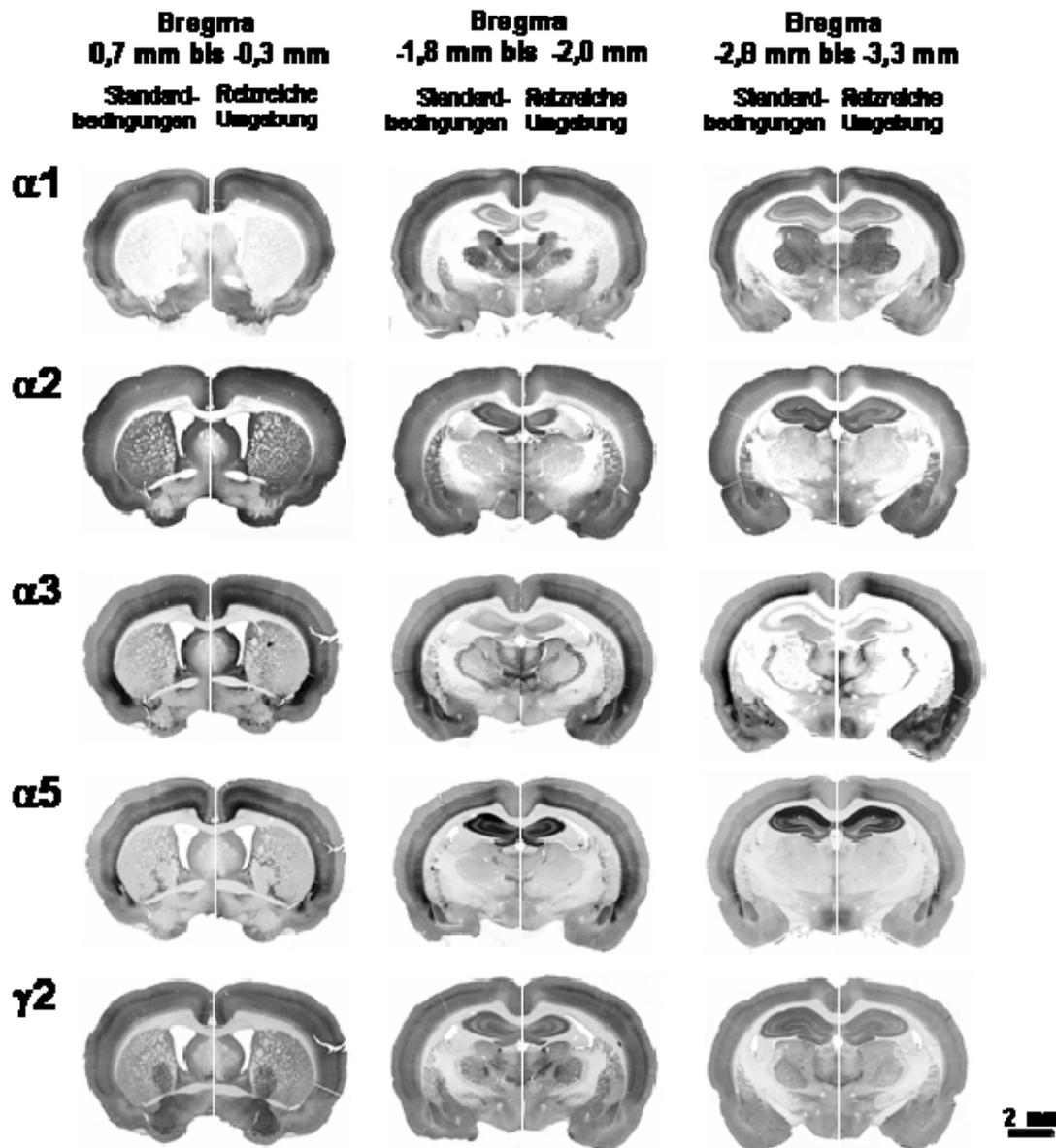


Abb. 6:
Immunhistochemisch gefärbte koronare Gehirnschnitte der GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 5$ und $\gamma 2$. Dargestellt sind die Schnittebenen Bregma 0,7 mm bis -0,3 mm, Bregma -1,8 mm bis 2,0 mm und Bregma -2,8 mm bis -3,3 mm. Es ist jeweils die Hemisphäre eines Tieres der Standardhaltung neben eine Hemisphäre eines Tieres der reizreichen Umgebung gestellt worden. Zu erkennen ist der Anstieg der Immunreaktivität der Tiere der reizreichen Umgebung in den $\alpha 3$ - und $\alpha 5$ -Rezeptor-Untereinheiten. Das laminäre Expressionsmuster ist dabei unverändert.

Die Immunreaktivität der $\alpha 5$ -Rezeptor-Untereinheit ist schwach und diffus in den Schichten I-IV verteilt. Besonders stark repräsentiert sie sich in der Schicht VI, in der zahlreiche Neurone stark angefärbt erscheinen. In Schicht V ist diese Untereinheit nur mäßig vorhanden. Bemerkenswerterweise ist $\alpha 5$ in der Schicht IV der primären sensorischen Gebiete nicht zu finden, wodurch eine klare Abgrenzung zu den anliegenden Gebieten entsteht. Auch hier lässt sich ein regionales Verteilungsmuster erkennen: der frontale Kortex (FR) weist eine stärkere Immunreaktivität im Vergleich zur $\alpha 3$ -Untereinheit auf, dafür zeigt der somatosensorische und der okzipitalen Kortex eine geringere Immunreaktivität als die $\alpha 3$ -Untereinheit. Der Hippokampus ist sehr stark angefärbt.

Wie die $\alpha 1$ -Untereinheit ist die $\gamma 2$ -Rezeptor-Untereinheit in den Schichten I, III-IV und IVa am stärksten ausgeprägt. In den übrigen Schichten ist die Immunreaktivität schwächer. In den Schichten III und IV findet man die prägnanteste Anfärbung in allen zytoarchitektonischen Arealen des Neokortex. In den Schichten I, IV und IVb ist, wie bei der $\alpha 1$ -Untereinheit, eine geringere Färbung zu finden. Das Neuropil weist eine starke Immunreaktivität auf.

5.1.2 Hippokampale Expression

In der Hippokampusformation ist die $\alpha 5$ -Rezeptor-Untereinheit am stärksten exprimiert, wohingegen die Untereinheiten $\alpha 2$ und $\gamma 2$ eine geringere Immunreaktivität aufweisen. Am schwächsten ausgeprägt ist im Vergleich zu den anderen Untereinheiten die Immunreaktivität der Untereinheiten $\alpha 1$ und $\alpha 3$.

Die $\alpha 1$ -Untereinheit weist eine klare Verteilung in den dendritischen Schichten des Ammonhorns und des Gyrus dentatus auf. Für diese Untereinheit war jedoch die starke Färbung der $\alpha 1$ -positiven GABAergen Interneurone der pyramidalen und granulären Zellschichten und der polymorphen Schicht des Gyrus dentatus sehr charakteristisch.

Expression der einzelnen GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten bei Tieren der Standardhaltung

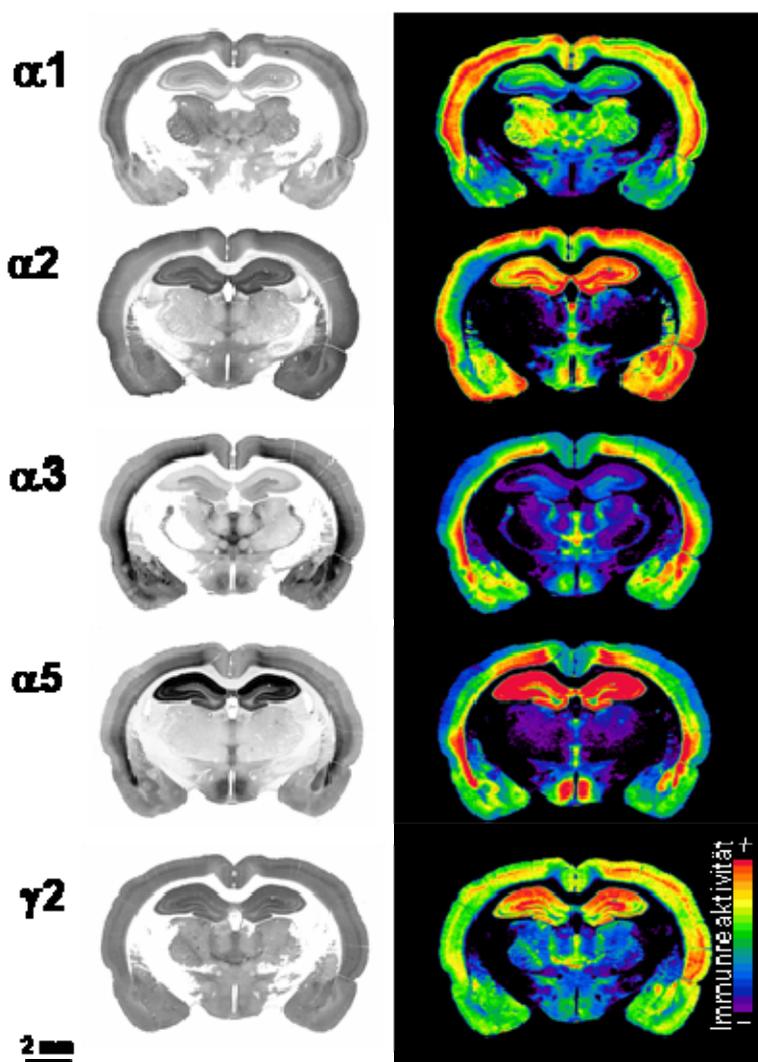


Abb. 7:
Expressionsmuster der GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 5$ und $\gamma 2$ im Gehirn alter Ratten (36 Monate). Die Abbildung zeigt auf der linken Seite die immunhistochemische Färbung und auf der rechten Seite die farbkodierte Darstellung.

Die $\alpha 2$ -Untereinheit ist am stärksten im Gyrus dentatus exprimiert; im Vergleich dazu sind die restlichen Areale der Hippokampusformation für diese Untereinheit nur schwach immunreaktiv.

Für die $\alpha 3$ -Rezeptor-Untereinheit wird in allen Strukturen des Hippokampus nur eine sehr geringe Immunreaktivität gefunden.

Die $\alpha 5$ -Rezeptor-Untereinheit zeigt verglichen mit der $\alpha 2$ -Untereinheit ein komplementäres Verteilungsmuster: Im Gyrus dentatus ist diese Untereinheit kaum zu finden, wobei der restliche Hippokampus eine starke Immunreaktivität aufweist. Diese Untereinheit stellt die Untereinheit mit der stärksten Expression in der Hippokampusformation dar.

Wie die $\alpha 2$ -Untereinheit ist die $\gamma 2$ -Rezeptor-Untereinheit für das Ammonshorn nur schwach immunreaktiv. Etwas stärker ist diese Untereinheit jedoch im Gyrus dentatus exprimiert.

5.2 Veränderungen der Expression von GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten nach Transfer in eine reizreiche Umgebung

Im Vergleich zu den Tieren, die unter Standardbedingungen untergebracht waren, zeigten die Tiere der reizreichen Haltung bei mikroskopischer Betrachtung der einzelnen Gehirnschnitte einen Anstieg der Immunreaktivität für die Rezeptor-Untereinheiten $\alpha 3$ und $\alpha 5$. Die Messung der optischen Dichten innerhalb der zytoarchitektonischen Areale ergab eine signifikante Erhöhung dieser Untereinheiten. Im Vergleich dazu war das Expressionsmuster der Untereinheiten $\alpha 1$, $\alpha 2$ und $\gamma 2$ nicht verändert. Dieses Verteilungsmuster wurde in allen drei Schnittebenen gefunden, das laminäre kortikale Expressionsmuster blieb dabei erhalten (Abb. 8, Abb. 9, Abb. 10, Abb. 11).

5.2.1 Neokortikale Veränderungen

Für die GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten $\alpha 1$ und $\alpha 2$ ließ sich nach Haltung in einer reizreichen Umgebung keine Veränderung der Immunreaktivität feststellen. Die $\alpha 1$ -Rezeptor-Untereinheit war weiterhin überwiegend in den Schichten II, V und Vb zu finden, wohingegen sie in den Schichten III und IVb kaum vertreten war. $\alpha 2$ wies auch hier im Vergleich zu $\alpha 1$ ein komplementäres Expressionsmuster auf: Die Immunreaktivität war in den Regionen stark ausgeprägt, in denen $\alpha 1$ kaum vertreten war. Sie entsprachen weitgehend dem von Fritschy und Mohler beschriebenen Verteilungsmuster 6 Monate alter Ratten (Fritschy und Mohler 1995).

Die Expression der $\alpha 3$ -Rezeptor-Untereinheit war bei Tieren aus der reizreichen Haltung deutlich erhöht, wobei das laminäre Verteilungsmuster unverändert blieb. Verglichen mit den optischen Dichten der Tiere aus der Standardhaltung zeigten sich in nahezu allen Hirnregionen signifikante Erhöhungen der Immunreaktivität, die im primären somatosensorischen Kortex (Par1) und im sekundären somatosensorischen Kortex (Par2) am stärksten ausgeprägt waren, aber auch den Vorderpfotenrepräsentierenden Kortex (FL) betrafen. Je nach Schnittebene lag der Anstieg der Immunreaktivität für Par1 zwischen 25% ($p=0,002$; Ebene 3) und 46,3% ($p=0,001$; Ebene 1), für Par2 zwischen 15,1% ($p=0,001$; Ebene 3) und 44,5% ($p=0,003$; Ebene 1), für HL zwischen 17,8% ($p=0,014$; Ebene 3) und 22,5% ($p=0,013$; Ebene 2), für Fr zwischen 15,8% ($p=0,017$; Ebene 3) und 18,2% ($p=0,01$; Ebene 2) und für FL bei 27,1% ($p=0,01$; Ebene 2).

Die aktivitätsbedingten Veränderungen der Immunreaktivität nach Haltung in einer reizreichen Umgebung waren für die $\alpha 5$ -Rezeptor-Untereinheit weniger stark ausgeprägt als die der $\alpha 3$ -Untereinheit: Auch hier lag je nach Schnittebene der Anstieg der Immunreaktivität für Par1 zwischen 15,9% ($p=0,008$; Ebene 2) und 19,9% ($p=0,01$; Ebene 1), für HL zwischen 11,6% ($p=0,011$; Ebene 2) und 14,8% ($p<0,018$; Ebene 3) und Fr lag bei 7,3% ($p=0,018$, Ebene 2).

Wie bereits für die Rezeptor-Untereinheiten $\alpha 1$ und $\alpha 2$ gezeigt, fand sich auch für die $\gamma 2$ -Rezeptor-Untereinheit bei Tieren, die in der reizreichen Umgebung gehalten wurden, keine wesentlichen Expressionsänderungen. Lediglich in der kaudalen Schnittebene wurde ein leichtgradiger signifikanter Anstieg der optischen Dichte im primären somatosensorischen Kortex Par1 (12,2%; $p=0,02$) beobachtet. In allen anderen Hirnregionen zeigten sich keine Änderungen.

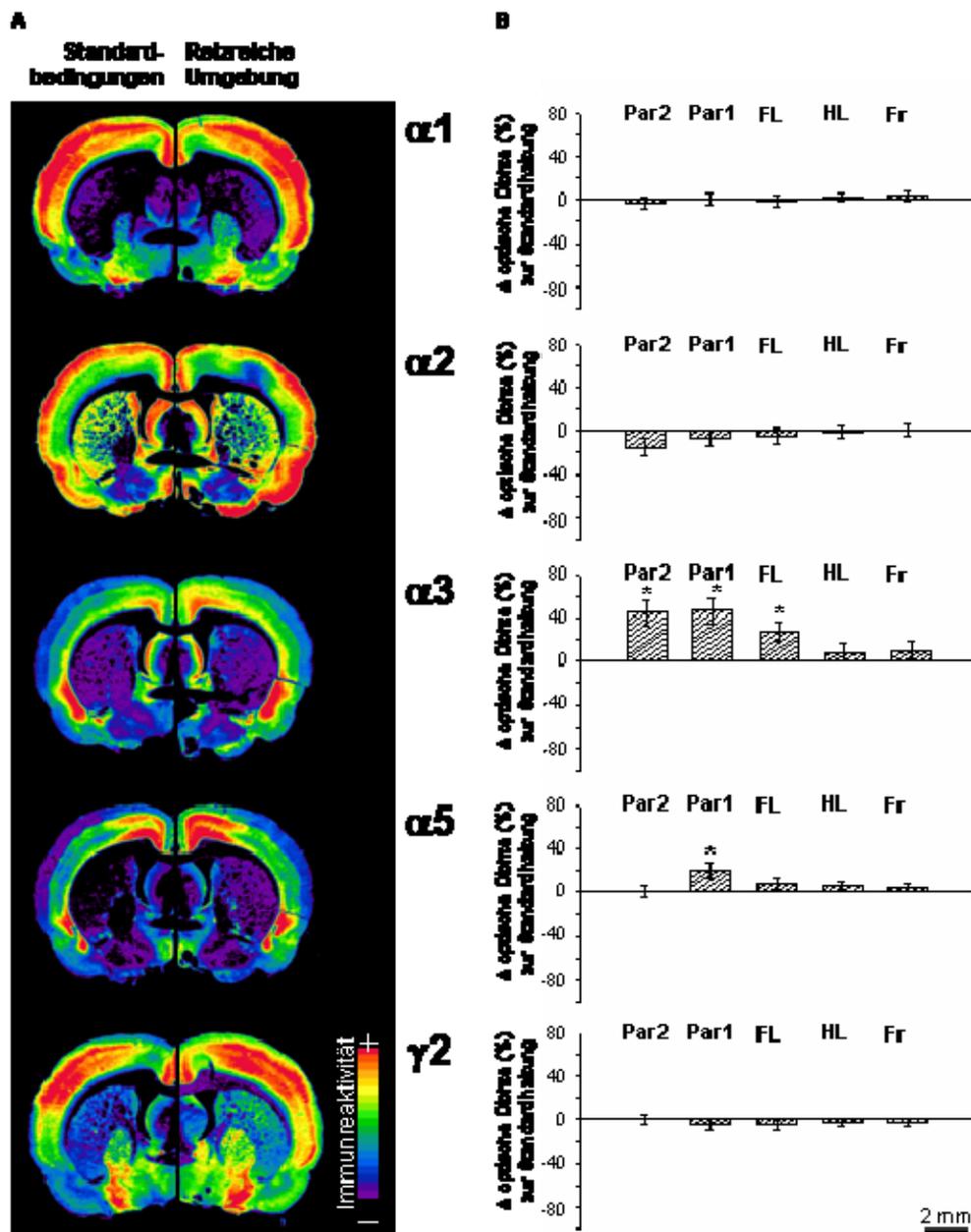


Abb. 8:

A: Farbkodierte Darstellung immunzytochemischer Hirnschnittpräparate die mit Antikörpern gegen die GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 5$ und $\gamma 2$ gefärbt wurden (Schnittebene Bregma 0,7 mm bis -0,3 mm). Linksseitig ist die Hemisphäre eines Tieres der Standardhaltung und rechtsseitig die Hemisphäre eines Tieres, das in der reizreichen Umgebung untergebracht war, dargestellt. Die Tiere der Standardhaltung zeigen ein gewöhnliches Expressionsmuster der einzelnen Rezeptoruntereinheiten. Die Tiere der stimulierenden Haltung weisen in der $\alpha 3$ - und $\alpha 5$ -Rezeptor-Untereinheit einen signifikanten Anstieg der Immunreaktivität auf. Die Untereinheiten $\alpha 1$, $\alpha 2$ und $\gamma 2$ lassen keine Veränderungen sehen. **B:** Prozentuale Veränderungen der optischen Dichten der Tiere der reizreichen Umgebung im Vergleich zu den Tieren der Standardhaltung in verschiedenen zytoarchitektonischen Hirnregionen. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung; signifikante Veränderungen ($p < 0,05$) sind mit einem * gekennzeichnet.

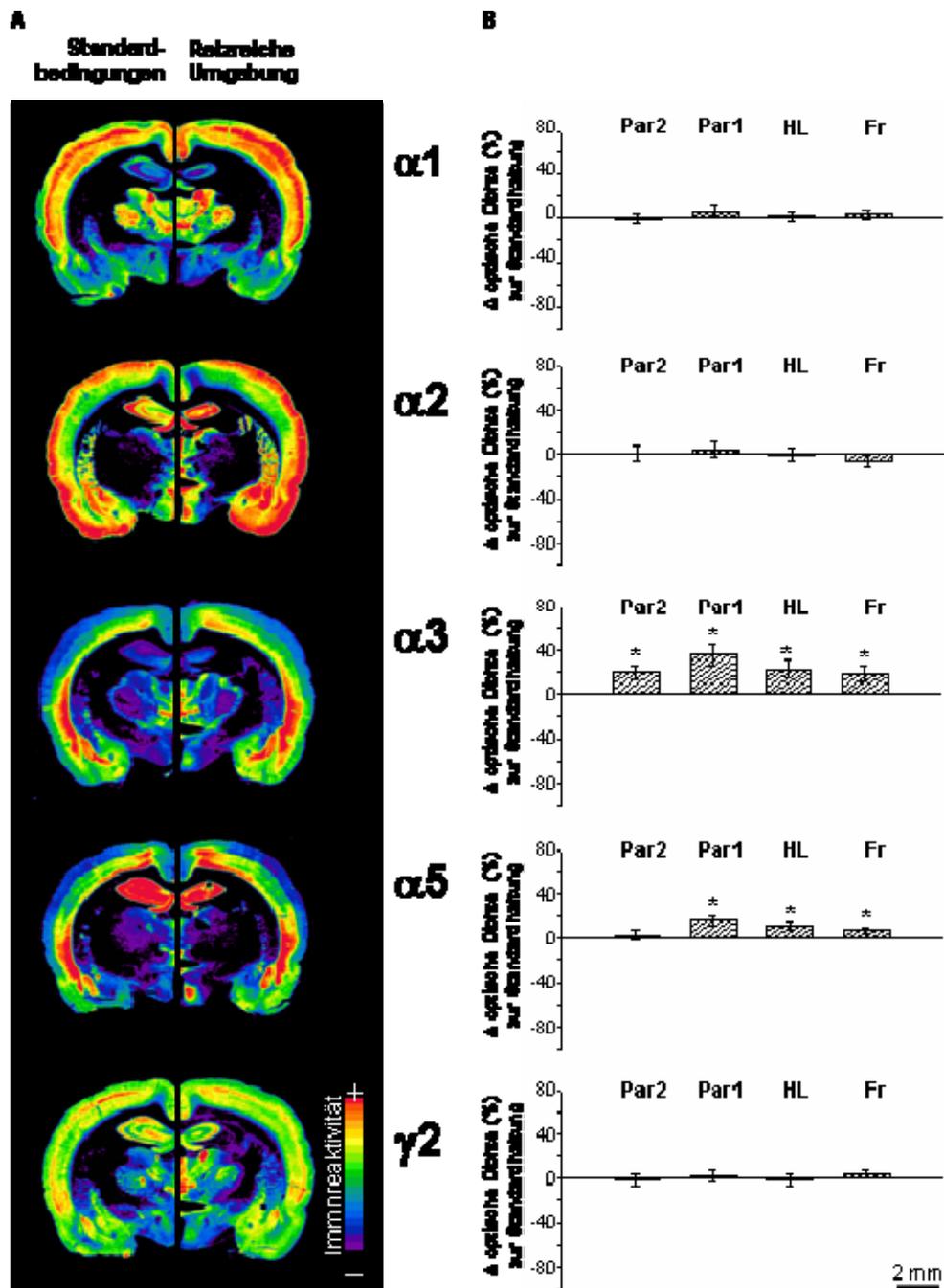


Abb. 9:

A: Farbkodierte Darstellung immunzytochemischer Hirnschnittpräparate die mit Antikörpern gegen die GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 5$ und $\gamma 2$ gefärbt wurden (Schnittebene Bregma -1,8 mm bis -2,0 mm). Linksseitig ist die Hemisphäre eines Tieres der Standardhaltung und rechtsseitig die Hemisphäre eines Tieres, das in der reizreichen Umgebung untergebracht war, dargestellt. Die Tiere der Standardhaltung zeigen ein gewöhnliches Expressionsmuster der einzelnen Rezeptoruntereinheiten. Die Tiere der stimulierenden Haltung weisen in der $\alpha 3$ - und $\alpha 5$ -Rezeptor-Untereinheit einen signifikanten Anstieg der Immunreaktivität auf. Die Untereinheiten $\alpha 1$, $\alpha 2$ und $\gamma 2$ lassen keine Veränderungen sehen. **B:** Prozentuale Veränderungen der optischen Dichten der Tiere der reizreichen Umgebung im Vergleich zu den Tieren der Standardhaltung in verschiedenen zytoarchitektonischen Hirnregionen. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung; signifikante Veränderungen ($p < 0,05$) sind mit einem * gekennzeichnet.

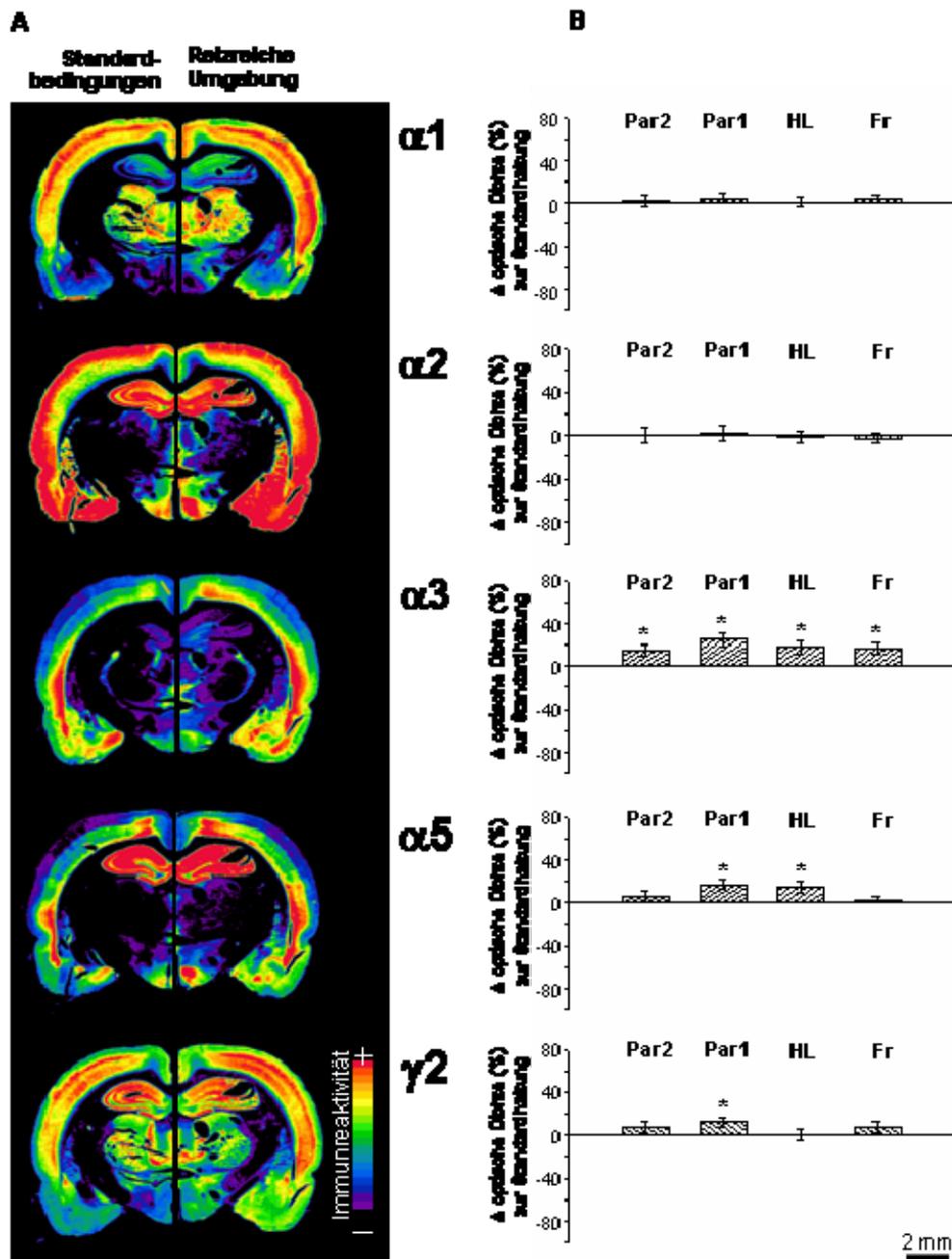


Abb. 10:

A: Farbkodierte Darstellung immunzytochemischer Hirnschnittpräparate die mit Antikörpern gegen die GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 5$ und $\gamma 2$ gefärbt wurden (Schnittebene Bregma -2,8 mm bis -3,3 mm). Linksseitig ist die Hemisphäre eines Tieres der Standardhaltung und rechtsseitig die Hemisphäre eines Tieres, das in der reizreichen Umgebung untergebracht war, dargestellt. Die Tiere der Standardhaltung zeigen ein gewöhnliches Expressionsmuster der einzelnen Rezeptoruntereinheiten. Die Tiere der stimulierenden Haltung weisen in der $\alpha 3$ - und $\alpha 5$ -Rezeptor-Untereinheit einen signifikanten Anstieg der Immunreaktivität auf. Die Untereinheiten $\alpha 1$, $\alpha 2$ und $\gamma 2$ lassen keine Veränderungen sehen. **B:** Prozentuale Veränderungen der optischen Dichten der Tiere der reizreichen Umgebung im Vergleich zu den Tieren der Standardhaltung in verschiedenen zytoarchitektonischen Hirnregionen. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung; signifikante Veränderungen ($p < 0,05$) sind mit einem * gekennzeichnet.

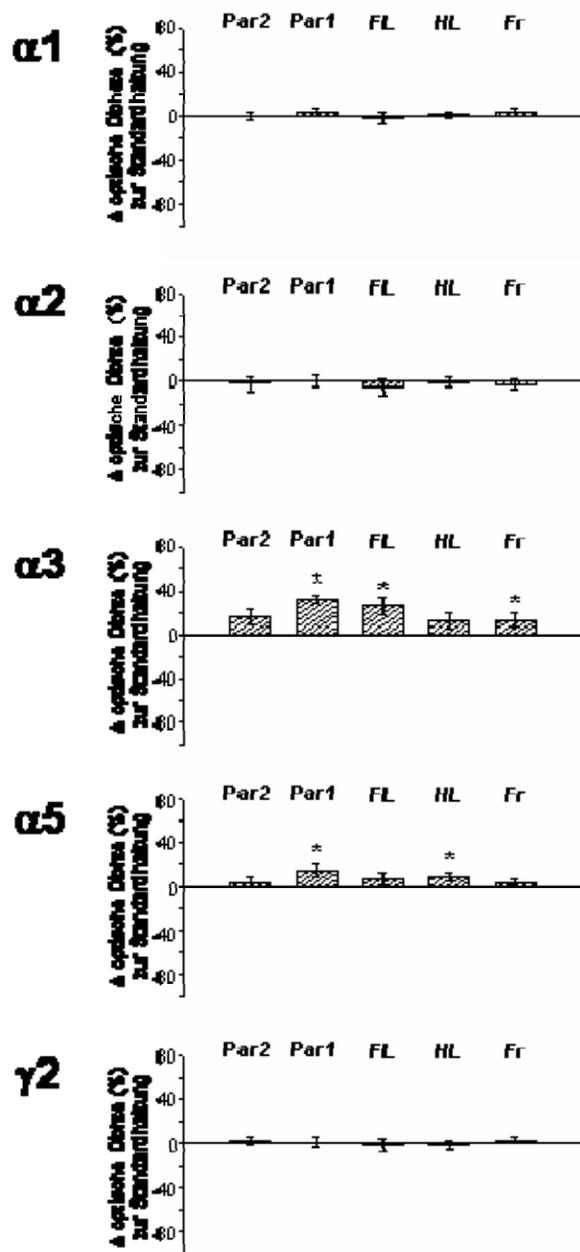


Abb. 11:

Prozentuale Änderungen der optischen Dichten der Immunreaktivität für verschiedene zytoarchitektonische Hirnregionen (Schnittebenen 1-3) nach dreimonatigem Aufenthalt in einer reizreichen Umgebung gegenüber der Standardhaltung. Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung; signifikante Veränderungen ($p < 0,05$) wurden mit einem Stern markiert.

5.2.2 Hippokampale Veränderungen

Die hippokampale Expression der GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten wurde in gleicher Weise wie die Expression im Neokortex analysiert. Mikroskopisch zeigte sich kein Unterschied innerhalb der einzelnen GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 5$ und $\gamma 2$ bei Tieren aus der reizreichen Umgebung im Vergleich zu den Tieren der Standardhaltung. Auch die Messung der optischen Dichten der Immunreaktivität zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den Tieren der reizreichen Umgebung und den Kontrollen.

Mikroskopisch ergab sich darüber hinaus kein Hinweis auf eine Änderung der optischen Dichte $\alpha 1$ -positiver GABAerger Interneurone, die in den Regionen CA1, CA3 und dem Gyrus dentatus ausgewertet wurden.

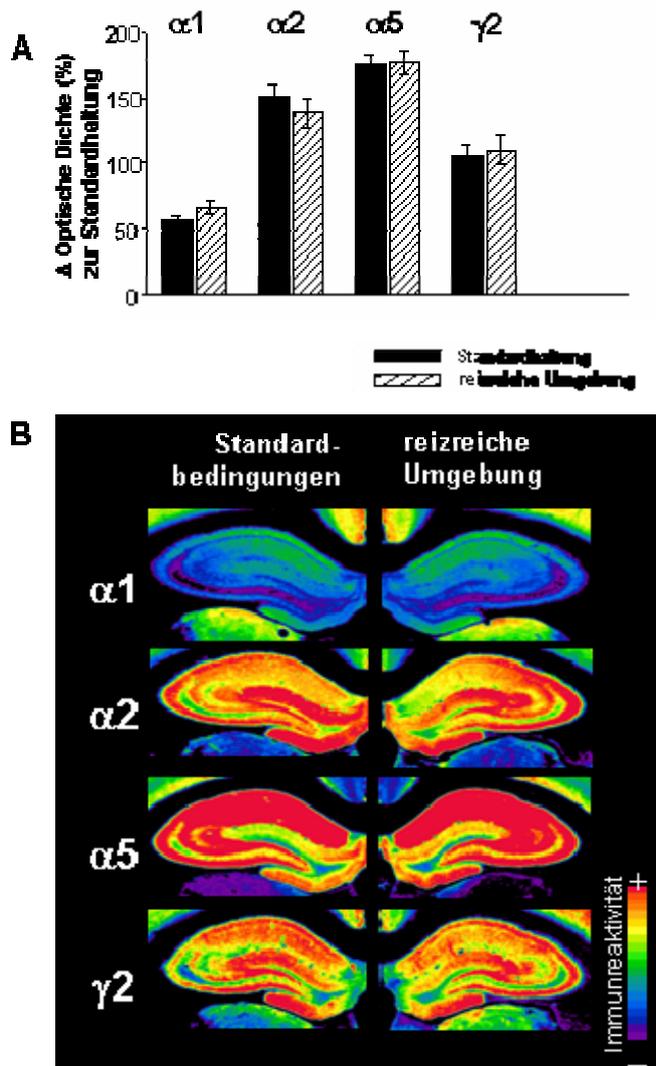


Abb. 12:

Verteilung der GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 5$ und $\gamma 2$ in der Hippokampusformation von Tieren, die in der reizreichen Umgebung untergebracht waren und von Tieren, die unter Standardbedingungen gehalten wurden.

A: Das Balkendiagramm stellt die koronaren Hirnschnitte durch die optischen Dichtewerte der Tieren der Standardhaltung und der Tieren der reizreichen Haltung dar.

B: Farbkodierte Darstellung der Hippokampusformation. Die linke Hippokampusformation der Tiere der Standardhaltung ist der linken gespiegelten Formation der Tiere der reizreichen Umgebung gegenübergestellt. Es sind keine Veränderungen der Immunreaktivität zu sehen.

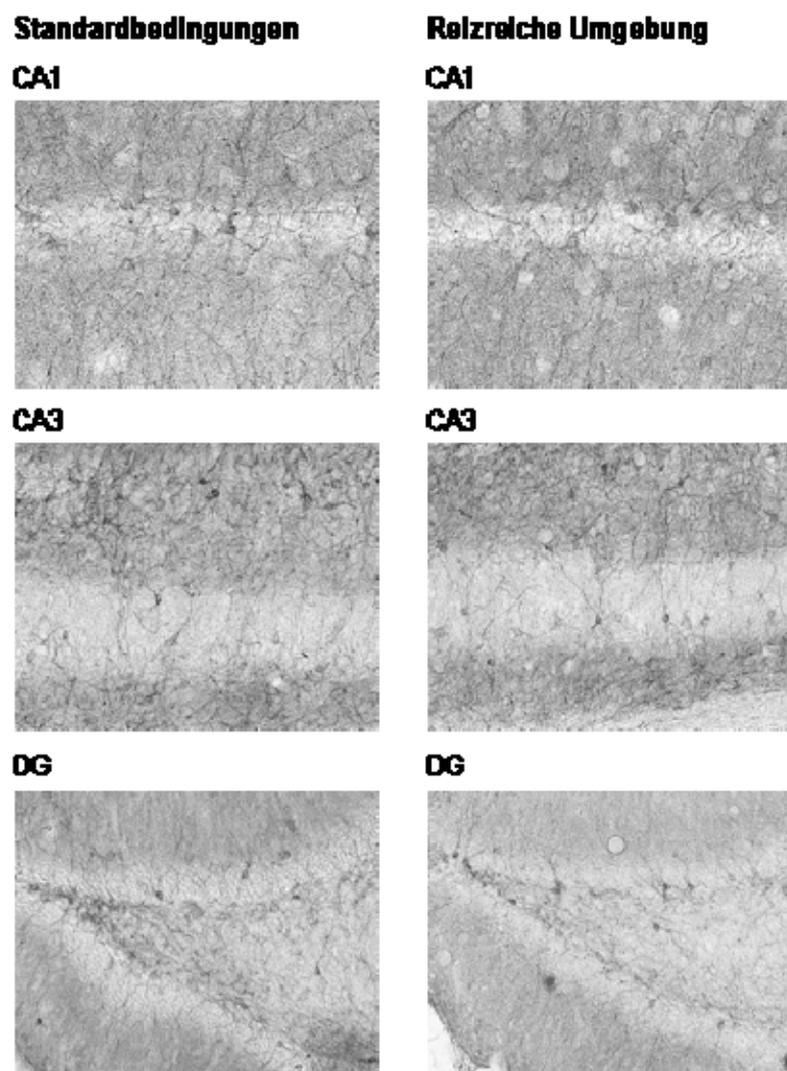


Abb. 13:
 $\alpha 1$ -positive GABAerge Interneurone im Hippokampus nach Haltung in Standardkäfigen bzw. in einer reizreichen Umgebung. Koronare Hirnschnittpräparate verschiedener Hippokampusregionen (CA1, CA3 und Gyrus dentatus), die mit Antikörpern gegen die GABA_A-Rezeptor-Untereinheit $\alpha 1$ gefärbt wurden.

6. Diskussion

Die vorliegende Studie zeigte nach Haltung der Tiere in einer reizreichen Umgebung eine spezifische Änderung des Expressionsmusters der GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten. Bei den Rezeptor-Untereinheiten $\alpha 3$ und $\alpha 5$ konnte eine signifikante Erhöhung der Immunreaktivität im Neokortex festgestellt werden, wobei die Heraufregulation der $\alpha 3$ -Rezeptor-Untereinheit stärker ausgeprägt war als bei der $\alpha 5$ -Untereinheit. Die Hippokampusformation war von diesen Veränderungen nicht betroffen; hier kam es zu keiner Modifikation der Rezeptorexpression nach Haltung in einer reizreichen Umgebung. Stets waren diese Modifikationen am deutlichsten im primären somatosensorischen Kortex Par1 zu sehen. Im Vergleich dazu blieben die Rezeptor-Untereinheiten $\alpha 1$, $\alpha 2$ und $\gamma 2$ von der angereicherten Umgebung unbeeinflusst. Ihr Verteilungsmuster entsprach weiterhin dem von Fritschy und Mohler (Fritschy und Mohler 1995) beschriebenen Expressionsmuster 6 Monate alter Ratten. Durch diese Veränderungen könnte das Gleichgewicht zwischen den einzelnen Untereinheiten des Neokortex moduliert werden.

Dies deutet auf eine Änderung der Untereinheitenzusammensetzung des Rezeptors hin. Da die Rezeptor-Untereinheiten $\alpha 3$ und $\alpha 5$ vorwiegend während der Hirnentwicklung in den ersten 10 Lebenstagen exprimiert werden, könnte eine partielle Rekapitulation eines frühen Expressionsmusters der GABA_A-Rezeptoren vorliegen.

6.1 Verteilung der Expressionsänderungen der GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten im Neokortex

In der vorliegenden Arbeit zeigten die GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten $\alpha 3$ und $\alpha 5$ spezifische Veränderungen ihres Expressionsmusters im Neokortex. Diese fanden sich vor allem im primären somatosensorischen Kortex Par1 aber auch in Hinterpfotenkortex HL und Vorderpfotenkortex FL, weniger im frontalen Kortex FR.

Dieses Verteilungsmuster der Veränderungen deckt sich mit früheren Studien, die sich mit den unterschiedlichsten Modifikationen nach Haltung in einer reizreichen Umgebung beschäftigten. Naka fand eine ähnliche Aufteilung auf der Ebene des Neurotransmitters Noradrenalin (Naka et al. 2002). Er entdeckte einen signifikanten Anstieg dieses Neurotransmitters im parieto-temporo-okzipitalen Kortex nach 40-tägiger Haltung in einem reizreichen Umfeld, wobei die dopaminergen und serotoninerger Neurotransmittersysteme keine Veränderungen zeigten.

Das Pigment Lipofuszin stellt neben der GFAP-Expression (saures Gliafaserprotein) eines der offensichtlichsten Alterungszeichen im Gehirn dar. Die ersten Lipofuszinablagerungen treten in den meisten kortikalen Regionen des Rattenhirns ungefähr ab dem ersten Lebensjahr in Erscheinung. Das Lipofuszinverteilungsmuster war im Rattenhirn homogener als im menschlichen Gehirn (Braak, 1983). Die Menge und das charakteristische Verteilungsmuster dieses Pigments könnte ein Kriterium für altersinduzierte Veränderungen darstellen. (Braak et al Acta Neuropathol 1979, und Plenum Press 1983). Auch hier fanden sich spezifische Veränderungen im Gehirn alter Ratten. Ein Lipofuszinanstieg zeigte sich vor allem in den Neuronen des somatosensorischen (vorwiegend HL) und des motorischen Kortex (Hilbig et al. 2002). GFAP-positive Astrozyten stellen ebenfalls ein Zeichen der Hirnalterung dar; sie sind verantwortlich für eine altersbedingte chronisch verlaufende Gliose. Ab dem dritten Lebensjahr vermehren sie sich stark. Die reizreiche Haltung verursachte eine signifikante Verminderung der GFAP-positiven Astrozyten vor allem in HL und FL, hatte aber keinen Einfluss auf die Lipofuszinanhäufung im Kortex.

Im frontalen, temporalen und entorhinalen Kortex zeigte sich nach reizreicher Haltung bis zu einem Alter von 30 Monaten eine ähnliche synaptische Dichte wie sie junge Tiere aufweisen. Im frontalen, temporalen und entorhinalen Kortex stieg die synaptische Dichte sogar an. Diese Ergebnisse deuteten an, dass es mit dem Altern zu einer Abnahme der synaptischen Dichte kommt, und dieser Abfall durch eine Haltung in einer reizreichen Umgebung reduziert werden kann (Saito et al. 1994).

Auch in einer Studie, die von Staiger et al. an erwachsenen Ratten durchgeführt wurde, fand sich ein spezifischer und statistisch signifikanter Anstieg der Transkriptionsfaktoren c-Fos, JunB, cAMP und Kox24. Diese Erhöhung wurde vor allem in den repräsentierenden Barrefeldern nach Stimulation der Vibrissen, die als histologisch dichte Zellnester imponieren, gefunden (Staiger et al. 2002, Bisler et al. 2002). In einer anderen Studie wurde die Heraufregulation des Transkriptionsfaktors c-Fos nach reizreicher Haltung untersucht, und ebenfalls ein aktivitätsinduzierter Anstieg im Kortex festgestellt (Bertini et al. 2002).

Darüber hinaus wurde die cAMP-Konzentration an 20 Monate alten Ratten sowohl unter basalen Bedingungen als auch nach Aktivierung des beta-adrenergen Transmittersystems im Kortex bestimmt (Escorihuela et al. 1995). Es fand sich ein signifikanter Anstieg der cAMP-Konzentration nach Haltung in einer reizreichen Umgebung. Die reizreiche Umgebung bewirkte eine lang andauernde Modifikation in der Ansprechbarkeit des beta-adrenergen Neurotransmittersystems, was in einem Anstieg des cAMP nach Aktivierung des Beta-Rezeptors durch Isoprenalin widergespiegelt wurde (Escorihuela et al. 1995). Es wird daher angenommen, dass Manipulationen des Umfeldes in frühen Lebensphasen, welche zu einer Verminderung der altersbedingten Defizite führen, eine minimale aber lang andauernde Veränderung des noradrenergen Neurotransmittersystems bewirken.

Die vorliegenden Untersuchungen zeigen, dass darüber hinaus auch das postsynaptische GABAerge System modifiziert wird, wobei diese Veränderungen eine ähnliche Verteilung zeigen.

6.2 Expression der GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten in der Hippokampusformation

In der vorliegenden Arbeit fanden sich in der Hippokampusformation keine Veränderungen der Expression der GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten nach Aufenthalt in einer reizreichen Umgebung. Dieses Ergebnis war überraschend, da in zahlreichen Studien zu den Auswirkungen einer reizreichen Umgebung insbesondere in dieser Hirnregion ausgeprägte Veränderungen gefunden wurden. Williams zeigte hippokampale Veränderungen nach Haltung in einem reizreichen Milieu durch einen Anstieg des Transkriptionsfaktors CREP (cAMP response element binding protein) (Williams et al. 2001). Dieser Transkriptionsfaktor wird mit der Lang-Zeit-Potenzierung (LTP) und dem Lernen assoziiert. Die LTP stellt einen transmitter- und second messenger abhängigen Vorgang dar, steht im Zusammenhang mit neuronaler Plastizität und liegt komplexen Lern- und Gedächtnisvorgängen zugrunde (Bliss und Collingridge 1993, Muller et al. 2000a, Muller et al. 2000b, Lynch 2004). Eine Zunahme der synaptischen Dichte wurde ebenfalls beschrieben (Saito et al. 1994).

Kempermann stellte eine erhebliche Zunahme der Neuroneogenese nach Haltung in einer reizreichen Umgebung fest (Kempermann et al. 1998a, Kempermann et al. 1997). Schon durch einen kurzzeitigen Aufenthalt in einem anregenden Milieu kam es zu einem vielfachen Anstieg der Neuroneogenese. Die Tiere dieser Studie zeigten eine beachtliche Verbesserung in der Durchführung verschiedener Verhaltenstests (Kempermann et al. 1998b, Kempermann et al. 2002).

Des Weiteren wurde ein protektives Potential der reizreichen Umgebung der im Hippokampus neurotoxisch wirkenden Glukokortikoide festgestellt (Mohammed et al. 1993). Auch fand sich in diesem Zusammenhang ein signifikanter Anstieg des Wachstumsfaktors NGF in der Hippokampusformation, aber auch in der Sehrinde und dem entorhinalen Kortex (Mohammed et al. 1990, Pham et al. 1999).

Nach reizreicher Haltung kam es im Kortex zu keiner Veränderung in der Lipofuszinanreicherung, wohingegen es im Gyrus dentatus des Hippokampus zu einer verminderten Lipofuszinkonzentration kam, was auf eine abnehmende altersabhängige Degeneration hindeuten könnte (Kempermann et al. 2002). Im Gegensatz zu diesen Veränderungen der Zellproliferation und der Wachstumsfaktorenexpression fand sich in der vorliegenden Studie keine Modifikation in den GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten.

6.3 Funktionelle Auswirkungen

Voruntersuchungen haben gezeigt, dass schon ein kurzer Aufenthalt in einer reizreichen Umgebung von nur wenigen Monaten ausreicht, damit alte Ratten wieder eine mit jungen Ratten vergleichbare Wendigkeit und Agilität erreichen. Im Vergleich zu den Tieren der Kontrollgruppe erlernten sie eine neue Geschicklichkeit, die sich darin zeigte, dass sie z.B. wieder über schmale Holzstangen laufen konnten. Die typische altersbedingte Verkleinerung der rezeptiven Felder der Hinterpfoten verschwand nahezu komplett durch die reizreiche Haltung (Godde et al. 2002, Dupont et al. 2001). Auch Hilbig (Hilbig et al. 2002) beschrieb eine Größenzunahme des kortikalen rezeptiven Feldes der Hinterpfote nach Transfer in eine reizreiche Umgebung. Es wurde beinahe wieder die Größe, die einer jungen erwachsenen Ratte entspricht, erlangt. Diese Ergebnisse deuten auf eine aktivitätsabhängige Plastizität hin, die selbst im hohen Alter zu einer Wiedererlangung verloren gegangener sensomotorischer Fähigkeiten führen kann.

Durch die Haltung in einem reizreichen Milieu kommt es zu einem signifikanten Anstieg der $\alpha 3$ -Rezeptor-Untereinheit, während sich für die $\alpha 5$ -Rezeptor-Untereinheit ein zwar ähnlicher, allerdings weniger deutlicher Anstieg zeigt. Diese Umstellung innerhalb des Expressionsmusters könnte aufgrund der Verschiebung des Gleichgewichtes zwischen den einzelnen Untereinheiten einen Anhalt für eine veränderte Zusammensetzung des GABA_A-Rezeptors und damit auch einer veränderten Rezeptorfunktion sein. In pharmakologischen und elektrophysiologischen Studien wurde durch den Austausch einzelner Rezeptor-Untereinheiten eine Beeinflussung der Affinität für GABA oder Benzodiazepine (Ymer et al. 1990, Puia et al. 1991) und Veränderung der Kanaleigenschaften (Verdoorn et al. 1990) dargestellt.

An oxytozinproduzierenden Neuronen im Hypothalamus zeigte sich, dass eine Änderung der Zusammensetzung des GABA_A-Rezeptors eine reversible, lang anhaltende Plastizität hervorruft (Brussaard et al. 1997, Fenelon und Herbison 1996, Brussaard und Kits 1999, Brussaard et al. 1999). So werden am Beispiel der oxytozinproduzierenden Neurone die Modifikationen der GABA_A-Rezeptorfunktion innerhalb des Schwangerschafts-Laktationszyklus durch Veränderung des Gleichgewichtes zwischen der $\alpha 1$ und $\alpha 2$ -Untereinheit beschrieben (Brussaard und Herbison 2000). Übertragen auf die vorliegende Studie führt die Haltung in einem reizreichen Milieu zu einer veränderten Expression der GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten und dadurch möglicherweise zu einer veränderten Rezeptorfunktion.

GABAerge Neurone sind im somatosensorischen Kortex das Hauptkontrollelement, welches die Größe und Lokalisation der rezeptiven Felder bestimmt (Dykes 1997). Sie sind somit an der Modulation der rezeptiven Felder beteiligt (Jones 1993) und beeinflussen die Antwort der rezeptiven Neurone auf Stimuli in sensorischen und nonsensorischen Arealen. Es kann durch eine Verschiebung des Gleichgewichtes zwischen inhibitorischen GABAergen und exzitatorischen cholinergen Systemen zu Langzeitveränderungen in der Lokalisation und den Antworteigenschaften der rezeptiven Felder kommen. Eine Applikation des GABA-Antagonisten Bicuculline führt zu einer deutlich sichtbaren Vergrößerung der rezeptiven Felder im somatosensorischen Kortex (Hicks und Dykes 1983, Dykes et al. 1984, Kyriazi et al. 1996). Durch den Rückgang der GABAergen Aktivität kommt es zu einem Verlust der Spezifität der rezeptiven Felder. Eysel beschrieb diese Veränderung nach Induktion einer fokalen Ischämie im visuellen Kortex von Katzen (Eysel et al. 1987, Eysel und Schmidt-Kastner 1991, Schiene et al. 1996). Zu einer Reduktion der GABAergen Inhibition kommt es durch eine experimentell bedingte sensorische Deafferentierung in den zugeordneten Regionen, die mit einer Reorganisation der rezeptiven Felder und einer Modulation der synaptischen Übertragung verbunden ist (Rosier et al. 1995). Dementsprechend führt dies auch in den motorischen Feldern zu einer Neugestaltung. Nach Durchtrennung peripherer motorischer Nerven übernehmen benachbarte motorische Areale dem durchtrennten Nerv ursprünglich zugeordneten Funktionen und innervieren benachbarte Körperteile (Jacobs und Donoghue 1991).

Ein möglicher Mechanismus könnte nach Ansicht der Autoren die Aktivierung bereits bestehender „schlafender“ lateraler exzitatorischer Verbindungen durch die Reduktion der inhibitorischen Aktivität sein. Diese intrakortikalen inhibitorischen Schaltkreise dienen demnach der Aufrechterhaltung bzw. nach Läsion der Neuformierung kortikaler motorischer Repräsentationsfelder.

Die quantitativen Auswirkungen von GABA und Bicuculline auf die Beschaffenheit der rezeptiven Felder wurde von Tremere untersucht (Tremere et al. 2001). Die Pharmakologische Blockade des inhibitorischen Systems durch den GABA_A-Rezeptor-Antagonisten Bicuculline vergrößerte die rezeptiven Felder im somatosensorischen Kortex (Alloway et al. 1989, Dykes et al. 1984). Andere Studien beschreiben, dass es durch den Antagonismus des GABA-Rezeptors zu einer signifikanten räumlichen Ausdehnung der rezeptiven Felder im primären oder sekundären somatosensorischen Kortex kommt (Batuev et al. 1982, Hicks und Dykes 1983, Dykes et al. 1984, Alloway und Burton 1986, Alloway et al. 1989, Kyriazi et al. 1996).

Die vorliegenden Befunde zeigen eine Änderung des GABAergen Systems auf Ebene der Rezeptoruntereinheiten auf. Die aktivitätsabhängigen Veränderungen der GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten könnten zu einer verminderten Wirksamkeit von GABA am Rezeptor führen und so über eine Reduktion der Inhibition zu einer Aufweitung der rezeptiven Felder beitragen.

6.4 Rekapitulation eines juvenilen Expressionsmusters der GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten

Im Laufe des Lebens kommt es zu einer Umstrukturierung der Zusammensetzung des GABA_A-Rezeptors. Morphologische und semiquantitative Auswertungen der regionalen optischen Dichtewerte zeigen, dass die GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten altersabhängig regional unterschiedlich exprimiert werden (Yu et al. 2004). Während den ersten postnatalen Tagen werden die Untereinheiten $\alpha 2$ und $\alpha 5$ reichlich im Kortex exprimiert, wohingegen die $\alpha 1$ und $\gamma 2$ Untereinheiten nur im unwesentlichen Ausmaß vorhanden sind. In den folgenden Entwicklungswochen kommt es zu einem Anstieg von $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ und $\gamma 2$ im Kortex; im Gegensatz dazu zeigt sich eine Verminderung der $\alpha 5$ -Untereinheit. Nach einer Lebensdauer von drei Monaten wird eine kontinuierliche Herabregulation der Untereinheiten $\alpha 3$, $\alpha 5$ und $\gamma 2$ im Kortex beobachtet. Die $\alpha 1$ und $\alpha 2$ Rezeptoruntereinheiten bleiben von diesen Veränderungen jedoch unbeeinflusst. Es finden sich also spezifische Untereinheitenzusammensetzungen während der Gehirnreifung und -alterung. Die $\alpha 3$ -Rezeptor-Untereinheit stellt dabei eine Untereinheit dar, die vorwiegend im Gehirn sich entwickelnder Ratten vorhanden ist. Durch die Haltung alter Ratten in einer reizreichen Umgebung kommt es zu einer signifikanten Heraufregulation der $\alpha 3$ -Rezeptor-Untereinheit, welche zu einer erneuten Umstrukturierung des Rezeptors führt. Da eine Verstärkung des inhibitorischen Systems eine Verkleinerung der rezeptiven Felder bewirkt, kann nun angenommen werden, dass es durch die verstärkte Expression der $\alpha 3$ -Rezeptor-Untereinheit dazu einen Betrag leistet.

6.5 Klinische Auswirkungen

Eine Vielzahl von Medikamenten bindet am GABA_A-Rezeptors, v. a. Benzodiazepine, Antikonvulsiva, Anästhetika und Neurosteroid (z. B. der Progesteron-Metabolit Pregnenolon) (Whiting et al. 1999, Hevers und Luddens 1998). Die Zusammensetzung der Untereinheiten des GABA_A-Rezeptors, v. a. die der α -Untereinheiten, bedingt die pharmakologischen Eigenschaften des Rezeptors. So haben Rezeptoren, die eine α 1-Untereinheit enthalten, einen Benzodiazepin-Bindungstyp I und für das Imidazopyridin Zolpidem und CL 218,872 (GABA_A α 1 bevorzugender partieller Agonist) eine sehr hohe Affinität. Im Vergleich dazu haben Rezeptoren, die die Untereinheiten α 2, α 3 und α 5 vorweisen einen Benzodiazepin-Bindungstyp II und binden Zolpidem mit einer nur sehr geringen Affinität (Araujo et al. 1996). Alle Benzodiazepine besitzen dosisabhängige anxiolytische, sedativ-hypnotische, muskelrelaxierende und antikonvulsive Eigenschaften. Altersabhängige Veränderungen der Pharmakokinetik betreffen vornehmlich die Absorption, die Verteilung, den Metabolismus und die Elimination der Medikamente. Die Nebenwirkungen der unterschiedlichen Benzodiazepingruppen sind jedoch beinahe identisch, da die zentralen Wirkungen der Benzodiazepine auf einem gemeinsamen molekularen Mechanismus basieren. Relativ häufig kommt es zu Reaktionen, wie Sedation, Müdigkeit, Ataxie, und zu Beeinträchtigungen der Bewegungsabläufe und des Gedächtnisses (Klotz 1988). Diese Nebenwirkungen treten im Besonderen bei alten Menschen auf. Durch die Umstrukturierung des GABA_A-Rezeptors im Alter könnten sich die Wirkungsveränderungen der Benzodiazepine bei alten Menschen erklären lassen. Unter anderem wird oftmals von paradoxen Reaktionen alter Menschen auf Benzodiazepine berichtet (Ricou et al. 1986, Rodrigo 1991, Fulton und Mullen 2000). Z. B. kann Midazolam bei alten Patienten Unruhe und Gewaltbereitschaft hervorrufen anstatt Beruhigung zu verschaffen (Weinbroum et al. 2001). Aufgrund der pharmakodynamischen und pharmakokinetischen Veränderungen der Benzodiazepine im Alter wird eine geringere Dosierung gefordert (Naranjo et al. 1995). Die vorliegenden Befunde deuten daraufhin, dass die Pharmakologie GABAerger Medikamente bei alten Patienten auch durch Aktivität beeinflusst wird.

7. Schlussfolgerungen

Die vorliegende Studie zeigt erhebliche Expressionsänderung der GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten $\alpha 3$ und $\alpha 5$ nach einem drei Monate andauernden Aufenthalt in einer anregenden Käfighaltung im Neokortex sehr alter Ratten. Beide Rezeptor-Untereinheiten waren vorwiegend im primären somatosensorischen Kortex (Par1) erhöht. Jedoch war dieser Effekt in der $\alpha 3$ -Rezeptor-Untereinheit deutlicher zu sehen als in der $\alpha 5$ -Untereinheit. Diese Modifikation umfasste sowohl die Dichte, als auch das spezifische Verteilungsmuster. Obwohl die Eigenschaften der einzelnen Untereinheiten weitgehend unbekannt sind, wird postuliert, dass die $\alpha 3$ -Rezeptor-Untereinheit vorwiegend im sich entwickelnden Gehirn vorkommt. Da es im Laufe des Lebens zu einer Umstrukturierung des Rezeptors kommt und sich somit eine altersabhängigen Zusammensetzung des GABA_A-Rezeptors ergibt, kann nun angenommen werden, dass die reizreiche Haltung eine Rekapitulation eines juvenilen Expressionsmusters bewirken könnte.

GABAerge Neurone sind im somatosensorischen Kortex das Hauptkontrollelement, die die Größe und Lokalisation der rezeptiven Felder bestimmen. Im Alter kommt es zu einer Größenabnahme der rezeptiven Felder. Erklärt wird dies durch eine Verschiebung des Gleichgewichtes zwischen dem inhibitorischen GABAergen und exzitatorischen cholinergen System. Die aktivitätsabhängige Veränderung der GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten führt zu einer verminderten Wirksamkeit von GABA am Rezeptor. Durch die Reduktion der Inhibition könnte es zu einer erneuten Aufweitung der rezeptiven Felder kommen. Diese Modulation der GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten könnte zu einer aktivitätsabhängigen Plastizität beitragen, die selbst im hohen Alter zu einer Wiedererlangung verloren gegangener sensomotorischer Fähigkeiten führen kann. Auch könnte die Veränderung des Expressionsmusters des GABA_A-Rezeptors eine Bedeutung für pharmakologischen Therapien haben, da sehr viele Medikamente wie z. B. Benzodiazepine oder Antiepileptika über den GABA_A-Rezeptor wirken.

8. Literaturverzeichnis

- Alloway KD, Burton H. 1986. Bicuculline-induced alterations in neuronal responses to controlled tactile stimuli in the second somatosensory cortex of the cat: a microiontophoretic study. *Somatosens Res*, 3 (3):197-211.
- Alloway KD, Rosenthal P, Burton H. 1989. Quantitative measurements of receptive field changes during antagonism of GABAergic transmission in primary somatosensory cortex of cats. *Exp Brain Res*, 78 (3):514-532.
- Araujo F, Tan S, Ruano D, Schoemaker H, Benavides J, Vitorica J. 1996. Molecular and pharmacological characterization of native cortical gamma-aminobutyric acidA receptors containing both alpha1 and alpha3 subunits. *J Biol Chem*, 271 (44):27902-27911.
- Batuev AS, Alexandrov AA, Scheynikov NA. 1982. Picrotoxin action on the receptive fields of the cat sensorimotor cortex neurons. *J Neurosci Res*, 7 (1):49-55.
- Beregi J, 1990. Centenarians in Hungary – a sociomedical and demographic study. Basel: Krüger.
- Berkefeld T, Godde B, Dinse HR, 1996. Optical imaging of age-related changes of rat somatosensory cortical representations and their sensitivity to the Ca²⁺ influx blocker nimodipine. *Soc Neurosci Abstr*. 22:538.4.
- Bertini G, Peng ZC, Fabene PF, Grassi-Zucconi G, Bentivoglio M. 2002. Fos induction in cortical interneurons during spontaneous wakefulness of rats in a familiar or enriched environment. *Brain Res Bull*, 57 (5):631-638.
- Bertrand D, Changeux JP. 1995. Nicotinic receptor: an allosteric protein specialized for intercellular communication. *Seminars Neurosci*. 7: 75-90.
- Birren J, 1988. A contribution to the theory of the psychology of aging: as a Counterpart of Development. *Emergent theories of aging*, New York, Springer 153-176.
- Bisler S, Schleicher A, Gass P, Stehle JH, Zilles K, Staiger JF. 2002. Expression of c-Fos, ICER, Krox-24 and JunB in the whisker-to-barrel pathway of rats: time course of induction upon whisker stimulation by tactile exploration of an enriched environment. *J Chem Neuroanat*, 23 (3):187-198.
- Bliss TV, Collingridge GL. 1993. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*, 361 (6407):31-39.
- Bloom FE, Iversen LL. 1971. Localizing 3H-GABA in nerve terminals of rat cerebral cortex by electron microscopic autoradiography. *Nature*, 229 (5287):628-630.
-

- Braak H, 1979. Spindle-shaped appendages of IIIb-pyramids filled with lipofuscin: a striking pathological change of the senescent human isocortex. *Acta Neuropathol.* 46: 197-202.
- Braak H, 1983. Architectonics as seen by lipofuscin stains. In: Jones EG, Peters A, *Cerebral Cortex*. Plenum Press, New York.
- Braak H, Braak E, Strengé H, Koppang N, 1984. Canine ceroid lipofuscinosis, a model for aging of the human isocortex. *Gerontology* 30, 215-217.
- Brussaard AB, Kits KS. 1999. Changes in GABAA receptor-mediated synaptic transmission in oxytocin neurons during female reproduction: plasticity in a neuroendocrine context. *Ann N Y Acad Sci*, 868:677-680.
- Brussaard AB, Herbison AE. 2000. Long-term plasticity of postsynaptic GABAA-receptor function in the adult brain: insights from the oxytocin neurone. *Trends Neurosci*, 23 (5):190-195.
- Brussaard AB, Devay P, Leyting-Vermeulen JL, Kits KS. 1999. Changes in properties and neurosteroid regulation of GABAergic synapses in the supraoptic nucleus during the mammalian female reproductive cycle. *J Physiol*, 516 (Pt 2):513-524.
- Brussaard AB, Kits KS, Baker RE, Willems WP, Leyting-Vermeulen JW, Voorn P, Smit AB, Bicknell RJ, Herbison AE. 1997. Plasticity in fast synaptic inhibition of adult oxytocin neurons caused by switch in GABA(A) receptor subunit expression. *Neuron*, 19 (5):1103-1114.
- Cantilli EJ, Shmelzer JL, 1971. *Transportation and Aging: Selected Issues*. Washington DC: US Government Printing Office.
- Chu DC, Albin RL, Young AB, Penney JB. 1990. Distribution and kinetics of GABAB binding sites in rat central nervous system: a quantitative autoradiographic study. *Neuroscience*, 34 (2):341-357.
- Cooper JS. 1989. Benzodiazepines and appetite. recent preclinical advances and their clinical implications. *Human Psychopharmacol.* 4: 81-89.
- De Blas AL. 1996. Brain GABAA receptors studied with subunit-specific antibodies. *Mol Neurobiol*, 12 (1):55-71.
- Dupont E, Canu MH, Langlet C, Falempin M. 2001. Time course of recovery of the somatosensory map following hindpaw sensory deprivation in the rat. *Neurosci Lett*, 309 (2):121-124.
- Dykes RW. 1997. Mechanisms controlling neuronal plasticity in somatosensory cortex. *Can J Physiol Pharmacol*, 75 (5):535-545.
- Dykes RW, Landry P, Metherate R, Hicks TP. 1984. Functional role of GABA in cat primary somatosensory cortex: shaping receptive fields of cortical neurons. *J Neurophysiol*, 52 (6):1066-1093.
-

- Escorihuela RM, Fernandez-Teruel A, Tobena A, Vivas NM, Marmol F, Badia A, Dierssen M. 1995. Early environmental stimulation produces long-lasting changes on beta-adrenoceptor transduction system. *Neurobiol Learn Mem*, 64 (1):49-57.
- Eysel UT, Schmidt-Kastner R. 1991. Neuronal dysfunction at the border of focal lesions in cat visual cortex. *Neurosci Lett*, 131 (1):45-48.
- Eysel UT, Worgotter F, Pape HC. 1987. Local cortical lesions abolish lateral inhibition at direction selective cells in cat visual cortex. *Exp Brain Res*, 68 (3):606-612.
- Fenelon VS, Herbison AE. 1996. Plasticity in GABAA receptor subunit mRNA expression by hypothalamic magnocellular neurons in the adult rat. *J Neurosci*, 16 (16):4872-4880.
- Franke H, 1985. *Auf den Spuren der Langlebigkeit*. Stuttgart: Schattauer.
- Fritschy JM, Mohler H. 1995. GABAA-receptor heterogeneity in the adult rat brain: differential regional and cellular distribution of seven major subunits. *J Comp Neurol*, 359 (1):154-194.
- Fritschy JM, Paysan J, Enna A, Mohler H. 1994. Switch in the expression of rat GABAA-receptor subtypes during postnatal development: an immunohistochemical study. *J Neurosci*, 14 (9):5302-5324.
- Fritschy JM, Weinmann O, Wenzel A, Benke D. 1998a. Synapse-specific localization of NMDA and GABA(A) receptor subunits revealed by antigen-retrieval immunohistochemistry. *J Comp Neurol*, 390 (2):194-210.
- Fritschy JM, Johnson DK, Mohler H, Rudolph U. 1998b. Independent assembly and subcellular targeting of GABA(A)-receptor subtypes demonstrated in mouse hippocampal and olfactory neurons in vivo. *Neurosci Lett*, 249 (2-3):99-102.
- Fritschy JM, Kiener T, Bouilleret V, Loup F. 1999. GABAergic neurons and GABA(A)-receptors in temporal lobe epilepsy. *Neurochem Int*, 34 (5):435-445.
- Fulton SA, Mullen KD. 2000. Completion of upper endoscopic procedures despite paradoxical reaction to midazolam: a role for flumazenil? *Am J Gastroenterol*, 95 (3):809-811.
- Godde B, Spengler F, Dinse HR. 1996. Associative pairing of tactile stimulation induces somatosensory cortical reorganization in rats and humans. *Neuroreport*, 8 (1):281-285.
- Godde B, Stauffenberg B, Spengler F, Dinse HR. 2000. Tactile coactivation-induced changes in spatial discrimination performance. *J Neurosci*, 20 (4):1597-1604.
-

- Godde B, Berkefeld T, David-Jurgens M, Dinse HR. 2002. Age-related changes in primary somatosensory cortex of rats: evidence for parallel degenerative and plastic-adaptive processes. *Neurosci Biobehav Rev*, 26 (7):743-752.
- Godde B, Hilger T, von Seelen W, Berkefeld T, Dinse HR. 1995. Optical imaging of rat somatosensory cortex reveals representational overlap as topographic principle. *Neuroreport*, 7 (1):24-28.
- Havighurst RJ, Neugarten B, Tobin S, 1969. *Disengagement and Patterns of Aging. Middle Age and Aging*, Chicago: University of Chicago Press: 161-172.
- Hevers W, Luddens H. 1998. The diversity of GABAA receptors. Pharmacological and electrophysiological properties of GABAA channel subtypes. *Mol Neurobiol*, 18 (1):35-86.
- Herlyn U. 1990. Zur Aneignung von Raum und Lebensverlauf. In L. Bertels & U. Herlyn, *Lebenslauf und Raumerfahrung*. Opladen: Leske u. Budrich. S. 7-34.
- Hicks TP, Dykes RW. 1983. Receptive field size for certain neurons in primary somatosensory cortex is determined by GABA-mediated intracortical inhibition. *Brain Res*, 274 (1):160-164.
- Hilbig H, Bidmon HJ, Steingruber S, Reinke H, Dinse HR. 2002. Enriched environmental conditions reverse age-dependent gliosis and losses of neurofilaments and extracellular matrix components but do not alter lipofuscin accumulation in the hindlimb area of the aging rat brain. *J Chem Neuroanat*, 23 (3):199-209.
- Hjort PF. 2000. [Physical activity and health in the elderly--walk on!]. *Tidsskr Nor Laegeforen*, 120 (24):2915-2918.
- Izquierdo I, Medina JH. 1991. GABAA receptor modulation of memory: the role of endogenous benzodiazepines. *Trends Pharmacol Sci*, 12 (7):260-265.
- Jacobs KM, Donoghue JP. 1991. Reshaping the cortical motor map by unmasking latent intracortical connections. *Science*, 251 (4996):944-947.
- Jones EG. 1993. GABAergic neurons and their role in cortical plasticity in primates. *Cereb Cortex*, 3 (5):361-372.
- Katz S, 1983. Assessing self maintenance: Activities of daily living, mobility and instrumental activities of daily living. *Journal American Geriatrics Society*, 31: 721-727.
- Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH. 1997. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature*, 386 (6624):493-495.
- Kempermann G, Brandon EP, Gage FH. 1998a. Environmental stimulation of 129/SvJ mice causes increased cell proliferation and neurogenesis in the adult dentate gyrus. *Curr Biol*, 8 (16):939-942.
-

- Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH. 1998b. Experience-induced neurogenesis in the senescent dentate gyrus. *J Neurosci*, 18 (9):3206-3212.
- Kempermann G, Gast D, Gage FH. 2002. Neuroplasticity in old age: sustained fivefold induction of hippocampal neurogenesis by long-term environmental enrichment. *Ann Neurol*, 52 (2):135-143.
- Klotz U. 1988. [Effects and side effects of benzodiazepines]. *Anasth Intensivther Notfallmed*, 23 (3):122-126.
- Kyriazi HT, Carvell GE, Brumberg JC, Simons DJ. 1996. Quantitative effects of GABA and bicuculline methiodide on receptive field properties of neurons in real and simulated whisker barrels. *J Neurophysiol*, 75 (2):547-560.
- Laurie DJ, Seeburg PH, Wisden W. 1992. The distribution of 13 GABAA receptor subunit mRNAs in the rat brain. II. Olfactory bulb and cerebellum. *J Neurosci*, 12 (3):1063-1076.
- Lavoie AM, Tingey JJ, Harrison NL, Pritchett DB, Twyman RE. 1997. Activation and deactivation rates of recombinant GABA(A) receptor channels are dependent on alpha-subunit isoform. *Biophys J*, 73 (5):2518-2526.
- Lehr U, 1991a. *Psychologie des Alterns*. Heidelberg: Quelle und Meyer.
- Lehr U, 1991b. Hundertjährige – ein Beitrag zur Langlebigkeitsforschung. *Zeitschrift für Gerontologie*, 24: 227-232.
- Loup F, Weinmann O, Yonekawa Y, Aguzzi A, Wieser HG, Fritschy JM. 1998. A highly sensitive immunofluorescence procedure for analyzing the subcellular distribution of GABAA receptor subunits in the human brain. *J Histochem Cytochem*, 46 (10):1129-1139.
- Lynch MA. 2004. Long-term potentiation and memory. *Physiol Rev*, 84 (1):87-136.
- Marom-Klibansky R, Drory Y. 2002. [Physical activity for the elderly]. *Harefuah*, 141 (7):646-650, 665, 664.
- Mohammed AH, Henriksson BG, Soderstrom S, Ebendal T, Olsson T, Seckl JR. 1993. Environmental influences on the central nervous system and their implications for the aging rat. *Behav Brain Res*, 57 (2):183-191.
- Mohammed AK, Winblad B, Ebendal T, Larkfors L. 1990. Environmental influence on behaviour and nerve growth factor in the brain. *Brain Res*, 528 (1):62-72.
- Muller D, Nikomenko I, Jourdain P, Alberti S, 2002. LTP, memory and structural plasticity. *Curr. Mol. Med.*, 2 (7): 605-611.
- Murphy S. 1993. Astrocytes. In: *Pharmacology and Function*. Academic Press Inc., New York.
-

- Naka F, Shiga T, Yaguchi M, Okado N. 2002. An enriched environment increases noradrenaline concentration in the mouse brain. *Brain Res*, 924 (1):124-126.
- Naranjo CA, Herrmann N, Mittmann N, Bremner KE. 1995. Recent advances in geriatric psychopharmacology. *Drugs Aging*, 7 (3):184-202.
- Nayeem N, Green TP, Martin IL, Barnard EA. 1994. Quaternary structure of the native GABAA receptor determined by electron microscopic image analysis. *J Neurochem*, 62 (2):815-818.
- Nutt DJ, Glue P, Lawson C. 1990. The neurochemistry of anxiety: an update. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 14 (5):737-752.
- Olsen RW, Avoli M. 1997. GABA and epileptogenesis. *Epilepsia*, 38 (4):399-407.
- Oswald W, Gunzelmann T, 1991. *Psychometrie und klinische Beurteilung. Gerontologie* (2. Auflage), Stuttgart: Kohlhammer: 431-455.
- Pham TM, Ickes B, Albeck D, Soderstrom S, Granholm AC, Mohammed AH, 1999. Changes in brain nerve growth factor levels and nerve growth factor receptors in rat exposed to environmental enrichment for one year. *Neuroscience*, 94 (1): 279-286.
- Petermans J. 2001. [Physical exercise in the aged]. *Rev Med Liege*, 56 (4):223-227.
- Pham TM, Ickes B, Albeck D, Soderstrom S, Granholm AC, Mohammed AH. 1999. Changes in brain nerve growth factor levels and nerve growth factor receptors in rats exposed to environmental enrichment for one year. *Neuroscience*, 94 (1):279-286.
- Pratt JA. 1992. The neuroanatomical basis of anxiety. *Pharmacol Ther*, 55 (2):149-181.
- Puia G, Vicini S, Seeburg PH, Costa E. 1991. Influence of recombinant gamma-aminobutyric acid-A receptor subunit composition on the action of allosteric modulators of gamma-aminobutyric acid-gated Cl⁻ currents. *Mol Pharmacol*, 39 (6):691-696.
- Redecker C, Luhmann HJ, Hagemann G, Fritschy JM, Witte OW. 2000. Differential downregulation of GABAA receptor subunits in widespread brain regions in the freeze-lesion model of focal cortical malformations. *J Neurosci*, 20 (13):5045-5053.
- Ricou B, Forster A, Bruckner A, Chastonay P, Gemperle M. 1986. Clinical evaluation of a specific benzodiazepine antagonist (RO 15-1788). Studies in elderly patients after regional anaesthesia under benzodiazepine sedation. *Br J Anaesth*, 58 (9):1005-1011.
- Rodrigo CR. 1991. Flumazenil reverses paradoxical reaction with midazolam. *Anesth Prog*, 38 (2):65-68.
-

- Rosier AM, Arckens L, Demeulemeester H, Orban GA, Eysel UT, Wu YJ, Vandesande F. 1995. Effect of sensory deafferentation on immunoreactivity of GABAergic cells and on GABA receptors in the adult cat visual cortex. *J Comp Neurol*, 359 (3):476-489.
- Saito S, Kobayashi S, Ohashi Y, Igarashi M, Komiya Y, Ando S. 1994. Decreased synaptic density in aged brains and its prevention by rearing under enriched environment as revealed by synaptophysin contents. *J Neurosci Res*, 39 (1):57-62.
- Sarter M, Schneider HH, Stephens DN. 1988. Treatment strategies for senile dementia: antagonist beta-carbolines. *Trends Neurosci*, 11 (1):13-17.
- Saup W, 1986. Wohnen im Alter. Kurseinheit 1 der Fernuniversität Hagen. Hagen: Fachbereich Erziehungs-, Sozial- und Geisteswissenschaften.
- Schaie KW, 1989. Individual differences in rate of cognitive changes in adulthood. *The course of later life: Research and reflections*. New York, Springer, 63-83.
- Schiene K, Bruehl C, Zilles K, Qu M, Hagemann G, Kraemer M, Witte OW. 1996. Neuronal hyperexcitability and reduction of GABAA-receptor expression in the surround of cerebral photothrombosis. *J Cereb Blood Flow Metab*, 16 (5):906-914.
- Sieghart W, Fuchs K, Tretter V, Ebert V, Jechlinger M, Hoger H, Adamiker D. 1999. Structure and subunit composition of GABA(A) receptors. *Neurochem Int*, 34 (5):379-385.
- Schmitz-Scherzer R, 1974. Freizeit und Alter. Kohlhammer: Stuttgart.
- Somogyi P, Takagi H. 1982. A note on the use of picric acid-paraformaldehyde-glutaraldehyde fixative for correlated light and electron microscopic immunocytochemistry. *Neuroscience*, 7 (7):1779-1783.
- Staiger JF, Masannek C, Bisler S, Schleicher A, Zuschratter W, Zilles K. 2002. Excitatory and inhibitory neurons express c-Fos in barrel-related columns after exploration of a novel environment. *Neuroscience*, 109 (4):687-699.
- Tokarski W, 1991. Freizeitgestaltung. Gerontologie (2. Auflage). Kohlhammer: Stuttgart.
- Tremere L, Hicks TP, Rasmusson DD, 2001. Expansion of receptive fields in raccoon somatosensory cortex in vivo by GABA(A) receptor antagonism: implications for cortical reorganization. *Exp. Brain Res*. 136 (4):447-455.
- Tretter V, Ehya N, Fuchs K, Sieghart W. 1997. Stoichiometry and assembly of a recombinant GABAA receptor subtype. *J Neurosci*, 17 (8):2728-2737.
- Tubiana M. 2002. [The aged: medical and social aspects]. *C R Biol*, 325 (6):699-717.
-

- Turek FW, Van Reeth O. 1988. Altering the mammalian circadian clock with the short-acting benzodiazepine, triazolam. *Trends Neurosci*, 11 (12):535-541.
- Verdoorn TA, Draguhn A, Ymer S, Seeburg PH, Sakmann B. 1990. Functional properties of recombinant rat GABAA receptors depend upon subunit composition. *Neuron*, 4 (6):919-928.
- Weinbroum AA, Szold O, Ogorek D, Flaishon R. 2001. The midazolam-induced paradox phenomenon is reversible by flumazenil. Epidemiology, patient characteristics and review of the literature. *Eur J Anaesthesiol*, 18 (12):789-797.
- Whiting PJ. 1999. The GABA-A receptor gene family: new targets for therapeutic intervention. *Neurochem Int*, 34 (5):387-390.
- Whiting PJ, Bonnert TP, McKernan RM, Farrar S, Le Bourdelles B, Heavens RP, Smith DW, Hewson L, Rigby MR, Sirinathsinghji DJ, Thompson SA, Wafford KA. 1999. Molecular and functional diversity of the expanding GABA-A receptor gene family. *Ann N Y Acad Sci*, 868:645-653.
- Williams BM, Luo Y, Ward C, Redd K, Gibson R, Kuczaj SA, McCoy JG. 2001. Environmental enrichment: effects on spatial memory and hippocampal CREB immunoreactivity. *Physiol Behav*, 73 (4):649-658.
- Wisden W, Seeburg PH. 1992. GABAA receptor channels: from subunits to functional entities. *Curr Opin Neurobiol*, 2 (3):263-269.
- Wisden W, Laurie DJ, Monyer H, Seeburg PH. 1992. The distribution of 13 GABAA receptor subunit mRNAs in the rat brain. I. Telencephalon, diencephalon, mesencephalon. *J Neurosci*, 12 (3):1040-1062.
- Ymer S, Draguhn A, Wisden W, Werner P, Keinänen K, Schofield PR, Sprengel R, Pritchett DB, Seeburg PH. 1990. Structural and functional characterization of the gamma 1 subunit of GABAA/benzodiazepine receptors. *Embo J*, 9 (10):3261-3267.
-

9. Anhang

9.1 Lebenslauf

Persönliche Daten:	Marion Christina Stangl Geb. am 10.08.1976 in Horb a. N. ledig
Schulbildung:	
9/1983 – 8/1987	Grundschule Horb a. N.
9/1987 – 8/1996	Martin-Gerbert-Gymnasium Horb a. N.
Abschluss 1996	Allgemeine Hochschulreife
Soziales Jahr:	
	Urologische Intensivstation der Universitätsklinik Tübingen
Medizinstudium:	
10/1997 – 6/2004	Friedrich-Schiller-Universität Jena
2/2001 – 7/2001	Auslandsaufenthalt an der Universität Padua/Italien
Praktisches Jahr:	
4/2003 – 7/2003	Innere Medizin, Universitätsspital Bern/Schweiz
8/2003 – 11/2003	Trauma Surgery, University of Stellenbosch Kapstadt/Südafrika
12/2003 – 3/2004	Kinderheilkunde, Kantonsspital Winterthur/Schweiz
Promotion:	
9/2002 – 12/2004	Experimentelle Neurologie unter Leitung von Herr Priv.-Doz. Dr. med. C. Redecker Klinik und Poliklinik für Neurologie (Direktor: Prof. Dr. O. W. Witte), FSU Jena
Beruf:	
Ab 12/04	Assistenzärztin Medizinische Klinik II (Herr Prof. Dr. med Drs. h.c. M. V. Singer) Universitätsklinikum Mannheim

Mannheim, den 17.01.2006

Marion Stangl

9.2 Danksagung

Sehr herzlich möchte ich mich bei Herrn Priv.-Doz. Dr. med. habil. C. Redecker für seine engagierte und fachlich hervorragende Betreuung meiner Promotion bedanken. Von Beginn an hatte er ein offenes Ohr für alle Fragen, motivierte mich in verzweifelten Augenblicken und fand immer Zeit und aufmunternde Worte. Dadurch blieb die Begeisterung für wissenschaftliches Arbeiten und für das Forschungsthema erhalten. Besonders danken möchte ich ihm für seine freundschaftliche und herzliche Art, die sich trotz steigender Arbeitsbelastung nie verändert hat.

Herrn Prof. Dr. med. Otto W. Witte möchte ich für die exzellente Arbeitsmöglichkeit in seiner Klinik und in der Experimentellen Neurologie im Forschungszentrum Lobeda einen herzlichen Dank aussprechen.

Allen Mitarbeitern der Forschungsgruppe der Experimentellen Neurologie danke ich für die kollegiale und immer hilfsbereite Zusammenarbeit.

Herrn Priv.-Doz. Dr. rer. nat Dinse, Institut für Neuroinformatik der Ruhr-Univ. Bochum, danke ich für die Bereitstellung der Fischer- und Brown-Norway-Ratten nach Training in der reizreichen Umgebung

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir das Studium ermöglicht haben und mich in allen schwierigen Situationen immer unterstützt haben.

Auch möchte ich meiner Schwester Nicole und Christoph Bott für das kritische und aufwendige Korrekturlesen danken.

9.3 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass

- mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,
- ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönliche Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,
- mich folgende Person bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt hat: Herr Priv.-Doz. Dr. med. Christoph Redecker,
- die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,
- ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und
- ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Horb, den 29.12.04
