

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie

der Medizinischen Fakultät

der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

„Altersabhängiger Einfluss des cGAS-STING Signalwegs auf das
zentrale Nervensystem der Maus“

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. med.

(doctor medicinae)

an der medizinischen Fakultät

der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

vorgelegt von	Shananthan Kethiswaran
aus	Willich
Magdeburg	2023

Dokumentationsblatt

Bibliographische Beschreibung:

Kethiswaran, Shananthan

Altersabhängiger Einfluss des cGAS-STING Signalwegs auf das zentrale Nervensystem der Maus

Magdeburg – 2023. – 59 Bl, 12 Abb., 4 Tab.

Kurzreferat:

Mit der voranschreitenden Alterung unserer Gesellschaft nehmen altersbedingte Krankheiten, wie zum Beispiel neurodegenerative Erkrankungen zu. Eine Ursache für diese Erkrankungen scheint eine langfristige, niedriggradige Entzündungsreaktion, die als *Inflammaging* bezeichnet wird, zu sein. Der 2013 entdeckte cGAS-STING Signalweg kann unter anderem zu Typ I Interferon induzierten Entzündungsreaktionen beitragen und Autophagie-Prozesse aktivieren. Dabei wird freie DNA im Zytosol durch cGAS erkannt und führt zur Synthese des sekundären Messengers 2',3'-cGAMP. Dieser aktiviert STING, welches durch die Aktivierung von IRF3 die Transkription inflammatorischer Gene induziert. Wir untersuchten in Mäusegehirnen die Konzentrationen der wesentlichen Proteine dieses Signalwegs und weiterer bedeutsamer Mediatoren autophagischer Prozesse. Zusätzlich analysierten wir die Signalintensität des STING-Proteins in Frontalschnitten von Mäusegehirnen. Unsere Ergebnisse zeigen, dass mit zunehmendem Alter die 2',3'-cGAMP-, STING- und IRF3-Konzentration abnehmen, während die bei cGAS und pBeclin1 eine Zunahme erkennbar ist. In den Frontalschnitten konnten wir mit zunehmendem Alter eine Abnahme der Signalintensität von STING im entorhinalen Kortex und eine Zunahme der STING positiven Zellen im *Cornu ammonis 1* des Hippocampus feststellen. Diese Daten deuten darauf hin, dass bei gesunden alternden Mäusen eine Deregulierung der cGAS-STING Signalwegs stattfindet. Die pharmakologische Beeinflussung dieses Signalwegs könnte daher eine potenzielle, kausale Therapieoption bei neurodegenerativen Erkrankungen wie der Alzheimer-Demenz darstellen.

Schlüsselwörter:

cGAS-STING Signalweg, 2',3'-cGAMP, Autophagie, *Inflammaging*, neuronales Altern

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	1
1.1 Altern.....	1
1.2 Autophagie.....	1
1.2.1 Autophagie und neurodegenerative Erkrankungen	4
1.3 Der cGAS-STING Signalweg	6
1.4 Der Zusammenhang zwischen zellulärer Autophagie und dem cGAS-STING Signalweg	7
1.5 Der Einfluss von Seneszenz und des cGAS-STING Signalwegs bei neurodegenerativen Erkrankungen und im alternden Gehirn	9
1.6 Fragestellung der Arbeit	10
2 Material und Methoden	11
2.1 Chemikalien	11
2.2 Liste der Primärantikörper	11
2.3 Liste der Sekundärantikörper	12
2.4 Versuchstiere	13
2.5 Biochemische Methoden	13
2.5.1 Proteinextraktion aus Mäusehirnen	13
2.5.2 Amidoschwarz Proteinbestimmung	14
2.5.3 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	14
2.5.4 Coomassie Brilliant Blau R250 Färbung	16
2.5.5 2',3'-cGAMP ELISA	16
2.6 Immunhistochemie	17
2.6.1 ‚Free Floating‘ Immunfluoreszenzfärbung	17
2.6.2 Bildgebung	18
2.7 Statistik	19
3 Ergebnisse.....	20
3.1 Quantitative Analyse von Komponenten des cGAS-STING Signalwegs in Mäusegehirnen unterschiedlicher Altersgruppen	20
3.2 Immunhistochemische Analyse der STING-Lokalisation in ausgewählten Bereichen des Mäusehirns	24
3.2.1 STING und IBA1 im entorhinalen Kortex	26
3.2.2 STING und IBA1 im <i>Cornu ammonis 1</i>	27
3.2.3 STING und IBA1 im <i>Gyrus dentatus</i>	28
3.2.4 Kolokalisation von STING mit Astrozyten- und Neuronenmarkern	29
4 Diskussion	32
4.1 Das Mausgehirn als Modell für neuronales Altern	32

4.2 Gehirnregionen mit frühen Veränderungen im Alter	32
4.3 Auswertung der quantitativen Daten	33
4.4 Region-spezifische Analysen von Proteinen des cGAS-STING Signalwegs in Mäusegehirnen	36
4.5 Klinischer Ausblick.....	38
5 Zusammenfassung	40
Tabellenverzeichnis.....	41
Abbildungsverzeichnis	42
Literaturverzeichnis	43
Danksagung	51
Ehrenerklärung	52
Darstellung des Lebenswegs	53

Abkürzungsverzeichnis

2',3'-cGAMP	2',3'-zyklischem Guanosinmonophosphat-Adenosinmonophosphat
ABC	Avidin-Biotin Complex
AD	Alzheimer Demenz
AMP, ATP	Adenosinmonophosphat, Adenosintriphosphat
APP	<i>Amyloid Precursor Protein</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat ((NH ₄) ₂ S ₂ O ₈)
ATG	<i>Autophagy Target Gene</i>
CA1	<i>Cornu ammonis 1</i>
cGAS	<i>cyclic GMP-AMP Synthase</i>
DG	<i>Gyrus dentatus</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
dsDNA	doppelsträngige DNA
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERGIC	<i>ER-Golgi Intermediate Compartment</i>
GFAP	<i>Glial Fibrillary Acidic Protein</i>
GTP	Guanosintriphosphat
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
IBA1	ionized calcium-binding adapter molecule 1
IHC	Immunhistochemie
IRF	<i>Interferon Regulatory Factor</i>
ISG	<i>Interferon-Stimulated Gene</i>
LBD	Ligandenbindungsdomäne
LC3	<i>microtubule associated protein 1A/B light chain 3A</i>
LIR	<i>LC3 Interacting Region</i>
LLPS	Liquid-Liquid Phase Separation
MAP2	<i>Microtubule-Associated Protein 2</i>
mTOR	<i>mammalian Target Of Rapamycin</i>
NeuN	<i>Neuronal Nuclei/ hexaribonucleotide binding protein 3</i>

OS	Oxidativer Stress
p62	sequestosome-1
PAS	<i>Pre-Autophagosomal Structure</i>
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i>
PD	<i>Parkinson's Disease</i>
PE	Phosphatidylethanolamin
PIK3C3	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PLP	<i>Periodate-Lysine-Paraformaldehyde</i>
PS1	Präsenilin-1
SA β -Gal	<i>Senescence-Associated beta-galactosidase</i>
SASP	Seneszenz assoziierter sekretorischen Phänotyp
SDS	<i>Sodium Dodecylsulfate</i>
Ser	Serin
SN	<i>Substantia nigra</i>
STING	<i>STimulator of INterferon Genes</i>
TAZ	<i>Transcriptional co-Activator with PDZ-binding motive</i>
TBS	<i>Tris-Buffered-Saline</i>
TBK1	<i>TANK-binding kinase 1</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TSG 101	Tumor Suszeptibilitäts-Gen 101
ULK1	<i>UNC51-Like Kinase1</i>
VPS34	<i>Vacuolar Protein Sorting associated protein 34</i>
WB	Western-Blot
YAP	<i>Yes Associated Protein</i>
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Altern

Die Weltbevölkerung wächst nicht nur rapide, sondern die durchschnittliche Lebenserwartung der Menschen nimmt global auch deutlich zu. So wird die Zahl der über 60-jährigen von 1 Milliarde im Jahre 2019 auf 2,1 Milliarden bis 2050 ansteigen (Béjot und Yaffe 2019). Als Ursachen für die höhere Lebenserwartung im letzten Jahrhundert sind unter anderem bessere hygienische Bedingungen, verbesserte Ernährung und die Errungenschaften der modernen Medizin mit Impfungen, Medikamenten und verbesserte Behandlungsverfahren zu nennen. Mit zunehmender Alterung der Gesellschaft gehen allerdings neue medizinische, wirtschaftliche und gesellschaftliche Herausforderungen einher (Gruber und Wise 2001). Altersbedingte Erkrankungen wie zum Beispiel maligne Tumore, Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Alzheimer-Demenz (AD) und Morbus Parkinson (PD) nehmen zu und das Gesundheitssystem muss sich folglich auf mehr Langzeit-Pflegefälle einstellen. Neben der hohen Lebenserwartung ist es daher wichtig, ein gesundes Altern mit einer besseren Lebensqualität zu ermöglichen (Khaw 1997). Eine Vielzahl von Studien belegen, dass eine Lebensweise mit regelmäßiger Bewegung, gesunder Ernährung und Verzicht auf Nikotin sowie Alkohol entscheidend für ein gesundes Altern ist (Chakravarty et al. 2012, Peel et al. 2005). Darüber hinaus spielen weitere Faktoren wie Genetik und noch nicht vollständig erforschte Entzündungsreaktionen eine Rolle (Fülöp et al. 2019). Interessanterweise konnten einige Studien nachweisen, dass Intervallfasten (regelmäßige Abfolge von Zeiten mit Nahrungsaufnahme und Fasten) in verschiedenen Tiermodellen und bei Hefezellen die Lebenserwartung erhöhte (Mitchell et al. 2019, Gruenewald 1996). In Zeiten der Kalorienrestriktion wechseln zum Beispiel Hefezellen vom anabolen in den katabolen Stoffwechsel und aktivieren zelluläre autophagische Prozesse, wobei vermehrt fehlgefaltete Proteine und Zellorganellen recycelt werden (Lin et al. 2000, Takeshige et al. 1992). Im Gegensatz dazu führte die Hemmung der Autophagie-assoziierten Faktoren bei verschiedenen Tiermodellen zum früheren Tod (Tóth et al. 2008, Lee et al. 2010).

1.2 Autophagie

Der Begriff der Autophagie wurde von Christian de Duve geprägt, der 1963 die Funktion der Lysosomen entdeckte (Deter et al. 1967). 1992 beschrieb das Team von Yoshinori Ohsumi in Hefezellen die molekularen Mechanismen der Autophagie. Dabei untersuchte die

Forschungsgruppe mutierte Hefezellen, denen für den Zellabbau wichtige Proteinasen fehlten. Im Folgenden identifizierten sie eine Reihe von Enzymen und die dazugehörigen kodierenden Gene, die für die Autophagie eine zentrale Rolle spielen (Takeshige et al. 1992). Diese wurden später einheitlich als Autophagie assoziierte Gene (ATG) klassifiziert, wovon bis heute mindestens 15 beschrieben wurden (Mizushima 2020).

Unter Autophagozytose werden verschiedene Formen der Autophagie wie zum Beispiel Makro-, Mikro- und Chaperon-vermittelte Autophagie (CMA) verstanden (Klionsky und Emr 2000). Bei der Makroautophagie werden Zellorganellen oder Proteine von einer Ausstülpung des Endoplasmatischen Retikulums (ER) eingeschlossen, um eine doppelmembranhüllte Formation, das Autophagosom, zu bilden. Im weiteren Verlauf fusioniert das Autophagosom mit einem Lysosom zum Autophagolysosom (Takeshige et al. 1992). Bei der Mikroautophagie hingegen stülpt sich direkt die lysosomale Membran um das abzubauen Material im Zytoplasma (Oku und Sakai 2018). Die CMA ist ein komplexer Mechanismus, bei dem Proteine des Hitzeschockproteins Hsc70, ein Chaperon, erkannt und zum Lysosom geführt werden (Kaushik und Cuervo 2012).

Bei der Makroautophagie ist mTOR (mammalian target of rapamycin) als ein wichtiges regulatorisch fungierendes Protein an der Autophagie beteiligt (Deleyto-Seldas und Efeyan 2021). Nährstoffe, Wachstumsfaktoren sowie der AMP/ATP-Gehalt beeinflussen die mTOR-Aktivität (Kim et al. 2011). Das mTOR-Protein reguliert die Dephosphorylierung der UNC51-like Kinase1 (ULK1), wodurch diese inaktiviert wird (Chan 2009) (siehe Abbildung 1 D). Das aktivierte, phosphorylierte ULK1 löst sich vom mTOR-Komplex und bildet mit dem focal adhesion kinase (FAK)-interacting protein (FIP200) und Atg13 einen Komplex aus (Hara et al. 2008) (siehe Abbildung 1 A). Der ULK1-Komplex aktiviert wiederum den Beclin1-VPS34 (vacuolar protein sorting associated protein 34)-Komplex, bestehend aus Beclin1, Atg14L, Atg15 und der Phosphatidylinositol 3-kinase der Klasse III (PIK3C3) (Wirth et al. 2013). PIK3C3 ist für die Aktivierung der Autophagie, das Formieren der Phagophore aus dem ER, wie auch für die Elongation des Autophagosoms zuständig (Russell et al. 2013) (siehe Abbildung 1 B).

Ein weiteres wichtiges Protein, das microtubule-associated protein 1A/1B light chain 3A (LC3-I), muss für die weitere Reifung und Fusionierung mit Lysosomen aktiviert werden. Dafür wird LC3 am Carboxyl-Ende mit Hilfe von Atg4 zu LC3-I glycinisiert, welches dann durch Atg3 und Atg7 mit Phosphatidylethanolamin (PE) lipidiert und somit zu LC3-II wird (siehe Abbildung 1 C) (Tanida et al. 2008). LC3-II kann durch diese Modifikation in die Autophagosomenmembran eingebaut werden. Bevor es zum Verschluss des Autophagosoms kommt, markiert und transportiert das ubiquitinierte Cargo-Protein Sequestosome 1 / p62 (p62) die abzubauen Proteine oder Organellen zum Autophagosom (siehe Abbildung 1 C, D) (Bjørkøy et al. 2009).

Anschließend fusioniert das fertige Autophagosom mit Lysosomen und wird zum Autophagolysosom (siehe Abbildung 1 E, F) (Lőrincz und Juhász 2020). Lysosomen haben in ihrem Lumen einen pH-Wert von 5 und durch saure Hydrolasen die Eigenschaft, Biomoleküle zu verdauen (Mindell 2012).

Mit der Autophagie werden nicht mehr benötigte Bestandteile und Organellen der Zelle abgebaut und die einzelnen Bausteine der Wiederverwendung zugeführt. Interessanterweise liegt einer Vielzahl an Erkrankungen des Menschen in ihrer Pathophysiologie eine Störung des Stoffwechsels auf zellulärer Ebene, unter anderem der Autophagie, zugrunde. In der Tumorgenese von Brust-, Ovarial- und Prostatakrebs wurden zum Beispiel monoallele Veränderungen des Beclin1 Gens (BECN1) vorgefunden (Choi et al. 2013). Bei Infektionen mit Pathogenen wie einigen Bakterien (z.B. Gruppe A Streptokokken, Salmonella enterica) oder Viren (z.B. HSV-1) werden diese durch Autophagie neutralisiert.

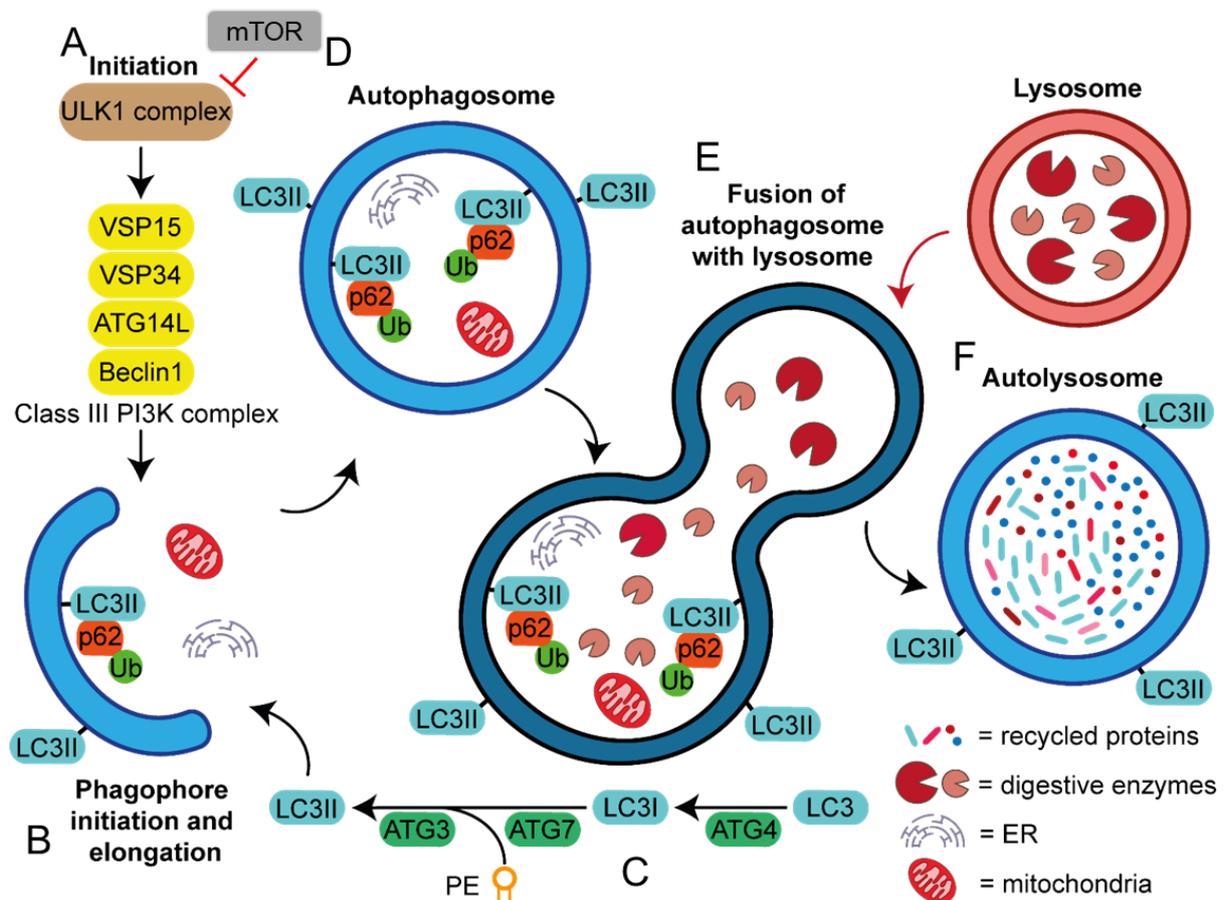


Abbildung 1: Bildung der Autophagosomen

Die schematische Darstellung zeigt die Zwischenschritte der Makroautophagie. Die Initiation (A) folgt mit der Bildung des Ulk1-Komplexes. Dieses aktiviert den Beclin1-VSP34 (PI3KCIII) -Komplex, welches die Formierung und die Elongation des Phagophores (B) induziert. LC3 wird durch mehrere Zwischenschritte zu LC3-II lipidiert und in die Phagophore eingebaut (C). Das ubiquitinierte p62 transportiert die abzubauenen Zellbestandteile in das Autophagosom (C). LC3-II führt zum Verschluss

des Autophagosoms (D), welches anschließend mit Lysosomen fusioniert (E). Im Autophagolysosom werden die Zellbestandteile degradiert (F) (Abbildung aus Passarella 2023).

1.2.1 Autophagie und neurodegenerative Erkrankungen

Die Störung der Autophagie im zentralen Nervensystem (ZNS) scheint eine relevante Ursache für Erkrankungen wie PD oder der AD zu sein (Yu et al. 2005). Bei PD führt der fehlende Abbau von alpha-Synuclein zur Degeneration dopaminerger Neurone in der *Substantia nigra* (SN) und dadurch zu komplexen motorischen Ausfällen. Der fehlende Abbau von alpha-Synuclein ist schwerwiegend, weil dieser die Formierung der Autophagosomen hemmt (Winslow et al. 2010). Auch bei der AD ist eine Ansammlung von Proteinen, hier β -Amyloid, ursächlich. In Neuronen bilden sich Autophagosomen unter anderem in den Synapsen und werden dann retrograd zum Soma gebracht, das die größte Anzahl an Lysosomen enthält (Hollenbeck 1993). Bei der AD ist dieser retrograde Transport und die Formierung der Autophagolysosomen gestört (Nixon et al. 2005). Die folglich entstehende Akkumulation von β -Amyloid führt sukzessive zum Funktionsverlust und zur Degeneration der Neurone.

Im zentralen Nervensystem befinden sich eine Reihe von Zelltypen wie z.B. Neurone, Astrozyten, Gliazellen und Mikroglia, die als Immuneffektorzellen wirken. Neurone sind postmitotisch, d.h. sie gehören zu den Zellen, die sich nicht mehr teilen. Das Aufrechterhalten der Homöostase ist für die Zellfunktion und das Überleben dieser Zellart damit immens wichtig. Ablagerungen von Proteinen wie β -Amyloid oder alpha-Synuclein stören den Zellhaushalt und führen zum Tod der Zelle. Verschiedene Mutationen, die die Autophagie beeinträchtigen, wurden als Ursache für Erkrankungen wie der AD und PD erkannt. Bei der familiären AD sind Gene der Protease Präsenilin-1 (PS1) oder des Amyloid Präkursor-Proteins (APP) mutiert. Es kommt infolgedessen zum verminderten autophagosomalen Abbau von β -Amyloid, weil PS1 die lysosomale vakuoläre Form der ATPase (V-ATPase) in ihrer Funktion beeinträchtigt und somit die Azidifikation der Lysosomen und damit die Proteolyse hemmt (Lee et al. 2010, Cataldo et al. 2004).

Weitere Studien zeigen, dass Autophagie-assoziierte Proteine bei neurodegenerativen Erkrankungen beeinträchtigt sind. Zum Beispiel hat man in AD-Mäusegehirnen verringerte Mengen an Beclin1 festgestellt, was zu einer Akkumulation des APP führte (Pickford et al. 2008). Außerdem hat man in *Drosophila melanogaster* mit einem Knockdown von ATG7 und ATG8 Genen eine verringerte Lebensspanne, eine Akkumulierung von Ubiquitin positiven Aggregaten und eine Erhöhung der Konzentration der Marker für neurodegenerative Erkrankungen festgestellt (Juhász et al. 2007).

Der mTOR Signalweg hat eine modulierende, im Wesentlichen inhibierende, Wirkung auf die Autophagie. Damit hat das mTOR-Protein eine essenzielle Rolle bei der Kontrolle des Proteinhaushalts der Neurone. Eine Hemmung des mTOR-Proteins durch Rapamycin hat einen verbesserten Abbau des β -Amyloids und des Tau-Proteins zur Folge (Caccamo et al. 2010). Diese Beobachtungen zeigen, dass Autophagie eine wichtige Rolle bei der Pathogenese der AD spielt und eine Aktivierung von Beclin1 sowie die Hemmung von mTOR eine Reduktion von β -Amyloid zur Folge hat.

Bei den dopaminergen Neuronen des PD lassen sich Lewy-Körperchen mit alpha-Synuclein und Ubiquitin nachweisen. Studien zeigen, dass alpha-Synuclein über Makroautophagie und CMA abgebaut wird (Webb et al. 2003, Cuervo et al. 2004). Einige Studien weisen darauf hin, dass oxidativer Stress (OS) die Ursache für eine verstärkte Autophagie in den dopaminergen Neuronen ist (Janda et al. 2012). Der OS verhindert die Expression von Oxy-Alpha Genen. Die Oxy-Alpha Gene aktivieren die mTOR-Kinase und verhindern somit die Initiierung der Autophagie (Choi et al. 2010). Insbesondere bei dem familiären PD ist die Elimination von reaktiven Sauerstoffspezies und die Mitophagie, der Abbau von Mitochondrien, gestört. Durch eine Mutation im Parkin-Gen kann die Ubiquitinierung der Mitochondrien und damit der proteasomale und autophagolytische Abbau nicht mehr erfolgen (Narendra et al. 2008).

Im Vergleich zur Funktion bei neuronalen Vorgängen ist über die Rolle von Glia- und Mikrogliazellen in neurodegenerativen Erkrankungen weniger bekannt. Gliazellen sind wichtig für die Aufrechterhaltung der Homöostase im Gehirn, haben eine Stützfunktion und bilden die Myelinscheide um Neurone. Zusätzlich sind sie Bestandteil der Blut-Hirn-Schranke und haben eine Transport- und Abwehrfunktion. Gliazellen sind durch die Aufnahme von Zellbestandteilen wichtig für die Homöostase und nutzen dafür auch die Autophagie (Gorojod et al. 2015). Gorojod et al. haben in ihrer Studie festgestellt, dass als Folge einer Zellschädigung der Gliazellen von Ratten, vermehrt LC3-II und Beclin1 gebildet werden. In Alzheimer-Mausmodellen (PDAPP-Mäusen) konnte man eine signifikant reduzierte Anzahl von Astrozyten und Gliazellen im zentralen Nervensystem verglichen mit Wildtyp-Mäusen identifizieren (Gorojod et al. 2015). Die wenigen Astrozyten in den PDAPP-Mäusen müssen mehr Abbau-Produkte der Neurone recyceln als in Wildtyp-Mäusen.

Mikrogliazellen sind Teil des monozytär-phagozytären Systems im ZNS und in der Lage, Zelltrümmer und Fremdkörper wie Bakterien und Viren zu phagozytieren. Choi et al. (2010) haben festgestellt, dass Mikrogliazellen mit Hilfe der Autophagie alpha-Synuclein abbauen. Diese Erkenntnisse zeigen, dass die Autophagie in den Glia- und Mikrogliazellen im Alter gestört ist. Im Vergleich zu den Neuronen ist bei Astrozyten und Mikrogliazellen weniger über die molekularen Veränderungen durch neurodegenerative Erkrankungen bekannt. Weitere Studien in diesem Zusammenhang sind erforderlich.

1.3 Der cGAS-STING Signalweg

Der cGAS-STING Signalweg (**c**yclic **GMP-AMP Synthase** – **S**timulator of **I**nterferon **G**enes) ist ein wichtiger Teil des angeborenen Immunsystems, indem es doppelsträngige Desoxyribonukleinsäuren (dsDNA) im Zytoplasma erkennt und die nachgeschaltete Immunantwort einleitet (Zhang et al. 2013). In gesunden eukaryotischen Zellen ist DNA im Nukleus und in den Mitochondrien (mt-DNA) zu finden. Eine Schädigung des Zellkerns bzw. der Mitochondrien oder der Einschluss von Fremd-DNA in Folge einer Infektion mit Bakterien oder DNA-Viren führt zu freier dsDNA im Zytoplasma. Die freie dsDNA wird von cGAS, wie in Abbildung 2 zu sehen, unter Bildung eines 2:2-Komplexes gebunden (Zhang et al. 2014). Das cGAS-Enzym erkennt die DNA an ihrem Zucker-Phosphat-Rückgrat, weshalb es zu keinem Abbau spezifischer DNA anhand der Nukleotidsequenz kommt (Civril et al. 2013). Es kommt zu einer Konformationsänderung am aktiven Zentrum des cGAS-Enzyms, wodurch die Synthese von 2',3'-zyklischem Guanosinmonophosphat-Adenosinmonophosphat (2',3'-cGAMP) aus Adenosintriphosphat (ATP) und Guanosintriphosphat (GTP) katalysiert wird (Wu et al. 2013). Diese 2',3'-Bindung kommt im Gegensatz zur 3',5'-Bindung selten vor und wird deshalb seltener von Hydrolasen abgebaut (Ritchie et al. 2022). 2',3'-cGAMP fungiert als sekundärer Messenger und bindet am Transmembranprotein STING des ER. Das STING-Protein ist ein Dimer aus vier Transmembrandomänen, sowie einer ins Zytosol ragenden Ligandenbindungsdomäne (LBD) (Shang et al. 2019). Die Bindung von 2',3'-cGAMP an die LBD führt zu einer Konformationsänderung des STING-Proteins, wodurch mehrere der STING-Dimere durch Disulfid-Brückenbindungen zu einem Polymer werden (Ergun et al. 2019). Anschließend wird das STING-Protein vom ER zum Golgi-Apparat transportiert und palmitoyliert (Zhang et al. 2020, Mukai et al. 2016). Hier phosphoryliert das STING-Protein unter anderem die Tank-binding-Kinase-1 (TBK-1) am Serinrest 172, welche dann selbst als pTBK-1 die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors Interferon-regulating-Faktor-3 (IRF-3) am Serin 396 katalysiert (Ding et al. 2020). Das phosphorylierte IRF-3 (pIRF-3) dimerisiert und induziert unter anderem im Nukleus die Transkription der Interferon Typ I stimulierenden Gene (ISG) sowie weitere inflammatorische Mediatoren (Wu et al. 2013). Das STING-Protein wird anschließend ubiquitiniert, zu den Lysosomen transportiert und abgebaut (Assil und Paludan 2023).

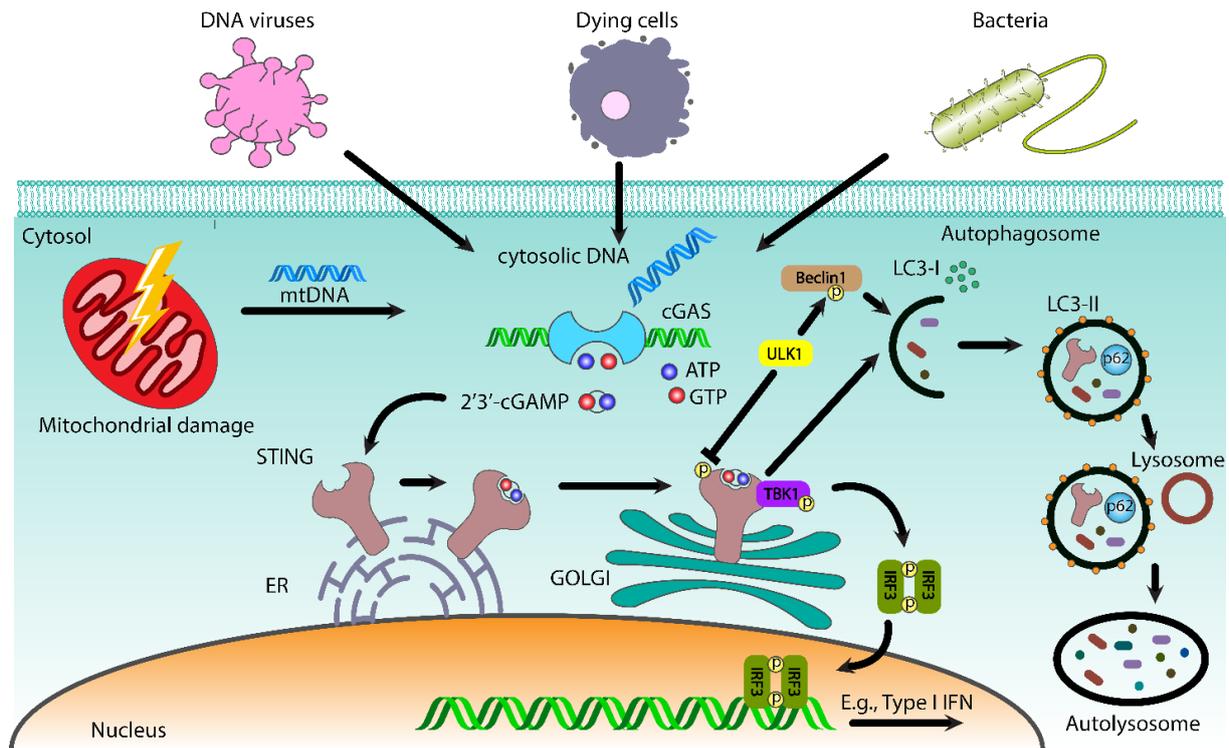


Abbildung 2: Der cGAS-STING Signalweg

dsDNA im Zytosol aus phagozytierten Zellen, Mitochondrien, Viren oder Bakterien wird von cGAS gebunden, welches 2',3'-cGAMP aus ATP und GTP bildet. 2',3'-cGAMP bindet an STING, welches zum Golgi-Apparat wandert und dort TBK-1 zu pTBK-1 phosphoryliert. pTBK-1 phosphoryliert IRF3, das entstehende pIRF3 gelangt in den Nucleus und ist dort an der Transkription von ISGs beteiligt. Zusammen mit Zytokinen und Interferonen wird so eine Immunantwort ausgelöst. Im Folgenden wird STING durch Autophagie recycelt (Abbildung aus Passarella 2023).

1.4 Der Zusammenhang zwischen zellulärer Autophagie und dem cGAS-STING Signalweg

Aktuelle Studien zeigen, wie der cGAS-STING Signalweg mit der Autophagie verknüpft ist. Bei der Seeanemonenart *Nematostella vectensis* die STING-vermittelte Autophagie beschrieben (Gui et al. 2019). Diese Seeanemonenart hat sich vor mehr als 500 Millionen Jahren von der Entwicklungslinie des *Homo sapiens* abgespalten. Statt zu einer Freisetzung von Zytokinen führt die Aktivierung des cGAS-STING Signalwegs bei *Nematostella vectensis* zur Initiierung der Autophagie. Daraus folgt, dass der Signalweg primär für die Autophagie zuständig ist und die Expression von Interferonen evolutionär gesehen neu hinzugekommen ist (Gui et al. 2019).

Die Verknüpfungen zwischen der Autophagie und dem cGAS-STING Signalweg sind vielfältig. Das cGAS-Enzym interagiert direkt mit Beclin1, indem es mit dem Rubicon-Protein um die

Superhelix-Domäne des Beclin1 Komplexes konkurriert (Liang et al. 2014). Im Gegensatz zu cGAS hat das Rubicon-Protein einen inhibierenden Effekt auf die Autophagie (Nah et al. 2021). Das cGAS-Enzym ist außerdem ein Rezeptor für LC3, in dem es mehrere LC3-interagierende Regionen (LIRs) beinhaltet und somit die Autophagie aktivieren kann (Birgisdottir et al. 2013). Das cGAS-Molekül bildet 2:2 Komplexe mit dsDNA aus. Mehrere dieser Komplexe können ein Polymer bilden und eine Flüssig-Flüssig Phasentrennung (Liquid-Liquid Phase Separation, LLPS) verursachen (Du und Chen 2018). Diese LLPS wirkt wie ein Mikroreaktor, beschleunigt den Signalweg und induziert damit die Autophagie (Noda et al. 2020).

Ähnlich wie bei cGAS hat das STING-Protein ebenfalls LIRs (Liu et al. 2019). Beim vesikulären Transport des STING-Proteins vom ER zum Golgi-Apparat bildet sich das ER-Golgi intermediäre Zellkompartiment (ERGIC). An dieser Stelle findet die LC3-Lipidierung und die Autophagosom-Bildung aus Vesikeln statt, die bei der Knospung (Budding) des ERs oder des ERGICs entstehen (Ge et al. 2014). Bei einer Hemmung des Proteintransports vom ER zum ERGIC durch Brefeldin A (BFA) ist die LC3-Lipidierung in 2',3'-cGAMP-stimulierten Zellen verhindert (Gui et al. 2019). Gui et al. konnten damit veranschaulichen, dass die Autophagie eine wichtige Aufgabe des cGAS-STING Signalwegs ist. Zudem wird das STING-Protein ausgehend vom Golgi-Apparat in Membranen, welche LC3-II und p62 enthalten, eingeschleust und mit Hilfe der Autophagie abgebaut (Mukai et al. 2016). Konno et al. konnten in Herzmuskelzellen zeigen, dass eine Dephosphorylierung von ULK1 (Ser555) über die AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK) eine Phosphorylierung von STING (Ser366) bewirkt (Konno et al. 2013). Diese Phosphorylierung des STING-Proteins am Ser366 führt zu dessen Inaktivierung.

Eine weitere Interaktion des cGAS-STING Signalwegs und der Autophagie ist die Beteiligung von TBK-1 an der Reifung (Maturation) von Autophagosomen. TBK-1 kann das Cargoprotein p62 phosphorylieren, welches dann das ubiquitinierte STING zum sich formierenden Autophagosom bringt (Prabakaran et al. 2018). Zusätzlich zeigte sich, dass das Fehlen von TBK-1 die Funktion der Mikrotubuli beeinträchtigt (Oakes et al. 2017). Mikrotubuli sind wichtig für den Transport der Autophagosomen und der Fusion mit Lysosomen (Webb et al. 2004).

Durch autophagosomalen Abbau von STING wird eine überschießende Zytokin-Freisetzung vermieden (Abdullah et al. 2020). Neueste Studien belegen, dass für den Abbau das STING-Protein mit Ubiquitin und dem Tumor Suszeptibilitäts-Gen 101 (TSG 101) gebunden werden muss, um in Clathrin-umhüllten Vesikeln zum Lysosom zu gelangen (Assil und Paludan 2023). Durch diese vielschichtigen Wechselwirkungen zwischen Autophagie und dem cGAS-STING Signalweg wird eine überschießende Induktion der Zytokin-Freisetzung vermieden.

1.5 Der Einfluss von Seneszenz und des cGAS-STING Signalwegs bei neurodegenerativen Erkrankungen und im alternden Gehirn

Seit mehreren Jahren scheint es erwiesen zu sein, dass die Akkumulation geschädigter DNA, zum Beispiel durch reaktive Sauerstoffspezies oder verkürzte Telomere, einer der zellulären Faktoren ist, der zu Alterungsprozessen führt (Brasnjevic et al. 2008). Ursächlich hierfür ist einerseits der vermehrte Zelltod (Apoptose) und andererseits der Abbruch der Zellteilung (Zellseneszenz). Im Laufe der Zeit reichern sich in seneszenten Zellen β -Galactosidase (SA β -Gal) und diverse als Seneszenz-assoziierte sekretorische Phänotypen (SASP) bekannte Zytokine, Immunmodulatoren, Wachstumsfaktoren und Proteasen an (Dimri et al. 1995, Young und Narita 2009). Dies führt in den betroffenen Zellen zu einer niedrigschwelligen, langanhaltenden Entzündungsreaktion, die als ‚*Inflammaging*‘ bezeichnet wird (Olivieri et al. 2018). In Gehirnen von AD-Patienten und in AD-Mausmodellen hat man signifikant hohe Mengen an SA β -Gal und SASPs in Progenitorzellen von Oligodendrozyten, den Vorläuferzellen der Myelinscheide-bildenden ZNS-spezifischen Gliazellen, festgestellt (Zhang et al. 2019).

Neuronale Zellen sind besonders empfindlich gegenüber reaktiven Sauerstoffspezies, weil sie einen hohen Energieumsatz und im Verhältnis zu anderen Zellen des Organismus wenig Glutathion als Antioxidans besitzen (Dringen 2000). Studien zeigen auch, dass sich in Neuronen von älteren Mäusen besonders viel geschädigte DNA befindet und die SA β -Gal Aktivität hoch ist (Sedelnikova et al. 2004, Jurk et al. 2012). Neue Studien zeigen die Verflechtungen von Zellseneszenz und dem cGAS-STING Signalweg auf. Die Koaktivatoren yes-associated protein (YAP) und transcriptional co-activator with PDZ-binding motif (TAZ) binden an verschiedenen DNA-Sequenzen, die für die Zellproliferation wichtig sind. Eine Hemmung dieser Proteine führt in Fibroblasten zur Zellseneszenz und zur vermehrten Alterung der Zellen (Sladitschek-Martens et al. 2022). Sladitschek-Martens und seine Kollegen fanden heraus, dass die Zellseneszenz in den Fibroblasten durch den cGAS-STING Signalweg eingeleitet und dieser durch YAP/TAZ gehemmt wird.

Im ZNS ist der genaue Ablauf von Entzündungsreaktionen bislang nur unzureichend erforscht. Neuere Studien zeigen, dass Virusinfektionen den cGAS-STING Signalweg in Mikroglia und Astrozyten aktivieren (Jeffries und Marriott 2017). In retinalen Ganglienzellen von Mäusen konnte gezeigt werden, dass eine direkte Aktivierung von STING mithilfe von 2',3'-cGAMP eine axonale Regeneration nach einer Verletzung induziert (Wang et al. 2022). Die Forschung über den Einfluss des cGAS-STING Signalwegs in neuroinflammatorischen Prozessen ist jung und mehr Studien auf diesem Gebiet sind für ein besseres Verständnis erforderlich.

1.6 Fragestellung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, die Expression der Proteine des cGAS-STING Signalwegs und der Autophagie im ZNS gesund alternder Mäuse zu untersuchen, um damit ein grundlegendes Verständnis dieses Signalweges im alternden Gehirn zu schaffen. Um verschiedene Altersgruppen von Mäusen zu vergleichen, wurden die Tiere im Alter von 8, 24 und 108 Wochen jeweils als junge, erwachsene und alte Mäuse definiert. Es wurden quantitative Analysen der Proteine des Signalwegs mit Hilfe des Western Blot Verfahrens durchgeführt. Kortex-Proben der Mäuse aus den drei verschiedenen Altersgruppen wurden hierzu verwendet. Um eine Aussage über die altersabhängige Verteilung der Proteine des Signalwegs in verschiedenen Hirnarealen treffen zu können, wurde das STING-Protein in 20 µm dicken Frontalschnitten der Mäusegehirne aller Altersgruppen immunhistochemisch gefärbt und mikroskopisch untersucht. Insbesondere wurden die Bereiche der *Cornu ammonis 1* (CA1) und des *Gyrus dentatus* (DG) im Hippocampus und der entorhinale Kortex (EC) im Temporallappen immunhistochemisch analysiert. Der Hippocampus und der EC sind eine der ersten Areale im ZNS, die bei der AD funktionell beeinträchtigt werden.

Somit fokussiert sich diese Arbeit auf folgende Fragestellungen:

- Welche Konzentrationen weisen ausgewählte Proteine des cGAS-STING Signalwegs und der Autophagie in den Mäusekortex bei den verschiedenen Altersgruppen auf?
- Ist in den untersuchten Gehirnarealen ein altersabhängiges Verteilungsmuster des STING-Proteins zu erkennen?
- In welchen Zellen des ZNS (exemplarisch Neuronen, Mikroglia oder Astrozyten) ist das STING-Protein hauptsächlich zu finden?

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Chemikalien wurden von Thermo Fisher Scientific, Carl Roth, Merck, Serva, Sigma-Aldrich und Roche bezogen. Ausnahmen spezieller Chemikalien und Lösungen mit Herstellerangaben und Zusammensetzungsinformationen werden in den Methoden beschrieben. Für alle Versuche wurde, sofern nicht anders erwähnt, doppelt destilliertes Wasser (ddH₂O) aus dem Milli-Q Direct System (Merck Millipore) benutzt.

2.2 Liste der Primärantikörper

Antikörper	Art, Klonalität	Anwendung, Verdünnung	Hersteller, Katalognummer
anti-β-Actin	ms, monoklonal	WB, 1:2000	Cell Signaling #3700 (8H10D10)
anti-Beclin1	rb, polyklonal	WB, 1:1000	Cell Signaling #3738
anti-cGAS	rb, monoklonal	WB, 1:1000	Cell Signaling #15102
anti-GFAP	ch, polyklonal	IHC, 1:500	Abcam (ab4674)
anti-GFAP	rb, polyklonal	WB, 1:1000	Synaptic System 173002
anti-Iba1	gt, polyklonal	IHC, 1:1000	Abcam (ab5076)
anti-IRF3	rb, monoklonal	WB, 1:1000	Abcam (ab68481)
anti-LC3A/B	rb, monoklonal	WB, 1:1000	Cell Signaling #12741 (D3U4C)
anti-MAP2	gp, polyklonal	WB, 1:1000	Synaptic System 188004
Anti-NeuN	gp, polyklonal	IHC, 1:1000	Synaptic System 266-004
anti-Phospho-Beclin1 (Ser30)	rb, polyklonal	WB, 1:1000	Cell Signaling #54101S

anti-Phospho-IRF3 (Ser396)	rb, polyklonal	WB, 1:1000	Sigma-Aldrich SAB5700435
anti-Phospho-TBK1/NAK (Ser172)	rb, monoklonal	WB, 1:500	Cell Signaling #5483 (D52C2)
anti-Phospho-ULK1 (Ser555)	rb, monoklonal	WB, 1:1000	Cell Signaling #5869 (D1H4)
anti- p62	rb, monoklonal	WB, 1:1000	Cell Signaling #5114S
anti-TBK1/NAK	rb, polyklonal	WB, 1:1000	Cell Signaling #3013
anti-TMEM173/STING	rb, polyklonal	WB, 1:1000	proteintech Cat no: 19851-1-AP
anti-ULK1	rb, monoklonal	WB, 1:1000	Cell Signaling #8054 (D8H5)

Tabelle 1: Primärantikörper, ms = Maus, rt = Ratte, rb = Kaninchen, ch = Huhn, gt = Ziege, gp = Meerschweinchen, WB = Western Blot, IHC = Immunhistochemie

2.3 Liste der Sekundärantikörper

Antikörper	Art, Klonalität	Anwendung, Verdünnung	Hersteller, Katalognummer
Donkey anti-rabbit IgG H&L (H+L) -Biotin	rb, polyklonal	IHC, 1:500	Jackson Immuno Research (711-065-152)
CyTM3 AffiniPure Donkey Anti-Chicken IgY (IgG) (H+L)	ch, polyklonal	IHC, 1:1000	Jackson Immuno Research (703-165-155)
CyTM3 AffiniPure Donkey Anti-Goat IgG (H+L)	gt, polyklonal	IHC, 1:1000	Jackson Immuno Research (705-165-147)
CyTM5 AffiniPure Donkey Anti-Guinea Pig IgG (H+L)	gp, polyklonal	IHC, 1:2000	Jackson Immuno Research (706-175-148)
Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody	rb, monoklonal	WB, 1:7500	Cell Signaling Technology #7074P2
Peroxidase AffiniPure goat anti-mouse IgG (H+L)	ms, polyklonal	WB, 1:7500	Jackson Immuno Research (115-035-146)
Peroxidase AffiniPure Donkey Anti-Guinea Pig IgG (H+L)	gp, monoklonal	WB, 1:7500	Jackson Immuno Research (706-033-148)

Tabelle 2: Sekundärantikörper, ms = Maus, rb = Kaninchen, ch = Huhn, gt = Ziege, gp = Meerschweinchen, WB = Western Blot, IHC = Immunhistochemie

2.4 Versuchstiere

Für die Versuche wurden Wildtyp-Mäuse (*Mus musculus*) des Inzuchtstammes C57BL/6J und STING-Knock-out Mäuse der Linie B6(Cg)-Sting1tm1.2Camb/J aus der Tierzucht des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie (IPT) der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke Universität Magdeburg verwendet. Mäuse wurden in Gruppen von 5 - 6 Tieren, mit einem zwölfstündigen Hell-Dunkel Rhythmus (Lichtphase von 6-18 Uhr), einer Temperatur von $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von $50\pm 10\%$ und einer Futter- sowie Wasserzufuhr *ad libitum* gehalten. Die aktuellen europäischen Richtlinien (2010/63/EU) wurden eingehalten. Die Tierversuche wurden vom Land Sachsen-Anhalt genehmigt (Referat für Veterinärwesen, Tierschutz, Tierarznei- und Futtermittel: Landesverwaltungsamt Sachsen-Anhalt; Lizenznummer: 42505-2-1507 UniMD Deutschland).

2.5 Biochemische Methoden

2.5.1 Proteinextraktion aus Mäusehirnen

- Homogenisierungspuffer: 1 x PBS-Puffer (pH 7,4) versetzt mit 1x cOmplete™, EDTA-freier Protease-Inhibitor-Cocktail, 1x PhosSTOP™
- 4 x SDS-Puffer: 250 mM Tris-Base titriert mit Salzsäure (HCl) auf pH 6,8, 4 % (v/v) SDS, 40 % (v/v) Glycerin, 20 % (v/v) β -Mercaptoethanol, 0,004 % (v/v) Bromphenolblau

Für die Studie wurden 8, 24 und 108 Wochen alte Mäuse mit Isofluran Baxter (Baxter GmbH) tief anästhesiert und anschließend mit einer Schere dekapitiert. Nach der Präparierung der Gehirne wurden diese in kaltem Homogenisierungspuffer im Verhältnis von 10 ml pro 1 g Gehirn inkubiert. Das Gewebe wurde mit einem vorgekühlten Potter (Potter S, Sartorius) bei 900 rpm mit zwölf Hüben homogenisiert. Es wurde 4 x SDS in einem Verhältnis 1:4 hinzugefügt und bei hoher Viskosität 0,5 μl Benzonase (SigmaAldrich) beigelegt. Die so hergestellten Proben wurden bei 95°C für 5 min inkubiert und dann bei 4°C und $14000 \times g$ für 20 min zentrifugiert. Der resultierende Überstand wurde in ein frisches Eppendorf Reaktionsgefäß (Eppendorf AG) transferiert und bis zur weiteren Nutzung bei -20°C gelagert.

Die Tötung der Mäuse und die Entnahme der Gehirne wurden von Mitarbeiter*innen des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie mit zertifizierter Qualifikation für die Durchführung von Tierversuchen vollzogen.

2.5.2 Amidoschwarz Proteinbestimmung

- Färbelösung: 1,44 % (w/v) Amidoschwarz, 10 % (v/v) Essigsäure, 90 % (v/v) Methanol
- Waschlösung: 10 % (v/v) Essigsäure, 90 % (v/v) Methanol
- Stammlösung: 0,5 mg/ml Bovines Serumalbumin (BSA) Lösung
- 0,1 M Natriumhydroxid (NaOH)

Um die Gesamtproteinmenge der jeweiligen Proben zu bestimmen, wurde eine Amidoblack-Färbung durchgeführt (Badin und Herve 1965). Triplets der Proben und der BSA-Stammlösung wurden nach dem Schema der Tabelle 3 auf einer 96-Well-Titerplatte (Eppendorf AG) pipettiert. 10 µl der Proben wurde jeweils mit 90 µl ddH₂O verdünnt und 200 µl der Amidoblack Färbelösung wurde zu jeder Probe hinzugefügt. Nach einer Inkubation bei Raumtemperatur für 10 min und Zentrifugation bei 3500 x g für 10 min (Eppendorf AG, Zentrifuge 5810R), wurde das entstandene Pellet mit 300 µl einer Methanol-Essigsäure Lösung (9:1) gewaschen. Der beschriebene Wasch- und Zentrifugationsvorgang wurde einmal wiederholt. Nachdem das Pellet für 30 min bei 37 °C trocknete, wurde es mit 300 µl einer 0,1 M NaOH Lösung unter leichtem Schütteln gelöst. Anschließend wurde eine photometrische Messung bei 620 Nanometer (nm) mit einem Photometer (infinite® F50, Tecan) durchgeführt. Die gemessene Extinktion wurde auf den BSA-Standard bezogen, um die Proteinmenge zu bestimmen.

Reihe	µg BSA	µl ddH ₂ O	µl BSA-Lösung
A	0	100	0
B	2	96	4
C	4	92	8
D	8	84	16
E	12	76	24
F	16	68	32
G	20	60	40

Tabelle 3: BSA-Standard für die Amidoschwarz Proteinbestimmung

2.5.3 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

- 4 x Trenngel-Puffer: 1,5 M Tris-Base mit Salzsäure (HCl) auf pH 8,5 titriert
- 4 x Sammelgel-Puffer: 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8
- 40 % (v/v) Acrylamid + 2,04 g Bisacrylamid
- 30 % (v/v) Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1) (Roth)

Zusammensetzung	Trenngel 5 %	Trenngel 20 %	Sammelgel 5 %
4 x Puffer	6,84 ml	6,84 ml	9 ml

87 % (v/v) Glycerin	1,8 ml	7,2 ml	8,28 ml
40 % (v/v) Acrylamid	4,056 ml	16,2 ml	-
30 % (v/v) Rotiphorese	-	-	5,76 ml
0,2 M EDTA	316,8 µl	316,8 µl	360µl
10 % (v/v) SDS	316,8 µl	316,8 µl	360 µl
TEMED (Sigma)	21,6 µl	21,6 µl	27,3 µl
10 % (w/v) Ammoniumperoxodisulfat (Sigma)	115,2 µl	72 µl	222,3 µl
0,5 % (v/v) Bromphenol Blau	-	96 µl	-
0,2 % Phenolrot	-	-	175 µl
ddH₂O	18,94 ml	1,392 ml	11,88 ml

Tabelle 4: Zusammensetzung des SDS-Polyacrylamid Gels

Lösungen:

- 1 x SDS-Puffer: 0,25 % (w/v) SDS, 10 % (v/v) Glycerin, 5 % (v/v) β-Mercaptoethanol, 62,5 mM Tris pH 6,8, 0,001 % (w/v) Bromphenol Blau
- Proteinmarker: Page Ruler, Page Ruler Plus
- 1 x Elektrophorese Puffer: 25 mM Tris-Base, 192 mM Glycin, 0,1 % (v/v) SDS
- 1 x Western Blot Puffer: 25 mM Tris-Base, 192 mM Glycin, 0,02 % (v/v) SDS
- 1 x TBS: 20 mM Tris-Base, 0,8 % (w/v) NaCl
- 1 x TBS-T: 20 mM Tris-Base, 0,8 % (w/v) NaCl, 0,1 % (v/v) Tween-20
- 5 % (w/v) Magermilchpulver (Roth) in TBS oder TBS-T
- Nitrozellulosemembran (Protran BA85, 0,22 µm, Li-Cor Biosciences)
- Ponceau S Färbelösung: 5 % (w/v) Ponceau S, 3 % (v/v) Essigsäure in ddH₂O
- Chemolumineszente Detektionsreagenzien: Pierce™ ECL Western Blotting-Substrat, SuperSignal™ West Femto

SDS-Page wurde nach dem Standardprotokoll von Cleveland et al. (1977) ausgeführt. Gradientengele (5 - 20 %) wurden mit 30 µg Protein pro Spur beladen und die Trennung der Proteine wurde mit 12 mA für jedes Gel mittels einer Hoefer™ Mighty Small™ SE250 Elektrophorese-Unit (Amersham Biosciences) durchgeführt. Eine Coomassie Färbung wurde mit jedem Gel, wie in Kapitel 2.5.4 beschrieben, durchgeführt. Die Proteine wurden anschließend für 1,5 h bei 200 mA und einer konstanten Temperatur von 4 °C auf eine Nitrozellulosemembran übertragen (Towbin et al. 1979). Darauffolgend wurden die Membranen für 10 min in Ponceau S Lösung gefärbt. Überschüssiges Ponceau S Lösung wurde mit ddH₂O und TBS entfernt. Um unspezifische Antikörperbindungen zu verhindern, wurden die Membranen für 1,5 h in TBS mit 5 % Magermilch geblockt, anschließend mehrmals mit TBS gespült und abschließend über Nacht mit dem jeweiligen Primärantikörper bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Membrane für jeweils 5 und 10 min mit TBS und TBS-T gespült, und anschließend mit einem korrespondierenden Meerrettich Peroxidase (horse radish peroxidase, HRP) -konjugiertem Sekundärantikörper in 5%iger TBS-T Milch bei Raumtemperatur für 1,5 h inkubiert. Nachfolgend wurden die Membranen, wie zuvor beschrieben, gewaschen und mit chemolumineszenten Detektionsmarkern ECL und Femto

inkubiert. Für die Visualisierung der Banden wurde das Odyssey® Fc Imaging System Model 2800 von LI-COR Biosciences genutzt. Die Signalintensität jeder einzelnen Bande wurde mit Hilfe der Image Studio™ Lite Software Version 5.0 (LI-COR Biosciences) quantifiziert und das geladene Volumen der Proben mittels des β -Actin Signals normalisiert, um gleiche Proteinkonzentrationen zu gewährleisten.

2.5.4 Coomassie Brilliant Blau R250 Färbung

- Coomassie Färbelösung: 0,125 % (w/v) Coomassie Brilliant Blau R250, 50 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure
- Entfärbelösung: 7 % (v/v) Essigsäure
- Konservierungslösung: 50 % (v/v) Methanol, 5 % (v/v) Glycerin

Die Coomassie Färbung korrespondiert zur Gesamtmenge der geladenen Proteine in jeder Spur des SDS-PAGE. Die Gele wurden nach dem Blotten über Nacht in ausreichender Menge Färbelösung inkubiert und anschließend mit der Entfärbelösung entfärbt. Die Gele wurden so lange entfärbt, bis distinkte Proteinbanden klar zu erkennen waren. Nun wurden die Gele über Nacht in ddH₂O inkubiert und am nächsten Tag mithilfe des ArtixScan F2 (Microtek) Scanners und der SilverFast 8.0 Software digitalisiert und analysiert. Zuletzt wurden die Gele in der Konservierungslösung für 5 min inkubiert und auf einem Trocknungsrahmen zwischen zwei Cellophanfolien (Roth) getrocknet.

2.5.5 2',3'-cGAMP ELISA

Für das ‚*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*‘ (ELISA) wurde das cayman chemical 2',3'-cGAMP ELISA Kit (cayman chemical 501700) sowie das N-PER™ Extraktions-Reagenz für neuronale Proteine (Thermo Fisher Scientific 87792) verwendet. Mäuse im Alter von 8, 24 und 108 Wochen wurden mit Isofluran Baxter (Baxter GmbH) tief anästhesiert und anschließend dekapitiert. Die Gehirne wurden mit dem N-PER™ Extraktions-Reagenz im Verhältnis 1 g Gewebe/ 10 ml Reagenz mit einem Potter (Potter S, Sartorius) mittels 12 Hüben bei 900 rpm homogenisiert. Nach Inkubation der Proben bei 95 °C für 5 min, wurden diese bei 14000 x g und 4 °C für 20 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf Reaktionsgefäß transferiert und eine Amidoblack-Färbung zur Bestimmung der Proteinkonzentrationen wie in Kapitel 2.5.2 beschrieben, durchgeführt. Anschließend wurde der 2',3'-cGAMP ELISA mittels beschriebenen Kit entsprechend den Herstelleranweisung durchgeführt. In Kürze: Jeweils 50 μ l Probe mit einer Proteinkonzentration von 1 μ g pro 50 μ l wurden in ein Well pipettiert.

Anschließend wurden jeweils 50 µl 2',3'-cGAMP-HRP in allen Wells, außer „total activity“ (TA) und „blank“ (Blk), pipettiert. Nachfolgend wurden 50 µl 2'3'-cGAMP polyklonales Antiserum in allen Wells, außer „non specific binding“ (NSB), TA und Blk, pipettiert und die Platte über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde nach dreimaligem Waschen mit dem beigelegten Waschpuffer, jeweils 175 µl der Tetramethylbenzidin-Substratlösung hinzugefügt sowie jeweils 5 µl des Tracers bei TA. Die Platte wurde für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und mit 75 µl der HRP-Stopplösung pro Well blockiert. Die photospektrometrische Messung der Proben wurde mit einem Mikroplatten-Reader Infinite® F50 (Tecan) bei 450 nm durchgeführt.

2.6 Immunhistochemie

2.6.1 ‚Free Floating‘ Immunfluoreszenzfärbung

- PLP-Fixierlösung: Natriumperjodat-Lysin-Paraformaldehyd Fixierlösung nach McLean und Nakane: 30 ml Lysin-Puffer (0,1 M Lysin-HCl, 0,05 M Na₂HPO₄, pH 7,4), 0,54 g Glukose gelöst in 10 ml 16 % Paraformaldehyd (PFA) (16 % PFA (w/v) in PBS (Ambion)
- Saccharoselösung: 30 % (w/v) Sucrose, 14 % (v/v) 0,2 M NaH₂PO₄*H₂O, 36 % (v/v) 0,2 M Na₂HPO₄*H₂O
- TPBS: 0,12 % (w/v) Tris, 0,9 % NaCl, 0,025 % (w/v) NaH₂PO₄*H₂O
- TPBS-T: 0,12 % (w/v) Tris, 0,9 % (w/v) NaCl, 0,025 % (w/v) NaH₂PO₄*H₂O, 0,3 % (v/v) Triton X-100
- Avidin-Biotin Komplex Lösung (ABC-Lösung): VECTASTAIN® Elite® ABC-Kit (Vector Laboratories) (0,5 % Reagenz A, 0,5 % Reagenz B)
- Biotin-Tyramin Lösung: 0,15 % (w/v) Biotin-Tyramin, 0,03 % (v/v) von 30 % H₂O₂ in TPBS-T

Für immunhistochemische Färbungen wurden Mäuse im Alter von 8, 24 und 108 Wochen mit einer intraperitonealen Injektion mit 4%iger Chloralhydrat Lösung (150 µl /10 g Körpergewicht) anästhesiert. Die Mäuse wurden auf einer Styroporplatte fixiert, um anschließend den Thorax zu eröffnen. Transkardial wurden 20 ml einer Natriumchlorid-Lösung und 3 x 20 ml der PLP-Fixierlösung in den Blutkreislauf perfundiert. Darauf folgend wurden die Mäuse dekapitiert, die Gehirne präpariert und über Nacht bei Raumtemperatur in PLP-Fixierlösung inkubiert. Dieser Schritt der Tötung und Entnahme der Mäusegehirne wurde von für die Durchführung von Tierversuchen zertifizierten Mitarbeiter*innen des Instituts umgesetzt. Am Folgetag wurde die PLP-Fixierlösung bis auf 1 ml entfernt und mit einer ausreichenden Menge Saccharoselösung aufgefüllt. Die so präparierten Gehirne wurden bei 4 °C für 3 Tage inkubiert. Anschließend

wurden die Gehirne mit einem Einbettmedium für Kryoschnitte eingebettet und bei -70 °C tiefgefroren. Letztlich wurden die Gehirne mittels Leica CM3050 S Kryostat (Leica) frontal in 20 µm dicke Scheiben geschnitten. Die Schnitte wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei 4 °C in einer TPBS-Lösung mit 0,01 % Natriumazid aufbewahrt.

Alle Inkubations- und Waschschriffe wurden unter konstantem, leichtem Schütteln durchgeführt. Vor der Färbung wurden die Schnitte drei Mal in TPBS gewaschen. Die Permeabilisierung der Schnitte erfolgte durch 30 min Inkubation in einem TPBS/Ethanol Gemisch (1:1). Anschließend wurden die Schnitte drei Mal für je 5 min mit TPBS gewaschen und anschließend mit dem Primärantikörper in TPBS-T und 1 % Pferdeserum über Nacht bei 4 °C im Dunklen inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Schnitte vier Mal für je 5 min mit TPBS-T gewaschen und anschließend bei Raumtemperatur für 2 h mit Biotin-konjugiertem IgG (1:500 in TPBS-T mit 1 % Pferdeserum) inkubiert. Im Folgenden wurden die Schnitte drei Mal mit TPBS-T für 5 min gewaschen, gefolgt von einer 1-stündigen Inkubation mit ABC-Lösung. Nach 3 weiteren Waschschriffen mit TPBS-T, wurden die Schnitte für 20 min mit Biotin-Tyramin Lösung inkubiert und anschließend nach 3 weiteren Waschschriffen mit TBS-T bei 4 °C über Nacht mit Alexa Fluor 488-konjugiertem Streptavidin (1:2000 in TPBS-T mit 1 % Pferdeserum) und weiteren Primärantikörpern im Dunklen inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Schnitte vier Mal mit TPBS-T für je 5 min gewaschen und mit dem wirtsspezifischen Sekundärantikörper (1:1000 in TPBS-T mit 1 % Pferdeserum) für weitere 4 h bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte auf mit Gelatine bedeckten Objektträgern (Superfrost® 26 x 76 mm, Roth) für 30 min bei 37 °C getrocknet und für jeweils 2 min in 70, 80, 90 und 100 % Isopropanol sowie zweifach für 5 min in Roti®Histol (Roth) inkubiert. Schließlich wurden die Objektträger getrocknet, mit Neo-Mount™ (Millipore) bedeckt und mit Deckgläschen (Menzel™ 11911998) eingebettet.

2.6.2 Bildgebung

Für die Erstellung der mikroskopischen Aufnahmen wurde das konfokales Mikroskop Axioplan 2 imaging (Carl-Zeiss Jena) mit dem Objektiv EC Plan Neofluar 63x/1.40 Oil DIC M27 (AA = 0.19 mm) genutzt. Es wurden serielle Aufnahmen in der z-Achse (z-Stack) angefertigt, um ein dreidimensionales Bild zu generieren. Diese z-Stack Aufnahmen wurden mit einer CCD-Kamera Spot RT und der Software ZEN 2012 SP5 FP1 (schwarz) (Carl-Zeiss Jena, Version 14.0.9.201) erstellt. Die untersuchten Gehirnareale wurden mit Hilfe eines Atlanten (Franklin und Paxinos 2008) aufgesucht und es wurden jeweils Bilder von mindestens drei Bildern pro Gehirnareal und pro Hemisphäre gemacht. Analysen wurden mit FIJI ImageJ (Version 2.0) gemacht.

2.7 Statistik

Alle Daten werden als Mittelwert \pm dem Standardfehler (SEM) entsprechend Gaußscher Verteilung oder als Medianwerte präsentiert. One-Way ANOVA-Tests und Tukey-Post-Hoc Mehrfachvergleichstests wurden zur Prüfung auf signifikante Unterschiede zwischen den Altersgruppen verwendet. Die statistische Analyse wurde mit Version 8 von Prism (GraphPad Software, USA) durchgeführt. p-Werte von $p < 0,05$ wurden als statistisch signifikant angesehen (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$), wie in der Legende der Abbildungen im Abschnitt Ergebnisse angegeben.

3 Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war es die Verteilung der Konzentration ausgewählter Proteine des cGAS-STING Signalwegs und der Autophagie in Mäusen verschiedener Altersgruppen zu bestimmen. Dazu wurden, wie in Kapitel 1.6 beschrieben, 8, 24 und 108 Wochen alte Mäuse als junge, erwachsene und alte Mäuse definiert. Um die Proteinmenge der Schlüsselkomponenten des Signalwegs im ZNS der Mäuse zu ermitteln, wurde das Western-Blot-Verfahren angewandt. Aufgrund der gegenseitigen Beeinflussung von autophagischen Prozessen und dem cGAS-STING Signalweg wurden auch Effektorproteine der Autophagie quantitativ analysiert. Für eine regionale und zelltypspezifische Analyse wurden Frontalschnitte der Mäusegehirne am entorhinalen Kortex (EC) und im Hippocampus am *Gyrus dentatus* (DG) und *Cornu ammonis 1* (CA1) immunhistochemisch untersucht. Hierbei wurde das STING-Protein als Schlüsselkomponente des Signalwegs hinsichtlich Signalintensität und Lokalisierung in den Gehirnschnitten analysiert.

3.1 Quantitative Analyse von Komponenten des cGAS-STING Signalwegs in Mäusegehirnen unterschiedlicher Altersgruppen

Die Erkenntnis, dass der cGAS-STING Signalweg eine wichtige Rolle in neuroinflammatorischen Prozessen spielen kann, legte nahe, die wesentlichen Proteine dieses Signalwegs in Mäusegehirnen quantitativ mittels WB-Verfahren zu bestimmen. Dazu wurden die Proteine aus den Kortizes der Mäuse extrahiert (siehe Kapitel 2.5.1) und die jeweilige Gesamtproteinmenge bestimmt (siehe Kapitel 2.5.2), bevor anschließend das WB-Verfahren (siehe Kapitel 2.5.3) durchgeführt wurde. Mit diesem Verfahren konnten die entscheidenden Proteine des Signalwegs identifiziert und quantifiziert werden (vgl. Abbildung 3 B-I).

Das erste untersuchte Protein war das cGAS-Protein. Eine signifikant höhere spezifische Proteinmenge wurde bei 108 Wochen alten Mäusen im Vergleich zu 8 und 24 Wochen alten Mäusen festgestellt (vgl. Abbildung 3 A, B). Im Gegensatz dazu zeigte sich bei der Untersuchung von STING eine tendenzielle Abnahme der Proteinkonzentration mit zunehmendem Alter, die sich zwischen 8 und 108 Wochen alten Mäusen als signifikant erwies (vgl. Abbildung 3 A, C). Bei den Konzentrationen von TBK1 und pTBK1 (Ser172), sowie beim Verhältnis zwischen pTBK1 und TBK1, wurden keine altersabhängige Tendenzen beobachtet (vgl. Abbildung 3 A, D-F). Das Verhältnis der phosphorylierten und der nicht-phosphorylierten Form eines Proteins kann Aufschluss darüber geben, wie stark oder schwach das Protein in

seiner Umgebung aktiv ist. Zwischen 8 Wochen und 108 Wochen alten Mäusen wurde eine deutliche Abnahme der Proteinkonzentration von IRF3, identifiziert, wobei für pIRF3 (Ser396) keine eindeutige altersabhängige Tendenz erkennbar war (vgl. Abbildung 3 A, G, H). Die Tendenz des Verhältnisses zwischen pIRF3 (Ser396) und IRF3 ist zunehmend (vgl. Abbildung 3 I).

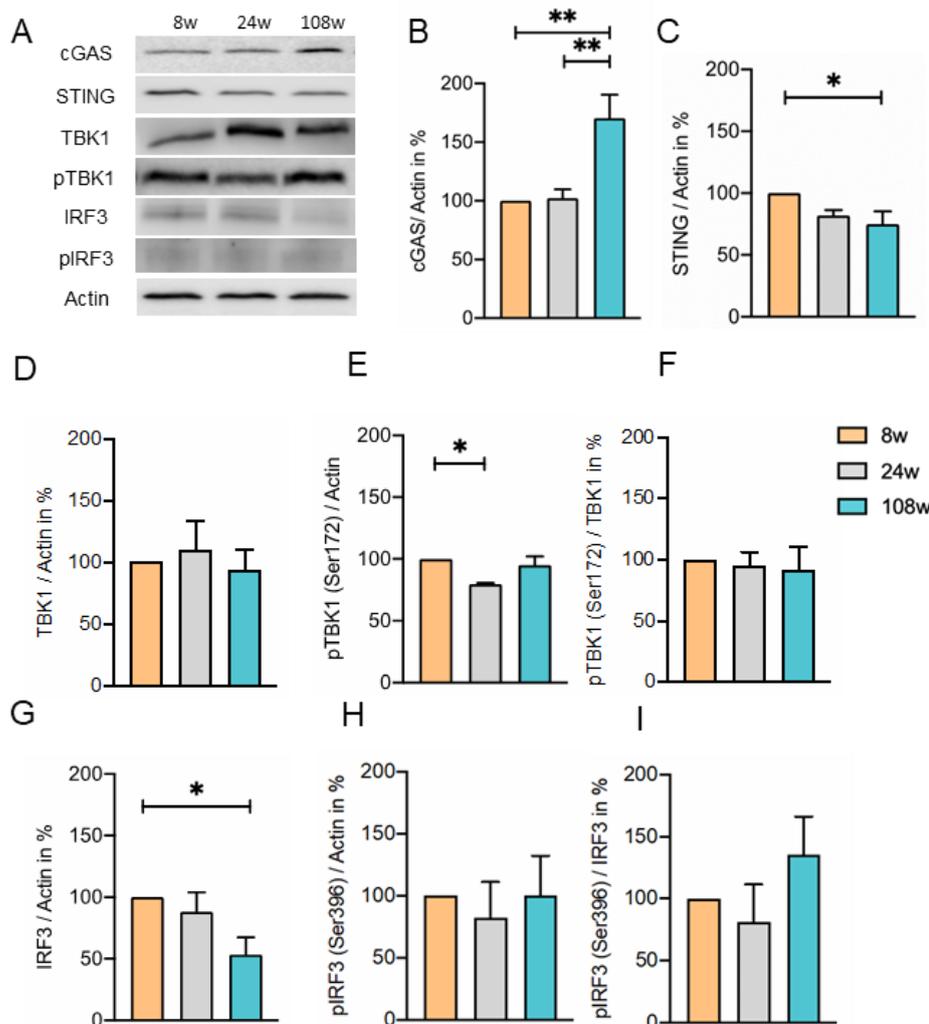


Abbildung 1: WB-Analyse von Proteinen des cGAS-STING Signalwegs im Kortex alternder Mäuse

Repräsentative Western-Blots von Proteinen des cGAS-STING Signalwegs mit Actin als Ladungskontrolle (A). Bestimmung der spezifischen Proteinkonzentrationen per Western-Blot mit Actin als Referenz von cGAS (B), STING (C), TBK1 (D), pTBK1 (E), IRF3 (G) und pIRF3 (H). Die Verhältnisse zwischen phosphorylierter und unphosphorylierter Form von TBK1 und IRF3 sind in F und I dargestellt. Die Daten wurden als Mittelwert \pm Standardfehler (SEM) angegeben. Die Abkürzungen 8w, 24w und 108w stehen für Mäuse im Alter von 8, 24 bzw. 108 Wochen. Die statistische Auswertung erfolgte mit einfaktorier ANOVA und dem Tukey Post-hoc Test (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, $n = 6$ mit je 3 technischen Replikaten, für pIRF3 und das Verhältnis zwischen pIRF3/ IRF3 $n = 3$).

Um die Menge an 2',3'-cGAMP zu analysieren, wurde ein ELISA (siehe 2.5.5) durchgeführt. Hierbei zeigte sich eine deutliche Abnahme der 2',3'-cGAMP Konzentration bei 108 Wochen alten Mäusegehirnen im Vergleich zu 8 und 24 Wochen alten Tieren (vgl. Abbildung 4).

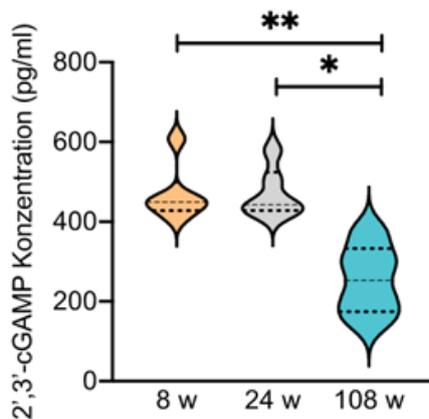


Abbildung 4: 2',3'-cGAMP-Konzentration im Kortex alternder Mäuse

Statistische Analyse der mittels ELISA-Verfahren photometrisch bestimmter Konzentration von 2',3'-cGAMP in isolierten Kortexen von Mäusen im Alter von 8, 24 und 108 Wochen. Bemerke: Die 2',3'-cGAMP-Konzentration nimmt bei 108 Wochen alten Mäusen im Vergleich zu 8 und 24 Wochen alten Mäusen signifikant ab. Es wurden Proben aus jeweils sechs Tieren pro Altersgruppe untersucht (* $p < 0,05$, ** $p < 0,001$).

Aufgrund der engen Relation der Autophagie und des cGAS-STING Signalwegs wurden die Proteinmengen von Beclin1, Kofaktor der Autophagosom-Initiation (Liang et al. 2014), und ULK1, wichtiger Regulator der Autophagie (Konno et al. 2013), in den Mäusen der verschiedenen Altersgruppe analysiert. Wie in Abbildung 5 A-D zu sehen ist, zeigten sich bei ULK1 und pULK1 (Ser555) sowie dem Verhältnis zwischen pULK1 und ULK1 keine Tendenzen einer altersabhängigen Konzentrationsveränderung. Bei pBeclin1 (Ser30) ist im Vergleich zu Beclin1 eine signifikant höhere Konzentration des phosphorylierten Proteins in den 108 Wochen alten Mäusen verglichen mit 8 und 24 Wochen alten Tieren nachweisbar (vgl. Abbildung 5 A, E, F). Das Verhältnis zwischen pBeclin1 zu Beclin1 weist eine tendenzielle, nicht signifikante Zunahme zugunsten der phosphorylierten Form auf (vgl. Abbildung 5 G). Die WB-Analysen von p62 und LC3 zeigten keine signifikanten Veränderungen. Die Tendenz erhöhter Proteinkonzentration von p62 und LC3-II sind bei 108 Wochen alten Mäusegehirnen im Vergleich zu den 8 und 24 Wochen alten erkennbar (vgl. Abbildung 6 A, B, D). Auch die Proteinkonzentrationen von LC3-I sowie das Verhältnis zwischen LC3-I und LC3-II zeigen nicht signifikant erhöhte Tendenzen (vgl. Abbildung 6 C, E).

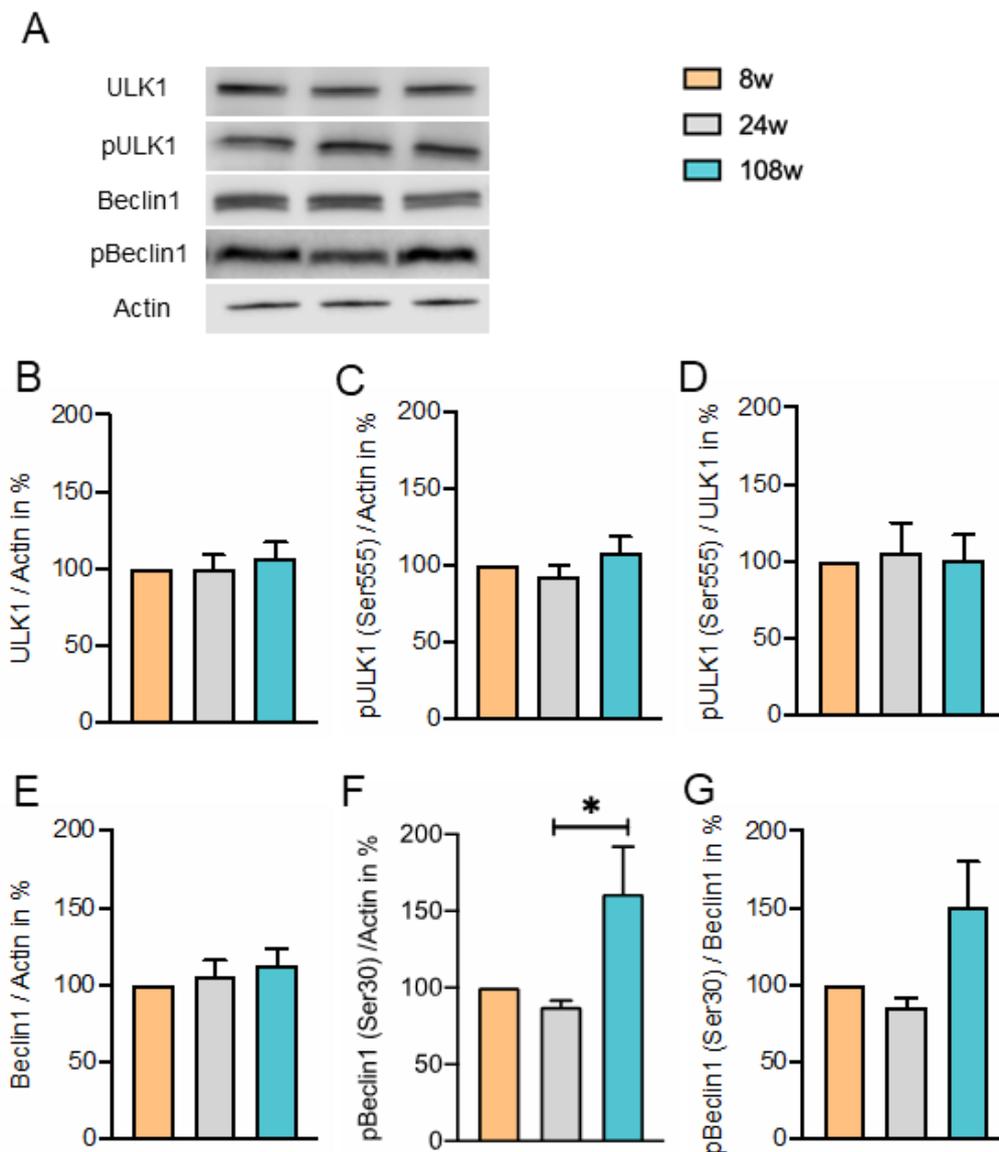


Abbildung 5: Quantitative Konzentrationsbestimmung ausgewählter Proteine des cGAS-STING Signalwegs im Kortex alternder Mäuse mit Relevanz für Autophagie-Prozesse

Veranschaulichende Blots von ULK1 und Beclin1 und der jeweils zugehörigen phosphorylierten Form. Als Ladungskontrolle wurde Actin gewählt (A). Keine signifikanten Veränderungen der Proteinmenge von Ulk1 (B), pULK1 (C) und Beclin1 (E). Signifikant höhere Proteinmenge von pBeclin1 in den 108 Wochen alten Mäusekortex verglichen mit jüngeren Altersgruppen (F). Die Ratio von pULK1/ULK1 (D) und pBeclin1/Beclin1 (G) zeigt keine signifikanten Veränderungen der Phosphorylierung. Mäuse im Alter von 8, 24 und 108 Wochen werden durch die Abkürzungen 8w, 24w bzw. 108w repräsentiert. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm SEM angegeben. Die Analyse erfolgte mittels einfaktoriellem ANOVA und dem Tukey Post-hoc Test (* $p < 0,05$, $n = 6$ in jeder Gruppe mit drei bis sechs unabhängigen Experimenten (B-G)).

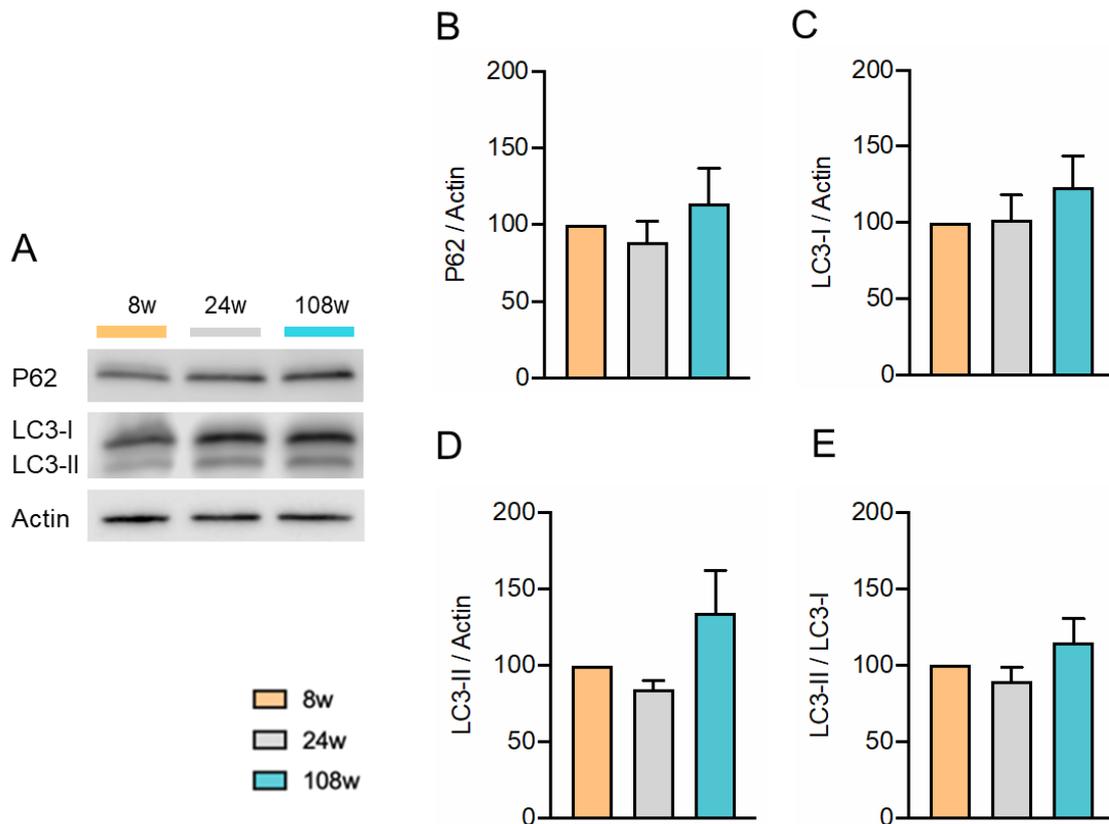


Abbildung 6: WB-Analysen von p62, LC3-I und LC3-II im Kortex von Mäusen unterschiedlicher Altersgruppen

Repräsentative Western Blots mit Actin als Ladekontrolle (A). Die Daten zeigen tendenziell erhöhte Menge an p62, LC3-I und LC3-II bei 108 Wochen alten Mäusen verglichen mit 8 und 24 Wochen alten Tieren (B-D). Das Verhältnis zwischen LC3-II und LC3-I ist bei den 108 Wochen alten Mäusen im Vergleich zu den jüngeren Mäusen erhöht (E). Mit den Abkürzungen 8w, 24w und 108w werden 8, 24 beziehungsweise 108 Wochen alte Mäuse repräsentiert. Die statistische Auswertung erfolgte mit einfaktorieller ANOVA und dem Tukey Post-hoc Test (n = 6 in jeder Gruppe, mit drei bis sechs technischen Replikaten).

3.2 Immunhistochemische Analyse der STING-Lokalisation in ausgewählten Bereichen des Mäusehirns

Um eine zellspezifische, lokale Analyse des cGAS-STING Signalwegs im ZNS von Mäusen zu erreichen, wurden Frontalschnitte des Hirns mit verschiedenen Markern für STING und ZNS-spezifische Zellen (IBA1 für Mikroglia, glial fibrillary acidic protein (GFAP) für Astrozyten, microtubule-associated protein 2 (MAP2), Hexaribonukleotid-Bindungsprotein-3 (NeuN) für Neuronen) immunhistochemisch gefärbt (vgl. Abbildung 7 und 11). Für die Signalverstärkung der Färbung des STING-Enzyms wurden die Schnitte mittels Avidin-Biotin Komplex (ABC) behandelt. Als Gehirnregionen wurden der Hippocampus mit dem DG und der CA1 ausgewählt. Diese Gehirnareale sind wichtig für die Konsolidierung von Gedächtnisinhalten (Lee et al. 2004) und die Degeneration des Hippocampus spielt bei Demenzformen wie der

AD eine essenzielle Rolle (Mu und Gage 2011). Im Alter sind die synaptische Plastizität und die Neurogenese im DG vermindert (Farmer et al. 2004, van Praag et al. 2005). Als repräsentative Region der Großhirnrinde (Kortex) wurde der EC ausgewählt.

Die in Abbildung 7 dargestellten repräsentativen Färbungen der beiden Hippocampus-Bereiche DG und CA1 sowie des EC zeigen eine Kolokalisierung des STING- und des IBA1-Signals in allen untersuchten Gehirnregionen. Die kleinen gelben Pfeile im überlagerten Bild (MERGE) in Abbildung 7 weisen beispielhaft auf einige STING und IBA1 positive Zellen hin.

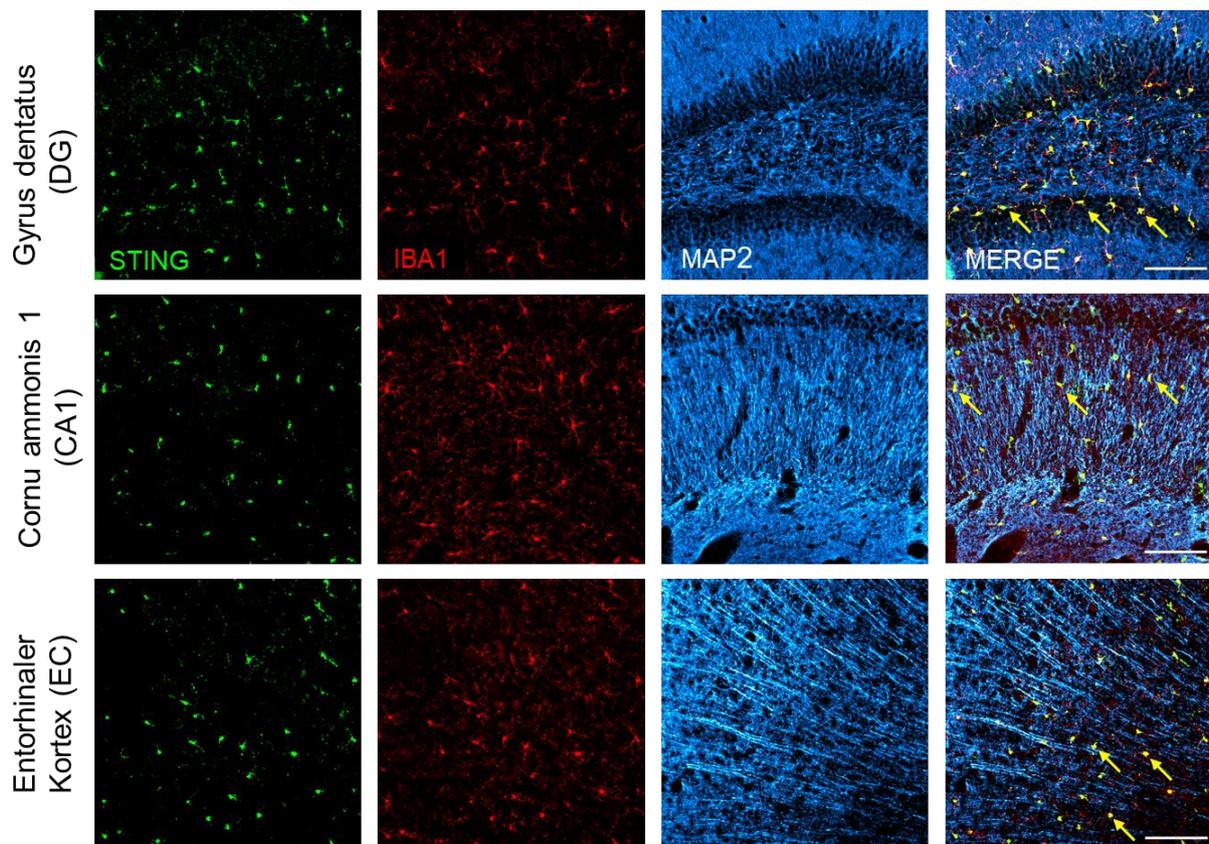


Abbildung 7: Immunfluoreszenzfärbung des *Gyrus dentatus* und der *Cornu ammonis 1* sowie des entorhinalen Kortex von 8 Wochen alten Mäusen mittels Antikörper gegen STING, IBA1 und MAP2

20 µm dicke Frontalschnitte von 8 Wochen alten Mäusen wurden immunhistochemisch mit Hilfe von Antikörpern gegen STING (grün), IBA1 (rot) und MAP2 (blau) gefärbt. Die hier dargestellten Färbungen zeigen repräsentativ die Kolokalisierung von STING und IBA1 positiven Mikrogliazellen in den oben angeführten Gehirnarealen der Maus. Die Kolokalisierung von STING mit IBA1 zeigt, dass dieses Protein im ZNS von Mäusen vor allem in Mikrogliazellen exprimiert ist. Die Pfeile zeigen beispielhaft einige Kolokalisationen im überlagerten Bild (Merge) auf. Maßstab: 100 µm

3.2.1 STING und IBA1 im entorhinalen Kortex

Im EC wurde festgestellt, dass sich die Signalintensität von IBA1 und STING im Alter verringert. Im Gegensatz zu 8 Wochen alten Mäusegehirnen ist bei 24 und 108 Wochen alten Mäusen eine signifikant geringere Signalintensität der beiden Proteine, wie in Abbildung 8 A, B, D dargestellt, zu finden. Bei der Anzahl STING und IBA1 positiver Zellen wurden keine eindeutigen Differenzen festgestellt (siehe Abbildung 8 A, C, E).

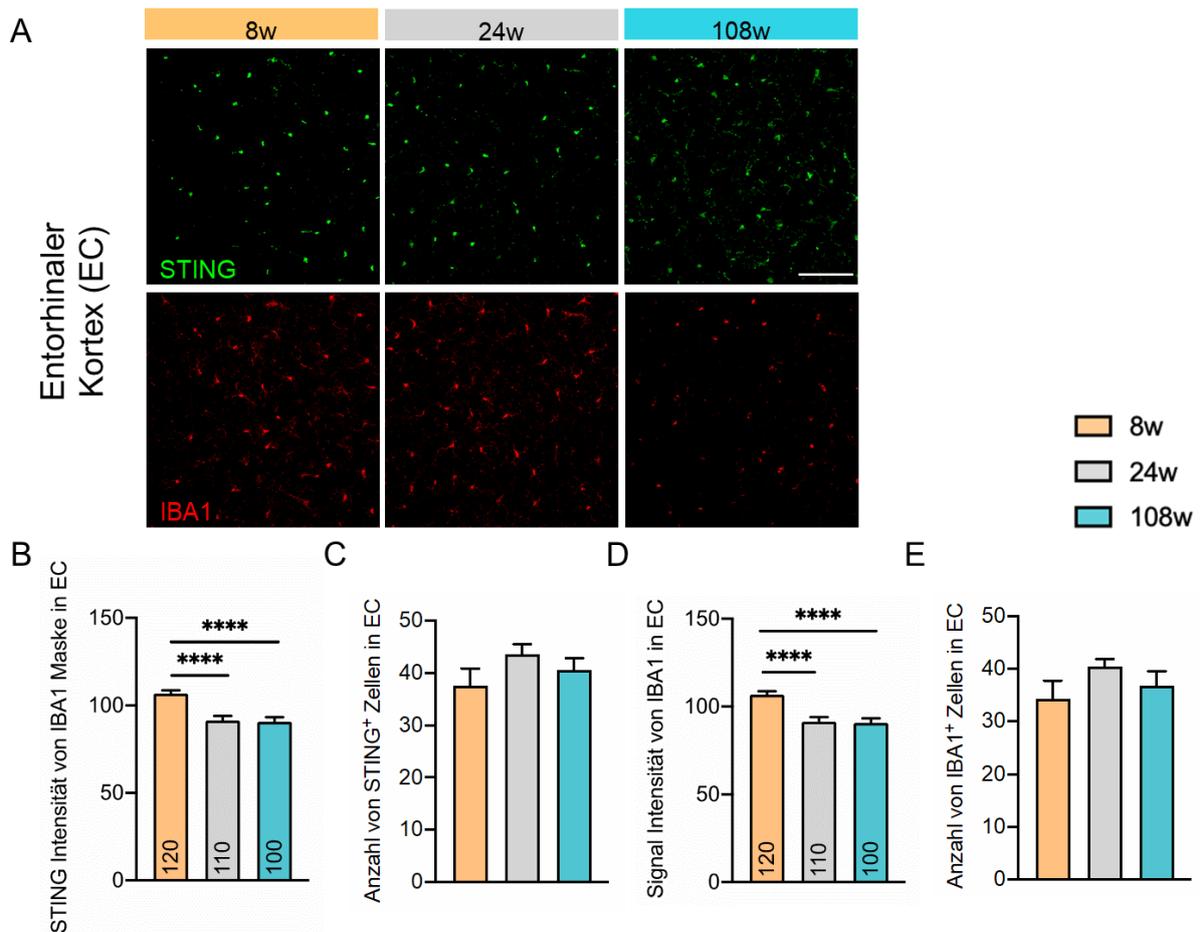


Abbildung 8: STING und IBA1 sind im EC von 8 Wochen alten Mäusen am höchsten exprimiert

Repräsentative Aufnahmen von STING und IBA1 positiven Zellen im EC von 8, 24 und 108 Wochen alten Mäusen (A). In 24 und 108 Wochen alten Mäusen vermindert sich die Signalintensität von STING und IBA1 im Vergleich zur 8 Wochen alten Gruppe (B, D). Die Gesamtmenge der STING positiven Zellen, sowie die IBA1 positiven Zellen zeigen im Alter keine signifikanten Veränderungen (C, E). Dabei stehen 8w, 24w und 108w für 8, 24 bzw. 108 Wochen alte Mäuse. Die Daten wurden als Mittelwerte \pm SEM gezeigt. Die statistische Auswertung folgte mit dem einfaktoriellen ANOVA und dem Tukey Post-hoc Test ($****p < 0,0001$, $n = 6$ in jeder Gruppe bei drei unabhängigen Experimenten). Für die Auswertung der Signalintensität wurden 100-120 Zellen ausgewertet (B, D). Maßstab: 100 μ m

3.2.2 STING und IBA1 im *Cornu ammonis 1*

In der CA1-Region wurde, wie in Abbildung 9 D gezeigt, keine Veränderung bei der Intensität IBA1 positiver Zellen festgestellt. Bei der Signalintensität von STING innerhalb der IBA1 Maske wurde bei den 108 Wochen alten Mäusen eine signifikant höhere Intensität als bei 24 Wochen alten festgestellt (9 A, B). Die Anzahl STING positiver Zellen ist zudem bei 108 Wochen alten Tieren signifikant größer als bei 8 und 24 Wochen alten (9 A, C). Bei den IBA1 positiven Zellen wurde kein Unterschied in den verschiedenen Altersgruppen festgestellt (9 A, E). Aufgrund der erhöhten STING Signalintensität im Alter ist von einer möglichen Aktivierung des Signalwegs in Teilen des Hippocampus auszugehen.

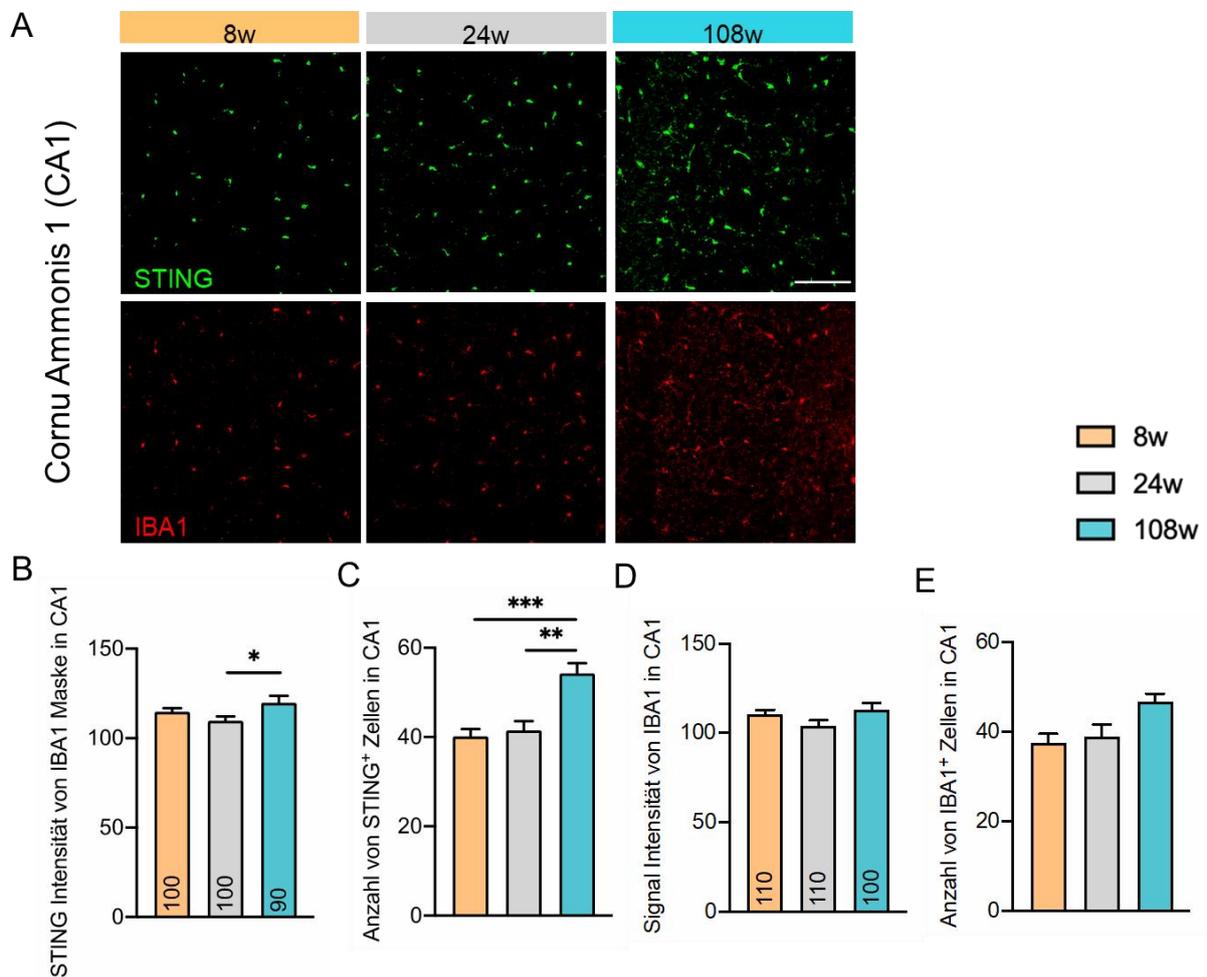


Abbildung 9: Altersabhängig signifikanter Anstieg STING positiver Zellen im CA1 der Maus

Repräsentative Aufnahmen von STING und IBA1 positiven Zellen von 8, 24 und 108 Wochen alten Mäusen im Bereich der CA1 (A). Eine Zunahme von STING positiven Zellen sowie eine höhere Signalintensität von STING wurde mit zunehmendem Alter der Tiere festgestellt (B, C). Die Signalintensität von IBA1 zeigte keine Veränderung (D). 8w, 24w und 108w stehen dabei für 8, 24 beziehungsweise 108 Wochen alte Mäuse. Eine nicht signifikante Zunahme wurde bei Mikroglia-Zellen festgestellt (E). Es wurden die Mittelwerte \pm Standardfehler gezeigt. Die Auswertung erfolgte mit der einfaktoriellen ANOVA und dem Tukey Post-hoc Test (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). Es wurden

beide Hemisphären pro Tier, bei 6 Tieren (n = 6) untersucht. Für die Signalintensität wurden 90–110 Zellen analysiert (B, D). Maßstab: 100 µm

3.2.3 STING und IBA1 im *Gyrus dentatus*

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden im DG ebenfalls die Signalintensität und die Anzahl der Zellen, die sowohl STING als auch IBA1 positiv waren, quantifiziert (vgl. Abbildung 10 A – E). Bei Betrachtung der Anzahl wurden eine signifikante Zunahme der IBA1 positiver Zellen (vgl. Abbildung 10 E), begleitet von einer geringfügigen, aber nicht signifikanten Zunahme STING positiver Zellen festgestellt (vgl. Abbildung 10 C). Die IBA1-Signalintensität blieb über die verschiedenen Altersgruppen hinweg nahezu konstant (vgl. Abbildung 10 D), während die Signalintensität von STING in den IBA1 positiven Zellen tendenziell leicht abnahm (vgl. Abbildung 10 B).

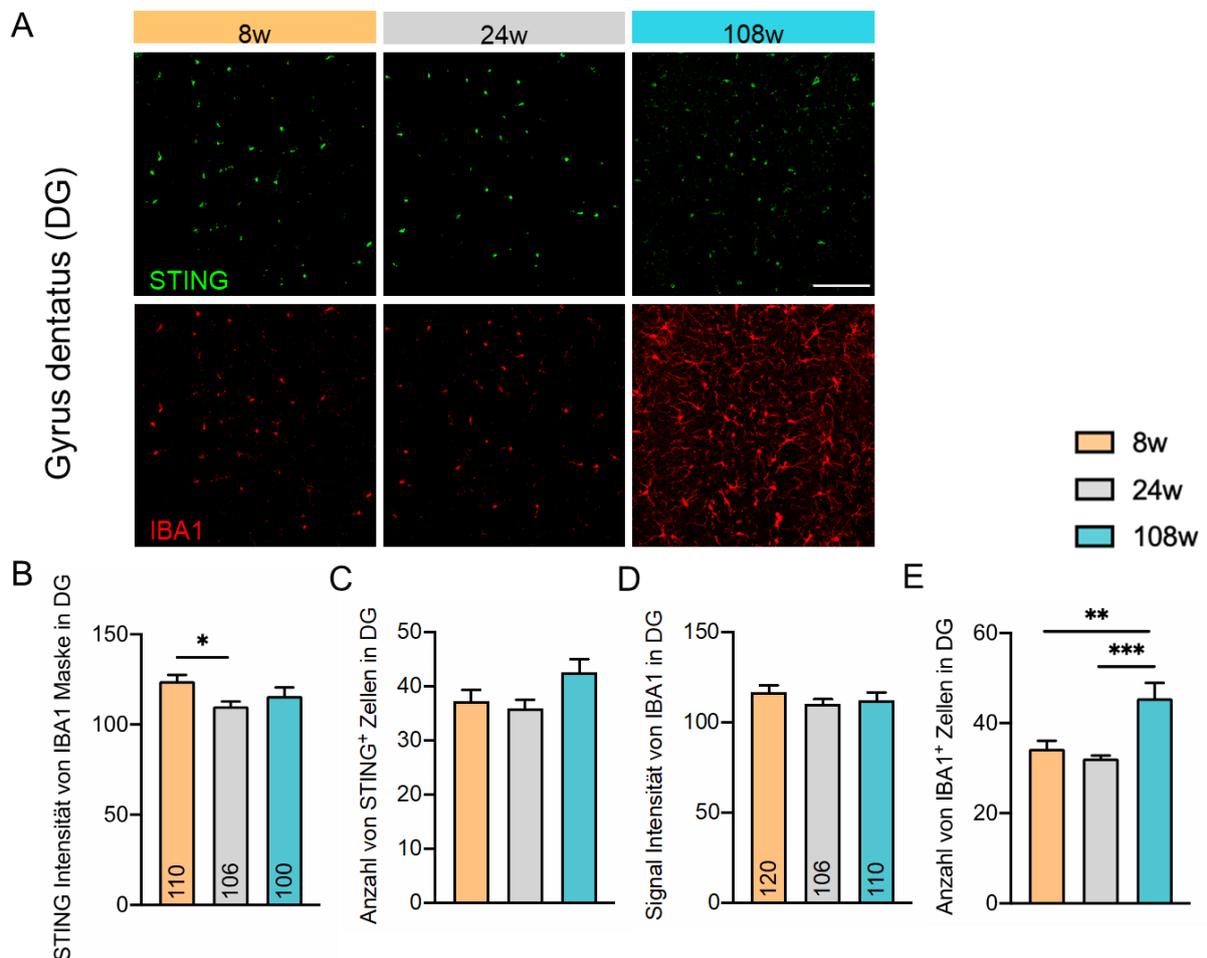


Abbildung 10: Altersabhängige Zunahme der IBA1 positiven Zellen im DG von Mäusen

Veranschaulichende Aufnahmen von STING und IBA1 positiven Zellen im DG bei 8, 24 und 108 Wochen alten Mäusen (A). Im Vergleich zu den 24 und 108 Wochen alten Mäusen wurde bei den 8 Wochen alten Mäusen eine Abnahme der Signalintensität für IBA1 und des STING-Proteins in der IBA1 Maske gefunden (B). Die Zahl der STING positiven Zellen ist tendenziell bei den 108 Wochen alten Tieren

höher als bei den jüngeren Mäusegruppen (C). Eine nahezu konstante Signalintensität von IBA1 in den verschiedenen Altersgruppen (D). Signifikant höhere Anzahl von Mikroglia wurden bei 108 Wochen alten Mäusen im Vergleich zu 8 und 24 Wochen alten Mäusen gefunden (E). 8w, 24w und 108w stehen respektive für 8, 24 beziehungsweise 108 Wochen alte Mäuse. Die Werte wurden als Mittelwerte \pm Standardfehler angegeben. Die Auswertung erfolgte mit der einfaktoriellen ANOVA und dem Tukey Post-hoc Test (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). Es wurden beide Hemisphären pro Tier, bei sechs Tieren untersucht ($n = 6$). Für die Signalintensität wurden 90–110 Zellen analysiert (B, C). Maßstab: 100 μm

3.2.4 Kolokalisation von STING mit Astrozyten- und Neuronenmarkern

Unsere Beobachtung, dass die Anzahl IBA1 positiver Zellen im Alter, bei gleichzeitiger Zunahme STING positiver Zellen, unverändert bleibt, hat uns zu der Annahme geführt, dass das STING-Protein auch in anderen Zelltypen des ZNS, wie Astrozyten oder Neuronen, lokalisiert sein könnte. Kofärbungen mit GFAP für Astrozyten und NeuN bzw. MAP2 für Neurone führten, wie in Abbildung 7 und 11 veranschaulicht, zu vereinzelt Kolokalisierungen von STING mit beiden Zelltypen.

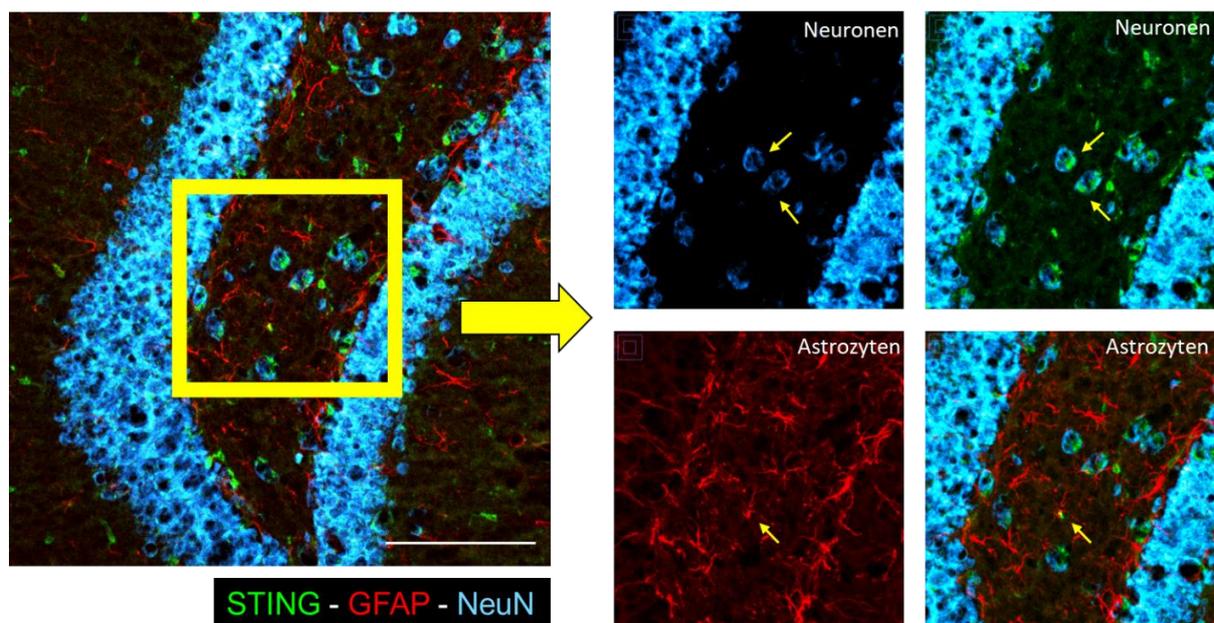


Abbildung 11: Beispiel für die Kolokalisation von STING mit Astrozyten (GFAP) und mit Neuronen (NeuN) im DG

Repräsentative Aufnahme mit Vergrößerung eines Ausschnittes im DG eines 24 Wochen alten Mausgehirns mit einer IF-Färbung von STING (grün), GFAP (rot) und NeuN (blau) zum Nachweis der STING-Lokalisation in Neuronen und Astrozyten. Bemerke: Die Kolokalisation vom STING-Signal und GFAP und NeuN sind mit den kleinen Pfeilen dargestellt. Maßstab: 100 μm

In Abbildung 12 wurden Korrelationsanalysen der Signalintensitäten zwischen STING und IBA1, MAP2 und GFAP unter Verwendung des Pearson Korrelationskoeffizienten durchgeführt. Korrelationsanalysen wurden durchgeführt, um zu illustrieren, in welchen Zelltypen (Neuronen,

Mikrogliazellen und Astrozyten) sich das STING-Protein hauptsächlich befindet. Es zeigte sich eine signifikante Abnahme des Korrelationskoeffizienten zwischen STING und MAP2 im CA1 bei 108 Wochen alten Mäusen im Vergleich zu 8 und 24 Wochen alten Mäusen (Siehe Abbildung 12 E) und eine zwischen STING und GFAP im CA1 bei 108 Wochen alten Mäusen im Vergleich zu 24 Wochen alten Mäusen.

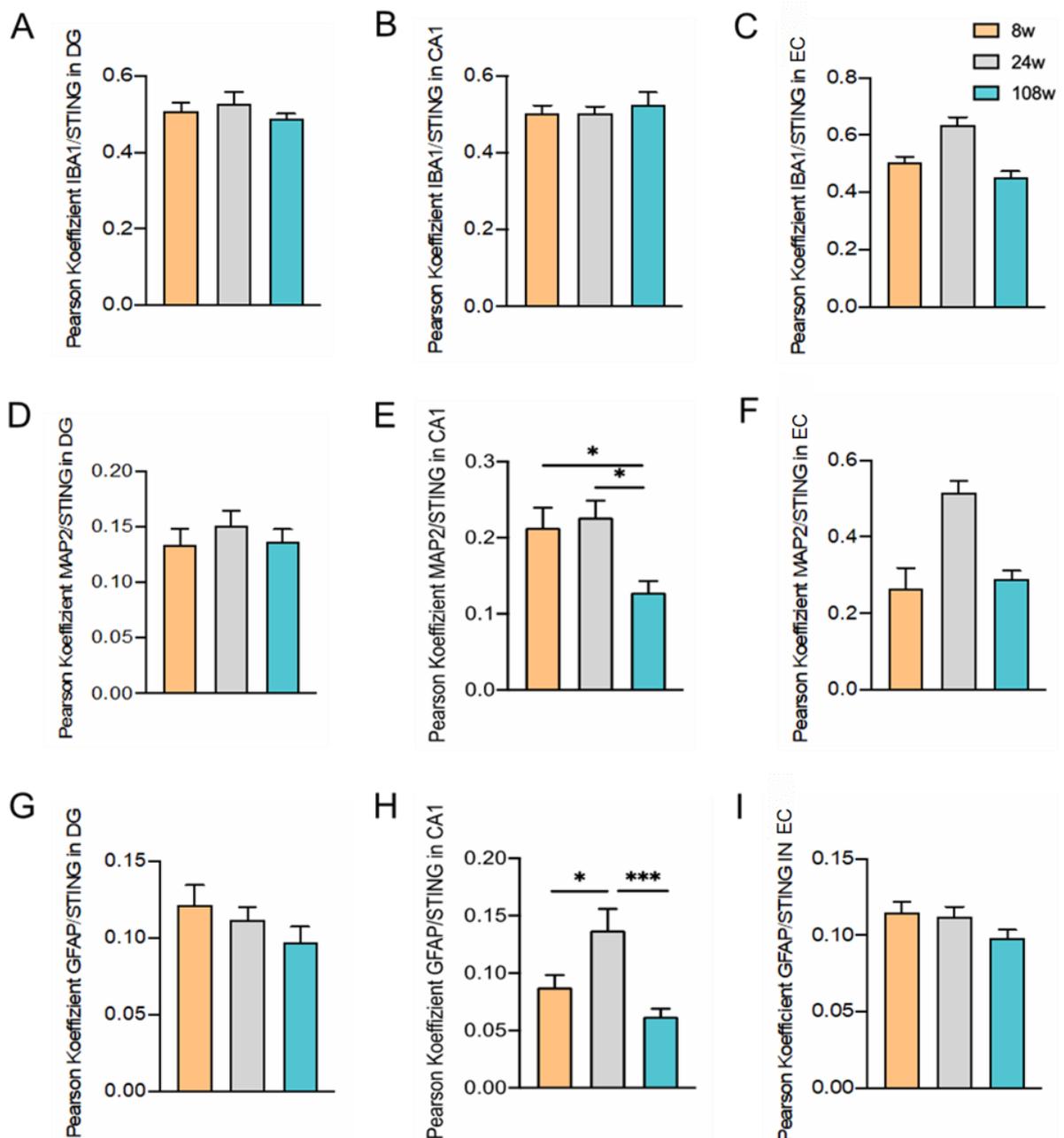


Abbildung 12: Kolokalisationsanalyse von STING und IBA1 sowie GFAP und MAP2 in verschiedenen Gehirnbereichen von Mäusen unterschiedlicher Altersgruppen.

Die Diagramme zeigen den Wert des Pearson Korrelationskoeffizienten zwischen den verschiedenen Altersgruppen in den drei analysierten Gehirnbereichen. Die Korrelationen der Signalintensitäten wurden mit IBA1/STING (A-C), MAP2/STING (D-F) und GFAP/STING (G-I) durchgeführt. 8, 24

beziehungsweise 108 Wochen alte Mäuse wurden mit 8w, 24w und 108w abgekürzt. Die Werte wurden als Mittelwert \pm Standardfehler angegeben. Eine einfaktorielle ANOVA und der Tukey Post-hoc Test wurde zur statistischen Auswertung genutzt (*p < 0,05, ***p < 0,001). Aus beiden Hemisphären des Gehirns der Mäuse wurden die Regionen analysiert. Bei drei technischen Wiederholungen wurden je sechs Tiere analysiert (n = 6).

4 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle des cGAS-STING Signalwegs als möglichen Faktor beim gesunden Altern des ZNS zu untersuchen. Hierfür wurden die Haupteffektorproteine des Signalwegs im ZNS von Mäusen analysiert. Außerdem haben wir untersucht in welchen Zelltypen des ZNS die Proteine des Signalwegs vor allem exprimiert werden.

Diese Arbeit zeigt, dass die Proteine des cGAS-STING Signalwegs unterschiedlich stark in den verschiedenen Altersgruppen im Kortex exprimiert werden. Zudem zeigte sich eine deutliche Kolo­kalisierung von STING und IBA1 positiven Zellen im EC und Hippocampus, was einer hauptsächlich­en Expression von STING in Mikrogliazellen entspricht.

4.1 Das Mausgehirn als Modell für neuronales Altern

Für die Veranschaulichung der cGAS-STING Aktivierung im ZNS im Verlauf des Alterns wurde als Modellorganismus die Labormaus der Inzuchtlinie C57BL/6J genutzt. Vorteilhaft für diese Untersuchung ist, dass diese Maus­zuchtlinie für verschiedene Experimente im Hinblick auf das Altern und altersbezogenen Erkrankungen wie der AD oder PD genutzt wird. Die durchschnittliche Lebenserwartung einer Labormaus beträgt etwa 2 Jahre (Liang et al. 2003). Studien zeigen, dass sich Mäuse trotz der unterschiedlichen Lebensdauer mit Menschen eine ähnliche systemische und organspezifische Physiologie teilen (Demetrius 2006). Für die Untersuchung altersspezifischer Veränderungen wurden im Rahmen dieser Arbeit 3 Altersgruppen ausgewählt: 8 Wochen als jugendliches, 24 Wochen als erwachsenes und 108 Wochen als altes Äquivalent.

4.2 Gehirnregionen mit frühen Veränderungen im Alter

Quantitative Analysen in Form von WB und ELISA wurden anhand von Kortexproben von Mäusen durchgeführt. Der zerebrale Kortex ist evolutionsbiologisch gesehen der jüngste ausdifferenzierte Abschnitt des Gehirns. Eine Atrophie und Funktionsverlust in verschiedenen Arealen des zerebralen Kortex sind im Zusammenhang mit dem Altern beschrieben (Morrison und Baxter 2012).

Für diese Arbeit wurden DG und CA1 des Hippocampus und der EC für die Analyse ausgewählt, weil eine Fülle an Studien die Atrophie dieser Regionen im Alter und insbesondere deren Zusammenhang mit neurodegenerativen Erkrankungen darstellt (Stranahan und

Mattson 2010). Der EC ist eine der ersten und am schwersten von altersabhängiger Atrophie betroffener Regionen des Neokortex (van Hoesen et al. 1991). Der DG ist einer der wenigen Bereiche im ZNS wo sich durch Neurogenese neue Nervenzellen ausbilden können. Der Hippocampus ist für die Gedächtnisbildung unabdingbar. Diese Fähigkeiten des DG und des Hippocampus nehmen im Alter jedoch ab. Eine Atrophie des Hippocampus wurde bei neurodegenerativen Erkrankungen wie der AD festgestellt (Mu und Gage 2011).

4.3 Auswertung der quantitativen Daten

Vor der Auswertung der mittels quantitativer Western-Blot-Analyse erhobenen Ergebnisse muss erwähnt werden, dass hierbei keine differenzierte Analyse der unterschiedlichen Zelltypen des ZNS möglich ist. Für das WB-Verfahren und die ELISAs wurde der zerebrale Kortex der Mäuse verwendet, da es insbesondere in der Kortex-Region zu wesentlichen Umformungsprozessen während des Alterns kommt (Morrison und Baxter 2012).

Die Menge an cGAS ist in den Kortexen der 108 Wochen alten Mäuse signifikant höher als in den 8 und 24 Wochen alten Mäusen (vgl. Abbildung 3 B). Interessanterweise ist die Menge des vom cGAS produzierten sekundären Botenstoffs 2',3'-cGAMP bei den 108 Wochen alten Mäusen signifikant geringer als bei den 8 und 24 Wochen alten Mäusegehirnen (vgl. Abbildung 4). Die größere Menge an cGAS führt bei den 108 Wochen alten Mäusen nicht zur Synthese von mehr 2',3'-cGAMP, folglich ist die Aktivität von cGAS im Alter geringer oder dieses wird schneller abgebaut. Das Dinukleotid 2',3'-cGAMP wird hauptsächlich von der Hydrolase „ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1“ (Enpp1) abgebaut (Onyedibe et al. 2019). Wie sich der Abbau von 2',3'-cGAMP durch Enpp1 im Alter verändert, ist nicht bekannt. Mit 2',3'-cGAMP bildet cGAS-Komplexe aus, die eine LLPS verursachen (siehe Kapitel 1.5). Diese LLPS führen dazu, dass die Aktivität von cGAS gesteigert wird und zusätzlich die Autophagie aktiviert wird (Gui et al. 2019). Gui et al. fanden zudem heraus, dass eine Behandlung von Fibroblastenzellen mit 2',3'-cGAMP die Formierung von Autophagosomen induziert. Eine geringere Aktivität von cGAS kann, durch eine verringerte Aktivierung der Autophagie, eine reduzierte Degradierung fehlgefalteter Proteine bewirken.

Die verringerte Menge des sekundären Botenstoffs 2',3'-cGAMP korreliert mit der verringerten Proteinmenge des STING-Proteins (vgl. Abbildung 3 C). Für eine konkretere Aussage muss die phosphorylierte und somit aktivierte Form von STING betrachtet werden. Unsere Daten zeigen, dass es in gesund alternden Mäusen möglicherweise zu einer Herabregulierung des cGAS-STING Signalwegs kommt (siehe Abbildung 3 C, G). Im Gegensatz dazu findet beim pathologischen Altern, wie bspw. bei neurodegenerativen Erkrankungen wie AD oder PD, eine als ‚*Inflammaging*‘ bezeichnete langfristige Entzündungsreaktion statt (Franceschi und

Campisi 2014). Veränderungen des STING-Proteins können unter Umständen als Marker für altersbezogene Erkrankungen dienen. Studien belegen, dass Allel-Varianten des STING-Gens, die eine verringerte Sensitivität auf das angeborene Immunsystem aufweisen, beim Menschen mit weniger neurodegenerativen Erkrankungen assoziiert sind (Hamann et al. 2019). In Mausmodellen mit α -Synucleopathien, einem PD-Modell, konnte man zeigen, dass STING durchgehend aktiviert wird (Hinkle et al. 2022).

Bei TBK1 und pTBK1 lassen sich aus den Analysen des WBs keine Tendenzen bestimmen (vgl. Abbildung 3 D, E). TBK1 ist eine Schnittstelle der Neuroinflammation und der Autophagie (Weidberg und Elazar 2011). Bisher noch nicht untersuchte Faktoren, können eine Ursache sein, dass keine klaren Tendenzen zur Aktivierung von TBK1 in dieser Arbeit erkennen lassen. Das Verhältnis zwischen pTBK1 und TBK1, welches keine Erhöhung oder Verringerung zwischen den verschiedenen Altersgruppen aufweist, unterstreicht diesen Sachverhalt (vgl. Abbildung 3 F). Ein erhöhtes Verhältnis würde unter anderem für eine Aktivierung über das STING-Protein sprechen. Ein verringertes Verhältnis würde im Gegensatz für eine Herunterregulierung des cGAS-STING Signalwegs sprechen. Gulen et al. konnten nachweisen, dass die Inhibition des STING-Proteins in alten Mäusegehirnen zu einer Verringerung der pTBK1 Menge führt. Dies verdeutlicht, dass der Signalweg von STING zu pTBK1 eine entscheidende Rolle im Entzündungsgeschehen alternder Mäusegehirne spielt. Wir hätten im Alter niedrigere pTBK1 Mengen erwartet. Möglicherweise spielen Interaktionen mit anderen Proteinen eine Rolle und führen zu keiner eindeutigen Tendenz von pTBK1 im Alter.

Im Unterschied zu TBK1 ist die Menge an IRF3 bei 108 Wochen alten Mäusen geringer als bei 8 und 24 Wochen alten Mäusen (vgl. Abbildung 3 G). IRF3 wird in Folge einer Entzündung aktiviert, eine Verringerung im Alter lässt auf weniger entzündliches Geschehen schließen (Zhao et al. 2023). Die phosphorylierte Form von IRF3 ist der aktive Zustand des Proteins. Hierbei haben wir keine signifikanten Veränderungen von pIRF3 festgestellt (vgl. Abbildung 3 H). Passarella hat die wesentlichen Gene, die von pIRF3 reguliert werden, untersucht. Die RT-PCR ergab, dass die Gene von ISG 54, IFN α , und IFN β im Kortex der Mäusegehirnen im Alter herunterreguliert werden (Passarella 2023). Diese Ergebnisse unterstützen die in unserer Arbeit dargelegten und zuvor beschriebenen Verringerung der IRF3 Menge (vgl. Abbildung 3 G).

Als wichtige Regulatoren der Autophagie haben wir auch eine quantitative Analyse von Beclin1, ULK1 und der jeweiligen phosphorylierten Form beider Proteine durchgeführt. Beclin1 ist für die Initiierung der Autophagie essenziell, außerdem reguliert es die Akkumulierung von Amyloid im Hirn von Mäusen und Menschen (Jaeger et al. 2010, Pickford et al. 2008). Durch eine Bindungsdomäne am Beclin1 Komplex wird cGAS gebunden und die dsDNA im Zytosol

kann somit durch die Autophagie abgebaut werden. Außerdem wird durch den Abbau von cGAS in Form einer negativen Rückkopplung der cGAS-STING Signalweg herunterreguliert (Liang et al. 2014). Bei Beclin1 konnten wir keine signifikanten Veränderungen feststellen (vgl. Abbildung 5 E). Wie in Abbildung 5 F zu sehen ist, ist bei 108 Wochen alten Mäusekortex eine signifikant höhere Menge an Serinrest 30 (Ser30) phosphoryliertem Beclin1 vorzufinden als in 8 und 24 Wochen alten Mäusekortex. Die Autophagierate nimmt in verschiedenen Tiermodellen mit dem Alter ab (Donati et al. 2001, Cuervo und Dice 2000). Somit hätten wir eine Abnahme von pBeclin1 im Alter erwartet. Die Phosphorylierung von Beclin1 an Ser30 wird hauptsächlich durch ULK1 induziert, welches wiederum durch mTOR inhibiert und durch den cGAS-STING Signalweg aktiviert wird (Deleyto-Seldas und Efeyan 2021). Außerdem phosphoryliert zum Beispiel die Phosphoglycerat-Kinase 1 (PGK1) bei Hypoxie und Glutaminmangel in Krebszellen Beclin1 an Ser30 (Qian et al. 2017). Weitere Effektoren können einen Einfluss auf diese Phosphorylierung von Beclin1 haben und sind Gegenstand der aktuellen Forschung.

Ulk1 kann Beclin1 am Serinrest 30 phosphorylieren und somit die Autophagie induzieren. Vor allem in Folge von Aminosäuremangel oder in Zellen mit Torin-1 Behandlung kommt es durch die Aktivierung von pBeclin1 zu einer erhöhten Autophagierate (Park et al. 2018). Aus diesen Gründen haben wir die Proteinmenge von Ulk1 analysiert. Es wurden bei ULK1 keine signifikanten Veränderungen festgestellt (vgl. Abbildung 5 B). Die Phosphorylierung von ULK1 am Serinrest 555 ist eine nicht kanonische Regulierung von Autophagie und dem cGAS-STING Signalweg. Im Hinblick auf pULK1 (Ser555) wurden ebenfalls keine Veränderungen festgestellt (vgl. Abbildung 5 C). Aufgrund der von uns zuvor gezeigten Abnahme der STING-Protein Menge im Alter, hätten wir eine Abnahme der pULK1 (Ser555) Menge im Alter erwartet. Eine mögliche Ursache für die fehlende Veränderung der pULK1 Menge im Alter könnte darin liegen, dass das Protein ULK1 mit zahlreichen anderen Proteinen interagiert, insbesondere im Hinblick auf Autophagie und Proteinbiosynthese. Wie in Kapitel 1.4 beschrieben, führt eine Dephosphorylierung von pULK1 an Ser555 zu einer Phosphorylierung von STING an Ser366 und zu dessen Inaktivierung (Konno et al. 2013).

Wir untersuchten zusätzlich die Proteinmengen von p62 und LC3. Beide Proteine sind wichtig für die Elongation und Formation der Autophagosomen. Hierbei analysierten wir die Proteinmengen über das WB-Verfahren und haben eine nicht signifikant erhöhte Tendenz bei den 108 Wochen alten Mäusegehirnen für p62 und LC3-II festgestellt (vgl. Abbildung 6 B, D). LC3-II ist die aktivierte Form von LC3 (Mizushima und Yoshimori 2007). Generell ist die Autophagie im Alter beeinträchtigt, was zu einer verringerten Degradation von Autophagosomen durch Lysosomen führt. Die von uns beobachteten erhöhten Mengen von p62 und LC3-II Proteinen waren nicht statistisch signifikant. Hier könnte eine größere

Stichprobengröße möglicherweise zu einem signifikanten Ergebnis führen. In Gehirnschnitten von Patienten mit neurodegenerativen Erkrankungen wie AD, PD und Amyotropher Lateralsklerose wurde ebenfalls eine Akkumulierung von p62 beschrieben (Ma et al. 2019).

4.4 Region-spezifische Analysen von Proteinen des cGAS-STING Signalwegs in Mäusegehirnen

Für die Analyse des cGAS-STING Signalwegs in den spezifischen Gehirnregionen der Mäuse wurden wie in 4.1 besprochen der EC und im Hippocampus der DG und die CA1-Region ausgewählt. Vorerst wurden Färbungen mit Antikörpern gegen das STING-Protein durchgeführt. In vorherigen Studien wurde die vorrangige Aktivierung des cGAS-STING Signalwegs in Gliazellen wie Mikrogliazellen und Astrozyten während einer Virusinfektion gezeigt (Jeffries und Marriott 2017). Wir konnten bei Wildtyp-Mäusen ohne einer Infektion oder anderer Form einer ersichtlichen Entzündung zeigen, dass die primäre Lokalisierung des STING-Proteins in den Mikroglia-Zellen ist (vgl. Abbildung 7). Dieses Erkenntnis deckt sich mit der Funktion der Mikrogliazellen als Teil des Immunsystems, welche für die Immunantwort auf Infektionen und den Abbau von Fremdkörpern zuständig sind.

Der EC ist zusammen mit dem Hippocampus Teil des limbischen Systems und wichtig für die Langzeitpotenzierung und Gedächtnisbildung (Chrobak et al. 2000, Room und Groenewegen 1986). Aufgrund der Bedeutsamkeit für die Gedächtnisbildung ist der EC auch eine der ersten Regionen im Kortex, welche durch Krankheiten wie der AD betroffen ist (van Hoesen et al. 1991). Der Hauptbeitrag (Input) aus dem Kortex kommt vom EC und gelangt in die molekulare Zellschicht des DG und über CA3 in CA1 des Hippocampus (Frank et al. 2000). Bei Nagetieren ist der EC unter anderem für die Orientierung im Raum wichtig (Høydal et al. 2019). Eine Untersuchung der STING-Proteinmenge bei Mäusen oder Ratten mit einer Beeinträchtigung der EC-Region und die Untersuchung der Orientierungsfähigkeit dieser Tiere zum Beispiel in einem Wasserlabyrinth kann weitere Aufschlüsse über den Zusammenhang zwischen dem cGAS-STING Signalweg und einer Beeinträchtigung des Kurz- und Langzeit-Gedächtnisses geben (Redish und Touretzky 1998).

Wir konnten bei unseren immunhistochemischen Färbungen des EC zeigen, dass es bei 24 und 108 Wochen alten Mäusen im Vergleich zu 8 Wochen alten Mäusen zu einer signifikanten Abnahme der Signalintensitäten von IBA1 und STING kommt (vgl. Abbildung 8 B, C). Diese Abnahme der Signalintensität von STING deckt sich mit der quantitativen Abnahme von STING, die wir bei der WB-Analyse (vgl. Abbildung 3 C) gesehen haben. Hierbei muss angemerkt werden, dass der EC nur einen kleinen Teil des Kortex ausmacht. Somit ist die quantitative Abnahme von STING im Wesentlichen durch die anderen Kortex-Areale zu

erklären. Die verringerte STING-Menge und geringe Anzahl an Mikrogliazellen im Alter deuten auf geringeres Entzündungsgeschehen hin. Im Umkehrschluss führt eine Herbeiführung einer Entzündungsreaktion mittels einer Injektion vom Tau-Protein in den EC von Mäusen über die Bindung am Polyglutamine Binding Protein (PQBP1) zu einer Aktivierung des cGAS-STING Signalwegs (Jin et al. 2021).

Im Gegensatz zum EC ist bei der CA1-Region des Hippocampus eine signifikant höhere Anzahl STING positiver Zellen bei 108 Wochen alten Mäusen verglichen mit 8 und 24 Wochen alten zu finden (vgl. Abbildung 8 D). Zudem ist die STING-Intensität in der IBA1 Maske der Mikrogliazellen bei den 108 Wochen alten Tieren höher als bei den 24 Wochen alten (vgl. Abbildung 8 C). Korrelierend zu den Ergebnissen im CA1 ist die Anzahl IBA1 positiver Zellen im DG ebenfalls erhöht (vgl. Abbildung 9 E). Diese Tatsache deutet darauf hin, dass in den Gehirnen der älteren Tiere eine auf bestimmte Gehirnregionen begrenzte Entzündungsreaktion mit Beteiligung von Mikroglia stattfinden könnte. Eine Atrophie der CA1- und DG-Region des Hippocampus, die unter anderem durch Entzündungsreaktionen verursacht wird, ist mit Hilfe von MRT-Studien bei Menschen schon bei frühen Stadien der AD zu sehen (Flores et al. 2015, Wang et al. 2006). Weitere Studien an Mäusen mit einer gezielten Induktion einer Entzündungsreaktion sowie an Alzheimer Mausmodellen wären wichtig, um eine Aktivierung des cGAS-STING Signalwegs in bestimmten Gehirnarealen, wie dem Hippocampus, nachzuweisen.

Durch die immunhistochemischen Färbungen der Gehirnschnitte konnten wir zeigen, dass das STING-Protein hauptsächlich in Mikrogliazellen lokalisiert ist. Darüber hinaus konnten wir darstellen, dass auch in Neuronen und Astrozyten, wenn auch im geringeren Umfang, das STING-Protein exprimiert wird. Es gibt nur wenige Studien, die eine Aktivierung des cGAS-STING Signalwegs in Neuronen und Astrozyten veranschaulichen. Wang et al. 2022 konnten zeigen, dass für die axonale Regeneration des Sehnervs von Mäusen die Aktivierung des cGAS-STING Signalwegs notwendig ist. Hierbei wird die Freisetzung von Interferon Gamma (IFN γ) in den Schwannschen Zellen durch die Synthese von 2',3'-cGAMP durch cGAS induziert. Dieses wandert dann in die Axone und bindet dort an STING und aktiviert die Expression weiterer proinflammatorischer Zytokine (Wang et al. 2022). In unserer Studie konnten wir zeigen, dass bei Mäusen ohne Induktion des Signalwegs das STING-Protein hauptsächlich im Soma der Neurone zu finden ist (vgl. Abbildung 10). Weitere Studien sind nötig, um zu erklären, ob STING bei einem Entzündungsgeschehen, wie bei der axonalen Regeneration des Sehnervs, auch in den Axonen der Nerven aktiv ist. In wenigen Fällen konnten wir auch eine Kollokalisierung von GFAP positiven Astrozyten mit dem STING-Protein finden. Wie in Kapitel 1.6 beschrieben, zeigen Studien eine Akkumulation von STING in Astrozyten bei Virusinfektionen (Jeffries und Marriott 2017). Interessant wäre eine Studie, die

eine gezielte Induktion einer Entzündung im ZNS von Mäusen durchführt, um zu untersuchen, ob die Akkumulation von STING während eines Entzündungsgeschehens variieren kann (vgl. Abbildung 11). In diesem Zusammenhang wäre zu erwarten, dass sich eine erhöhte STING-Akkumulation bei einem Entzündungsgeschehen zeigt.

Die Expression des STING-Proteins in den Neuronen und Astrozyten von verschiedenen Gehirnarealen ist sehr heterogen und von Zelle zu Zelle unterschiedlich. Dadurch sind die Analysen des Signalwegs in diesen Zelltypen im Gegensatz zu den Mikrogliazellen schwierig (vgl. Abbildung 11 D-I). Daher haben wir den Pearson-Koeffizient zwischen den Färbungen von STING und Mikrogliazellen, STING und Neuronen, sowie zwischen STING und Astrozyten bestimmt (vgl. Abbildung 11). Die Werte des Koeffizienten (r) können zwischen 0 und 1 liegen, wobei 0 keinen und 1 einen vollständigen linearen Zusammenhang, in diesem Falle eine Kolorisierung, darstellt. Die Interpretation der Korrelationskoeffizienten erfolgte gemäß Cohen (1988), wobei ein Korrelationskoeffizient (r) von unter 0,3 als vernachlässigbare, von 0,3 bis 0,5 als moderat und zwischen 0,5 und 1 als stark angesehen wurde. Wie in Abbildung 12 A-C zu sehen ist, ist der Pearson-Koeffizient zwischen STING und den Mikrogliazellen durchgehend zwischen 0,4 und 0,7. Die IBA1 positiven Mikrogliazellen weisen somit mehrheitlich eine hohe Übereinstimmung der Kolorisierung mit dem STING Signal auf. Zwischen STING und den MAP2 positiven Neuronen wurde ein Pearson-Koeffizient zwischen 0,12 und 0,5 ermittelt (vgl. Abbildung 11 D-F). Eine signifikante Abnahme des Koeffizienten wurde hier im CA1 der 108 Wochen alten Mäuse im Vergleich zu den 8 und 24 Wochen alten Mäusen festgestellt. Unsere Untersuchungen ergaben jedoch, dass MAP2 möglicherweise nicht der geeignete Marker für Neuronen in unserer Studie ist. In der CA1-Region zeigt es aufgrund seiner hohen Dendriten-Dichte ein zu allgemeines Signal. Für präzisere Ergebnisse wäre NeuN ein geeigneterer Marker. Bei den GFAP positiven Astrozyten und STING ist der Pearson-Koeffizient mit 0,09 bis 0,15 noch niedriger. Diese Daten zeigen ein heterogenes Verteilungsmuster von STING, das hauptsächlich in Mikrogliazellen zu finden ist. In Astrozyten ist die STING-Menge vernachlässigbar, während bei Neuronen mit dem spezifischeren Marker NeuN wahrscheinlich präzisere Ergebnisse erzielt werden können. Ein Vergleich der STING-Menge und ihrer spezifischen Verteilung in Mäusegehirnen, in denen eine Entzündung induziert wurde, wäre entscheidend für eine fundierte Schlussfolgerung.

4.5 Klinischer Ausblick

In unserer Untersuchung an gesund alternden Mäusen konnten wir nachweisen, dass der cGAS-STING Signalweg im Alter herunterreguliert wird. Es wäre von besonderem Interesse zu untersuchen, wie aktiv dieser Signalweg in Mäusen mit einer gezielten Entzündung im

zentralen Nervensystem ist. Im Anschluss an der Erstbeschreibung des cGAS-STING Signalwegs wurden verschiedene Inhibitoren identifiziert, die an wichtigen Schritten dieses Signalwegs agieren (Decout et al. 2021). Diese Inhibitoren können potenziell die durch Zytokine induzierte Entzündungsreaktion im zentralen Nervensystem hemmen. Angesichts der Tatsache, dass die langfristige als *Inflammaging* bekannte Entzündungsreaktion eine mögliche Ursache für neurodegenerative Erkrankungen wie Alzheimer und Parkinson sein könnte, eröffnen diese Inhibitoren möglicherweise eine kausale, medikamentöse Behandlungsperspektive für diese Erkrankungen.

Hierbei ist außerdem zu beachten, dass aufgrund einiger Unterschiede in den biologischen Prozessen, dem Immunsystem und dem Stoffwechsel zwischen Mäusen und Menschen die Übertragbarkeit der Ergebnisse trotz hoher genetischer Übereinstimmung begrenzt ist. Weitere Forschung ist erforderlich, um die spezifischen Unterschiede zwischen Menschen und Maus zu identifizieren und zu verstehen, die bei der Übertragbarkeit der Ergebnisse berücksichtigt werden müssen.

5 Zusammenfassung

Alterungsprozesse und kausale Behandlungsmöglichkeiten neurodegenerativer Erkrankungen stehen im Fokus der aktuellen Forschung. Relevante Ursachen dieser neurodegenerativen Erkrankungen sind die Dysbalance der Proteinhomöostase und die als *Inflamming* bezeichnete langanhaltende, niederschwellige Entzündungsreaktion im ZNS. Ein Faktor für das *Inflamming* könnte der erst 2013 entdeckte cGAS-STING Signalweg sein, der mit Hilfe des cGAS-Proteins DNA erkennt und mit STING, TBK1 und IRF3 unter anderem die Transkription von Interferon Typ I stimulierenden Genen (ISG) induziert. Außerdem aktiviert der cGAS-STING Signalweg die Autophagie.

Wir haben bei gesunden Mäusen wesentliche Proteine des Signalwegs und der Autophagie analysiert. Dafür haben wir in 8, 24 und 108 Wochen alten Mäusekortexes per Westernblot quantitativ die Menge der Proteine bestimmt. Darüber hinaus untersuchten wir in Frontalschnitten des Gehirns von Mäusen mittels Immunhistochemie die Verteilung des STING-Proteins im entorhinalen Kortex, im *Gyrus dentatus* und im *Cornu ammonis 1* im Hippocampus. Wir konnten eine Abnahme der Menge von 2',3'-cGAMP, STING und IRF3, sowie eine Zunahme der Mengen von cGAS und pBeclin1 in den Kortexes der Mäuse zeigen. In der mikroskopischen Untersuchung der Gehirnschnitte identifizierten wir Mikrogliazellen als Hauptlokalisation des STING-Proteins im ZNS, während vereinzelt Kollokalisierungen auch mit Astrozyten und Neuronen in allen drei Altersgruppen beobachtbar waren. Bei 108 Wochen alten Mäusen konnten wir eine Abnahme der Signalintensität von STING im entorhinalen Kortex und eine Zunahme der STING positiven Zellen im *Cornu ammonis 1* des Hippocampus feststellen.

Unsere Ergebnisse legen nahe, dass der cGAS-STING Signalweg im ZNS von gesund alternden Mäusen möglicherweise herunterreguliert wird. Ob dies auf eine Aktivierung der Autophagie im Alter zurückzuführen ist, bedarf weiterer Untersuchungen. Die Erkenntnis einer möglichen Herunterregulierung des Signalwegs und der damit verbundenen Abwesenheit einer Interferon Typ I induzierten Entzündungsreaktion in gesund alternden Mäusen könnte dazu beitragen, dass als *Inflamming* bezeichnete entzündliche Geschehen im Alter zu reduzieren. Mögliche Inhibitoren dieses Signalwegs könnten eine kausale, medikamentöse Therapie für durch *Inflamming* verursachte neurodegenerative Erkrankungen wie Alzheimer und Parkinson darstellen.

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Primärantikörper	12
Tabelle 2: Sekundärantikörper	12
Tabelle 3: BSA-Standard für die Amidoschwarz Proteinbestimmung	14
Tabelle 4: Zusammensetzung des SDS-Polyacrylamid Gels	15

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Bildung der Autophagosomen	3
Abbildung 2: Der cGAS-STING Signalweg.....	7
Abbildung 3: WB-Analyse von Proteinen des cGAS-STING Signalwegs im Kortex alternder Mäuse	21
Abbildung 4: 2',3'-cGAMP-Konzentration im Kortex alternder Mäuse	22
Abbildung 5: Quantitative Konzentrationsbestimmung ausgewählter Proteine des cGAS-STING Signalwegs im Kortex alternder Mäuse mit Relevanz für Autophagie-Prozesse	23
Abbildung 6: WB-Analysen von p62, LC3-I und LC3-II im Kortex von Mäusen unterschiedlicher Altersgruppen	24
Abbildung 7: Immunfluoreszenzfärbung des <i>Gyrus dentatus</i> und der <i>Cornu ammonis 1</i> sowie des entorhinalen Kortex von 8 Wochen alten Mäusen mittels Antikörper gegen STING, IBA1 und MAP2.....	25
Abbildung 8: STING und IBA1 sind im EC von 8 Wochen alten Mäusen am höchsten exprimiert.....	26
Abbildung 9: Altersabhängig signifikanter Anstieg STING positiver Zellen im CA1 der Maus	27
Abbildung 10: Altersabhängige Zunahme der IBA1 positiven Zellen im DG von Mäusen	28
Abbildung 11: Beispiel für die Kolokalisation von STING mit Astrozyten (GFAP) und mit Neuronen (NeuN) im DG.....	29
Abbildung 12: Kolokalisationsanalyse von STING und IBA1 sowie GFAP und MAP2 in verschiedenen Gehirnbereichen von Mäusen unterschiedlicher Altersgruppen	30

Literaturverzeichnis

1. Abdullah A, Mobilio F, Crack PJ, Taylor JM: STING-Mediated Autophagy Is Protective against H₂O₂-Induced Cell Death. *International Journal of Molecular Sciences*. 21 (2020).
2. Assil S, Paludan SR: STING is ESCRTed to degradation by microautophagy. *Nature cell biology*. 25. 379–380 (2023).
3. Badin J, Herve B: La Precipitation des Proteines par l'amidoschwarz et son application au microdosage des proteines seriques. *Annales de biologie clinique*. 23. 321–332 (1965).
4. Béjot Y, Yaffe K: Ageing Population: A Neurological Challenge. *Neuroepidemiology*. 52. 76–77 (2019).
5. Birgisdottir ÅB, Lamark T, Johansen T: The LIR motif - crucial for selective autophagy. *Journal of cell science*. 126. 3237–3247 (2013).
6. Bjørkøy G, Lamark T, Pankiv S, Øvervatn A, Brech A, Johansen T: Monitoring autophagic degradation of p62/SQSTM1. *Methods in enzymology*. 452. 181–197 (2009).
7. Brasnjevic I, Hof PR, Steinbusch HWM, Schmitz C: Accumulation of nuclear DNA damage or neuron loss: molecular basis for a new approach to understanding selective neuronal vulnerability in neurodegenerative diseases. *DNA repair*. 7. 1087–1097 (2008).
8. Caccamo A, Majumder S, Richardson A, Strong R, Oddo S: Molecular interplay between mammalian target of rapamycin (mTOR), amyloid-beta, and Tau: effects on cognitive impairments. *The Journal of biological chemistry*. 285. 13107–13120 (2010).
9. Cataldo AM, Peterhoff CM, Schmidt SD, Terio NB, Duff K, Beard M, Mathews PM, Nixon RA: Presenilin mutations in familial Alzheimer disease and transgenic mouse models accelerate neuronal lysosomal pathology. *Journal of neuropathology and experimental neurology*. 63. 821–830 (2004).
10. Chakravarty EF, Hubert HB, Krishnan E, Bruce BB, Lingala VB, Fries JF: Lifestyle risk factors predict disability and death in healthy aging adults. *The American journal of medicine*. 125. 190–197 (2012).
11. Chan EY: mTORC1 phosphorylates the ULK1-mAtg13-FIP200 autophagy regulatory complex. *Science signaling*. 2. pe51 (2009).
12. Choi AMK, Ryter SW, Levine B: Autophagy in human health and disease. *The New England journal of medicine*. 368. 651–662 (2013).
13. Choi K-C, Kim S-H, Ha J-Y, Kim S-T, Son JH: A novel mTOR activating protein protects dopamine neurons against oxidative stress by repressing autophagy related cell death. *Journal of neurochemistry*. 112. 366–376 (2010).
14. Chrobak JJ, Lrincz A, Buzski G: Physiological patterns in the hippocampo-entorhinal cortex system. *Hippocampus*. 10. 457–465 (2000).
15. Civril F, Deimling T, Oliveira Mann CC de, Ablasser A, Moldt M, Witte G, Hornung V, Hopfner K-P: Structural mechanism of cytosolic DNA sensing by cGAS. *Nature*. 498. 332–337 (2013).

16. Cleveland DW, Fischer SG, Kirschner MW, Laemmli UK: Peptide mapping by limited proteolysis in sodium dodecyl sulfate and analysis by gel electrophoresis. *Journal of Biological Chemistry*. 252. 1102–1106 (1977).
17. Cohen J: Set Correlation and Contingency Tables. *Applied Psychological Measurement*. 12. 425–434 (1988).
18. Cuervo AM, Dice JF: Age-related decline in chaperone-mediated autophagy. *Journal of Biological Chemistry*. 275. 31505–31513 (2000).
19. Cuervo AM, Stefanis L, Fredenburg R, Lansbury PT, Sulzer D: Impaired degradation of mutant alpha-synuclein by chaperone-mediated autophagy. *Science (New York, N.Y.)*. 305. 1292–1295 (2004).
20. Decout A, Katz JD, Venkatraman S, Ablasser A: The cGAS-STING pathway as a therapeutic target in inflammatory diseases. *Nature reviews. Immunology*. 21. 548–569 (2021)
21. Deleyto-Seldas N, Efeyan A: The mTOR-Autophagy Axis and the Control of Metabolism. *Frontiers in cell and developmental biology*. 9. 655731 (2021).
22. Demetrius L: Aging in Mouse and Human Systems: A Comparative Study. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1067. 66–82 (2006).
23. Deter RL, Baudhuin P, Duve C de: Participation of lysosomes in cellular autophagy induced in rat liver by glucagon. *The Journal of cell biology*. 35. C11-6 (1967).
24. Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, Medrano EE, Linskens M, Rubelj I, Pereira-Smith O: A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 92. 9363–9367 (1995).
25. Ding C, Song Z, Shen A, Chen T, Zhang A: Small molecules targeting the innate immune cGAS–STING–TBK1 signaling pathway. *Acta pharmaceutica Sinica*. B. 10. 2272–2298 (2020).
26. Donati A, Cavallini G, Paradiso C, Vittorini S, Pollera M, Gori Z, Bergamini E: Age-related changes in the regulation of autophagic proteolysis in rat isolated hepatocytes. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences*. 56. B288-93 (2001).
27. Du M, Chen ZJ: DNA-induced liquid phase condensation of cGAS activates innate immune signaling. *Science (New York, N.Y.)*. 361. 704–709 (2018).
28. Ergun SL, Fernandez D, Weiss TM, Li L: STING Polymer Structure Reveals Mechanisms for Activation, Hyperactivation, and Inhibition. *Cell*. 178. 290-301.e10 (2019).
29. Farmer J, Zhao X, van Praag H, Wodtke K, Gage FH, Christie BR: Effects of voluntary exercise on synaptic plasticity and gene expression in the dentate gyrus of adult male Sprague-Dawley rats in vivo. *Neuroscience*. 124. 71–79 (2004).
30. Flores R de, La Joie R, Landeau B, Perrotin A, Mézenge F, La Sayette V de, Eustache F, Desgranges B, Chételat G: Effects of age and Alzheimer's disease on hippocampal subfields: comparison between manual and FreeSurfer volumetry. *Human brain mapping*. 36. 463–474 (2015).
31. Franceschi C, Campisi J: Chronic inflammation (inflammaging) and its potential contribution to age-associated diseases. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences*. 69 Suppl 1. S4-9 (2014).

32. Frank LM, Brown EN, Wilson M: Trajectory encoding in the hippocampus and entorhinal cortex. *Neuron*. 27. 169–178 (2000).
33. Franklin KBJ, Paxinos G: The mouse brain. In stereotaxic coordinates. Compact third edition. pp. ccxlii. Academic Press. New York [etc.] (2008).
34. Fülöp T, Larbi A, Witkowski JM: Human Inflammaging. *Gerontology*. 65. 495–504 (2019).
35. Ge L, Zhang M, Schekman R: Phosphatidylinositol 3-kinase and COPII generate LC3 lipidation vesicles from the ER-Golgi intermediate compartment. *eLife*. 3. e04135 (2014).
36. Gorojod RM, Alaimo A, Porte Alcon S, Pomilio C, Saravia F, Kotler ML: The autophagolysosomal pathway determines the fate of glial cells under manganese- induced oxidative stress conditions. *Free radical biology & medicine*. 87. 237–251 (2015).
37. Gruber J, Wise D: An International Perspective on Policies for an Aging Society. National Bureau of Economic Research. Cambridge, MA (2001).
38. Gruenewald DA: Fasting-induced increases in food intake and neuropeptide Y gene expression are attenuated in aging male brown Norway rats. *Endocrinology*. 137. 4460–4467 (1996).
39. Gui X, Yang H, Li T, Tan X, Shi P, Li M, Du F, Chen ZJ: Autophagy induction via STING trafficking is a primordial function of the cGAS pathway. *Nature*. 567. 262–266 (2019).
40. Gulen MF, Samson N, Keller A, Schwabenland M, Liu C, Glück S, Thacker VV, Favre L, Mangeat B, Kroese LJ, Krimpenfort P, Prinz M, Ablasser A: cGAS-STING drives ageing-related inflammation and neurodegeneration. *Nature*. 620. 374–380 (2023).
41. Hamann L, Ruiz-Moreno JS, Szwed M, Mossakowska M, Lundvall L, Schumann RR, Opitz B, Puzianowska-Kuznicka M: STING SNP R293Q Is Associated with a Decreased Risk of Aging-Related Diseases. *Gerontology*. 65. 145–154 (2019).
42. Hara T, Takamura A, Kishi C, Iemura S-I, Natsume T, Guan J-L, Mizushima N: FIP200, a ULK-interacting protein, is required for autophagosome formation in mammalian cells. *The Journal of cell biology*. 181. 497–510 (2008).
43. Hinkle JT, Patel J, Panicker N, Karuppagounder SS, Biswas D, Belington B, Chen R, Brahmachari S, Pletnikova O, Troncoso JC, Dawson VL, Dawson TM: STING mediates neurodegeneration and neuroinflammation in nigrostriatal α -synucleinopathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 119. e2118819119 (2022).
44. Hollenbeck PJ: Products of endocytosis and autophagy are retrieved from axons by regulated retrograde organelle transport. *The Journal of cell biology*. 121. 305–315 (1993).
45. Høydal ØA, Skytøen ER, Andersson SO, Moser M-B, Moser EI: Object-vector coding in the medial entorhinal cortex. *Nature*. 568. 400–404 (2019).
46. Janda E, Isidoro C, Carresi C, Mollace V: Defective autophagy in Parkinson's disease: role of oxidative stress. *Molecular neurobiology*. 46. 639–661 (2012).
47. Jeffries AM, Marriott I: Human microglia and astrocytes express cGAS-STING viral sensing components. *Neuroscience letters*. 658. 53–56 (2017).
48. Jin M, Shiwaku H, Tanaka H, Obita T, Ohuchi S, Yoshioka Y, Jin X, Kondo K, Fujita K, Homma H, Nakajima K, Mizuguchi M, Okazawa H: Tau activates microglia via the PQBP1-cGAS-STING pathway to promote brain inflammation. *Nature communications*. 12. 6565 (2021).

49. Juhász G, Erdi B, Sass M, Neufeld TP: Atg7-dependent autophagy promotes neuronal health, stress tolerance, and longevity but is dispensable for metamorphosis in *Drosophila*. *Genes & development*. 21. 3061–3066 (2007).
50. Jurk D, Wang C, Miwa S, Maddick M, Korolchuk V, Tzolou A, Gonos ES, Thrasivoulou C, Saffrey MJ, Cameron K, Zglinicki T von: Postmitotic neurons develop a p21-dependent senescence-like phenotype driven by a DNA damage response. *Aging cell*. 11. 996–1004 (2012).
51. Kaushik S, Cuervo AM: Chaperone-mediated autophagy: a unique way to enter the lysosome world. *Trends in cell biology*. 22. 407–417 (2012).
52. Khaw KT: Healthy aging. *BMJ (Clinical research ed.)*. 315. 1090–1096 (1997).
53. Kim J, Kundu M, Viollet B, Guan K-L: AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nature cell biology*. 13. 132–141 (2011).
54. Klionsky DJ, Emr SD: Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science (New York, N.Y.)*. 290. 1717–1721 (2000).
55. Konno H, Konno K, Barber GN: Cyclic dinucleotides trigger ULK1 (ATG1) phosphorylation of STING to prevent sustained innate immune signaling. *Cell*. 155. 688–698 (2013).
56. Lee JH, Budanov AV, Park EJ, Birse R, Kim TE, Perkins GA, Ocorr K, Ellisman MH, Bodmer R, Bier E, Karin M: Sestrin as a feedback inhibitor of TOR that prevents age-related pathologies. *Science (New York, N.Y.)*. 327. 1223–1228 (2010).
57. Lee J-H, Yu WH, Kumar A, Lee S, Mohan PS, Peterhoff CM, Wolfe DM, Martinez-Vicente M, Massey AC, Sovak G, Uchiyama Y, Westaway D, Cuervo AM, Nixon RA: Lysosomal proteolysis and autophagy require presenilin 1 and are disrupted by Alzheimer-related PS1 mutations. *Cell*. 141. 1146–1158 (2010).
58. Lee JLC, Everitt BJ, Thomas KL: Independent cellular processes for hippocampal memory consolidation and reconsolidation. *Science (New York, N.Y.)*. 304. 839–843 (2004).
59. Liang H, Masoro EJ, Nelson JF, Strong R, McMahan CA, Richardson A: Genetic mouse models of extended lifespan. *Experimental gerontology*. 38. 1353–1364 (2003).
60. Liang Q, Seo GJ, Choi YJ, Kwak M-J, Ge J, Rodgers MA, Shi M, Leslie BJ, Hopfner K-P, Ha T, Oh B-H, Jung JU: Crosstalk between the cGAS DNA sensor and Beclin-1 autophagy protein shapes innate antimicrobial immune responses. *Cell host & microbe*. 15. 228–238 (2014).
61. Lin SJ, Defossez PA, Guarente L: Requirement of NAD and SIR2 for life-span extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science (New York, N.Y.)*. 289. 2126–2128 (2000).
62. Liu D, Wu H, Wang C, Li Y, Tian H, Siraj S, Sehgal SA, Wang X, Wang J, Shang Y, Jiang Z, Liu L, Chen Q: STING directly activates autophagy to tune the innate immune response. *Cell death and differentiation*. 26. 1735–1749 (2019).
63. Lőrincz P, Juhász G: Autophagosome-Lysosome Fusion. *Journal of molecular biology*. 432. 2462–2482 (2020).
64. Ma S, Attarwala IY, Xie X-Q: SQSTM1/p62: A Potential Target for Neurodegenerative Disease. *ACS chemical neuroscience*. 10. 2094–2114 (2019).
65. McLean IW, Nakane PK: Periodate-lysine-paraformaldehyde fixative. A new fixation for immunoelectron microscopy. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*. 22. 1077–1083 (1974).

66. Mindell JA: Lysosomal acidification mechanisms. *Annual review of physiology*. 74. 69–86 (2012).
67. Mitchell SJ, Bernier M, Mattison JA, Aon MA, Kaiser TA, Anson RM, Ikeno Y, Anderson RM, Ingram DK, Cabo R de: Daily Fasting Improves Health and Survival in Male Mice Independent of Diet Composition and Calories. *Cell metabolism*. 29. 221-228.e3 (2019).
68. Mizushima N: The ATG conjugation systems in autophagy. *Current opinion in cell biology*. 63. 1–10 (2020).
69. Mizushima N, Yoshimori T: How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy*. 3. 542–545 (2007).
70. Morrison JH, Baxter MG: The ageing cortical synapse: hallmarks and implications for cognitive decline. *Nature reviews. Neuroscience*. 13. 240–250 (2012).
71. Mu Y, Gage FH: Adult hippocampal neurogenesis and its role in Alzheimer's disease. *Molecular neurodegeneration*. 6. 85 (2011).
72. Mukai K, Konno H, Akiba T, Uemura T, Waguri S, Kobayashi T, Barber GN, Arai H, Taguchi T: Activation of STING requires palmitoylation at the Golgi. *Nature communications*. 7. 11932 (2016).
73. Nah J, Zablocki D, Sadoshima J: The roles of the inhibitory autophagy regulator Rubicon in the heart: A new therapeutic target to prevent cardiac cell death. *Experimental & molecular medicine*. 53. 528–536 (2021).
74. Narendra D, Tanaka A, Suen D-F, Youle RJ: Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *The Journal of cell biology*. 183. 795–803 (2008).
75. Nixon RA, Wegiel J, Kumar A, Yu WH, Peterhoff C, Cataldo A, Cuervo AM: Extensive involvement of autophagy in Alzheimer disease: an immuno-electron microscopy study. *Journal of neuropathology and experimental neurology*. 64. 113–122 (2005).
76. Noda NN, Wang Z, Zhang H: Liquid-liquid phase separation in autophagy. *The Journal of cell biology*. 219 (2020).
77. Oakes JA, Davies MC, Collins MO: TBK1: a new player in ALS linking autophagy and neuroinflammation. *Molecular brain*. 10. 5 (2017).
78. Oku M, Sakai Y: Three Distinct Types of Microautophagy Based on Membrane Dynamics and Molecular Machineries. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*. 40. e1800008 (2018).
79. Olivieri F, Prattichizzo F, Grillari J, Balistreri CR: Cellular Senescence and Inflammaging in Age-Related Diseases. *Mediators of inflammation*. 2018. 9076485 (2018).
80. Onyedibe KI, Wang M, Sintim HO: ENPP1, an Old Enzyme with New Functions, and Small Molecule Inhibitors-A STING in the Tale of ENPP1. *Molecules (Basel, Switzerland)*. 24 (2019).
81. Park J-M, Seo M, Jung CH, Grunwald D, Stone M, Otto NM, Toso E, Ahn Y, Kyba M, Griffin TJ, Higgins L, Kim D-H: ULK1 phosphorylates Ser30 of BECN1 in association with ATG14 to stimulate autophagy induction. *Autophagy*. 14. 584–597 (2018).
82. Passarella S: The role of the cGAS-STING pathway in mammalian brain physiology and ageing, *Universitäts- und Landesbibliothek Sachsen-Anhalt* (2023).

83. Peel NM, McClure RJ, Bartlett HP: Behavioral determinants of healthy aging. *American journal of preventive medicine*. 28. 298–304 (2005).
84. Pickford F, Masliah E, Britschgi M, Lucin K, Narasimhan R, Jaeger PA, Small S, Spencer B, Rockenstein E, Levine B, Wyss-Coray T: The autophagy-related protein beclin 1 shows reduced expression in early Alzheimer disease and regulates amyloid beta accumulation in mice. *The Journal of clinical investigation*. 118. 2190–2199 (2008).
85. Prabakaran T, Bodda C, Krapp C, Zhang B-C, Christensen MH, Sun C, Reinert L, Cai Y, Jensen SB, Skouboe MK, Nyengaard JR, Thompson CB, Lebbink RJ, Sen GC, van Loo G, Nielsen R, Komatsu M, Nejsum LN, Jakobsen MR, Gyrd-Hansen M, Paludan SR: Attenuation of cGAS-STING signaling is mediated by a p62/SQSTM1-dependent autophagy pathway activated by TBK1. *The EMBO journal*. 37 (2018).
86. Qian X, Li X, Lu Z: Protein kinase activity of the glycolytic enzyme PGK1 regulates autophagy to promote tumorigenesis. *Autophagy*. 13. 1246–1247 (2017).
87. Redish AD, Touretzky DS: The role of the hippocampus in solving the Morris water maze. *Neural computation*. 10. 73–111 (1998).
88. Ritchie C, Carozza JA, Li L: Biochemistry, Cell Biology, and Pathophysiology of the Innate Immune cGAS-cGAMP-STING Pathway. *Annual review of biochemistry*. 91. 599–628 (2022).
89. Room P, Groenewegen HJ: Connections of the parahippocampal cortex. I. Cortical afferents. *The Journal of comparative neurology*. 251. 415–450 (1986).
90. Russell RC, Tian Y, Yuan H, Park HW, Chang Y-Y, Kim J, Kim H, Neufeld TP, Dillin A, Guan K-L: ULK1 induces autophagy by phosphorylating Beclin-1 and activating VPS34 lipid kinase. *Nature cell biology*. 15. 741–750 (2013).
91. Sedelnikova OA, Horikawa I, Zimonjic DB, Popescu NC, Bonner WM, Barrett JC: Senescing human cells and ageing mice accumulate DNA lesions with unrepairable double-strand breaks. *Nature cell biology*. 6. 168–170 (2004).
92. Shang G, Zhang C, Chen ZJ, Bai X-C, Zhang X: Cryo-EM structures of STING reveal its mechanism of activation by cyclic GMP-AMP. *Nature*. 567. 389–393 (2019).
93. Sladitschek-Martens HL, Guarnieri A, Brumana G, Zanconato F, Battilana G, Xiccato RL, Panciera T, Forcato M, Bicciato S, Guzzardo V, Fassan M, Ulliana L, Gandin A, Tripodo C, Foiani M, Brusatin G, Cordenonsi M, Piccolo S: YAP/TAZ activity in stromal cells prevents ageing by controlling cGAS-STING. *Nature*. 607. 790–798 (2022).
94. Stranahan AM, Mattson MP: Selective vulnerability of neurons in layer II of the entorhinal cortex during aging and Alzheimer's disease. *Neural plasticity*. 2010. 108190 (2010).
95. Takeshige K, Baba M, Tsuboi S, Noda T, Ohsumi Y: Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and conditions for its induction. *The Journal of cell biology*. 119. 301–311 (1992).
96. Tanida I, Ueno T, Kominami E: LC3 and Autophagy. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.). 445. 77–88 (2008).
97. Tóth ML, Sigmond T, Borsos E, Barna J, Erdélyi P, Takács-Vellai K, Orosz L, Kovács AL, Csikós G, Sass M, Vellai T: Longevity pathways converge on autophagy genes to regulate life span in *Caenorhabditis elegans*. *Autophagy*. 4. 330–338 (2008).
98. Towbin H, Staehelin T, Gordon J: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 76. 4350–4354 (1979).
99. van Hoesen GW, Hyman BT, Damasio AR: Entorhinal cortex pathology in Alzheimer's disease. *Hippocampus*. 1. 1–8 (1991).
 100. van Praag H, Shubert T, Zhao C, Gage FH: Exercise enhances learning and hippocampal neurogenesis in aged mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 25. 8680–8685 (2005).
 101. Wang L, Miller JP, Gado MH, McKeel DW, Rothermich M, Miller MI, Morris JC, Csernansky JG: Abnormalities of hippocampal surface structure in very mild dementia of the Alzheimer type. *NeuroImage*. 30. 52–60 (2006).
 102. Wang X, Yang C, Wang X, Miao J, Chen W, Zhou Y, Xu Y, An Y, Cheng A, Ye W, Chen M, Song D, Yuan X, Wang J, Qian P, Wu AR, Zhang Z-Y, Liu K: Driving axon regeneration by orchestrating neuronal and non-neuronal innate immune responses via the IFN γ -cGAS-STING axis. *Neuron* (2022).
 103. Webb JL, Ravikumar B, Atkins J, Skepper JN, Rubinsztein DC: Alpha-Synuclein is degraded by both autophagy and the proteasome. *The Journal of biological chemistry*. 278. 25009–25013 (2003).
 104. Webb JL, Ravikumar B, Rubinsztein DC: Microtubule disruption inhibits autophagosome-lysosome fusion: implications for studying the roles of aggregates in polyglutamine diseases. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 36. 2541–2550 (2004).
 105. Weidberg H, Elazar Z: TBK1 mediates crosstalk between the innate immune response and autophagy. *Science signaling*. 4. pe39 (2011).
 106. Winslow AR, Chen C-W, Corrochano S, Acevedo-Arozena A, Gordon DE, Peden AA, Lichtenberg M, Menzies FM, Ravikumar B, Imarisio S, Brown S, O'Kane CJ, Rubinsztein DC: α -Synuclein impairs macroautophagy: implications for Parkinson's disease. *The Journal of cell biology*. 190. 1023–1037 (2010).
 107. Wirth M, Joachim J, Tooze SA: Autophagosome formation--the role of ULK1 and Beclin1-PI3KC3 complexes in setting the stage. *Seminars in cancer biology*. 23. 301–309 (2013).
 108. Wu J, Sun L, Chen X, Du F, Shi H, Chen C, Chen ZJ: Cyclic GMP-AMP is an endogenous second messenger in innate immune signaling by cytosolic DNA. *Science (New York, N.Y.)*. 339. 826–830 (2013).
 109. Young ARJ, Narita M: SASP reflects senescence. *EMBO reports*. 10. 228–230 (2009).
 110. Yu WH, Cuervo AM, Kumar A, Peterhoff CM, Schmidt SD, Lee J-H, Mohan PS, Mercken M, Farmery MR, Tjernberg LO, Jiang Y, Duff K, Uchiyama Y, Näslund J, Mathews PM, Cataldo AM, Nixon RA: Macroautophagy--a novel Beta-amyloid peptide-generating pathway activated in Alzheimer's disease. *The Journal of cell biology*. 171. 87–98 (2005).
 111. Zhang P, Kishimoto Y, Grammatikakis I, Gottimukkala K, Cutler RG, Zhang S, Abdelmohsen K, Bohr VA, Misra Sen J, Gorospe M, Mattson MP: Senolytic therapy alleviates A β -associated oligodendrocyte progenitor cell senescence and cognitive deficits in an Alzheimer's disease model. *Nature neuroscience*. 22. 719–728 (2019).
 112. Zhang X, Bai X-C, Chen ZJ: Structures and Mechanisms in the cGAS-STING Innate Immunity Pathway. *Immunity*. 53. 43–53 (2020).

113. Zhang X, Shi H, Wu J, Zhang X, Sun L, Chen C, Chen ZJ: Cyclic GMP-AMP containing mixed phosphodiester linkages is an endogenous high-affinity ligand for STING. *Molecular cell*. 51. 226–235 (2013).
114. Zhang X, Wu J, Du F, Xu H, Sun L, Chen Z, Brautigam CA, Zhang X, Chen ZJ: The cytosolic DNA sensor cGAS forms an oligomeric complex with DNA and undergoes switch-like conformational changes in the activation loop. *Cell reports*. 6. 421–430 (2014).
115. Zhao Y, Simon M, Seluanov A, Gorbunova V: DNA damage and repair in age-related inflammation. *Nature reviews. Immunology*. 23. 75–89 (2023).

Danksagung

Die Danksagung ist in dieser Version aus Datenschutzgründen nicht enthalten.

Ehrenerklärung

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Otto-von Guericke Universität eingereichte Dissertation mit dem Titel

„Altersabhängiger Einfluss des cGAS-STING Signalwegs auf das zentrale Nervensystem von Mäusen“

im Institut für Pharmakologie und Toxikologie

mit Unterstützung durch Prof. Daniela Dietrich und Dr. Peter Landgraf

ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Bei der Abfassung der Dissertation sind Rechte Dritter nicht verletzt worden. Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht.

Ich übertrage der Medizinischen Fakultät das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Magdeburg, den 15.11.2023

Unterschrift

Darstellung des Lebenswegs

Der Lebenslauf ist in dieser Version aus Datenschutzgründen nicht enthalten.