

Aus der Abteilung Neuro- und Sinnesphysiologie
(Prof. Dr. med. D.W. Richter)
im Zentrum Physiologie und Pathophysiologie
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Erhöhte Hypoxieempfindlichkeit in Hippokampus-
schnitten bei einem Mausmodell des
RETT-Syndroms**

INAUGURAL – DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Marc Fischer

aus
Bad Hersfeld

Göttingen 2012

D e k a n: Prof. Dr. med. M. P. Schön

I. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. M. Müller

II. Berichterstatter\in:

III. Berichterstatter\in:

Tag der mündlichen Prüfung:

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| 1. Einleitung | 1 |
| 1.1. RETT-Syndrom | 1 |
| 1.2. Genetische Ursachen des RETT-Syndroms | 3 |
| 1.3. Neuronale Dysfunktion im RETT-Syndrom | 5 |
| 1.4. Hypoxie-induzierte Spreading Depression als Test für Hypoxietoleranz | 6 |
| 1.5. Fragestellung dieser Arbeit | 10 |
| 2. Material und Methoden | 11 |
| 2.1. Mausmodell für das RETT-Syndrom | 11 |
| 2.2. Herstellung akuter Hippokampusgewebeschnitte | 11 |
| 2.3. Messtechnik und allgemeiner Versuchsaufbau | 14 |
| 2.4. Ionen-selektive Glasmikroelektroden | 16 |
| 2.5. Messung der extrazellulären K ⁺ -Konzentration mit Ionen-selektiven Mikroelektroden | 20 |
| 2.6. Messung interstitieller Volumenänderungen mittels Indikator- Verdünnungsmethode | 26 |
| 2.7. Intrazelluläre Ableitungen | 28 |
| 2.8. Registrierung des intrinsischen optischen Signals (IOS) | 29 |
| 3. Ergebnisse | 32 |
| 3.1. Vergleich der Hypoxieempfindlichkeit von WT- und <i>Mecp2</i> ^{fl/y} -Mäusen | 32 |
| 3.2. Veränderungen der interstitiellen [K ⁺] | 37 |
| 3.3. Zellvolumenveränderungen während HSD | 40 |
| 3.4. Neuronale Membranpotentiale während HSD | 43 |
| 3.5. Ausbreitungsmuster der HSD im Hippokampus | 46 |
| 4. Diskussion | 48 |
| 5. Zusammenfassung | 53 |
| 6. Literaturverzeichnis | 55 |

1. Einleitung

1.1. RETT-Syndrom

Das RETT-Syndrom wurde erstmals 1966 von dem österreichischen Kinderarzt Andreas Rett beschrieben. Er wurde auf die Krankheit aufmerksam, als er 2 kleine Mädchen mit bis dato unbekanntem Krankheitsbild bei ihren Müttern in seinem Wartezimmer sitzen sah und diese gleichzeitig anfangen, Handstereotypien durchzuführen, die wie Händewaschen aussahen (Rett 1966).

Das RETT-Syndrom ist heute nach der ICD-10 klassifiziert als eine tiefgreifende Entwicklungsstörung, zu denen unter anderem auch KANNER- und ASPERGER-Autismus gehören (Graubner 2012). Im Unterschied dazu sind beim RETT-Syndrom ausschließlich Mädchen betroffen. Nach einem im Regelfall normalen Schwangerschaftsverlauf und normaler Geburt entwickeln sich die Patientinnen bis zum 6. Lebensmonat bis maximal zum 2. Lebensjahr regelrecht. Von diesem Zeitpunkt an kommt es zu einer progressiven motorischen und geistigen Entwicklungsverzögerung, sogar bereits erlernte Fähigkeiten gehen wieder verloren (Graubner 2012). Weiterhin erfolgt in diesem Zeitraum auch eine soziale Isolation, es wird vielfach über unmotivierter Schrei- und Weinkrämpfe berichtet. Auch der bei Geburt normale Kopfumfang ist perzentilenflüchtig, eine sekundäre Mikrozephalie tritt auf (Hagberg et al. 1983).

Nach dieser Phase der Regression gibt es eine lange, stabile Plateauphase, in der die Fähigkeiten der Patientinnen nicht weiter verloren gehen, sondern konstant bleiben. In dieser Zeit treten oft auch schon die ersten Epilepsien auf, an denen

bis zu 80% der RETT-Patientinnen leiden. Die Anfälle können dabei sowohl einfach-fokal oder komplex-fokal als auch generalisiert sein, oft ist die Epilepsie therapieresistent, sodass mehrere Medikamente getestet werden müssen, bis es zur Abnahme der Epilepsiehäufigkeit kommt (Glaze 2005).

Die weiteren Symptome des RETT-Syndroms sind sehr vielfältig. Die motorische Dysfunktion erstreckt sich auf viele Bereiche, die meisten Patientinnen können nicht mehr als ein paar Schritte gestützt laufen, auch eine sinnvolle Feinmotorik der Hände fehlt (Lotan und Ben-Zeev 2006). Stattdessen kommt es zu den schon beschriebenen, sehr typischen, stereotypen Handbewegungen, die an Kneten oder "Händewaschen" erinnern. Die RETT-Patientinnen sind sehr oft kleinwüchsig und entwickeln häufig im Jugend- oder Erwachsenenalter eine Skoliose, die mit Progression der Erkrankung fortschreitet und teilweise sogar operationsbedürftig werden kann (Percy et al. 2010). Sprechen und andere Arten der Kommunikation sind auch sehr eingeschränkt, zusätzlich kommen noch eine schwere geistige Retardierung und autismusähnliche Charakterzüge hinzu. Weitere häufige Symptome, die RETT-Patientinnen zeigen, sind Luftschlucken, Hyperventilation und Apnoe teilweise bis zu mehreren Minuten. Diese Apnoe- und Hyperventilationsphasen wechseln sich mit Phasen normaler Atmung ab, der Häufigkeitsgipfel liegt zwischen 5 und 10 Jahren (Julu et al. 2001).

Grundsätzlich sind die meisten Symptome sehr variabel, die körperliche und geistige Beeinträchtigung kann sehr unterschiedlich ausgeprägt sein und es gibt durchaus Patientinnen, die relativ eigenständig laufen können oder einfache Worte

sprechen. Die Diagnose erfolgte bis zum Jahr 1999 nur mit Hilfe eines Scoresystems der Symptome, was auf Grund der hochvariablen Expressivität zu einigen Verwechslungen mit den anderen Krankheiten aus dem autistischen Formenkreis führte.

1.2. Genetische Ursachen des RETT-Syndroms

Im Jahr 1999 wurde das Gen, welches beim RETT-Syndrom am häufigsten mutiert ist, entdeckt und fortan war ein Gentest zur Diagnose möglich (Amir et al. 1999). Das betroffene *MECP2*-Gen liegt auf dem X-Chromosom und codiert das Methyl-CpG-Bindende Protein 2 (MeCP2). Die Mutation erfolgt spontan, vor allem in der Keimbahn des Vaters (Zhu et al. 2010). Da dieser sein X-Chromosom an alle Töchter und sein Y-Chromosom an alle Söhne weitergibt, ist das klassische RETT-Syndrom bei Jungen sehr selten, nur bei gelegentlicher maternaler Mutation sind diese betroffen.

Die Lage auf dem X-Chromosom erklärt auch die variable Expressivität, denn nach der Lyon-Hypothese wird bei Frauen eines der X-Chromosomen in jeder Zelle zufällig inaktiviert (Lyon 1961). Dadurch ist es möglich, dass einige Patientinnen nahezu keine Symptome aufweisen oder nur Konduktorinnen dieser Krankheit sind. Andere zeigen eine ähnlich schwere Verlaufsform wie vom RETT-Syndrom betroffene Jungen und versterben kurz nach der Geburt, je nachdem, in wie vielen Zellen das mutierte X-Chromosom bei diesen Patientinnen aktiv bleibt. Da Jungen nur ein X-Chromosom besitzen, liegt bei ihnen immer eine maximale Expressivität vor. Durch den nun möglichen Gentest konnten nun auch einige Jungen gefunden

werden, bei denen eine *MECP2*-Mutation vorlag. Diese waren aber entweder sehr stark behindert und verstarben kurz nach der Geburt (Schüle et al. 2008) oder sie hatten auch ein 2. X-Chromosom und somit zusätzlich ein KLINEFELTER-Syndrom (Deidrick et al. 2005).

Eine Variante des RETT-Syndroms, bei der das *CDLK5*-Gen (Cyclin-dependent Kinase-Like 5 Gen) mutiert ist, fällt durch massive frühe Epilepsien schon vor dem 6. Lebensmonat auf, die teilweise sogar mehrmals täglich auftreten. Diese Mädchen haben oft auch eine überdurchschnittlich starke Ausprägung der anderen Symptome (Mari et al. 2005).

MeCP2 ist ein Transkriptionsfaktor, welcher an der langfristigen Ein- und Ausschaltung von Genen beteiligt ist. Unter den Zielgenen befinden sich unter anderem *BDNF* (*brain derived neurotrophic factor*) (Chen WG et al. 2003), der Transkriptionsfaktor *DLX5* (Bienvenu und Chelly 2006), ein Modulator der Na^+/K^+ -ATPase Phospholemman (Deng V et al. 2007) und eine Untereinheit des mitochondrialen Komplexes III der Atmungskette (Kriaucionis et al. 2006). Die maximale Expression von MeCP2 erfolgt dabei während der Entwicklung des Gehirns immer in Regionen der Ausreifung und Differenzierung (Shahbazian et al. 2002). So ist MeCP2 um die Geburt herum vor allem im Hirnstamm ausgeprägt, während cerebelläre und kortikale Schichten erst deutlich später MeCP2 exprimieren (Mullaney et al. 2004). Erst danach wird es auch im Thalamus und in den Basalganglien vermehrt gebildet, was ja auch der natürlichen Reifung des Gehirns entspricht (Kaufmann et al. 2005).

Basierend auf diesen typischen *MECP2*-Mutationen wurden verschiedenste RETT-Mausmodelle entwickelt, die Deletionen oder Punktmutationen in diesem Gen tragen (Chen RZ et al. 2001; Guy et al. 2001). Einige frühe, experimentelle Therapieversuche wurden im Mausmodell bereits erfolgreich durchgeführt. Beispielsweise führt die Behandlung mit IGF-1 (*Insulin-like Growth Factor 1* = Insulinähnlicher Wachstumsfaktor 1) zu einer um 50% höheren Lebenserwartung, einer weniger starken Bewegungseinschränkung und einer stabileren Atmung mit geringerer Variabilität der Atemfrequenz (Tropea et al. 2009). Außerdem war mit dieser Behandlung das Gewicht des Gehirns weniger deutlich vermindert und die Dendritendichte war höher als bei *Mecp2^{-/-}*-Mäusen ohne IGF-1-Behandlung (Guy et al. 2007).

1.3. Neuronale Dysfunktion im RETT-Syndrom

Wie eingangs schon beschrieben, leiden RETT-Patientinnen durch ihre Atemstörungen an ausgedehnten Phasen systemischer Hypoxie. Dasselbe gilt auch für Maus-Modelle, die dieses Krankheitsbild imitieren. Diese ausgeprägten Atemstörungen werden wahrscheinlich durch die erhöhte Aktivität von 5-HT- und NMDA-Rezeptoren im Atemzentrum der *Medulla oblongata* (Blue et al. 1999), in Kombination mit der schon beschriebenen BDNF-Dysregulation ausgelöst (Kaufmann et al. 2005). Alle diese Faktoren werden direkt oder indirekt durch MeCP2 gefördert oder unterdrückt, wodurch ein Funktionsverlust dieses Proteins weit reichende Folgen hat.

Ziel meiner Arbeit war nun zu untersuchen, ob das Gehirn dieser Tiere nachweisbar durch die intermittierende systemische Hypoxie in seiner Funktion beeinträchtigt wird. So wäre zum Beispiel denkbar, dass die ständige systemische Hypoxie zu einem *preconditioning* führt, das heißt, dass die Neurone eine verminderte Anfälligkeit gegenüber Hypoxie haben und dass sie in definierten hypoxischen Versuchsbedingungen erst zu einem späteren Zeitpunkt ihre Arbeit einstellen. Eine Hirnregion, die eine sehr ausgeprägte Ischämieempfindlichkeit aufweist, ist ja bekanntlich der Hippokampus. Nun ist dieser beim RETT-Syndrom durch die *MECP2*-Mutation schon beeinträchtigt, die synaptische Plastizität und wiederum die NMDA-Rezeptoren sind verringert (Asaka et al. 2006). Bei einer schweren Hypoxie kommt es zunächst innerhalb von 2 Minuten zu einem Funktionsausfall des betroffenen Areals und zwar bei kranken und gesunden Tieren gleichermaßen (Fischer et al. 2009), die synaptische Aktivität sinkt rapide und die Zellen beginnen, auf anaeroben Stoffwechsel umzuschalten. Im weiteren Verlauf kommt es im Hippokampus zu einer so genannten hypoxie-induzierten Spreading Depression.

1.4. Hypoxie-induzierte Spreading Depression als Test für Hypoxietoleranz

Eine sogenannte Spreading Depression (SD) ist eine nahezu komplette Depolarisation von Neuronen und Gliazellen, die lokal entsteht und sich dann auf benachbarte Zellen ausbreitet. Dabei kommt es zu einem plötzlichen Abfall der extrazellulären Spannung und einer gestörten Ionenverteilung (Hansen 1985; Müller und Somjen 2000; Somjen 2001). Die erste Beschreibung einer Spreading Depression geht auf Leao im Jahr 1944 zurück, als er bei anästhesierten

Kaninchen versuchte, Epilepsien künstlich auszulösen und mit Hilfe eines kortikalen Elektrogramms darzustellen (Leao 1944). Stattdessen bemerkte er jedoch ein Absinken und schließlich ein Ausbleiben der Signale in der von der Epilepsie betroffenen Region, das sich langsam von einer Elektrode zur nächsten über den gesamten Kortex ausbreitete. Diese sich ausbreitende Unterdrückung der neuronalen Aktivität im Kortex bezeichnete er mit dem Terminus "spreading depression of cortical activity" (Leao 1944).

Zu Beginn der Spreading Depression tritt langsam Kalium aus den Neuronen vom Intra- in den Extrazellulärraum aus. Auch Glutamat spielt eine bedeutende Rolle bei der Entstehung der Spreading Depression, da es die Depolarisation von Neuronen und Gliazellen fördert und bei Blockade der NMDA-Kanäle keine normoxische SD mehr auslösbar ist. Wenn dann ein gewisser Schwellenwert erreicht ist, öffnen sich spannungsabhängige Na^+ -Kanäle und es kommt zu einem plötzlichen Potentialabfall extrazellulär, analog dazu zu einer Depolarisation intrazellulär. Dabei handelt es sich ähnlich wie bei Aktionspotentialen um ein "Alles-oder-nichts"-Phänomen, erst bei Erreichen des Schwellenwertes tritt der starke Potentialabfall ein. Das extrazelluläre Kalium steigt massiv an, während $[\text{Na}^+]_o$ und $[\text{Ca}^{2+}]_o$ absinken und diese Kationen im Tausch gegen K^+ in die Zellen strömen (Somjen 2001). Bei den Anionen verhält es sich ähnlich, denn $[\text{Cl}^-]_o$ fällt ab, wohingegen Glutamat freigesetzt wird und die extrazelluläre Glutamatkonzentration ansteigt (Müller und Somjen 2000b). Die Spreading Depression ist im Normalfall reversibel, nach Erreichen des Spitzenwertes sinken $[\text{K}^+]_o$ und V_o wieder auf normale Werte und das Hirngewebe erholt sich vollständig.

Als Auslöser einer Spreading Depression kommen viele Stimuli in Frage: Durch tetanische Stimulation mit hochfrequenten elektrischen Pulsen oder mechanische Stimulation mittels Druck oder Punction des Gewebes kann sie ebenso ausgelöst werden wie durch alkalische pH-Werte, niedrige Osmolarität oder eine ganze Reihe chemischer Substanzen. Die wichtigsten chemischen Stimuli sind Kaliumionen, Glutamat und in manchen Bereichen Acetylcholin, da diese auch im natürlichen Zellverband in ausreichenden Mengen vorkommen und freigesetzt werden können (Somjen 2001).

Eine Sonderform der Spreading Depression ist die hypoxieinduzierte oder hypoxische Spreading Depression (HSD). Im Unterschied zur den anderen Formen der Spreading Depression sind der Funktionsverlust und die neuronale Depolarisation hierbei nur dann reversibel, wenn rechtzeitig wieder Sauerstoff hinzugegeben wird. Auch die beteiligten Ionenströme sind etwas verändert: So ist die initiale Depolarisation der Neurone wahrscheinlich durch einen veränderten Mechanismus zu erklären, da NMDA-Antagonisten die normoxische SD deutlich stärker blockieren, aber eine HSD nur verzögern. TTX hingegen, ein Antagonist der spannungsabhängigen Na^+ -Kanäle, kann auf der anderen Seite die Amplitude der HSD stark verkleinern und ihr Auftreten sogar ganz verhindern, während es quasi keinen Effekt auf eine normoxische SD hat (Somjen 2001). Auch zeigen bei Wiedereinsetzen der Sauerstoffversorgung die Kaliumströme bei der HSD deutlich andere Eigenschaften als bei der SD, es kommt nach der HSD zu einem transienten Absinken der extrazellulären Kaliumkonzentration unter den normoxischen Ausgangswert.

Zusätzlich zu den elektrischen Veränderungen gibt es bei einer Spreading Depression auch deutliche optische Auffälligkeiten des Gewebes, die man zuverlässig und mit relativ einfachen Mitteln als sogenanntes Intrinsisches Optisches Signal (IOS) beobachten kann (Aitken et al. 1999; Müller und Somjen 1999). Bei einer Spreading Depression nimmt die Lichtreflexion des Gewebes zu. Dabei wird die Aufhellung des Gewebes nicht durch die Zellschwellung während der SD ausgelöst, denn diese würde das Gewebe normalerweise dunkler erscheinen lassen (Fayuk et al. 2002). Vielmehr spielen Cl⁻-Ionen eine Schlüsselfunktion, da durch Substitution der Cl⁻-Ionen im Nährmedium die starke IOS-Zunahme wegfällt und nur die durch Zellschwellung verursachte IOS-Abnahme zu beobachten ist (Bahar et al. 2000). Vermutet wird ein Zusammenhang von Cl⁻-Ionen und der mitochondrialen Schwellung während der SD, die ursächlich die Zunahme der Lichtreflexion während der SD auslösen kann (Müller und Somjen 1999).

Die Funktion der Synapsen und die axonale Impulsfortleitung sind während der Spreading Depression vollständig blockiert. Auftreten kann die Spreading Depression prinzipiell im gesamten Bereich der grauen Substanz im Gehirn; besonders im Kortex, im Hippokampus, und unter bestimmten Umständen auch im Hirnstamm (Funke et al. 2009; Kron et al. 2011; Somjen et al. 1992). Als experimentelles Modell für einen ischämischen Schlaganfall eignet sich die hypoxische Spreading Depression sehr gut, da man bei dieser in Verbindung mit Ionen-selektiven Mikroelektroden zeitlich sehr gut aufgelöste elektrophysiologische und ionale Veränderungen protokollieren kann. Auch kann

sie quasi als extrazelluläres Ereignis abgeleitet werden und stellt so eine integrierte Summenantwort des betroffenen neuronalen Netzwerkes (z.B. des Hippokampus) dar.

1.5 Fragestellung dieser Arbeit

Das primäre Ziel dieser Arbeit war es, die Hypoxieempfindlichkeit des Hippokampus in MeCP2-defizienten Mäusen im Detail zu analysieren und mit dem Wildtyp zu vergleichen. Dazu wurden verschiedene direkte und indirekte Methoden durchgeführt, unter anderem die direkte DC-Potentialmessung, Ionen-selektive Mikroelektroden, Messungen der Zellschwellung und optische Verfahren. Im Rahmen dieser Versuche konnte erstmals eine erhöhte Hypoxieempfindlichkeit des hippokampalen Systems bei MeCP2-defizienten Mäusen nachgewiesen werden. Die gewonnenen Ergebnisse flossen bereits in eine ausführliche Publikation ein, die im Journal of Neurophysiology im Jahr 2009 veröffentlicht wurde (Fischer et al. 2009). Auf Basis dieser Daten konnte in weiterführenden Arbeiten aus der Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass bei diesen Tieren unter Hypoxie kalziumabhängige Kaliumkanäle mit geringer und mittlerer Leitfähigkeit in CA1-Pyramidenzellen des Hippokampus weniger stark aktiviert werden und zudem der zelluläre Kalziumhaushalt deutlich beeinträchtigt ist (Kron und Müller 2010).

2. Material und Methoden

2.1. Mausmodell für das RETT-Syndrom

Dem Mausmodell, welches ich für die Analysen im Rahmen der vorliegenden Arbeit benutzte, fehlten die Exons 3 und 4 des *MECP2*-Gens, wodurch die Symptome des RETT-Syndroms sehr gut imitiert wurden [B6.129P2(C)-*Mecp2^{tm-1-1Bird}* (Guy et al. 2001)]. Heterozygote Weibchen (*Mecp2^{+/-}*) wurden von den Jackson Laboratories, Bar Harbour, ME geliefert. Durch Kreuzung mit Männchen vom Wildtyp (WT) entstanden heterozygote Weibchen (*Mecp2^{+/-}*), die auch teilweise zur weiteren Zucht verwendet wurden, hemizygoten Männchen (*Mecp2^{-y}*) und sowohl männliche als auch weibliche Wildtypen in der Zucht. Da die hemizygoten Männchen (*Mecp2^{-y}*) schon am circa 60. Tag verstorben sind, untersuchte ich sowohl die *Mecp2^{-y}*- als auch die Wildtypmännchen zwischen Tag 38 und Tag 60. In diesem Zeitraum waren die *Mecp2^{-y}*-Mäuse bereits symptomatisch und zeigten einen kleineren Wuchs, eindeutig gestörte Motorik und weitere soziale Verhaltensauffälligkeiten.

2.2. Herstellung akuter Hippokampusgewebeschnitte

Bei der Organentnahme ging ich folgendermaßen vor: Die Mäuse wurden mit Ether tief betäubt; als die Reflexe auf schmerzhafte Reize erloschen waren, wurden sie durch Dekapitation getötet. Der Schädel wurde eröffnet und das Gehirn wurde schnell aus dem Schädel entfernt und in gekühlte Artifizielle Cerebrospinale Flüssigkeit (ACSF) eingelegt. Gleichzeitig wurde eine Blutprobe asserviert und der Hämatokrit mit Hilfe einer Hämatokritkapillare und einer Zentrifuge ermittelt. Dem gekühlten Gehirn wurde sodann der Hirnstamm und der Frontallappen entfernt,

das verbleibende Gewebe wurde mit Hilfe von handelsüblichem Sekundenkleber auf einem Teflonblock fixiert. Nun wurde mit einem Vibroslicer (752M Vibroslice, Campden Instruments, Loughborough, Großbritannien) durch vorsichtiges Entfernen der anterioren Hirnanteile der Hippokampus freigelegt und 400 µm dicke koronare Gehirnschnitte in der gesamten Breite des Hippokampus geschnitten. Nach dem Teilen der Gewebeschnitte in der Medianebene wurden diese in eine Interface-Messkammer des Oslo-Typs überführt. Dort ruhten die Hirnschnitte für 90 Minuten, um vor Beginn der Messung eine bestmögliche Erholung vom Präparationstrauma zu gewährleisten.

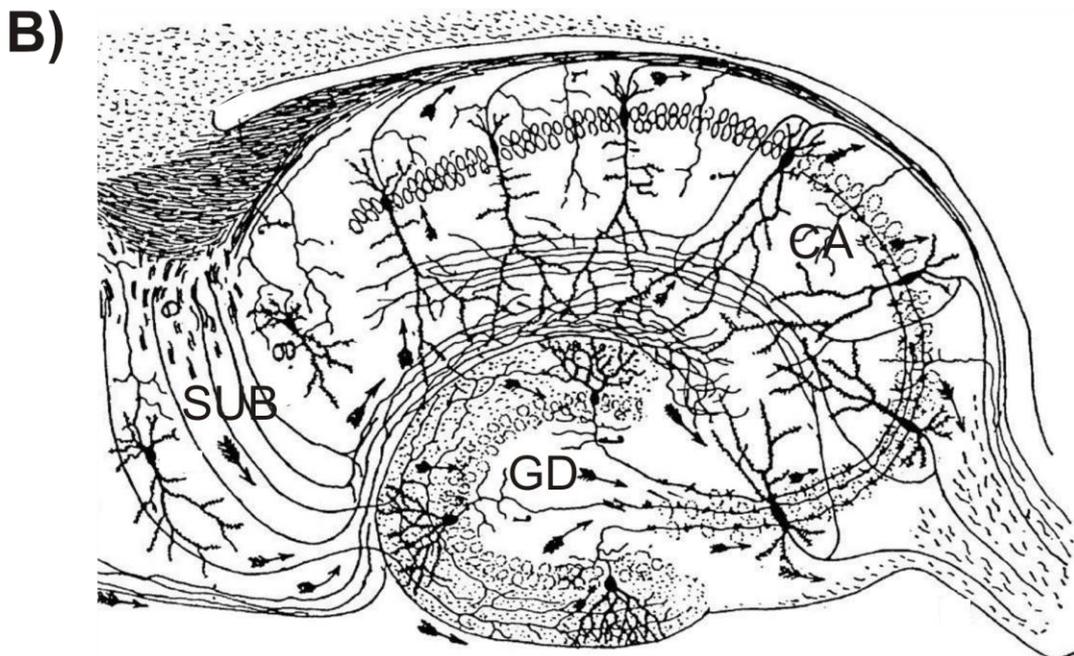
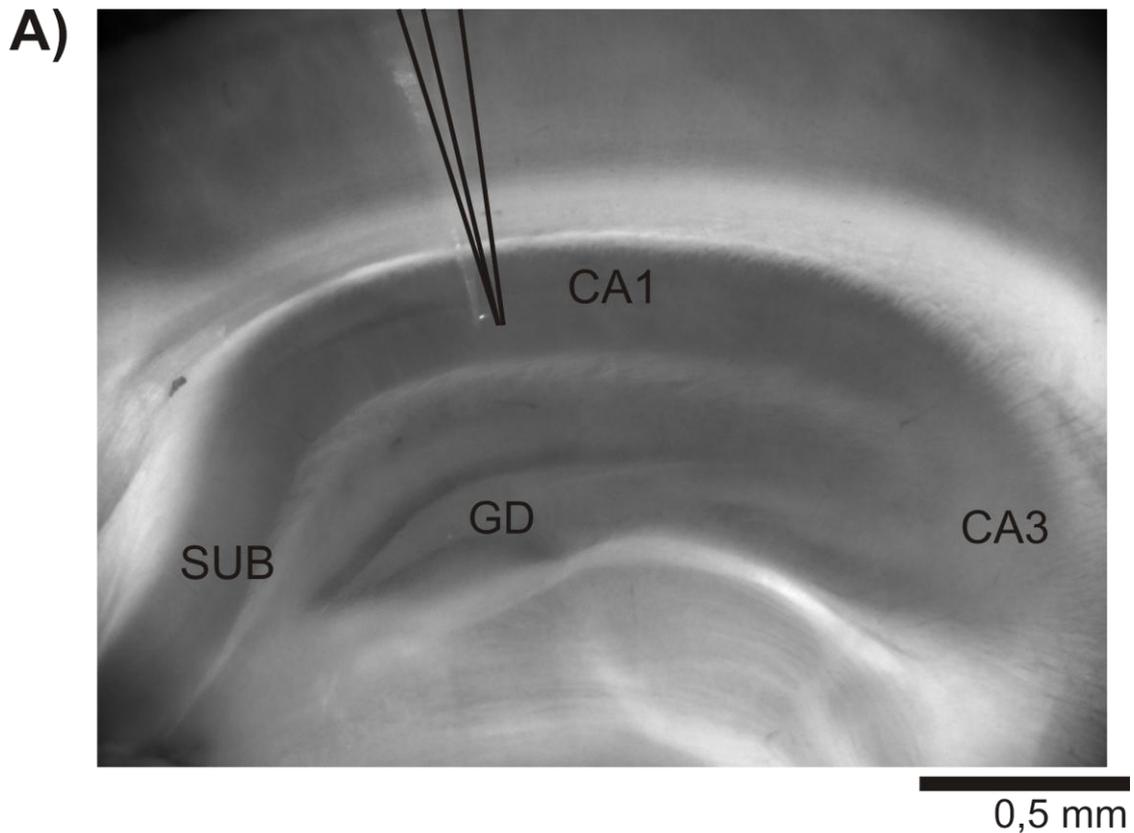


Abbildung 1: **A)** CCD-Kameraaufnahme der Hippokampusformation im akuten Hirnschnitt einer Maus, **B)** schematische Zeichnung von Ramon y Cajal (1911, modifiziert). Zu erkennen ist der *Gyrus dentatus* (GD) und in der sich entwindenden Schnecke die Regionen des *Cornu ammonis* (CA4 – CA1) mit der Elektrodenspitze (doppellumig) in der CA1-Region, sowie das *Subikulum* (sub).

2.3. Messtechnik und allgemeiner Versuchsaufbau

Ein wichtiger Bestandteil der Interface-Messkammer war ein Nylonnetz, auf welchem die Gewebeschnitte lagen. Wie in Abbildung 2 genauer zu erkennen ist, wurde in die innere Messkammer oxygenierte ACSF geleitet, welche von unten die Gewebeschnitte mit einer Flussrate von 3-4 ml/min umspülte und leicht mit Carbogen (95% O₂ – 5% CO₂) begast wurde, um einen pH-Wert von 7,4 einzustellen. Weit stärker wurde die äußere Messkammer mit Carbogen (95% O₂ - 5% CO₂; 400 ml/min) versorgt, welches über Lüftungseinlässe zum Gewebeschnitt aufstieg. Somit befanden sich die Hirnschnitte genau an der Grenzfläche (Interface) zwischen Flüssigkeit und Gasphase. Unter diesen Bedingungen wird der Sauerstoff hauptsächlich aus der Gasphase aufgenommen. Die ACSF bestand aus (in mM): 130 NaCl, 3.5 KCl, 1.25 NaH₂PO₄, 24 NaHCO₃, 1.2 CaCl₂, 1.2 MgSO₄ und 10 Dextrose. Dabei wurde die gesamte Interface-Messkammer auf 35-36 °C erwärmt und die Gewebeschnitte nach der Präparation zunächst für 90 Minuten in Ruhe gelassen. Durch das Betätigen eines Ventils konnte nun der Gasfluss in die Messkammer von 95% O₂ – 5% CO₂ auf 95% NO₂ – 5% CO₂ umgestellt und somit in kürzester Zeit effektiv eine schwere Hypoxie in den Gewebeschnitten ausgelöst werden. Streng genommen wurde eine vollständige Anoxie zwar nicht erreicht, da die ACSF nach wie vor mit Carbogen begast wurde, jedoch konnte gezeigt werden, dass der Sauerstoffpartialdruck (pO₂) im Gewebe unter einer derartigen schweren Hypoxie genauso vollständig absinkt wie bei Anoxie (Foster et al. 2005).

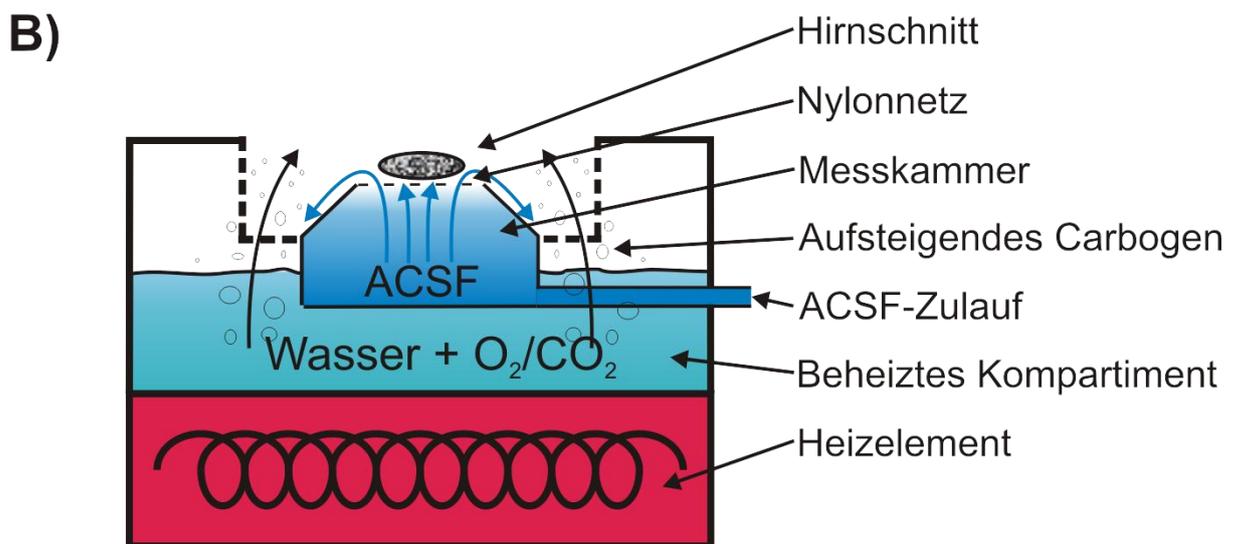
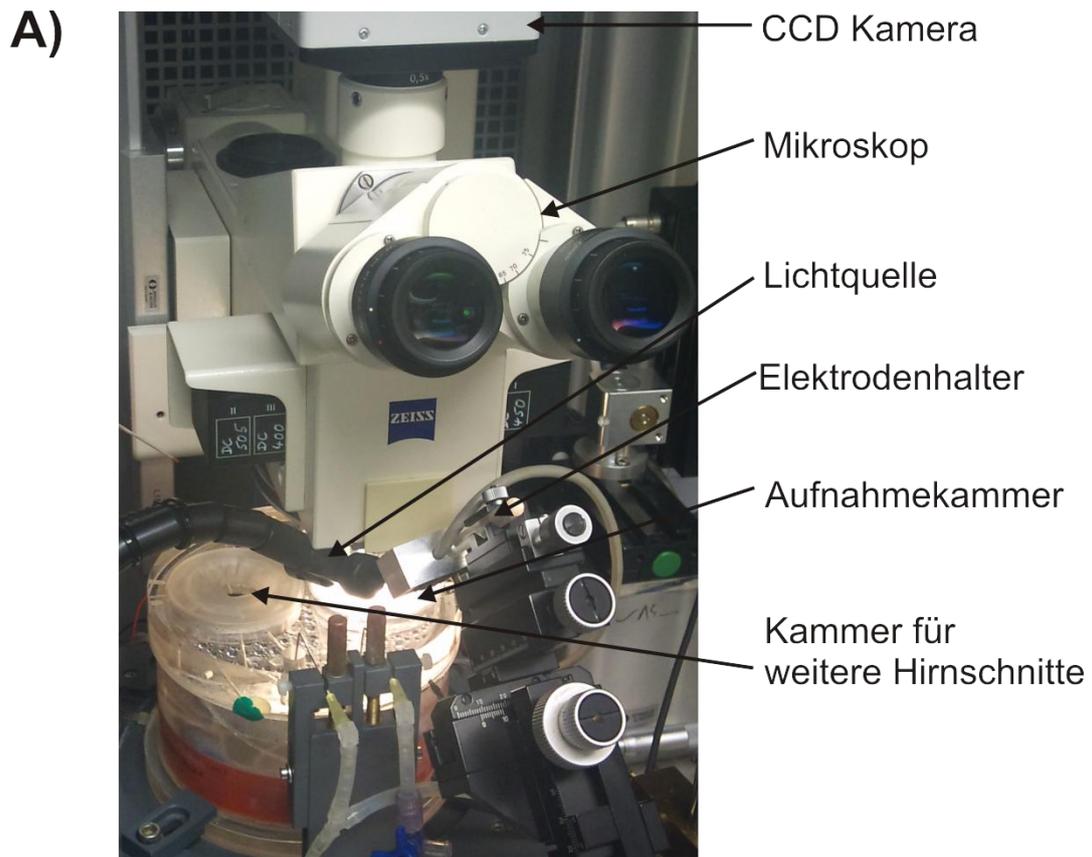


Abbildung 2: A) Axiotech-Mikroskop mit aufgesetzter CCD-Kamera und Interface-Messkammer mit Mikroelektrode. In der Schemazeichnung **B)** ist der Aufbau der Aufnahmekammer genauer erläutert.

Um die Adaptation des Gewebes an wiederholte Hypoxie zu beobachten und diese zwischen Wildtyp- und *Mecp2^{-/-}*-Mäusen zu vergleichen, wurden alle Versuche mit Ausnahme der intrazellulären Ableitungen dreimal pro Gewebeschnitt mit einer Pause von jeweils 20 Minuten durchgeführt. Bei Eintritt der hypoxieinduzierten Spreading Depression wurde die Begasung nach 20 Sekunden wieder auf Carbogen umgestellt, um eine vollständige Erholung zu gewährleisten.

Da sämtliche Versuche sich somit auf etwas mehr als eine Stunde beschränkten, wurden bis zu 4 Hirnschnitte von einem Tier benutzt. Um valide Aussagen der Beobachtungen zu erhalten, wurden alle Versuche mit mindestens 4 verschiedenen Tieren jedes Genotyps durchgeführt, die Anzahl der Experimente (n) bezieht sich immer auf die Anzahl der untersuchten Gewebeschnitte. Die Signifikanz der Experimente wurde mit einem zweiseitigen ungepaarten t-Test und einem Signifikanzlevel von $p = 0,05$ errechnet. Bei zutreffender Signifikanz wurden die entsprechenden Abbildungen und Werte mit einem Stern für $p < 0,05$ und mit zwei Sternen für $p < 0,01$ markiert.

2.4. Ionen-selektive Glasmikroelektroden

Ionen-selektive Elektroden wurden zuerst von Caldwell im Jahr 1954 entwickelt, wobei er pH-selektive Glaselektroden benutzte, welche nur in sehr großen Zellen, zum Beispiel in Riesenzellen von Tintenfischen, Verwendung fanden (Caldwell 1954). Die Entwicklung von Na^+ - und K^+ -selektivem Glas (Eisenman et al. 1957) führte zu intrazellulären Na^+ - und K^+ -Messungen mit glasisolierten Elektroden

(Hinke 1959). Da die Spitzen dieser Elektroden jedoch immer noch einen Durchmesser von 100 μm hatten, konnten auch diese lediglich in Riesenzellen benutzt werden. Die ersten Mikroelektroden, die diesen Namen auch tatsächlich verdienten, entwickelte Lev 1964. Bei diesen Elektroden musste die Spitze nur wenige Mikrometer in die Zelle eindringen (Lev 1964). Zwei gravierende Nachteile der ersten Mikroelektroden waren jedoch, dass zum einen das Ionen-selektive Glas komplett in der Zelle versenkt werden musste und somit weiterhin nur relativ große Zellen in Frage kamen und dass zum anderen das Ionen-selektive Glas eine relativ schlechte Spezifität für Na^+ - oder K^+ -Ionen hatte.

Diese Probleme wurden erst zuverlässig und nachhaltig durch die Einführung von flüssigem Ionenaustauscher statt Ionen-selektivem Glas gelöst (Cornwall et al. 1970), wodurch bei intrazellulären Messungen nur noch die Spitze der Elektrode, welche ungefähr 0,5 μm misst, die Zellmembran durchdringen muss. Durch die Entwicklung neuer Ionenaustauscher konnte zumindest für Natrium-, Kalium- und pH-Elektroden eine annehmbare Spezifität erreicht werden. Das Prinzip dieser Elektroden beruht auf einem Ionenaustausch an der Grenzfläche zwischen Ionensensor und Extra- oder Intrazellulärraum des zu untersuchenden Gewebeschnittes. Je höher dabei die Konzentration des zu messenden Ions, desto größer auch der stattfindende Austausch an Ionen. Die aufgenommenen Ionen werden dann im Inneren der Elektrode im gleichen Maße vom Ionensensor an die Backfill-Lösung abgegeben. Im Vergleich mit der Referenzelektrode kann dann die Konzentration des gesuchten Ions berechnet werden, nachdem die Spannungsunterschiede in verschiedenen definierten Eichlösungen kalibriert

wurden (Günzel et al. 1997).

Ionen-selektive Mikroelektroden haben verschiedene Vorteile gegenüber anderen Methoden wie zum Beispiel Farbstoffmessungen und Isotopenmarkierungen. Zum einen messen sie direkt die Aktivität der Ionen, nicht nur die Konzentration. Die Aktivität der Ionen ist viel genauer bei zellulären Vorgängen, da gebundene oder auf andere Weise inaktivierte Ionen in die Aktivität nicht mit einfließen, in die Konzentration jedoch schon. Die Aktivität a von K^+ zum Beispiel ist mit der Konzentration über folgende Formel verknüpft: $a_{K^+} = \gamma[K^+]$ wobei γ der Aktivitätskoeffizient ist. Der Aktivitätskoeffizient ist meist nicht einfach zu berechnen, daher ist die direkte Aktivitätsmessung von Vorteil. Weiterhin ist beim Eindringen der Elektrode in die Zelle durch die Größe der Spitze fast ausgeschlossen, dass Organellen angestochen werden können, sodass nur das Zytoplasma gemessen wird. Dadurch, dass nur eine Zelle angestochen werden muss, bei extrazellulärer Messung gar keine, sind auch in-vivo-Messungen möglich. Ein weiterer Vorzug ist die zeitgenaue Messung und die schnellen Antworten innerhalb weniger Sekunden, die eine Ionen-selektive Mikroelektrode generiert. Auch sind Messungen über mehrere Stunden möglich, theoretisch auch von mehreren Ionen zur gleichen Zeit. Zudem wird gleichzeitig auch die extrazelluläre Spannung V_o mit bestimmt.

Ionen-selektive Mikroelektroden haben jedoch auch einige Nachteile: Für intrazelluläre Messungen muss die Zellwand penetriert werden und dieses Ereignis führt unweigerlich zum Untergang vieler angestochener Zellen. Bei

extrazellulären Messungen fällt dieser Nachteil jedoch weg. Auch ist bei der Herstellung Ionen-selektiver Mikroelektroden ein gewisses Maß an handwerklichen Fähigkeiten Voraussetzung. Gerade die zeitaufwändige Konstruktion der Elektroden, aber auch das Einbringen in die präparierten Gewebeschnitte, können einige Schwierigkeiten bereiten. Aufgrund des hohen elektrischen Widerstands der Elektroden (10^9 - $10^{12} \Omega$) sind elektrische und elektrostatische Störsignale ohne adäquate Abschirmung der Messkammer oft noch von weit entfernten Störquellen nachweisbar. Der Schutz des gesamten Messaufbaus mit antielektrischer Folie schränkt den Zugang zur Messkammer während der Messung ein. Ein weiteres Problem tritt bei Ionen mit hoher intrazellulärer Bindung oder Pufferung, zum Beispiel Ca^{2+} oder H^+ auf, denn die Ionenflüsse können dann nicht so ohne weiteres aus der Aktivität berechnet werden. Da Kalium jedoch intrazellulär reichlich in ungebundener Form vorhanden ist und TMA im natürlichen Zellverband nicht vorkommt (Thomas 1978), trifft das auf die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Messungen nicht zu.

Durch die zeitgenaue Messung und die lange Erfahrung der Arbeitsgruppe im Umgang mit Mikroelektroden war dies die Methode der Wahl, um die genauen Vorgänge bei hypoxieinduzierter Spreading Depression im Gehirnschnitt von RETT-Mäusen darzustellen.

2.5. Messung der extrazellulären K⁺-Konzentration mit Ionen-selektiven Mikroelektroden

Bei der Messung der extrazellulären Kaliumionenkonzentration [K⁺]_o mussten zunächst doppelläufige Glasmikroelektroden vom gedrehten Typ erstellt werden (siehe Abbildung 3): Eine Borosilikat-Glaskapillare mit Filament (GC100F-15, Harvard Apparatus, Holliston, USA) und eine Kapillare ohne Filament (GC150-15, Harvard Apparatus, Holliston, USA) wurden mit 2-Komponenten-Epoxidharzkleber (Uhu[®] plus endfest 300, langsam härtend) verklebt. Zur weiteren Aushärtung wurden die verklebten Kapillaren bei 80°C für eine Stunde bis zu einer theoretisch möglichen Endfestigkeit von ~2000N/cm² im Ofen erhitzt. Zum Ziehen der Elektroden benutzte ich ein Vertikal-Elektrodenziehgerät (Narishige Type PE-2, Narishige Group, Tokyo, Japan). Dabei wurden die Kapillaren eingespannt und in der Mitte erhitzt, leicht vorgezogen, gleichzeitig um 180° gedreht und in einem 2. Schritt dann von einem Gewicht vollständig auseinander gezogen.

Da der Kaliumsensor hydrophob ist und Glasoberflächen bekanntermaßen hydrophil sind, musste die Kapillare ohne Filament, die für die Kaliummessung bestimmt war, silanisiert werden, während der Referenzkanal in dieser Zeit zum Schutz mit H₂O gefüllt wurde, um seine Silanisierung zu vermeiden. Zum Silanisieren verwendete ich HMDS (Hexamethyldisilazan, 98%, Fluka)-Dämpfe, welche bei ungefähr 45°C 30 bis 45 Minuten auf den Ionen-selektiven Kanal einwirkten und anschließend bei 180°C für 2 Stunden eingebrannt wurden. Danach konnte die Spitze dieses Kanals mit dem Kalium-Ionophore-I-Ionensensor (Cocktail A, Fluka 60031, Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland) gefüllt

werden, aufgefüllt wurde der Kanal mit 150 mM KCl + 10 mM HEPES bei einem pH-Wert von 7,4 als K⁺-Austauschlösung. Der Referenzkanal enthielt durchgängig 150 mM NaCl + 10 mM HEPES, ebenfalls bei pH 7,4. Die fertig befüllte Elektrode wurde mittels chlorierter Silberdrähte an einen Differenzial-Elektrometer-Verstärker (FD 223, World Precision Instruments, Sarasota, USA) angeschlossen und über einen AD-Wandler an ein Aufnahmeprogramm (Axoscope, PClamp 9,2 Software (Molecular Devices, Sunnyvale, USA)) gesendet.

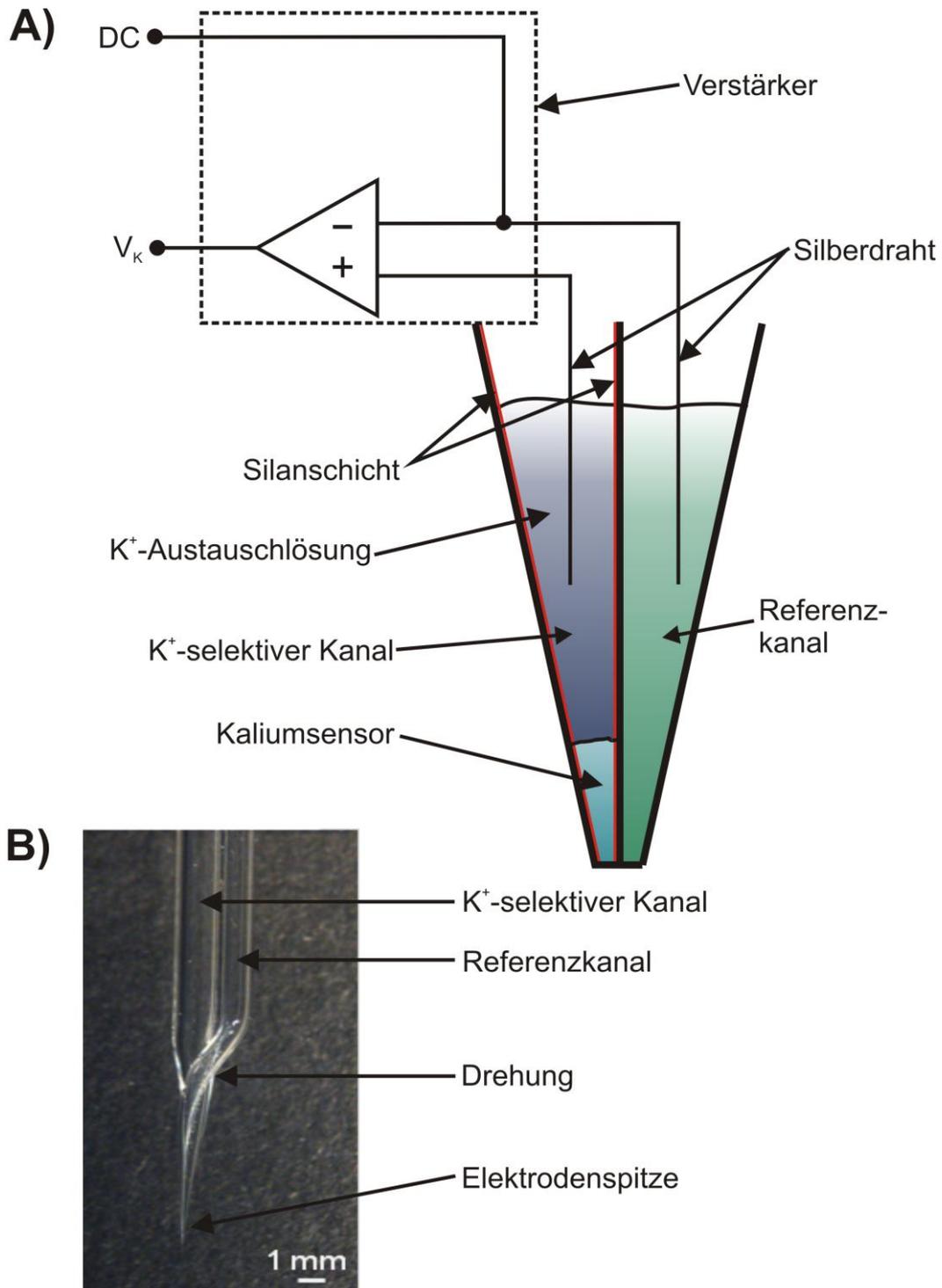


Abbildung 3: **A)** Schemazeichnung und **B)** Foto einer Ionen-selektiven Glasmikroelektrode am Beispiel der Kalium-selektiven Elektrode. Das Signal des Referenzkanals wird im Verstärker vom Kaliumkanal subtrahiert, um das reine Signal der K^+ -Veränderung zu erhalten. Der Referenzkanal misst das reine DC-Potential.

Zum Kalibrieren der K⁺-Elektrode vor bzw. nach jeder Messung wurden spezielle Eichlösungen mit folgender Zusammensetzung verwendet (in mM):

| Lösung | KCl | NaCl | MgSO₄ | CaCl₂ | NaH₂PO₄ | HEPES |
|---------------|------------|-------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------------------|--------------|
| 0 | 0 | 157,5 | 1,2 | 1,2 | 1,25 | 10 |
| 1 | 1 | 156,5 | 1,2 | 1,2 | 1,25 | 10 |
| 2 | 2 | 155,5 | 1,2 | 1,2 | 1,25 | 10 |
| 5 | 5 | 152,5 | 1,2 | 1,2 | 1,25 | 10 |
| 10 | 10 | 147,5 | 1,2 | 1,2 | 1,25 | 10 |
| 20 | 20 | 137,5 | 1,2 | 1,2 | 1,25 | 10 |
| 50 | 50 | 107,5 | 1,2 | 1,2 | 1,25 | 10 |
| 100 | 100 | 57,5 | 1,2 | 1,2 | 1,25 | 10 |

(Tabelle 1: Kalibrierlösungen für K⁺-Selektive Mikroelektroden)

Die unterschiedlichen Konzentrationen an NaCl beruhten auf dem Ausgleich von KCl zwecks Angleichen der Ionenstärke und Osmolarität im Vergleich zu ACSF. Bei allen Zugaben von 10 mM HEPES wurde mit 1M NaOH bis zu einem pH-Wert von 7,4 titriert.

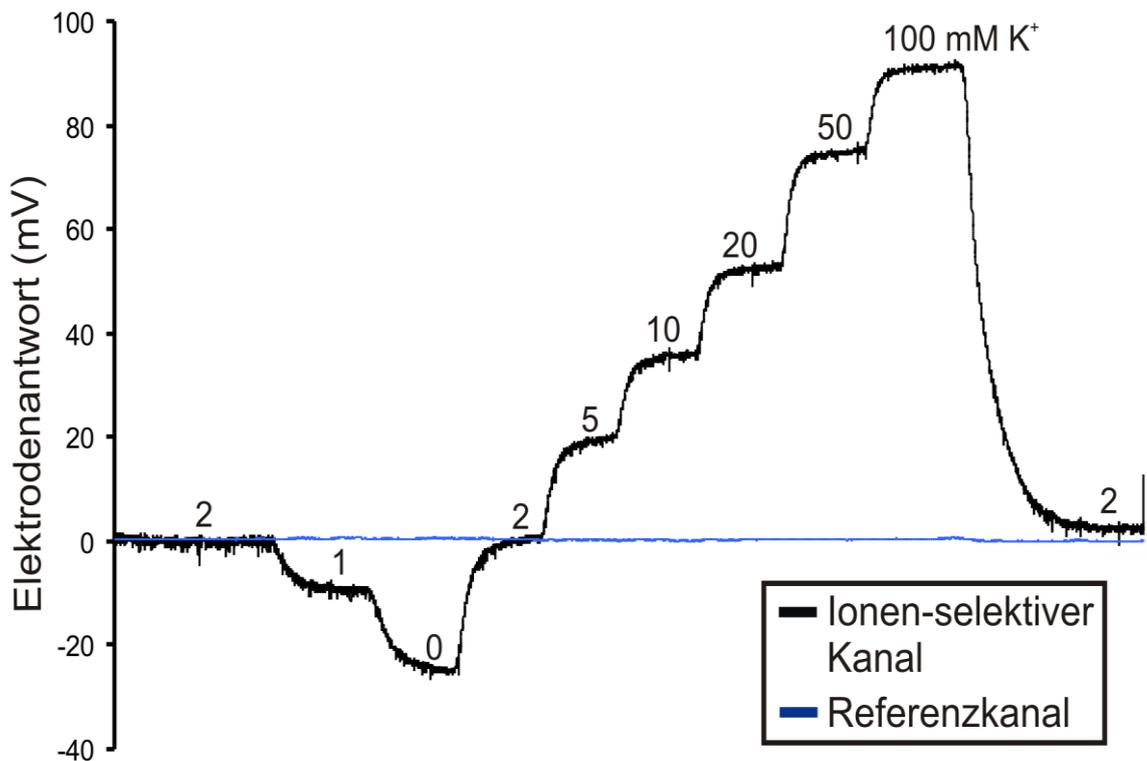


Abbildung 4: Kalibrationskurve vor/nach jeder Kaliumionenmessung. Die Zahlen über dem Ionen-selektiven Kanal geben die Konzentration von Kalium (in mM) in der jeweiligen Eichlösung an. Zu beachten ist die konstante Spannung des Referenzkanals bei verschiedenen Kaliumkonzentrationen und der große lineare Antwortbereich des Kaliumkanals.

Diese Kalibrierung wurde jeweils vor bzw. nach jedem untersuchten Hirnschnitt durchgeführt. Der Anstieg des Elektrodenpotentials betrug im Mittelwert $52,7 \pm 4,3$ mV pro Dekade Unterschied in der K⁺-Konzentration. Diese Werte nähern sich der Nernst-Gleichung an, in der ein theoretischer Potentialanstieg von 59,16 mV pro Dekade Konzentrationsanstieg errechnet wird:

$$\text{EMF} = E_0 + s \log c_K \quad \text{mit}$$

EMF: elektromotorische Kraft (force); Zellpotential [mV]

E_0 : Referenzpotential [mV]

c_K : Konzentration von K^+

s: Nernst-Steigung

$$s = 2,303 R T / (z_K F) = 59,16 \text{ ([mV]; } 25^\circ\text{C)}$$

bei einem einfach positiven Ion wie Kalium (K^+)

R: Gaskonstante ($8,314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$)

T: absolute Temperatur [K]

F: Faraday-Konstante ($96.487 \text{ C mol}^{-1}$)

z_K : Ladungszahl des Kaliumions

(Ammann 1986)

Da das Referenzpotential E_0 bei meiner Versuchsanordnung in der Referenzelektrode gemessen und automatisch von der elektromotorischen Kraft EMF subtrahiert wird, ergibt sich folgende Vereinfachung:

$$\text{EMF} - E_0 = 59,16 \log c_K$$

Für die kaliumselektiven Mikroelektroden ergibt sich eine Detektionsgrenze von durchschnittlich $0,87 \text{ mM } K^+$ mit einer Standardabweichung von $\pm 0,62 \text{ mM } K^+$ ($n=26$). Die extrazelluläre Kaliumionenkonzentration $[K^+]_o$ wurde direkt aus dem Potentialanstieg der Elektroden durch Benutzen der vorherigen Kalibrierung errechnet. Bei der Messung selbst wurde die Elektrode mit der Spitze schräg von oben im *Stratum radiatum* der hippokampalen CA1 Region platziert.

2.6. Messung interstitieller Volumenänderungen mittels Indikator-Verdünnungsmethode

Die Zellschwellung, die während einer hypoxiebedingten Spreading Depression auftritt, wurde mit Hilfe von Tetramethylammonium (TMA^+)-selektiven Mikroelektroden quantifiziert. Die Zellmembran ist nicht durchlässig für TMA^+ , somit verteilt sich das den Lösungen zugefügte TMA^+ gleichmäßig im Interstitium. Bei einer Änderung des interstitiellen Volumens (ISV) verändert sich dann entsprechend die Konzentration von TMA^+ . So kommt es bei Schrumpfung des ISV zu einem $[\text{TMA}^+]$ -Anstieg, bei Vergrößerung des ISV zu einem $[\text{TMA}^+]$ -Abfall. Da TMA^+ im natürlichen Zellverband nicht vorkommt, konnten durch die Zugabe von 1,5 mM TMA^+ in die ACSF somit die relativen Änderungen des Extrazellulärraums und damit antiproportional auch die Zellschwellung gemessen werden; diese Methode wird als Indikator-Verdünnungsmethode bezeichnet (Nicholson und Phillips 1981). Auch die Elektroden zur TMA^+ -Messung waren doppelläufig, die Herstellung der Elektrodenrohlinge erfolgte auf die gleiche Art wie bei den K^+ -selektiven Elektroden. Der TMA^+ -selektive Kanal wurde jedoch in der Spitze mit Corning 477317 K^+ ion exchanger (IE190, World Precision Instruments, Sarasota, USA) gefüllt. Dieser besitzt zwar eigentlich eine ausgeprägte K^+ -Selektivität, jedoch auch eine große TMA-Sensitivität. So konnte in vorigen Arbeiten gezeigt werden, dass die Spannung bei einem $[\text{K}^+]_o$ -Anstieg von 3,5 mM auf 50 mM sich lediglich um 0,3 mV erhöhte, wenn die Backfill-Lösung kein Kalium enthielt (Müller und Somjen 1999). Die Potentialänderungen des Ionen-selektiven Kanals durch den K^+ -Ausstrom während einer Spreading Depression sind somit zu vernachlässigen.

Aufgefüllt wurde dieser Elektrodenkanal mit 150 mM TMA-Cl + 10 mM HEPES bei einem pH-Wert von 7,4. Der Referenzkanal enthielt auch bei diesem Elektrodentyp 150 mM NaCl + 10 mM HEPES bei einem pH-Wert von 7,4.

Auch für die TMA⁺-Messung wurden entsprechende Kalibrierlösungen erstellt mit folgender Zusammensetzung (in mM):

| Lösung | TMACl | NaCl | KCl | MgSO₄ | CaCl₂ | NaH₂PO₄ | HEPES |
|---------------|--------------|-------------|------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------------------|--------------|
| 0 | 0 | 157,5 | 3,5 | 1,2 | 1,2 | 1,25 | 10 |
| 0,1 | 0,1 | 157,4 | 3,5 | 1,2 | 1,2 | 1,25 | 10 |
| 0,5 | 0,5 | 157 | 3,5 | 1,2 | 1,2 | 1,25 | 10 |
| 1 | 1 | 156,5 | 3,5 | 1,2 | 1,2 | 1,25 | 10 |
| 5 | 5 | 152,5 | 3,5 | 1,2 | 1,2 | 1,25 | 10 |
| 10 | 10 | 147,5 | 3,5 | 1,2 | 1,2 | 1,25 | 10 |
| 50 | 50 | 107,5 | 3,5 | 1,2 | 1,2 | 1,25 | 10 |
| 100 | 100 | 57,5 | 3,5 | 1,2 | 1,2 | 1,25 | 10 |

(**Tabelle 2:** Kalibrierlösungen für TMA-Selektive Mikroelektroden)

Der Potentialanstieg pro Dekade TMA⁺-Anstieg betrug durchschnittlich 59,5 ±5,1 mV pro Dekade, die Detektionsgrenze 0,35 ±0,41 mM TMA⁺ (n=31) (siehe Abbildung 5). Die relative Veränderung der Größe des Extrazellulärraumes (ISV) wurde nach folgender Formel berechnet: $\Delta ISV(\%) = 100 \times (([TMA]_{normal}/[TMA]_{hypoxie})-1)$ (Dietzel et al. 1980).

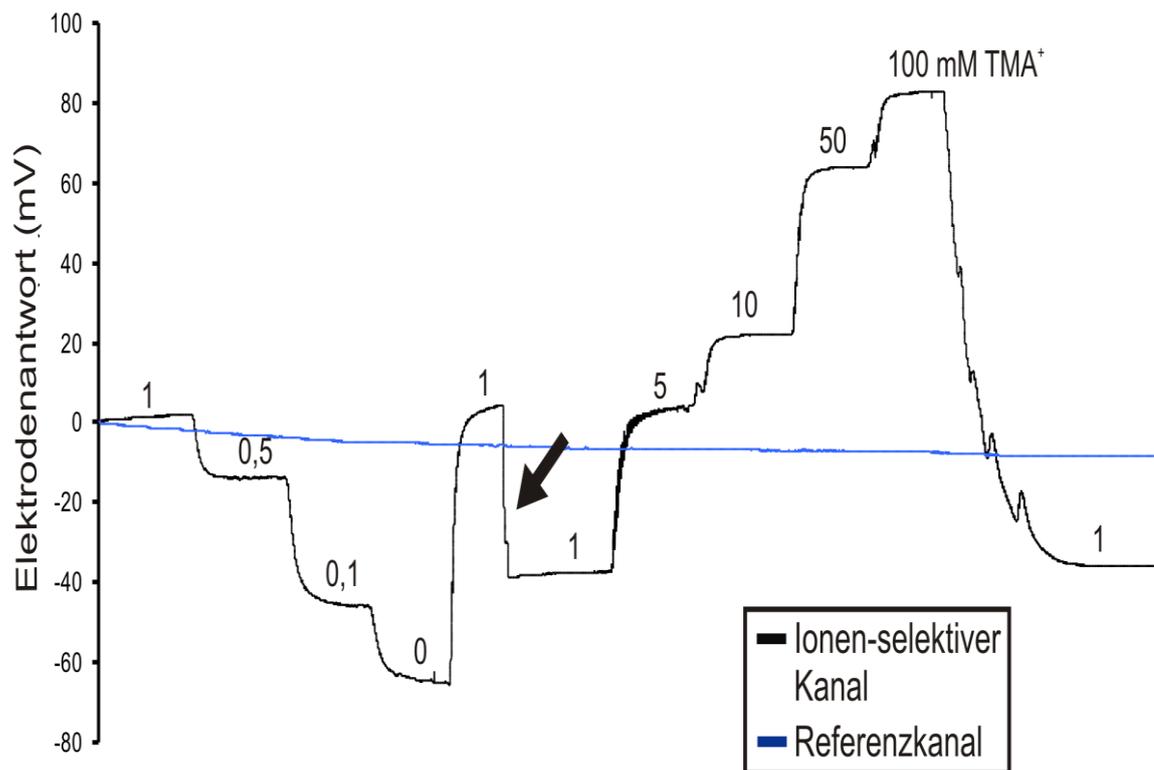


Abbildung 5: Kalibrationskurve vor/nach jeder TMA⁺-Messung. Die Zahlen oberhalb des Ionen-selektiven Kanals geben die Konzentration (in mM) von TMA-Chlorid in der jeweiligen Kalibrierlösung an. Der Pfeil markiert eine manuelle Veränderung des Ionen-selektiven Kanals am Verstärker ohne Konzentrationsänderung um ein Überschreiten des Messbereichs bei hoher [TMA]⁺ zu vermeiden. Auch in dieser Kalibrierung ist keine Änderung im Referenzkanal durch Konzentrationsänderung des TMA⁺ zu beobachten.

2.7. Intrazelluläre Ableitungen

Für die intrazellulären Ableitungen aus CA1-Pyramidenzellen wurden scharfe Mikroelektroden aus dickwandigem Glas (GC 150F-10, Harvard Apparatus, Holliston, USA) gezogen. Diese wurden mit 2 M Kaliumacetat, 5 mM Kaliumchlorid und 10 mM HEPES bei einem pH von 7,4 gefüllt. Diese Elektroden wurden mit Hilfe eines schrittmotorgetriebenen Mikromanipulators (Mini 25, Luigs + Neumann,

Rathingen, Deutschland) langsam an den Hirnschnitt herangeführt und schrittweise in die CA1-Region vorgetrieben, bis ein einzelnes Neuron angestochen wurde. Falls sich das Membranpotential dieses Neurons nach der Punktion bei mindestens -55 mV stabilisierte, wurde die Messung fortgeführt, falls es weiter depolarisierte, wurde die Zelle verworfen und von vorne begonnen. Zur Messung des Eingangswiderstandes wurde alle 10 Sekunden ein hyperpolarisierender Strompuls mit einer Amplitude von 400-600 pA und einer Dauer von 200 ms angelegt. Zur Berechnung wurden immer fünf aufeinander folgende Strompulse gemittelt, sobald eine kontinuierliche Spannung erreicht war. Danach wurde Hypoxie ausgelöst und die Messung des Membranpotentials und des Membranwiderstandes in den verschiedenen Phasen der Spreading Depression fortgeführt.

2.8. Registrierung des intrinsischen optischen Signals (IOS)

Für die optische Messung des Ausbreitungsmusters der Spreading Depression benutzte ich eine CCD-Kamera (Imago QE, PCO Imaging, Kelheim, Deutschland) und ein computergesteuertes Polychrom-II-Beleuchtungssystem (Till Photonics, Gräfelfing, Deutschland). Die zu untersuchenden hippokampalen Gewebeschnitte wurden mit weißem Licht im Winkel von ca. 45° bestrahlt und mittels eines 5x Objektivs (Epiplan, Zeiss, Jena, Deutschland) betrachtet. Alle 2 Sekunden wurde bei 15 ms Belichtungszeit ein Bild mit der CCD-Kamera aufgezeichnet. Zur Verdeutlichung der Lichtreflexion, die während der Spreading Depression zunimmt, wurde von allen Bildern jeweils die Reflexion in Ruhe subtrahiert, das heißt, das erste Bild wurde von der gesamten Serie abgezogen und das Resultat

dann für einen Messbereich von $\pm 20\%$ Helligkeitsänderung in 256 Graustufen angezeigt. Die Quantifizierung der Lichtstärkenänderung erfolgte direkt neben der Elektrode in der CA1-Region der Hirnschnitte im *Stratum radiatum*. Die Ausbreitungsgeschwindigkeit der Spreading Depression wurde ebenfalls durch die Zunahme der Lichtreflexion, beziehungsweise deren voranschreitende Wellenfront (siehe Abbildung 6), ermittelt. Zur Bestimmung der Gesamtgröße des von der HSD betroffenen Gewebegebiets wurden alle Pixel gezählt, deren Helligkeit um $\geq 5\%$ zugenommen hatte. Diese Bildanalysen wurden mit Hilfe der Programme Tillvision 4.0 (Till Photonics, Gräfelfing, Deutschland) und MetaMorph Offline 6.1 (Universal Imaging Corporation, Marlow, Großbritannien) durchgeführt.

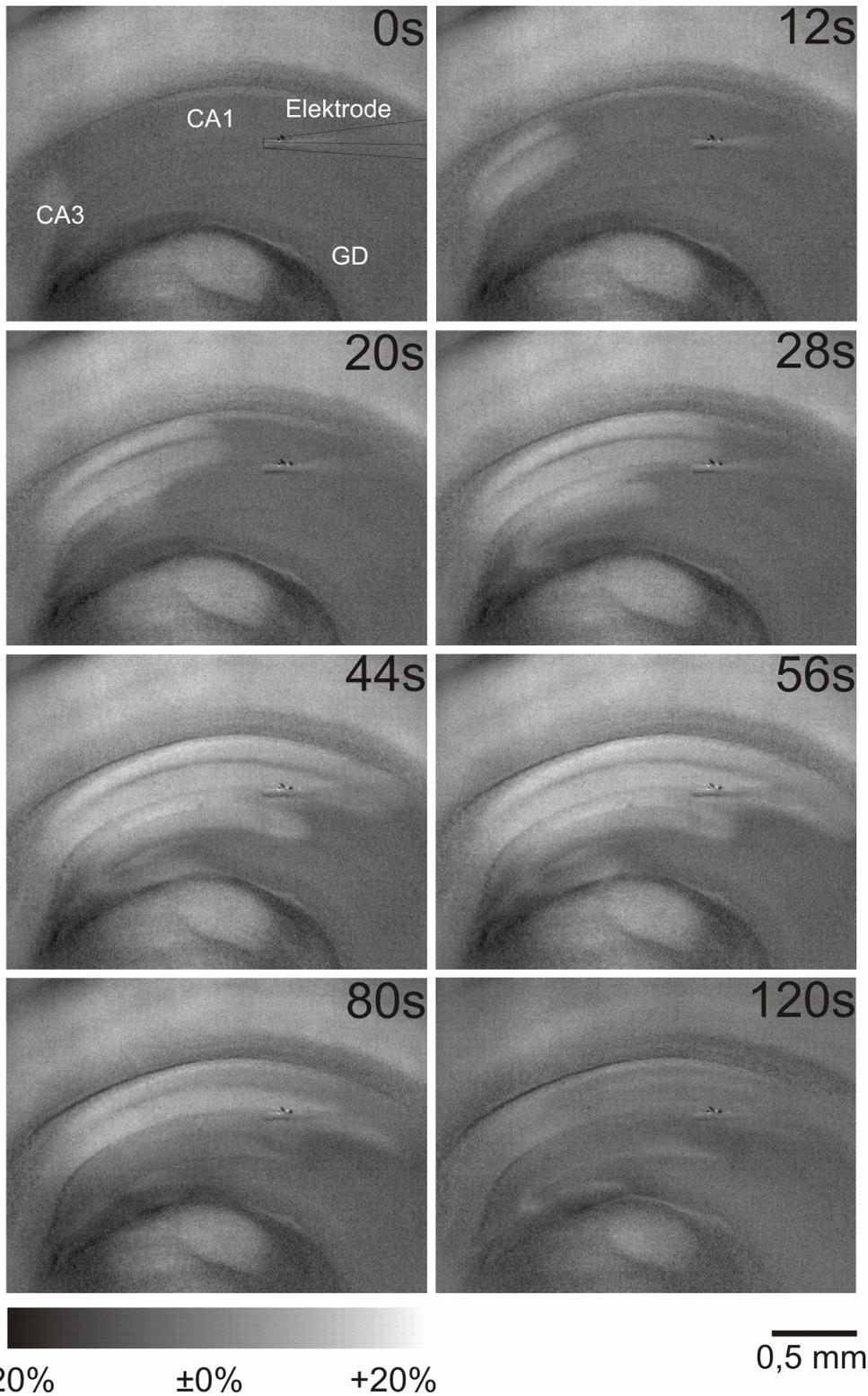


Abbildung 6: Das Intrinsische Optische Signal (IOS) einer Spreading depression. Zunächst nimmt die Lichtstreuung im Hippokampus zu, das Signal wird heller. Nach der Maximalausdehnung verblasst das Signal und die Helligkeit nimmt wieder das Ausgangsniveau an (CA1/3: *Cornu ammonis* 1/3, GD: *Gyrus dentatus*).

3. Ergebnisse

3.1. Vergleich der Hypoxieempfindlichkeit von WT- und *Mecp2*^{-y}-Mäusen

Rekurrierende Atemstörungen mit passageren Apnoephasen führen zu intermittierender systemischer Hypoxie der *Mecp2*^{-y}-Mäuse. Eine etwaige systemische Adaptation an chronisch niedrige Sauerstofflevel im Körper der *Mecp2*^{-y}-Mäuse wurde mit Hilfe des Hämatokrit untersucht. In der Tat fand sich hier ein signifikanter Unterschied: Bei den *Mecp2*^{-y}-Männchen war dieser mit $49,8 \pm 2,3$ (n=8) deutlich höher als bei WT-Männchen ($44,1 \pm 1,4$; n=7; P=0.0001), was bestätigt, dass diese Tiere wiederholte systemische Hypoxien erleiden und versuchen, sich daran zu adaptieren (siehe Abbildung 7).

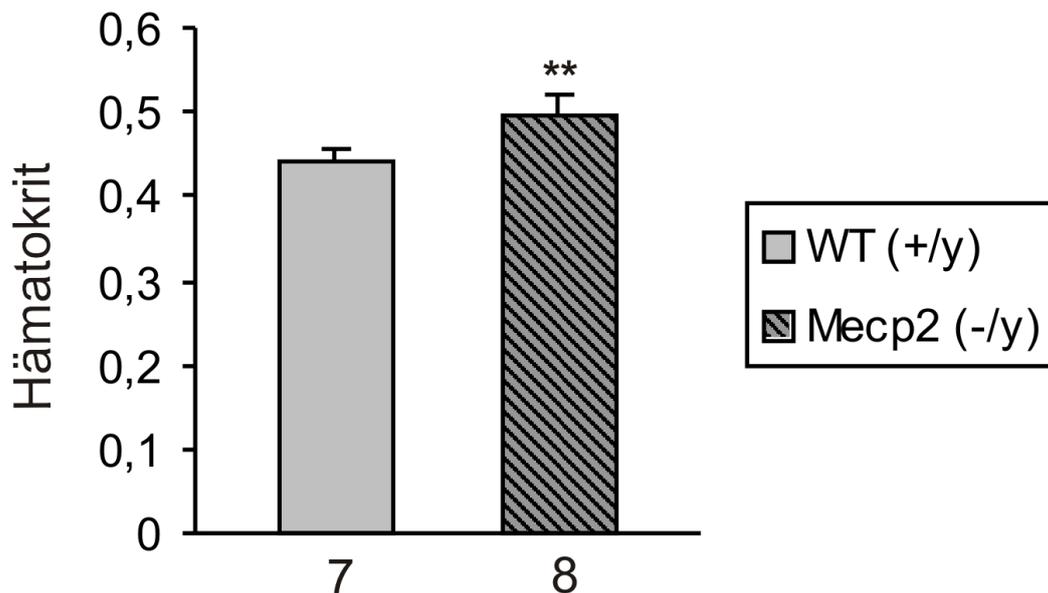


Abbildung 7: Der Hämatokrit ist bei *Mecp2*^{-y}-Männchen höher als bei Wildtyp-Männchen. Dies weist auf eine systemische Adaptation der *Mecp2*^{-y}-Mäuse auf hypoxische Episoden hin.

Um die Hypoxieempfindlichkeit der *Mecp2^{-/-}*-Mäuse weiter mit der der Wildtypiere zu vergleichen wurden sowohl elektrische als auch optische Veränderungen gleichzeitig in akuten hippocampalen Gewebeschnitten gemessen. Als ein Parameter für die Hypoxieempfindlichkeit wurde vor allem die hypoxieinduzierte Spreading Depression untersucht. Bei den Wildtypen trat die hypoxieinduzierte Spreading Depression durchschnittlich nach $170 \pm 53,9$ s O₂ Entzug auf.

Der Indikator für das Auftreten der HSD, der plötzliche Abfall des extrazellulären DC-Potentials, zeigte eine Amplitude von $-15,6 \pm 2,5$ mV, die HSD dauerte bei Messung über den Zeitraum des halben Amplitudenlevels durchschnittlich $50,9 \pm 13,9$ s (n=14). Bei den *Mecp2^{-/-}*-Tieren kam es schon nach $128,9 \pm 28,3$ s zu einer hypoxieinduzierten Spreading Depression (n=14). Das Auftreten der HSD erfolgte somit signifikant früher, um 24% verglichen mit WT-Tieren (p=0.0179). Die Amplitude der DC-Potentialnegativierung war mit $15,3 \pm 2,4$ mV nicht zu unterscheiden von dem der Wildtypen. Auch die Dauer der HSD unterschied sich mit $43,0 \pm 7,1$ s nicht signifikant von der Kontrollgruppe (siehe Abbildung 8).

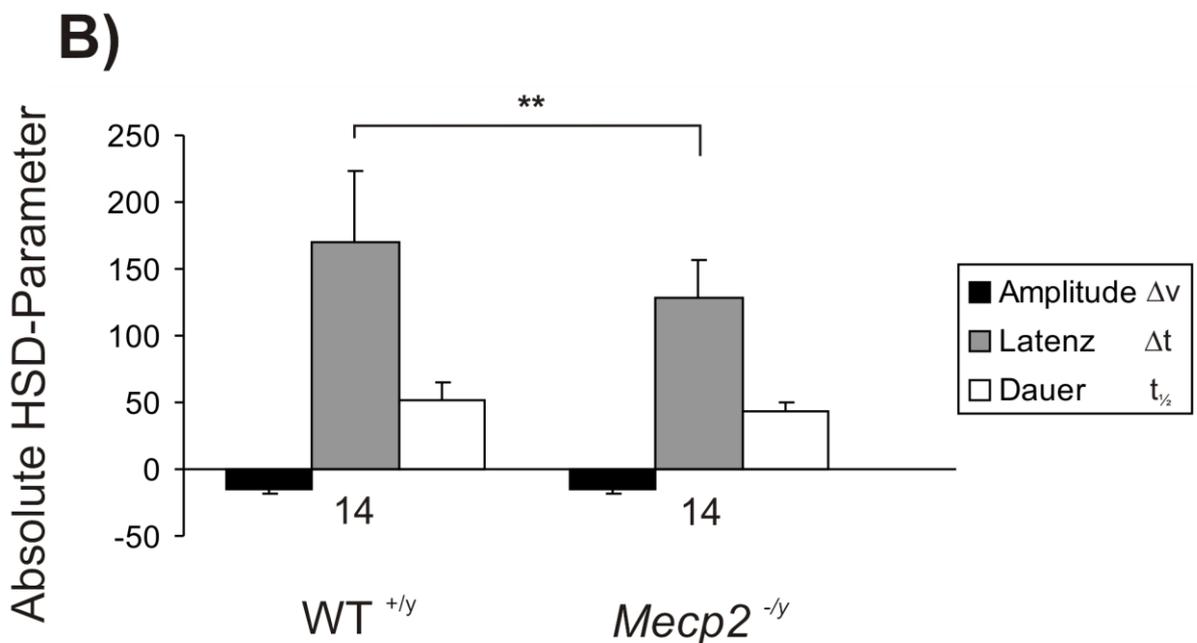
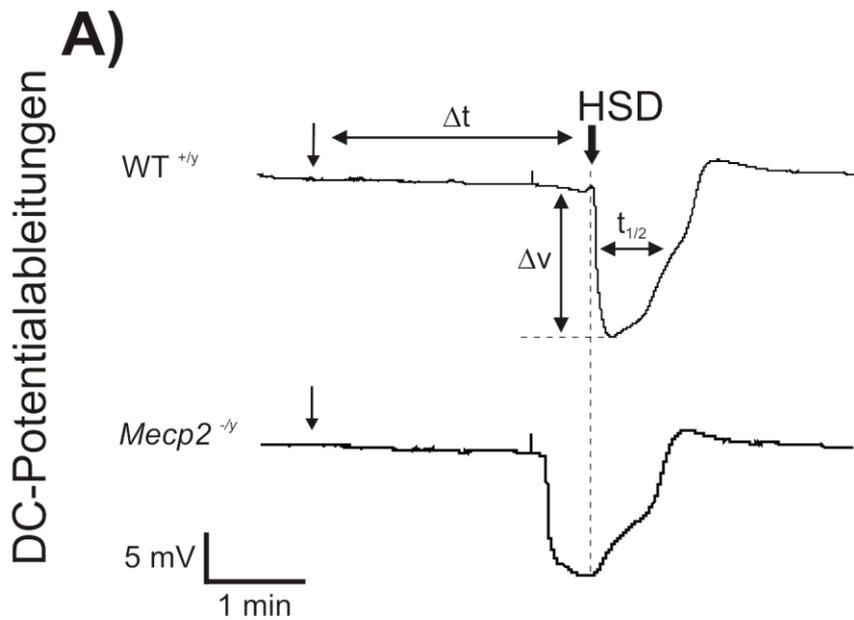


Abbildung 8: A) DC-Potentialableitungen von WT^{+/y}- und Mecp2^{-/y}-Hirnschnitten unter schwerer Hypoxie. Die gemessenen Parameter der HSD - Amplitude (Δv), Latenz (Δt) und Dauer ($t_{1/2}$) - sind in Diagramm **B)** zusammenfassend dargestellt. Die Latenz vom Einleiten der Hypoxie bis zum Auftreten der HSD ist bei Mecp2^{-/y}-Tieren deutlich geringer als bei WT-Männchen. Amplitude und Dauer der HSD sind hingegen nicht verschieden.

Um auch mögliche Adaptationseffekte bei mehrfacher Hypoxie zu testen, wurde dreimal nach je 20 Minuten am selben Hirnschnitt wiederholt die Sauerstoffversorgung unterbrochen. Sowohl im WT, als auch bei *Mecp2^{-y}*-Tieren war die HSD mehrfach nacheinander am selben Hirnschnitt auslösbar. Als Test auf Effekte wiederholter Hypoxie konnte zwar das verfrühte Auftreten der HSD bei *Mecp2^{-y}*-Tieren genauso beobachtet werden. Im Vergleich der 2. und 3. HSD mit der 1. HSD konnten zu den Hirnschnitten der jeweiligen Genotypen jedoch keine weiteren Veränderungen der charakteristischen HSD-Parameter mehr festgestellt werden. Weder Amplitude und Latenz, noch die Dauer waren signifikant verschieden zwischen 1. und 2./3. HSD (n=13, siehe Abbildung 9).

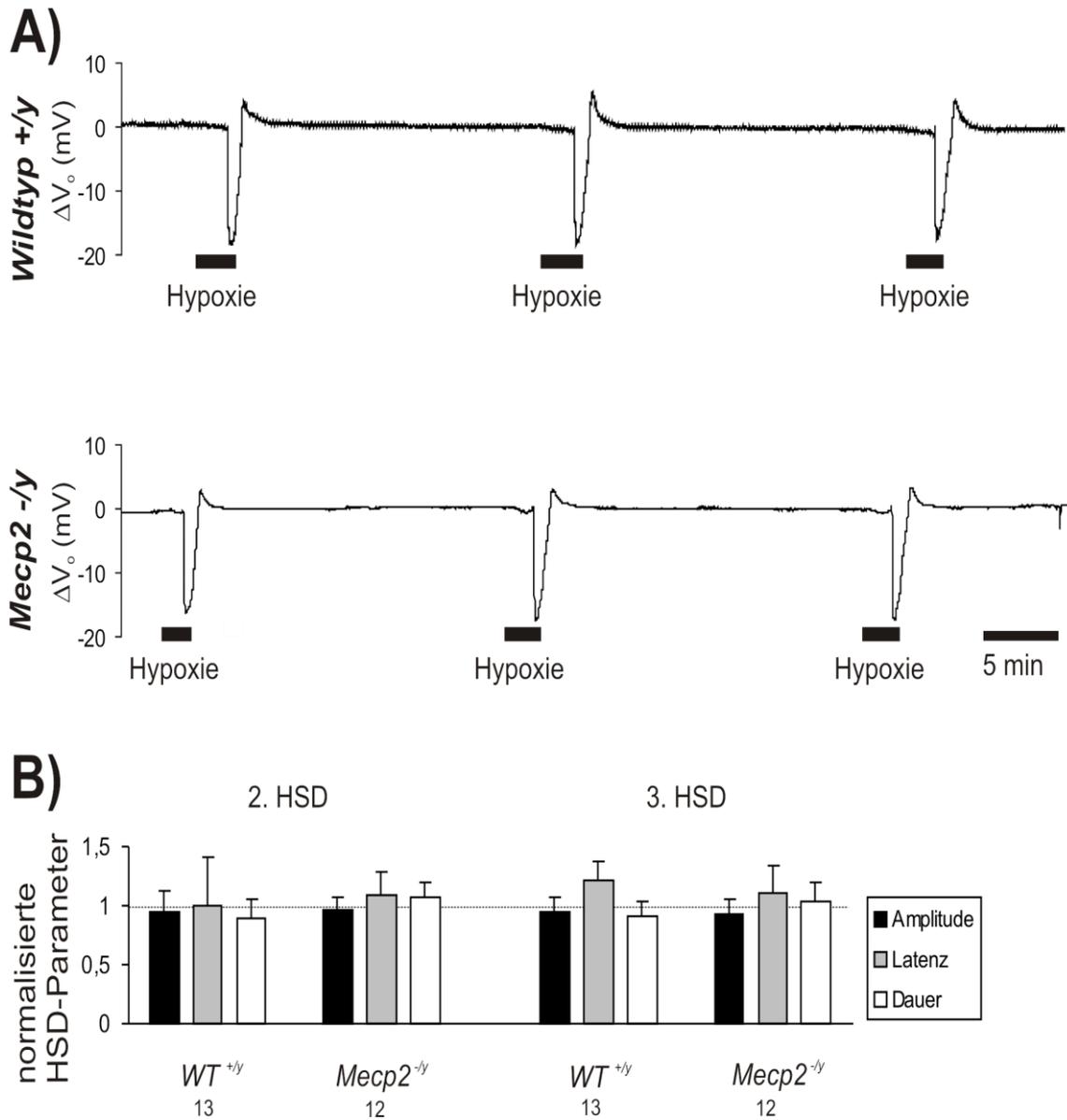


Abbildung 9: A) DC-Potentialableitungen von $WT^{+/y}$ - und $Mecp2^{-/y}$ -Hirnschnitten. Bei wiederholter Hypoxie gab es keine Unterschiede in Amplitude, Latenz und Dauer. Das Diagramm **B)** zeigt das Verhältnis von zweiter und dritter HSD jeweils bezogen auf die erste HSD bei WT - und $Mecp2^{-/y}$ -Mäusen.

3.2. Veränderungen der interstitiellen $[K^+]_o$

Da als Grund für das verfrühte Auftreten der hypoxiebedingten Spreading Depression unter anderem auch eine Störung des Kaliumhaushalts in Frage kam und Kalium eine Schlüsselrolle bei der Entstehung und der Ausbreitung der Spreading Depression spielt (Kager et al. 2002; Van Harreveld 1978), untersuchte ich die Änderungen der Kaliumkonzentration im Extrazellulärraum $[K^+]_o$ mit Hilfe Ionen-selektiver Mikroelektroden. Diese Messungen wurden mit DC-Potentialableitungen kombiniert (siehe Material und Methoden). Während der Hypoxie zeigte $[K^+]_o$ ein typisches Verlaufsmuster (siehe Abbildung 10): Zu Beginn der Hypoxie noch vor dem Auftreten der Spreading Depression kam es zu einem langsamen Anstieg von $[K^+]_o$ auf einen sogenannten Schwellenwert. Gleichzeitig mit Einsetzen des extrazellulären DC-Potentialabfalls und der Spreading Depression stieg $[K^+]_o$ massiv an und erreichte einen Gipfel. In der Erholungsphase der Gewebeschnitte nach erneuter Reoxygenierung fiel der $[K^+]_o$ -Wert für kurze Zeit unter das normoxische Ausgangsniveau ab und erreichte hier sein Minimum. Innerhalb der nachfolgenden 20 Minuten Erholung wurde dann jedoch der $[K^+]_o$ Ausgangswert wieder erreicht.

Ausgewertet wurden die 3 markanten Punkte Schwellenwert, Gipfel und Minimum, welche zwischen Wildtyp und *Mecp2^{-y}*-Tieren verglichen wurden. Außerdem wurde die Geschwindigkeit des linearen $[K^+]_o$ -Anstiegs vor der HSD bestimmt (siehe Abbildung 10).

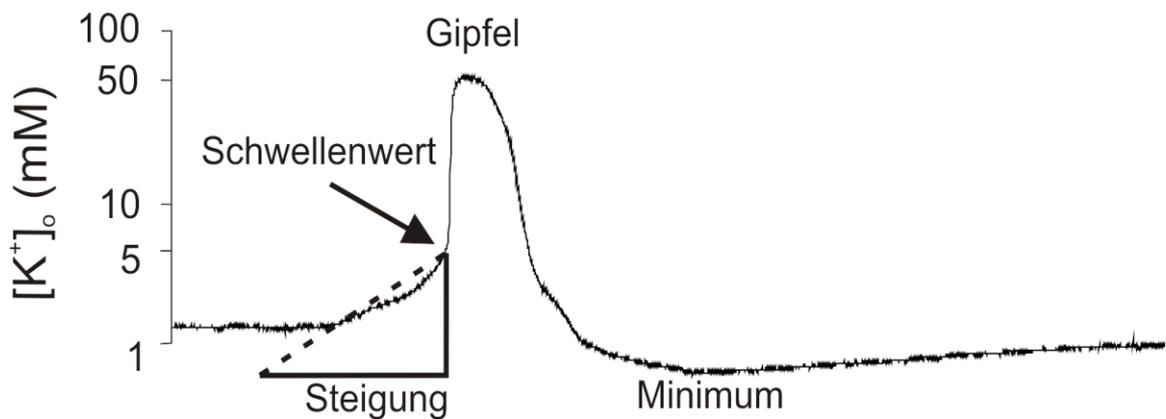


Abbildung 10: Vergrößerte Darstellung der $[K^+]_o$ zur Erläuterung der markanten Punkte während der HSD: Noch vor Auftreten der HSD erfolgt ein langsamer Anstieg bis auf einen Schwellenwert, die Steigung bis zum Schwellenwert wird separat berechnet. Auf dem Gipfel der HSD ist auch der $[K^+]_o$ -Wert am höchsten. Nach der HSD fällt der $[K^+]_o$ -Wert unter das normoxische Ausgangsniveau auf ein Minimum, welches sich langsam wieder erholt.

Bei den Hirnschnitten der Wildtyp-Männchen stieg der $[K^+]_o$ -Wert zu Beginn der Hypoxie langsam um $5,8 \pm 1,6$ mM pro Minute auf einen Schwellenwert von durchschnittlich $9,3 \pm 4,9$ mM an ($n=13$). Mit dem Auftreten der Spreading Depression kletterte $[K^+]_o$ auf Werte von $73,7 \pm 17,5$ mM. Nach Wiedereinsetzen der Oxygenierung sank $[K^+]_o$ langsam vom Gipfel auf ein Minimum von $2,1 \pm 0,5$ mM bevor es wieder das Niveau vor der Hypoxie erreichte. Auch bei wiederholter Hypoxie nach 20 Minuten Erholung änderten sich die Werte nicht signifikant, weder die Zeit bis zum Auftreten der HSD, noch die Dauer oder die Amplitude des extrazellulären Spannungsabfalls zeigten statistisch signifikante Unterschiede zur ersten HSD (siehe Abbildung 11). Im Vergleich von *Mecp2^{-y}*-Tieren mit Kontrolltieren waren der initiale Schwellenwert mit $8,2 \pm 3,6$ mM K^+ und die Steigungsgeschwindigkeit mit $5,6 \pm 1,2$ mM K^+ pro Minute nicht zu unterscheiden.

Der Maximalwert von $[K^+]_o$ war jedoch auf dem Gipfel der HSD mit $52,3 \pm 29,5$ mM signifikant geringer als bei Wildtypen ($p=0,0358$), das Minimum während der Erholungsphase war bei $2,1 \pm 0,5$ mM wiederum nicht signifikant verschieden ($n=12$). Auch bei einer 2. hypoxieinduzierten Spreading Depression war der $[K^+]_o$ -Wert im Maximum deutlich geringer ($P=0.0431$). Erst bei der 3. HSD war kein Unterschied mehr festzustellen (siehe Abbildung 11).

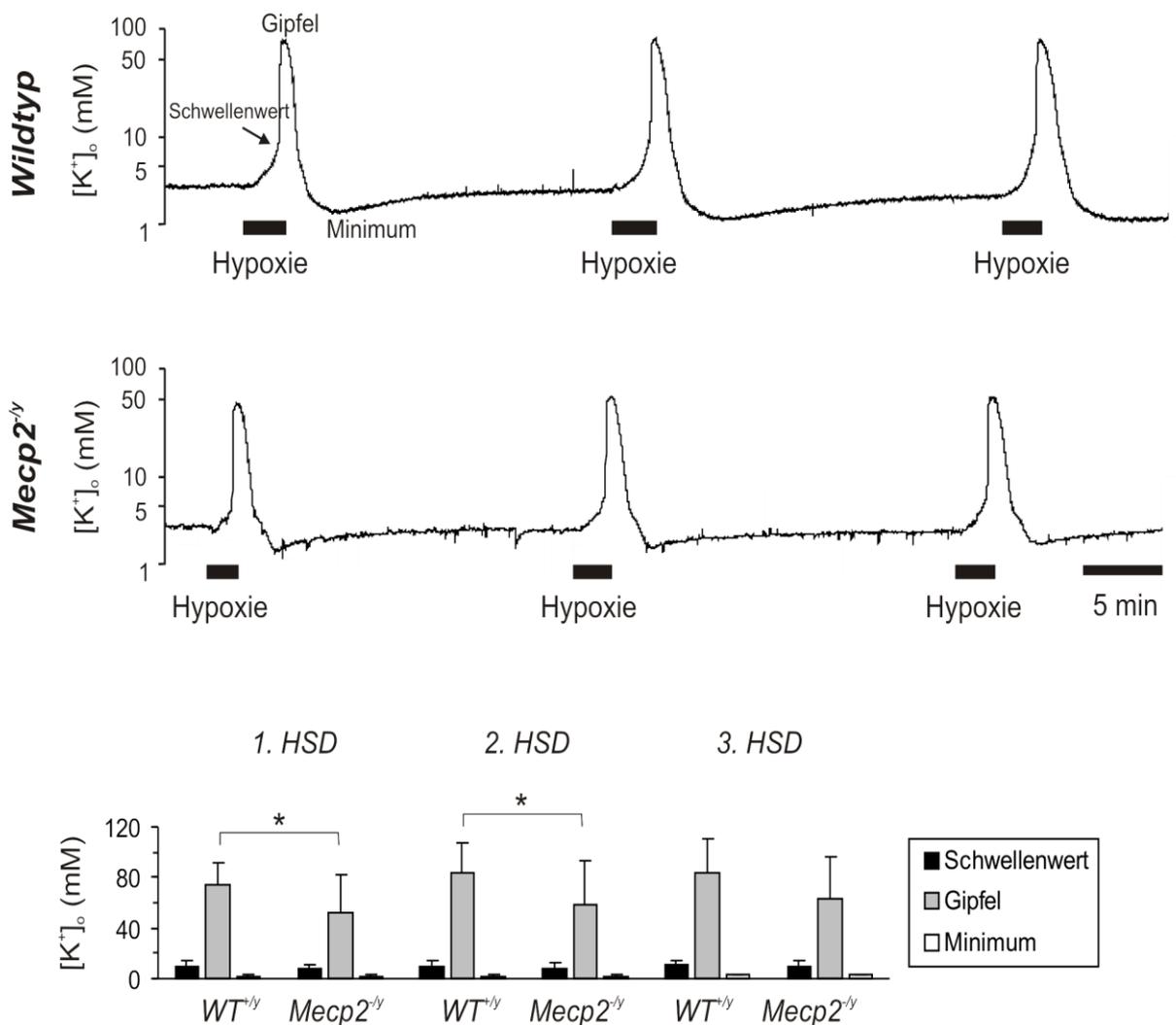


Abbildung 11: Änderungen der interstitiellen $[K^+]_o$ im Vergleich WT zu *Mecp2*^{-/-}. Die extrazellulären K^+ -Werte auf dem Gipfel der Spreading Depression sind bei *Mecp2*^{-/-}-Tieren in der 1. und 2. HSD deutlich geringer als im Wildtyp.

3.3. Zellvolumenveränderungen während HSD

Um den reduzierten $[K^+]_o$ -Werten im Maximum der HSD auf den Grund zu gehen, gab es nun verschiedene Ansätze. Zum einen hätte ein vergrößerter interstitieller Raum mit geringerer Neuronendichte und/oder kleineren Neuronen auch Auswirkungen auf die Ionenströme im Zellverbund und vor allem auf die Veränderungen des extrazellulären Ionenmilieus. Denkbar waren auch Veränderungen die sich nur auf die Zellschwellung während der HSD beschränkten. Bei RETT-Mäusen ist schon seit Längerem bekannt, dass sie kleinere Gehirne besitzen, in dem Mausmodell, welches ich benutzte beträgt die Hirnvolumenreduktion bis zu 13% (Belichenko NP et al. 2008). Auch der Hippokampus ist bei diesen Tieren um 17,7% kleiner. Die Zellgröße der Neurone ist um 15-25% bis zu 43% kleiner, je nach untersuchter Region und Studie (Chen RZ et al. 2001; Fischer et al. 2009). Die Packungsdichte der Neurone ist jedoch deutlich höher als bei Wildtypen, bis zu 71,6%. Insgesamt ergeben sich somit keine offensichtlichen Unterschiede in der Größe des Extrazellulärspaces unter Normalbedingungen. Um jedoch herauszufinden, ob der Extrazellulärraum der Hippokampusformation der *Mecp2^{-y}*-Tiere sich unter Hypoxie anders verhält als im Wildtyp, wurden TMA-selektive Mikroelektroden genutzt, wofür 1,5 mM Tetramethylammoniumchlorid zur ACSF zugesetzt wurde (Indikator Verdünnungsmethode).

Zu Beginn der Hypoxie kam es zu einem langsamen Anstieg der $[TMA]_o$ auf einen Schwellenwert von durchschnittlich 1,75 mM, was einer Verkleinerung des Extrazellulärspaces um $12,6 \pm 10,7\%$ entspricht (siehe Abbildung 12). Das

Maximum der Zellschwellung trat in beiden Genotypen kurz nach Beginn der HSD auf. Die TMA⁺-Konzentrationen erreichten auf dem Gipfel bei Wildtyptieren $3,40 \pm 1,7$ mM und bei *Mecp2*^{-/-}-Tieren $3,19 \pm 0,8$ mM. Im Mittel betrug somit die Größenreduktion des ISV bei Wildtypen und *Mecp2*^{-/-}-Tieren $50,3 \pm 13,7$ % (n=19) und $50,2 \pm 12,3$ % (n=12). In der Reoxygenierungsphase kam es offenbar durch ein Überschießen der Zellvolumenregulation oder einem Verlust des TMA-Chlorids in die Nährlösung zu einer kurzzeitigen Unterschreitung des normoxischen Ausgangswertes. Bei TMA⁺-Konzentrationen von $1,27 \pm 0,2$ mM und $1,29 \pm 0,2$ mM (WT und *Mecp2*^{-/-}) nahm das interstitielle Volumen vorübergehend um $20,8 \pm 18,2$ % und $18,8 \pm 19,6$ % (WT und *Mecp2*^{-/-}) ab. Offensichtlich sind jedoch trotz der geringeren Neuronengröße und der vermehrten Dichte bei *Mecp2*^{-/-}-Tieren keine statistisch signifikanten Unterschiede in der relativen Zellschwellung unter Hypoxie zu erkennen. Aussagen über das absolute interstitielle Volumen sind auf Grund der erhobenen Meßdaten nicht möglich. Hierzu wären weitere umfangreiche und methodisch äußerst anspruchsvolle Versuchsreihen basierend auf Messungen der TMA-Diffusionsprofile im Gewebe notwendig gewesen, die den Umfang dieser Arbeit bei weitem überschritten hätten.

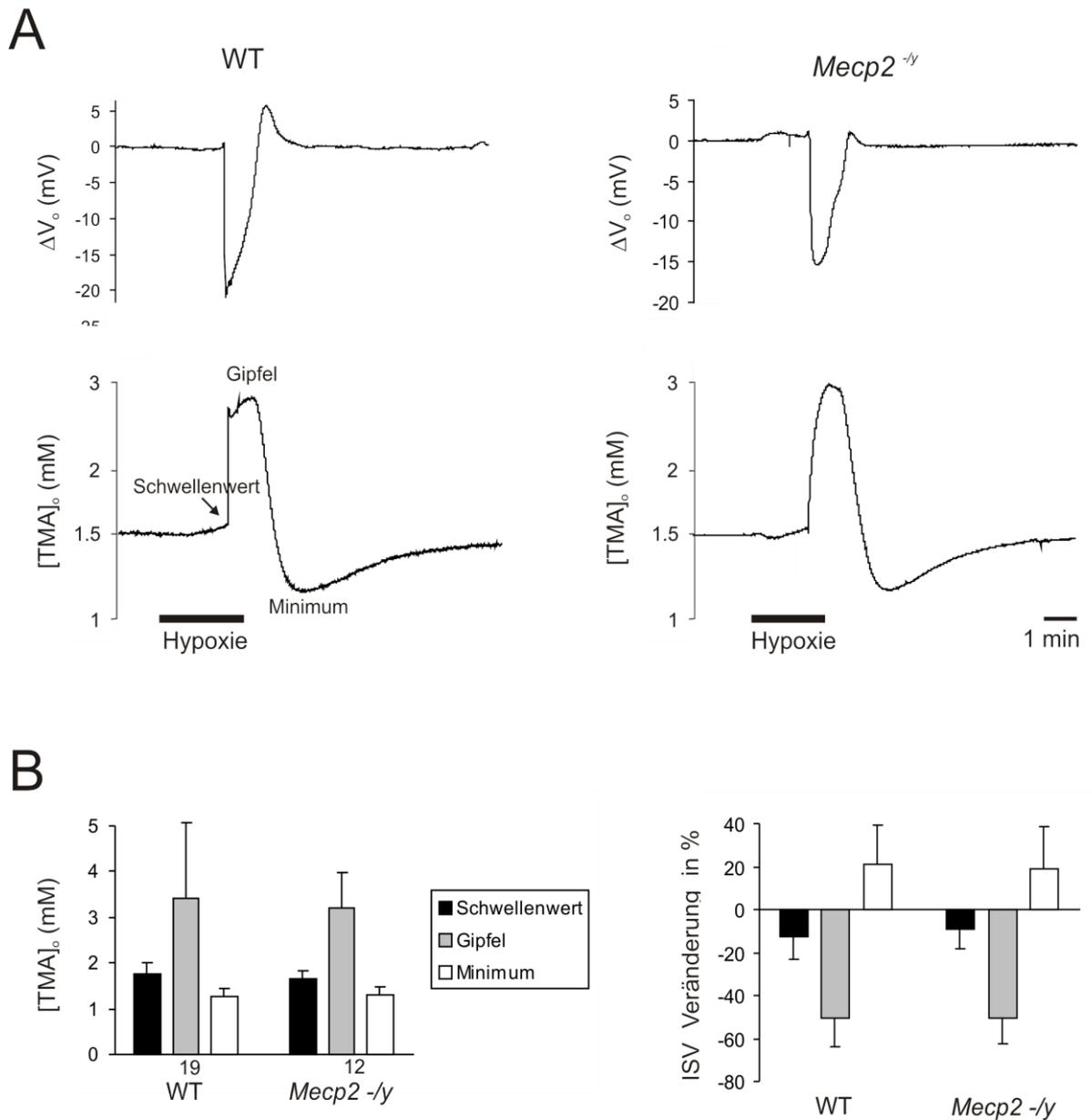


Abbildung 12: Interstitielle relative Volumenänderungen während der HSD: **(A)** Beispielregistrierungen der TMA-Messung von WT- und *Mecp2*^{-/-}-Tieren **(B)** statistischer Vergleich der drei markanten Punkte der TMA-Konzentration und der entsprechenden Interstitiellen Volumenänderung (ISV) während der HSD-Messung.

3.4. Neuronale Membranpotentiale während HSD

Um mögliche Ursachen für die veränderten $[K^+]_o$ -Level zu finden wurden intrazelluläre Ableitungen der Pyramidenzellen in der CA1-Region mit Hilfe scharfer Elektroden durchgeführt. Eine mögliche Erklärung für erniedrigte $[K^+]_o$ -Level während der HSD wäre nämlich eine unvollständige Depolarisation der Neuronen, welche dann weniger K^+ ausschütten würden.

Das durchschnittliche Ruhemembranpotential und der Eingangswiderstand betragen in Wildtyp-Tieren $-68,3 \pm 10,3$ mV; $25,3 \pm 8,3$ M Ω ; n=14 und waren zu *Mecp2^{-/-}*-Tieren ($-66,2 \pm 11,6$ mV; $27,7 \pm 9,4$ M Ω ; n=18) nicht verschieden (siehe Abbildung 13). Unter schwerer Hypoxie zeigten die CA1-Pyramidenzellen einen charakteristischen Verlauf des Potentials und des Erregungswiderstandes: Zu Beginn der Hypoxie kam es bei WT-Tieren zu einer transienten initialen Hyperpolarisation von $-3,2 \pm 4,3$ mV der Eingangswiderstand sank um $43,0 \pm 16,2\%$. Die Hyperpolarisation hielt jedoch nicht lange an, allmählich ging sie in eine langsame Depolarisation bis zu einem Schwellenwert von $-44,8 \pm 12,8$ mV über. Mit Beginn der Spreading Depression trat eine plötzliche Depolarisation bis auf $-18,4 \pm 4,8$ mV auf, gefolgt von einer weiteren langsamen Depolarisation auf einen finalen Gipfel von $-10,7 \pm 6,7$ mV. In der Reoxygenierungsphase wurde die intrazelluläre Elektrode meist durch die Zellschwellung verschoben oder rutschte aus der Zelle heraus, die Ableitungen wurden meistens in dieser Zeit instabil und brachen schließlich ganz ab (siehe Abbildung 12A *Mecp2^{-/-}*). Somit waren über die vollständige Erholungsphase keine ausreichende Datenmenge vorhanden.

In *Mecp2^{-y}*-Tieren war die initiale Hyperpolarisation vergleichbar mit der der Wildtypiere, der Eingangswiderstand sank jedoch weniger deutlich ab, nur um $27,9 \pm 15,4\%$ ($p=0,029$). Das Schwellenpotential, der Spitzenwert und der Verlust des Widerstandes während der HSD unterschieden sich bei *Mecp2^{-y}* nicht von WT-Tieren. Die massive neuronale Depolarisation am Gipfel der HSD war jedoch auch in *Mecp2^{-y}*-Tieren komplett.

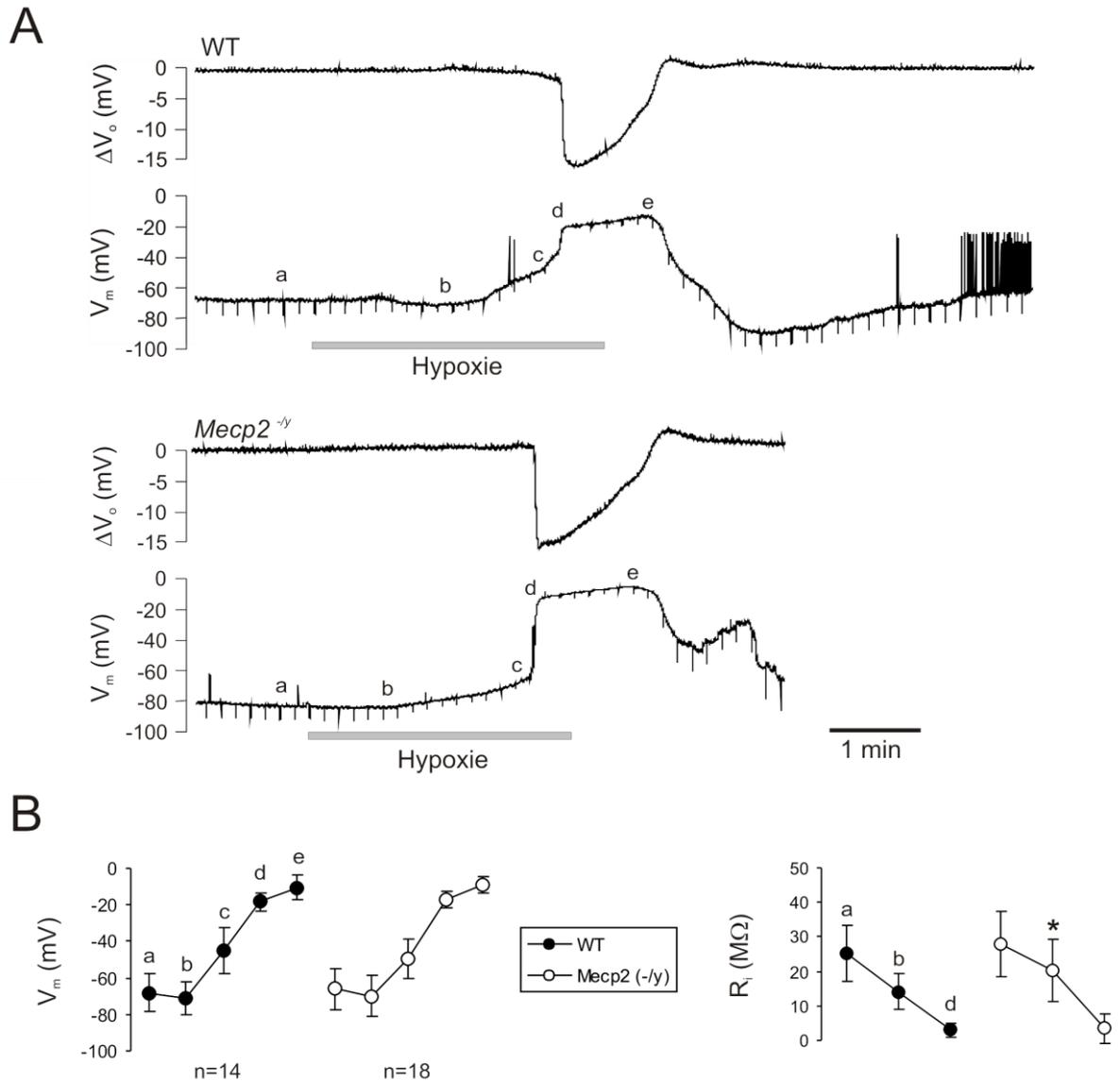


Abbildung 13: Neuronale Depolarisationen während der HSD: **A)** Extrazelluläre DC-Potentialableitung (ΔV_o) und intrazelluläre Messung des Membranpotentials (V_m); **B)** Diagramm der verschiedenen Phasen der HSD; Vergleich von Membranpotential und Widerstand: Während der initialen hypoxischen Hyperpolarisation fällt der Eingangswiderstand im $Mecp2^{-/-}$ -Tier weniger ab.

a: Ruhemembranpotential, b: initiale hypoxische Hyperpolarisation, c: Schwellenwert, d: früher Gipfel, e: absoluter Gipfel

3.5. Ausbreitungsmuster der HSD im Hippokampus

Die zusätzlich zu den elektrischen durchgeführten optischen Messungen beruhen auf der Zunahme der Lichtstreuung innerhalb des Hirngewebes während einer Spreading Depression. Diese intrinsischen optischen Signale (IOS) treten gleichzeitig mit dem plötzlichen Spannungsabfall des extrazellulären DC-Potentials auf (Aitken et al. 1998). In den dendritischen Schichten (*Stratum radiatum*, *Stratum oriens*) war die Zunahme des IOS am größten, während das *Stratum pyramidale* deutlich weniger Signalanstieg zeigte (siehe Abbildung 6). Die Ausbreitung des Signals erfolgte vor allem in die CA1-Region und den *Gyrus dentatus*, wobei die CA3-Region jedoch grundsätzlich ausgespart wurde.

Die im Gesamtbild auch von der HSD betroffenen Bereiche im Neokortex, in den Basalganglien und dem Dienzephalon sollten für die weiteren detaillierten Betrachtungen des Hippokampus keine Rolle spielen. Quantifiziert wurden die Änderungen der Lichtstreuung in einem kleinen Bereich in der CA1-Region im *Stratum radiatum* direkt neben der Messelektrode. Hierbei zeigten sich jedoch im Vergleich von Wildtypen mit einer Zunahme von $19\% \pm 9\%$ (n=14) und *Mecp2^{-y}*-Tieren mit $22,9\% \pm 10,9\%$ (n=14) Intensitätssteigerung kein signifikanter Unterschied (siehe Abbildung 14). Der Bereich der durch die Spreading Depression betroffenen Anteile des gesamten Hippokampus betrug bei beiden Genotypen im Mittelwert $53,8 \pm 9,6\%$ bzw. $55,3 \pm 14,9\%$ und unterschied sich ebenfalls nicht signifikant. Auch die Ausbreitungsgeschwindigkeit der Hypoxischen Spreading Depression bei Wildtypen war mit $6,2 \pm 2,5$ mm/min nicht verschieden zu der bei *Mecp2^{-y}*-Tieren ($6,2 \pm 1,8$ mm/min, siehe Abbildung 14).

Auch bei wiederholter Hypoxie änderten sich die Zunahme der Lichtintensität und der zeitliche Verlauf nicht. Es gab weder einen Unterschied in der Ausbreitungsgeschwindigkeit noch im betroffenen Areal beim Vergleich der beiden Genotypen (n=12).

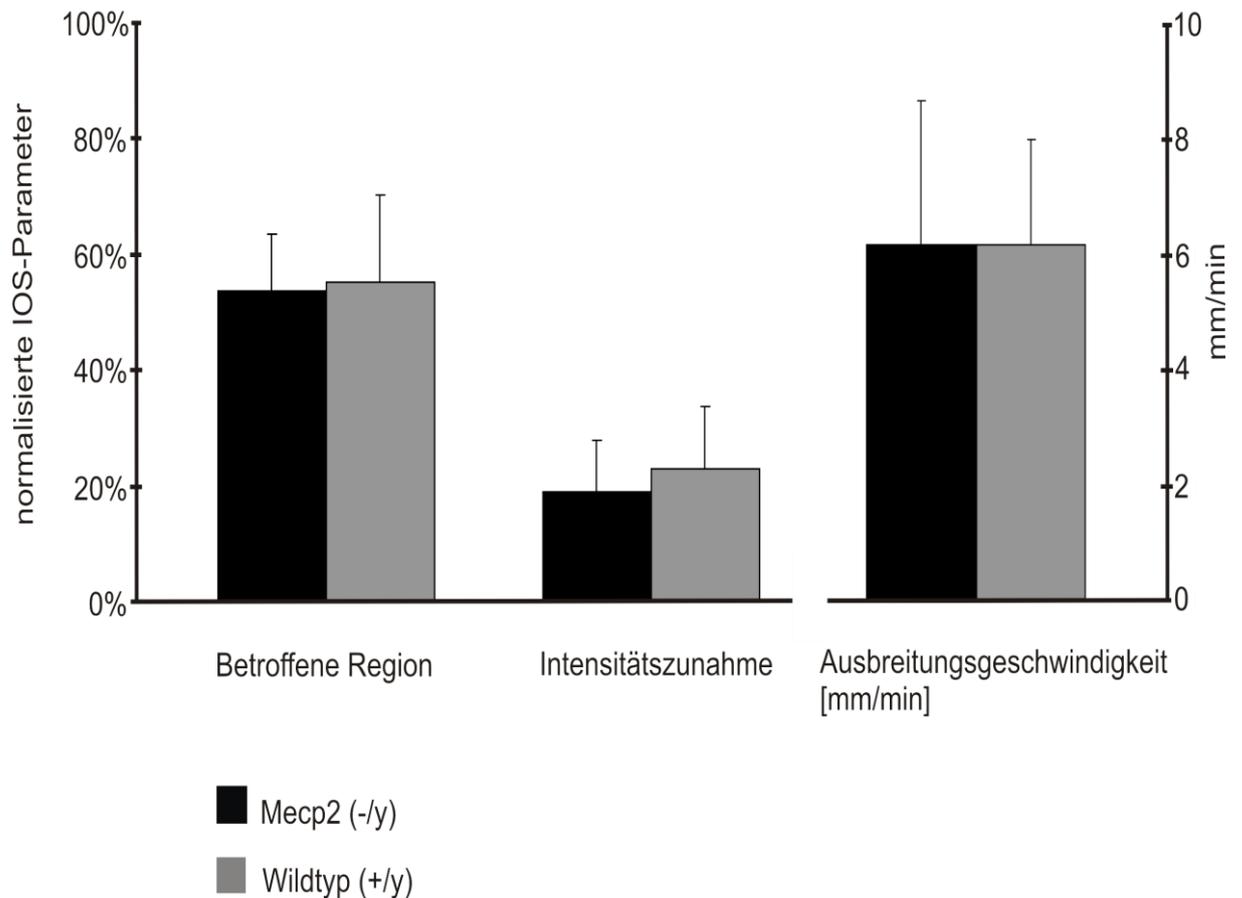


Abbildung 14: Das von der HSD betroffene Areal, die Intensität der Lichtstreuung und die Ausbreitungsgeschwindigkeit der Wellenfront unterscheiden sich nicht signifikant bei Wildtyp und Knockout-Hirnschnitten (jeweils n=14).

4. Diskussion

Das RETT-Syndrom beeinflusst als neuronale Entwicklungsstörung cortikale Funktionen und führt zu Atemstörungen und –aussetzern mit dadurch auftretenden Phasen von systemischer Hypoxie. In dieser Arbeit untersuchte ich ob die neuronale Funktion der hochgradig hypoxieempfindlichen Region des Hippokampus durch wiederholte systemische Hypoxie beeinträchtigt wird oder ob hier Anpassungen im Sinne eines “pre-conditioning” zu finden sind. Der erhöhte Hämatokrit bei *Mecp2^{-/-}*-Tieren bestätigt bereits zweifelsfrei, dass eine systemische Adaptation an diese Hypoxien stattfindet. Die elektrophysiologische Analyse zeigt eindeutig, dass der Hippokampus bei RETT-Mäusen deutlich empfindlicher für Sauerstoffmangel ist als im Wildtyp. Zusätzliche Untersuchungen, die parallel zu den Experimenten dieser Dissertation stattfanden, zeigten auch eine erhöhte HIF1 α -Expression (Hypoxieinduzierter Faktor 1 α) in allen Teilen des *Mecp2^{-/-}*-Gehirns, dies ist ein Hinweis darauf, dass sich die Hypoxieempfindlichkeit nicht nur auf den Hippokampus beschränkt, sondern sich auch auf weitere Bereiche des *Mecp2^{-/-}*-Gehirns erstreckt (Fischer et al. 2009).

Als eine der möglichen Ursachen für diese erhöhte Hypoxieempfindlichkeit deuten die Messungen der $[K^+]_o$ -Veränderungen und die V_m -Ableitungen (intrazelluläre Ableitungen) auf eine gestörte Funktion von Kaliumkanälen im RETT-Syndrom hin.

Die hypoxieinduzierte Spreading Depression trat in *Mecp2^{-/-}*-Tieren signifikant früher auf, wie anhand des eher einsetzenden DC-Potentialabfalls bewiesen werden konnte. Dies macht eine erhöhte Hypoxieempfindlichkeit der *Mecp2^{-/-}*-

Tiere deutlich, da sie das Membranpotential der Neurone und Gliazellen bei O₂-Mangel nicht so lange aufrecht halten können wie die Wildtyptiere. Als Folge kommt es bei schwerer Hypoxie somit insgesamt früher zu einem neuronalen Funktionsverlust. Der Ablauf und die Charakteristika der Spreading Depression selbst waren außer dem verfrühten Auftreten bei beiden Genotypen ähnlich, es kam zu einer kompletten Depolarisation der CA1-Pyramidenzellen und auch die posthypoxische Erholungsphase lief gleich ab. Auch das wiederholte Auslösen einer HSD zeigte keine weiteren Auffälligkeiten bei Hirnschnitten von *Mecp2^{-/-}*-Tieren. Die optischen Messungen der Lichtstreuung wiesen nicht auf statistisch signifikante Unterschiede in der räumlichen Ausdehnung des betroffenen Areals des Hippokampus, der Ausbreitungsgeschwindigkeit oder der Intensität der Änderung der Lichtstreuung und damit der Stärke der HSD hin.

Trotz des verfrühten Auftretens der Spreading Depression zeigten weiterführende Arbeiten, die auch die Synapsenfunktion untersuchten, dass der Zeitverlauf des Funktionsverlusts der Synapsen während Hypoxie und die Erholung nach Reoxygenierung in Wildtyp und *Mecp2^{-/-}* nicht unterschiedlich waren (Fischer et al. 2009). Somit kann wohl ein vermehrter neuronaler Schaden bei *Mecp2^{-/-}*-Hirnschnitten durch kurze Hypoxieperioden, wie ich sie auslöste, nicht angenommen werden, zumindest in der aktuellen Versuchskonfiguration und der relativ kurzen Nachbeobachtungszeit. Weitergehende, über Tage andauernde Nachbeobachtungen waren auf Grund der Verwendung akuter Hippokampusschnitte im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich, dazu würde es in-vivo-Modelle von Ischämie und Hypoxie benötigen.

Bis heute gibt es nur wenige Arbeiten, die sich mit einer verstärkten Hypoxieantwort beim RETT-Syndrom befassen haben. Die vegetative Atemregulation unter Hypoxie (5 min, 8% O₂) war deutlich stärker ausgeprägt bei *Mecp2*^{-/-}- und *Mecp2*^{+/-}-Tieren als bei Wildtypen, vor allem wiesen *Mecp2*^{-/-}-Tiere eine erhöhte Atemfrequenz und eine verstärkte Atemdepression posthypoxisch auf (Bissonnette und Knopp 2006). Auch in akuten Hirnstammschnitten von *Mecp2*^{-/-}-Tieren trat die HSD verfrüht auf, wenn die schwere Hypoxie mit weiteren Stressoren zusammentrifft (Kron et al. 2011). In Kulturen von cerebellären Körnerzellen trat der Zelltod durch Hypoxie (95% N₂ / 5% CO₂) deutlich früher ein, da kurze Hypoxieepisodes, welche Wildtypkulturen nicht beeinträchtigten, bereits zum Absterben der *Mecp2*^{-/-}-Kulturen führten. Außerdem zeigte die gleiche Arbeit, dass die Aktivität von Caspase-3 und die Ausschüttung des mitochondrialen apoptoseinduzierenden Faktors AIF erhöht waren, was auf eine vergrößerte Vulnerabilität der Mitochondrien im Rett-Syndrom hindeutet (Russell et al. 2007).

Andere Mechanismen, die die Hypoxietoleranz durch eine *MECP2*-Mutation verringern können, sind eine verringerte Aktivität der Na⁺-K⁺-ATPase, wie sie in Neuronen des Neocortex bei *Mecp2*-Mäusen und RETT-Patienten gefunden wurde (Deng G et al. 1999). Kontrovers diskutiert wird der Gehalt der Zellen an ATP. Während einige Arbeiten einen reduzierten ATP-Gehalt im Hirn von *Mecp2*-Knockoutmäusen fanden (Saywell et al. 2006), wurden in dieser Arbeitsgruppe normale ATP-Mengen in Hirnschnitten des MeCP2-defizienten Hippokampus gemessen (Fischer et al. 2009). Da sich jedoch auch in meiner Messung das Ruhemembranpotential der CA1-Neurone im *Mecp2*^{-/-}-Gewebeschnitt nicht vom

WT-Gewebeschnitt unterschied, sind derartige ATP-Veränderungen wahrscheinlich nicht der primäre Auslöser der verfrühten hypoxischen Spreading Depression. Dennoch besteht weiterhin die Möglichkeit, dass die Mitochondrien der *Mecp2^{-y}*-Tiere bei Hypoxie weniger leistungsfähig sind.

Ein wesentliche Ursache für die schneller auftretende HSD sind anscheinend die veränderten Kaliumströme während und vor allem zu Beginn der Hypoxie. Die intrazellulären Membranpotentialmessungen in Pyramidenzellen der CA1-Region zeigten einen verringerten Abfall des Eingangswiderstandes in der frühen Hypoxiephase. Nun werden aber gerade in dieser Phase Kaliumkanäle aktiviert (Hansen et al. 1982) und sowohl ATP-abhängige als auch Ca^{2+} -abhängige K^+ -Kanäle haben eine Schlüsselrolle bei der initialen Hyperpolarisation inne (Erdemli et al. 1998; Fujimura et al. 1997; Zawar und Neumcke 2000). Weiterführende Untersuchungen der einzelnen K^+ -Kanäle zeigten, dass im *Mecp2^{-y}*-Hippokampus in den CA1-Neuronen von *Mecp2^{-y}*-Mäusen tatsächlich Ca^{2+} -abhängige Kaliumkanäle mit geringer und mittlerer Leitfähigkeit in ihrer Aktivität eingeschränkt sind (Kron und Müller 2010). Ursachen dafür scheinen Veränderungen in der zellulären Ca^{2+} -Homöostase und verminderte Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern in *Mecp2^{-y}* CA1-Neuronen zu sein. Dazu passt auch, dass der Spitzenwert der extrazellulären Kaliumkonzentration bei *Mecp2^{-y}*-Mäusen während der HSD deutlich erniedrigt ist.

Andere Parameter, welche das Auftreten und die Ausbreitung der Spreading Depression beeinflussen können, sind die Gewebemorphologie und die Größe des

Extrazellulärtraumes. Kortikale und subkortikale Neurone sind bei RETT-Patienten kleiner und dichter gepackt (Bauman et al. 1995). Außerdem wurde ein geringer Verlust kortikaler Neurone und eine verringerte Dichte an dendritischen Fortsätzen entdeckt (Belichenko PV et al. 1994), während die Anzahl der Präsynapsen nicht verändert zu sein scheint (Nelson et al. 2006). Die reduzierte kortikale Dicke ist wohl ein Ergebnis der verzögerten Reifung und Differenzierung bei MeCP2-Defizienz (Fukuda et al. 2005). Diese morphologischen Veränderungen zusammen genommen verursachen anscheinend die reduzierte Größe des Hippokampus. Wenn man also annimmt, dass das interstitielle Volumen genauso verringert ist, könnte dies auch das verfrühte Auftreten der HSD erklären (Chebabo et al. 1995), da extrazelluläre Kaliumionen und Glutamat bereits nach einer kürzeren Hypoxiedauer kritische Werte erreichen können. Weiterhin könnte durch eine dichtere Zellpopulation von Hippokampusneuronen die interneuronale Kommunikation mittels ephaptischer Wechselwirkungen gefördert werden (Francis et al. 2003), was auch zu verstärkter Aktivität in der Frühphase der Hypoxie führen kann. Durch meine Versuche mit TMA-Chlorid konnte ich nun zeigen, dass die relative Zellschwellung bei *Mecp2^{-y}*-Tieren und Wildtyp-Tieren nicht verschieden ist. Dadurch sind eine geringere Zellschwellung und daraus folgende mildere Extrazellulärtraumbeschränkungen als Ursache für die reduzierten $[K^+]_o$ -Werte am Gipfel der HSD auszuschließen. Ob der Extrazellulärtraum in seiner absoluten Größe eingeschränkt ist, kann auf der Basis meiner Daten jedoch nicht ermittelt werden. Dazu wären gepulste, iontophoretische Gaben von TMA und eine detaillierte Analyse der TMA-Diffusionsprofile im Gewebe nötig (Nicholson 1991; Nicholson und Phillips 1981).

5. Zusammenfassung

Trotz der systemisch hypoxischen Episoden, denen die RETT-Mäuse aufgrund des verminderten Atemantriebs verstärkt ausgesetzt sind, findet bei diesen Tieren keine neuronale Präkonditionierung an niedrige Sauerstofflevel statt. Stattdessen ist die Hypoxietoleranz der *Mecp2*^{-y}-Männchen sogar geringer als die der Tiere mit Wildtyp-Allel. Wie das verfrühte Auftreten der HSD zeigte, konnte das hippocampale Netzwerk der *Mecp2*^{-y}-Tiere Phasen schwerer Hypoxie nicht so lange tolerieren wie bei gesunden Tieren. Daraus folgt, dass die neuronalen Funktionen bei *Mecp2*^{-y}-Tieren bei Sauerstoffmangelversorgung früher verloren gehen und unter MeCP2-Defizienz neurologische Komplikationen, bei denen es zu Hypoxie und metabolischem Stress im Hirn kommt, wie z.B. Schlaganfall, reduzierte Perfusion oder Schädel-Hirn-Traumata mit begleitendem Hirnödem, eine deutlich schlechtere Prognose haben könnten.

Auf der Suche nach der Ursache der erhöhten Hypoxieempfindlichkeit scheinen die Kaliumströme während der frühen Phase der Hypoxie und der HSD eine bedeutende Rolle zu spielen. Die Kaliumionenkonzentration während der HSD ist in den *Mecp2*^{-y}-Tieren deutlich niedriger und der Eingangswiderstand der CA1-Neurone zu Beginn der Hypoxie noch vor der eigentlichen HSD ist weniger stark vermindert. Dies lässt auf eine Fehlfunktion neuronaler Kaliumkanäle im RETT-Syndrom schließen, welche in weiteren Untersuchungen auf Zell- und Einzelkanalebene auch bestätigt wurde. Eine veränderte relative Zellschwellung während der HSD als Ursache für die abgeschwächten extrazellulären Konzentrationsveränderungen des Kaliums ist mittels Indikator-

Verdünnungsmethode nicht zu beobachten. Zwar sind die Neurone dichter gepackt, aber sie sind auch kleiner und mit weniger Dendritenfortsätzen bestückt.

Wenn man annimmt, dass diese erhöhte Hypoxieempfindlichkeit sich auf das gesamte Gehirn erstreckt, wie weiterführende Untersuchungen der HIF-1 α -Expression vermuten lassen, könnten auch die kognitive Dysfunktion und mentale Behinderung der RETT-Patienten zumindest teilweise durch die Atemdysregulation und damit assoziierte intermittierende systemische Hypoxie erklärt werden. Ein Aussetzen des Atem- und Kreislaufzentrums im Hirnstamm unter Hypoxie wäre besonders fatal, zumal die RETT-Patienten immer wieder unter Atemstörungen und dadurch reduziertem O₂-Angebot leiden. In der Tat versterben ungefähr 25% der RETT-Patientinnen an akutem und unerwartetem kardiorespiratorischen Versagen (Julu et al. 1997).

6. Literaturverzeichnis

- Aitken PG, Tombaugh GC, Turner DA, Somjen GG** (1998): Similar propagation of SD and hypoxic SD-like depolarization in rat hippocampus recorded optically and electrically. *J Neurophysiol* 80, 1514-1521
- Aitken PG, Fayuk D, Somjen GG, Turner DA** (1999): Use of intrinsic optical signals to monitor physiological changes in brain tissue slices. *Methods* 18, 91-103
- Amir RE, Van den Veyver IB, Wan M, Tran CQ, Francke U, Zoghbi HY** (1999): Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2. *Nat Genet* 23, 185-188
- Ammann D** Ion-Selective Microelectrodes Principles, Design and Application. Springer-Verlag, Berlin 1986
- Asaka Y, Jugloff DG, Zhang L, Eubanks JH, Fitzsimonds RM** (2006): Hippocampal synaptic plasticity is impaired in the Mecp2-null mouse model of Rett syndrome. *Neurobiol Dis* 21, 217-227
- Bahar S, Fayuk D, Somjen GG, Aitken PG, Turner DA** (2000): Mitochondrial and intrinsic optical signals imaged during hypoxia and spreading depression in rat hippocampal slices. *J Neurophysiol* 84, 311-324
- Bauman ML, Kemper TL, Arin DM** (1995): Pervasive neuroanatomic abnormalities of the brain in three cases of Rett's syndrome. *Neurology* 45, 1581-1586
- Belichenko NP, Belichenko PV, Li HH, Mobley WC, Francke U** (2008): Comparative study of brain morphology in Mecp2 mutant mouse models of Rett syndrome. *J Comp Neurol* 508, 184-195
- Belichenko PV, Oldfors A, Hagberg B, Dahlstrom A** (1994): Rett syndrome: 3-D confocal microscopy of cortical pyramidal dendrites and afferents. *Neuroreport* 5, 1509-1513
- Bienvenu T, Chelly J** (2006): Molecular genetics of Rett syndrome: when DNA methylation goes unrecognized. *Nat Rev Genet* 7, 415-426
- Bissonnette JM, Knopp SJ** (2006): Separate respiratory phenotypes in methyl-CpG-binding protein 2 (Mecp2) deficient mice. *Pediatr Res* 59, 513-518
- Blue ME, Naidu S, Johnston MV** (1999): Development of amino acid receptors in frontal cortex from girls with Rett syndrome. *Ann Neurol* 45, 541-545
- Caldwell PC** (1954): A glass microelectrode suitable for the measurement of the intracellular pH of large cells. *J Physiol* 124, 1P
- Chebabo SR, Hester MA, Jing J, Aitken PG, Somjen GG** (1995): Interstitial space, electrical resistance and ion concentrations during hypotonia of rat

hippocampal slices. *J Physiol* 487, 685-697

Chen RZ, Akbarian S, Tudor M, Jaenisch R (2001): Deficiency of methyl-CpG binding protein-2 in CNS neurons results in a Rett-like phenotype in mice. *Nat Genet* 27, 327-331

Chen WG, Chang Q, Lin Y, Meissner A, West AE, Griffith EC, Jaenisch R, Greenberg ME (2003): Derepression of BDNF transcription involves calcium-dependent phosphorylation of MeCP2. *Science* 302, 885-889

Cornwall MC, Peterson DF, Kunze DL, Walker JL, Brown AM (1970): Intracellular potassium and chloride activities measured with liquid ion exchanger microelectrodes. *Brain Res* 23, 433-436

Deidrick KM, Percy AK, Schanen NC, Mamounas L, Maria BL (2005): Rett syndrome: pathogenesis, diagnosis, strategies, therapies, and future research directions. *J Child Neurol* 20, 708-717

Deng G, Su JH, Ivins KJ, Van Houten B, Cotman CW (1999): Bcl-2 facilitates recovery from DNA damage after oxidative stress. *Exp Neurol* 159, 309-318

Deng V, Matagne V, Banine F, Frerking M, Ohliger P, Budden S, Pevsner J, Dissen GA, Sherman LS, Ojeda SR (2007): FXD1 is a MeCP2 target gene overexpressed in the brains of Rett syndrome patients and Mecp2-null mice. *Hum Mol Genet* 16, 640-650

Dietzel I, Heinemann U, Hofmeier G, Lux HD (1980): Transient changes in the size of the extracellular space in the sensorimotor cortex of cats in relation to stimulus-induced changes in potassium concentration. *Exp Brain Res* 40, 432-439

Eisenman G, Rudin DO, Casby JU (1957): Glass electrode for measuring sodium ion. *Science* 126, 831-834

Erdemli G, Xu YZ, Krnjevic K (1998): Potassium conductance causing hyperpolarization of CA1 hippocampal neurons during hypoxia. *J Neurophysiol* 80, 2378-2390

Fayuk D, Aitken PG, Somjen GG, Turner DA (2002): Two different mechanisms underlie reversible, intrinsic optical signals in rat hippocampal slices. *J Neurophysiol* 87, 1924-1937

Fischer M, Reuter J, Gerich FJ, Hildebrandt B, Hägele S, Katschinski D, Müller M (2009): Enhanced hypoxia susceptibility in hippocampal slices from a mouse model of Rett syndrome. *J Neurophysiol* 101, 1016-1032

Foster KA, Beaver CJ, Turner DA (2005): Interaction between tissue oxygen tension and NADH imaging during synaptic stimulation and hypoxia in rat hippocampal slices. *Neuroscience* 132, 645-657

Francis JT, Gluckman BJ, Schiff SJ (2003): Sensitivity of neurons to weak electric fields. *J Neurosci* 23, 7255-7261

Fujimura N, Tanaka E, Yamamoto S, Shigemori M, Higashi H (1997): Contribution of ATP-sensitive potassium channels to hypoxic hyperpolarization in rat hippocampal CA1 neurons in vitro. *J Neurophysiol* 77, 378-385

Fukuda T, Itoh M, Ichikawa T, Washiyama K, Goto Y (2005): Delayed maturation of neuronal architecture and synaptogenesis in cerebral cortex of Mecp2-deficient mice. *J Neuropathol Exp Neurol* 64, 537-544

Funke F, Kron M, Dutschmann M, Muller M (2009): Infant brain stem is prone to the generation of spreading depression during severe hypoxia. *J Neurophysiol* 101, 2395-2410

Glaze DG (2005): Neurophysiology of Rett syndrome. *J Child Neurol* 20, 740-746

Graubner B ICD-10-GM 2012 Systematisches Verzeichnis: Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme 10. Revision - German Modification Version 2012. Deutscher Ärzteverlag, Köln 2012, F84

Günzel D, Durry S, Schlue WR (1997): Intracellular alkalinization causes Mg²⁺ release from intracellular binding sites in leech Retzius neurones. *Pflugers Arch* 435, 65-73

Guy J, Hendrich B, Holmes M, Martin JE, Bird A (2001): A mouse Mecp2-null mutation causes neurological symptoms that mimic Rett syndrome. *Nat Genet* 27, 322-326

Guy J, Gan J, Selfridge J, Cobb S, Bird A (2007): Reversal of neurological defects in a mouse model of Rett syndrome. *Science* 315, 1143-1147

Hagberg B, Aicardi J, Dias K, Ramos O (1983): A progressive syndrome of autism, dementia, ataxia, and loss of purposeful hand use in girls: Rett's syndrome: report of 35 cases. *Ann Neurol* 14, 471-479

Hansen AJ (1985): Effect of anoxia on ion distribution in the brain. *Physiol Rev* 65, 101-148

Hansen AJ, Hounsgaard J, Jahnsen H (1982): Anoxia increases potassium conductance in hippocampal nerve cells. *Acta Physiol Scand* 115, 301-310

Hinke JA (1959): Glass micro-electrodes for measuring intracellular activities of sodium and potassium. *Nature* 184(Suppl 16), 1257-1258

Julu PO, Kerr AM, Hansen S, Apartopoulos F, Jamal GA (1997): Immaturity of medullary cardiorespiratory neurones leading to inappropriate autonomic reactions as a likely cause of sudden death in Rett's syndrome. *Arch Dis Child* 77, 464-465

Julu PO, Kerr AM, Apartopoulos F, Al-Rawas S, Engerstrom IW, Engerstrom L, Jamal GA, Hansen S (2001): Characterisation of breathing and associated central autonomic dysfunction in the Rett disorder. *Arch Dis Child* 85, 29-37

Kager H, Wadman WJ, Somjen GG (2002): Conditions for the triggering of spreading depression studied with computer simulations. *J Neurophysiol* 88, 2700-2712

Kaufmann WE, Johnston MV, Blue ME (2005): MeCP2 expression and function during brain development: implications for Rett syndrome's pathogenesis and clinical evolution. *Brain Dev* 27 Suppl 1, S77-S87

Kriaucionis S, Paterson A, Curtis J, Guy J, Macleod N, Bird A (2006): Gene expression analysis exposes mitochondrial abnormalities in a mouse model of Rett syndrome. *Mol Cell Biol* 26, 5033-5042

Kron M, Müller M (2010): Impaired hippocampal Ca²⁺ homeostasis and concomitant K⁺ channel dysfunction in a mouse model of Rett syndrome during anoxia. *Neuroscience* 171, 300-315

Kron M, Zimmermann JL, Dutschmann M, Funke F, Müller M (2011): Altered responses of MeCP2-deficient mouse brain stem to severe hypoxia. *J Neurophysiol* 105, 3067-3079

Leao AAP (1944): Spreading depression of activity in the cerebral cortex. *J Neurophysiol* 7, 359-390

Lev AA (1964): Determination of activity and activity coefficients of potassium and sodium ions in frog muscle fibres. *Nature* 201, 1132-1134

Lotan M, Ben-Zeev B (2006): Rett syndrome. A review with emphasis on clinical characteristics and intervention. *Scientific World Journal* 6, 1517-1541

Lyon MF (1961): Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.). *Nature* 190, 372-373

Mari F, Azimonti S, Bertani I, Bolognese F, Colombo E, Caselli R, Scala E, Longo I, Grosso S, Pescucci C (2005): CDKL5 belongs to the same molecular pathway of MeCP2 and it is responsible for the early-onset seizure variant of Rett syndrome. *Hum Mol Genet* 14, 1935-1946

Mullaney BC, Johnston MV, Blue ME (2004): Developmental expression of methyl-CpG binding protein 2 is dynamically regulated in the rodent brain. *Neuroscience* 123, 939-949

Müller M, Somjen GG (1999): Intrinsic optical signals in rat hippocampal slices

during hypoxia-induced spreading depression-like depolarization. *J Neurophysiol* 82, 1818-1831

Müller M, Somjen GG (2000a): Na⁺ and K⁺ concentrations, extra- and intracellular voltages, and the effect of TTX in hypoxic rat hippocampal slices. *J Neurophysiol* 83, 735-745

Müller M, Somjen GG (2000b): Na⁺ dependence and the role of glutamate receptors and Na⁺ channels in ion fluxes during hypoxia of rat hippocampal slices. *J Neurophysiol* 84, 1869-1880

Nelson ED, Kavalali ET, Monteggia LM (2006): MeCP2-dependent transcriptional repression regulates excitatory neurotransmission. *Curr Biol* 16, 710-716

Nicholson C (1991): Quantitative analysis of extracellular space using the method of TMA⁺ iontophoresis and the issue of TMA⁺ uptake. *Can J Physiol Pharmacol* 70, 314-322

Nicholson C, Phillips JM (1981): Ion diffusion modified by tortuosity and volume fraction in the extracellular microenvironment of the rat cerebellum. *J Physiol* 321, 225-257

Percy AK, Lee HS, Neul JL, Lane JB, Skinner SA, Geerts SP, Annese F, Graham J, McNair L, Motil KJ, Barrish JO, Glaze DG (2010): Profiling scoliosis in Rett syndrome. *Pediatr Res* 67, 435-439

Ramón y Cajal S Nerveux de l'Homme et des Vertebretes Vols. 1 and 2. A. Maloine, Paris 1911

Rett A (1966): Über ein eigenartiges hirnatrophisches Syndrom bei Hyperammonämie im Kindesalter. *Wien Med Wochenschr* 116, 723-726

Russell JC, Blue ME, Johnston MV, Naidu S, Hossain MA (2007): Enhanced cell death in MeCP2 null cerebellar granule neurons exposed to excitotoxicity and hypoxia. *Neuroscience* 150, 563-574

Saywell V, Viola A, Confort-Gouny S, Le Fur Y, Villard L, Cozzone PJ (2006): Brain magnetic resonance study of Mecp2 deletion effects on anatomy and metabolism. *Biochem Biophys Res Commun* 340, 776-783

Schüle B, Armstrong DD, Vogel H, Oviedo A, Francke U (2008): Severe congenital encephalopathy caused by MECP2 null mutations in males: central hypoxia and reduced neuronal dendritic structure. *Clin Genet* 74, 116-126

Shahbazian MD, Antalffy B, Armstrong DL, Zoghbi HY (2002): Insight into Rett syndrome: MeCP2 levels display tissue- and cell-specific differences and correlate with neuronal maturation. *Hum Mol Genet* 11, 115-124

Somjen GG (2001): Mechanisms of Spreading Depression and Hypoxic Spreading

Depression-Like Depolarization. *Physiol Rev* 81, 1065-1096

Somjen GG, Herreras O, Jing J (1992): Spreading Depression and Neuron Damage: a Brief Review. *Exp Brain Res* 23, 27-33

Thomas RC Ion-sensitive Intracellular Microelectrodes How to Make and Use Them. Academic Press, London 1978

Tropea D, Giacometti E, Wilson NR, Beard C, McCurry C, Fu DD, Flannery R, Jaenisch R, Sur M (2009): Partial reversal of Rett Syndrome-like symptoms in MeCP2 mutant mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 2029-2034

Van Harreveld A (1978): Two mechanisms for spreading depression in the chicken retina. *J Neurobiol* 9, 419-431

Zawar C, Neumcke B (2000): Differential activation of ATP-sensitive potassium channels during energy depletion in CA1 pyramidal cells and interneurons of rat hippocampus. *Pflugers Arch* 439, 256-262

Zhu X, Li M, Pan H, Bao X, Zhang J, Wu X (2010): Analysis of the parental origin of de novo MECP2 mutations and X chromosome inactivation in 24 sporadic patients with Rett syndrome in China. *J Child Neurol* 25, 842-848

Publikationen zum Thema dieser Dissertation:

Fischer M, Gerich FJ, Haegele S, Katschinski D, Müller M (2008): MeCP2 deficiency impairs synaptic plasticity and decreases the hypoxia tolerance of hippocampal slices. *Acta Physiologica* 192 (Supplement 663), OT1-2-2.

Fischer M, Reuter J, Gerich FJ, Hägele S, Katschinski DM, Müller M (2008). Increased hypoxia sensitivity of the hippocampal network in RETT syndrome. *Society for Neuroscience Abstracts*, 447.7

Fischer M, Reuter J, Gerich FJ, Hildebrandt B, Hägele S, Katschinski D, Müller M (2009): Enhanced hypoxia susceptibility in hippocampal slices from a mouse model of Rett syndrome. *Acta Physiologica* 195 (Supplement 669), 231

Fischer M, Reuter J, Gerich FJ, Hildebrandt B, Hägele S, Katschinski D, Müller M (2009): Enhanced hypoxia susceptibility in hippocampal slices from a mouse model of Rett syndrome. *J Neurophysiol* 101, 1016-1032

Danksagung

Ich bedanke mich bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Müller für ihre Unterstützung, namentlich besonders bei Belinda Kempkes, die mich in viele der verwendeten Methoden eingearbeitet hat.

Ein besonderer Dank gilt natürlich meinem Doktorvater selbst, Prof. Dr. Michael Müller, ohne den diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre und an den ich mich immer wenden konnte, wenn Probleme auftraten.

Lebenslauf

Ich wurde am 12. März 1985 in Bad Hersfeld als Kind von Erwin Heinrich Fischer und Andrea Rieck-Eydt geboren. Mein Vater Erwin Heinrich Fischer ist von Beruf Hoteldirektor, meine Mutter Andrea Rieck-Eydt Chemieingenieurin. Mein Bruder Jan Fischer wurde am 12. März 1990 geboren.

Von 1991 bis 1995 besuchte ich die Mittelpunktschule Heiligenberg in Gensungen als Grundschule. Anschließend war ich von 1995 bis 2001 an der Drei-Burgen-Schule in Felsberg, einer Gesamtschule mit abgegrenztem Gymnasialzweig ab der 5. Klasse. Die gymnasiale Oberstufe der Geschwister-Scholl-Schule in Melsungen besuchte ich von 2001-2004, an welcher ich 2004 auch meine allgemeine Hochschulreife erlangte.

Das darauffolgende Jahr von September 2004 bis Juli 2005 leistete ich Zivildienst auf der chirurgischen Station des Kreiskrankenhauses Melsungen (heute Asklepios Klinik Melsungen).

Seit dem Wintersemester 2005/06 studiere ich Humanmedizin an der Georg-August-Universität Göttingen, an welcher ich im Herbst 2007 den 1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung und im Herbst 2011 den 2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung bestand.