

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

**Modulation der Hypoxie-Empfindlichkeit medullärer Netzwerke in einem
Maus-Modell des Rett-Syndroms**

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

vorgelegt von

Jasper Lukas Zimmermann

aus Oldenburg (Oldb)

Göttingen 2011

Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel

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

II. Berichterstatter/in: Prof. Dr. med. P. Huppke

III. Berichterstatter/in:

Tag der mündlichen Prüfung: 14.02.2012

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	5
1.1	Rett-Syndrom	5
1.1.1	Genetik des Rett-Syndroms.....	5
1.1.2	Klinik des Rett-Syndroms.....	6
1.1.3	Respiratorische Symptome beim Rett-Syndrom	8
1.2	Spreading depression.....	9
1.2.1	Intrinsische optische Signale (IOS)	11
1.2.2	Auswirkungen und Klinik der <i>spreading depression</i>	13
1.3	Bedeutung von Hypoxie im Hirnstamm und bei <i>Mecp2^{-y}</i> -Mäusen	14
1.4	Messung atem-assoziierter rhythmischer Aktivität in Hirnstammschnitten	16
1.5	Serotonin-Rezeptor-Aktivierung durch 5-HT _{1A} -Rezeptor-Agonisten.....	17
1.6	Ziele dieser Arbeit.....	18
2	Material und Methoden	20
2.1	Mausmodell für das Rett-Syndrom	20
2.2	Präparation der akuten Hirnschnitte	21
2.2.1	Präparation der rhythmisch aktiven Schnitte.....	21
2.3	Aufbewahrung der Schnitte und Versuchsaufbau	22
2.4	Verwendete Gase, Lösungen und Pharmaka	24
2.5	Hypoxie-Protokoll	26
2.6	Elektrophysiologische Ableitungen	26
2.6.1	Extrazelluläre DC-Potentiale.....	26
2.6.2	Messung rhythmischer Massenaktivität	27
2.7	Optische Messungen	27
2.8	Datenanalyse und Statistik	29
3	Ergebnisse	30
3.1	Hirnstamm-HSDs bei juvenilen Wildtyp- und <i>Mecp2^{-y}</i> -Mäusen	30
3.1.1	Analyse der intrinsischen optischen Signale (IOS)	31
3.1.2	Analyse der elektrophysiologischen Ableitungen	34
3.1.2.1	Versuche bei einer extrazellulären K ⁺ -Konzentration von 8 mM	35
3.1.2.2	Versuche bei einer extrazellulären K ⁺ -Konzentration von 3,5 mM	39
3.1.2.3	Vergleich physiologischer mit erhöhter Kalium-Konzentration ...	42
3.2	Hirnstamm-HSDs bei adulten Wildtyp- und <i>Mecp2^{-y}</i> -Mäusen.....	43
3.3	Einfluss von Serotonin-Rezeptor-Modulation auf die Hypoxieempfindlichkeit	45
3.4	Wirkung von HSD auf die respiratorische Rhythmogenese	50
4	Diskussion	53
4.1	Beginn und Ausbreitung von HSDs im Hirnstamm von <i>Mecp2^{-y}</i> - und Wildtyp-Mäusen	53
4.2	Erhöhte Hypoxieempfindlichkeit bei <i>Mecp2^{-y}</i> -Mäusen	56
4.2.1	Bedeutung des NTS für die respiratorische Regulation	57

4.3	Bedeutung von medullären HSDs für die respiratorische Rhythmogenese.....	58
4.3.1	Zusammenhang mit dem <i>Sudden Infant Death Syndrome</i> (SIDS) ..	60
4.4	Neuroprotektive Wirkung der Serotonin-Rezeptor-Aktivierung.....	61
5	Zusammenfassung und Ausblick	64
6	Anhang.....	66
6.1	Abbildungsverzeichnis	66
6.2	Tabellenverzeichnis	68
6.3	Abkürzungsverzeichnis.....	69
7	Literaturverzeichnis	70
	Danksagung	78
	Lebenslauf.....	79

1 Einleitung

1.1 Rett-Syndrom

1.1.1 Genetik des Rett-Syndroms

Beim Rett-Syndrom handelt es sich um eine Störung der neuronalen Entwicklung, die mit einer Häufigkeit von einer auf 10.000-15.000 Geburten nahezu ausschließlich bei weiblichen Kindern auftritt (Hagberg et al. 1983). Bereits 1966 wurde das Rett-Syndrom durch den österreichischen Pädiater Dr. Andreas Rett beschrieben (Rett 1966). Erst 17 Jahre später allerdings erzeugte die erste Publikation in englischer Sprache zu diesem Thema internationale Aufmerksamkeit für das Rett-Syndrom (Hagberg et al. 1983).

Das Rett-Syndrom ist eine genetische Erkrankung, die in 95% der Fälle durch Mutationen im X-chromosomalen *MECP2*-Gen auf dem Locus Xq28 verursacht wird (Amir et al. 1999). In selteneren Fällen führt eine Mutation im ebenfalls X-chromosomalen *CDKL5* (*cycline-dependent kinase-like 5*)-Gen zu einer atypischen kongenitalen Form des Rett-Syndroms, die in erster Linie durch bereits in den ersten drei Lebensmonaten auftretende Epilepsien gekennzeichnet ist (Grosso et al. 2007). In dieser Arbeit beziehe ich mich aber ausschließlich auf die wesentlich häufigere, typische Form des Rett-Syndroms. Bei den Mutationen des *MECP2*-Gens kann es sich um verschiedene Typen von *nonsense*-, *missense*- und *frameshift*-Mutationen handeln (Christodoulou et al. 2003). Grundlage hierfür sind in der Mehrzahl der Fälle Neumutationen, die zumeist in der Keimbahn des Vaters auftreten; es wurde jedoch auch über Fälle berichtet, in denen das mutierte *MECP2*-Gen von der nicht erkrankten Mutter vererbt wurde. Dies lässt vermuten, dass in diesem Fall ein Gonadenmosaik bei der Mutter vorlag (Amir et al. 1999). Das *MECP2*-Gen kodiert für das *methyl-CpG-binding protein 2* (MeCP2). Bei diesem Protein handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor, der am *long term gene silencing* (Bienvenu und Chelly 2006) verschiedener Gene und aber auch an der Aktivierung einer Vielzahl anderer Gene beteiligt ist. MeCP2 bindet an die Promotor-Region dieser Gene und bewirkt so eine veränderte Expression (Chahrour et al. 2008). Von MeCP2 kontrollierte Zielgene sind beispielsweise *BDNF* (*brain derived neurotrophic factor*) (Kline et al. 2010), der Transkriptionsfaktor *DLX5* (Bienvenu und Chelly

2006), ein Modulator der phospholemmlalen Na^+/K^+ -ATPase (Deng et al. 2007) und eine Untereinheit des Komplexes III der mitochondrialen Atmungskette (Kriaucionis et al. 2006). Aufgrund der großen Bedeutung von MeCP2 für die Ausbildung und den Funktionserhalt der Synapsen und neuronalen Netzwerke wird das Rett-Syndrom auch als Synaptopathie bezeichnet (Zoghbi 2003).

Im Laufe der neuronalen Entwicklung zeigen sich unterschiedliche Expressionsmuster von MeCP2 in verschiedenen Abschnitten des ZNS. So liegt postnatal zunächst eine hohe Expression von MeCP2 vor allem in denjenigen medullären Netzwerken vor, die von vitaler Bedeutung beispielsweise für die respiratorische, zirkulatorische und kardiale Steuerung sind. In sich später ausdifferenzierenden neuronalen Netzwerken, wie Neokortex, Hippokampus und Kleinhirn, hat auch das MeCP2-Protein ein späteres Expressionsmaximum im Zuge der Reifung dieser Gewebe (Shahbazian et al. 2002, Zoghbi 2003).

1.1.2 Klinik des Rett-Syndroms

Das Rett-Syndrom ist eine gynäkotrope Erkrankung. Es kommt also aufgrund der X-chromosomalen Lokalisation des *MECP2*-Gens beim Menschen nahezu ausschließlich bei Mädchen zur Ausbildung der Symptome, da männliche hemizygoter Mutationsträger zumeist gar nicht oder aber mit schwersten Behinderungen und somit nicht längerfristig lebensfähig geboren werden. Nach dem Down-Syndrom ist das Rett-Syndrom die zweithäufigste genetische Ursache für mentale Retardierung bei Mädchen; es macht hier etwa 25-30% der Fälle aus (Hagberg 1985). In selteneren Fällen kann es aber auch bei Jungen zur Ausprägung einer Variante des Rett-Syndroms kommen, die betroffenen Kinder weisen allerdings einen stark heterogenen Phänotyp auf und erfüllen zumeist auch nicht alle Diagnose-Kriterien des Rett-Syndroms (Jan et al. 1999).

Die weiblichen Patienten zeigen eine zunächst normale psychomotorische Entwicklung, im Zuge derer die wichtigen Meilensteine der Kindesentwicklung erreicht werden. Die meisten Patientinnen erlernen das Laufen, gelegentlich kommt es auch zur Ausbildung erster sprachlicher Fähigkeiten. Der Erkrankungsbeginn bei den Patientinnen liegt zwischen dem 6. und 18. Lebensmonat. Es kommt zunächst zu einer Stagnation der Entwicklung und darauf folgend zum stadienhaft beginnenden progredienten Verlust von

motorischen und kognitiven Fähigkeiten (Chahrour und Zoghbi 2007).

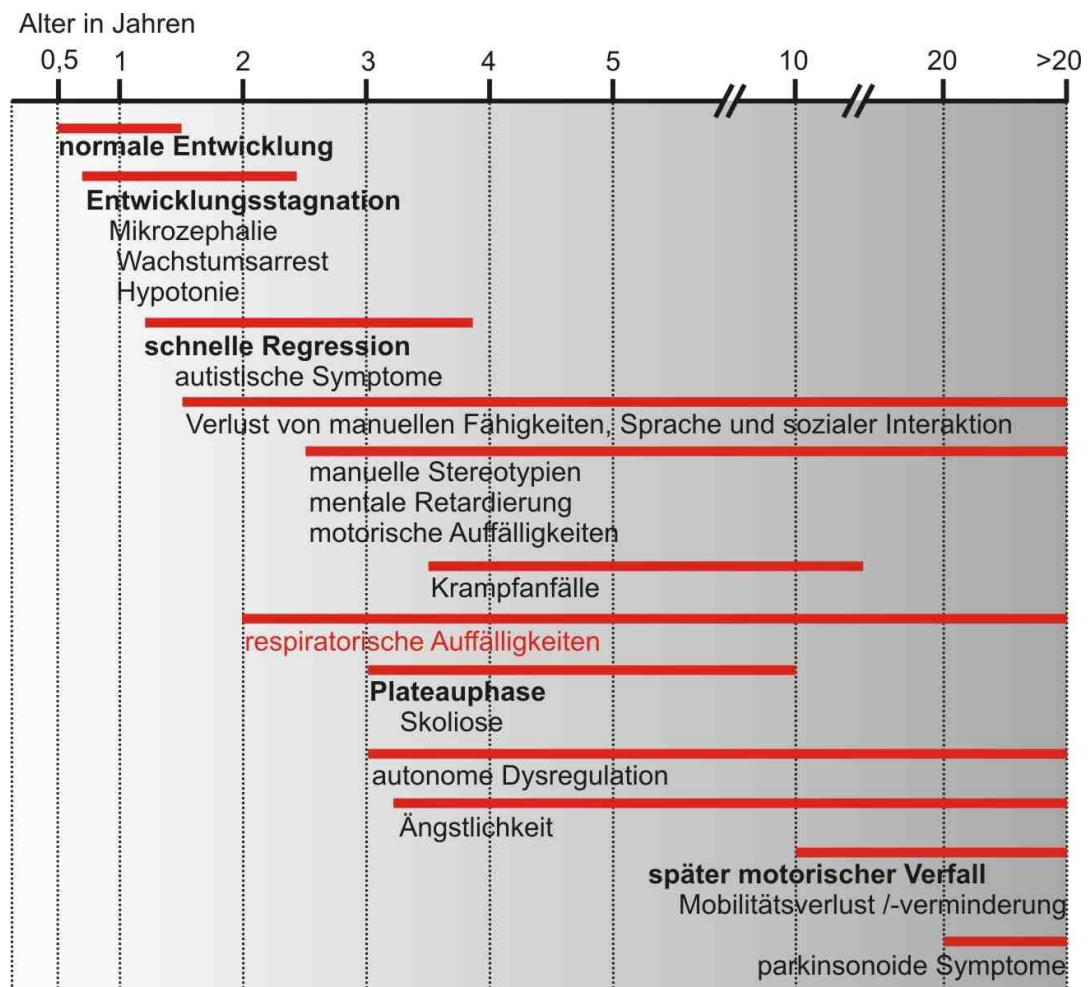


Abbildung 1: Stadien der Entwicklung des Rett-Syndroms und charakteristische Symptome (modifiziert nach Chahrour und Zoghbi 2007, S. 423)

Auf eine initial normale Entwicklung des Kindes folgt eine Stagnation der Entwicklung ab dem 6.-18. Monat und daraufhin eine zunehmende Regression bereits vorhandener Fertigkeiten. Diese kann in einer Plateauphase münden, so dass die Patienten bis in die 6. oder 7. Lebensdekade in schwerst behindertem Zustand überleben können.

Ein erster Indikator für den Beginn der Erkrankung kann die Stagnation des Kopfwachstums der Kinder sein, die zumeist im zweiten Lebensjahr in einer Mikrozephalie mündet. Innerhalb von eineinhalb Jahre treten neben autistischem Verhalten (Nomura 2005), Spastiken, epileptischen Krampfanfällen (Steffenburg et al. 2001, Jian et al. 2006) und stereotypen motorischen Phänomenen, wie zum Beispiel den für das Syndrom typischen waschenden Handbewegungen (Percy 2002), auch schwere Störungen der Atmung auf, die das klinische Bild des Rett-Syndroms prägen können und häufig zum

frühzeitigen Tod bei Rett-Patientinnen führen (Hagberg et al. 1983, Zoghbi 2003). Bei Kindern, die nicht vorzeitig versterben, erreicht die Ausprägung der Symptomatik nach einigen Jahren ein Plateau. Ein Überleben der Patientinnen ist dann in schwerst behindertem Zustand bis in die 6. oder 7. Lebensdekade möglich.

1.1.3 Respiratorische Symptome beim Rett-Syndrom

Die komplexen Störungen der Atmung beim Rett-Syndrom treten hauptsächlich im wachen Zustand altersabhängig beispielweise in Form von alternierenden Episoden der Hyperventilation oder forciertes Atmung auf und können mit genereller kardiorespiratorischer Dysregulation einhergehen (Julu et al. 2001, Weese-Mayer et al. 2008, Katz et al. 2009). Die auffälligste und gefährlichste Form dieser Atemstörungen sind jedoch die häufig auftretenden Atemstillstände und Apnoen. Folge dieser respiratorischen Störungen kann eine lebensbedrohliche systemische Hypoxie sein (Hagberg et al. 1983, Katz et al. 2009).

Als Mausmodell für das Rett-Syndrom dienen *Mecp2^{-y}*-Mäuse. Diese männlichen Knockout-Tiere zeigen einen dem menschlichen Rett-Syndrom ähnlichen Phänotyp; im Vergleich zum Menschen ist dieser allerdings generell etwas schwächer ausgeprägt. So werden die männlichen *Mecp2^{-y}*-Mäuse symptomatisch, wohingegen die weiblichen hemizygoten Tiere erst spät einen deutlich abgeschwächten Phänotyp exprimieren. Aus diesem Grund werden männliche *Mecp2^{-y}*-Mäuse als Mausmodell verwendet. Dieser Zusammenhang wird im Abschnitt 2.1 dieser Arbeit („Mausmodell für das Rett-Syndrom“) näher erläutert.

In Untersuchungen am Mausmodell konnte gezeigt werden, dass beim Rett-Syndrom eine Verstärkung mit der Atmung assoziierter Reflexe und eine verminderte Plastizität dieser Reflexe vorliegen (Stettner et al. 2007, Roux et al. 2008, Voituron et al. 2009). Neuere Ergebnisse deuten darauf hin, dass diese Störungen auf Grundlage einer Verschiebung des neuronalen Gleichgewichtes von Exzitation und Inhibition entstehen. In pontomedullären Hirnstammregionen, die an der kardiorespiratorischen Kontrolle beteiligt sind, zeigt sich im Mausmodell für das Rett-Syndrom eine Verschiebung dieses Gleichgewichtes

hin zur zellulären Hyperexzitabilität und damit einer verstärkten Erregbarkeit des neuronalen Gewebes (Medrihan et al. 2008, Taneja et al. 2009, Abdala et al. 2010, Kline et al. 2010). Diese verstärkte Erregbarkeit zeigt sich vor allem in Neuronengruppen, die der postinspiratorischen Kontrolle dienen. Die Folge sind variabel verlängerte postinspiratorische Intervalle bei gleichzeitig verkürzter Inspiration und daraus resultierend eine arrhythmische Atmung mit einer erhöhten Frequenz repetitiver, transienter Apnoen. Diese Apnoen entstehen aus einer endexpiratorischen Atemlage heraus und gehen mit erhöhtem postinspiratorischem Vagotonus einher, der sich durch Bradykardien und eine Laryngokonstriktion äußert (Stettner et al. 2007). Die mit hoher Frequenz auftretenden Apnoen können die Ursache für repetitive lebensbedrohliche systemische Hypoxien bei Rett-Patienten und im Mausmodell sein. Generell werden die schweren kardiorespiratorischen Störungen für die Mehrzahl der plötzlichen Todesfälle bei Rett-Patientinnen verantwortlich gemacht (Kerr et al. 1997, Ogier und Katz 2008, Stettner et al. 2008b, Katz et al. 2009).

In plethysmographischen Untersuchungen an Rett-Patienten wurde nachgewiesen, dass die an *Mecp2*^{-y}-Mäusen untersuchten Auffälligkeiten der respiratorischen Funktion den Beeinträchtigungen der Atmung bei Patienten mit dem Rett-Syndrom in hohem Maße gleichen (Viemari et al. 2005, Stettner et al. 2008b). Somit sind die *Mecp2*^{-y}-Tiere als valides Modell für das Rett-Syndrom einzustufen.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass im Hippokampus von *Mecp2*^{-y}-Mäusen eine erhöhte Hypoxie-Empfindlichkeit im Vergleich mit Wildtyp-Mäusen vorliegt. Diese äußerte sich im beschleunigten Auftreten von sogenannten hypoxieinduzierten *spreading depressions* (Fischer et al. 2009). Für weitere Ausführungen zu diesem Punkt sei auf Abschnitt 1.3 („Bedeutung von Hypoxie im Hirnstamm und bei *Mecp2*^{-y}-Mäusen“) dieser Dissertation verwiesen.

1.2 Spreading depression

Bei einer *spreading depression* (SD) handelt es sich um eine massive und synchrone, fast vollständige Depolarisation von Neuronen und Gliazellen, die sich wellenartig vom Fokus der jeweiligen Noxe aus im neuronalen Gewebe ausbreitet (Leão 1944). Mit der neuronalen Depolarisation einhergehend kommt

es zu einer starken Verschiebung der Ionengleichgewichte zwischen Intra- und Extrazellulärraum mit einer massiven Akkumulation von Kalium-Ionen im Interstitium und einer deutlichen Verschiebung von Kalzium-, Natrium- und Chloridionen in den Intrazellulärraum (Hansen 1985). Dies legt den Schluss nahe, dass es zu einem Austausch von K^+ gegen Na^+ und Ca^{2+} kommt (Silver und Erecinska 1990), während Cl^- passiv dem sich verändernden elektrischen Gradienten folgt (Müller 2000). Die Elektrolytverschiebung führt zu einer neuronalen und glialen Schwellung und die daraus resultierende Verkleinerung des Extrazellulärspaces verstärkt das ionale Ungleichgewicht weiter (Hansen und Olsen 1980). Gleichzeitig tritt eine plötzliche steile Negativierung des extrazellulären DC-Potentials um 15-25 mV auf. Dieser *DC-Potential-Shift* ist mit extrazellulären Elektroden als Korrelat der massiven synchronen Membrandepolarisation messbar.

Ausgelöst werden kann eine *spreading depression* durch verschiedene Noxen, wie zum Beispiel durch mechanische Stimulation (Somjen et al. 1992), Applikation erhöhter K^+ - (Lauritzen et al. 1988) oder Glutamat- (Hossmann 2003) Konzentrationen, Hypoosmolarität (Chebabo et al. 1995), die Blockade der $Na^+/-K^+$ -ATPase (Balestrino et al. 1999) oder durch tetanische elektrische Stimulation (Leão 1944, Reid et al. 1988).

Darüber hinaus ist auch, wie in dieser Arbeit durchgeführt, eine SD-Auslösung durch schwere Hypoxie möglich. Die dabei auftretenden sogenannten hypoxieinduzierten *spreading-depression*-ähnlichen Depolarisationen (HSDs) unterscheiden sich in einigen Aspekten leicht von einer durch andere Stimuli hervorgerufenen SD. So ist eine KCl-induzierte SD beispielsweise in ihrer Dauer selbstlimitierend, eine durch Ischämie oder Hypoxie ausgelöste HSD hingegen kann nur durch innerhalb kurzer Zeit nach Beginn der HSD erfolgende Reoxygenierung bzw. Reperfusion beendet werden, da für die Rekonstitution des ionalen Gleichgewichtes und der neuronalen und glialen Membranpotentiale Sauerstoff benötigt wird. Eine ausführlichere diesbezügliche Abhandlung findet sich in dem Übersichtsartikel von George G. Somjen zu diesem Thema (Somjen 2001).

Aufgrund der erläuterten Unterschiede zwischen SDs und HSDs wird in dieser Arbeit durchgehend der Begriff hypoxieinduzierte *spreading-depression*-ähnliche

Depolarisation (HSD) anstelle von *spreading depression* (SD) verwendet.

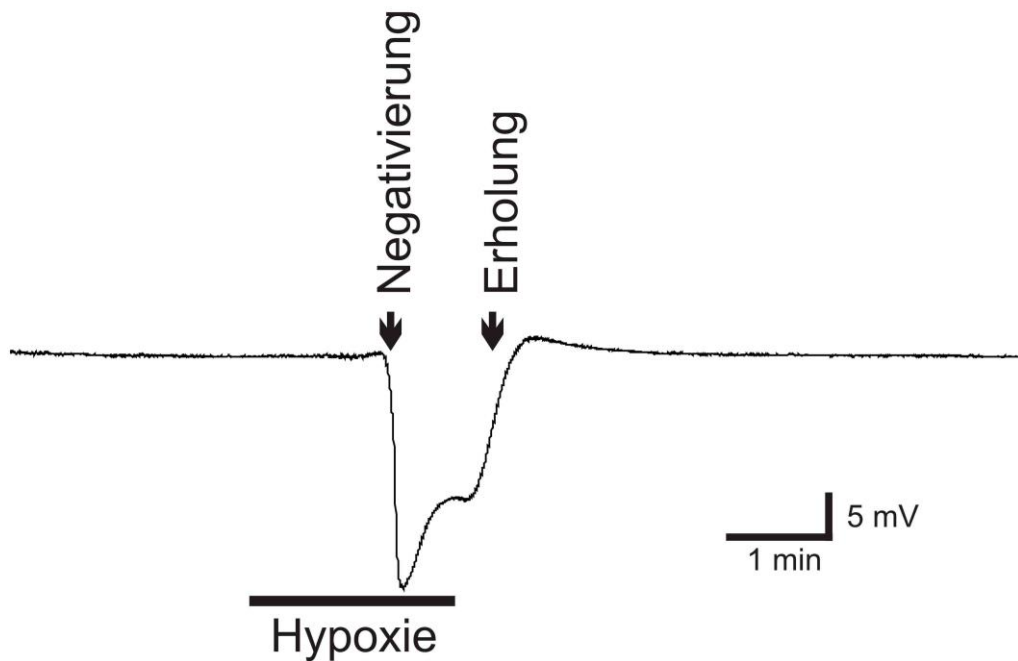


Abbildung 2: Ableitung des extrazellulären DC-Potentials einer HSD aus dem Bereich des Nucleus tractus solitarius (NTS)

Charakteristische Negativierung des extrazellulären DC-Potentials 1-2 Minuten nach Einleitung einer Hypoxie. Diese geht mit einer massiven synchronisierten Depolarisation der neuronalen Membranen einher. Nach erfolgter Reoxygenierung kommt es zur raschen Repolarisation der Neurone mit Erholung des extrazellulären Potentials.

1.2.1 Intrinsische optische Signale (IOS)

Charakteristisch für das Auftreten einer SD oder HSD im neuronalen Gewebe sind außerdem die sogenannten intrinsischen optischen Signale (IOS). Es kommt zu einer Aufhellung des von der SD betroffenen Gewebes, die durch eine Zunahme der Lichtstreuung und -reflexion an der invadierten Gewebeoberfläche verursacht wird (Snow et al. 1983). Diese Aufhellung des Gewebes tritt gegenüber der negativen DC-Potential-Veränderung um einige Sekunden verzögert auf, ist aber strikt an das Vorhandensein dieser DC-Potential-Veränderung gekoppelt und kann somit zur nicht-invasiven HSD-Analyse genutzt werden.

Die der Entstehung der IOS zugrunde liegenden molekularen Mechanismen sind bisher zwar nicht eindeutig geklärt, dennoch eignet sich das IOS hervorragend

zur Analyse des räumlichen und zeitlichen Ausbreitungsmusters einer HSD (Müller und Somjen 1999).

Es gibt verschiedene Erklärungsansätze für das Auftreten des IOS. Die während einer HSD auftretende Zellschwellung durch Verdünnung reflektierender Partikel im Zytosol der Zellen führt zu einer Abnahme der Lichtstreuung, die sich bei der optischen Aufnahme von HSDs als kurze Verdunklung der betrachteten Schnitte zu Beginn der HSD darstellt. Nahezu zeitgleich mit der charakteristischen steilen Negativierung des DC-Potentials kommt es dann allerdings zu einer deutlichen Aufhellung des betroffenen Gewebes (Tao 2000). Demzufolge muss es Mechanismen geben, welche die Lichtstreuung über dem betroffenen Gewebe in größerem Maße verstärken, als die Zellschwellung sie vermindert. Werden die Chloridionen in der Versuchslösung durch ein Anion wie Glukonat oder Methylsulfat ersetzt, das die Zellmembran nicht permeiert, kann die Zunahme der Lichtstreuung, also das IOS, unterdrückt werden (Müller und Somjen 1999). In diesem Fall kommt es zu einer Demaskierung der infolge der Zellschwellung abnehmenden Lichtstreuung und damit zu einer Verdunkelung des Schnittes. Sind in der Versuchslösung Chloridionen vorhanden, führt die SD-assoziierte Zunahme der Lichtstreuung zu einer Überlagerung der durch die Zellschwellung abnehmenden Lichtstreuung.

Eine mögliche Erklärung für die Aufhellung der Gewebeschnitte besteht in einer Schwellung von Zellorganellen wie Mitochondrien. Es ist bekannt, dass diese während einer HSD massiv depolarisieren (Bahar et al. 2000). Es gibt Hinweise dafür, dass insbesondere der mitochondriale Metabolismus einen wichtigen Beitrag zu der Entstehung von IOS leistet. So scheinen die veränderten Autofluoreszenz- und Absorptionsraten von NADH und mitochondrialen Zytochromen bei Hypoxie eine bedeutende Rolle zu spielen (Mané 2011).

Obwohl es bisher also keine eindeutige Erklärung für die Entstehung von IOS gibt, eignen sich diese sehr gut zur nicht-invasiven Analyse der Ausbreitung einer HSD in Echtzeit.

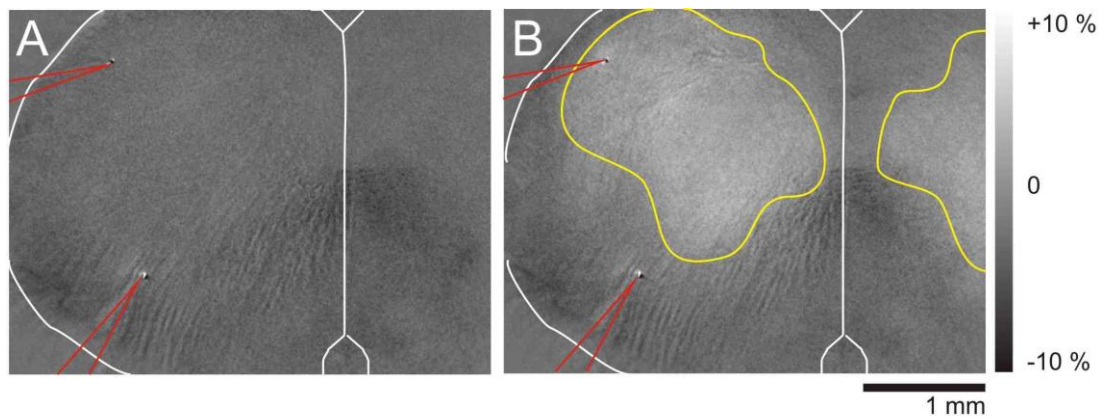


Abbildung 3: Intrinsic optisches Signal

Schnitt aus dem Hirnstamm einer Wildtyp-Maus (weiß umrandet). Typische Aufhellung des Gewebes im Verlauf einer HSD (gelb). (A) vor Beginn der HSD und (B) 20 s nach Beginn der HSD. Rot markiert sind die Positionen der Ableitelektroden.

1.2.2 Auswirkungen und Klinik der *spreading depression*

Die *spreading depression* führt zu einem reversiblen Verlust des negativen Membranpotentials und damit zu einer transienten Blockade der neuronalen Funktion durch Inhibition der axonalen Impulsfortleitung und der Funktion chemischer Synapsen. In diesem Funktionsverlust liegt auch der Begriff „*depression*“ begründet.

Die klinischen Folgen der SD können sich sehr unterschiedlich manifestieren. Im Zusammenhang mit der Migräne wird die sogenannte Aura, eine vorüber- und dem Kopfschmerz vorausgehende Eintrübung des Sichtfeldes, und auch der Kopfschmerz selbst mit dem Auftreten von SDs assoziiert (Lauritzen und Olesen 1984, Bolay et al. 2002). Schwerwiegendere Auswirkungen treten im Rahmen von Ereignissen wie Hirninfarkten und -blutungen auf. Hier kommt es im Bereich der Penumbra zu sekundärer Zellschädigung, die das *outcome* der Erkrankung wesentlich verschlechtert und die ätiologisch ebenfalls den Folgen von SD-Episoden zugeschrieben werden (Mies et al. 1993, Dreier et al. 2006, Dohmen et al. 2008). Auch die kurzzeitige reversible Bewusstlosigkeit nach einer leichten Gehirnerschütterung ohne strukturelle Schädigungskorrelate könnte im Zusammenhang mit SDs stehen. Das Auftreten von SDs wurde auch im Kontext mit Schädel-Hirn-Traumata (Strong et al. 2002) und Epilepsien (Gorji und

Speckmann 2004) beschrieben.

Erstbeschreiber der SD war Aristides Leão, der das Phänomen im Cortex von Kaninchen nachwies, als er elektroenzephalographisch das Auftreten von experimentellen Epilepsien untersuchte (Leão 1944). Seit langem ist bekannt, dass *spreading depressions* in verschiedenen neuronalen Geweben auftreten können, wie zum Beispiel im Hippokampus (Snow et al. 1983), Kleinhirn (Nicholson 1984), Rückenmark (Czéh und Somjen 1990) und in der Retina (do Carmo und Martins-Ferreira 1984). Seit einigen Jahren ist darüber hinaus nachgewiesen, dass SDs auch im Hirnstamm sowohl *in vivo* (Richter F et al. 2003, Richter et al. 2008) als auch *in vitro* in akuten Hirnstammschnitten von Ratten (Funke et al. 2009) auslösbar sind. Hier zeigte sich, dass insbesondere der juvenile Hirnstamm der Ratten anfällig für das Auftreten von HSDs ist (Funke et al. 2009).

Allerdings wurde zuvor nicht untersucht, ob HSDs auch im Hirnstamm von Mäusen auftreten und insbesondere ob es hier Unterschiede in der Hypoxieempfindlichkeit zwischen *Mecp2^{-y}*- und Wildtyptieren gibt. Auch war zu Beginn dieser Arbeit wenig darüber bekannt, wie sich das Auftreten einer SD auf die rhythmische Aktivität im Bereich des Atemzentrums (Prä-Bötzinger Komplex) auswirkt.

1.3 Bedeutung von Hypoxie im Hirnstamm und bei *Mecp2^{-y}*-Mäusen

In vorangegangenen Versuchen konnte gezeigt werden, dass in hippokampalen Hirnschnitten von infantilen *Mecp2^{-y}*-Mäusen im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte Hypoxie-Empfindlichkeit vorliegt, die sich im schnelleren Verlust des neuronalen Membranpotentials und demzufolge dem beschleunigten Auftreten von hypoxieinduzierten Depolarisationen, so genannten HSDs, äußert. Außerdem zeigten sich klare Hinweise für eine systemische Adaptation des Organismus an die beim Rett-Syndrom chronisch und repetitiv auftretenden Hypoxien. Dies schlägt sich unter anderem in einer Erhöhung des Hämatokrit-Wertes und erhöhter Expression des Hypoxiemarkers HIF-1 α (Hypoxie-induzierter Faktor 1 α) nieder (Fischer et al. 2009). Eine mögliche Erklärung für die erhöhte Hypoxieempfindlichkeit besteht in einer gestörten intrazellulären Ca²⁺-Homöostase. Folge dieser Störung ist eine verminderte Aktivierung von

protektiv wirksamen K^+ -Kanälen und damit einer abgeschwächten Stabilisierung des Membranpotentials durch Hyperpolarisation während der Frühphase der Hypoxie (Kron und Müller 2010).

Eines der Ziele dieser Arbeit war es nun, zu untersuchen, ob es auch im Hirnstamm von *Mecp2^{-y}*-Mäusen eine erhöhte Vulnerabilität des Gewebes gegenüber Hypoxie gibt.

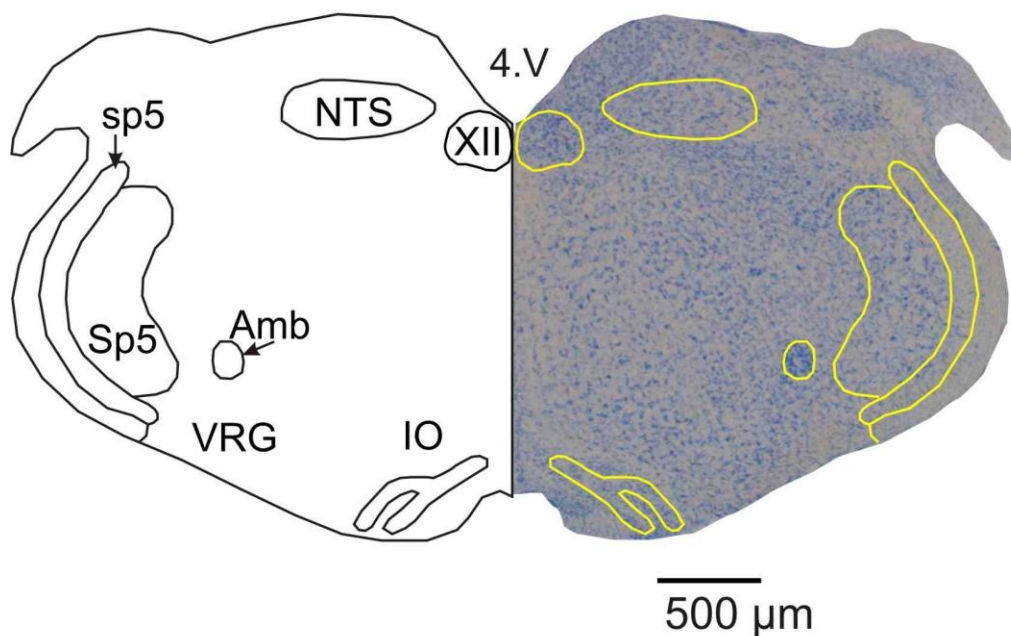


Abbildung 4: Transversaler Schnitt durch den Hirnstamm einer Maus auf Höhe des kaudalen Endes des 4. Ventrikels

Rechte Hälfte: Nissl-Färbung, linke Hälfte: Schema-Zeichnung mit eingezeichneten wichtigen anatomischen Bereichen (NTS: Nucleus tractus solitarius, 4.V: 4. Ventrikel, XII: Nucleus nervi hypoglossi, sp5: Tractus spinalis trigeminalis, Sp5: Nucleus spinalis trigeminalis, Amb: Nucleus ambiguus, IO: Inferiore Olive, VRG: ventrale respiratorische Gruppe)

Das Auftreten von HSDs in für die kardiorespiratorische Kontrolle wichtigen Bereichen des Hirnstamms könnte zu einer lebensbedrohlichen Beeinträchtigung oder gar Unterbrechung der neuronalen Funktionalität dieser Areale führen. So könnte eine Invasion des Prä-Bötzinger Komplexes (preBötC) im Bereich der ventralen respiratorischen Gruppe (VRG) durch die HSD zum Funktionsverlust in diesem wichtigen Bestandteil der respiratorischen

Rhythmogenese führen. Folge wäre ein Wegfall des zentralen Atemantriebs, der konsekutiv zum Atemstillstand führen würde. Es wurde bereits zuvor in Ratten gezeigt, dass es gelegentlich zu einer Ausbreitung der HSDs in den Bereich der VRG kommt (Funke et al. 2009). Da außerdem bekannt ist, dass das Auftreten von KCI-induzierten *spreading depressions* im Hirnstamm von nicht adulten Ratten *in vivo* tatsächlich zu einer Unterbrechung der respiratorischen Aktivität führen kann (Richter F et al. 2003), ist die Fragestellung nach einer erhöhten medullären Hypoxieempfindlichkeit bei *Mecp2^{-y}*-Mäusen sehr interessant. Die Tiere versterben zumeist im Alter von etwa 60 Tagen an Herz-Kreislauf- oder Atemversagen. Auch wenn die genaue Bedeutung des Auftretens von HSDs im Hirnstamm bisher nicht abschließend geklärt ist, ist das Vorliegen einer Art von Teufelskreis vorstellbar, da die HSDs zum einen als Folge einer Apnoe-induzierten Hypoxie auftreten können, zum anderen aber auch das Auftreten dieser Episoden begünstigen könnten. Tatsächlich zeigt sich auch klinisch, dass bis zu 25% der Rett-Patientinnen aufgrund von akutem Kreislaufversagen oder schweren Störungen der Atemregulation versterben (Kerr et al. 1997, Katz et al. 2009). Sowohl bei *Mecp2^{-y}*-Mäusen als auch bei Rett-Patientinnen spielt eine autonome Dysregulation von Atmung und Herz-Kreislauf-System also offensichtlich eine vital bedrohliche Rolle.

1.4 Messung atem-assoziiertes rhythmischer Aktivität in Hirnstammschnitten

Zur Untersuchung des Einflusses von HSDs auf die respiratorische Rhythmogenese eignen sich rhythmisch aktive Hirnstammschnitte, da sie die Messung einer atem-assoziierten Aktivität neuronaler Netzwerke *in vitro* ermöglichen (Smith et al. 1991). Die Präparation rhythmischer Schnitte wurde in unserer Arbeitsgruppe bereits zuvor aus dem Hirnstamm von Ratten erstellt (Funke et al. 2008). Um nun allerdings das Auftreten und die Auswirkungen einer HSD im rhythmisch aktiven Schnitt beobachten zu können, war eine Adaptation der bereits bekannten Präparations- und Messmethoden (Smith et al. 1991, Ramirez et al. 1996) notwendig. Um die Auslösung einer HSD durch Begasung der Schnitte mit Stickstoff zu ermöglichen, ist es erforderlich, die Schnitte anstatt wie zuvor in untergetauchtem Zustand (*submerged*) nun in einer Interface-Messkammer aufzubewahren und zu untersuchen. Die hypoxische

Auslösung einer HSD in Schnitten, die sich in untergetauchtem Zustand befinden, ist nicht in der Form möglich wie in einer Interface-Kammer, da bei untergetauchten Schnitten keine Gasphase besteht, aus der der Sauerstoff zuverlässig entzogen werden könnte. Auch der Abfluss der bei einer HSD entstehenden Ströme und akkumulierenden Ionen in die umgebende Flüssigkeit erschwert die Auslösung und auch die elektrophysiologische Detektion einer HSD an Schnitten in untergetauchtem Zustand. Darüberhinaus werden die in einer Interface-Kammer möglichen und zur Auslösung von HSDs notwendigen nahezu physiologischen Messtemperaturen von ca. 35-36°C von untergetauchten Schnitten nicht längerfristig toleriert. Dies liegt in der zu geringen Löslichkeit von Sauerstoff in Flüssigkeit dieser Temperatur und dem durch verstärkten Metabolismus erhöhten Sauerstoffbedarf des Schnittes bei höheren Temperaturen begründet. Nur in einer Interface-Kammer wird über die Carbogen (95% O₂, 5% CO₂)-Begasung der Kammer genügend Sauerstoff zur Verfügung gestellt, um die Schnitte bei nahezu physiologischen Temperaturen am Leben zu erhalten. Dies stellt einen weiteren Vorteil der Messung in Interface-Kammern dar, da so eine Messung unter realistischeren und nahezu physiologischen Bedingungen ermöglicht wird.

1.5 Serotonin-Rezeptor-Aktivierung durch 5-HT_{1A}-Rezeptor-Agonisten

Es ist bekannt, dass Serotonin-Rezeptor-Agonisten und speziell Agonisten des 5-HT_{1A}-Rezeptors eine neuroprotektive Wirkung haben (Prehn et al. 1991). Außerdem konnte bereits eine stabilisierende Wirkung der Serotonin-Agonisten auf die respiratorische Rhythmogenese (Richter DW et al. 2003) nachgewiesen werden. Ein Serotonin-Mangel im Hirnstamm ist assoziiert mit dem Auftreten des *Sudden Infant Death Syndrom* SIDS (Wilken et al. 1997, Audero et al. 2008, Duncan et al. 2010). Auch bei *MECP2*-defizienten Mäusen ließen sich im Verlaufe der postnatalen Entwicklung auftretende verminderte Serotonin-Spiegel im Gehirn nachweisen (Ide et al. 2005, Viemari et al. 2005).

Da außerdem bekannt ist, dass die Aktivierung von 5-HT_{1A}-Rezeptoren durch Serotonin-Agonisten wie 8-OH-DPAT (8-Hydroxy-N,N-dipropyl-2-aminotetralin) zu einer Abschwächung von hippokampalen KCl-induzierten SDs führt (Krüger et al. 1999) und eine Stabilisierung der Atmung bewirkt (Lalley et al. 1994, Stettner et al. 2008a, Dutschmann et al. 2009), wurde in dieser Arbeit der

Einfluss der 5HT_{1A}-Rezeptor-Aktivierung durch den Serotonin-Agonisten 8-OH-DPAT auf die Entstehung von HSDs im Hirnstamm untersucht. Diese Messungen sollten einen möglichen neuroprotektiven Effekt der Serotonin-Rezeptor-Aktivierung auf die Hypoxieempfindlichkeit des Hirnstammes zeigen und wurden sowohl bei *Mecp2*^{-y}- als auch bei Wildtyp-Tieren durchgeführt.

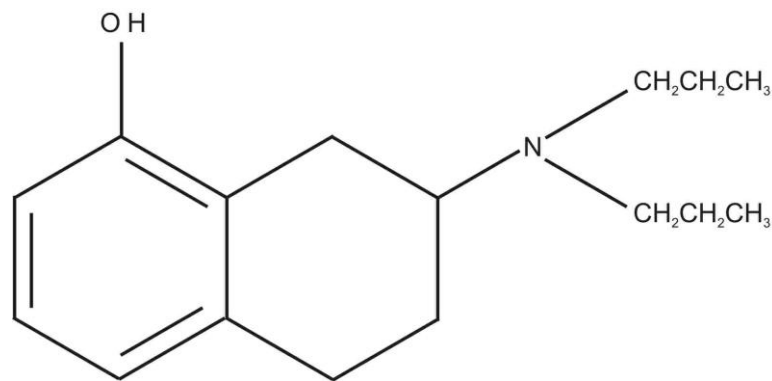


Abbildung 5: Struktuformel des 5-HT_{1A}-Agonisten 8-OH-DPAT (8-Hydroxy-N,N-dipropyl-2-aminotetralin)

1.6 Ziele dieser Arbeit

Aus den zuvor beschriebenen, bisher erforschten Sachverhalten ergaben sich als Fragestellung für diese Arbeit mehrere Ansatzpunkte. Zunächst stellte sich die grundlegende Frage, ob es prinzipiell möglich ist, HSDs in akuten Schnitten aus dem infantilen Hirnstamm von Mäusen auszulösen. In diesem Zusammenhang sollte auch festgestellt werden, welche Kerngebiete des Hirnstammes die Ausbreitung der HSD betrifft. Insbesondere die Frage, ob es zu einer regelmäßigen Invasion der respiratorischen Zentren des Hirnstammes im Bereich der ventralen respiratorischen Gruppe (VRG) kommt, ist für die Beurteilung des Einflusses von medullären HSDs auf die respiratorische Rhythmogenese von größter Bedeutung. Aus dem Hirnstamm von Ratten ist bekannt, dass eine Auslösung von HSDs hier zuverlässig nur im infantilen Hirnstamm und nach Konditionierung des Schnittes beispielsweise durch erhöhte extrazelluläre Kalium-Konzentrationen möglich ist (Funke et al. 2009). Daher sollte untersucht werden, ob HSDs im Hirnstamm von jungen Mäusen auch bei physiologischen Kalium-Konzentrationen auslösbar sind. Sollte eine Auslösung von HSDs im infantilen murinen Hirnstamm möglich sein, stellte dies die Grundlage für weitere Experimente dar. In diesen sollten eventuelle

Unterschiede bezüglich der Hypoxieempfindlichkeit und Ausbreitung von HSDs zwischen *Mecp2*^{-/-}- und Wildtyp-Tieren, wie sie aus dem Hippokampus bereits bekannt sind, untersucht werden.

Der nächste Schritt war, den Einfluss des 5-HT_{1A}-Rezeptor-Agonisten 8-OH-DPAT auf HSDs im Hirnstamm in Hinblick auf einen möglichen neuroprotektiven Effekt zu ermitteln. Zu diesem Zweck sollten mit 8-OH-DPAT vorbehandelte akute Hirnschnitte sowohl von *Mecp2*^{-/-}- als auch von Wildtyp-Tieren bezüglich einer veränderten Hypoxieempfindlichkeit des Gewebes gegenüber unbehandelten Kontrollschnitten analysiert werden.

Um die Auswirkung von Hypoxie und HSDs auf die respiratorische Funktion zu untersuchen, stellte sich die Frage, welche Auswirkungen das Auftreten einer HSD im Bereich der ventralen respiratorischen Gruppe des Hirnstamms auf die rhythmische atem-assoziierte Aktivität in diesem Bereich hat. Zu diesem Zweck musste zunächst ermittelt werden, ob es möglich ist, rhythmisch aktive Hirnschnitte in einer Interface-Kammer aufzubewahren und dort an diesen elektrophysiologische Messungen der respiratorischen Aktivität durchzuführen. Dies stellte eine neue, in dieser Form bisher nicht durchgeführte experimentelle Methodik dar.

2 Material und Methoden

2.1 Mausmodell für das Rett-Syndrom

Sämtliche Versuche wurden an akuten Hirnschnitten, das heißt an isoliertem Hirngewebe, durchgeführt; Versuche an lebenden Tieren fanden nicht statt. Als Modell für das Rett-Syndrom wurden sogenannte *Mecp2*^{-y}-Mäuse (B6.129P2(C)-*Mecp2*^{tm-1-1Bird}) verwendet (Guy et al. 2001). Zu deren Zucht wurden heterozygote Weibchen (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME) mit Wildtyp- (WT) Männchen (C57BL/6J) verpaart, um sowohl hemizygoten Männchen (*Mecp2*^{-y}) und heterozygote Weibchen (*Mecp2*^{+/-}), als auch Wildtyp-Mäuse beider Geschlechter zu erhalten. Homozygote *Mecp2*^{-/-}-Weibchen sind nicht lebensfähig, die heterozygoten weiblichen Tiere hingegen werden teilweise für die Fortführung der Zucht benötigt. Für die Versuche zu dieser Arbeit wurden ausschließlich männliche Tiere (*Mecp2*^{-y} und WT) verwendet, da bekannt ist, dass Östrogene im Zusammenhang mit einigen neurodegenerativen Erkrankungen und auch bei ischämischen Schädigungen, wie sie zum Beispiel durch einen Schlaganfall ausgelöst werden können, neuroprotektive Wirkungen zeigen können (Suzuki et al. 2006). Diese Effekte spielen bei den verwendeten jungen Tieren aufgrund der noch nicht eingetretenen Geschlechtsreife zwar eine untergeordnete Rolle, sind jedoch insbesondere bei den adulten Tieren von Bedeutung. Darüberhinaus ist bekannt, dass weibliche hemizygoten *Mecp2*^{+/-}-Tiere aufgrund der inhomogenen Inaktivierung des X-Chromosoms phänotypisch sehr variable Ausprägungen annehmen können und nur einen äußerst milden Phänotyp zeigen. Männliche *Mecp2*^{-y}-Tiere, die aufgrund des X-chromosomalen Erbganges als Knockout-Tiere anzusehen sind, zeigen eine deutlich homogenere Ausprägung der Symptome. Ein weiterer Vorteil der männlichen hemizygoten Tiere liegt darin, dass die Entwicklung der typischen Symptome bereits wenige Wochen postnatal beginnt, wohingegen weibliche heterozygote Tiere erst im Verlauf einiger Monate erste Symptome zeigen, die dann auch deutlich milder ausgeprägt sind (Bissonnette und Knopp 2006, Bissonnette et al. 2007, Katz et al. 2009).

Zur Untersuchung der Hypoxie-Empfindlichkeit des Hirnstammes wurden zum einen männliche Tiere im Alter von 10-15 Tagen und zum anderen männliche

Tiere im Alter von 45-50 Tagen verwendet.

Für die Ableitung der rhythmischen Aktivität des respiratorischen Netzwerkes wurden darüber hinaus in der Etablierungsphase der Ableitungen 6-10 Tage alte männliche NMRI-Mäuse verwendet.

2.2 Präparation der akuten Hirnschnitte

Die zuvor unter einer Glasglocke tief anästhesierten (Diethylether, Sigma Aldrich) Mäuse wurden mit einer Schere im Bereich des kranialen Teils der Wirbelsäule dekapitiert. Daraufhin wurden die Kopfhaut und der Schädel mit einer scharfen Schere und einer stumpfen Pinzette von kaudal her eröffnet und das so freigelegte Gehirn umgehend mit eiskalter, zuvor mit Carbogen (95% O₂ / 5% CO₂) begaster ACSF (*artificial cerebrospinal fluid*) gespült. Anschließend wurde das vollständige Gehirn mit Hilfe eines stumpfen Spatels zügig entnommen und dann zur Minimierung von ischämischer Schädigung für 1-2 min in eisgekühlter, mit Carbogen begaster ACSF abgekühlt. Bei der Entnahme des Gehirns aus der Schädelhöhle wurden dickere Hirnnerven teilweise mit Hilfe einer feinen Schere oder der Spatelkante abgetrennt, um ein Zerreißen des Hirnstammes zu verhindern. Anschließend wurde der Hirnstamm auf einem Filterpapier durch Entfernung des Groß- und Mittelhirns und des Cerebellums mit einem scharfen Skalpell isoliert. Der verbleibende Rest wurde auf einem vorbereiteten und vorgekühlten, um 25° abgewinkelten Agaroseblock mit Sekundenkleber (Roti coll 1, Carl Roth, Karlsruhe) fixiert. Dabei wurde die dorsale Schnittfläche des isolierten Hirnstammes auf der schrägen Schnittfläche des Agaroseblocks aufgelegt, wobei das rostrale Ende des Hirnstammes nach oben zeigte. Mit einem Vibroslicer (752M, Campden Instruments, Loughborough, UK) wurden bei hoher Vibrationsfrequenz und sehr geringer Vorschubgeschwindigkeit je nach Alter der Tiere und der daraus folgenden Größe des Hirnstammes zwei bis fünf 400 µm dicke schräg-transversale Gewebeschnitte aus dem Bereich des vierten Ventrikels hergestellt.

2.2.1 Präparation der rhythmisch aktiven Schnitte

Die an Ratten bereits beschriebene Präparation der rhythmischen Hirnschnitte (Smith et al. 1991, Funke et al. 2009), erfolgte analog zum oben beschriebenen

Vorgehen, allerdings wurde die Schnittdicke auf 650 µm erhöht, um möglichst den kompletten Bereich der ventralen respiratorischen Gruppe (VRG) in einem Schnitt zu erfassen. Zur Orientierung beim Erstellen der rhythmischen Schnitte wurden der Bereich der *Area postrema* am ventralen bzw. kaudalen Ende des vierten Ventrikels und die Wurzeln des *N. hypoglossus (N. XII)* genutzt. Aufgrund der anatomischen Konfiguration ließ sich aus jedem Versuchstier maximal ein rhythmisch aktiver Schnitt herstellen. Aus diesem Grund wurden zunächst keine *Mecp2^{-y}*-Mäuse, sondern normale Wildtyp-Mäuse (NMRI und Wildtyp-Tiere aus der *Mecp2^{-y}*-Zucht) verwendet.

2.3 Aufbewahrung der Schnitte und Versuchsaufbau

Die frisch präparierten Schnitte wurden dann in eine Interface-Mess- und Aufbewahrungskammer vom Oslo-Typ (Croning und Haddad 1998) überführt und dort bei 35,5°C für mindestens 90 min zur Erholung vom mechanischen Trauma der Präparation ungestört gelassen. Lediglich bei den rhythmischen Hirnschnitten wurde bereits nach einer kurzen Erholungszeit von 15 min mit der Ableitung rhythmischer Aktivität begonnen.

Während der Aufbewahrung und zwischen den Hypoxie-Versuchen wurde die Kammer kontinuierlich mit Carbogen (Flussrate ca. 0,4 l/min) begast. Die Hirnschnitte wurden mit ACSF umspült, welche zuvor in einem Wasserbad erwärmt und zur pH-Äquilibration (pH 7,4) mit Carbogen begast (Flussrate 4-5 ml/min) wurde. In diesem Milieu sind die akuten Hirnschnitte maximal für etwa fünf bis sechs Stunden verwendbar.

Die verwendete Interface-Kammer besteht aus zwei vollständig voneinander unabhängigen Kammern mit jeweils eigener Gas- und ACSF-Versorgung. Dies ermöglicht die gleichzeitige Untersuchung und auch Behandlung eines Hirnschnittes mit Pharmaka in der Messkammer, während in der zweiten Kammer die weiteren Schnitte in Kontrolllösung und begast mit Carbogen aufbewahrt werden. In einer Interface-Kammer vom Oslo-Typ liegen die Hirnschnitte auf einem Netz und damit an der Grenzfläche zwischen kontinuierlich ausgetauschter ACSF und dem zugeführten Gas; die Sauerstoffversorgung der Hirnschnitte erfolgt dabei nahezu vollständig aus der Gasphase. Dadurch lässt sich eine Hypoxie der in der Messkammer

befindlichen Schnitte ohne größere Zeitverzögerung erreichen. Die Wirkung in die Lösung applizierter Pharmaka tritt jedoch aufgrund des verlängerten Diffusionsweges mit zeitlicher Verzögerung ein. Dies macht ein Einwaschen der verwendeten Medikamente vor Beginn der Hypoxie für ~ 20 min notwendig.

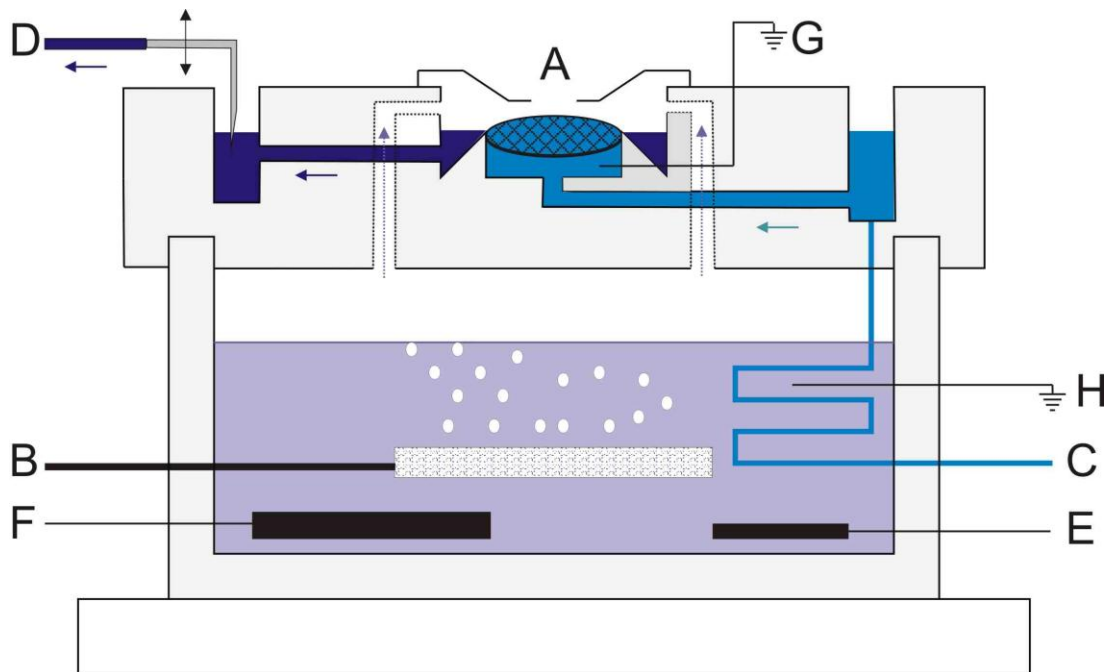


Abbildung 6: Interface-Kammer vom Oslo-Typ

In der Messkammer (A) liegt der Schnitt auf Linienpapier auf einem Nylonnetz, die Kammer ist mit einem Deckel bis auf eine kleine Öffnung verschlossen. Über einen Begasungsstein (B) im darunter liegenden Wärmebad wird die Kammer kontinuierlich mit Carbogen, beziehungsweise zur Erzeugung einer Hypoxie mit Stickstoff (+ 5% CO₂ zur pH-Konstanthaltung) begast. Über den Zulauf (C) wird die Kammer mit frischer, bereits zuvor in einem außerhalb der Kammer befindlichen Wasserbad vorerwärmter und mit Carbogen begaster ACSF durchspült. Im Wasserbad unter der Kammer wird die ACSF weiter erwärmt und gelangt dann in die eigentliche Messkammer (A). Die ACSF strömt dann durch einen Kanal aus der Kammer und wird anschließend über eine höhenverstellbare Kanüle (D) mit einer Unterdruckpumpe abgesaugt. Die Kammer ist über die Temperatursonde (E) mit einer Heizung verbunden und wird von dieser über das Heizelement (F) auf einer konstanten Temperatur von 35,5°C gehalten. Die Erdung der Messkammer (G) erfolgt über eine im Boden des Wasserbades innerhalb der Kammer liegende Elektrode. Die Erdungselektrode im Wasserbecken (H) dient dazu, elektronische Artefakte der Heizung und der Heizungssteuerung in der Messung zu verringern.

Die Versorgung der beiden Kammern mit der zuvor in einem Wasserbad erwärmten und mit Carbogen begasten ACSF erfolgt über eine Rollenpumpe

(205S, Watson & Marlow GmbH, Rommerskirchen) mit getrennten Schlauchsystemen für die Aufbewahrungs- und die Messkammer. Hinter die Rollenpumpe ist in beiden Versorgungskreisläufen jeweils ein Windkessel (Eigenbau, Zentrum Physiologie, Universität Göttingen) geschaltet, der in erster Linie der elektrischen Entkoppelung der Messkammer und damit der Minimierung von Rauschartefakten dient. Darüberhinaus werden mit Hilfe dieser Windkessel Pulsationen im Flüssigkeitsspiegel der Interface-Kammern und die Entstehung von Luftblasen im Schlauchsystem erfolgreich vermieden. Die Absaugung der ACSF aus den Kammern erfolgt mit einer Unterdruckpumpe über Kanülen, deren Höhe über eine Justierschraube reguliert werden kann. Dies ermöglicht eine präzise Einstellung der gewünschten Höhe des Flüssigkeitsspiegels in den Kammern.

Beheizt wird die Interface-Kammer über eine Heizspirale, die sich in einem Wasserbad unterhalb der Mess- und Aufbewahrungskammern befindet. Die Zuleitungen zur Versorgung der Kammern mit ACSF verlaufen durch dieses Wasserbad. Über einen sich ebenfalls in diesem Wasserbad befindlichen Temperaturfühler und eine Heizung (Eigenbau Elektronikwerkstatt, Zentrum Physiologie, Universität Göttingen) wurde die Temperatur auf dem Netz der Messkammer auf konstant 35,5°C reguliert.

Die verwendeten Temperatureinstellungen und Schnittdicken sind Standardbedingungen, unter denen auch im Hirnstamm von Ratten die Auslösung von HSD möglich ist (Funke et al. 2009).

Zur Detektion der intrinsischen optischen Signale (IOS) wurden die Schnitte mit einer Kaltlichtquelle (KL 1500 LCD, Schott AG, Mainz) beleuchtet.

2.4 Verwendete Gase, Lösungen und Pharmaka

Zur Begasung der Interface-Kammern und der vorgewärmten Lösungen wurde Carbogen verwendet. Dieses setzt sich zu 95% aus O₂ und zu 5% aus CO₂ zusammen. Der CO₂-Anteil dient zur pH-Äquilibrierung der Lösung. Zur Auslösung einer Hypoxie wurde die Begasung der Mess-Interfacekammer auf Stickstoff (95% N₂, 5% CO₂) gewechselt.

In den Versuchen wurde ACSF (*artificial cerebrospinal fluid*) mit der in Tabelle 1

dargestellten Zusammensetzung verwendet. Die Lösungen wurden in vollentsalztem Wasser angesetzt und mit Hilfe eines Magnetrührers durchmischt. Zu beachten ist hier, dass in das vorgelegte Wasser zunächst die CaCl_2 - und MgSO_4 -Stammlösungen und erst danach die zuvor hergestellte ACSF-Stammlösung (NaCl , KCl , NaH_2PO_4 , NaHCO_3) und die Glucose zugegeben werden müssen, um ein Ausfällen der Salze zu verhindern.

Für einige Versuche wurde die K^+ -Konzentration in der verwendeten ACSF zur Konditionierung der Schnitte auf bis zu 8 mM erhöht. Bei der Messung an rhythmischen Schnitten wurden verschiedene K^+ -Konzentrationen von 3,5 bis 8 mM verwendet. Für Versuche an Hirnschnitten von adulten Tieren wurde zur Konditionierung teilweise hypotone ACSF verwendet. In dieser ist die NaCl -Konzentration um 30 mM vermindert.

	ACSF normal	ACSF 8 mM K^+	ACSF 3,5 mM K^+ hypoton (-30 mM NaCl)
NaCl	130 mM	130 mM	100 mM
KCl	3,5 mM	8 mM	3,5 mM
NaH_2PO_4	1,25 mM	1,25 mM	1,25 mM
NaHCO_3	24 mM	24 mM	24 mM
CaCl_2	1,2 mM	1,2 mM	1,2 mM
MgSO_4	1,2 mM	1,2 mM	1,2 mM
Glucose	10 mM	10 mM	10 mM

Tabelle 1: Zusammensetzung der verwendeten Lösungen

Zur Untersuchung eines möglichen neuroprotektiven Effektes der Serotonin-Rezeptor-Aktivierung wurde der 5-HT_{1A}-Agonist 8-OH-DPAT (8-Hydroxy-N,N-dipropyl-2-aminotetralin, Sigma Aldrich, 50 μM) verwendet. Dazu wurde eine wässrige 50 mM Stammlösung hergestellt, die dann tiefgefroren aufbewahrt und für die Experimente aufgetaut sowie in ACSF auf eine Endkonzentration von 50 μM verdünnt wurde.

2.5 Hypoxie-Protokoll

Durch Umschalten der Begasung der Messkammer von Carbogen auf Stickstoff (95% N₂, 5% CO₂) ließ sich in der Messkammer eine schwere Hypoxie hervorrufen, die in der Regel innerhalb von 1-2 Minuten zur Auslösung einer HSD in dem dort befindlichen Schnitt führte. Zur Vermeidung von hypoxie-induzierten irreversiblen Veränderungen wurden die Schnitte 20 s nach dem Beginn (*onset*) der HSD durch Umschalten der Begasung auf Carbogen reoxygeniert. Innerhalb dieser Zeit hatte die DC-Potential-Veränderung ihren Tiefpunkt bereits erreicht. Die Versuchslösungen wurden auch während des Sauerstoffentzugs weiterhin mit Carbogen begast. Aus diesem Grund wird hier durchgehend der Begriff Hypoxie anstelle von Anoxie verwendet, obgleich davon ausgegangen werden kann, dass im Gewebeschnitt tatsächlich nahezu anoxische Bedingungen vorliegen, da das Gewebe im Schnitt seinen O₂-Bedarf vor allem aus der Gasphase der Interface-Kammer deckt.

2.6 Elektrophysiologische Ableitungen

2.6.1 Extrazelluläre DC-Potentiale

Im Rahmen dieser Arbeit wurden extrazelluläre DC-Potentialveränderungen während Hypoxie in verschiedenen Bereichen des Hirnstamms gemessen. Im Rahmen des Auftretens von hypoxieinduzierten *spreading-depression*-ähnlichen Depolarisationen (HSDs) kommt es im Extrazellulärraum zu einer messbaren negativen Verschiebung des DC-Potentials, die als Korrelat der massiven Membrandepolarisation der Neurone angesehen werden kann.

Die zur Detektion des extrazellulären Potentials benötigten Messelektroden wurden aus dünnwandigem Borosilikat-Glas (GC150TF-10, Harvard Apparatus, Edenbridge, UK) mit einem Horizontal-Elektrodenziehgerät (P-97, Flaming/Brown Micropipette Puller, Sutter Instruments Co., Novato, USA) gezogen. Die Elektroden wurden anschließend mit ACSF befüllt und durch gezieltes Zurückbrechen der Elektrodenspitze mit einer Pinzettenspitze auf einen Widerstand von ca. 5 MΩ getrimmt. Zur Messung wurden die Elektroden dann an die Messköpfe des Feldpotentialverstärkers angeschlossen, die an einem Manipulator mit Magnetfuß befestigt waren. Dies ermöglichte das

zielgenaue Ausrichten und Einstechen der Elektroden und so die Ableitung von Signalen aus definierten Kerngebieten der Hirnstammschnitte.

Die Messungen wurden mit einem DC-Potential Verstärker (Eigenbau der Elektronikwerkstatt, Zentrum Physiologie, Universität Göttingen) durchgeführt, von einem Analog-/Digitalwandler (Axon Digitizer 1322A, Molecular Devices, Sunnyvale, USA) mit einer Abtastrate von 100 Hz digitalisiert und mit dem Softwarepaket pCLAMP 9 (Molecular Devices) auf PC aufgezeichnet. Darüber hinaus diente ein Oszilloskop (TDS2014, Tektronix, Beaverton, USA) zur visuellen Kontrolle der elektrophysiologischen Messungen.

2.6.2 Messung rhythmischer Massenaktivität

Zur Detektion einer rhythmischen Aktivität im Bereich der ventralen respiratorischen Gruppe (VRG) wurden extrazelluläre Summenpotentiale im Bereich des Prä-Bötzinger Komplexes abgeleitet. Die hierzu verwendeten Elektroden wurden bis auf einen Widerstand von ca. 1 M Ω abgebrochen und ebenfalls mit ACSF befüllt. Die gemessenen Signale wurden aufgeteilt und zum einen als DC-Potential über die oben beschriebene Anlage digitalisiert, zum anderen als AC-Signal über einen Bandpassfilter und einen Gleichrichter/Integrator (beides Eigenbau der Elektronikwerkstatt, Zentrum Physiologie, Universität Göttingen) geleitet und dann ebenfalls über den Axon AD-Wandler in pCLAMP als integriertes Signal gleichzeitig mit dem DC-Potential dargestellt und aufgezeichnet. Dies ermöglichte die sichere Detektion einer HSD im DC-Potential bei gleichzeitiger Beobachtung der Auswirkung der HSD auf die rhythmische Aktivität der VRG im integrierten Signal.

2.7 Optische Messungen

Im Gegensatz zur elektrophysiologischen Messung mit Elektroden, die eine Detektion von Veränderungen nur an einer begrenzten Zahl von Punkten, das heißt den jeweiligen Einstichstellen, ermöglicht, erlaubt die optische Aufnahme von intrinsischen optischen Signalen (IOS) die zweidimensionale Betrachtung der Ausbreitung der HSD in Echtzeit.

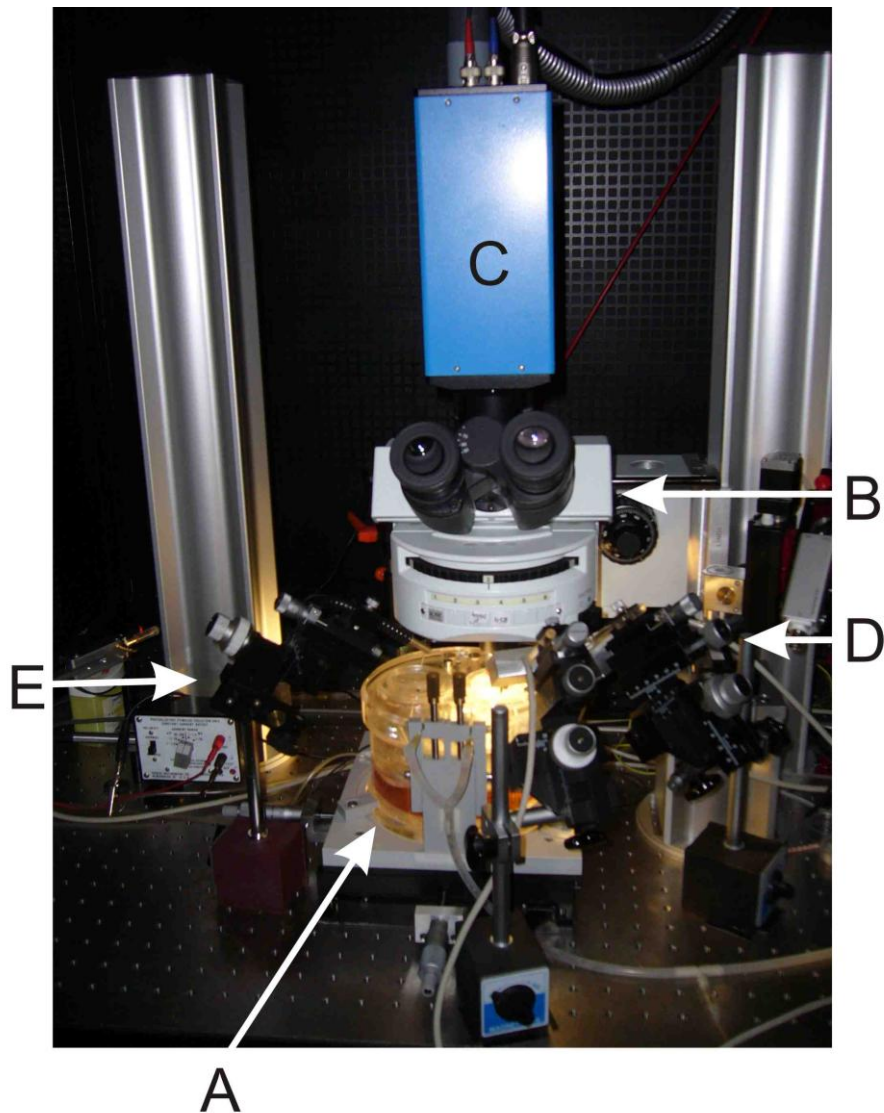


Abbildung 7: Versuchsaufbau

Der Versuchsaufbau besteht aus der Interface-Kammer (A) mit dem darüber montierten Mikroskop (B) und der CCD-Kamera (C). Die Messelektroden an den Messköpfen sind an den Manipulatoren mit Magnetfuß (D) befestigt. Die Kaltlichtquelle (E) dient zur optischen Messung der IOS. Der Aufbau steht auf einem optischen, vibrationsgedämpften Tisch in einem Faraday'schen Käfig zur elektrischen Abschirmung der Messung.

Zur Messung der Lichtreflexion an der Gewebeoberfläche wurden für diese Arbeit ein Computer-gestütztes Imaging System (Polychrome II, Till Photonics, Gräfelfing, Deutschland) und eine hocheinsensitive CCD-Kamera (Imago QE, PCO Imaging, Kelheim, Deutschland) verwendet (Hepp und Müller 2008). Die Gewebeschnitte wurden mit weißem Licht einer Kaltlichtquelle in einem Winkel von ca. 45° bestrahlt und in 2-s-Intervallen mit 15 ms Belichtungszeit durch ein 5x, 0.13NA Objektiv (Epiplan, Zeiss) an einem Mikroskop (Olympus BX51W)

aufgezeichnet. Um die Helligkeits-Unterschiede deutlicher herauszustellen, wurde nach der Messung von den entstandenen Bildern jeweils das erste Bild einer Reihe subtrahiert. Dann wurden diese Reihen auf die prähypoxische Baseline-Reflexion normalisiert und in einer 256-Graustufen-Skala, die eine Bandbreite von $\pm 20\%$ Helligkeitsveränderung abdeckt, dargestellt. Die optische Auswertung wurde mit Hilfe der Bildverarbeitungsprogramme Tillvision 4.0 (Till Photonics, Gräfelfing, Deutschland) und MetaMorph Offline 6.1 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) durchgeführt.

2.8 Datenanalyse und Statistik

Alle Daten in dieser Arbeit wurden als Mittelwerte mit Standardabweichung dargestellt. Die Anzahl der Experimente (n) bezieht sich auf die Anzahl der verwendeten Schnitte, auch wenn von diesen mehrere aus einem Versuchstier stammen.

Bei den mit 8-OH-DPAT vorbehandelten Schnitten, sowie den vergleichenden Kontrollmessungen, wurden die zweite und dritte ausgelöste HSD jeweils auf die erste unter Kontroll-Bedingungen ausgelöste HSD normalisiert. Die resultierenden Prozentwerte für die zweite und dritte HSD beziehen sich also jeweils auf die erste im selben Schnitt ausgelöste HSD. Ein Prozentwert von 100% bedeutet somit, dass der jeweilige Parameter zwischen der ersten und zweiten beziehungsweise ersten und dritten HSD exakt konstant blieb.

Statistische Signifikanztests wurden mit dem ungepaarten zweiseitigen t-test nach Student in Microsoft Excel durchgeführt. Für die Signifikanztestung der normierten zweiten HSDs wurde ein Einstichproben-t-test verwendet. Auf dem 5%-Niveau ($p < 0,05$) signifikante Unterschiede wurden in den Abbildungen und Tabellen mit einem Stern (*), auf dem 1%-Niveau ($p < 0,01$) signifikante Unterschiede mit zwei Sternen (**) und auf dem 0,1%-Niveau ($p < 0,001$) signifikante Ergebnisse mit drei Sternen (***) markiert.

3 Ergebnisse

3.1 Hirnstamm-HSDs bei juvenilen Wildtyp- und *Mecp2*^{-/-}-Mäusen

Bereits in vorangegangenen Versuchen konnte gezeigt werden, dass hippocampale Hirnschnitte von *Mecp2*^{-/-}-Mäusen eine erhöhte Hypoxie-Empfindlichkeit aufweisen (Fischer et al. 2009). Dort zeigte sich im Vergleich zu Wildtyp-Tieren ein beschleunigtes Auftreten von Hypoxieantworten in Form von sogenannten HSDs (hypoxieinduzierten *spreading-depression*-ähnlichen Depolarisationen). Darüber hinaus wurde bereits gezeigt, dass die Auslösung von HSDs auch in Hirnstammschnitten von Ratten möglich ist (Funke et al. 2009).

Ziel dieser Arbeit war es nun zunächst, zu untersuchen, ob sich auch im Hirnstamm von Mäusen HSDs auslösen lassen und ob auch in medullären Hirnschnitten von *Mecp2*^{-/-}-Mäusen eine gegenüber Wildtyp-Tieren veränderte Hypoxieempfindlichkeit vorliegt. Eine eventuelle erhöhte Hypoxieempfindlichkeit könnte als Erklärungsansatz für die Störungen der Atmung in Form von rezidivierenden, intermittierenden systemischen hypoxischen Episoden bei Rett-Patientinnen dienen, aber auch eine Konsequenz der systemischen Hypoxie sein. Für diese Arbeit wurden daher das Auftreten und die Charakteristika von HSDs im Hirnstamm von *Mecp2*^{-/-}- mit Wildtyp-Mäusen verglichen. Diese Versuche wurden in ACSF zum einen mit normaler physiologischer Kalium-Konzentration (3.5 mM) und zum anderen mit erhöhter Kalium-Konzentration (8 mM) durchgeführt.

Zur Erzeugung der schweren Hypoxie wurde die Begasung der akuten Hirnstammschnitte von Carbogen (95% O₂, 5% CO₂) zu Stickstoff (95% N₂, 5% CO₂) gewechselt. Die vorgewärmte ACSF wurde währenddessen weiterhin mit Carbogen begast.

An den dann auftretenden HSDs wurden als Messparameter die Zeit vom Sauerstoffentzug bis zum Auftreten der HSD (*onset* Δt in s), die maximale Amplitude der extrazellulären DC-Potential-Veränderung (ΔV in mV) und die Dauer der HSD ($t_{1/2}$ in s, gemessen auf der Höhe der halbmaximalen Amplitude) bestimmt (siehe Abbildung 8).

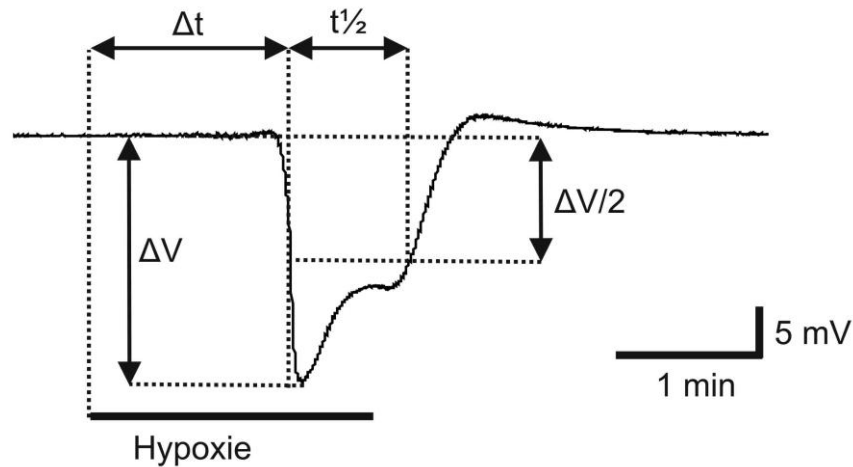


Abbildung 8: Gemessene und analysierte Parameter der HSD-assoziierten DC-Signale

Gemessen wurden die Zeit von der Einleitung der Hypoxie durch Umschalten der Begasung auf Stickstoff (+ 5% CO₂) bis zum Beginn der steilen DC-Negativierung (Δt), die maximale Amplitude der DC-Potential-Negativierung bezogen auf die vorherige normoxische Baseline (ΔV) und die Länge der HSD, gemessen als die Zeit zwischen dem Beginn der steilen DC-Negativierung und dem Zeitpunkt der halbmaximalen Amplitude während der posthypoxischen Erholung des Gewebes ($t_{1/2}$).

Es zeigte sich, dass HSDs im Hirnstamm von juvenilen Mäusen - anders als bei Ratten (Funke et al. 2009) - sowohl in normaler ACSF (3,5 mM K⁺) als auch bei erhöhten extrazellulären Kalium-Spiegeln (8 mM K⁺) zuverlässig auslösbar sind.

3.1.1 Analyse der intrinsischen optischen Signale (IOS)

Aufgrund der in vorangegangenen Versuchen mit Hirnstammschnitten von Ratten gewonnenen Erkenntnisse war davon auszugehen, dass der bevorzugte Bereich der HSD-Induktion der dorsale Anteil des spinalen Nucleus trigeminus (sp5) sei (Funke et al. 2009). Bei der Analyse der während der ersten Versuche zu dieser Arbeit aufgezeichneten IOS zeigte sich allerdings, dass anders als bei Ratten der Beginn der HSD zumeist im dorsalen Anteil des murinen Hirnstammes im Bereich des Nucleus tractus solitarius (NTS) liegt. Die HSDs begannen bei WT-Mäusen zu 58% und bei *Mecp2*^{-y}-Tieren zu 44% im NTS und ließen sich hier auch am zuverlässigsten auslösen. Aus diesem Grund fokussierte ich mich für die folgenden Versuche auf den NTS als primären Messpunkt für die Platzierung der Ableitelektrode.

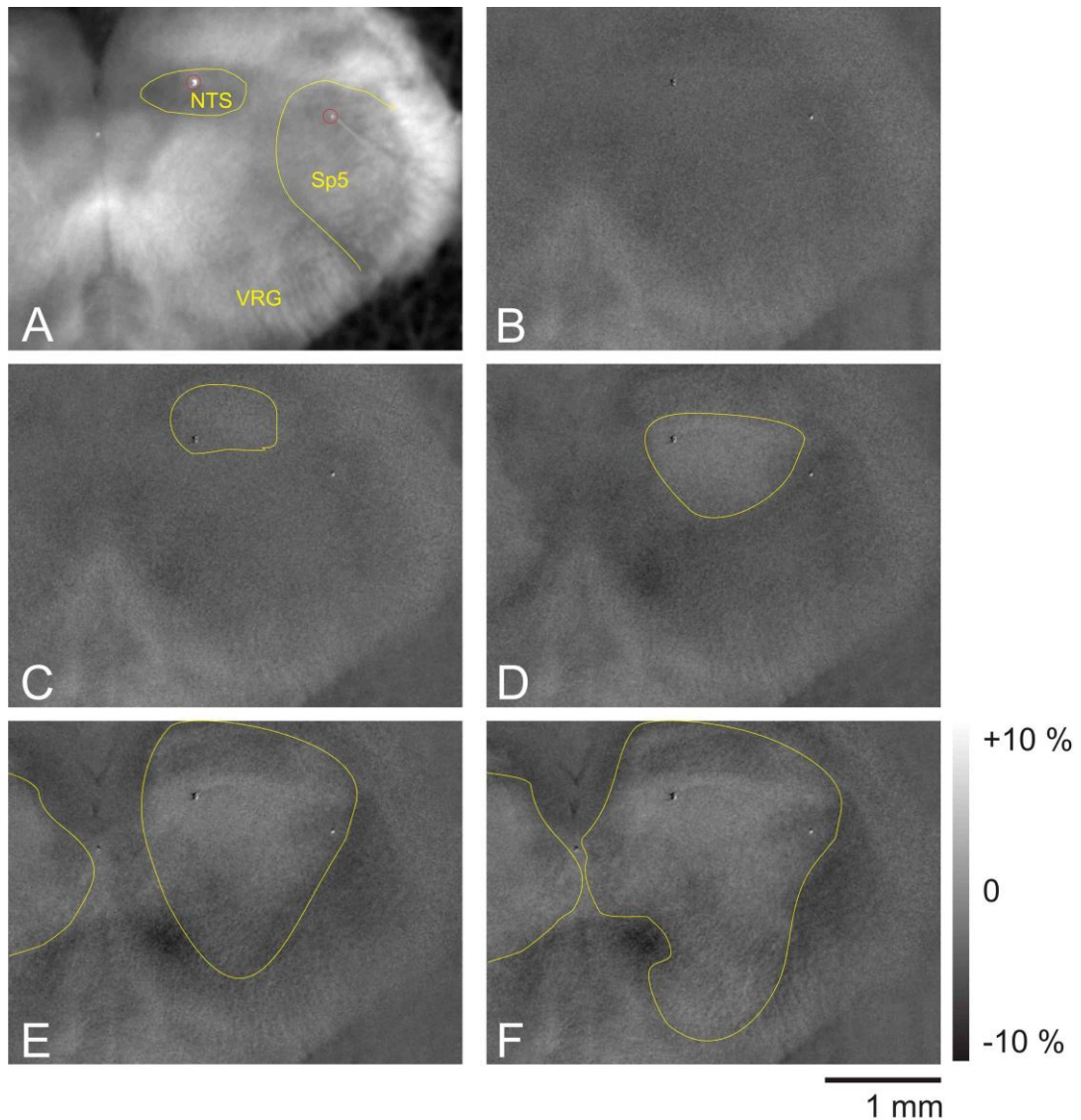


Abbildung 9: IOS in einem Wildtyp-Hirnstammschnitt

Die strikte Kopplung von IOS und DC-Potential-Veränderung während einer HSD ermöglicht mit Hilfe der nicht-invasiven IOS-Analyse die Identifikation der Bereiche des Hirnstamms, die vom Auftreten der HSD betroffen sind. (A: Übersichtsbild mit NTS: Nucleus tractus solitarius; Sp5: Nucleus spinalis nervi trigemini; VRG: ventrale respiratorische Gruppe; Einstichstellen der Ableitelektroden in NTS und dorsalem Sp5 (rot markiert); B-F: Ausbreitung der HSD (gelb umrandete Aufhellung des Gewebes) im Hirnstamm ausgehend vom NTS. Die Bilder wurden im Abstand von 6 s aufgenommen).

Darüberhinaus zeigte sich bei der Analyse der IOS, dass die Ausbreitung der HSD im Hirnstamm bei *Mecp2^{+/y}*-Tieren generell etwas schwächer ausgeprägt ist. Es kam seltener zur Invasion der ventralen respiratorischen Gruppe (VRG; 75% beim Wildtyp; 45% bei *Mecp2^{+/y}*-Tieren), das Ausbreitungsmuster war

generell etwas limitierter als beim Wildtyp.

Mit erhöhter extrazellulärer Kalium-Konzentration (8 mM K^+) kam es teilweise zur multifokalen Entstehung von HSDs. Die HSD breitete sich in diesen Fällen also nicht kontinuierlich von einem Bereich des Hirnstammes in andere Kerngebiete aus, sondern es kam nacheinander oder nahezu gleichzeitig zum Auftreten von HSDs in verschiedenen Bereichen des Hirnstammeschnittes. Ein eindeutiges Schema war hier nicht erkennbar, die primäre Induktion der HSD fand in verschiedensten Bereichen des Hirnstammes statt.

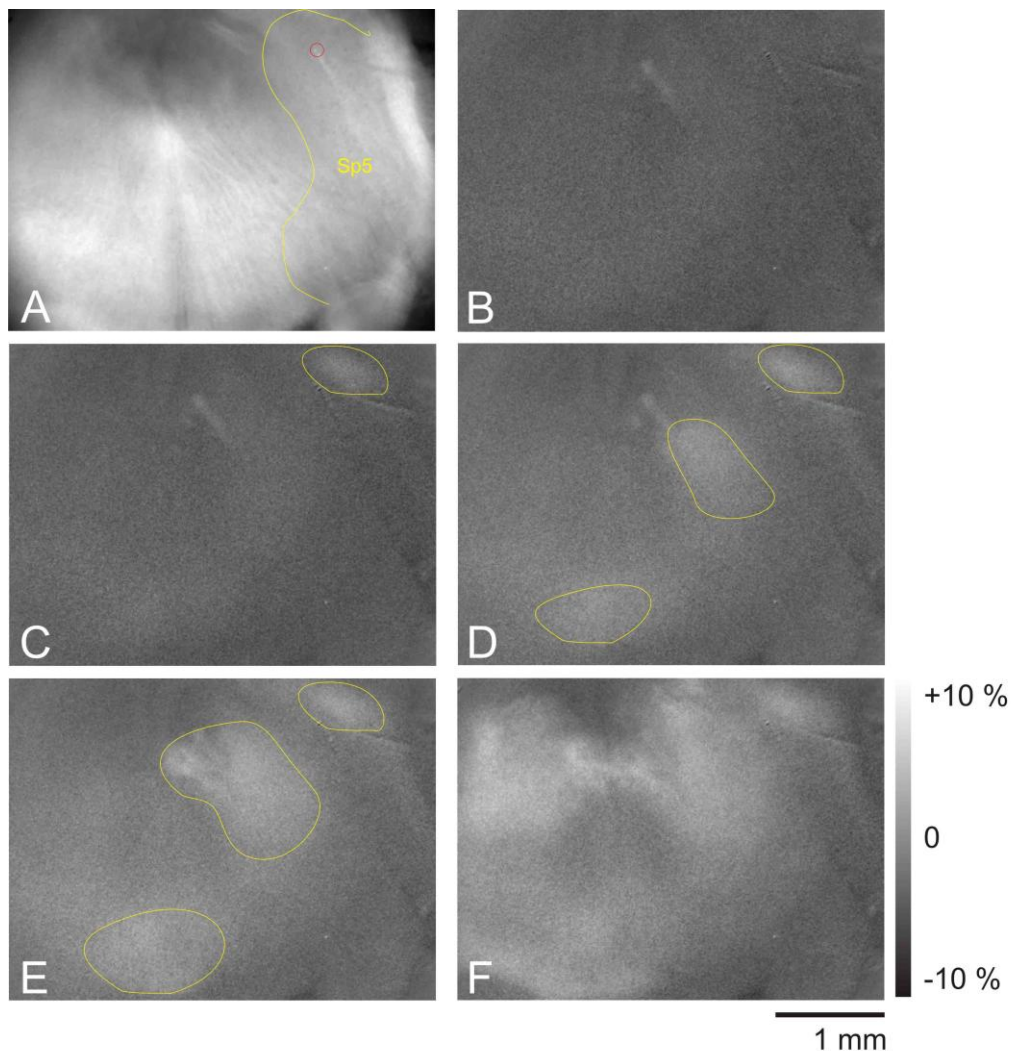


Abbildung 10: IOS in einem Wildtyp-Hirnstammeschnitt mit 8 mM extrazellulärer K^+ -Konzentration

Es zeigt sich eine multifokale Induktion der HSD, zu erkennen an den verschiedenen Bereichen des Hirnstammes, in denen das IOS nahezu gleichzeitig auftritt (gelb markierte Aufhellungen des Hirnstammeschnittes).

3.1.2 Analyse der elektrophysiologischen Ableitungen

Aufgrund der bei der Auswertung der IOS gewonnenen Erkenntnisse erfolgte die Ableitung des extrazellulären DC-Potentials zur elektrophysiologischen Detektion der HSD vor allem aus dem Nucleus tractus solitarius (NTS). Zu Vergleichszwecken wurden aber auch aus anderen Kerngebieten des Hirnstamms HSDs abgeleitet.

Da aus Versuchen an Ratten bekannt war, dass die Auslösung von HSDs dort nur bei erhöhten extrazellulären K^+ -Konzentrationen (8 mM K^+) möglich ist (Funke et al. 2009), wurden auch die initialen Versuche zu dieser Arbeit unter diesen Bedingungen durchgeführt.

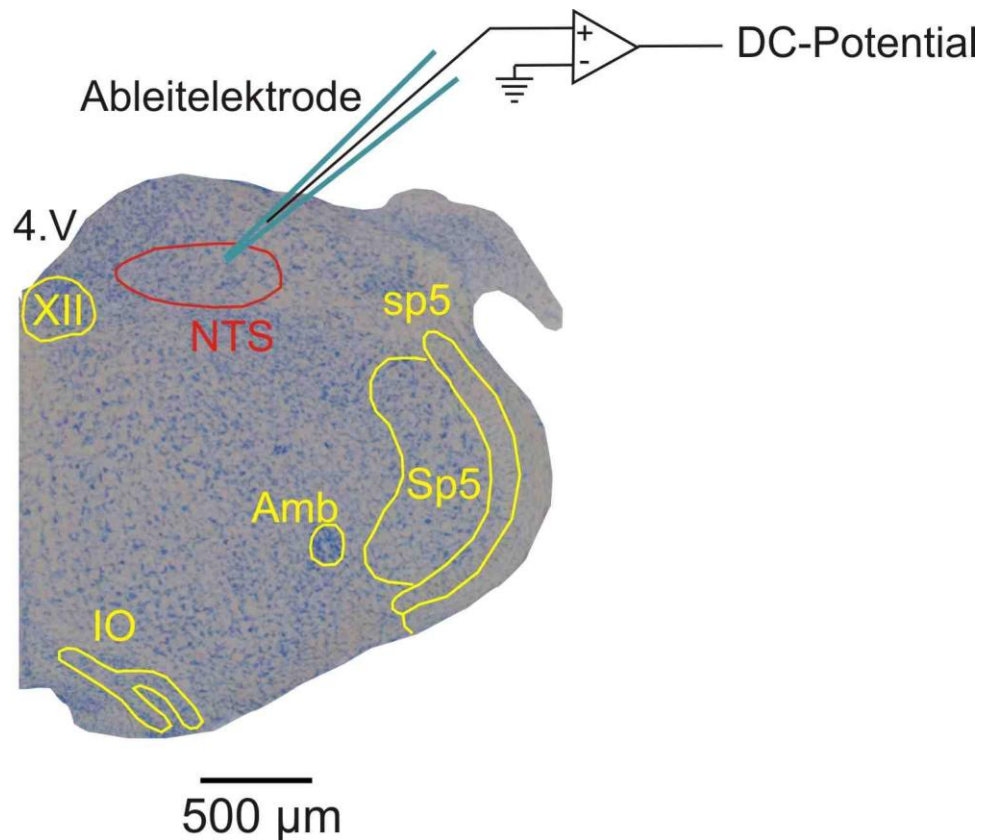


Abbildung 11: Ableitung aus dem Nucleus tractus solitarius (NTS)

Transversaler Schnitt durch den Hirnstamm einer Maus auf Höhe des kaudalen Endes des 4. Ventrikels. NTS: Nucleus tractus solitarius, 4V: 4. Ventrikel, XII: Nucleus nervi hypoglossi, sp5: Tractus spinalis trigeminalis, Sp5: Nucleus spinalis trigeminalis, Amb: Nucleus ambiguus, IO: Inferiore Olive, VRG: ventrale respiratorische Gruppe.

Auch in anderen Kerngebieten des Hirnstamms ließen sich HSDs elektrophysiologisch ableiten, traten hier allerdings nicht so zuverlässig und

meist auch erst später als im NTS auf. Dies bestätigt die in der IOS-Analyse erhobenen Befunde, die eine hauptsächliche Induktion der HSD im Bereich des NTS zeigten.

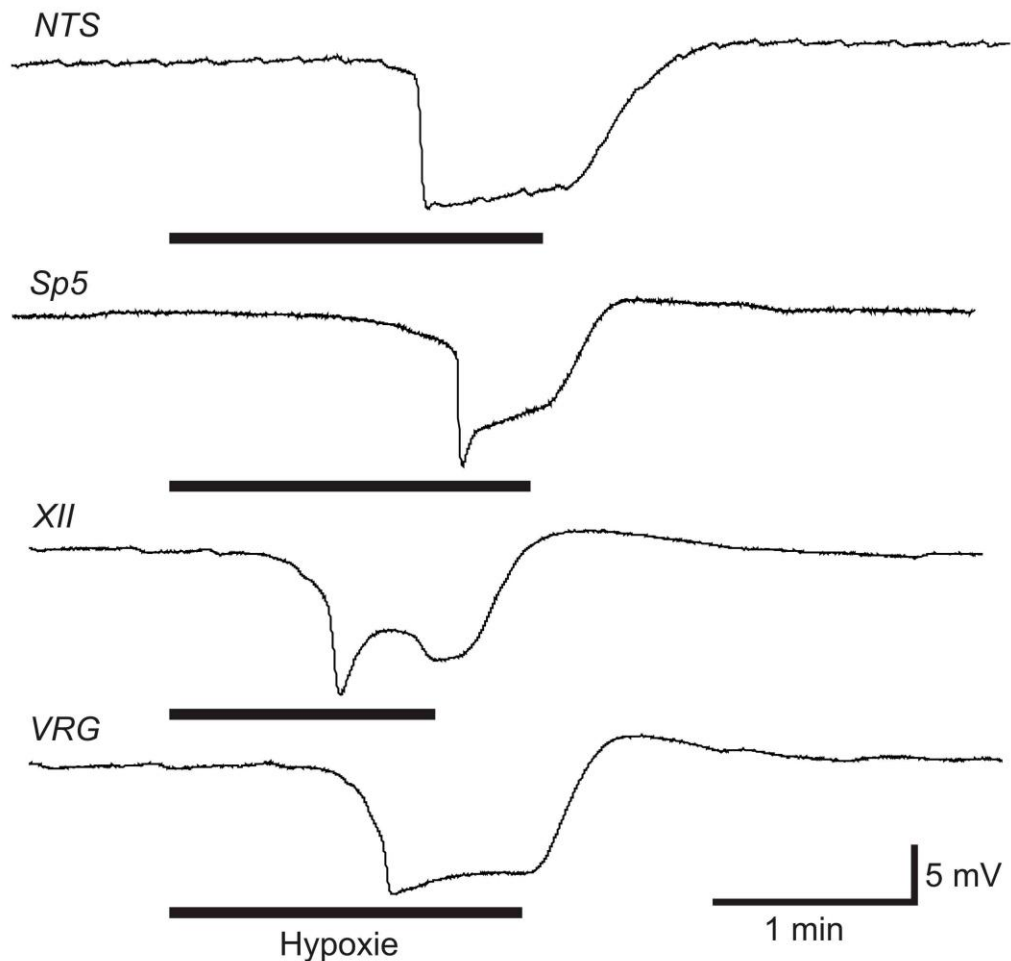


Abbildung 12: Charakteristische negative Veränderungen des extrazellulären Potentials gemessen in verschiedenen Kerngebieten innerhalb des Hirnstammes von Wildtyp-Tieren mit 3,5 mM extrazellulärer K^+ -Konzentration

Es zeigen sich deutliche Unterschiede in den Charakteristika der auftretenden HSDs. Eine Vergleichbarkeit der Parameter wie *onset* und Amplitude ist jedoch nicht gegeben, da es sich hier lediglich um einzelne Beispielmessungen handelt. Nucleus spinalis trigemini (Sp5), Nucleus tractus solitarius (NTS), Nucleus hypoglossus (XII) und ventrale respiratorische Gruppe (VRG).

3.1.2.1 Versuche bei einer extrazellulären K^+ -Konzentration von 8 mM

Die initialen Versuche zu dieser Arbeit wurden in ACSF mit auf 8 mM erhöhter Kalium-Konzentration durchgeführt. Die folgenden Messwerte stammen aus

dem Bereich des Nucleus tractus solitarius (NTS). Bei Ableitung aus dem spinalen Nucleus trigeminus (sp5) zeigte sich eine ähnliche Tendenz, aus dem im vorherigen Abschnitt genannten Grund fokussiere ich mich in dieser Arbeit aber auf den NTS.

Bei den Wildtyp-Tieren traten die HSDs hier durchschnittlich $42,8 \pm 5,4$ s nach Einleitung der Hypoxie durch Wechsel der Begasung auf (*onset*, Δt). Die mittlere Amplitude (ΔV) der HSDs betrug $-17,7 \pm 5,8$ mV bei einer mittleren Dauer ($t_{1/2}$) von $31,2 \pm 5,9$ s ($n = 10$).

Im Vergleich dazu war die mittlere Zeit bis zum Auftreten der HSD (Δt) bei den *Mecp2*^{-/-}-Tieren mit $30,4 \pm 5,8$ s signifikant beschleunigt ($p < 0,001$), was auch für den *Mecp2*^{-/-}-Hirnstamm eine erhöhte Hypoxie-Empfindlichkeit suggeriert. Die mittlere Amplitude der HSDs ($\Delta V = -17,6 \pm 5,3$ mV) sowie die mittlere Dauer ($t_{1/2} = 36,5 \pm 9,0$ s) zeigten jedoch keine signifikante Veränderung im Vergleich zum Wildtyp ($n = 12$).

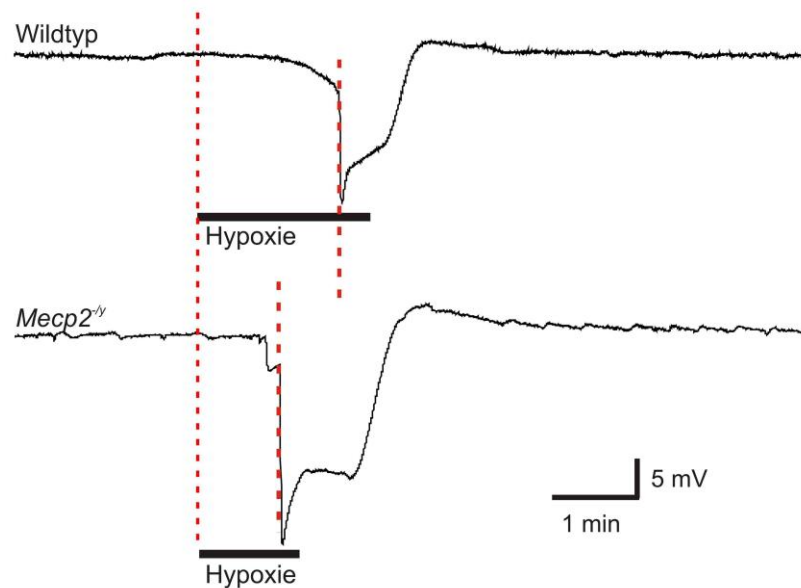


Abbildung 13: Beispiel-Ableitungen des DC-Potentials der HSDs mit 8 mM extrazellulärer K⁺-Konzentration aus dem NTS in einem Wildtyp- im Vergleich zu einem *Mecp2*^{-/-}-Tier

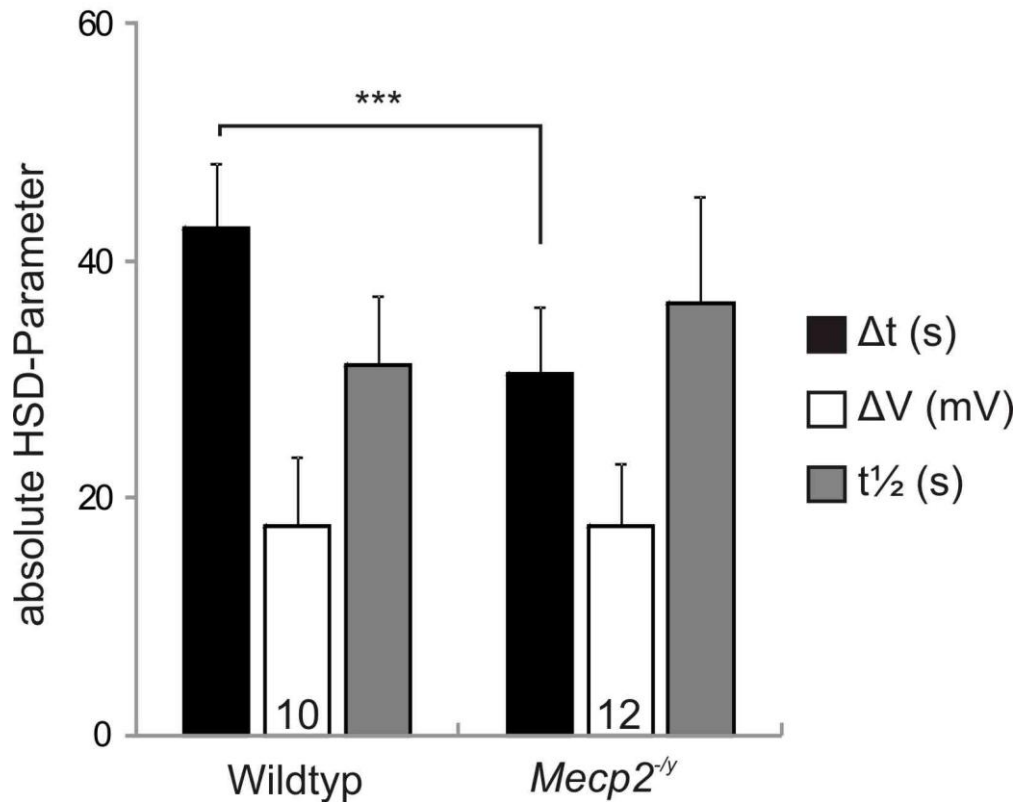


Abbildung 14: Parameter der HSD mit 8 mM extrazellulärer K⁺-Konzentration im NTS im Vergleich von Wildtyp zu *Mecp2*^{-/-}

Es zeigt sich ein signifikant verkürzter *onset* der HSD ($p < 0,001$, ***) bei *Mecp2*^{-/-}-Tieren. Die Amplitude der negativen DC-Potential-Veränderung ΔV ist zur besseren Übersichtlichkeit invertiert dargestellt. Die Zahlen am Fuß der Balken geben die jeweilige Anzahl der gemessenen Hirnstammschnitte (n) an. Die eingezeichneten Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.

Bei einigen der gemessenen Schnitte wurde nach erfolgter Reoxygenierung und einer Erholungszeit von 20 min eine zweite HSD ausgelöst, um zu untersuchen, ob eine Induktion von HSDs irreversible Veränderungen im Hirnstammgewebe hinterlässt, die zu einer Veränderung der Parameter einer weiteren ausgelösten HSD führt. Dies ist zur Beurteilung der Wirkung von Pharmaka wichtig und wird im Abschnitt 3.3 „Einfluss von Serotonin-Rezeptor-Modulation auf die Hypoxieempfindlichkeit“ nochmals aufgegriffen.

Die Parameter *onset*, Amplitude und Dauer der zweiten HSD waren weder beim Wildtyp (n=5) noch bei den *Mecp2*^{-/-}-Tieren (n=5) gegenüber der ersten HSD signifikant verändert. Eine detaillierte Auflistung der HSD-Parameter findet sich in Tabelle 2.

Dieser Sachverhalt erlaubt die Schlussfolgerung, dass eine repetitive Hypoxie, sofern sie jeweils rechtzeitig beendet wird, keine unmittelbaren irreversiblen Veränderungen in der Hypoxieempfindlichkeit und Vitalität des Gewebes verursacht. Auch ist es aufgrund dieser Befunde möglich, Messungen an mit Pharmaka behandelten Schnitten mit Kontrollmessungen an unbehandelten Schnitten zu vergleichen (siehe 3.3).

NTS 8 mM K ⁺		Wildtyp	<i>Mecp2</i> ^{-/-}
1. HSD	Δt (s)	42,8 ± 5,4 (n=10)	30,4 ± 5,8 *** (n=12)
	ΔV (mV)	-17,7 ± 5,8	-17,6 ± 5,3
	t _{1/2} (s)	31,2 ± 5,9	36,5 ± 9,0
2. HSD	Δt (s)	43,8 ± 3,9 (n=5)	31,0 ± 4,3 *** (n=5)
	ΔV (mV)	-17,8 ± 3,4	-18,6 ± 3,5
	t _{1/2} (s)	34,1 ± 6,3	38,6 ± 6,0
2. HSD normalisiert auf 1. HSD	Δt	100,5 ± 8,2 % (n=5)	99,3 ± 6,6 % (n=5)
	ΔV	103,3 ± 13,8 %	89,5 ± 11,7 %
	t _{1/2}	104,4 ± 6,7 %	113,9 ± 37,8 %

Tabelle 2: Parameter der HSD bei einer extrazellulären K⁺-Konzentration von 8 mM im NTS im Vergleich von Wildtyp zu *Mecp2*^{-/-}

Absolute HSD-Parameter der ersten und zweiten HSD sowie Parameter der zweiten HSD normalisiert auf die erste HSD im selben Schnitt. Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der ersten und zweiten HSD. Die Prozentwerte beziehen sich auf die Werte der Kontrollmessung, das heißt ein Prozentwert von 100,5% steht für eine Zunahme um 0,5%. Die Sterne geben die Signifikanzniveaus der Veränderungen an (siehe 2.8).

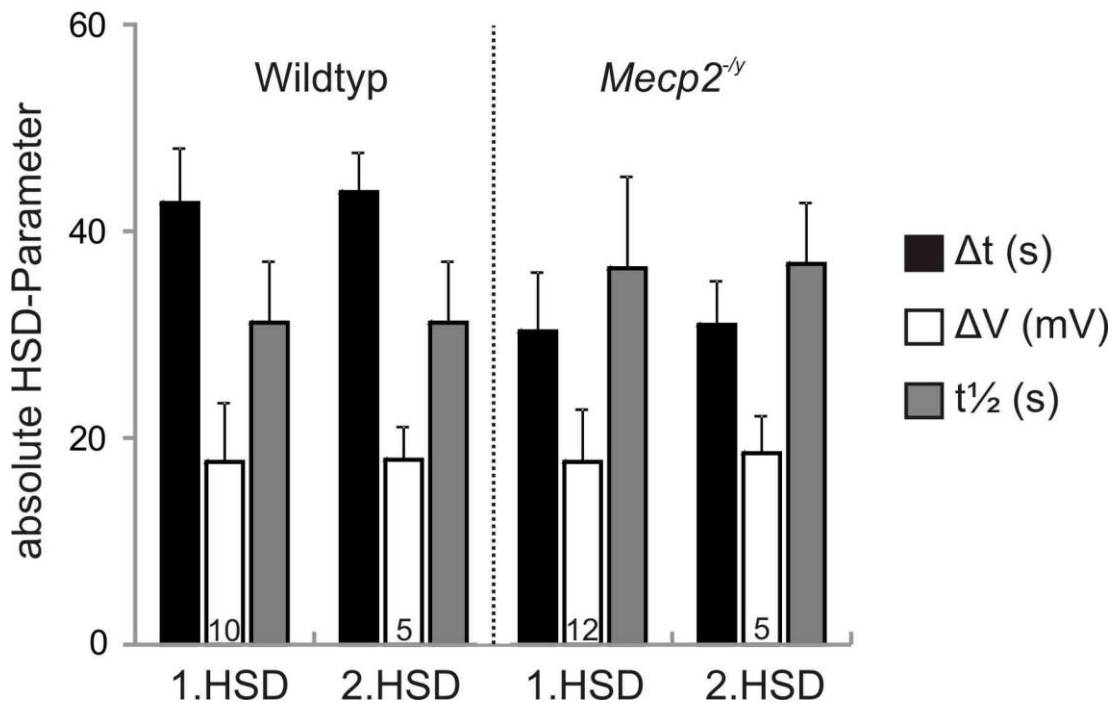


Abbildung 15: Parameter der ersten und zweiten HSD bei einer extrazellulären K^+ -Konzentration von 8 mM im NTS bei Wildtyp und *Mecp2^{-/-}*

Es zeigen sich keine signifikanten Änderungen zwischen den Parametern der ersten und zweiten ausgelösten HSD.

3.1.2.2 Versuche bei einer extrazellulären K^+ -Konzentration von 3,5 mM

Da es sich zeigte, dass eine Auslösung von HSDs auch mit einer normalen physiologischen Kalium-Konzentration zuverlässig möglich ist, wurden in der Folge Messungen in normaler ACSF mit 3,5 mM K^+ durchgeführt. Auch diese Messungen stammen aus dem Bereich des NTS.

Unter diesen Bedingungen trat die HSD beim Wildtyp nach durchschnittlich $67,4 \pm 16,4$ s mit einer Amplitude von $-22,4 \pm 3,4$ mV und einer mittleren Dauer von $53,1 \pm 11,7$ s auf (n = 18).

Im Vergleich dazu waren der *onset* ($\Delta t = 69,5 \pm 18,0$ s) und die Amplitude ($\Delta V = -21,1 \pm 2,8$ mV) der HSD bei einer extrazellulären K^+ -Konzentration von 3,5 mM nicht signifikant verändert. Dagegen war die mittlere Dauer der HSD mit $42,5 \pm 5,8$ s im Vergleich zum Wildtyp signifikant verkürzt ($p < 0,01$; n = 17).

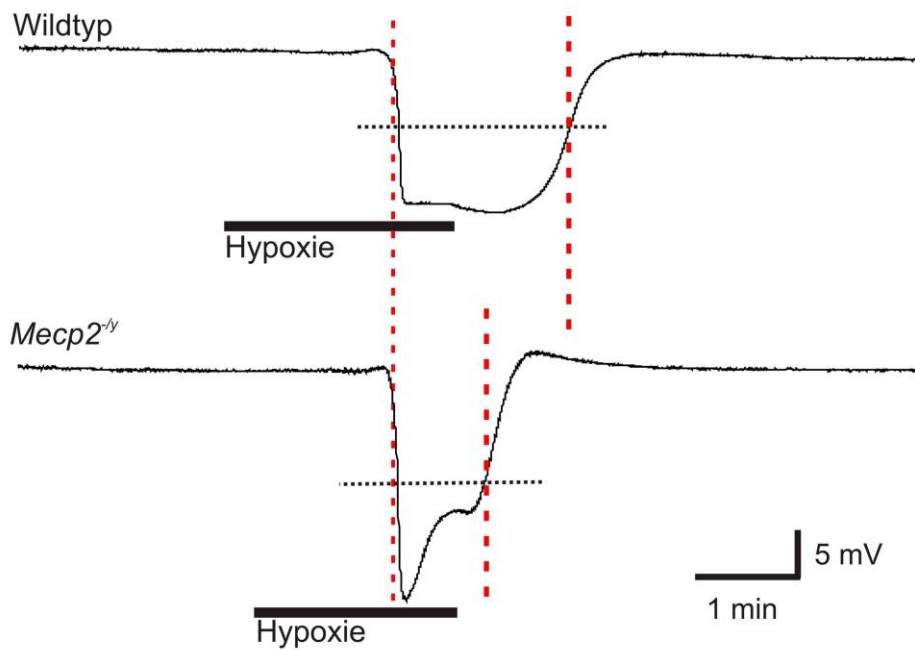


Abbildung 16: Beispielableitung aus dem NTS bei einer extrazellulären K⁺-Konzentration von 3,5 mM im Vergleich von Wildtyp zu *Mecp2^{-/-}*

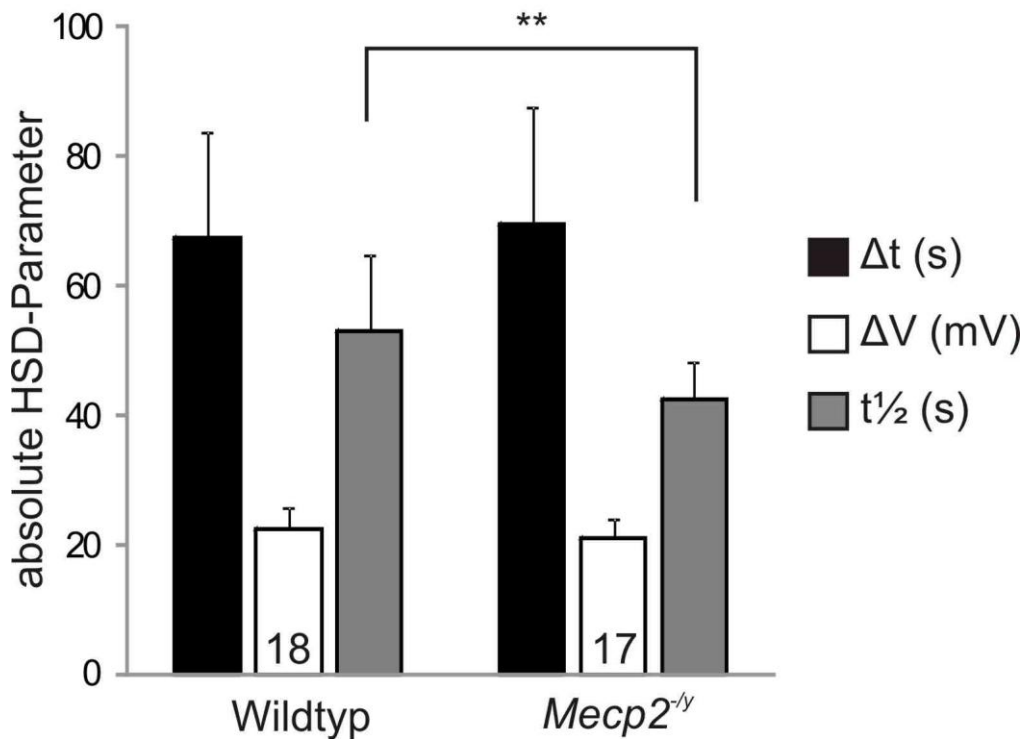


Abbildung 17: Parameter der HSD bei einer extrazellulären K⁺-Konzentration von 3,5 mM im NTS im Vergleich von Wildtyp zu *Mecp2^{-/-}*

Die mittlere Dauer der HSD t_{1/2} ist bei den *Mecp2^{-/-}*-Tieren signifikant (**) verkürzt.

Bei einigen Schnitten wurden nach jeweils 20 min Erholungsphase ebenfalls bei einer extrazellulären K^+ -Konzentration von 3,5 mM eine zweite und dritte HSD ausgelöst, um Vergleichswerte für die mit 8-OH-DPAT behandelten Schnitte zu erhalten (siehe 3.3). Die dabei gemessenen Parameter wurden zur besseren Vergleichbarkeit jeweils auf die erste im selben Schnitt ausgelöste HSD normalisiert und als Prozentangaben dargestellt. Die Prozentwerte bezeichnen also die Parameter der zweiten beziehungsweise dritten HSD relativ zu denen der ersten ausgelösten HSD.

Hier zeigte sich, dass sowohl beim Wildtyp als auch bei den *Mecp2^{-/-}*-Tieren der *onset* und die Amplitude der zweiten und dritten HSD sich von denen der ersten HSD nicht signifikant unterschieden (siehe Tabelle 3).

Allerdings war beim Wildtyp die mittlere Dauer $t_{1/2}$ sowohl der zweiten HSD mit $116,3 \pm 9,7\%$ ($p < 0,01$) als auch der dritten HSD mit $121,3 \pm 8,9\%$ ($p < 0,001$) signifikant verlängert ($n=6$). Auch bei den *Mecp2^{-/-}*-Tieren waren die zweite HSD mit $114,0 \pm 14,1\%$ ($p < 0,01$) und die dritte HSD mit $124,5 \pm 22,5\%$ ($p < 0,01$) signifikant verlängert ($n=9$).

NTS 3,5 mM K^+		Wildtyp (n=6)	<i>Mecp2^{-/-}</i> (n=9)
2. HSD normalisiert auf 1. HSD	Δt	$99,0 \pm 4,4\%$	$100,8 \pm 5,1\%$
	ΔV	$100,3 \pm 7,8\%$	$99,2 \pm 7,7\%$
	$t_{1/2}$	$116,3 \pm 9,7\%$ **	$114,0 \pm 14,1\%$ **
3. HSD normalisiert auf 1. HSD	Δt	$101,5 \pm 5,7\%$	$102,0 \pm 9,3\%$
	ΔV	$96,2 \pm 13,8\%$	$96,5 \pm 10,3\%$
	$t_{1/2}$	$121,3 \pm 8,9\%$ ***	$124,5 \pm 22,5\%$ **

Tabelle 3: Parameter der zweiten und dritten ausgelösten HSD bei einer extrazellulären K^+ -Konzentration von 3,5 mM jeweils normalisiert auf die erste HSD im selben Schnitt

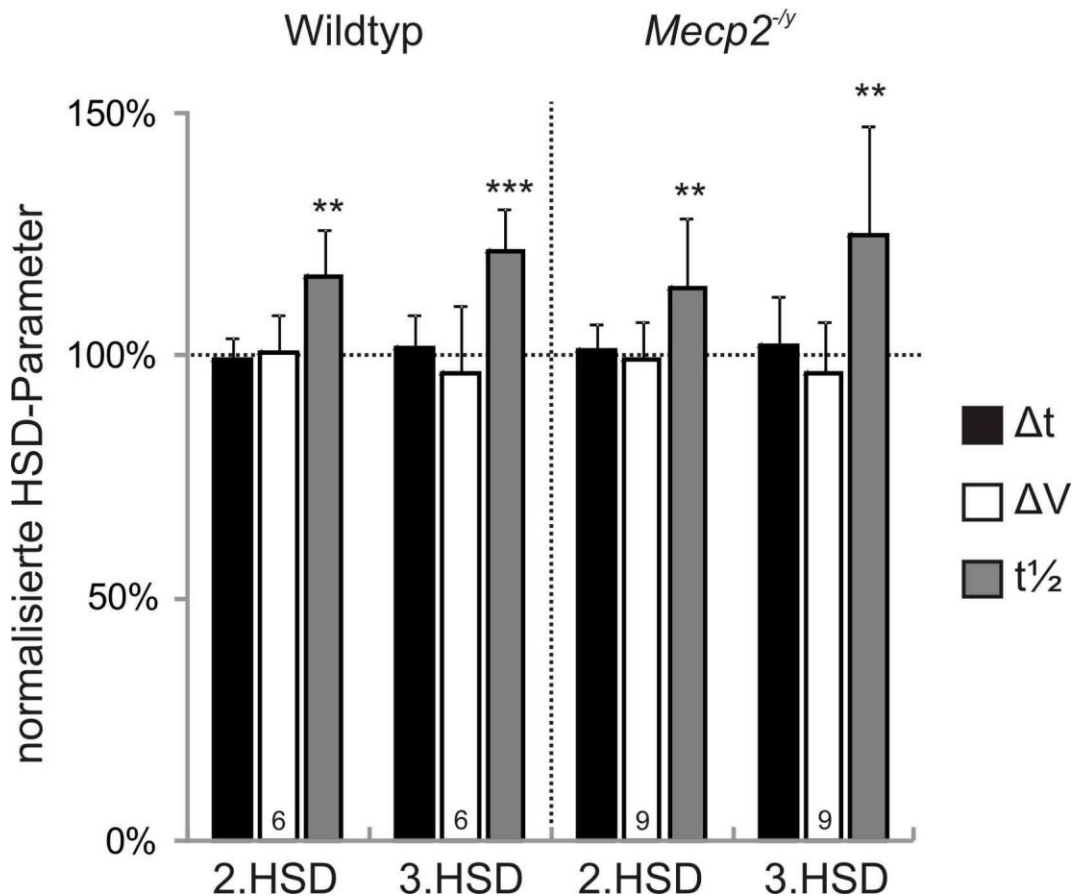


Abbildung 18: Parameter der zweiten und dritten ausgelösten HSD bei einer extrazellulären K^+ -Konzentration von 3,5 mM jeweils normalisiert auf die erste HSD im selben Schnitt

Die mittlere Dauer $t_{1/2}$ der zweiten und dritten HSD ist sowohl bei den *Mecp2^{-/-}*-Tieren als auch beim Wildtyp gegenüber der jeweiligen ersten HSD signifikant verlängert.

3.1.2.3 Vergleich physiologischer mit erhöhter Kalium-Konzentration

Im Vergleich der bei zwei verschiedenen extrazellulären Kalium-Konzentrationen (3,5 und 8 mM K^+) durchgeführten Versuche (siehe 3.1.2.1 und 3.1.2.2) zeigte sich, dass die HSDs mit 8 mM extrazellulärer K^+ -Konzentration signifikant früher auftreten als bei normalen (3,5 mM) Kalium-Konzentrationen.

Der *onset* (Δt) der HSDs mit 8 mM K^+ (n=10) war bei Wildtyptieren mit $42,8 \pm 5,4$ s gegenüber den HSDs mit 3,5 mM K^+ mit $67,4 \pm 16,4$ s (n=18) im Mittel um 36,5% verkürzt (p<0,001).

Bei *Mecp2^{-/-}*-Tieren trat die HSD mit 8 mM K^+ (n=12) mit $30,4 \pm 5,8$ s gegenüber denen unter physiologischer Kalium-Konzentration (n=17) mit $69,5 \pm 18,0$ s im

Mittel um 56,3% beschleunigt auf ($p < 0,001$).

Die Amplituden (ΔV) der DC-Potentialveränderungen zeigten bei den verschiedenen Kalium-Konzentrationen keinen signifikanten Unterschied.

Die Dauer der HSD ($t_{1/2}$) war bei Wildtyp-Tieren mit 8 mM extrazellulärer K^+ -Konzentration ($n=10$) mit $31,2 \pm 5,9$ s gegenüber den HSDs bei in normaler ACSF ($n=18$) mit $53,1 \pm 11,7$ s im Mittel um 41,2% verkürzt ($p < 0,001$).

Auch bei *Mecp2*^{-/-}-Tieren zeigte sich eine allerdings weniger stark ausgeprägte Verkürzung der HSD im Mittel um 14,1% bei erhöhter Kaliumkonzentration mit $36,5 \pm 9,0$ s ($n=12$) gegenüber $42,5 \pm 5,8$ s ($n=17$) in ACSF ($p < 0,05$).

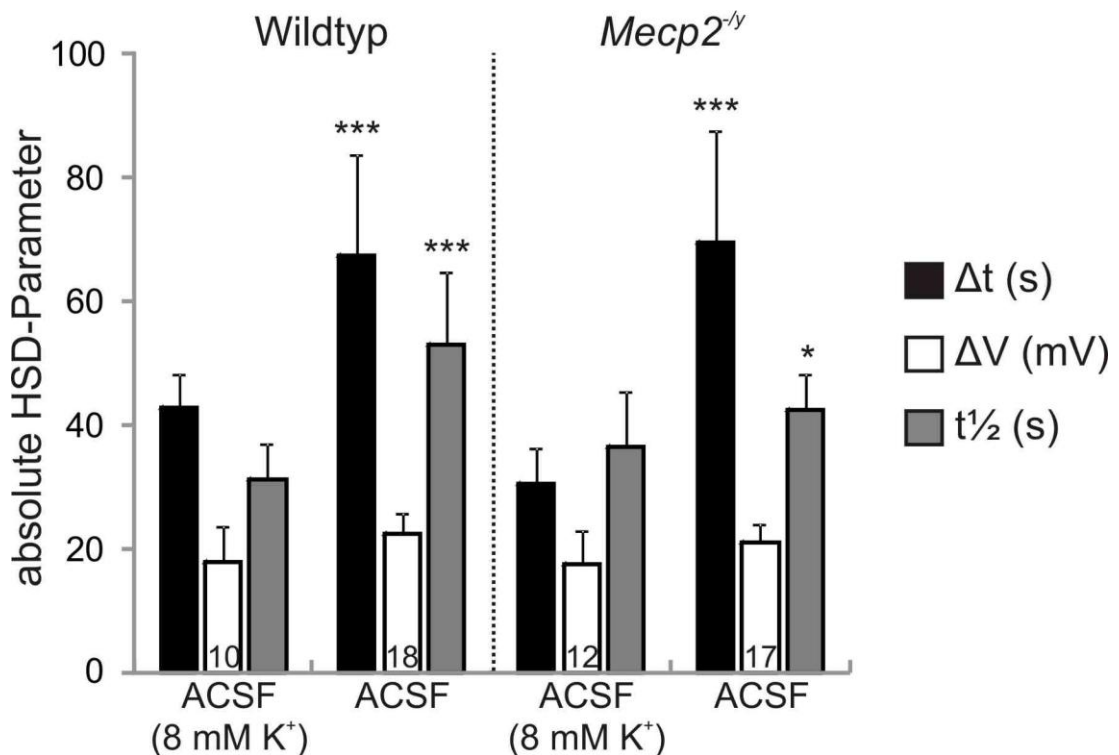


Abbildung 19: Parameter der HSD im NTS bei extrazellulären K^+ -Konzentrationen von 3,5 mM und 8 mM im Vergleich bei Wildtyp- und *Mecp2*^{-/-}-Tieren

3.2 Hirnstamm-HSDs bei adulten Wildtyp- und *Mecp2*^{-/-}-Mäusen

Da der Hippokampus adulter *Mecp2*^{-/-}-Mäuse bekanntermaßen eine erhöhte Hypoxieempfindlichkeit aufweist (Fischer et al. 2009) und die respiratorischen Auffälligkeiten bei adulten *Mecp2*^{-/-}-Mäusen zunehmen (Stettner et al. 2008b), wurden für diese Arbeit auch Hirnstammschnitte adulter (p40-50) *Mecp2*^{-/-}- und

Wildtyp-Mäuse untersucht.

Bei der Auswertung der elektrophysiologischen Messungen an diesen Hirnstammschnitten zeigte sich, dass eine Auslösung von HSDs hier nur sporadisch möglich ist. Die Mehrzahl der Schnitte zeigte nach Einleitung der Hypoxie lediglich ein langsames Absinken des extrazellulären Potentials um maximal 10-15 mV. Die für eine HSD charakteristische steile Negativverschiebung des DC-Potentials lag hier allerdings meist nicht vor. Auch nach Konditionierung der Hirnschnitte in ACSF mit erhöhter Kalium-Konzentration (8 mM K⁺) und in hypotoner ACSF (-30 mM) ließen sich HSDs nicht zuverlässig auslösen.

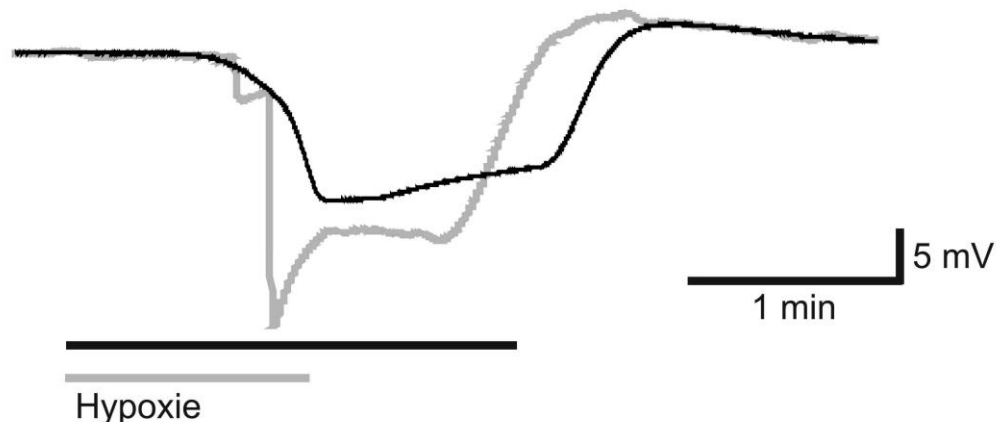


Abbildung 20: Ableitung des DC-Potentials aus dem NTS im Hirnschnitt einer adulten *Mecp2*^{-/-}-Maus

Das DC-Potential bei Auslösung einer Hypoxie im Hirnstamm von adulten Mäusen (schwarz) zeigt einen flacheren und verlangsamten Verlauf, der charakteristische steile Potential-Abstrich fehlt. Im juvenilen Hirnstamm (grau) ist die negative DC-Potential-Veränderung deutlich steiler ausgeprägt.

Trotz der weniger steil ausgeprägten DC-Veränderung ließ sich in der optischen Analyse dieser Hirnschnitte dennoch eine deutliche Aufhellung im Sinne eines IOS beobachten. Diese war bei nahezu allen Schnitten von adulten Tieren streng auf den dorsalen Teil des Schnittes im Bereich des Nucleus tractus solitarius (NTS) begrenzt.

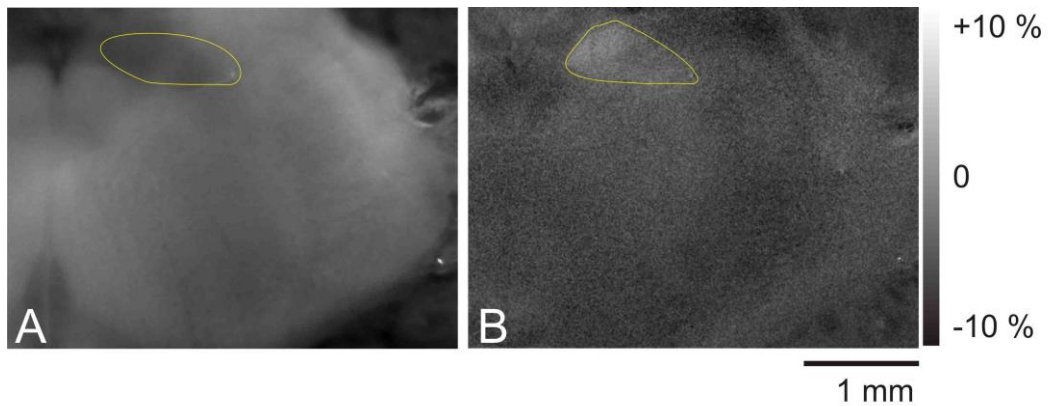


Abbildung 21: IOS einer HSD im akuten Hirnschnitt einer adulten Wildtyp-Maus

Die Ausbreitung des IOS bleibt auf den dorsalen Anteil des Schnittes im Bereich des NTS beschränkt.

3.3 Einfluss von Serotonin-Rezeptor-Modulation auf die Hypoxieempfindlichkeit

Es ist bekannt, dass die Modulation von Serotonin-Rezeptoren einen protektiven Effekt auf hochgradig hypoxieempfindliche neuronale Gewebe wie den Kortex oder den Hippokampus hat. Hier führt die Gabe von 5-HT_{1A}-Rezeptor-Agonisten (8-OH-DPAT) zu einer deutlichen Verkürzung von KCl-induzierten SDs (Krüger et al. 1999).

Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Arbeit der Einfluss von 5-HT_{1A}-Rezeptor-Agonisten (8-OH-DPAT) auf die Entstehung und Ausbreitung von HSDs im Hirnstamm untersucht. Diese Versuche wurden an akuten Hirnstammschnitten sowohl von Wildtyp- als auch *Mecp2*^{-/-}-Mäusen durchgeführt. Dazu wurden die Schnitte nach der Auslösung einer unter Kontrollbedingungen durchgeführten ersten HSD für 20 Minuten mit 50 µM 8-OH-DPAT in ACSF mit 3,5 mM K⁺ vorbehandelt. Darüber hinaus wurde bei jedem Schnitt nach Auftreten der zweiten HSD und einer 20-minütigen Auswaschphase von 8-OH-DPAT eine dritte HSD ausgelöst.

Der *onset* (Δt), die Amplitude (ΔV) und die Dauer ($t_{1/2}$) der auftretenden zweiten und dritten HSDs wurden auf die zuvor am selben Schnitt durchgeführte erste Kontrollmessung bezogen und auf diese normalisiert

Die normalisierten Werte der HSD in mit 8-OH-DPAT behandelten Schnitten

wurden nun mit den entsprechenden Werten der unbehandelten Schnitte verglichen (siehe 3.1.2).

Bei Wildtyp-Tieren waren die zweite und dritte HSD in ACSF unter Kontrollbedingungen, das heißt ohne Einwaschen eines Medikamentes, signifikant verlängert, der *onset* (Δt) und die Amplitude (ΔV) zeigten sich jedoch nicht verändert.

Nach Vorbehandlung der Schnitte mit 50 μM 8-OH-DPAT war die Zeit bis zum Auftreten der zweiten HSD (Δt) mit $116,4 \pm 6,8\%$ gegenüber der ersten Kontroll-HSD verzögert ($n=12$). Auch die dritte HSD trat mit $119,2 \pm 10,1\%$ gegenüber der ersten HSD verzögert auf ($n=12$). Dies stellt sowohl für die zweite ($p<0,001$) als auch die dritte HSD ($p<0,01$) einen signifikanten Unterschied zu den in ACSF ohne Medikament durchgeführten Messungen dar ($n=6$). Die Amplituden (ΔV) der zweiten und dritten HSD waren gegenüber der ersten HSD nicht signifikant verändert, die mittlere Dauer ($t_{1/2}$) der zweiten HSD mit $114,0 \pm 14,9\%$ und der dritten HSD mit $117,4 \pm 15,8\%$ signifikant verlängert. Eine ähnliche Veränderung von $t_{1/2}$ bei der zweiten und dritten HSD ließ sich jedoch auch bei den unter Kontrollbedingungen in ACSF durchgeführten HSDs beobachten und stellt somit keinen Effekt des 8-OH-DPAT dar.

NTS 3,5 mM K ⁺		ACSF (n=6)	8-OH-DPAT (n=12)
2. HSD normalisiert auf 1. HSD	Δt	99,0 \pm 4,4%	116,4 \pm 6,8% ***
	ΔV	100,3 \pm 7,8%	95,0 \pm 10,4%
	$t_{1/2}$	116,3 \pm 9,7%	114,0 \pm 14,9%
3. HSD normalisiert auf 1. HSD	Δt	101,5 \pm 5,7%	119,2 \pm 10,1% **
	ΔV	96,2 \pm 13,8%	93,8 \pm 10,4%
	$t_{1/2}$	121,3 \pm 8,9%	117,4 \pm 15,8%

Tabelle 4: Normalisierte Parameter der zweiten und dritten HSD von Wildtyp-Tieren unter Kontrollbedingungen (ACSF) und nach Einwaschen von 8-OH-DPAT

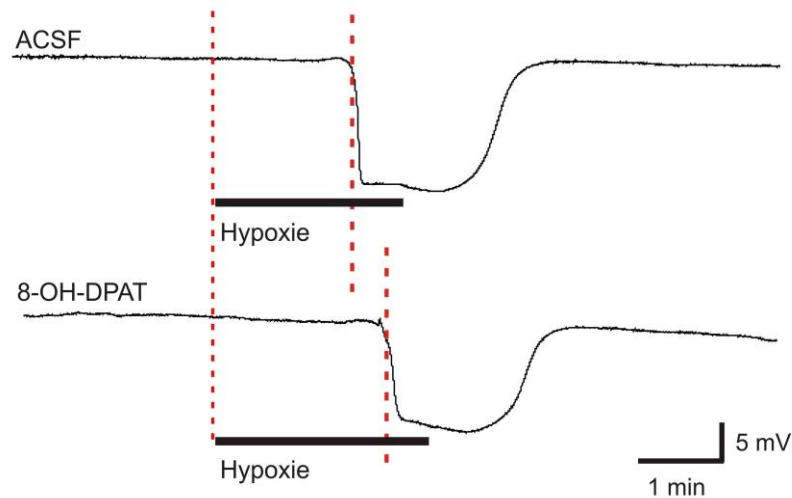


Abbildung 22: Beispielableitungen der zweiten und dritten HSD aus dem NTS von Wildtyp-Mäusen unter Kontrollbedingungen (ACSF) und nach Einwaschen von 50 μ M 8-OH-DPAT

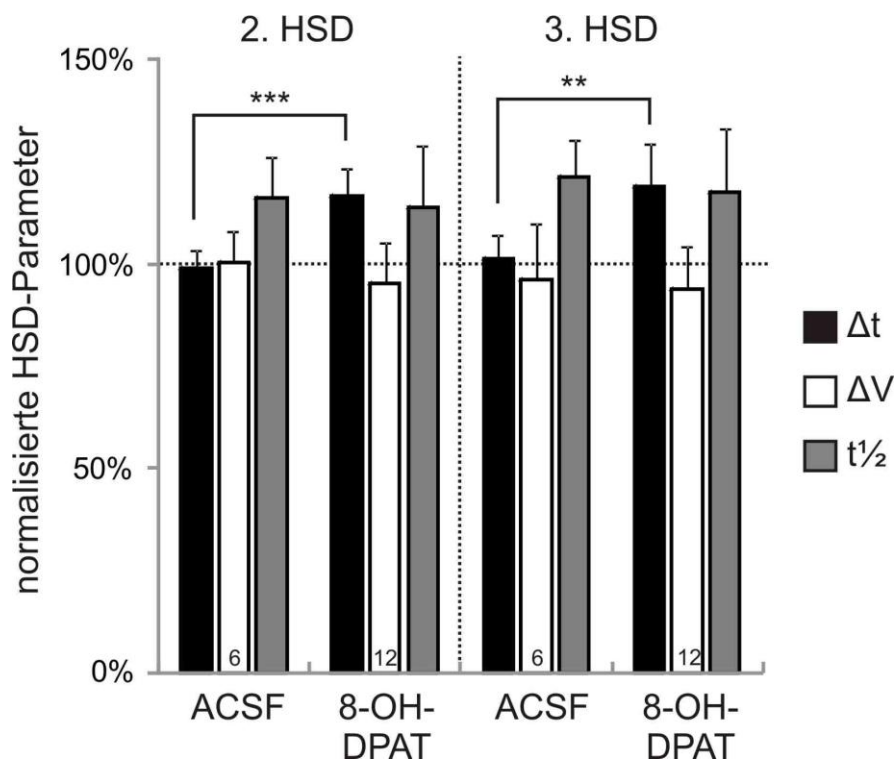


Abbildung 23: Normalisierte Parameter der zweiten und dritten HSD aus dem NTS von Wildtyp-Mäusen unter Kontrollbedingungen (ACSF) und nach Einwaschen von 50 μ M 8-OH-DPAT

Es zeigt sich eine signifikante Verlängerung des *onset* sowohl der HSD nach Applikation von 50 μ M 8-OH-DPAT als auch der dritten nach einer 20-minütigen Auswaschphase ausgelösten HSD.

Bei den *Mecp2^{-/-}*-Tieren zeigte sich ein ähnlicher Effekt wie bei den Wildtyp-Tieren. In ACSF unter Kontrollbedingungen waren die zweite und dritte HSD gegenüber der ersten signifikant verlängert, der *onset* (Δt) und die Amplitude (ΔV) allerdings nicht verändert.

Unter Einfluss von 50 μM 8-OH-DPAT ließ sich mit $115,5 \pm 13,9\%$ eine leichte Verzögerung von Δt der zweiten HSD und mit $119,2 \pm 20,5\%$ auch der dritten HSD gegenüber der ersten Kontroll-HSD beobachten. Wie beim Wildtyp besteht also auch hier ein signifikanter Unterschied für die zweite ($p < 0,01$) und dritte ($p < 0,05$) HSD zwischen den mit 8-OH-DPAT behandelten und den unbehandelten Schnitten.

Die Amplituden (ΔV) der zweiten und dritten HSD waren gegenüber der ersten HSD nicht signifikant verändert, die mittlere Dauer ($t_{1/2}$) der zweiten HSD mit $109,6 \pm 10,1\%$ und der dritten HSD mit $116,2 \pm 15,5\%$ ähnlich wie bei den in ACSF durchgeführten HSDs gegenüber denen der ersten HSD aber signifikant verlängert ($n=8$).

NTS 3,5 mM K ⁺		ACSF (n=9)	8-OH-DPAT (n=8)
2. HSD normalisiert auf 1. HSD	Δt	$100,8 \pm 5,1\%$	$115,5 \pm 13,9\%$ **
	ΔV	$99,2 \pm 7,7\%$	$96,0 \pm 16,9\%$
	$t_{1/2}$	$114,0 \pm 14,1\%$	$109,6 \pm 10,1\%$
3. HSD normalisiert auf 1. HSD	Δt	$102,0 \pm 9,3\%$	$119,2 \pm 20,5\%$ *
	ΔV	$96,5 \pm 10,3\%$	$94,5 \pm 16,5\%$
	$t_{1/2}$	$124,5 \pm 22,5\%$	$116,2 \pm 15,5\%$

Tabelle 5: Normalisierte Parameter der zweiten und dritten HSD aus dem NTS von *Mecp2^{-/-}*-Mäusen unter Kontrollbedingungen (ACSF) und nach Einwaschen von 8-OH-DPAT

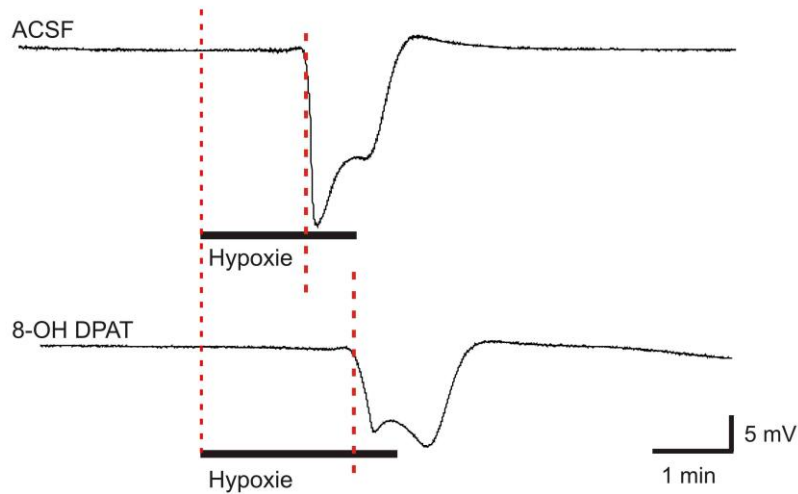


Abbildung 24: Beispielableitungen der zweiten und dritten HSD aus dem NTS von *Mecp2^{-/-}*-Mäusen unter Kontrollbedingungen (ACSF) und nach Einwaschen von 50 μ M 8-OH-DPAT

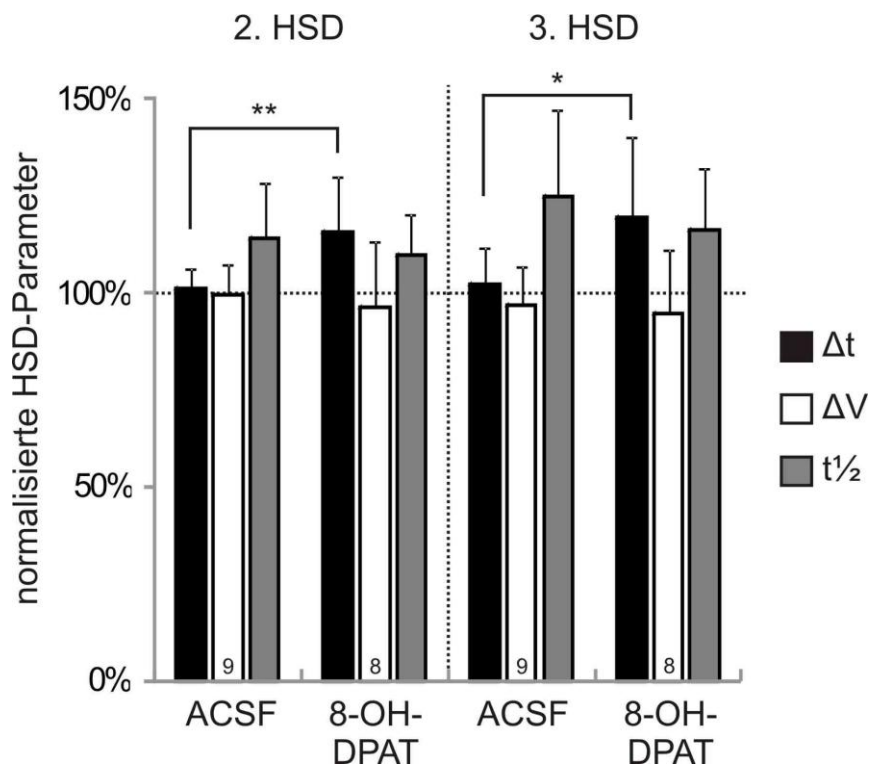


Abbildung 25: Normalisierte Parameter der zweiten und dritten HSD aus dem NTS von *Mecp2^{-/-}*-Mäusen unter Kontrollbedingungen (ACSF) und nach Einwaschen von 50 μ M 8-OH-DPAT

Es zeigt sich eine signifikante Verlängerung des *onset* sowohl der HSD nach Applikation von 50 μ M 8-OH-DPAT als auch der dritten ausgelösten HSD.

Die gemessenen Effekte von 8-OH-DPAT waren bei Wildtyp- und *Mecp2^{-y}*-Tieren vergleichbar und es ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen diesen Gruppen feststellen. Eine stärkere Wirkung von 8-OH-DPAT bei *Mecp2^{-y}*-Tieren scheint also nicht vorzuliegen.

3.4 Wirkung von HSD auf die respiratorische Rhythmogenese

Zur Untersuchung der Auswirkung von hypoxischen Episoden auf die respiratorische Rhythmogenese im Hirnstamm sollten rhythmisch aktive Hirnschnitte generiert werden, die dann in einer Interface-Kammer auf die Wirkung einer HSD hin untersucht werden sollten. Dazu musste zunächst ermittelt werden, ob das Aufbewahren und Messen von rhythmisch aktiven Hirnstammschnitten in einer Interface-Kammer prinzipiell möglich ist, da es sich hier um eine in dieser Form neue Methode handelt, die bisher nicht etabliert war. Zu diesem Zweck wurden die 650 µm dicken Hirnstammschnitte von im Mittel sechs Tage alten NMRI-Mäusen nach der zuvor beschriebenen Präparation in die Messkammer überführt und dort bei einer nahezu physiologischen Temperatur von 35-36°C mit ACSF inkubiert. Nach einer kurzen Erholungszeit von ca. 15 min wurde eine Ableitung aus der Region der ventralen respiratorischen Gruppen (prä-Bötzinger Komplex) mit einer Elektrode mit etwa 1 MΩ Impedanz durchgeführt. Das gemessene Signal wurde anschließend aufgetrennt und zum einen als DC Potential digitalisiert und zum anderen als integriertes Signal gleichzeitig mit dem DC Potential in pCLAMP dargestellt und aufgezeichnet.

Es zeigte sich, dass zur Aufrechterhaltung eines stabilen Rhythmus ein Anheben der extrazellulären Kalium-Konzentration auf 8 mM nötig war. Unter diesen Bedingungen ließen sich rhythmisch aktive Schnitte zuverlässig aufbewahren und wie beschrieben messen. Dabei zeigte sich eine Tendenz, die darauf hindeutete, dass die Frequenz der rhythmischen Aktivität abhängig von der Höhe der verwendeten extrazellulären Kalium-Konzentration ist. Ein Anheben der K⁺-Konzentration führte hier zu einem um 1-2 min verzögerten Anstieg der Frequenz. Bei hohen K⁺-Konzentrationen (8-10 mM) kam es zu einer langsamen Steigerung der Frequenz, die zumeist in einer spontan auftretenden *spreading depression* mündete.

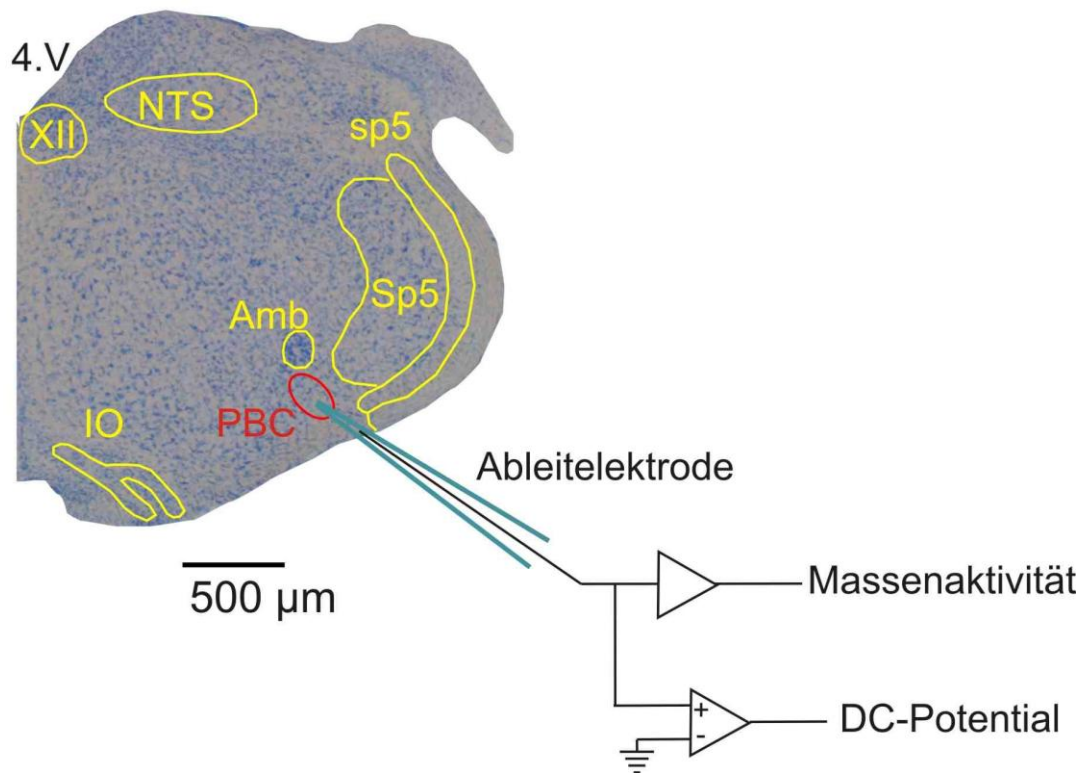


Abbildung 26: Ableitung eines extrazellulären Massenpotentials aus dem Bereich der ventralen respiratorischen Gruppe

Transversaler Schnitt durch den Hirnstamm einer Maus auf Höhe des kaudalen Endes des 4. Ventrikels. NTS: Nucleus tractus solitarius, 4.V: 4. Ventrikel, XII: Nucleus nervi hypoglossi, sp5: Tractus spinalis trigeminalis, Sp5: Nucleus spinalis trigeminalis, Amb: Nucleus ambiguus, IO: Inferiore Olive, VRG: ventrale respiratorische Gruppe.

Nach Etablierung eines stabilen Rhythmus wurde der in der Interface-Kammer befindliche Schnitt einer schweren Hypoxie ausgesetzt. Dies wurde wie bereits zuvor beschrieben durch das Umschalten der Messkammer-Begasung von Carbogen auf Stickstoff (95% N₂, 5% CO₂) erreicht. In der DC-Potential-Ableitung aus dem Bereich der ventralen respiratorischen Gruppe zeigte sich die typische negative DC-Potentialveränderung der HSD. Diese HSD trat mit einer Verzögerung von etwa 1 min nach Umschaltung der Begasung auf. Zeitgleich ließ sich anhand des simultan von der selben Elektrode abgeleiteten mit dem Atemrhythmus assoziierten Massenpotentials sehen, dass das Auftreten der HSD im Bereich der VRG eine unmittelbare und vollständige Unterbrechung der rhythmischen Aktivität verursachte. Wie auch in den nicht-rhythmischen Schnitten wurde eine Reoxygenierung des Gewebes 20 s nach Beginn der HSD

durch erneutes Umschalten der Begasung auf Carbogen eingeleitet. Dies führte im rhythmisch aktiven Schnitt zum um 2-3 min verzögerten Wiederauftreten der rhythmischen Aktivität (n=3).

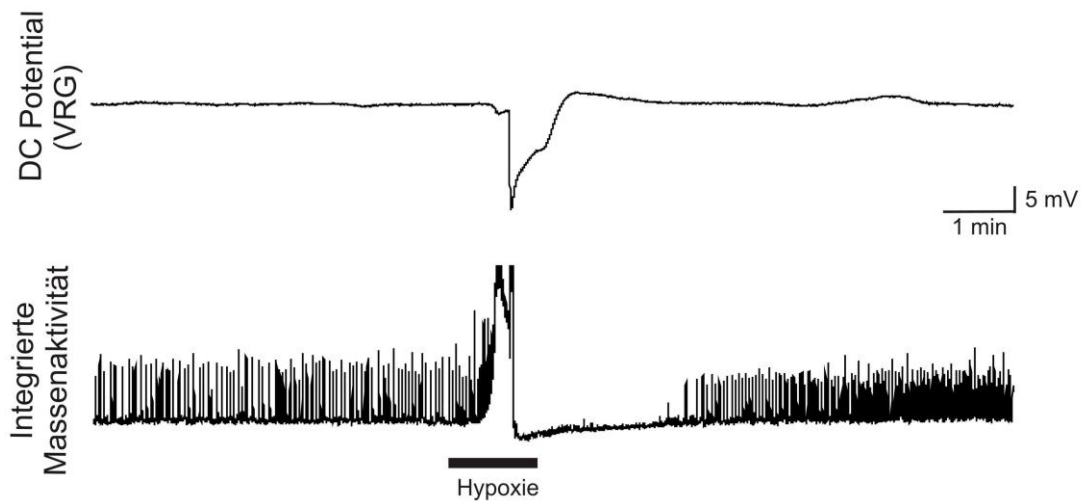


Abbildung 27: Ableitung des DC-Potentials und des integrierten Massenpotentials aus dem Bereich der VRG während einer HSD.

Das Auftreten der HSD im Bereich der ventralen respiratorischen Gruppe (VRG) führt zu einer unmittelbaren und vollständigen Unterbrechung der rhythmischen Aktivität. Etwa zwei Minuten nach Reoxygenierung kommt es zu einem Wiederauftreten der rhythmischen Aktivität.

Wie bereits zuvor beschrieben, wurden diese Experimente in der Etablierungsphase der Methodik von mir am Hirnstamm von NMRI-Mäusen durchgeführt. Aufgrund der Komplexität der in dieser Form völlig neuen Methodik war ein erhebliches Maß an Modifikationen an verschiedenen Parametern wie Temperatur und Kalium-Konzentration nötig, um zuverlässig rhythmisch aktive Hirnschnitte zu erhalten. Diese technischen Anfangsschwierigkeiten verhinderten, dass ich die Experimente an rhythmischen Hirnschnitten im Rahmen der Versuche zu dieser Arbeit weiter fortsetzen konnte.

Die hier beschriebenen Methoden und Experimente wurden nach Abschluss der Versuche zu dieser Dissertation in unserer Arbeitsgruppe aber fortgeführt. Dabei wurden unter anderem auch Unterschiede in der Auswirkung der HSD auf die Rhythmogenese bei Knockout- und Wildtyp-Tieren untersucht (Kron et al. 2011).

4 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Auswirkung von hypoxischen Episoden auf den Hirnstamm von Mäusen untersucht. Besonderes Augenmerk lag dabei auf Kerngebieten, die für die kardio-respiratorische Kontrolle entweder unmittelbar oder indirekt eine vitale Bedeutung haben. Zu diesem Zweck wurden erstmals Messungen an rhythmisch-aktiven Hirnstammschnitten in einer Interface-Kammer durchgeführt. Diese neue Methodik erlaubt die Analyse der Auswirkung von Hypoxie auf die atem-assoziierte rhythmische Aktivität unter nahezu physiologischen Temperaturen.

Darüberhinaus wurden Unterschiede in der Hypoxieempfindlichkeit zwischen *Mecp2*^{-/-}- und Wildtyp-Mäusen und mögliche protektive Effekte von Serotonin-Rezeptor-Aktivierung auf diese Hypoxieempfindlichkeit untersucht.

4.1 Beginn und Ausbreitung von HSDs im Hirnstamm von *Mecp2*^{-/-}- und Wildtyp-Mäusen

Seit der Erstbeschreibung von kortikalen *spreading depressions* durch Leão 1944 galt der Hirnstamm als hochgradig unempfindlich gegenüber Hypoxie und somit die Auslösung von medullären HSDs als nicht oder nur nach entsprechender Konditionierung und in weniger intensiver Form möglich (Somjen et al. 1992). Dies wurde in erster Linie auf die im Vergleich zum Cortex geringere Zelldichte und einen demzufolge größeren Extrazellulärraum im Hirnstamm zurückgeführt (Bures et al. 1974). Eine verminderte zelluläre Dichte des Gewebes bedingt unter anderem eine langsamere Akkumulation von K⁺-Ionen im Interstitium und erschwert auf diesem Wege die Entstehung von *spreading-depression*-Episoden. Auch ist das Hirnstammgewebe im Vergleich zum Hippokampus oder Cortex deutlich heterogener. Die Neuronen sind weniger systematisch und regelmäßig angeordnet, auch dies erschwert die Entstehung und Ausbreitung von SDs.

Erst in der jüngeren Vergangenheit konnte gezeigt werden, dass HSDs im Hirnstamm insbesondere von juvenilen (Richter F et al. 2003, Funke et al. 2009) aber auch adulten (Richter et al. 2008, Richter et al. 2010) Ratten generiert werden können. Dass hauptsächlich der Hirnstamm von sehr jungen Tieren

empfindlich für die Generierung von *spreading-depression*-Episoden ist, könnte darauf zurückgeführt werden, dass hier im Vergleich zum adulten Tier noch eine höhere Zelldichte vorliegt, die erst im Zuge der neuronalen Entwicklung durch die Selektion und Rückbildung der Neuronen vermindert wird. Darüber hinaus ist die neuronale Glia zunächst noch schwach ausgeprägt. Der gliale Anteil am Hirngewebe nimmt im Zuge der Entwicklung zu und verringert dadurch vermutlich die Empfindlichkeit des Gewebes gegenüber einer SD.

In den Experimenten zu dieser Dissertation konnte nun gezeigt werden, dass auch im Hirnstamm von Mäusen die Auslösung von HSDs zuverlässig möglich ist. Im Unterschied zu den an Ratten durchgeführten Untersuchungen (Funke et al. 2009) zeigte sich hier, dass dies sogar ohne vorherige Konditionierung der Hirnstammschnitte durch eine erhöhte extrazelluläre Kalium-Konzentration möglich ist. Die Analyse der intrinsischen optischen Signale ergab, dass es in den meisten gemessenen Schnitten in beiden Genotypen zur Invasion vor allem des Nucleus tractus solitarius (NTS) und des Nucleus spinalis nervi trigemini (sp5) kam. Als bevorzugter Bereich für den Beginn der HSDs kristallisierte sich ebenfalls bei beiden Genotypen der NTS heraus. Dies stellt einen Unterschied zum Hirnstamm von Ratten dar, da dort der sp5 als primärer Entstehungsort der HSDs ausgemacht wurde (Funke et al. 2009) und lässt den Schluss zu, dass der Bereich des NTS im murinen Hirnstamm die höchste Hypoxieempfindlichkeit und im Umkehrschluss die niedrigste Schwelle für das Auftreten von HSDs aufweist.

Interessanterweise zeigte sich, dass das Ausbreitungsmuster der HSDs im Hirnstamm zwischen *Mecp2*^{-y}- und Wildtyp-Tieren Unterschiede aufweist. So kommt es bei *Mecp2*^{-y}-Mäusen seltener zur Invasion von sp5, ventraler respiratorischer Gruppe (VRG) und inferiorer Olive (IO).

Diese gegenüber dem Wildtyp limitierte Ausbreitung der HSD lässt sich möglicherweise auf ein erhöhtes interstitielles Volumen (ISV) des neuronalen Gewebes bei *Mecp2*^{-y}-Tieren zurückführen. Es ist bekannt, dass eine Veränderung des ISV zum Beispiel durch osmotisch induzierte Zellschwellung Einfluss auf die Ausbreitung von HSDs im Gewebe hat, möglicherweise weil es beispielsweise durch eine Verringerung des ISV zu einer stärkeren Akkumulation des extrazellulären K⁺ und auch von Neurotransmittern kommt.

Auch die Veränderung des interstitiellen elektrischen Widerstandes durch Veränderung der Ausdehnung des ISV könnte eine Rolle spielen (Chebabo et al. 1995). Außerdem ist bekannt, dass die Erhöhung der extrazellulären Osmolarität und damit eine Aufweitung des ISV die Entstehung von *spreading depressions* unterdrücken kann (Huang et al. 1996).

Die Größe des ISV wird in erster Linie durch die Größe und Packungsdichte der Zellen und die Komplexität der dendritischen Bäume vorgegeben. Je nach Hirnregion schwankt der Anteil des ISV am Hirnvolumen zwischen 15 und 20% (McBain et al. 1990). *Mecp2^{-/-}*-Mäuse zeigen außer generell verminderter Hirngröße und -volumen in verschiedenen Bereichen des Großhirns und Kleinhirns (Belichenko et al. 2008) auch eine geringere Zellgröße und veränderte Zelldichte im Bereich des Hippokampus (Fischer et al. 2009), eine verminderte Komplexität der dendritischen Bäume im Cortex, verbunden mit einer verzögerten Reifung des neuronalen Gewebes (Fukuda et al. 2005) und auch Veränderungen der neuronalen Dichte im Cerebellum (Jentarra et al. 2010), sowie eine geringere Größe der Neuronen im Locus coeruleus (Taneja et al. 2009). Veränderung eben dieser Parameter scheinen auch im Hirnstamm von *Mecp2^{-/-}*-Mäusen vorzuliegen (Mironov et al. 2009). Zwar wurden diese morphologischen Veränderungen bisher überwiegend an adulten *Mecp2^{-/-}*-Mäusen untersucht. Da jedoch bekannt ist, dass die neuronalen Gewebe des Hirnstammes im Zuge der Entwicklung frühzeitiger reifen als andere Teile des Gehirns, könnten die beschriebenen Veränderungen hier auch schon bei juvenilen *Mecp2^{-/-}*-Mäusen vorliegen und ursächlich für die eingeschränkte Ausbreitung der HSDs sein. Tatsächlich ließ sich zeigen, dass in Zellkulturen aus dem prä-Bötzinger-Komplex (preBötC) von *Mecp2^{-/-}*-Mäusen *in vitro* bereits 14 Tage postnatal eine verminderte neuronale Dichte vorliegt, die darauffolgend weiter abnimmt. Assoziiert wird diese veränderte neuronale Struktur mit einer gestörten Kalzium-Homöostase, die durch den bei *Mecp2^{-/-}*-Mäusen bekannten Mangel an BDNF verursacht zu werden scheint (Mironov et al. 2009). Die verringerte neuronale Dichte im Bereich des preBötC könnte aufgrund des konsekutiv verminderten ISV ein Erklärungsansatz sein, warum es bei *Mecp2^{-/-}*-Mäusen seltener zu einer Invasion des Bereichs der ventralen respiratorischen Gruppe durch die HSD kommt.

4.2 Erhöhte Hypoxieempfindlichkeit bei *Mecp2*^{-y}-Mäusen

Es ist bekannt, dass im Hippokampus von *Mecp2*^{-y}-Mäusen eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Hypoxie vorliegt. Diese äußert sich in einer Verkürzung der Zeit bis zum Auftreten der HSD (*onset*) bei Hypoxie und damit einer verkürzten Zeitspanne, die das Gewebe ohne Funktionsverlust nach dem Beginn des Sauerstoffentzuges toleriert (Fischer et al. 2009).

In den Versuchen zu dieser Arbeit zeigte sich, dass auch im Bereich des medullären NTS das Auftreten von HSDs nach Sauerstoffentzug beschleunigt ist. Voraussetzung hierfür ist jedoch eine vorherige Konditionierung der Hirnschnitte durch die Erhöhung der extrazellulären Kalium-Konzentration auf 8 mM K⁺. Diese Konditionierung ist ein übliches Vorgehen zur Erhöhung der neuronalen Aktivität im Hirnstamm unter experimentellen Bedingungen (Smith et al. 1991, Funke et al. 2009). Es ist davon auszugehen, dass in einem medullären Hirnschnitt aufgrund der fehlenden supraspinalen Einflüsse und sensorischen Eingänge eine unphysiologisch verminderte neuronale Aktivität vorliegt. Diese fehlenden exzitatorischen Einflüsse sollen durch die Erhöhung der extrazellulären K⁺-Konzentration ausgeglichen werden. Eine erhöhte extrazelluläre Kalium-Konzentration erhöht die neuronale Erregbarkeit und begünstigt damit die Entstehung von *spreading depressions*.

Darüberhinaus ist das neuronale Gewebe des Hirnstammes, verglichen mit empfindlicheren Bereichen des Cortex und dem Hippokampus, relativ hypoxietolerant. Bei neonatalen Ratten ist ein anaerober Metabolismus zumindest für eine begrenzte Zeit und bei unphysiologisch niedrigen Temperaturen von 28-30°C, wie sie bei der Messung an untergetauchten Schnitten in Submersionskammern maximal möglich sind, ausreichend für die Aufrechterhaltung der Kalium-Homöostase und auch des respiratorischen Rhythmus (Ballanyi et al. 1992). Somit kann davon ausgegangen werden, dass leichtere Veränderungen der Hypoxieempfindlichkeit des Hirnstammes bei *Mecp2*^{-y}-Mäusen in Ruhe, das heißt ohne einen zusätzlichen Stressor, nicht als veränderter HSD *onset* detektierbar sind. Ein solcher Stressor wäre beispielweise die beschriebene Erhöhung der extrazellulären Kalium-Konzentration.

In nachfolgenden Versuchen, die auf den Befunden dieser Arbeit aufbauten,

konnte von anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass auch im Bereich des sp5 und der VRG die HSDs unter 8 mM K⁺ bei *Mecp2*^{-y}-Mäusen gegenüber den Wildtyp-Tieren beschleunigt auftraten (Kron et al. 2011). Somit liegt also in mindestens drei medullären Kerngebieten (NTS, sp5, VRG) eine erhöhte Hypoxieempfindlichkeit bei *Mecp2*^{-y}-Mäusen vor. Alle drei dieser Kerngebiete spielen eine wichtige Rolle in der kardio-respiratorischen Regulation und ein beschleunigtes Auftreten von HSDs in diesen Regionen des Hirnstamms könnte somit fatale Folgen haben.

4.2.1 Bedeutung des NTS für die respiratorische Regulation

So ist beispielsweise der NTS von essentieller Bedeutung für die Atmungsregulation, da er wesentlich an der Integration viszeraler Afferenzen in die motorischen Bahnen der Atmungsregulation beteiligt ist. Eine definierte Neuronengruppe innerhalb des NTS, die durch bestimmte sensomotorische Afferenzen aus der Lunge, die *slowly adapting stretch receptors* (SARs), gesteuert wird, ist primär verantwortlich für die zeitliche Koordinierung des Hering-Breuer-Reflexes. Dieser Reflex bewirkt die Beendigung der Inspirations- und den Übergang in die Postinspirationsphase sowie die Verlängerung der expiratorischen Periode (Kubin et al. 2006). Bei der Regulation der Atmung im NTS spielen insbesondere GABAerge ventrolaterale Neuronengruppen eine wichtige Rolle (Wasserman et al. 2002). Diese bewirken die Terminierung der inspiratorischen Phase (Wasserman et al. 2000). Eine Verschiebung des Gleichgewichtes von neuronaler Exzitation und Inhibition in diesem Bereich kann zu lebensbedrohlichen Apnoen führen.

Tatsächlich sind eine Steigerung der atemassozierten Reflexe und eine fehlende Habituation dieser Reflexe, wie bereits in 1.1.3 beschrieben, charakteristische Auffälligkeiten bei *Mecp2*^{-y}-Mäusen. Auch die sensorische Regulation der postinspiratorischen motorischen Aktivität, wie sie beispielsweise durch den Hering-Breuer-Reflex erfolgt, ist bei *Mecp2*^{-y}-Mäusen deutlich beeinträchtigt (Stettner et al. 2007).

Auf zellulärer Ebene wurde das Vorliegen einer Hyperexzitabilität in bestimmten Bereichen des NTS bei *Mecp2*^{-y}-Mäusen bereits beschrieben. Diese äußert sich als eine gesteigerte Empfindlichkeit der Neurone gegenüber afferenter

Stimulation und kann mutmaßlich mit einem besonders ausgeprägten Mangel des *brain derived neurotrophic factors* (BDNF) in diesem Bereich in Zusammenhang gebracht werden (Kline et al. 2010).

Zwar sind diese Veränderungen im NTS bisher nur für spätere neuronale Entwicklungsstadien in einem Alter der Mäuse von etwa 40 Tagen beschrieben, es ist jedoch bekannt, dass im Bereich der ventrolateralen Medulla eine Verminderung der GABAergen Inhibition bei *Mecp2^{-y}*-Mäusen bereits 7 Tage postnatal vorliegt. Diese liegt sowohl in einem Mangel an präsynaptischer Ausschüttung von GABA als auch in einer Verminderung postsynaptischer GABA-Rezeptoren begründet (Medrihan et al. 2008).

Diese Hyperexzitabilität des medullären neuronalen Gewebes bei *Mecp2^{-y}*-Mäusen und insbesondere des NTS könnte die Entstehung von HSDs begünstigen und erklären, weshalb es - wie beobachtet - zu einer beschleunigten Auslösung der HSDs bei *Mecp2^{-y}*-Mäusen kommt. Es ist davon auszugehen, dass ein Auftreten von HSDs im NTS die Regulation des sensomotorisch ausgelösten Hering-Breuer-Reflexes stark beeinträchtigen würde. Folge wäre eine Störung des regelmäßigen Wechsels zwischen Inspiration und Expiration, wie sie bereits sowohl bei *Mecp2^{-y}*-Mäusen experimentell als auch bei RETT-Patienten klinisch beschrieben wurde (Stettner et al. 2008b).

4.3 Bedeutung von medullären HSDs für die respiratorische Rhythmogenese

Die Auswirkung von Hypoxie auf die physiologische Atmung ist abhängig von der Dauer und Schwere der hypoxischen Episode. Zumeist kommt es initial zu einem Anstieg der respiratorischen Frequenz und bei ausreichender Länge und Schweregrad der Hypoxie darauffolgend zu einer Depression der Atmungsaktivität bis hin zum kompletten Atemstillstand. Dies lässt sich sowohl *in vitro* bei Mäusen (Ramirez et al. 1998) als auch *in vivo* an anästhesierten Katzen beobachten (Richter et al. 1991).

Seit einiger Zeit ist bekannt, dass das Auftreten von K^+ -induzierten SDs im Hirnstamm von anästhesierten juvenilen (p15) Ratten *in vivo* tatsächlich zu einer Unterbrechung der normalen Atmung führen kann (Richter F et al. 2003). Der

genaue pathophysiologische Mechanismus war bisher jedoch wenig erforscht. Um nun zu untersuchen, wie sich eine HSD auf die neuronale Netzwerkaktivität im Bereich der VRG auswirkt, wurden rhythmisch aktive Hirnstammschnitte angefertigt und diese in der Interface-Messkammer untersucht. Dies ermöglichte erstmals die Untersuchung von hypoxieinduzierten *spreading depressions* in rhythmisch aktiven Hirnschnitten bei nahezu physiologischen Temperaturen, da solche Schnitte bisher lediglich in Submersionskammern gemessen werden konnten, die derart hohe nahezu physiologische Temperaturen nicht ermöglichen.

Da sich bei der Analyse der intrinsischen optischen Signale zeigte, dass es regelmäßig, wenn auch nicht in allen Schnitten, zur Invasion der ventralen respiratorischen Gruppe (VRG) und des prä-Bötzinger-Komplexes (preBötC) durch die HSD kommt, stellte sich die Frage, welche Folge das Hineinlaufen der HSD in diese Bereiche für die neuronale Funktion und damit die respiratorische Rhythmogenese hat.

Es zeigte sich, dass eine Ausbreitung der HSD in den Bereich der ventralen respiratorischen Gruppe (VRG) innerhalb von nur etwa 1 min tatsächlich zu einer vollständigen reversiblen Unterbrechung der rhythmischen Aktivität führt. Nach der Reoxygenierung des Schnittes kam es etwa 2-3 min später zur Reetablierung und Normalisierung der rhythmischen Aktivität.

Dies beweist, dass das Auftreten von HSDs im Hirnstamm tatsächlich zu einer vollständigen Unterbrechung der primären respiratorischen Rhythmogenese führt und bestätigt die zuvor beschriebenen Folgen einer länger andauernden schweren hypoxischen Episode im Hirnstamm. Eine erhöhte Hypoxieempfindlichkeit bei *Mecp2^{-/-}*-Mäusen könnte also als eine mögliche Erklärung für die häufig und mit teilweise letalem Ausgang auftretenden Störungen der physiologischen Atmung bei *Mecp2^{-/-}*-Mäusen und Rett-Patientinnen dienen.

Interessanterweise zeigte sich, wie zuvor beschrieben, dass es bei *Mecp2^{-/-}*-Mäusen seltener zur Invasion der VRG durch die ausgelösten HSDs kommt als bei Wildtyp-Tieren. Angesichts der möglicherweise fatalen Folgen des Auftretens von HSDs in der VRG stellt dies einen klaren Vorteil für die Knockout-

Mäuse dar und könnte als Kompensations- beziehungsweise Adaptationsmechanismus angesehen werden. Kam es allerdings zu einer Invasion der VRG durch die HSD, so trat diese im Mittel früher auf als bei Wildtyp-Tieren (Kron et al. 2011). Dies könnte erklären, warum die Mehrzahl der *Mecp2^{-y}*-Mäuse tatsächlich am Atemstillstand verstirbt.

4.3.1 Zusammenhang mit dem *Sudden Infant Death Syndrome* (SIDS)

In den Experimenten zu dieser Arbeit zeigte sich, dass eine Auslösung von HSDs nahezu ausschließlich im Hirnstamm von sehr jungen Mäusen möglich ist, während die medullären Netzwerke von adulten Tieren vergleichsweise resistent gegenüber Hypoxie scheinen. Vergleichbare Ergebnisse wurden auch in Versuchen am Hirnstamm von Ratten gefunden (Richter F et al. 2003, Funke et al. 2009).

Diese Tatsache im Zusammenhang mit der zuvor beschriebenen fatalen Auswirkung, die das Auftreten von medullären HSDs auf vital bedeutsame Funktionen der kardio-respiratorischen Regulation haben kann, spricht für eine hohe Wichtigkeit ischämisch-pathologischer Hirnstammprozesse in sehr jungem Alter (Sparks und Hunsaker 2002). Da das Auftreten des Syndroms des plötzlichen Kindstodes (*Sudden Infant Death Syndrome*, SIDS) definitionsgemäß und auch klinisch auf das Säuglingsalter bis zur Vollendung des ersten Lebensjahres beschränkt ist (Willinger et al. 1991) und durch einen spontanen Atemstillstand gekennzeichnet ist, lässt sich hier möglicherweise ein kausaler Zusammenhang herstellen. Ein Atemarrest infolge einer durch vorübergehende Hypoxie ausgelösten HSD im Hirnstamm kann letale Folgen für die Kinder haben, insbesondere, da die vollständige Depolarisation der Neuronen bei einer *spreading depression* verhindert, dass es zu neuronalen Reanimationsversuchen wie dem aus *in-vitro*-Experimenten bekannten *gaspings* kommt. Ein bekannter klinischer Risikofaktor für das SIDS ist neben einer genetischen Prädisposition die einen Sauerstoff-Mangel begünstigende Schlafposition in Bauchlage, insbesondere im Bett der Eltern (Fleming et al. 1990). Diese auslösenden Faktoren sprechen ebenfalls dafür, dass eine transiente Hypoxie, in Folge derer es zu einer durch HSDs ausgelösten Apnoe kommt, Ursache für den plötzlichen Kindstod sein könnte. Auch eine Hyperthermie gilt als Risikofaktor für das SIDS (Ponsonby et al. 1993). Da

Hyperthermie gleichzeitig ein begünstigender Faktor für die Entstehung von *spreading-depression*-Episoden ist und diese unter bestimmten Bedingungen sogar auslösen kann (Wu und Fisher 2000), liegt hier ein weiterer Zusammenhang zwischen der vitalen Gefährdung von Säuglingen durch medulläre HSDs und dem SIDS vor.

Darüberhinaus spricht die bereits zuvor beschriebene Bedeutung eines medullären Serotonin-Mangels im Zusammenhang mit dem SIDS (Audero et al. 2008, Duncan et al. 2010) für eine autonome Dysregulation mit der Folge kardiorespiratorischer Fehlfunktionen als Hintergrund des SIDS.

Vor kurzem konnte gezeigt werden, dass bei *Mecp2^{-y}*-Mäusen eine Störung der zentralen CO₂-Chemorezeptoren vorliegt. Insbesondere bei milder Hyperkapnie fehlte die physiologische respiratorische Antwort (Zhang et al. 2011). Dies legt eine dem SIDS ähnliche Pathophysiologie der letalen Atemstillstände bei Rett-Patienten nahe, da eine fehlende respiratorische Reaktion auf relative Hypoxie und milde Hyperkapnie lebensbedrohlich sein kann.

4.4 Neuroprotektive Wirkung der Serotonin-Rezeptor-Aktivierung

Es gibt viele Anknüpfungspunkte zwischen der Bedeutung von Serotonin (5-HT) für die neuronale Funktionalität und dem Auftreten von *spreading depressions*, respiratorischen Dysregulationen und auch dem Rett-Syndrom. So ist ein medullärer Serotonin-Mangel direkt mit dem SIDS assoziiert (Duncan et al. 2010) und auch bei *Mecp2^{-y}*-Mäusen wurden verminderte Spiegel biogener Amine wie dem Serotonin ab einem Alter von 14 Tagen beschrieben (Ide et al. 2005). Darüberhinaus wurde *in vivo* ein Zusammenhang zwischen einer verminderten Aktivität der Tyrosinhydroxylase (TH), einem wichtigen Enzym im 5-HT-Syntheseweg, und den respiratorischen Abnormalitäten bei *Mecp2^{-y}*-Mäusen beschrieben (Viemari et al. 2005).

Außerdem ist bekannt, dass eine medikamentöse Aktivierung von Serotonin-Rezeptoren durch 5-HT_{1A}-Agonisten wie 8-OH-DPAT im Hippokampus zu einer Abschwächung von K⁺-induzierten *spreading depressions* führt (Krüger et al. 1999). Auch eine stabilisierende Wirkung von Serotonin auf die physiologische Atmung ist beschrieben (Lalley et al. 1994, Richter DW et al. 2003). So führt die Aktivierung von 5-HT_{1A}-Rezeptoren zu einer Verbesserung der kardiovaskulären

Regulation und zu einer Stabilisierung der Atmung bei mit Opioiden behandelten juvenilen Ratten (Dutschmann et al. 2009). Auch die Möglichkeit zur Unterdrückung von zentralen Apnoen bei Mäusen mit Hilfe von 5-HT_{1A}-Agonisten ist bekannt (Stettner et al. 2008a).

Sowohl *in vivo* bei *Mecp2*^{-/-}-Mäusen (Abdala et al. 2010) als auch bei Rett-Patienten (Andaku et al. 2005) hat die Applikation von 5-HT_{1A}-Rezeptor-Agonisten wie 8-OH-DPAT oder Buspiron einen positiven therapeutischen Effekt auf die für das Rett-Syndrom typischen respiratorischen Probleme. Insbesondere in Kombination mit der Erhöhung des Spiegels von γ -Aminobuttersäure (GABA) durch Hemmung der Wiederaufnahme von GABA verbessert die Gabe von 5-HT_{1A}-Agonisten den Phänotyp bei *Mecp2*^{-/-}-Mäusen und unterdrückt die respiratorischen Unregelmäßigkeiten nahezu vollständig (Abdala et al. 2010). Dieser Effekt ist unter anderem auf eine Suppression der Aktivität expiratorischer Neuronen durch 5-HT_{1A}-Aktivierung zurückzuführen.

Aufgrund dieser zahlreichen Hinweise auf eine neuro- und respiratorisch protektive Wirkung von Serotonin-Agonisten wurde für diese Arbeit der Einfluss von 8-OH-DPAT auf medulläre HSDs untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Applikation von ACSF mit 50 μ M 8-OH-DPAT sowohl bei Wildtyp- als auch bei *Mecp2*^{-/-}-Mäusen zu einer deutlichen Verzögerung des Auftretens von HSDs führte.

Die Aktivierung von Serotonin-Rezeptoren hat also eine gewisse neuroprotektive Wirkung. Sie führt zu einer Verlängerung des Zeitfensters, in dem nach Beginn einer Hypoxie oder Ischämie die Sauerstoffversorgung des Gewebes wiederhergestellt werden kann, ohne dass es zu einer sekundären Schädigung der Neuronen durch das Auftreten von *spreading-depression*-Episoden kommt.

Die Wirkung von Serotonin wird über verschiedene unterschiedliche Rezeptoren vermittelt und hat ein komplexes Spektrum von Inhibition und Exzitation bestimmter Neuronengruppen. So kommt es zu einer Modulation der mono- und polysynaptischen inhibitorischen postsynaptischen Potentiale (IPSPs) (Schmitz et al. 1995a)

Sowohl die beschriebene Abschwächung von hippokampalen *spreading depressions* (Krüger et al. 1999) als auch die Verzögerung der medullären

HSDs durch 5-HT_{1A}-Rezeptor-Aktivierung könnte unter anderem mit einer Membranhyperpolarisation durch die Aktivierung von G_i-Protein-gekoppelten Kalium-Kanälen erklärt werden. Über die Verminderung der Aktivität von Adenylatzyklasen und damit herabgesetzte zytosolische cAMP-Konzentrationen kommt es zu einer Abschwächung der neuronalen Erregbarkeit (Schmitz et al. 1995a). Darüber hinaus ist auch bekannt, dass die Aktivierung präsynaptischer 5-HT_{1A}-Rezeptoren zu einer Verminderung des Ca²⁺-Einstromes und infolgedessen einer Hemmung der synaptischen Transmission führt (Schmitz et al. 1995b).

5 Zusammenfassung und Ausblick

Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob die Auslösung von hypoxieinduzierten *spreading-depression*-ähnlichen Depolarisationen (HSDs) im Hirnstamm von Mäusen möglich ist. Darüber hinaus sollten mögliche Unterschiede in der Hypoxieempfindlichkeit des Hirnstammes von *Mecp2*^{-y}- und Wildtyp-Mäusen und die Beeinflussbarkeit dieser Hypoxieempfindlichkeit mit Hilfe des 5-HT_{1A}-Rezeptor-Agonisten 8-OH-DPAT analysiert werden. Als letzter Schritt sollte an einer rhythmischen Präparation der ventralen respiratorischen Gruppe (VRG) die unmittelbare Auswirkung des Auftretens einer HSD auf die mit der Atmung assoziierte rhythmische Aktivität Hirnstamm untersucht werden.

Es zeigte sich, dass HSDs im Hirnstamm von juvenilen (p10-15) Mäusen zuverlässig ausgelöst werden können, bevorzugte Lokalisation für die Initiation der HSD ist der Nucleus tractus solitarius (NTS). Im Hirnstamm adulter Mäuse war eine Auslösung von HSDs nicht zuverlässig möglich.

Weiterhin zeigte sich eine erhöhte Hypoxieempfindlichkeit bei *Mecp2*^{-y}-Mäusen dahingehend, dass bei Vorliegen eines zusätzlichen Stimulus (in diesem Fall eine auf 8 mM erhöhte extrazelluläre Kalium-Konzentration) das Auftreten von HSDs nach Beginn der Hypoxie deutlich beschleunigt ist.

Zur Untersuchung der Auswirkung von HSDs auf die respiratorische Rhythmogenese im Hirnstamm wurde die bereits etablierte Präparation rhythmisch aktiver Hirnstammschnitte an die Bedingungen in einer Interface-Messkammer vom Oslo-Typ adaptiert. Dies ermöglicht die Analyse der unmittelbaren Auswirkungen einer HSD auf die rhythmische Hirnstammaktivität bei nahezu physiologischen Temperaturen und stellt in dieser Form eine völlig neue Methodik dar.

Da die Analyse der rhythmisch aktiven Schnitte zeigte, dass die Invasion des Bereichs der VRG durch eine HSD zu einer vollständigen, reversiblen Blockade der rhythmischen Aktivität führt, könnte die erhöhte Hypoxieempfindlichkeit der *Mecp2*^{-y}-Mäuse in diesem Bereich ein möglicher Erklärungsansatz für die häufig letal endenden respiratorischen Unregelmäßigkeiten sowohl bei *Mecp2*^{-y}-Mäusen als auch bei Rett-Patientinnen sein.

Darüberhinaus unterstützen die gewonnenen Erkenntnisse die Theorie, dass

das Auftreten von HSDs im Hirnstamm eine mögliche Erklärung für das Syndrom des plötzlichen Kindstods (*sudden infant death syndrome*, SIDS) sein könnte.

Durch Zugabe von 50 μM 8-OH-DPAT war die Zeit bis zum Auftreten der HSD sowohl bei *Mecp2*^{-/-}- als auch bei Wildtyp-Mäusen signifikant verlängert.

Die Aktivierung von 5-HT_{1A}-Rezeptoren hat also einen protektiven Effekt gegenüber Hypoxie für das neuronale Gewebe. Aus diesem Grund wäre die weitere Erforschung der Wirksamkeit von 5-HT_{1A}-Rezeptor-Agonisten in der Therapie der mit dem Rett-Syndrom assoziierten respiratorischen Auffälligkeiten sehr interessant.

6 Anhang

6.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Stadien der Entwicklung des Rett-Syndroms und charakteristische Symptome (modifiziert nach Chahrour und Zoghbi 2007).....	7
Abbildung 2: Ableitung des extrazellulären DC-Potentials einer HSD aus dem Bereich des Nucleus tractus solitarius (NTS)	11
Abbildung 3: Intrinsisches optisches Signal	13
Abbildung 4: Transversaler Schnitt durch den Hirnstamm einer Maus auf Höhe des kaudalen Endes des 4. Ventrikels.....	15
Abbildung 5: Strukturformel des 5-HT _{1A} -Agonisten 8-OH-DPAT (8-Hydroxy-N,N-dipropyl-2-aminotetralin).....	18
Abbildung 6: Interface-Kammer vom Oslo-Typ	23
Abbildung 7: Versuchsaufbau	28
Abbildung 8: Gemessene und analysierte Parameter der HSD-assoziierten DC-Signale	31
Abbildung 9: IOS in einem Wildtyp-Hirnstammschnitt	32
Abbildung 10: IOS in einem Wildtyp-Hirnstammschnitt bei 8 mM extrazellulärer K ⁺ -Konzentration	33
Abbildung 11: Ableitung aus dem Nucleus tractus solitarius (NTS).....	34
Abbildung 12: Charakteristische negative Veränderungen des extrazellulären Potentials gemessen in verschiedenen Kerngebieten innerhalb des Hirnstammes von Wildtyp-Tieren bei 3,5 mM extrazellulärer K ⁺ -Konzentration	35
Abbildung 13: Beispiel-Ableitungen des DC-Potentials der HSDs bei 8 mM extrazellulärer K ⁺ -Konzentration aus dem NTS in einem Wildtyp im Vergleich zu einem <i>Mecp2</i> ^{-/-} -Tier	36
Abbildung 14: Parameter der HSD bei 8 mM extrazellulärer K ⁺ -Konzentration im NTS im Vergleich von Wildtyp zu <i>Mecp2</i> ^{-/-}	37
Abbildung 15: Parameter der ersten und zweiten HSD bei einer extra-zellulären K ⁺ -Konzentration von 8 mM im NTS bei Wildtyp und <i>Mecp2</i> ^{-/-}	39
Abbildung 16: Beispielableitung aus dem NTS bei einer extrazellulären K ⁺ -Konzentration von 3,5 mM im Vergleich von Wildtyp zu <i>Mecp2</i> ^{-/-}	40

Abbildung 17: Parameter der HSD bei einer extrazellulären K^+ -Konzentration von 3,5 mM im NTS im Vergleich von Wildtyp zu <i>Mecp2^{-/-}</i>	40
Abbildung 18: Parameter der zweiten und dritten ausgelösten HSD bei einer extrazellulären K^+ -Konzentration von 3,5 mM jeweils normalisiert auf die erste HSD im selben Schnitt.....	42
Abbildung 19: Parameter der HSD im NTS bei extrazellulären K^+ -Konzentrationen von 3,5 mM und 8 mM im Vergleich bei Wildtyp- und <i>Mecp2^{-/-}</i> -Tieren.....	43
Abbildung 20: Ableitung des DC-Potentials aus dem NTS im Hirnschnitt einer adulten <i>Mecp2^{-/-}</i> -Maus	44
Abbildung 21: IOS einer HSD im akuten Hirnschnitt einer adulten Wildtyp-Maus	45
Abbildung 22: Beispielableitungen der zweiten und dritten HSD aus dem NTS einer Wildtyp-Maus unter Kontrollbedingungen (ACSF) und nach Einwaschen von 50 μ M 8-OH-DPAT	47
Abbildung 23: Normalisierte Parameter der zweiten und dritten HSD aus dem NTS einer Wildtyp-Maus unter Kontrollbedingungen (ACSF) und nach Einwaschen von 50 μ M 8-OH-DPAT	47
Abbildung 24: Beispielableitungen der zweiten und dritten HSD aus dem NTS einer <i>Mecp2^{-/-}</i> -Maus unter Kontrollbedingungen (ACSF) und nach Einwaschen von 50 μ M 8-OH-DPAT	49
Abbildung 25: Normalisierte Parameter der zweiten und dritten HSD bei <i>Mecp2^{-/-}</i> -Tieren in ACSF und nach Einwaschen von 50 μ M 8-OH-DPAT	49
Abbildung 26: Ableitung eines extrazellulären Massenpotentials aus dem Bereich der ventralen respiratorischen Gruppe	51
Abbildung 27: Ableitung des DC-Potentials und des integrierten Massenpotentials aus dem Bereich der VRG während einer HSD.	52

6.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammensetzung der verwendeten Lösungen.....	25
Tabelle 2: Parameter der HSD bei einer extrazellulären K ⁺ -Konzentration von 8 mM im NTS im Vergleich von Wildtyp zu <i>Mecp2</i> ^{-/-}	38
Tabelle 3: Parameter der zweiten und dritten ausgelösten HSD bei einer extrazellulären K ⁺ -Konzentration von 3,5 mM jeweils normalisiert auf die erste HSD im selben Schnitt.....	41
Tabelle 4: Normalisierte Parameter der zweiten und dritten HSD von Wildtyp-Tieren unter Kontrollbedingungen (ACSF) und nach Einwaschen von 8-OH-DPAT.....	46
Tabelle 5: Normalisierte Parameter der zweiten und dritten HSD von bei <i>Mecp2</i> ^{-/-} -Tieren unter Kontrollbedingungen (ACSF) und nach Einwaschen von 8-OH-DPAT	48

6.3 Abkürzungsverzeichnis

ACSF	artifizielle cerebrospinale Flüssigkeit
BDNF	<i>brain derived neurotrophic factor</i>
DC-Potential	Extrazelluläres Gleichspannungs-Potential
HSD	hypoxieinduzierte <i>spreading-depression</i> -ähnliche Depolarisation
5-HT	Serotonin
IOS	intrinsisches optisches Signal
KO	<i>Knockout</i>
MeCP2	<i>methyl CpG binding proteine 2</i> , vom <i>MECP2</i> -Gen kodierte Protein
<i>Mecp2^{-/y}</i>	Mausmodell des Rett-Syndroms mit einer <i>Knockout</i> -Mutation im x-chromosomalen <i>MECP2</i> -Gen, männliches Tier
NTS	Nucleus tractus solitarius
8-OH-DPAT	8-Hydroxy-N,N-dipropyl-2-aminotetralin
preBötC	Prä-Bötzinger-Komplex
SD	<i>spreading depression</i>
VRG	ventrale respiratorische Gruppe
WT	Wildtyp

7 Literaturverzeichnis

- Abdala AP, Dutschmann M, Bissonnette JM, Paton JF (2010): Correction of respiratory disorders in a mouse model of Rett syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 18208-18213
- 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
- Andaku DK, Mercadante MT, Schwartzman JS (2005): Buspirone in Rett syndrome respiratory dysfunction. *Brain Dev* 27, 437-438
- Audero E, Coppi E, Mlinar B, Rossetti T, Caprioli A, Banhaabouchi MA, Corradetti R, Gross C (2008): Sporadic autonomic dysregulation and death associated with excessive serotonin autoinhibition. *Science* 321, 130-133
- 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
- Balestrino M, Young J, Aitken P (1999): Block of (Na⁺,K⁺)ATPase with ouabain induces spreading depression-like depolarization in hippocampal slices. *Brain Res* 838, 37-44
- Ballanyi K, Kuwana S, Volker A, Morawietz G, Richter DW (1992): Developmental changes in the hypoxia tolerance of the in vitro respiratory network of rats. *Neurosci Lett* 148, 141-144
- 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
- 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
- Bissonnette JM, Knopp SJ, Maylie J, Thong T (2007): Autonomic cardiovascular control in methyl-CpG-binding protein 2 (Mecp2) deficient mice. *Auton Neurosci* 136, 82-89
- Bolay H, Reuter U, Dunn AK, Huang Z, Boas DA, Moskowitz MA (2002): Intrinsic brain activity triggers trigeminal meningeal afferents in a migraine model. *Nat Med* 8, 136-142
- Bures J, Buresová K, Krivánek J: The Mechanism and Applications of Leão's Spreading Depression of Electroencephalographic Activity. Academia, Prag 1974
- Chahrour M, Zoghbi HY (2007): The story of Rett syndrome: from clinic to neurobiology. *Neuron* 56, 422-437

Chahrour M, Jung SY, Shaw C, Zhou X, Wong ST, Qin J, Zoghbi HY (2008): MeCP2, a key contributor to neurological disease, activates and represses transcription. *Science* 320, 1224-1229

Chebabo SR, Hester MA, Aitken PG, Somjen GG (1995): Hypotonic exposure enhances synaptic transmission and triggers spreading depression in rat hippocampal tissue slices. *Brain Res* 695, 203-216

Christodoulou J, Grimm A, Maher T, Bennetts B (2003): RettBASE: The IRSA MECP2 variation database-a new mutation database in evolution. *Human Mut* 21, 466-472

Croning MD, Haddad GG (1998): Comparison of brain slice chamber designs for investigations of oxygen deprivation in vitro. *J Neurosci Methods* 81, 103-111

Czéh G, Somjen GG (1990): Hypoxic failure of synaptic transmission in the isolated spinal cord, and the effects of divalent cations. *Brain Res* 527, 224-233

Deng V, Matagne V, Banine F, Frerking M, Ohliger P, Budden S, Pevsner J, Dissen GA, Sherman LS, Ojeda SR (2007): FXYD1 is a MeCP2 target gene overexpressed in the brains of Rett syndrome patients and Mecp2-null mice. *Hum Mol Genet* 16, 640-650

do Carmo RJ, Martins-Ferreira H (1984): Spreading depression of Leao probed with ion-selective microelectrodes in isolated chick retina. *An Acad Bras Cienc* 56, 401-421

Dohmen C, Sakowitz OW, Fabricius M, Bosche B, Reithmeier T, Ernestus RI, Brinker G, Dreier JP, Woitzik J, Strong AJ et al. (2008): Spreading depolarizations occur in human ischemic stroke with high incidence. *Ann Neurol* 63, 720-728

Dreier JP, Woitzik J, Fabricius M, Bhatia R, Major S, Drenckhahn C, Lehmann TN, Sarrafzadeh A, Willumsen L, Hartings JA et al. (2006): Delayed ischaemic neurological deficits after subarachnoid haemorrhage are associated with clusters of spreading depolarizations. *Brain* 129, 3224-3237

Duncan JR, Paterson DS, Hoffman JM, Mokler DJ, Borenstein NS, Belliveau RA, Krous HF, Haas EA, Stanley C, Nattie EE et al. (2010): Brainstem serotonergic deficiency in sudden infant death syndrome. *JAMA* 303, 430-437

Dutschmann M, Waki H, Manzke T, Simms AE, Pickering AE, Richter DW, Paton JF (2009): The potency of different serotonergic agonists in counteracting opioid evoked cardiorespiratory disturbances. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 364, 2611-2623

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

Fleming PJ, Gilbert R, Azaz Y, Berry PJ, Rudd PT, Stewart A, Hall E (1990): Interaction between bedding and sleeping position in the sudden infant death syndrome: a population based case-control study. *BMJ* 301, 85-89

- 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, Müller M, Dutschmann M (2008): Reconfiguration of respiratory-related population activity in a rostrally tilted transversal slice preparation following blockade of inhibitory neurotransmission in neonatal rats. *Pflugers Arch* 457, 185-195
- Funke F, Kron M, Dutschmann M, Müller M (2009): Infant brain stem is prone to the generation of spreading depression during severe hypoxia. *J Neurophysiol* 101, 2395-2410
- Gorji A, Speckmann EJ (2004): Spreading depression enhances the spontaneous epileptiform activity in human neocortical tissues. *Eur J Neurosci* 19, 3371-3374
- Grosso S, Brogna A, Bazzotti S, Renieri A, Morgese G, Balestri P (2007): Seizures and electroencephalographic findings in *CDKL5* mutations: case report and review. *Brain Dev* 29, 239-242
- 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
- Hagberg B (1985): Rett's syndrome: prevalence and impact on progressive severe mental retardation in girls. *Act Paediatr Scand* 74, 405-408
- 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, Olsen CE (1980): Brain extracellular space during spreading depression and ischemia. *Acta Physiol Scand* 108, 355-365
- Hepp S, Müller M (2008): Sulfhydryl oxidation: A potential strategy to achieve neuroprotection during severe hypoxia? *Neuroscience* 152, 903-912
- Hossmann KA (2003): Die Glutamathypothese des Schlaganfalls. *Fortschr Neurol Psychiatr* 71, 10-15
- Huang R, Aitken PG, Somjen GG (1996): Hypertonic environment prevents depolarization and improves functional recovery from hypoxia in hippocampal slices. *J Cereb Blood Flow Metab* 16, 462-467
- Ide S, Itoh M, Goto Y (2005): Defect in normal developmental increase of the brain biogenic amine concentrations in the *mecp2*-null mouse. *Neurosci Lett* 386, 14-17
- Jan MM, Dooley JM, Gordon KE (1999): Male Rett syndrome variant: application of diagnostic criteria. *Pediatr Neurol* 20, 238-240

- Jentarra GM, Olfers SL, Rice SG, Srivastava N, Homanics GE, Blue M, Naidu S, Narayanan V (2010): Abnormalities of cell packing density and dendritic complexity in the MeCP2 A140V mouse model of Rett syndrome/X-linked mental retardation. *BMC Neurosci* 11, 19
- Jian L, Nagarajan L, de Klerk N, Ravine D, Bower C, Anderson A, Williamson S, Christodoulou J, Leonard H (2006): Predictors of seizure onset in Rett syndrome. *J Pediatr* 149, 542-547
- 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
- Katz DM, Dutschmann M, Ramirez JM, Hilaire G (2009): Breathing disorders in Rett syndrome: progressive neurochemical dysfunction in the respiratory network after birth. *Respir Physiol Neurobiol* 168, 101-108
- Kerr AM, Armstrong DD, Prescott RJ, Doyle D, Kearney DL (1997): Rett syndrome: analysis of deaths in the British survey. *Eur Child Adolesc Psychiatry* 6, 71-74
- Kline DD, Ogier M, Kunze DL, Katz DM (2010): Exogenous brain-derived neurotrophic factor rescues synaptic dysfunction in Mecp2-null mice. *J Neurosci* 30, 5303-5310
- 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
- Krüger H, Heinemann U, Luhmann HJ (1999): Effects of ionotropic glutamate receptor blockade and 5-HT_{1A} receptor activation on spreading depression in rat neocortical slices. *Neuroreport* 10, 2651-2656
- Kubin L, Alheid GF, Zuperku EJ, McCrimmon DR (2006): Central pathways of pulmonary and lower airway vagal afferents. *J Appl Physiol* 101, 618-627
- Lalley PM, Bischoff AM, Richter DW (1994): Serotonin 1A-receptor activation suppresses respiratory apneusis in the cat. *Neurosci Lett* 172, 59-62
- Lauritzen M, Olesen J (1984): Regional cerebral blood flow during migraine attacks by Xenon-133 inhalation and emission tomography. *Brain* 107, 447-461
- Lauritzen M, Rice ME, Okada Y, Nicholson C (1988): Quisqualate, kainate and NMDA can initiate spreading depression in the turtle cerebellum. *Brain Res* 475, 317-327

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

Mané M: Spektrale Eigenschaften des intrinsischen optischen Signals während hypoxieinduzierter Spreading Depression im Hippokampus der Ratte. Med. Diss. Göttingen (in Vorbereitung*) 2011

McBain CJ, Traynelis SF, Dingledine R (1990): Regional variation of extracellular space in the hippocampus. *Science* 249, 674-677

Medrihan L, Tantalaki E, Aramuni G, Sargsyan V, Dudanova I, Missler M, Zhang W (2008): Early defects of GABAergic synapses in the brain stem of a MeCP2 mouse model of Rett syndrome. *J Neurophysiol* 99, 112-121

Mies G, Iijima T, Hossmann KA (1993): Correlation between peri-infarct DC shifts and ischaemic neuronal damage in rat. *Neuroreport* 4, 709-711

Mironov SL, Skorova E, Hartelt N, Mironova LA, Hasan MT, Kügler S (2009): Remodelling of the respiratory network in a mouse model of Rett syndrome depends on brain-derived neurotrophic factor regulated slow calcium buffering. *J Physiol* 587, 2473-2485

Müller M (2000): Effects of chloride transport inhibition and chloride substitution on neuron function and on hypoxic spreading-depression-like depolarization in rat hippocampal slices. *Neuroscience* 97, 33-45

Müller M, Somjen GG (1999): Intrinsic optical signals in rat hippocampal slices during hypoxia-induced spreading depression-like depolarization. *J Neurophysiol* 82, 1818-1831

Nicholson C (1984): Comparative neurophysiology of spreading depression in the cerebellum. *An Acad Bras Cienc* 56, 481-494

Nomura Y (2005): Early behavior characteristics and sleep disturbance in Rett syndrome. *Brain Dev* 27, S35-S42

Ogier M, Katz DM (2008): Breathing dysfunction in Rett syndrome: Understanding epigenetic regulation of the respiratory network. *Respir Physiol Neurobiol* 164, 55-63

Percy AK (2002): Rett syndrome. Current status and new vistas. *Neurol Clin* 20, 1125-1141

Ponsonby AL, Dwyer T, Gibbons LE, Cochrane JA, Wang YG (1993): Factors potentiating the risk of sudden infant death syndrome associated with the prone position. *N Engl J Med* 329, 377-382

Prehn JH, Backhauss C, Karkoutly C, Nuglisch J, Peruche B, Rossberg C, Krieglstein J (1991): Neuroprotective properties of 5-HT_{1A} receptor agonists in rodent models of focal and global cerebral ischemia. *Eur J Pharmacol* 203, 213-222

* mit freundlicher Genehmigung der Verfasserin

- Ramirez JM, Quellmalz UJ, Richter DW (1996): Postnatal changes in the mammalian respiratory network as revealed by the transverse brainstem slice of mice. *J Physiol* 491,799-812
- Ramirez JM, Quellmalz UJ, Wilken B, Richter DW (1998): The hypoxic response of neurones within the *in vitro* mammalian respiratory network. *J Physiol* 507 571-582
- Reid KH, Marrannes R, Wauquier A (1988): Spreading depression and central nervous system pharmacology. *J Pharmacol Methods* 19, 1-21
- Rett A (1966): Über ein eigenartiges hirnatrophisches Syndrom bei Hyperammonämie im Kindesalter. *Wien Med Wochenschr* 116, 723-726
- Richter DW, Bischoff A, Anders K, Bellingham M, Windhorst U (1991): Response of the medullary respiratory network of the cat to hypoxia. *J Physiol* 443, 231-256
- Richter DW, Manzke T, Wilken B, Ponimaskin E (2003): Serotonin receptors: guardians of stable breathing. *Trends Mol Med* 9, 542-548
- Richter F, Rupprecht S, Lehmenkühler A, Schaible HG (2003): Spreading depression can be elicited in brain stem of immature but not adult rats. *J Neurophysiol* 90, 2163-2170
- Richter F, Bauer R, Lehmenkühler A, Schaible HG (2008): Spreading depression in the brainstem of the adult rat: electrophysiological parameters and influences on regional brainstem blood flow. *J Cereb Blood Flow Metab* 28, 984-994
- Richter F, Bauer R, Lehmenkühler A, Schaible HG (2010): The relationship between sudden severe hypoxia and ischemia-associated spreading depolarization in adult rat brainstem *in vivo*. *Exp Neurol* 224, 146-154
- Roux JC, Dura E, Villard L (2008): Tyrosine hydroxylase deficit in the chemoafferent and the sympathoadrenergic pathways of the *Mecp2* deficient mouse. *Neurosci Lett* 447, 82-86
- Schmitz D, Empson RM, Heinemann U (1995a): Serotonin reduces inhibition via 5-HT_{1A} receptors in area CA1 of rat hippocampal slices *in vitro*. *J Neurosci* 15, 7217-7225
- Schmitz D, Empson RM, Heinemann U (1995b): Serotonin and 8-OH-DPAT reduce excitatory transmission in rat hippocampal area CA1 via reduction in presumed presynaptic Ca²⁺ entry. *Brain Res* 701, 249-254
- 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
- Silver IA, Erecinska M (1990): Intracellular and extracellular changes of Ca²⁺ in hypoxia and ischemia in rat brain *in vivo*. *J Gen Physiol* 95, 837-866
- Smith JC, Ellenberger HH, Ballanyi K, Richter DW, Feldman JL (1991): Pre-Bötzing complex: a brainstem region that may generate respiratory rhythm in mammals. *Science* 254, 726-729

- Snow RW, Taylor CP, Dudek FE (1983): Electrophysiological and optical changes in slices of rat hippocampus during spreading depression. *J Neurophysiol* 50, 561-572
- Somjen GG (2001): Mechanisms of spreading depression and hypoxic spreading depression-like depolarization. *Physiol Rev* 81, 1065-1096
- Somjen GG, Aitken PG, Czeh GL, Herreras O, Jing J, Young JN (1992): Mechanism of spreading depression: a review of recent findings and a hypothesis. *Can J Physiol Pharmacol* 70, S248-254
- Sparks DL, Hunsaker JC, 3rd (2002): Neuropathology of sudden infant death (syndrome): literature review and evidence of a probable apoptotic degenerative cause. *Childs Nerv Syst* 18, 568-592
- Steffenburg U, Hagberg G, Hagberg B (2001): Epilepsy in a representative series of Rett syndrome. *Acta Paediatr* 90, 34-39
- Stettner GM, Huppke P, Brendel C, Richter DW, Gärtner J, Dutschmann M (2007): Breathing dysfunctions associated with impaired control of postinspiratory activity in *Mecp2^{-y}* knockout mice. *J Physiol* 579, 863-876
- Stettner GM, Zanella S, Hilaire G, Dutschmann M (2008a): 8-OH-DPAT suppresses spontaneous central apneas in the C57BL/6J mouse strain. *Respir Physiol Neurobiol* 161, 10-15
- Stettner GM, Huppke P, Gärtner J, Richter DW, Dutschmann M (2008b): Disturbances of breathing in Rett syndrome: results from patients and animal models. *Adv Exp Med Biol* 605, 503-507
- Strong AJ, Fabricius M, Boutelle MG, Hibbins SJ, Hopwood SE, Jones R, Parkin MC, Lauritzen M (2002): Spreading and synchronous depressions of cortical activity in acutely injured human brain. *Stroke* 33, 2738-2743
- Suzuki S, Brown CM, Wise PM (2006): Mechanisms of neuroprotection by estrogen. *Endocrine* 29, 209-215
- Taneja P, Ogier M, Brooks-Harris G, Schmid DA, Katz DM, Nelson SB (2009): Pathophysiology of locus ceruleus neurons in a mouse model of Rett syndrome. *J Neurosci* 29, 12187-12195
- Tao L (2000): Light scattering in brain slices measured with a photon counting fiber optic system. *J Neurosci Methods* 101, 19-29
- Viemari JC, Roux JC, Tryba AK, Saywell V, Burnet H, Pena F, Zanella S, Bevengut M, Barthelemy-Requin M, Herzing LB et al. (2005): *Mecp2* deficiency disrupts norepinephrine and respiratory systems in mice. *J Neurosci* 25, 11521-11530
- Voituron N, Zanella S, Menuet C, Dutschmann M, Hilaire G (2009): Early breathing defects after moderate hypoxia or hypercapnia in a mouse model of Rett syndrome. *Respir Physiol Neurobiol* 168, 109-118
- Wasserman AM, Sahibzada N, Hernandez YM, Gillis RA (2000): Specific subnuclei of the nucleus tractus solitarius play a role in determining the duration of inspiration in the rat. *Brain Res* 880, 118-130

Wasserman AM, Ferreira M, Jr., Sahibzada N, Hernandez YM, Gillis RA (2002): GABA-mediated neurotransmission in the ventrolateral NTS plays a role in respiratory regulation in the rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 283, R1423-1441

Weese-Mayer DE, Lieske SP, Boothby CM, Kenny AS, Bennett HL, Ramirez JM (2008): Autonomic dysregulation in young girls with Rett Syndrome during nighttime in-home recordings. *Pediatr Pulmonol* 43, 1045-1060

Wilken B, Lalley P, Bischoff AM, Christen HJ, Behnke J, Hanefeld F, Richter DW (1997): Treatment of apneustic respiratory disturbance with a serotonin-receptor agonist. *J Pediatr* 130, 89-94

Willinger M, James LS, Catz C (1991): Defining the sudden infant death syndrome (SIDS): deliberations of an expert panel convened by the National Institute of Child Health and Human Development. *Pediatr Pathol* 11, 677-684

Wu J, Fisher RS (2000): Hyperthermic spreading depressions in the immature rat hippocampal slice. *J Neurophysiol* 84, 1355-1360

Zhang X, Su J, Cui N, Gai H, Wu Z, Jiang C (2011): The disruption of central CO₂ chemosensitivity in a mouse model of Rett syndrome. *Am J Physiol Cell Physiol* 301, 729-738

Zoghbi HY (2003): Postnatal neurodevelopmental disorders: meeting at the synapse? *Science* 302, 826-830

Danksagung

Mein besonderer Dank gebührt Herrn Prof. Dr. Michael Müller für die vorbildhafte Betreuung und Förderung meiner Arbeit, insbesondere dafür, dass er bei Fragen und Problemen jederzeit ansprechbar war.

Herrn Dr. Frank Funke danke ich für seine große Geduld und Mühe bei der Einführung in neue Methoden und Techniken sowie seinen unerschütterlichen Optimismus.

Außerdem möchte ich Frau Dr. Miriam Kron für Ihre Hilfe in technischen Fragestellungen und für die Weiterführung des im Rahmen meiner Arbeit begonnenen Projektes danken.

Besonders danke ich auch Frau Belinda Hildebrandt für die labortechnische Unterstützung, die Bereitstellung der Genotypisierungen und ihre positive Art, die sehr zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen hat.

Weiterhin danke ich Herrn Christian Schnell für die guten Ratschläge bei der Etablierung des rhythmisch aktiven Schnittes.

Lebenslauf

Ich, Jasper Lukas Zimmermann, wurde am 31.05.1986 als erstes Kind der Diplom-Verwaltungswirtin Ulrike Schramke-Zimmermann und des Diplom-Ingenieurs Johann Zimmermann in Oldenburg geboren. Von 1992 bis 1996 besuchte ich die Heiligengeisttor Grundschule, von 1996 bis 1998 die Orientierungsstufe Alexanderstraße und von 1998 bis 2005 das Gymnasium Liebfrauenschule in Oldenburg. Dort legte ich 2005 mein Abitur mit der Note 1,5 ab. Seit dem Sommersemester 2006 studiere ich an der Georg-August-Universität Göttingen Humanmedizin und habe dort im Frühjahr 2008 den ersten Abschnitt der ärztlichen Prüfung mit der Note 1,0 absolviert. Im Herbst 2008 wurde ich als Stipendiat in die Studienstiftung des deutschen Volkes aufgenommen. Seit dem August 2011 befinde ich mich im Praktischen Jahr. Die vorliegende Arbeit fertigte ich zwischen 2008 und 2011 in der Abteilung Neuro- und Sinnesphysiologie am Institut für Physiologie und Pathophysiologie unter der Leitung von Prof. Dr. rer. nat. Michael Müller an. Während dieser Zeit wurde ich für sechs Monate von der Universitätsmedizin Göttingen mit einem Forschungsstipendium im Rahmen des Programmes Gö4med gefördert. Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten lieferten die Grundlage für eine wissenschaftliche Publikation, die inzwischen im Journal of Neurophysiology erschienen ist sowie für drei Beiträge zu internationalen wissenschaftlichen Kongressen:

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

Müller M., Zimmermann JL, Kron M, Funke F (2010). Enhanced hypoxia susceptibility of MeCP2-deficient mouse brainstem. *Society for Neuroscience Abstracts*, 148.7.

Funke F, Zimmermann JL, Kron M, Müller M (2010). Enhanced hypoxia susceptibility in MeCP2-deficient mouse brainstem. *Acta Physiologica* 198 (Supplement 677), P-Mon-76 (Abstract).

Zimmermann JL, Funke F, Kron M, Müller M (2009). Enhanced hypoxia susceptibility of the brainstem of MeCP2 deficient mice. *Society for Neuroscience Abstracts*, 732.7.