

Aus der Abteilung Neuro- und Sinnesphysiologie

(Prof. Dr. med. D. W. Richter)

im Zentrum Physiologie und Pathophysiologie

der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

---

**Extramitochondriale und mitochondriale Produktion  
reaktiver Sauerstoffspezies im Hippokampus MeCP2-  
defizienter Mäuse**

INAUGURAL – DISSERTATION

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

vorgelegt von

**Ursula Gerda Hermine Hirt**

aus

**Aachen**

Göttingen 2013

**Dekan:** Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer

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

**II. Berichterstatter/in:** Prof. Dr. med. L. Maier

**III. Berichterstatter/in:** Prof. Dr. med. M. Oppermann

**Tag der mündlichen Prüfung:** 28.01.2014

# Inhalt

<b>1 Einleitung</b> .....	<b>5</b>
1.1 Das Rett-Syndrom .....	5
1.2 Mitochondriale Veränderungen im Rett-Syndrom .....	10
1.3 ROS-Produktion durch Mitochondrien .....	13
1.4 Zelluläre Produktion von ROS .....	17
1.5 Der optische Redoxindikator roGFP1 .....	18
1.6 Ziele der Arbeit .....	20
<b>2 Material und Methoden</b> .....	<b>22</b>
2.1 Mausmodell für das Rett-Syndrom .....	22
2.2 Präparation .....	23
2.3 Transfektion der Hirnschnittkulturen.....	25
2.4 Die optische Messung: Aufbau und Durchführung.....	26
2.5 roGFP1 (reduction/oxidation sensitive GFP) .....	31
2.6 C11-Bodipy <sup>581/591</sup> .....	32
2.7 2-Photonen-Laser-Scanning-Mikroskop.....	33
2.8 Zusammensetzung der Lösungen und Kulturmedien .....	35
2.9 Verwendete Pharmaka und Modulanzen.....	37
2.10 Statistik .....	39
<b>3 Ergebnisse</b> .....	<b>40</b>
3.1 Kalibrierung des roGFP1-Antwortbereichs.....	40
3.2 Zellkultur mit und ohne Antioxidanzien .....	46
3.3 Mitochondriale ROS-Produktion .....	48
3.4 Extramitochondriale ROS-Produktion .....	51

3.5 Einfluss von NO und Glutamat auf die ROS-Produktion .....	55
3.6 Visualisierung oxidativer Schäden mittels C11-Bodipy <sup>581/591</sup> ..	57
<b>4 Diskussion .....</b>	<b>60</b>
<b>5 Zusammenfassung und Ausblick .....</b>	<b>69</b>
<b>6 Anhang .....</b>	<b>71</b>
6.1 Abbildungsverzeichnis.....	71
6.2 Tabellenverzeichnis.....	72
6.3 Abkürzungsverzeichnis .....	72
<b>7 Literaturverzeichnis .....</b>	<b>74</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Rett-Syndrom

Das Rett-Syndrom ist eine postnatal progressiv verlaufende neurologische Entwicklungsstörung, die erstmals 1966 von dem Wiener Arzt Andreas Rett beschrieben wurde (Rett 1966). Die Prävalenz wird in Deutschland auf 1:10.000 bis 1:15.000 Mädchen geschätzt. Diese Schätzung erfolgt auf Grundlage einer epidemiologischen Studie, die Hagberg 1985 in Schweden durchführte (Hagberg 1985). Auch wenn damit das Rett-Syndrom selten ist, so zählt diese Erkrankung nach dem Down-Syndrom zu den häufigsten Ursachen für eine schwere geistige Behinderung von Mädchen.

Das klassische Rett-Syndrom entsteht durch eine spontane Mutation des *MECP2*-Gens, welches auf der Bande 28 im langen Arm des X-Chromosoms (Xq28) lokalisiert ist. Dieses Gen ist für die Kodierung des Transkriptionsfaktors MeCP2 (*methyl CpG binding protein 2*) verantwortlich (Amir et al. 1999; Chahrour et al. 2008). In 99,5% der Fälle handelt es sich um eine dominante *de-novo*-Mutation, die hauptsächlich in der väterlichen Keimbahn auftritt (Trappe et al. 2001). Das erklärt auch, wieso fast ausschließlich Mädchen vom Rett-Syndrom betroffen sind. Bei Jungen sind diese Mutationen normalerweise letal oder führen zu sehr schweren Behinderungen (Villard 2007).

Neben dem klassischen Rett-Syndrom gibt es auch noch eine Variante, der eine Mutation im *CDKL5*-Gen (*Cyclin-dependent Kinase-like 5*-Gen) zugrunde liegt. Das *CDKL5*-Gen liegt anders als das *MECP2*-Gen auf dem kurzen Arm des X-Chromosoms (Xp22). Die betroffenen Mädchen fallen meist innerhalb der ersten 3 Lebensmonate durch das Auftreten einer infantilen Epilepsie auf (Mari et al. 2005).

Bis zum Jahr 1999 erfolgte die Diagnose des Rett-Syndroms nur mit Hilfe eines Score Systems der Symptome (Hagberg et al. 1985; Hagberg and Witt-Engerström 1986). Seit 1999 existiert ein Gen-Test, durch den das Rett-Syndrom eindeutig bestimmt werden kann (Amir et al. 1999; Buyse et al. 2000). Dadurch ist es möglich, auch den Patientinnen das Rett-Syndrom zuzuordnen, die nicht den typischen Verlauf mit den entsprechenden Symptomen zeigen. Die große Variabilität des Phänotyps wird unter anderem durch die X-Chromosomeninaktivierung begründet (Weaving et al. 2003; Watson et al. 2005), denn der Lyon-Hypothese zu Folge wird in jeder Zelle zufällig eines der beiden X-Chromosomen inaktiviert (Lyon 1961). Bei betroffenen Jungen liegt immer die maximale Expressivität vor, da diese nur ein X-Chromosom besitzen. Inzwischen ist das Rett-Syndrom auch in den ICD-10-Klassifikationen aufgelistet und zählt zu den tiefgreifenden Entwicklungsstörungen F84.2 (Graubner 2012).

Der Verlauf der Entwicklung beim Rett-Syndrom wird allgemein in 4 Stadien unterteilt (Hagberg et al. 1983; Hagberg and Witt-Engerström 1986):

1. Stadium: Stagnation, Entwicklungsstillstand (6.-18. Lebensmonat)
2. Stadium: Regressionsphase (dauert einige Monate)
3. Stadium: pseudostationäre Phase, Plateauphase (2.-10. Lebensjahr)
4. Stadium: Phase der motorischen Verschlechterung (ab dem 10. Lebensjahr).

Die weiblichen Patienten zeigen in den ersten 6-18 Lebensmonaten zunächst eine normale Entwicklung. Einige lernen während dieser Zeit sogar laufen und sprechen. Ein Frühindikator wäre in diesem Stadium die Verlangsamung des Kopfwachstums, welche ab dem 2. Lebensjahr zu einer Mikrozephalie der Rett-Patientinnen führt. Wenn der Stillstand der Entwicklung eintritt, wird die Mikrozephalie von einer allgemeinen Wachstumsverzögerung begleitet. Zusätzlich kommt es zu Gewichtsverlust und zu einer schwachen Körperhaltung aufgrund von Muskelhypotonie. Neue Dinge werden von den Mädchen ab

diesem Zeitpunkt langsamer erlernt und ihre Aufmerksamkeit gegenüber der Umwelt nimmt ab (Chahrour and Zoghbi 2007).

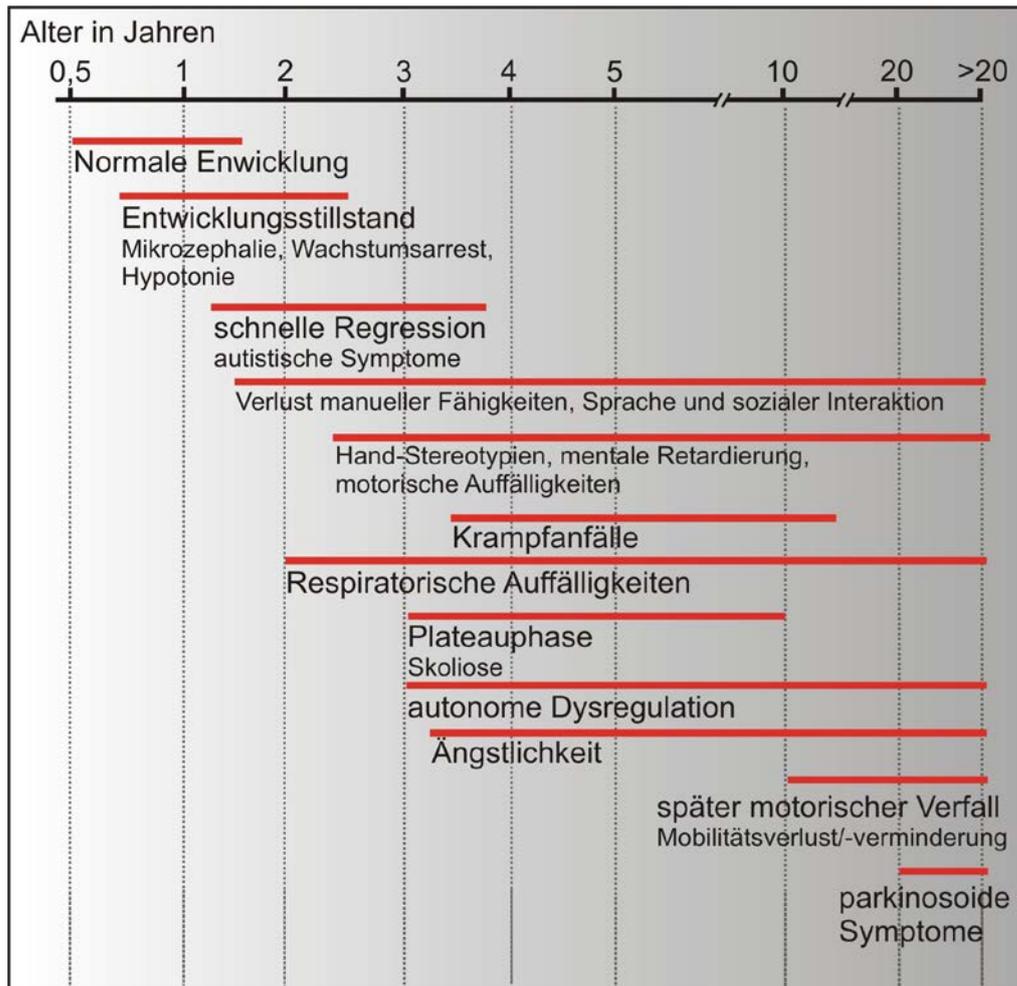
Das Stadium der Stagnation kann einige Monate dauern und es folgt eine allgemeine Regression der Entwicklung. Sie ist durch schwere Atembeschwerden, motorische Dysfunktionen, Verlust der Sprache, autistische Verhaltensweisen, epileptische Anfälle und variable mentale Retardierung gekennzeichnet. Die Fähigkeit, die Hände gezielt einzusetzen, geht verloren und es entwickeln sich stattdessen stereotypische waschende und knetende Handbewegungen (Hagberg et al. 1983; Steffenburg et al. 2001; Chahrour and Zoghbi 2007).

In der Regressionsphase kommt es zu einem Verlust der bereits erworbenen Fähigkeiten wie Laufen, Krabbeln, Sitzen, Sprechen oder soziale Kontaktfähigkeit. Es ist individuell sehr unterschiedlich, was verloren geht. Aber das Greifen, also der gezielte Einsatz der Hände geht typischerweise immer verloren und es setzen Handstereotypien ein. Häufig wird bei den Mädchen auch ein Zähneknirschen beobachtet. Begleitet wird die Regressionsphase von fast pausenlosem Schreien, weshalb sie auch als sogenannte Schreiphase beschrieben wird (Hagberg et al. 1983; Hagberg and Witt-Engerström 1986).

Nach der Regressionsphase werden die Mädchen nun wieder etwas ruhiger und zugänglicher. Es kommt zu einer Verminderung der autistischen Züge, sie nehmen Reize aus ihrer Umwelt wieder besser wahr und die Fähigkeit zur Kommunikation verbessert sich. Bekannte Symptome wie Handstereotypien, Zähneknirschen und epileptische Anfälle bleiben jedoch erhalten. Apraxie (neurologische Bewegungsstörung, infolge deren die Patientin unfähig ist, erlernte, willkürlich zielgerichtete bzw. zweckmäßige Bewegungen durchzuführen) und Gang- und Rumpfataxie (Störung der Bewegungskoordination, es kommt zu ruckartigen Bewegungen) verschlechtern

sich (Hagberg et al. 1983; Hagberg and Witt-Engerström 1986; Chahrour and Zoghbi 2007) (siehe auch Abbildung 1).

Auch wenn der kognitive Fortschritt erhalten bleibt, so setzen ab der Pubertät Spastiken, Bradykinesien und Dystonien ein. Oft werden die Mädchen auch durch die zunehmende Schwäche, Abmagerung und Skoliose immobil und sind ab dann auf einen Rollstuhl angewiesen (Hagberg et al. 1983; Hagberg and Witt-Engerström 1986). Über die Lebenserwartung der Rett-Patientinnen gibt es unterschiedliche Daten. Bei der Analyse australischer Daten von 332 Mädchen überlebten bis zum 20. Lebensjahr 78.3% (Freilinger et al. 2010). Etwa 25% der Rett-Patientinnen sind von einem plötzlichen Tod durch kardio-respiratorisches Versagen bedroht (Kerr et al. 1997; Julu et al. 2001).



**Abbildung 1: Stadien der Entwicklung und charakteristische Symptome beim Rett-Syndrom**

Auf eine initial normale Entwicklung der Mädchen folgt ein Stadium der Stagnation ab dem 6.-18. Lebensmonat, einhergehend mit einer zunehmenden Regression bereits erlernter Fähigkeiten. Die unterschiedlich lang andauernde Plateauphase endet schließlich in einer Phase der motorischen Verschlechterung.

[Quelle: modifiziert nach Chahrouh and Zoghbi 2007, S.423]

Eine kausale Therapie für das Rett-Syndrom gibt es bis zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht. Die Forschung zeigt jedoch, dass die Früherkennung solcher Entwicklungsstörungen wichtig ist, um einen günstigen Verlauf zu erzielen. Es gibt eine Vielzahl von unterstützenden Therapien, die den Mädchen helfen, sich das Leben zu erleichtern, und die zu einer gewissen Verbesserung der Lebensqualität beitragen (Segawa and Nomura 2005). Diese Therapien bezwecken, den Verlust von Fähigkeiten zu verlangsamen, Bewegungen zu

erhalten und zu verbessern und die soziale Kommunikation zu fördern. Es werden sehr individuell Physiotherapie, Ergotherapie, Musiktherapie, Hippotherapie (therapeutisches Reiten) sowie Logopädie angewendet. Zudem wurden schon Daten über den Nutzen einer ketogenen Diät erhoben (Haas et al. 1986), die Anwendung von Opioid-Antagonisten wie Naltrexon und Naloxon getestet (Percy et al. 1994) und klinische Studien durchgeführt, in denen eine Behandlung mit L-Carnitin untersucht wurde (Ellaway et al. 1999). Keine dieser Studien zeigte allerdings signifikante Verbesserungen der klinischen Symptome der Rett-Patienten (Percy 2002). Aktuell gibt es verschiedene Therapieansätze auf genetischer und synaptischer Ebene, die einerseits noch an Mausmodellen und andererseits schon auf der Erprobungsebene bei Rett-Patientinnen getestet werden (Percy 2002; Gadalla et al. 2011).

### **1.2 Mitochondriale Veränderungen im Rett-Syndrom**

Mitochondrien gelten als die Energiequelle einer Zelle, da sie vor allem für die ATP-Gewinnung durch die oxidative Phosphorylierung entscheidend sind. Mehr als 95% des ATP im Gehirn wird in den Mitochondrien produziert, die Glykolyse im Zytoplasma dagegen macht nur 1-5% des ATP-Gehalts aus (Erecińska and Silver 1989). Zudem spielen Mitochondrien bei der Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase eine wichtige Rolle und haben eine Reihe von Aufgaben zu erfüllen. Sie sind zum Beispiel mit verantwortlich für die Regulierung der zytosolischen Calciumkonzentration und auch der intrazelluläre pH-Wert kann unter Umständen beeinflusst werden. Zudem stellen sie eine wesentliche Quelle der ROS-Produktion (reaktive Sauerstoffspezies, engl. *reactive oxygen species*) dar (Foster et al. 2006; Moreira et al. 2010).

In Anbetracht der unterschiedlichen mitochondrialen Funktionen und deren Integration in verschiedene zelluläre Signalwege ist es nicht überraschend, dass

Beeinträchtigungen der mitochondrialen Physiologie derzeit als zentrales Ereignis bei neurodegenerativen Erkrankungen betrachtet werden (Foster et al. 2006). Als mögliche Ursache für die Parkinson-Erkrankung wird eine chronische Dysfunktion von Komplex I in Betracht gezogen (Schulz and Beal 1994). Die Dysfunktion von Komplex II scheint die Huntington-Krankheit zu vermitteln (Cooper and Schapira 1997) und eine Störung im Komplex IV gilt als häufigste Störung beim Leigh-Syndrom (Dahl 1998). Erhöhte ROS-Spiegel als Folge von Störungen der Mitochondrien sind zusammen mit Veränderungen bei ROS-Abbauprozessen möglicherweise an der Entstehung von Alzheimer (Behl and Moosmann 2002) und der amyotrophen Lateralsklerose (Kong and Xu 1998) beteiligt.

Das Rett-Syndrom ist zwar keine neurodegenerative Erkrankung, dennoch gibt es aber auch bei Rett-Patienten klare Hinweise dafür, dass morphologische Veränderungen der Mitochondrien vorliegen. Muskel- und Frontallappen-Biopsien zeigten geschwollene Mitochondrien mit granulären Einschlüssen, Vakuolisierungen und membranösen Veränderungen (Cornford et al. 1994; Eeg-Olofsson et al. 1990; Ruch et al. 1989). Solche ultrastrukturellen Veränderungen wurden auch für die kortikalen und hippokampalen Mitochondrien der *Mecp2*<sup>+/y</sup>-Mäuse bestätigt (Belichenko et al. 2009). Auch für Funktionsstörungen der Mitochondrien gibt es überzeugende Beweise. Biochemische Analysen von Muskel- und Frontallappen-Biopsien von Rett-Patienten zeigen geringere Konzentrationen der Cytochrom-C-Oxidase und der Succinat-Cytochrom-C-Reduktase (Coker and Melnyk 1991; Gibson et al. 2010).

Professor Müller mit seiner Arbeitsgruppe und auch andere beobachteten eine erhöhte Anfälligkeit der Hippokampi und des Hirnstamms MeCP2-defizienter Mäuse auf Hypoxie (Fischer et al. 2009; Kron and Müller 2010; Kron et al. 2011; Mironov et al. 2009). Eine gestörte zelluläre Calcium-Homöostase und eine Kalium-Kanal-Dysfunktion wurden als mögliche Ursachen für die erhöhte

Anfälligkeit der hippokampalen CA1-Neuronen auf Hypoxie identifiziert (Fischer et al. 2009; Kron and Müller 2010). Aufgrund dieser erhöhten Hypoxie-Empfindlichkeit könnte ein O<sub>2</sub>-Mangel, der aus einer unregelmäßigen Atmung resultiert, die Funktion der Mitochondrien und damit die zelluläre Energieversorgung direkt beeinflussen. Tatsächlich wurden bei Rett-Patientinnen Schwankungen des Blut-Laktat-Spiegels beobachtet (Haas et al. 1995).

Da die Atmungskette eine wichtige Ausgangsquelle von Superoxiden darstellt, ist die Generierung von ROS direkt mit der mitochondrialen Aktivität verbunden (Boveris and Chance 1973). Eine erhöhte basale mitochondriale Atmung könnte daher zu einer verstärkten ROS-Bildung führen und damit zu einem Ungleichgewicht im zellulären Redox-Status. Tatsächlich zeigte die Arbeitsgruppe Müller eine Beeinträchtigung der Mitochondrien und eine Verschiebung des zellulären Redox-Gleichgewichts mit Hilfe des genetisch kodierten optischen ROS-/Redox-Sensors roGFP1 im Hippokampus von Rett-Mäusen (Großer et al. 2012).

Es gibt auch weitere Belege für eine erhöhte oxidative Belastung bei Rett-Patienten. Blutproben der Patienten zeigten eine geringere Aktivität der Superoxid-Dismutase (SOD), sowie einen verminderten Vitamin-E-Spiegel. Des Weiteren fanden sich erhöhte Eisen- und Carbonylprotein-Konzentrationen, ein erhöhter Malondialdehyd-Spiegel und erhöhtes F2-Isoprostan im Plasma bei Rett-Patienten. F2-Isoprostan ist unter anderem ein Indikator für eine intensivere Lipidperoxidation und entsteht bei oxidativem Stress durch freie Radikale aus Arachidonsäure (de Felice et al. 2009; Sierra et al. 2001).

### 1.3 ROS-Produktion durch Mitochondrien

Unter dem Begriff reaktive Sauerstoffspezies (ROS, engl. *reactive oxygen species*) wird eine Vielzahl von Molekülen und freien Radikalen (chemische Verbindungen mit einem ungepaarten Elektron) zusammengefasst, die sich von molekularem Sauerstoff ableiten (Turrens 2003). Das Sauerstoffmolekül ( $O_2$ ) enthält zwei ungepaarte Elektronen auf der äußeren Schale und ist somit ein Diradikal. Durch die besondere Elektronenanordnung ist  $O_2$  relativ stabil und reagiert nur mit einem Elektron zum gleichen Zeitpunkt. Wenn das Molekül allerdings ein weiteres Elektron aufnimmt, entsteht aus dem  $O_2$  ein Superoxid-Radikal ( $\bullet O_2^-$ ), welches als Vorstufe der meisten ROS dient. Aus Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) und  $\bullet O_2^-$  entstehen in der Fenton-Reaktion unter anderem auch Hydroxyl-Radikale ( $\bullet OH$ ) (Halliwell and Gutteridge 1984).  $\bullet OH$  gelten unter den ROS zu den reaktionsfreudigsten Verbindungen und zählen zu den stärksten natürlichen Oxidationsmitteln (Dean et al. 1997). Die nachfolgende Tabelle gibt einen kleinen Überblick über die verschiedenen ROS (Sies 1993).

ROS-Bezeichnung	Chemisches Symbol
Hydroxyl-Radikal	$\bullet OH$
Superoxidanion-Radikal	$\bullet O_2^-$
Singulett-Sauerstoff	$^1O_2$
Ubisemiquinon-Radikal	$\bullet Q^-$
Peroxynitrit	$ONOO^-$
Nitritoxid-Radikal	$\bullet NO$
Wasserstoffperoxid	$H_2O_2$

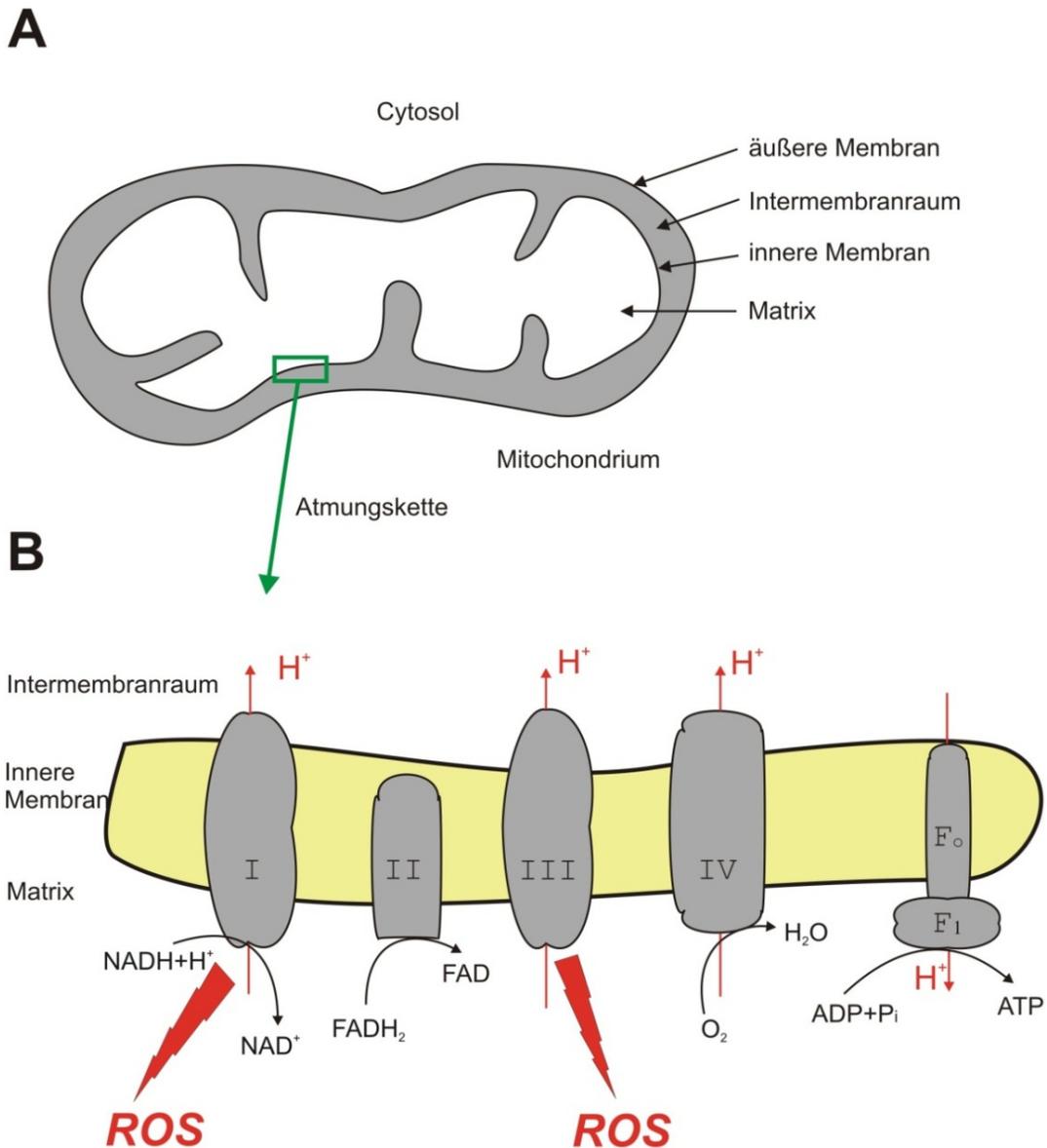
**Tabelle 1: Überblick über verschiedene ROS**

ROS entstehen als Nebenprodukt des Zellstoffwechsels und erfüllen in geringen Dosen einerseits wichtige Aufgaben im zellulären Signaltransduktionssystem und werden andererseits als potentiell zellschädigend betrachtet, wenn zu viel ROS gebildet werden (Finkel 1998). ROS entstehen in verschiedenen zellulären Enzymsystemen, die entweder in den Mitochondrien oder im Zytosol lokalisiert sind. Mitochondrien erzeugen etwa 85% des gesamten zellulären  $\bullet\text{O}_2^-$  und stellen damit die größte Quelle von  $\bullet\text{O}_2^-$  und anderen ROS dar (Boveris and Chance 1973; Dröge 2002; Chen 2003). Während des Prozesses des Elektronentransportes in der mitochondrialen Atmungskette entweichen etwa 2-5% der Elektronen und reagieren unmittelbar mit dem diffusionsfähigen  $\text{O}_2$ , was zur  $\bullet\text{O}_2^-$  Produktion führt (Boveris and Chance 1973; Dröge 2002; Foster et al. 2006). Es kommt vor allem an zwei Komplexen zur Bildung von Superradikalen: an Komplex I, der NADH-Dehydrogenase (Turrens and Boveris 1980; Turrens 1997) und Komplex III, der Cytochrom-C-Reduktase (Boveris et al. 1976; Turrens 1997) (siehe Abbildung 2). Die meisten Sauerstoffmoleküle, die durch aerobe Organismen verbraucht werden, reduziert die Cytochrom-C-Oxidase in der letzten Reaktion der Atmungskette zu Wasser.

Auch verschiedene zytosolische Oxidasen, wie z.B. die Xanthin-Oxidase oder die NAD(P)H-Oxidase erzeugen ROS (Boveris and Chance 1973; Dröge 2002). Wie bereits kurz angedeutet, vermitteln ROS eine positive, physiologische und eine pathogene Rolle in der Zelle (Valko et al. 2007). Physiologisch werden ROS in niedrigen Konzentrationen eingesetzt. Zum Beispiel werden in Immunzellen ROS zur Verteidigung gegen infektiöse Antigene gebildet oder auch  $\text{H}_2\text{O}_2$  spielt im Hirn als intrazellulärer Botenstoff eine wichtige Rolle bei der Signaltransduktion und der Regulation des Gefäßtonus (Chan 2001; Demchenko et al. 2002; Foster et al. 2006; Valko et al. 2007). Es konnte bereits gezeigt werden, dass  $\text{H}_2\text{O}_2$  intrazelluläre Calcium-Speicher moduliert, die neuronale Erregbarkeit über eine Steigerung der Kalium-Leitfähigkeit kontrolliert, den zytosolischen Redox-Status durch eine Oxidation von NADH und  $\text{FADH}_2$  moduliert und den zellulären ATP-

Gehalt reduziert (Gerich et al. 2009). Unter normalen physiologischen Bedingungen werden das zelluläre  $\text{H}_2\text{O}_2$  und andere ROS durch verschiedene zelleigene Antioxidanzien, besonders durch die Katalase und das Glutathion-(GSH-) System entfernt (Chan 1996; Foster et al. 2006). Zum Beispiel entsteht durch die Dismutation von  $\bullet\text{O}_2^-$ , die entweder spontan abläuft oder von der Superoxiddismutase (SOD) katalysiert wird,  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Cadenas and Davies 2000). Aufgrund seiner langen Halbwertszeit wirkt  $\text{H}_2\text{O}_2$  als physiologisches, membranpermeables Signalmolekül und stellt eine zentrale Verbindung im ROS-Stoffwechsel dar.  $\text{H}_2\text{O}_2$  kann wiederum vollständig zu  $\text{H}_2\text{O}$  reduziert werden.

Allerdings führt eine Überproduktion von ROS zu oxidativem Stress, was ein Ungleichgewicht zwischen Oxidations- und Reduktionsmitteln beschreibt. Durch die unkontrollierte Oxidation von Makromolekülen wie Proteinen, Membranlipiden und somatischer DNA werden diese wichtigen Zellstrukturen beschädigt (Chan 1996; Valko et al. 2007). Dadurch wird nicht nur das Zytoskelett beeinflusst, sondern auch zelluläre Funktionen und zytosolische Signalwege. Ironischerweise schützen verschiedene ROS-vermittelte Reaktionen die Zelle vor ROS-induziertem oxidativem Stress und stellen so das Redox-Gleichgewicht, auch als Redox-Homöostase bezeichnet, wieder her (Valko et al. 2007).



**Abbildung 2: ROS-Produktion der mitochondrialen Atmungskette**

**A)** Schematische Darstellung eines Mitochondriums. **B)** Schema der Atmungskette mit den einzelnen Komplexen I – IV (Komplex I: NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase, Komplex II: Succinat-Ubichinon-Oxidoreduktase, Komplex III: Ubihydrochinon-Cytochrom-C-Oxidoreduktase, Komplex IV: Cytochrom-C-Oxidase) und der F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPase. Durch die Komplexe I und II werden von NADH+H<sup>+</sup> und von FADH<sub>2</sub> jeweils zwei Elektronen auf das Coenzym Q (Ubichinon) übertragen. Diese Elektronen werden schrittweise an Komplex IV weitergeleitet, der seinerseits dann die Elektronen unter Bildung von Wasser auf molekularen Sauerstoff überträgt. Durch diese Elektronenweiterleitung werden immer wieder H<sup>+</sup>-Ionen in den Intermembranraum gepumpt. Der so aufgebaute Protonengradient dient der F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPase zur ATP-Synthese. Dieser Vorgang wird als oxidative Phosphorylierung bezeichnet.

Alternativ kann  $\bullet\text{O}_2^-$  noch mit anderen Radikalen interagieren und reagiert zum Beispiel mit Stickstoffmonoxid (NO) zu Peroxynitrit ( $\text{ONOO}^-$ ). Die Oxidanzien, die von NO abstammen, werden auch als reaktive Stickstoffspezies (RNS, engl. *reactive nitrogen species*) bezeichnet. Peroxynitrit gehört zu den reaktivsten Verbindungen unter den ROS/NOS, und kann Proteine, Lipide und Nukleinsäuren oxidieren und nitrieren (Beckman and Koppenol 1996; Beckman 2009).

### 1.4 Zelluläre Produktion von ROS

Neben der mitochondrialen  $\bullet\text{O}_2^-$ -Produktion erzeugen auch verschiedene zytosolische Oxidasen, wie z.B. die Xanthin-Oxidase, die NAD(P)H-Oxidase und die Cyclooxygenase, die restlichen 15% des zellulären  $\bullet\text{O}_2^-$  (Boveris and Chance 1973; Dröge 2002).

Die NAD(P)H-Oxidasen sind bisher die einzig bekannte Enzymgruppe, die ausschließlich für die ROS-Produktion zuständig ist (Babior 1999; Bedard and Krause 2007). Die anderen Enzymgruppen, wie die Xanthin-Oxidase, Cyclooxygenase und Komplexe der Atmungskette, bilden ROS als Nebenprodukt und haben primär andere biochemische Funktionen. NAD(P)H-Oxidasen katalysieren die Reduktion von molekularem Sauerstoff zu Superoxid, wobei  $\text{NADPH}+\text{H}^+$  als Elektronendonator fungiert. NAD(P)H-Oxidasen wurden ursprünglich in phagozytierenden Zellen entdeckt, wobei man heute zwischen den phagozytären NAD(P)H-Oxidasen und den nicht-phagozytären NAD(P)H-Oxidasen unterscheidet (Babior 1999; Bedard and Krause 2007).

Die Xanthin-Oxidase katalysiert den Abbau von Hypoxanthin über Xanthin zur Harnsäure. Bei dieser Reaktion kommt es zur Bildung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  und  $\bullet\text{O}_2^-$  (Chung et al. 1997; Harrison 2004). Cyclooxygenasen (COX) sind wichtige Enzyme der Prostaglandin-Synthese und katalysieren die Umwandlung von Arachidonsäure

zu Prostaglandin-H<sub>2</sub>. Da diese Reaktion in zwei Teilschritten abläuft, besitzen die COX-Enzyme zwei Aktivitäten, eine Cyclooxygenase- und eine Peroxidase-Aktivität (Simmons 2004).

### **1.5 Der optische Redoxindikator roGFP1**

Das grün fluoreszierende Protein (GFP) ist ein Protein aus der Qualle *Aequorea victoria*, das bei Anregung mit blauem oder ultraviolettem Licht grün fluoresziert (Shimomura et al. 1962; Chalfie 1995). Die Fluoreszenz-Eigenschaften von GFP machen dieses Protein zu einem wichtigen Indikator verschiedener zellulärer Parameter. Insbesondere durch die Möglichkeit, GFP mit beliebig anderen Proteinen genetisch spezifisch fusionieren zu können, dient GFP u.a. zur zellulären Lokalisation bestimmter Proteine. Die wichtigsten Eigenschaften von GFP sind: wirkungsvolle Fluoreszenz, Protease-Resistenz, Photostabilität und Stabilität bei zytosolischen pH- oder Chlorid-Änderungen.

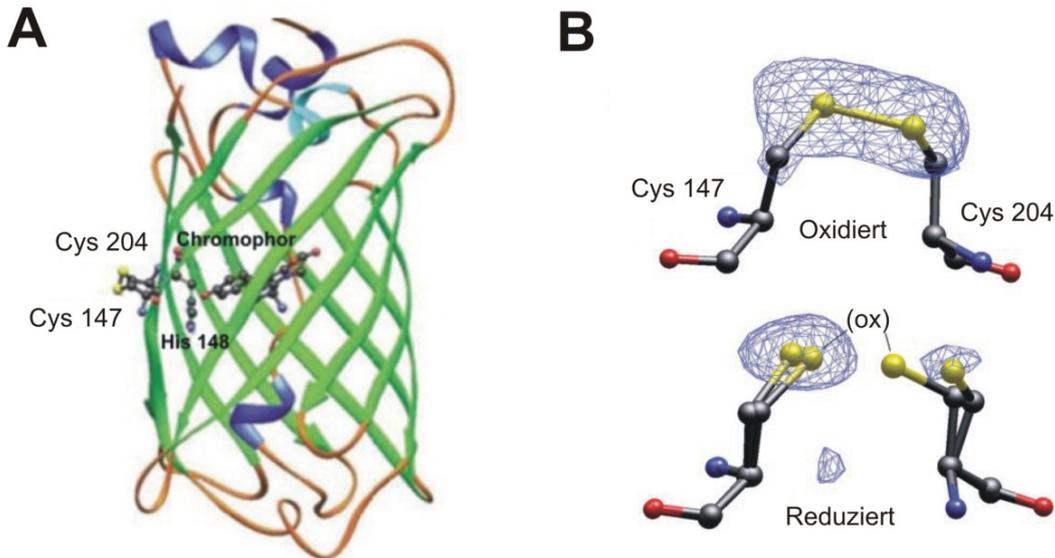
Änderungen im Redox-Gleichgewicht einer Zelle beeinflussen eine Reihe von Zellfunktionen. Diese Redox-Veränderungen werden entweder durch eine Verschiebung des GSH/GSSG-Verhältnisses (Glutathion/Glutathiondisulfid) herbeigeführt und/oder durch ein verschobenes Verhältnis zwischen reduziertem und oxidiertem Thioredoxin. Sowohl Glutathion als auch Thioredoxin zählen zu den natürlichen Antioxidanzien einer Zelle. Kleine Veränderungen im Redox-Zustand können schwere Folgen für die Zelle haben. Es kommt dadurch zu defekter Proteinfaltung oder zu einer veränderten Enzymaktivität, da viele Enzyme in ihrem aktiven Zentrum Cystein-Reste enthalten. Trotz der Gefahren der übermäßigen Oxidation benutzen Zellen manchmal die Redox-Anpassung als Signalweg, zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren (NF- $\kappa$ B, AP-1), Kaspasen, Tyrosin-Phosphatasen oder

GTPasen (Ras). Auch zahlreiche synaptische Proteine und Transmitterrezeptoren sind redox-sensitiv (Dooley et al. 2004).

Um einen Indikator für den Redox-Status einer Zelle zu entwickeln, wurden bei dem GFP zwei zusätzliche Cystein-Reste in angrenzenden Beta-Strängen der Stellen 147 und 204 nahe dem Chromophor eingefügt (siehe Abbildung 3). Die Reduktion/Oxidation dieser Cystein-Reste moduliert die Fluoreszenz-Eigenschaften des sogenannten reduction/oxidation GFP (roGFP1, redox-sensitives GFP) (Dooley et al. 2004; Hanson et al. 2004; Cannon and Remington 2008). Der Redoxindikator roGFP1 hat bei 395 nm und 470 nm zwei diskrete Anregungsmaxima. Im oxidierten Zustand kommt es zur Disulfid-Bildung zwischen den Cystein-Resten, was über eine Konformationsänderung die Protonierung des Chromophors fördert. Der Peak des Anregungsspektrums bei 395 nm wird so, auf Kosten des Absorptionsmaximums nahe 470 nm, gesteigert. Mit anderen Worten, die Lichtabsorption bei 395 nm verstärkt sich, während die Lichtabsorption bei 470 nm abgeschwächt wird. Reduktion hat gegenteilige Effekte (Dooley et al. 2004; Hanson et al. 2004), das heißt, bei der Reduktion von roGFP1 kommt es zum Aufbrechen der Disulfidbrücke. Dadurch verstärkt sich die Lichtabsorption bei 470 nm, während die Lichtabsorption bei 395 nm abgeschwächt wird.

Durch diese exzitations-ratiometrischen Fluoreszenz-Eigenschaften des roGFP1 können dynamische und quantitative optische Analysen von Redox-Änderungen und ROS in der Zelle durchgeführt werden. Die räumliche und zeitliche Verteilung in den Geweben kann beobachtet werden. Das Verhältnis der Fluoreszenzen ( $F_{395}/F_{470}$ ) zeigt den Umfang der Oxidation und somit Hinweise auf das Redox-Gleichgewicht. Auch werden mögliche Fehlerquellen wie veränderte Farbstoffkonzentration, Instabilität der Beleuchtung sowie die unterschiedliche Dicke/Größe der Zellen und die ungleichmäßige Verteilung und Konzentration des Indikators in den Zellen minimiert/entfernt (Dooley et al.

2004; Hanson et al. 2004). Die Zuverlässigkeit von roGFP1 für hippokampale Hirnschnittkulturen wurde bereits bestätigt (Funke et al. 2011).



**Abbildung 3: strukturelle Darstellung des optischen Redoxindikators roGFP1**

**A)** Dargestellt ist die Tertiärstruktur des modifizierten roGFP1. Durch die Mutationen C48S/T65S/S147C/Q204C liegen die beiden modifizierten Cysteinreste Q204C/S147C an der Oberfläche des Proteins. **B)** Diese Abbildung zeigt ein Kugel-Stab-Model. Hier sind Stickstoffatome blau dargestellt, Sauerstoff rot, Schwefel gelb und Kohlenstoff-Atome grau. Im oxidierten Zustand bilden die modifizierten Cysteinreste eine Disulfidbrücke aus. Diese Disulfidbrückenbildung führt zu einer Konformationsänderung des Proteins, welche die Protonierung des Chromophors unterstützt. Dadurch verstärkt sich die Lichtabsorption bei 395 nm während die Lichtabsorption bei 470 nm abgeschwächt wird. Bei Reduktion bricht die Disulfidbrücke auf und die Lichtabsorption verändert sich entgegengesetzt.

[Quelle: (Hanson et al. 2004, S.13049)]

## 1.6 Ziele der Arbeit

In vorangehenden Messungen durch die Arbeitsgruppe Müller wurde bereits eine erhöhte oxidative Belastung im Hippokampus des Rett-Mausmodells gezeigt (Großer et al. 2012). Es wurde beobachtet, dass das Redox-Gleichgewicht unter Ruhebedingungen bei MeCP2-defizienten Mäusen oxidiert, also höher war, als bei den korrespondierenden WT-Mäusen. Dieses Redox-

Ungleichgewicht entsteht wahrscheinlich durch eine erhöhte mitochondriale ROS-Produktion. Im Rahmen dieser Arbeit wurde basierend auf den Vorarbeiten der mögliche Einfluss verschiedener zellulärer Enzyme auf die ROS-Produktion mittels fluoreszenzmikroskopischer Untersuchungen und unter Einsatz des optischen Redoxindikators roGFP1 untersucht. Als Präparate dienten organotypische hippokampale Hirnschnittkulturen, die von einem Mausmodell für das Rett-Syndrom gewonnen wurden. Einerseits wurde die mitochondriale ROS-Produktion durch Blockade der Atmungskette und durch Entkopplung des mitochondrialen Protonengradienten, was zu einer erhöhten Aktivität der Atmungskette führt, nochmals genauer untersucht, um auch die mitochondriale ROS-Produktion besser einordnen und beurteilen zu können. Vergleichend wurde aber auch die extramitochondriale ROS-Produktion durch verschiedene zytosolische ROS-Quellen analysiert, wie z.B. die Xanthin-Oxidase, die NAD(P)H-Oxidase und die Cyclooxygenase, um ihren Beitrag abzuschätzen. Da NO mit ROS reagiert und über NOS-Bildung ebenfalls oxidative Schäden vermitteln kann, wurde auch das NO-System durch Blockade der NO-Synthase bzw. durch Zugabe eines NO-Donors moduliert. Einige Messungen wurden zudem mit dem Fluoreszenzfarbstoff C11-Bodipy<sup>581/591</sup> durchgeführt, da wahrscheinlich auch die Lipidperoxidation durch erhöhte ROS-Spiegel intensiviert ist.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Mausmodell für das Rett-Syndrom

Basierend auf der genetischen Ursache der Erkrankung wurde eine Vielzahl von Mausmodellen für das Rett-Syndrom entwickelt, die entweder eine große Deletion, eine Stopp-Mutation oder eine Nonsense-Mutation tragen (Guy et al. 2001; Shahbazian et al. 2002; Brendel et al. 2011). Das im Rahmen dieser Arbeit verwendete Mausmodell für das Rett-Syndrom entstammt der Zuchtlinie B6.129P2(c)-*Mecp2*<sup>tm-1-1Bird</sup> (Guy et al. 2001) und ist eine MeCP2-Knockout-Maus, d.h. dieser Maus-Zuchtlinie fehlt das *MECP2*-Gen, sodass der Transkriptionsfaktor MeCP2 nicht exprimiert wird. Zur Züchtung der Tiere wurden heterozygote *Mecp2*<sup>+/-</sup>-Weibchen mit C57BL/6J-Männchen (Wildtyp, WT) gekreuzt. So wurden heterozygote Weibchen (*Mecp2*<sup>+/-</sup>), hemizygoten Männchen (*Mecp2*<sup>-/y</sup>) und Wildtypen (WT) beiderlei Geschlechts generiert.

Aufgrund des gewünschten möglichst homogenen Phänotyps wurden in der vorliegenden Arbeit nur männliche Knockout (KO) -Mäuse sowie die korrespondierenden WT-Männchen verwendet, da bei den Weibchen immer ein X-Chromosom inaktiviert wird. Durch die zufällige Verteilung der X-Chromosomeninaktivierung und somit des X-gekoppelten *Mecp2*-Gens kommt es zu einer nicht kontrollierbaren erheblichen phänotypischen Variabilität, was für unsere Untersuchungen vermieden werden sollte. Hinzu kommt, dass der Phänotyp bei den Weibchen viel milder ist und auch erst deutlich später auftritt.

## 2.2 Präparation

Die verwendeten organotypischen Hippokampus-Hirnschnittkulturen wurden nach der Kultivierungsmethode von Stoppini erstellt (Stoppini et al. 1991; Funke et al. 2011), d.h. sämtliche in dieser Arbeit durchgeführten Versuche fanden ausschließlich an isoliertem Hirngewebe statt, welches erst nach Tiertötung gewonnen wurde. Genehmigungspflichtige Versuche oder Eingriffe an lebenden Tieren wurden nicht durchgeführt.



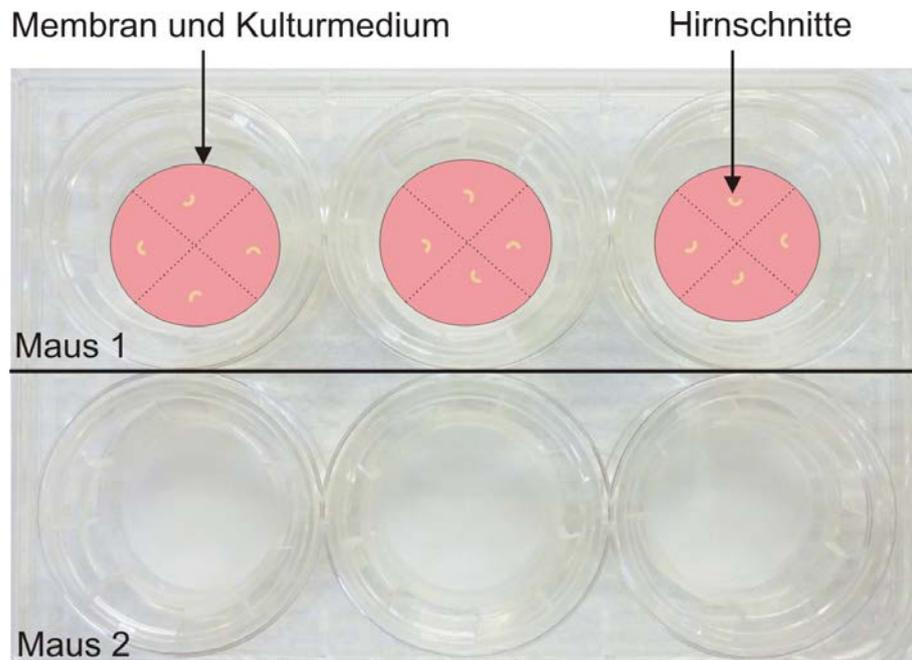
**Abbildung 4: Das für die Herstellung der Schnittkulturen verwendete Präparationsbesteck**

Von links nach rechts: große Schere, feine Augenschere, Skalpell, kleiner Spatel, Pasteur-Pipette, feine Pinzetten, Löffel-Spatel, Glas-Petrischale

Männliche *Mecp2*-Mäuse (*Mecp2<sup>-/y</sup>* oder *Mecp2<sup>+/y</sup>*) im Alter von P1-P7 (postnatal) wurden zügig dekapitiert. Nach Entfernung der Haut wurde die Schädeldecke vorsichtig abgelöst, das Gehirn mit einem feinen Spatel ausgeschält und in eine sterile Petri-Schale mit eiskalter HBSS (*Hanks balanced salts solution*) übertragen. Die genaue Zusammensetzung aller verwendeten Lösungen und Kulturmedien ist am Ende des Kapitels unter 2.9

zusammenfassend aufgeführt. Das verwendete Präparationsbesteck ist in Abbildung 4 aufgeführt.

Die weitere Präparation fand unter einer Stereolupe statt. Um die Keimzahl zu minimieren und somit die organotypischen Hirnschnittkulturen zu schützen, wurde zudem während der gesamten Präparation unter einer Sterilbank gearbeitet. Im Detail wurden die beiden Hemisphären mit einem Skalpell vom Hirnstamm getrennt. Mit Hilfe einer Pinzette und eines Skalpells ließen sich die Hippocampi beider Hemisphären isolieren. Mit dem *Tissue Chopper* (McIlwain, Stoelting Co.) wurden die beiden Hippocampi in 350 µm dicke Hirnschnitte geschnitten. Pro Tier entstanden ca. 20-25 Schnitte. Diese wurden unter der Stereolupe vollständig voneinander getrennt und 12 Schnitte gezielt auf die porösen Membranen der Kulturplatte (Transwell® Permeable Supports, CORNING) übertragen (siehe Abbildung 5).



**Abbildung 5: Aufteilung der 6-Well-Kulturplatte**

Pro Präparation wurden von der 6-Well-Platte je 3 Transwell-Kammern vorbereitet. Zum Auftragen der Hirnschnitte wurde eine Membran gedanklich in Quadranten (siehe gestrichelte Linie) unterteilt, da dies für die spätere Handhabung am günstigsten war.

Zur Vorbereitung der Membran wurden vor der Präparation 3 Transwell-Kammern mit je 1 ml Wachstumsmedium (Growth-Medium) gefüllt und in einem Zellkulturschrank bei kontrollierten Bedingungen inkubiert (37°C, 95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 95% Luftfeuchtigkeit). Pro Membranfilter wurden 4 Hippokampus-Schnitte so aufgetragen, dass in jedem Quadranten ein Schnitt lag (siehe Abbildung 5). Die 6-Well-Platte kam bis zur Verwendung in den Inkubator (37°C, 95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 95% Luftfeuchtigkeit). Das Wachstumsmedium wurde alle zwei bis drei Tage zur Hälfte ausgewechselt. Die Experimente mit den Schnittkulturen wurden innerhalb von 5-10 Tagen nach Anlegen der Schnittkulturen (*days in vitro*, DIV) durchgeführt.

Mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde in der Regel nach den Versuchen von allen verwendeten Tieren eine Genotypisierung durchgeführt, so dass fast alle Messungen blind erfolgten. Die dafür benötigte DNA wurde aus Schwanzspitzen-Biopsien isoliert. Diese Analysen erfolgten zentral durch das technische Personal.

### **2.3 Transfektion der Hirnschnittkulturen**

Das Einschleusen fremder DNA oder RNA in eine eukaryotische Zelle wird als Transfektion beschrieben. Während des Zellzyklus wird die entsprechende Gen-Sequenz abgelesen und das dazugehörige Protein-Produkt von der Zelle gebildet (Kim and Eberwine 2010). Bei dem Vorgang der Transfektion wird die stabile von der transienten Transfektion unterschieden. Bei der stabilen Transfektion wird die Gen-Sequenz fest in das Genom eingebaut und ist somit vor den zellulären Abbauprozessen geschützt. Bei der transiente Transfektion verbleiben die Plasmide nur kurzfristig in der Zelle und werden nach einiger Zeit von verschiedenen Zellmechanismen abgebaut. Im Rahmen dieser Arbeit wurden nur transiente Transfektionen der organotypischen Hirnschnittkulturen

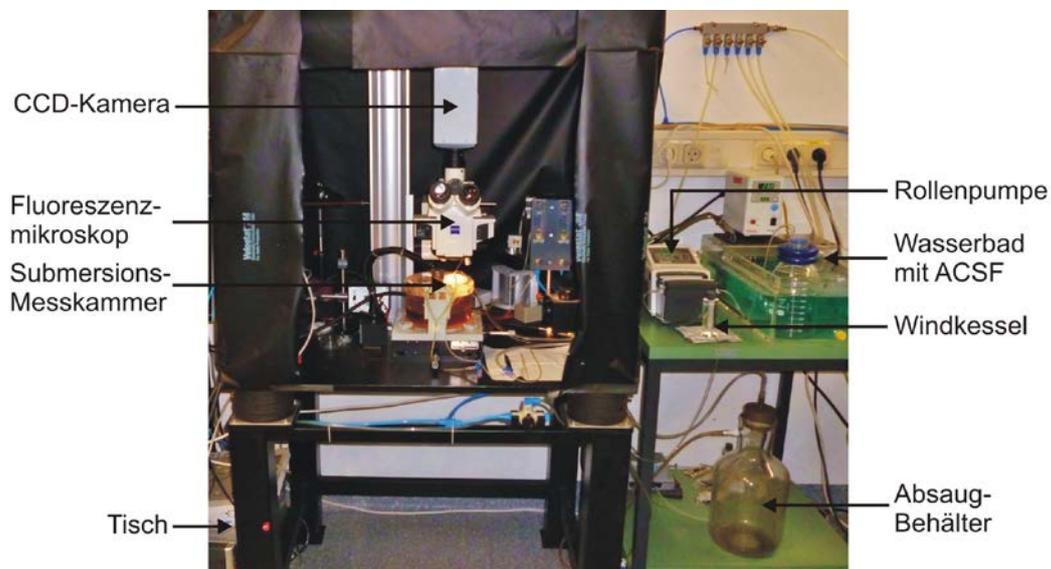
durchgeführt. Das hier verwendete Plasmid pEGFP-N1 (Clontech, Mountain view, USA) wird für die roGFP1-Expression in Säugetierzellen genutzt. Dieser Vektor wurde mit Hilfe der Lipofection, einem biochemischen Verfahren, in die Hirnschnittkulturen transfiziert. Bei der Lipofection wird die einzuschleusende Fremd-DNA mit Liposomen gemischt. Diese Lipoplexe werden dann von der Zelle aufgenommen und die Plasmid-DNA intrazellulär freigesetzt.

Zur Vorbereitung der Transfektion wurden zunächst zwei Ansätze in Eppendorf Reaktionsgefäßen vorbereitet. Dazu wurden im ersten Gefäß 4 µl Plasmid-DNA (1 µg/ml) mit 84 µl Opti-MEM gemischt und im zweiten Gefäß 1,5 µl Lipofectamin2000 Reagent ebenfalls zu 84 µl Opti-MEM hinzugegeben. Beide Ansätze wurden mittels eines Laborschüttlers (Vortex) gemischt und 10 Minuten bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz 1 in Ansatz 2 pipettiert und es folgte eine Inkubationszeit von 20 Minuten bei RT, um die Bildung der Lipoplexe zu gewährleisten. Die Transfektion der Schnittkulturen wurde frühestens am 4. Tag nach Anlegen der Kultur (DIV 4) durchgeführt, um ein Anwachsen der Zellen auf der Membran zu gewährleisten. Es wurden jeweils 40 µl des Lipofectamin-DNA-Komplexes auf je einen Hirnkulturschnitt gegeben und für mindestens 2 Tage belassen. Nach mindestens 48 Stunden waren ausreichend hohe roGFP1-Expressionslevel erreicht und die Schnitte konnten für die Messungen verwendet werden.

### **2.4 Die optische Messung: Aufbau und Durchführung**

Der optische Arbeitsplatz war so ausgerichtet, dass sich alle benötigten Geräte in unmittelbarer Nähe zueinander befanden (siehe Abbildung 6). Um zu gewährleisten, dass die Zellen während der Messung weiterleben, wurde eine Submersions-Messkammer benutzt, durch die kontinuierlich angewärmte ACSF-Lösung floss. Die Flussrate betrug 3-4 ml pro Minute, was bis zum Erreichen der

Messkammer zu einer Vorlaufzeit von etwa 1 Minute führte. Diese Verzögerung musste bei der Gabe der verschiedenen Pharmaka und Lösungen beachtet werden. Die ACSF-Lösung wurde in ein 38°C warmes Wasserbad (Haake) gestellt und permanent mit einem Carbogen-Gasgemisch (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) begast. Durch eine Rollenpumpe (Watson Marlow 205S) wurde die Lösung mit 35 Umdrehungen pro Minute angesaugt und über einen kleinen Windkessel durch dünne Tygon®-Schläuche zur Messkammer weitergeleitet. Der Windkessel sorgte für einen gleichmäßigen Fluss, der durch die Rollenlager der Rollenpumpe nicht vollständig gewährleistet werden konnte und Luftblasen, die beim Lösungswechsel in den Schlauch gelangen wurden mit Hilfe des Windkessels abgefangen. Da die ACSF-Lösung auf dem Weg zur Messkammer abkühlte, führte der letzte Schlauch vor der Messkammer durch einen Wärmetauscher. Die Lösung erreichte die Kammer letztendlich mit einer konstanten Temperatur zwischen 30°C bis 32°C. Von der Messkammer aus wurde die Lösung mittels Unterdruck in eine 5 Liter Sammelflasche abgesaugt.

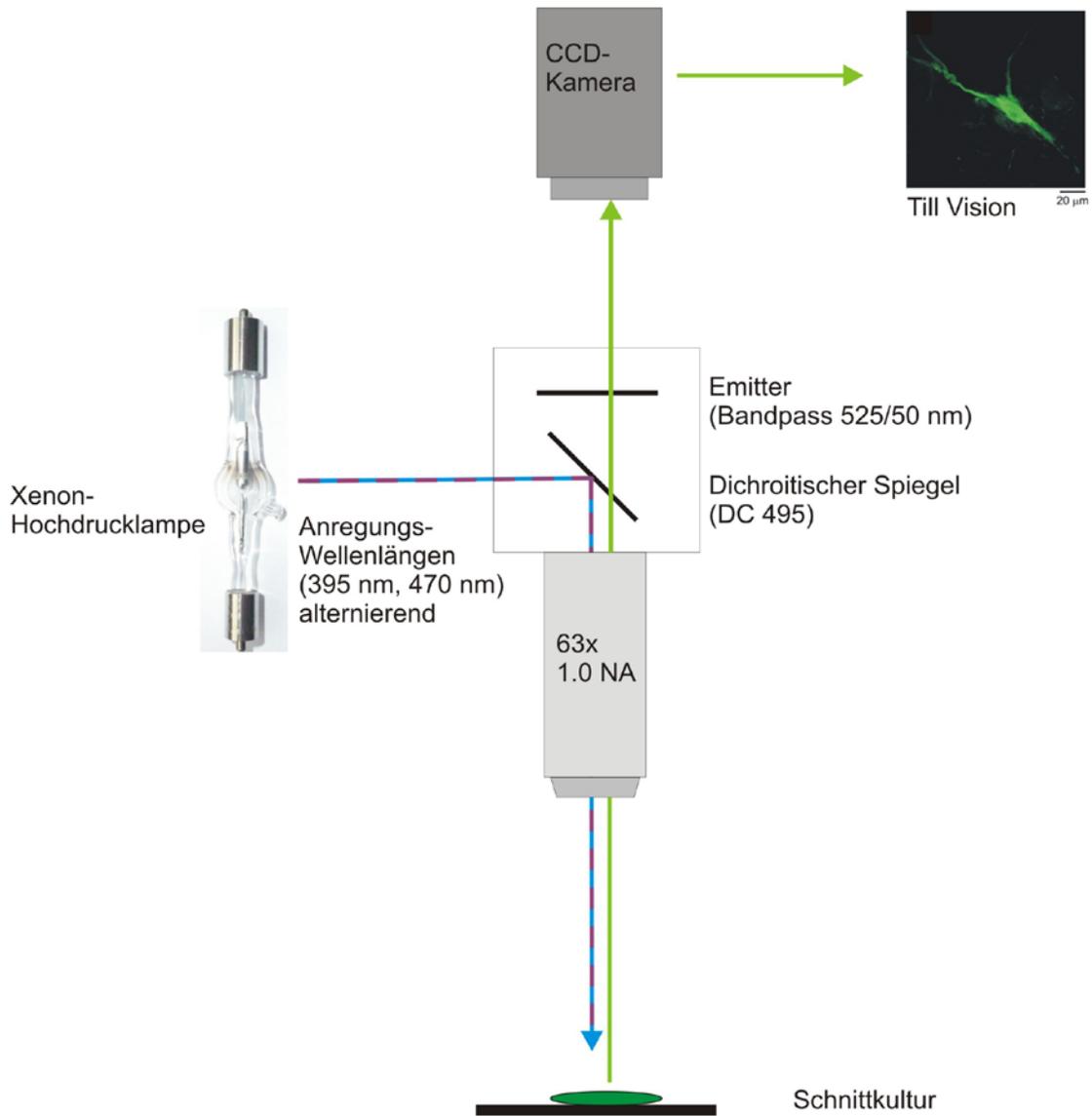


**Abbildung 6: Aufbau des optischen Messplatzes**

Abgebildet ist eine fotografische Aufnahme des Arbeitsplatzes. Um die Wege der Lösungen möglichst kurz zu halten befindet sich das Wasserbad in unmittelbarer Nähe zur Messkammer. Um während der Messung das Streulicht zu minimieren, ist der Messplatz mit einer schwarzen Folie abgedeckt. Das Mikroskop mit der CCD-Kamera steht auf einem schwingungsdämpfenden Tisch, um Erschütterungen, die die Messung beeinflussen könnten, entgegenzuwirken.

Nach Starten des Computers konnte mit Hilfe der Steuerungs- und Bearbeitungssoftware Till Vision® die CCD-Kamera und die polychromatische Lichtquelle in Betrieb genommen werden. Die Fluoreszenzmikroskopie ist eine Spezialisierung der Lichtmikroskopie. Die in dieser Arbeit vorgestellten optischen Messungen fanden an einem aufrechten Fluoreszenzmikroskop (AxioTech vario, Zeiss) statt. Eine Xenon-Hochdrucklampe (Polychrom V, Till Photonics) diente als polychromatische Lichtquelle.

Das Anregungslicht der Wellenlängen 395 nm und 470 nm, die den Anregungsmaxima von roGFP1 entsprechen (Dooley et al. 2004; Hanson et al. 2004), wurde über eine Lichtfaser in das Mikroskop eingekoppelt und auf einen dichroitischen Spiegel (Dichroit, DC 495) projiziert. Dieser zwischengeschaltete Dichroit ist ein dünnes Stück beschichtetes Glas, welches in einem 45° Winkel zum Strahlengang des Anregungslichtes steht und die Fähigkeit hat das Anregungslicht zu reflektieren und die emittierte, längerwellige Fluoreszenz hindurch zu lassen. Die durch den dichroitischen Spiegel umgeleitete Anregungswellenlänge wurde zunächst durch ein 40x Wasserimmersionsobjektiv (Zeiss, Achromat, 0.8 NA) auf die Probe fokussiert, mit dessen Hilfe die zu untersuchende Zelle ausgewählt wurde. Während der Messung wurde das Anregungslicht durch ein 63x Wasserimmersionsobjektiv (Zeiss, Apochromat, 1.0 NA) auf das Präparat fokussiert. Durch die Absorption dieser Wellenlängen werden die sogenannten Fluorophore (fluoreszente Stoffe) in einen angeregten Zustand versetzt. Die emittierte Fluoreszenz hat immer eine längere, energieärmere Wellenlänge als das Anregungslicht. Der Emissionsfilter (Emitter, Bandpass-Filter, BP 525/50 nm) verhindert zusätzlich den Durchtritt der zur Anregung benutzten Wellenlängen und leitet sehr effizient nur die Fluoreszenz der Probe an die hochsensitive CCD-Kamera (Imago QE, PCO Imaging, 62% Quanteneffizienz bei 500 nm) weiter.

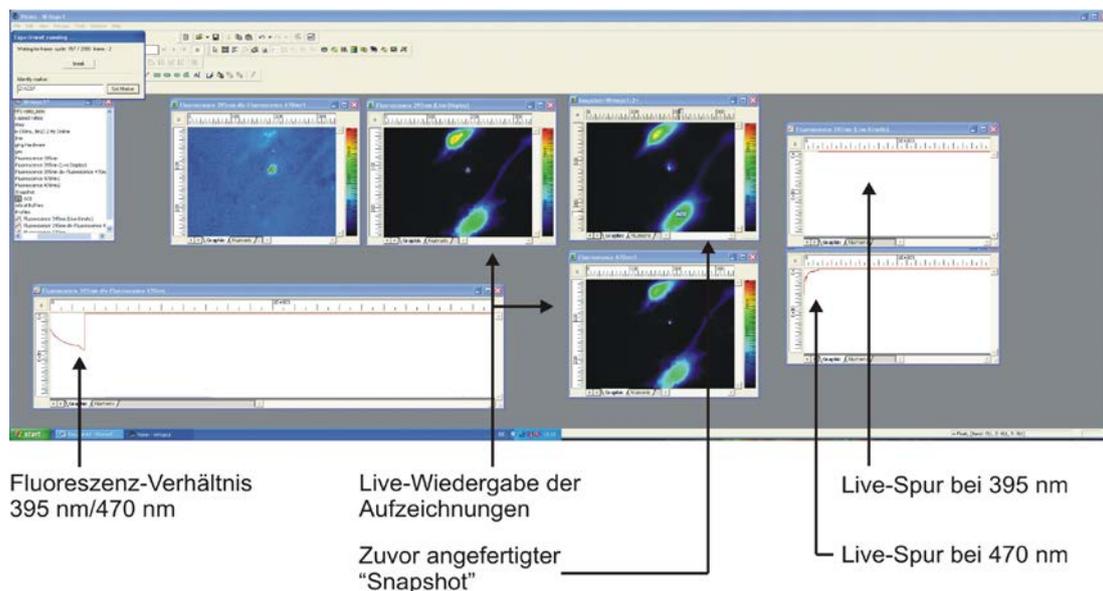


**Abbildung 7: Schematische Darstellung der optischen Messung**

Ausgehend von der Xenon-Hochdrucklampe trifft das Anregungslicht der Wellenlängen 395 nm und 470 nm zunächst auf den Dichroitischen Spiegel (DC495), welcher den Lichtstrahl durch das Wasserimmersionsobjektiv auf das Präparat lenkt. Das angeregte roGFP1 fluoresziert im grünen Bereich des Lichtes. Diese emittierte Fluoreszenz passiert den Emissionsfilter und wird von der CCD-Kamera erfasst. Diese leitet die gewonnenen Informationen zur Bildbearbeitung an das Programm Till Vision® weiter.

Die Bildbearbeitung erfolgte mit dem Programm Till Vision® (Till Photonics®, Gräfelfing, Deutschland), eine Software, die für die wissenschaftliche Bildgebung und Bildbearbeitung entwickelt wurde und zur Computeransteuerung des Polychroms notwendig ist. Bereits während der Messung wurden die

Fluoreszenzintensitäten innerhalb festgelegter Bereiche (ROI, *regions of interest*) durch Berechnung der mittleren Pixel-Grauwerte analysiert und graphisch dargestellt, so dass Änderungen der Emission in Echtzeit verfolgt werden konnten. Individuell erstellte Protokolle definieren die vorgesehenen Anregungswellenlängen und die jeweilige Belichtungszeit, mit welcher die Messung ablaufen soll. Ebenso werden auch die Bildrate und Anzahl der Bilder vorgegeben. Für die roGFP1-Messungen wurden die Wellenlängen 395 nm und 470 nm benutzt, da roGFP1 dort seine zwei Anregungsmaxima hat (Dooley et al. 2004; Hanson et al. 2004).



**Abbildung 8: Darstellung von Till Vision®**

Abgebildet ist ein Screenshot, der während einer laufenden Messung erstellt wurde. Es lässt sich die Anordnung der verschiedenen Parameter erkennen, die parallel zur Messung beobachtet werden können. Das zuvor angefertigte Übersichtsbild (*Snapshot*) bleibt als Kontrollbild erhalten, sodass man bei der Live-Wiedergabe schnell erkennt, wenn eine Zelle unter Gabe einer Substanz anschwillt oder das Präparat verrutscht. An der Messspur, die durch das Fluoreszenz-Verhältnis berechnet wird, lässt sich die Wirkung einer Test-Substanz bereits während der Gabe mitverfolgen.

Bei roGFP1 lag die Belichtungszeit typischerweise zwischen 50-150 ms. Alle 10 Sekunden wurde eine neue Aufnahme gemacht, was einer Bildrate von 0,1 Hz

entspricht. Mit einem 2x2 Binning wurden jeweils 4 angrenzende Pixel zusammengefasst und gemittelt. So enthielt das letztendliche Bild ein Viertel der Pixelanzahl im Vergleich zum Original. Der Vorteil davon war einerseits die Reduzierung der Größe bei der Speicherung der Daten, vor allem aber der Empfindlichkeitsgewinn bei der Detektion der Fluoreszenzemission, da das Licht der einzelnen Pixel beim Binning addiert wird. Zu Beginn der Messung wurde in einem Übersichtsbild (*Snapshot*) der Bereich festgelegt, dessen Daten analysiert werden sollten (ROI, *region of interest*). Wie bereits kurz erwähnt ließ sich während der Messung an einem Live-Bild die Lage der Zelle weiterhin kontrollieren (siehe Abbildung 8). Auch die Intensitäten der ROIs wurden auf einer Zeitachse abgebildet. Nach Beendigung und Speicherung der Messung, konnten die Daten jederzeit in eine Microsoft Excel®-Tabelle überführt und dort weiter bearbeitet und im Detail analysiert werden. Auch die statistischen und quantitativen Auswertungen der Daten sowie das Erstellen der Diagramme und Messspuren erfolgte mit dem Programm Microsoft Excel®.

### **2.5 roGFP1 (reduction/oxidation sensitive GFP)**

Um die zytosolischen ROS- und Redox-Veränderungen zu überwachen, wurde das reduktions-/oxidations-sensitive GFP (roGFP1) benutzt, welches die Arbeitsgruppe von Prof. S.J. Remington an der University of Oregon (USA) entwickelte (Dooley et al. 2004; Hanson et al. 2004).

Die Redox-Sonde roGFP1 ist ein exzitations-ratiometrischer Fluorophor. Bei Oxidation ist die Lichtabsorption von roGFP1 bei 390 nm erhöht und bei 470 nm erniedrigt. Bei Reduktion ergeben sich umgekehrte Änderungen, d.h. die Lichtabsorption wird bei 390 nm erniedrigt und bei 470 nm erhöht (Dooley et al. 2004; Hanson et al. 2004). Der Redoxindikator roGFP1 wurde abwechselnd bei 395 nm und bei 470 nm angeregt. Unter Verwendung eines 495 nm-

Strahlenteilers (*beam-splitter*) und eines 525/50 nm-Bandpass-Emissions-Filters wurde die Fluoreszenz von der Exzitation getrennt und das Fluoreszenz-Verhältnis (F395/F470) bestimmt (Funke et al. 2011; Großer et al. 2012).

Das redox-sensitive GFP wurde freundlicherweise von Professor S.J. Remington, University of Oregon, zur Verfügung gestellt.

### 2.6 C11-Bodipy<sup>581/591</sup>

C11-Bodipy<sup>581/591</sup> ist ein oxidations empfindlicher Fluoreszenzfarbstoff, der für Messungen der Lipidperoxidation geeignet ist (Drummen et al. 2002). Die C11-Bodipy<sup>581/591</sup>-Sonden sind eine neue Klasse von Molekülen, die im sichtbaren Bereich des elektromagnetischen Spektrums fluoreszieren und laut der Literatur hervorragende Fluoreszenzcharakteristiken aufweisen. Einige Vorteile von C11-Bodipy<sup>581/591</sup> sollen sich in der guten Photostabilität zeigen, wodurch es nur bedingt Fluoreszenz-Artefakte gibt. Auch soll C11-Bodipy<sup>581/591</sup> praktisch unempfindlich gegenüber pH-Veränderungen sein (Drummen et al. 2002). Durch den lipophilen Charakter kann C11-Bodipy<sup>581/591</sup> gut Membranen überwinden. Gegenüber einer Vielzahl von Sauerstoff-Radikalen und Peroxynitrit ist C11-Bodipy<sup>581/591</sup> sensibel, dennoch unempfindlich bei Superoxiden, Nitratoxiden und Hydroperoxid (Drummen et al. 2002).

Bei C11-Bodipy<sup>581/591</sup> handelt es sich um ein Fettsäuren-Analog mit fluoreszierenden Eigenschaften im roten Bereich des sichtbaren Spektrums (max. Emission 595 nm), so dass eine Anwendung in der Fluoreszenzmikroskopie möglich ist. Bei durch freie Radikale induzierter Oxidation verschiebt sich die C11-Bodipy<sup>581/591</sup> Fluoreszenz von Rot nach Grün und das Verhältnis der Grün/Rot-Emission steigt dabei. Diese Gegebenheit der spektralen Trennung der

nicht-oxidierten (595 nm) und der oxidierten (520 nm) Form ist sehr vorteilhaft, da so eine emissions-ratiometrische Darstellung der oxidativen Aktivität im Verhältnis möglich wird (Drummen et al. 2002).

Für die Messung wurde 1  $\mu\text{l}$  C11-Bodipy<sup>581/591</sup> der 5 mM Stammlösung (gelöst in DMSO) in das Wachstumsmedium der organotypischen Hirnschnittkulturen gegeben (entspricht einer Endkonzentration von 5  $\mu\text{M}$ ) und für 24 Stunden inkubiert. Die anschließenden Messungen erfolgten an einem optischen *Dual-view*-Messplatz mit Hilfe einer CCD-Kamera und einem optischen Bildteiler, der zwischen Mikroskop und CCD-Kamera montiert ist. Zunächst wird die Anregungswellenlänge 485 nm durch einen geeigneten dichroiten Spiegel (505 DCLP) von der Emission getrennt und auf das Präparat fokussiert. Die gesamte Emission trifft dann im *Dual-view* auf einen weiteren dichroiten Spiegel (565 dcxr), welcher die rote und grüne C11-Bodipy<sup>581/591</sup>-Fluoreszenz spektral trennt. Darüber hinaus ist der *Dual-view* mit zwei Emissionsfiltern (Emitter, Bandpass-Filter, Filtersatz II) ausgestattet. Die grüne Emission trifft nach Passieren von einem der beiden Emitter (Bandpass D535/40) auf den Chip der CCD-Kamera und rote Fluoreszenz wird nach Durchtritt durch den anderen Filter (Bandpass D600/40) daneben auf dem Chip der CCD-Kamera abgebildet. Zur Anregung wurde bei den C11-Bodipy<sup>581/591</sup> Messungen eine Belichtungszeit von 1800 ms verwendet. Weitere Messungen erfolgten zusätzlich noch mit dem 2-Photonen-Laser-Scanning-Mikroskop, welches in Kapitel 2.7 noch genauer beschrieben wird.

### **2.7 2-Photonen-Laser-Scanning-Mikroskop**

Gelegentlich wurden roGFP1-transfizierte Zellen oder C11-Bodipy<sup>581/591</sup> gefärbte Schnittkulturen mit Hilfe eines 2-Photonen-Laser-Scanning-Mikroskops (TPLSM) visualisiert. Das zugrundeliegende physikalische Phänomen dieser Technik

wurde schon 1930 von Maria Göppert-Mayer beschrieben (Göppert-Mayer 1931), trotzdem kam das Konzept der 2-Photonen-Laser-Scanning-Mikroskope erst im Jahre 1990 auf den Markt (Denk et al. 1990). Bei der Laser-Scanning Mikroskopie wird das Präparat durch den Fluoreszenz-anregenden Laserstrahl mit Hilfe sogenannter Scan-Spiegel punktweise waagrecht und senkrecht abgetastet. Beim TPLSM werden die Fluorophore nur im räumlich eng begrenzten Brennpunkt des Laserstrahls angeregt, wodurch außerhalb von diesem Brennpunkt keine weiteren Fluoreszenzen entstehen. Indem das Fluoreszenzsignal zeitlich einem bestimmten Bildpunkt zugeordnet wird, entsteht somit ein Bild mit guter räumlicher Auflösung. Dadurch können lebende Zellen dreidimensional im Sub-Mikrometerbereich dargestellt werden. Die Vorteile der 2-Photonen-Laser-Mikroskopie gegenüber der herkömmlichen Mikroskopie sind vielfältig. Von Bedeutung ist vor allem, dass die Anregung der Moleküle durch Infrarotlicht erfolgt und damit eine hohe Eindringtiefe in die Proben ermöglicht wird. Auch sind die Aufnahmen durch den Laserstrahl sehr lokal und es wird ein besserer Kontrast gewährleistet. Das verwendete langwellige Laserlicht führt zudem zu weniger Phototoxizität innerhalb der zu untersuchenden Gewebe.

Das hier verwendete System besteht aus einem aufrechten Mikroskop (BX51 WI, Olympus), einem TriM Scope II Scan-Kopf mit der ImSpector Kontroll-Software (LaVision BioTec) und einem gepulsten Titan-Saphir-Laser (Mai Tai eHP DeepSee, Newport Spectra-Physics). Die 2-Photonenanregung von roGFP1 erfolgte bei 925 nm unter Verwendung eines 63x 1.0 NA Objektivs (Zeiss Plan-Apochromat VIS-IR). Zur Trennung der Laserwellenlänge von der Fluoreszenzemission wurde ein 670-nm-dichroitischer Spiegel (670 DCXR) eingesetzt. Die Fluoreszenzemission wurde im Weit-Feld-Modus (non-descanned) durch einen hochempfindlichen Photomultiplier (H7421/H7422 Series, Hamamatsu) erfasst. Der Fluoreszenz-Farbstoff C11-Bodipy<sup>581/591</sup> wurde mit einer Wellenlänge von 800 nm angeregt. Die C11-Bodipy<sup>581/591</sup> wurden dann

im Gegensatz zur roGFP1-Fluoreszenz mittels Dichroit (570DCXR), und zweier Emitter (BP 536/40 für grün und BP 617/73 für rot) auf zwei Photomultiplier aufgeteilt, um grüne und rote Emissionsanteile zu trennen. Für weiterführende Auswertungen nach den Messungen und zur 3D-Rekonstruktion wurde die Bildbearbeitungs-Software MetaMorph Offline® (Version 6.1/7.0, Universal Imaging Corporation/Molecular Devices®) verwendet.

### **2.8 Zusammensetzung der Lösungen und Kulturmedien**

Bei den Messungen der organotypischen hippokampalen Hirnschnittkulturen wurde die ACSF-Lösung (artifizielle cerebrospinale Flüssigkeit) verwendet. Zum Ansetzen einer 1-Liter-Lösung ACSF wurde zunächst vollentsalztes Wasser in einen Mischkolben gegeben und folgende Bestandteile hinzugefügt: 130 mM NaCl, 3,5 mM KCl, 1,25 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 24 mM NaHCO<sub>3</sub>, 1,2 mM CaCl<sub>2</sub>, 1,2 mM MgSO<sub>4</sub> und 10 mM Dextrose. Dabei war zu beachten, dass als erstes CaCl<sub>2</sub>- und MgSO<sub>4</sub>-Stammlösungen hinzugefügt und erst nach Durchmischen dieser Salze die 10X ACSF-Stammlösung (NaCl, KCl, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, NaHCO<sub>3</sub>) und Dextrose zugegeben wurden. Mit Einhalten dieser Reihenfolge wurde ein Ausfällen der Salze verhindert. Zur Einstellung des pH-Wertes auf 7,4 und zur Versorgung der Hirnkulturschnitte mit Sauerstoff (O<sub>2</sub>) wurde die ACSF-Lösung während der Messung konstant auf 38°C gehalten und kontinuierlich mit Carbogen (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) begast.

Zur Herstellung der Hirnschnitte wurde das Kulturmedium HBSS (*Hanks balanced salts solution*) verwendet. 1 Liter HBSS bestand aus 9.5 g Hanks-Pulver (ohne Ca<sup>2+</sup> oder Mg<sup>2+</sup>) welches in 1 Liter destilliertem H<sub>2</sub>O gelöst wurde. Hinzu kamen 4 mM NaHCO<sub>3</sub> und 1 mM HEPES (pH-Puffer-System).

Das für die Zellkulturen verwendete Wachstumsmedium (Growth-Medium) wurde wie folgt zusammengesetzt. 100 ml Growth-Medium bestand aus: 95 ml MEM (Minimum essential medium), 5% FCS, 0,5 mM L-Glutamin, 20µl/ml B-27 50x supplement und 100µg/ml Penicillin/Streptomycin. Der im Growth-Medium verwendete B-27-Zusatz enthält Antioxidanzien. Daher wurde in einigen Kontrollversuchen, die deutlich gekennzeichnet sind, ein B-27-Zusatz ohne Antioxidanzien verwendet. Dadurch sollte der potentielle Einfluss der Antioxidanzien auf das Redox-Gleichgewicht im Ruhezustand und auf die zellulären Antwortreaktionen bei akutem oxidativen Stress getestet werden. In nachfolgender Tabelle sind die verwendeten Feinchemikalien nochmals mit Angaben zu den Lieferanten alphabetisch aufgelistet.

<b>Feinchemikalien</b>	<b>Lieferant</b>
B-27 Supplement	Invitrogen
CaCl <sub>2</sub>	Sigma-Aldrich
Dextrose	Merck
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich
Glucose	Sigma-Aldrich
Hanks	Sigma-Aldrich
HEPES	Sigma-Aldrich
KCl	Merck
L-Glutamine	Invitrogen
Lipofectamine 2000 Reagent	Invitrogen
MgSO <sub>4</sub>	Merck
MEM	Invitrogen
NaCl	Merck
NaHCO <sub>3</sub>	Sigma-Aldrich
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck
Opti-MEM	Invitrogen
Penicillin/Streptomycin	Biochrom
Transferrin	Calbiochem und Invitrogen

**Tabelle 2: Zusammenfassung der für Lösungen und Zellkulturen verwendeten Feinchemikalien**

## **2.9 Verwendete Pharmaka und Modulanzen**

Zur Modulation des mitochondrialen Metabolismus, zellulärer Enzyme und der Zellaktivität wurden diverse Pharmaka und Modulanzen verwendet. Einen Überblick über alle verwendeten Pharmaka und Modulanzen sowie deren Wirkung gibt Tabelle 3.

Da DPI, FCCP, Indomethacin, Oligomycin und Rotenon nicht wasserlöslich sind, wurden diese Substanzen zunächst in DMSO (Dimethylsulfoxid) gelöst und als 10-100 mM Stammlösungen im Kühlschrank bei 4°C oder im Gefrierschrank bei -20°C aufbewahrt. Um eine mögliche Wirkung von DMSO auf die Zellen zu minimieren, war die End-DMSO-Konzentration unter 0,2 %.

Allopurinol und DTT wurden direkt in der Endkonzentration in der ACSF-Lösung gelöst.

Glutamat, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, TBHP, L-NMMA und Nitroprussid wurden mit destilliertem H<sub>2</sub>O als Stammlösungen von 50 mM, 100 mM und 1 M angesetzt. Da es sich bei H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und TBHP um weniger stabile Substanzen handelt, wurden diese Stammlösungen für jede Messung frisch zubereitet. Die hochkonzentrierten Ausgangslösungen wurden bei 4°C aufbewahrt. Glutamat, L-NMMA und Nitroprussid wurden als wässrige Stammlösungen bei -20°C zur Aufbewahrung eingefroren.

## Material und Methoden

Reagenz	Wirkung	Stammlösung Aufbewahrung	Endkonzentration	Lieferant
<b>Allopurinol</b>	Xanthinoxidase-Inhibitor	direkt eingewogen in ACSF RT	<b>200 µM</b> für 8 min	Sigma-Aldrich
<b>DPI</b> Diphenyliodonium Chlorid	Inhibiert Komplex I, NADPH-Oxidase, Pentosephosphat-Weg und Citrat-Zyklus	10 mM in DMSO -20°C	<b>20 µM</b> für 8 min	Tocris
<b>DTT</b> DL-Dithiothreitol	Reduziert SH-Gruppen	direkt eingewogen in ACSF 4°C	<b>10 mM</b> für 3 min	Sigma-Aldrich
<b>FCCP</b> Carbonylcyanid-4-(trifluoromethoxy)-phenylhydrazon	„Entkoppler“, bildet Protonenkanäle in der inneren Mitochondrienmembran	10 mM in DMSO -20°C	<b>1 µM</b> für 3 min	Tocris
<b>Glutamat</b>	Erregender Neurotransmitter im ZNS; Führt unter anderem zu Ca <sup>2+</sup> Freisetzung	1 M in H <sub>2</sub> O dest. RT	<b>100 µM</b> für 30 min	Sigma-Aldrich
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 30% Lösung</b> Wasserstoffperoxid	starkes Oxidationsmittel, beeinflusst zelluläre ROS-Spiegel	1 M in H <sub>2</sub> O dest. 4°C	<b>5 mM</b> für 3 min	Sigma-Aldrich
<b>Indomethacin</b>	Cyclooxygenase-Inhibitor	100 mM in DMSO -20°C	<b>100 µM</b> für 3 min	Tocris
<b>L-NMMA</b> L-NG-monomethyl-Arginincitrat	Nicht-selektiver NO-Synthase-Inhibitor	50 mM in H <sub>2</sub> O dest. -20°C	<b>100 µM</b> für 8 min	Biomol
<b>Nitroprussid</b>	NO-Freisetzung	100 mM in dH <sub>2</sub> O -20°C	<b>100 µM</b> für 8 min	Sigma-Aldrich
<b>Oligomycin</b>	ATP-Synthase-Inhibitor	10 mg/ml in DMSO -20°C	<b>10 µg/ml</b> für 8 min	Sigma-Aldrich
<b>Rotenon</b>	Inhibiert Komplex I	10 mM in DMSO -20°C	<b>20 µM</b> für 8 min	Sigma-Aldrich
<b>TBHP, 70% Lösung</b> <i>tert</i> -Butylhydroperoxid	starkes Oxidationsmittel, fördert Lipidperoxidation	1 mM, 0,1 mM in H <sub>2</sub> O dest. 4°C	<b>0,1mM, 20µM</b> für 3 min	Sigma-Aldrich

**Tabelle 3: Verwendete Pharmaka und Modulanzen**

## 2.10 Statistik

Die Daten dieser Dissertation wurden insgesamt an organotypischen Hirnschnittkulturen von 36 Mäusen erhoben. Fast alle Experimente wurden an mindestens drei verschiedenen Tieren durchgeführt, um mögliche Einflüsse aufgrund individueller Unterschiede der Tiere oder unterschiedliche „Güte“ der Präparation zu minimieren.

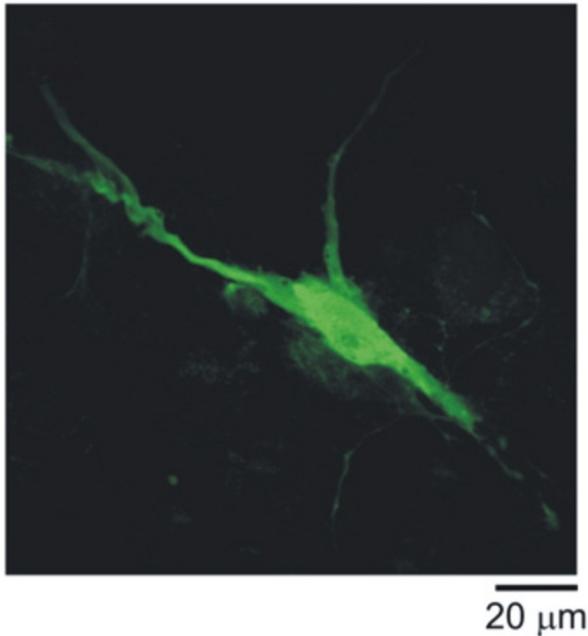
Die dargestellten Ergebnisse sind jeweils als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben. Die Anzahl der Experimente (n) bezieht sich jeweils auf die Anzahl der gemessenen Zellen. Die statistischen und quantitativen Auswertungen der Daten erfolgte mit dem Programm Microsoft Excel<sup>®</sup>. Dabei wurde die Signifikanz der durch die Pharmaka induzierten Veränderungen im Vergleich zwischen WT- und Knockout-Mäusen mit dem ungepaarten zweiseitigen t-Test nach Student bestimmt. Zur Prüfung signifikanter Änderungen der roGFP1-Grundlinie innerhalb eines Genotyps bei Gabe von Modulanzien und Pharmaka kam ein gepaarter t-Test zum Einsatz, in dem der Drogeneffekt mit den Ausgangsbedingungen (d.h. 1,0 oder 100%) verglichen wurde. Signifikante Änderungen sind in den Diagrammen auf dem 5%-Niveau ( $p < 0,05$ ) mit einem Stern (\*), auf dem 1%-Niveau ( $p < 0,01$ ) mit zwei Sternen (\*\*) und auf dem 0,1%-Niveau ( $p < 0,001$ ) mit drei Sternen (\*\*\*) angegeben.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Kalibrierung des roGFP1-Antwortbereichs

Um zu untersuchen in wie weit das zytosolische Redox-Gleichgewicht in hippokampalen Hirnschnitten durch den verstärkten mitochondrialen Stoffwechsel beeinflusst wird, kam die genetisch kodierte optische Sonde roGFP1 zum Einsatz. Der Redox-Sensor roGFP1 ermöglicht dynamische, semi-quantitative Analysen von zytosolischen Redox-Veränderungen und vom ROS-Status der Zellen und wurde an der University of Oregon, USA entwickelt (Dooley et al. 2004; Hanson et al. 2004). Ein zuverlässiges Ansprechverhalten und hinreichende Sensitivität von roGFP1 in hippokampalen Zell- und Schnittkulturen wurde bereits bestätigt (Funke et al. 2011).

Nach der Lipofectamin-vermittelten Transfektion der organotypischen hippokampalen Hirnschnittkulturen wurde roGFP1 meist in den Gliazellen exprimiert. Untersuchungen einiger dieser Zellen mittels TPLSM bestätigten an optischen Schnittbildern eine homogene Verteilung von roGFP1 im Zytosol der ganzen Zelle, sowie eine Ausbreitung auch bis in die Ausläufer dieser Zellen (siehe Abbildung 9). Ausreichend hohe Expressionslevel, d.h. eine für die optischen Messungen ausreichend hohe zytosolische roGFP1 Proteinkonzentration auf zellulärer Ebene, wurden in der Regel nach 48 Stunden erreicht. Die Anzahl der Zellen, die pro Schnittkultur erfolgreich transfiziert wurde, war allerdings sehr gering (<1%). Das war jedoch unproblematisch, da ohnehin an jeder Schnittkultur nur ein einziges Experiment durchgeführt wurde, um Akkumulationseffekte der verschiedenen Pharmaka-Applikationen zu verhindern.



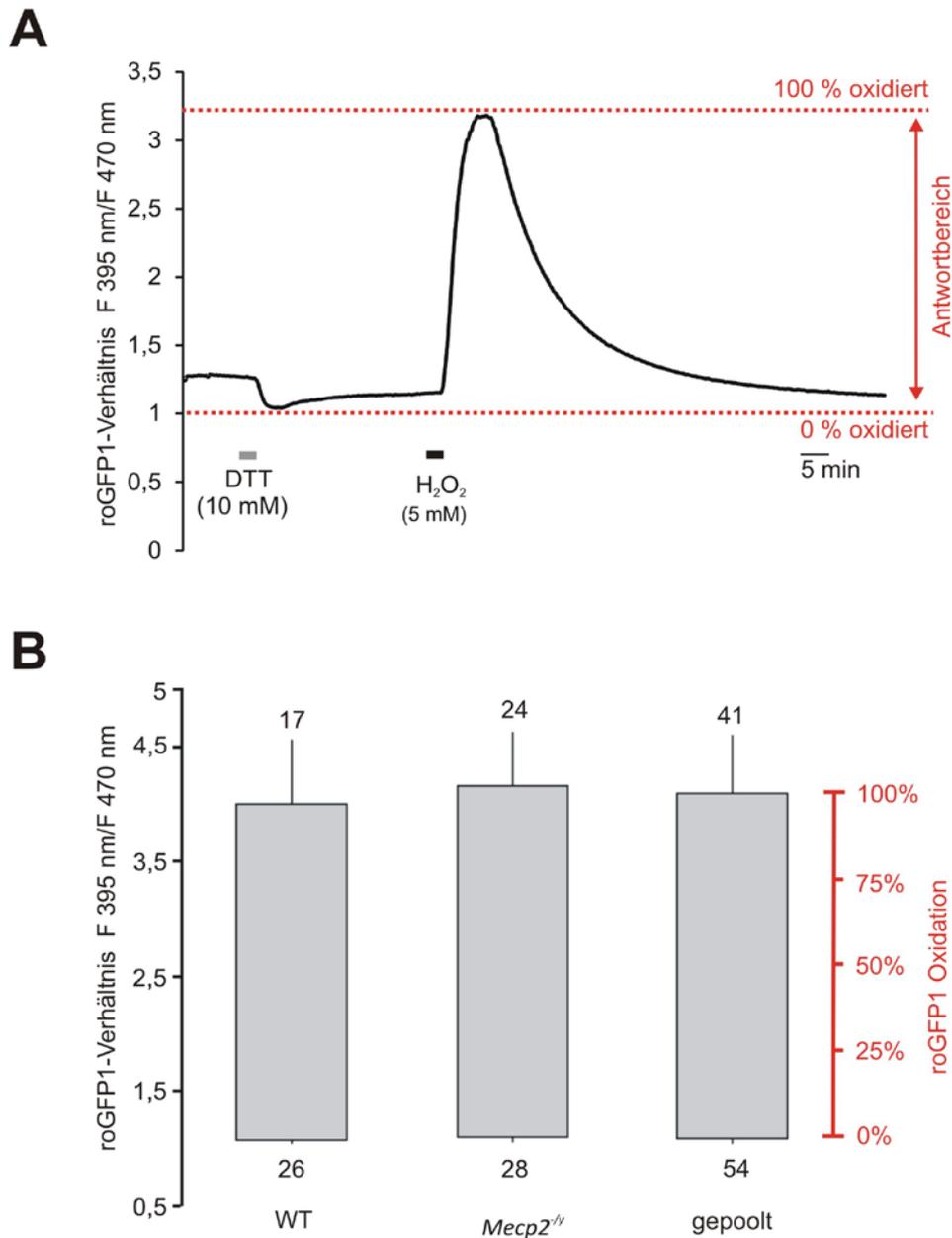
### **Abbildung 9: zytosolische Expression von roGFP1**

Mit dem TPLSM wurden hochauflösende optische Aufnahme von roGFP1-exprimierenden Gliazellen gemacht und die einzelnen Schnittbilder zu einer 3D Abbildung rekonstruiert. Es lässt sich die homogene zelluläre Verteilung von roGFP1 erkennen und es zeigt sich, dass sich roGFP1 bis in die distalen Abschnitte der Zelle erstreckt. Das gezeigte Präparat wurde mit einer Wellenlänge von 925 nm und einer Laserleistung von 8% angeregt (63x 1,0 NA Objektiv). Die Einzelbilder wurden mit einer Pixelauflösung von 485 nm/Pixel und einem Z-Abstand von 250 nm aufgenommen. Die gezeigte 3D Darstellung wurde aus einem Z-Stapel aus 73 Einzelbildern rekonstruiert und entspricht einer Ansicht in XY-Ebene.

Um semi-quantitative Analysen durchführen zu können, wurde zuerst eine Kalibrierung des roGFP1-Antwortbereichs durchgeführt (siehe Abbildung 10). Dazu wurde die Reaktion von roGFP1 auf maximale Reduktion (DTT) und Oxidation ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) bestimmt (Großer et al. 2012; Funke et al. 2011; Hanson et al. 2004). Diese Kalibrierung fand bereits zwei Jahre zuvor in Vorversuchen durch andere Arbeitsgruppenmitgliedern statt (Großer et al. 2012), und wurde nun für die aktuellen Versuchsbedingungen wiederholt. Dazu kamen die sättigenden Dosen von DTT (10 mM, 3 min) und  $\text{H}_2\text{O}_2$  (5 mM, 3 min) zum Einsatz, die jeweils massive Zellantworten auslösten. Zwar wurde meist versucht beide Antworten nacheinander an der gleichen Zelle zu messen – und in 41 Zellen war dies auch problemlos möglich (siehe Abbildung 10A) – bei einigen Zellen kam es jedoch vor

allein nach der zweiten Drogengabe zu nur noch einer unvollständigen Erholung, was eine verminderte Zellvitalität suggeriert. In diesem Fall wurde nur die erste und vollständig reversible Drogengabe ausgewertet, so dass sich letztlich eine unterschiedliche Anzahl Messungen für DTT und  $\text{H}_2\text{O}_2$  ergaben.

Bei Applikation von 5 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  stieg das roGFP1-Fluoreszenzverhältnis F395/F470 deutlich an und es ergaben sich folgende Maximalwerte: WT-Schnitte  $4,01 \pm 0,56$  ( $n = 17$ ), *Mecp2<sup>-/-</sup>*-Schnitte  $4,16 \pm 0,48$  ( $n = 24$ ). Bei der Gabe von 10 mM DTT wurde eine Abnahme des roGFP1-Verhältnis beobachtet. Die ratiometrischen Minimalwerte dieser Messungen betragen bei den WT-Schnitten  $1,08 \pm 0,04$  ( $n = 26$ ) und bei den *Mecp2<sup>-/-</sup>*-Schnitten  $1,1 \pm 0,04$  ( $n = 28$ ). Sowohl die Antworten auf starke Oxidation als auch auf Reduktion waren nach Auswaschen der applizierten Substanzen völlig reversibel (siehe Abbildung 10A) und das Verhältnis erreichte nach einer gewissen Zeit wieder die Ausgangswerte. Da bei diesen Messungen die beiden Genotypen gleichermaßen reagierten, konnten die Kalibrierungsdaten gepoolt werden. Nach Zusammenfassung der Daten resultierte bei der Gabe von 5 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  ein maximaler ratiometrischer Wert für die roGFP1-Emission von  $4,09 \pm 0,52$  ( $n = 41$ , definiert als 100% oxidiert) und bei der Gabe von 10 mM DTT ein minimaler ratiometrischer Wert von  $1,09 \pm 0,04$  ( $n = 54$ , definiert als 0% oxidiert, siehe Abbildung 10B).

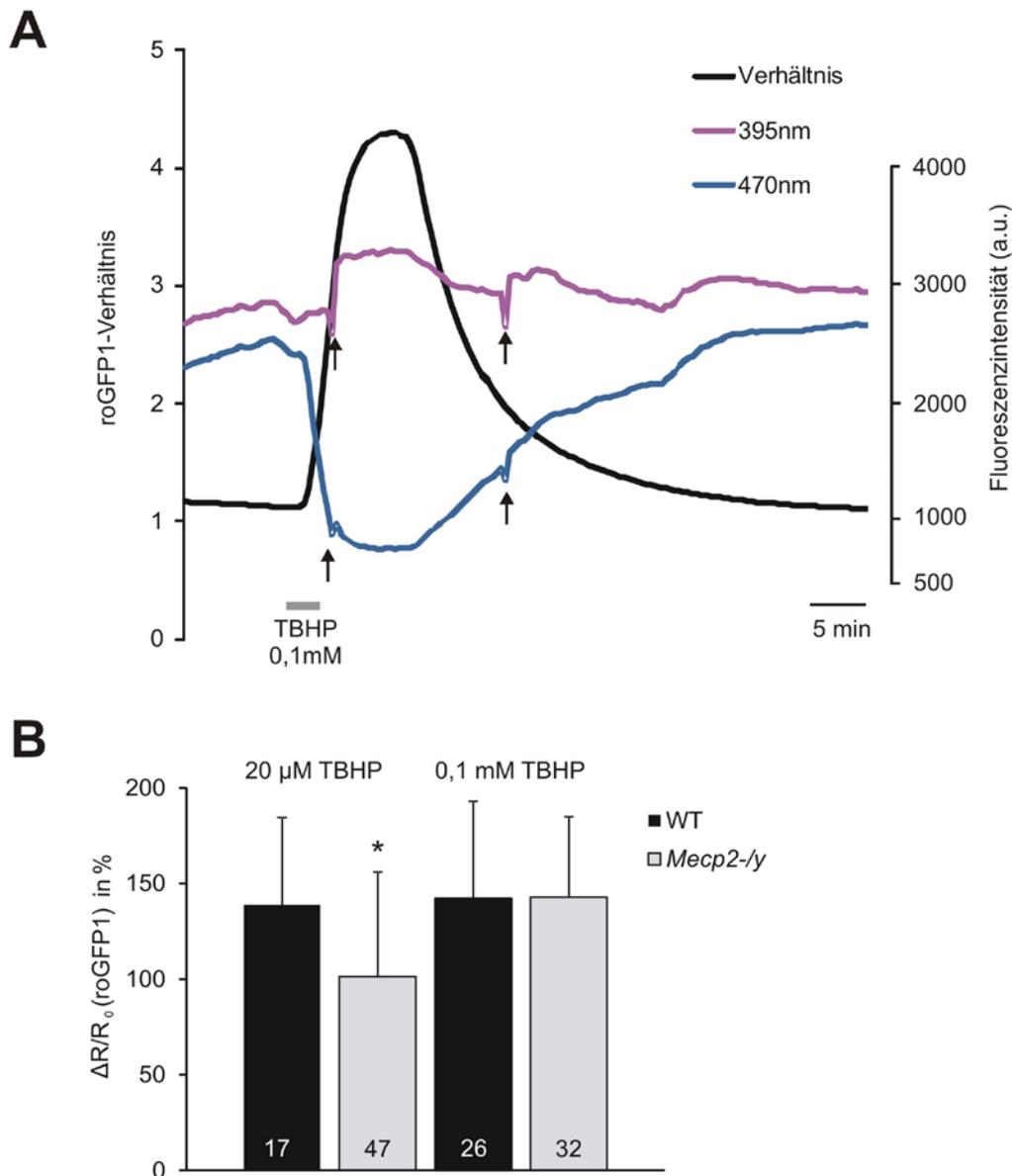


**Abbildung 10: Kalibrierung des roGFP1-Antwortbereichs**

**A)** Diese Beispielspur wurde bei der Messung eines *Mecp2<sup>-/-</sup>*-Hippokampus-Schnittes aufgezeichnet und stellt die Reaktionen einer Zelle auf die Sättigungsdosen des Reduktionsmittels DTT und des Oxidationsmittels H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dar. Die Kalibrierung diente dazu die Fluoreszenzverhältnisse zu bestimmen, die maximaler Oxidation und maximaler Reduktion entsprechen. Somit wurden diese ratiometrischen Werte des roGFP1-Verhältnisses dazu verwendet, um die vollständige Oxidation (100% oxidiert) und die vollständige Reduktion (0% oxidiert) des zytosolischen roGFP1 zu definieren. **B)** Im Vergleich ließen sich bei den Reaktionen auf H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und DTT keine Unterschiede zwischen WT- und *Mecp2<sup>-/-</sup>*-Schnitten beobachten. Daher konnten die Kalibrierungsdaten beider Gruppen zusammengefasst werden und bestimmen so den roGFP1-Antwortbereich in organotypischen hippokampalen Mäuse-Hirnschnittkulturen. Die Anzahl der analysierten Zellen ist dargestellt. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.

Basierend auf den erhaltenen Kalibrierungsdaten konnte das Redox-Gleichgewicht einer Zelle anhand der roGFP1-Grundlinie bestimmt werden (siehe Abbildung 12). Bei den WT-Mäusen betrug die Grundlinie im Mittel  $1,24 \pm 0,09$  ( $n = 209$ ), das entspricht 5,2% oxidiert. Praktisch identische Werte zeigte die Grundlinie der *Mecp2*<sup>-/-</sup>-Mäusen. Diese betrug im Mittel  $1,24 \pm 0,11$  ( $n = 305$ ), das entspricht 5,0% oxidiert.

Der Sensor roGFP1 detektiert nicht nur spezifisch eine Art von ROS, sondern ist vielmehr ein Indikator für den intrazellulären Redox-Status. In Vorarbeiten wurde bereits gezeigt, dass  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\bullet\text{OH}$  und  $\bullet\text{O}_2^-$  detektiert werden (Funke et al. 2011). Das ist sehr vorteilhaft im Hinblick auf die rasche Umwandlung der verschiedenen ROS. Daher wurde in dieser Arbeit untersucht, ob auch das starke Oxidationsmittel TBHP zu einer Änderung des roGFP1-Verhältnisses führt. TBHP wurde in zwei verschiedenen Konzentrationen (0,1 mM und 20  $\mu\text{M}$ ) für jeweils 3 min gegeben. Bei der Applikation von 0,1 mM TBHP stieg das roGFP1-Verhältnis beider Genotypen fast gleichermaßen, bei WT-Schnitten um  $142,2 \pm 50,1\%$  ( $n = 26$ ) und bei *Mecp2*<sup>-/-</sup>-Schnitten um  $142,9 \pm 41,9\%$  ( $n = 32$ ). Bei der Gabe von 20  $\mu\text{M}$  TBHP ließ sich zwischen den WT- und den *Mecp2*<sup>-/-</sup>-Schnittkulturen eine unterschiedlich ausgeprägte Reaktion beobachten. Während bei den WT-Schnitten das roGFP1-Verhältnis um  $138,8 \pm 45,7\%$  ( $n = 17$ ) zunahm, kam es bei den *Mecp2*<sup>-/-</sup>-Schnitten zu einer etwas geringeren Zunahme von  $101,2 \pm 54,7\%$  ( $n = 47$ ,  $p = 0,01$ , siehe Abbildung 11).

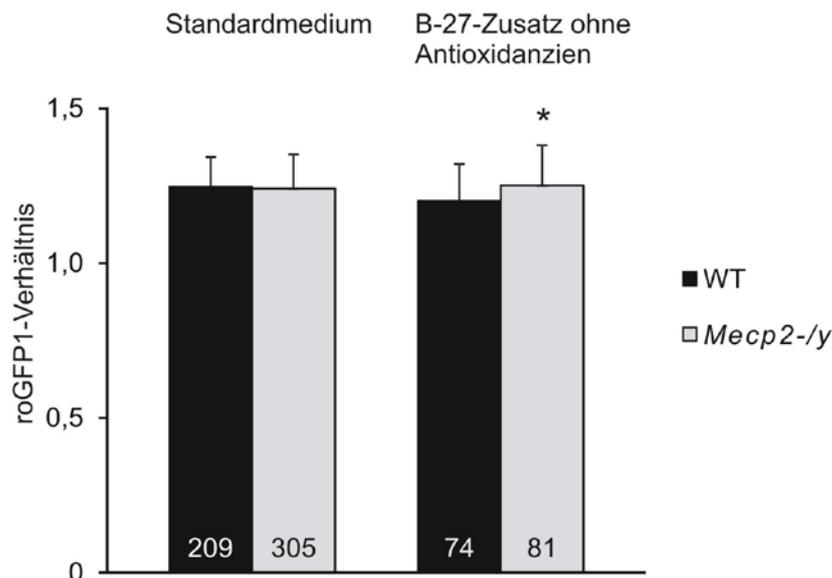


**Abbildung 11: Ratiometrische Messungen von TBHP mit roGFP1**

**A)** Hippokampale organotypische Hirnschnitte wurden mit roGFP1 transfiziert und mit 0,1 mM TBHP, einem starken Oxidationsmittel behandelt. Es lässt sich beobachten, dass sich die Lichtabsorption durch die Oxidation bei 470 nm verringert, während sich die Lichtabsorption bei 395 nm intensiviert. Aufgrund dieser Eigenschaft von roGFP1 sind ratiometrische Messungen möglich. Zudem ist die Oxidation des GFPs reversibel, wodurch dynamische Messungen möglich werden. Es wurde bewusst eine Spur ausgesucht, in der zum Beispiel durch den Lösungswechsel bedingte Bewegungsartefakte sichtbar sind (siehe Pfeile), welche durch die Ratioberechnung rausgemittelt wurden. **B)** Zusammenfassende Darstellung der prozentualen Veränderung des roGFP1-Verhältnis bei der Gabe von 0,1 mM und 20  $\mu$ M TBHP (3 min), wobei die WT-Schnitte bei den Messungen mit 20  $\mu$ M TBHP intensiver reagieren als die *Mecp2*<sup>-/-</sup>-Schnitte. Die Anzahl der Messungen ist am Fuß der Balken angezeigt, statistisch signifikante Unterschiede sind durch Sterne markiert (\* p < 0,05).

### 3.2 Zellkultur mit und ohne Antioxidanzien

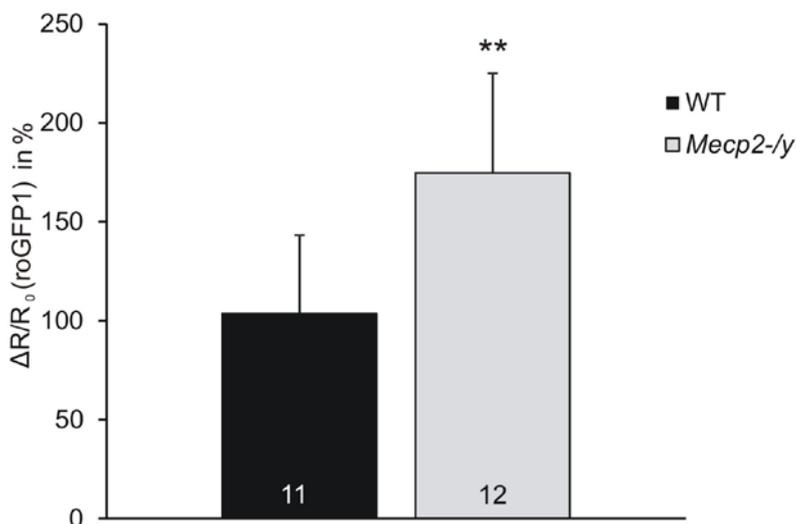
Da der Standard B-27-Zusatz, der für das Kulturmedium verwendet wird, Antioxidanzien enthält (nach Angaben des Herstellers eine nicht näher spezifizierte Mischung aus Vitamin E, Vitamin-E-Acetat, Superoxiddismutase, Katalase und Glutathion) wurden einige Versuche durchgeführt, bei denen die verwendeten Hirnschnittkulturen in einem Medium mit einem Antioxidanzien-freien B-27-Zusatz kultiviert wurden. Die roGFP1-Grundlinie veränderte sich in Abwesenheit der Antioxidanzien wie erwartet nicht signifikant im Vergleich zu den Schnitten, die im normalen Medium mit Antioxidanzien kultiviert wurden. Allerdings zeigte sich, dass das roGFP1-Verhältnis der WT-Schnitte verglichen zu den *Mecp2*<sup>-/-</sup>-Schnitten weniger oxidiert war. Die Grundlinie der WT-Schnitte betrug hier im Mittel  $1,20 \pm 0,11$  ( $n = 74$ ), das entspricht 3,73% oxidiert. Das roGFP1-Verhältnis der *Mecp2*<sup>-/-</sup>-Grundlinie betrug  $1,25 \pm 0,13$  ( $n = 81$ ,  $p = 0,01$ ), das entspricht einer Oxidation von 5,36% (siehe Abbildung 12).



**Abbildung 12: Vergleich der roGFP1-Grundlinien unter Ruhebedingungen**

Bei den Messungen an den Schnitten im Wachstumsmedium mit dem B-27-Zusatz ohne Antioxidanzien zeigt sich dahingehend ein Unterschied, dass die Grundlinie der *Mecp2*<sup>-/-</sup>-Mäuse höher ist als die der korrespondierenden WT-Mäuse.

Zusätzlich zu den Veränderungen im Redox-Gleichgewicht im Ruhezustand, wurde nach einer veränderten Reaktion bei oxidativer Belastung gesucht, vermittelt durch 200  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  (3 min). Wenn zur Kultivierung der Hirnschnittkulturen das Medium ohne Antioxidanzien verwendet wurde, zeigten WT-Schnitte als Antwort auf diese oxidative Belastung einen geringeren Anstieg des roGFP1-Verhältnisses als die *Mecp2*<sup>-/-</sup>-Schnitte. Das heißt, bei den WT-Schnitten kam es zu einer Redox-Verschiebung Richtung Oxidation mit einer prozentualen Zunahme von  $103,5 \pm 39,8\%$  (n = 11), während die *Mecp2*<sup>-/-</sup>-Schnitte eine Zunahme von  $174,6 \pm 50,3\%$  (n = 12, p = 0,001) zeigten (siehe Abbildung 13). Interessanter Weise waren die absoluten Antworten der beiden Genotypen auf diese  $\text{H}_2\text{O}_2$  Belastung intensiver als die Antworten, die in vorherigen Versuchen von anderen Arbeitsgruppenmitgliedern an Hirnschnittkulturen gemessen wurden, die in normalem Medium mit Antioxidanzien kultiviert wurden (WT:  $74,0 \pm 31,6\%$ , n = 18 und *Mecp2*<sup>-/-</sup>:  $118,7 \pm 42,8\%$ , n = 26, p < 0,001) (Großer et al. 2012). Auch unter diesen Bedingungen zeigten die *Mecp2*<sup>-/-</sup>-Schnitte erhöhte Antworten auf  $\text{H}_2\text{O}_2$ .



**Abbildung 13: oxidative Belastung durch 200 $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$**

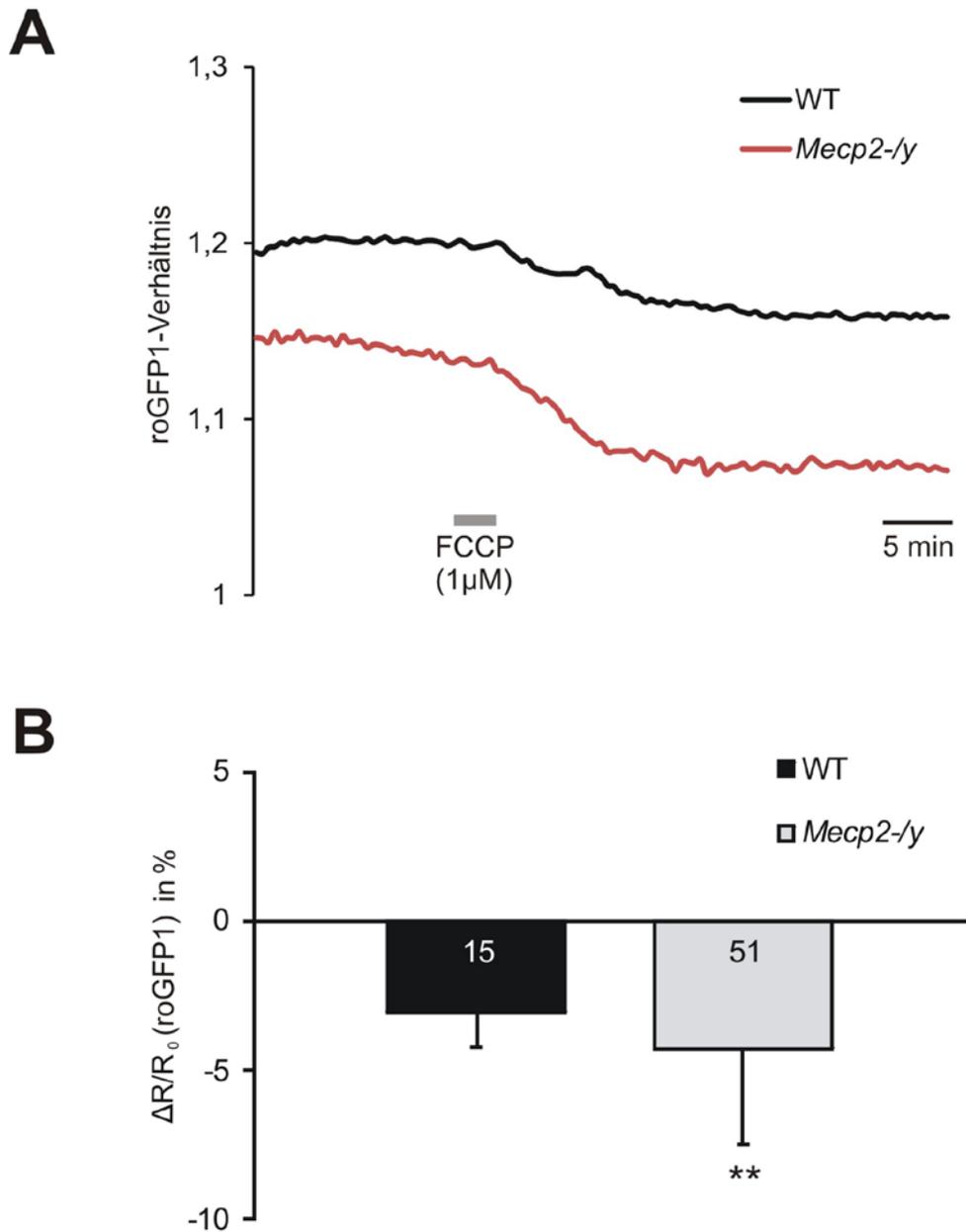
Dargestellt sind die Daten der oxidativen Belastung durch 200  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  (3 min), auf die die *Mecp2*<sup>-/-</sup>-Schnitte intensiver reagieren, als die WT-Schnitte. Die Hirnschnittkulturen wurden zuvor in einem Medium ohne Antioxidanzien kultiviert. Der signifikante Unterschied zwischen den beiden Genotypen ist mit Sternen markiert (\*\* p < 0,01).

Viele der zugegebenen Substanzen wurden in dem Lösungsmittel DMSO gelöst. Um Effekte des Lösungsmittels selbst auszuschließen, wurden einige Schnitte mit 0,2% DMSO in ACSF behandelt (8 min), d.h. in einer üblich verwendeten Konzentration. DMSO hatte keinen Effekt auf die Hirnschnittkulturen. Keiner der beiden Genotypen zeigte eine eindeutige Veränderung des roGFP1-Verhältnisses (WT-Schnitte:  $-0,6 \pm 1,0\%$ ,  $n = 17$ , *Mecp2*<sup>-/-</sup>-Schnitte:  $-0,3 \pm 1,0\%$ ,  $n = 11$ ).

### 3.3 Mitochondriale ROS-Produktion

Vorversuche haben bestätigt, dass es in *Mecp2*<sup>-/-</sup>-Mäusen bei einer erhöhten Belastung der Mitochondrien zu einer intensiveren ROS-Bildung und zu einer stärkeren oxidativen Verschiebung des zytosolischen Redox-Status kommt. Unter anderem wurde bereits gezeigt, dass es bei einer Behandlung mit Antimycin A, einem Blocker von Komplex III der mitochondrialen Atmungskette, zu einem deutlich intensiveren Anstieg im roGFP1-Verhältnis der *Mecp2*<sup>-/-</sup>-Schnitte kam als in den WT-Schnitten (Großer et al. 2012). Um diese Versuche zu vervollständigen wurden nun weitere Modulanzen der mitochondrialen Funktion, FCCP und Oligomycin getestet.

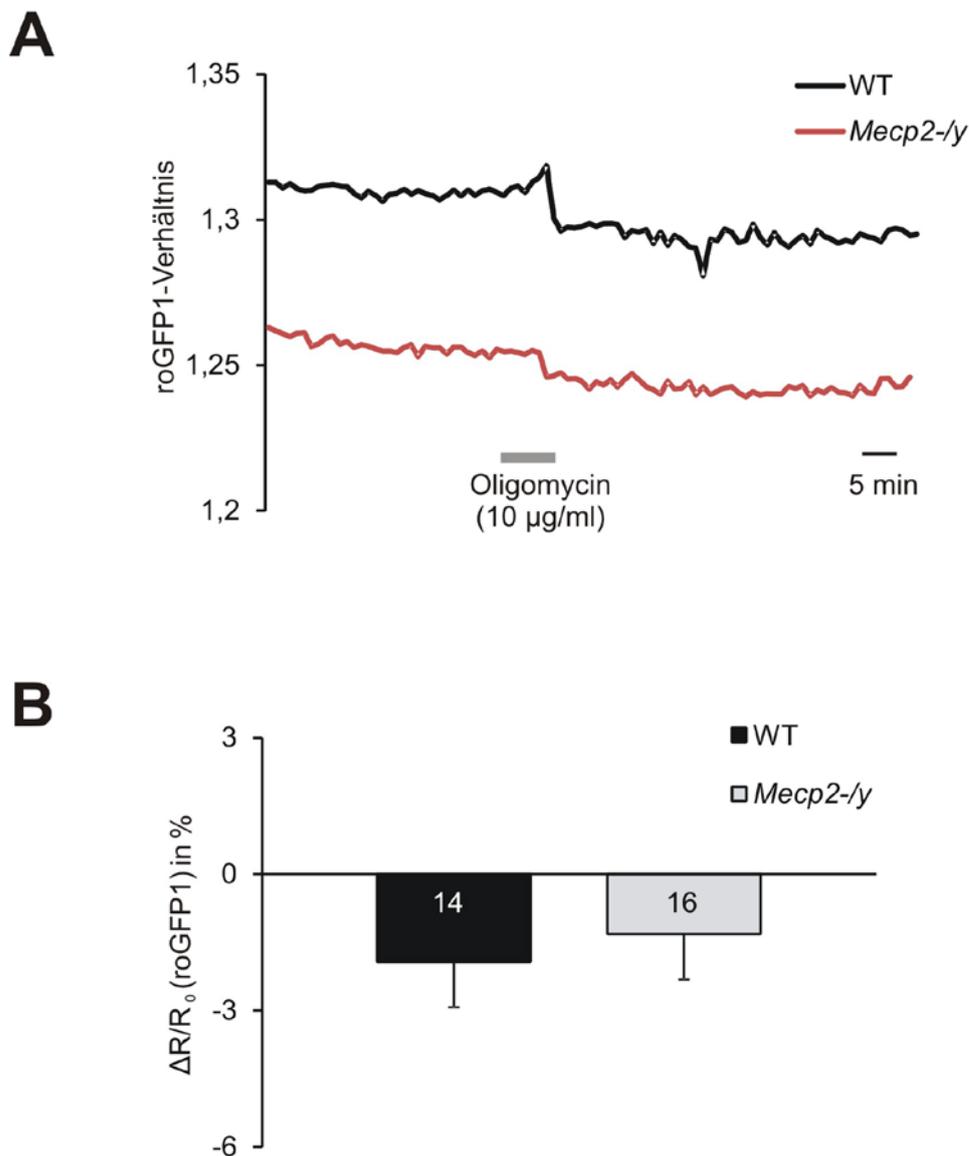
FCCP ist ein sogenannter Entkoppler und bildet Protonenkanäle in der inneren Mitochondrienmembran. Dadurch werden die Mitochondrien nahezu vollständig depolarisiert, was zu einer maximalen Stimulation der Atmungskette führt. Bei Applikation von 1  $\mu$ M FCCP (3 min) kam es bei den WT-Schnitten zu einer Abnahme des roGFP1-Verhältnisses um  $3,1 \pm 1,2\%$  ( $n = 15$ ), das heißt eine Verschiebung hin zu reduzierenden Bedingungen. Bei den *Mecp2*<sup>-/-</sup>-Schnitten war die Abnahme des roGFP1-Verhältnisses intensiver und betrug  $4,3 \pm 1,4\%$  ( $n = 51$ ,  $p = 0,003$ , siehe Abbildung 13).



**Abbildung 14: Wirkung von FCCP auf den mitochondrialen Metabolismus**

**A)** Die Beispielspuren zeigen Messungen einer *Mecp2<sup>-/-</sup>*-Maus und einer WT-Maus. Nach der Gabe von 1 µM FCCP lässt sich eine Abnahme des roGFP1-Verhältnisses beobachten. Nach Auswaschen von FCCP lässt sich keine Erholung der Schnitte beobachten, das heißt die Grundlinie erreicht den ursprünglichen Ausgangswert nicht wieder. **B)** Das Blockdiagramm zeigt die Mittelwerte der prozentualen Veränderung des roGFP1-Verhältnisses als Antwort auf 1 µM FCCP (3 min). Es wird deutlich, dass die *Mecp2<sup>-/-</sup>*-Schnitte intensiver reagieren als die WT-Schnitte.

Oligomycin (10 µg/ml, 8 min) ist ein Blocker der ATP-Synthase und induziert zwar eine moderate Abnahme des roGFP1-Verhältnisses (siehe Abbildung 15), aber keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Genotypen (WT-Schnitten:  $-1,93 \pm 1,1\%$ ,  $n = 14$  und *Mecp2*<sup>-/-</sup>-Schnitten  $-1,31 \pm 0,9\%$ ,  $n = 16$ ).



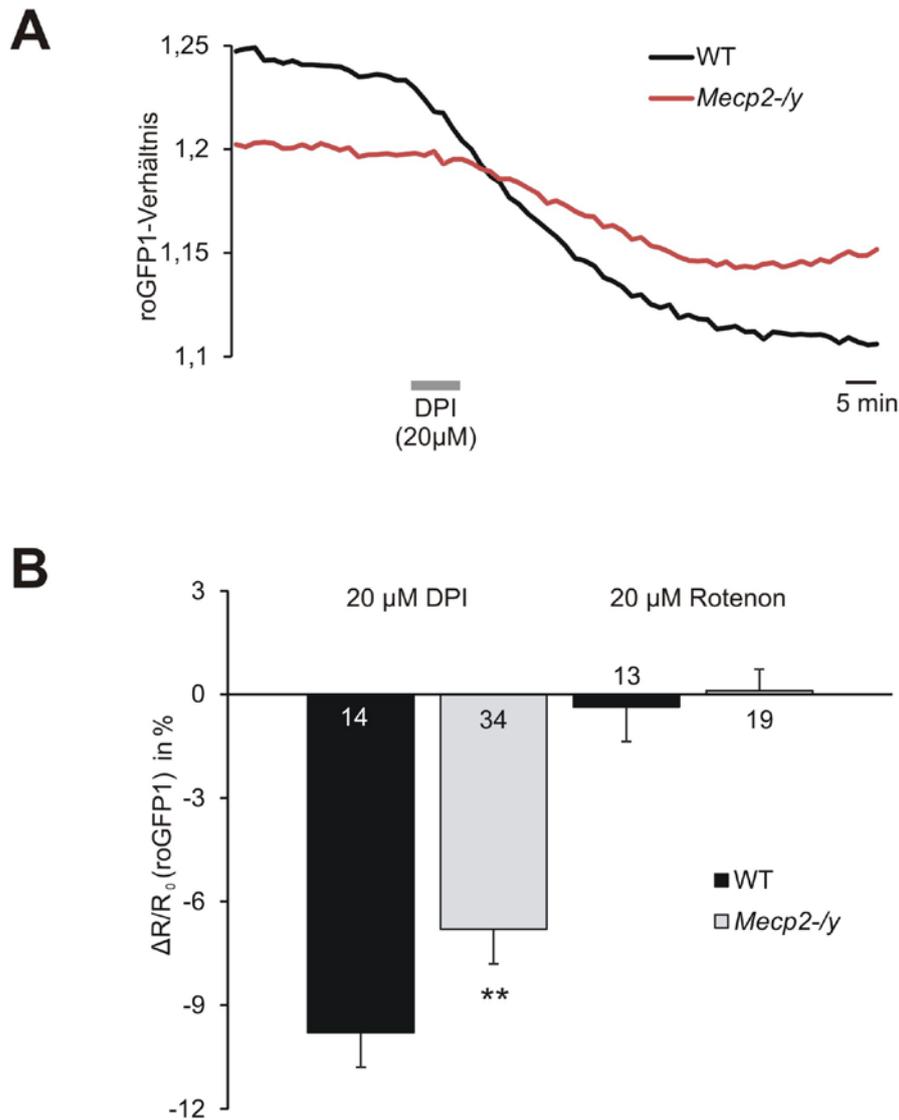
**Abbildung 15: Wirkung von Oligomycin auf den mitochondrialen Metabolismus**

**A)** Die dargestellten Beispielspuren zeigen die Veränderung des roGFP1-Verhältnisses nach der Applikation von 10 µg/ml Oligomycin bei einer WT-Maus und einer *Mecp2*<sup>-/-</sup>-Maus. Nach der Gabe lässt sich eine Abnahme des roGFP1-Verhältnisses beobachten. **B)** Die Mittelwerte zeigen die prozentuale Veränderung des roGFP1-Verhältnisses bei der Gabe von 10 µg/ml Oligomycin (8 min). Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Genotypen.

### 3.4 Extramitochondriale ROS-Produktion

Neben den Mitochondrien tragen auch zelluläre/zytosolische Oxidasen zu einer gewissen ROS-Bildung bei. Dieser ROS-Beitrag ist jedoch geringer als die ROS-Produktion der Mitochondrien und stellt nur etwa 15% der gesamten zellulären ROS-Produktion dar (Boveris and Chance 1973; Dröge 2002). Um die extramitochondriale ROS-Produktion zu bewerten und möglicherweise genotypische Unterschiede zwischen WT- und *Mecp2*<sup>-/-</sup>-Mäusen zu erkennen, wurden gezielt verschiedene Oxidasen pharmakologisch blockiert, um ihren jeweiligen Beitrag zur Redox-Grundlinie abzuschätzen.

DPI (20 µM, 8 min), ein Blocker der NAD(P)H-Oxidase, verringert das roGFP1-Verhältnis in WT-Schnitten um  $9,8 \pm 3,2\%$  (n = 14). In *Mecp2*<sup>-/-</sup>-Schnitten verursacht DPI eine geringere Abnahme von  $6,8 \pm 3,2\%$  (n = 34, p = 0,004, siehe Abbildung 16). DPI wirkt jedoch nicht nur auf die NAD(P)H-Oxidase, sondern vermittelt auch einen hemmenden Effekt auf Komplex I der Atmungskette. Um einen solchen Effekt von DPI auf Komplex I auszuschließen, kam der spezifische Komplex-I-Blocker Rotenon zum Einsatz. Damit wurde der Effekt einer spezifischen Komplex-I-Blockade bestimmt. Nach Applikation von Rotenon (20 µM, 8 min) konnte keine signifikante roGFP1-Antwort gefunden werden, weder bei den WT-Mäusen ( $-0,36 \pm 1,1\%$ ; n = 13), noch bei den *Mecp2*<sup>-/-</sup>-Schnittkulturen ( $0,11 \pm 0,6\%$ ; n = 19) (siehe Abbildung 16B). Die durch DPI induzierten Änderungen sind somit auf Blockade der NAD(P)H-Oxidase und nicht auf einen unspezifischen Effekt auf Komplex I zurückzuführen. Zudem muss bei DPI von einer irreversiblen Wirkung ausgegangen werden, da auch nach dem Auswaschen von DPI bis zu 30 Minuten danach noch keine Erholung der Redox-Antwort zu erwarten war. Diese irreversible Wirkung von DPI auf die Zelle ist auch in Literaturberichten aufgeführt (Stuehr et al. 1991, Dodd-o et al. 1997).

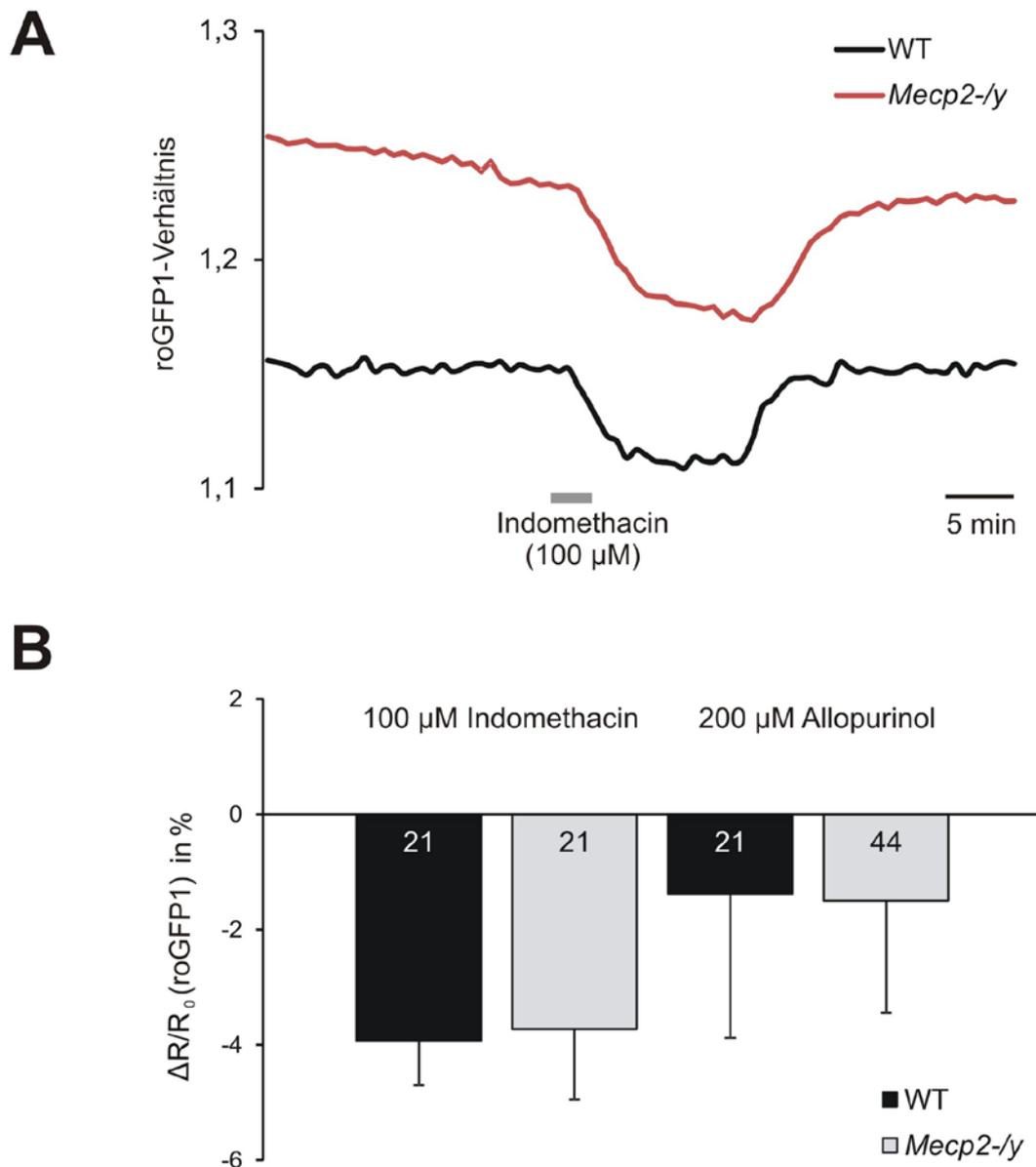


**Abbildung 16: Wirkung von DPI und Rotenon auf den Redox-Zustand der Zelle**

**A)** Die dargestellten Beispielspuren machen deutlich, dass der DPI-Effekt bei den *Mecp2<sup>-/-</sup>*-Schnitten geringer ist, als bei den WT-Schnitten. **B)** Dargestellt sind die Mittelwerte der roGFP1-Veränderung nach Applikation von DPI und Rotenon. DPI führt bei beiden Genotypen in der Zelle zu einer Abnahme des roGFP1-Verhältnisses, das heißt Verschiebung hin zur Reduktion. Bei WT-Schnitten ist diese Abnahme intensiver als bei den korrespondierenden *Mecp2<sup>-/-</sup>*-Schnitten. Rotenon hat keinen eindeutigen Einfluss auf das roGFP1-Verhältnis, wodurch sichergestellt ist, dass die beobachtete Reaktion auf DPI auf die Hemmung der NAD(P)H-Oxidase durch DPI zurückzuführen ist.

Die Hemmung der Cyclooxygenase durch Indomethacin (100 µM, 3 min) rief eine moderate Abnahme des roGFP1-Verhältnisses hervor, jedoch ohne signifikanten Unterschied zwischen WT- und *Mecp2<sup>-/-</sup>*- Schnitten. Bei den WT-Schnitten

verringerte sich das roGFP1-Verhältnis um  $3,9 \pm 0,8\%$  ( $n = 21$ ) während die Abnahme bei den *Mecp2*<sup>-y</sup>-Schnitten  $3,7 \pm 1,2\%$  ( $n = 21$ ) betrug (siehe Abbildung 17). Eine Blockierung der Xanthin-Oxidase durch Allopurinol (200  $\mu\text{M}$ , 8 min) führte nur zu einer geringen Abnahme des roGFP1-Verhältnisses bei WT- und *Mecp2*<sup>-y</sup>-Hirnschnittkulturen. Bei den WT-Schnitten betrug diese Abnahme  $1,4 \pm 2,5\%$  ( $n = 21$ ), bei den *Mecp2*<sup>-y</sup>-Schnitten verringerte sich das roGFP1-Verhältnis um  $1,5 \pm 1,95\%$  ( $n = 44$ ) (siehe Abbildung 17).



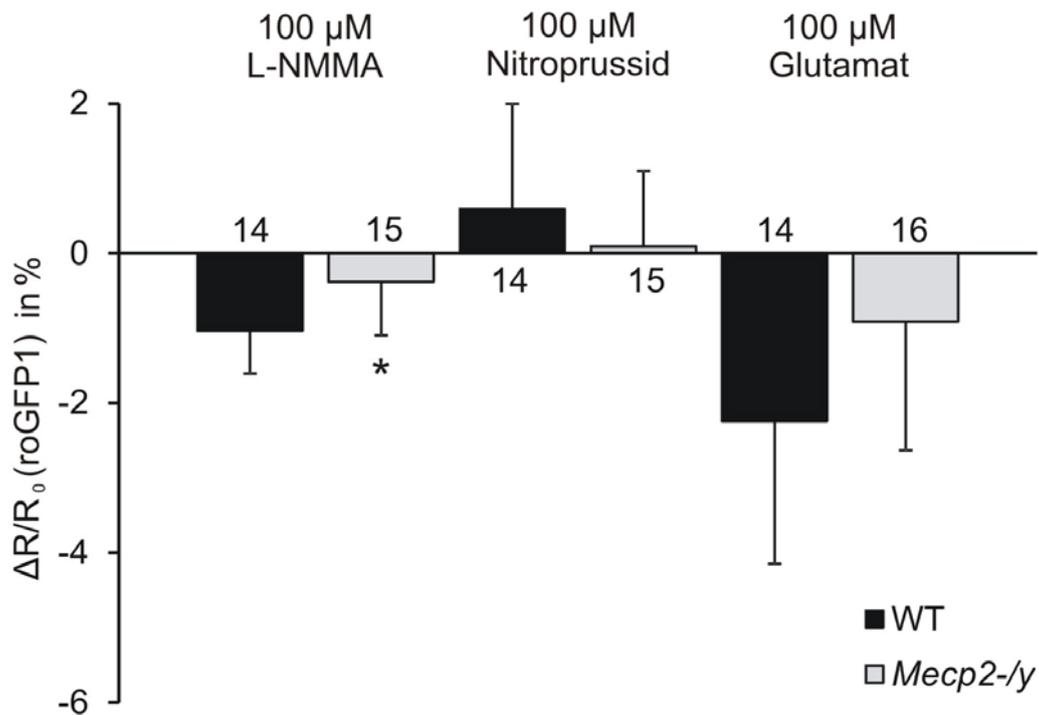
**Abbildung 17: Hemmung der extramitochondrialen Oxidasen**

**A)** Die dargestellten Beispielspuren zeigen die moderate Abnahme des roGFP1-Verhältnisses nach Applikation von 100 µM Indomethacin für 3 min. Beispielspuren für Allopurinol sind nicht gezeigt, da hier kaum Änderungen sichtbar waren. Nach Auswaschen von Indomethacin lässt sich gut beobachten, dass sich die Schnittkultur wieder erholt und zur roGFP1-Grundlinie zurückkehrt. **B)** Zusammengefasst sind die Mittelwerte der roGFP1-Veränderungen beider Genotypen bei der Gabe von Indomethacin (100 µM, 3 min) und Allopurinol (200 µM, 8 min). Durch die Hemmung der Xanthin-Oxidase durch Allopurinol sowie bei der Hemmung der Cyclooxygenase durch Indomethacin kommt es zu einer moderaten Abnahme des roGFP1-Verhältnisses. Ein signifikanter Unterschied der Abnahme innerhalb der beiden Genotypen konnte nicht beobachtet werden.

### 3.5 Einfluss von NO und Glutamat auf die ROS-Produktion

Zusätzlich zu der primären ROS-Bildung durch Mitochondrien und den zytosolischen Oxidasen haben auch noch andere Systeme einen modulatorischen Einfluss auf den Redox-Status einer Zelle. Dazu gehören Veränderungen der Stickstoffmonoxid (NO) –Ebene und Calcium-Einflüsse. Wie bereits kurz erwähnt (siehe Kapitel 1.3, S.17) kann NO mit ROS zu NOS reagieren und dadurch Proteine, Lipide und Nukleinsäuren oxidieren und nitrieren (Beckman and Koppenol 1996; Beckman 2009). Zudem hemmt NO zum Beispiel reversibel die Cytochrom-C-Oxidase und beeinflusst damit direkt die mitochondriale Atmungskette sowie die mitochondriale ROS-Produktion (Cleeter et al. 1994). Calcium-Veränderungen sind eng an neuronale Erregbarkeit und Aktivität gekoppelt. Unter anderem ist Calcium ein wichtiger Regulator der mitochondrialen Funktion und stimuliert die ATP-Synthese und damit die Atmungskette (Brookes et al. 2004; Gordeeva et al. 2003). In einigen Versuchen wurde bereits gezeigt, dass die Calcium-Homöostase im Hippokampus der *Mecp2<sup>-/-</sup>*-Mäuse gestört ist (Kron and Müller 2010).

Um diese möglichen Beiträge zu testen, wurden gezielt die zellulären NO-Spiegel moduliert. Die Modulation durch den NO-Donor Nitroprussid (100  $\mu$ M, 8 min) hatte keinen Einfluss auf das roGFP1-Verhältnis in WT- und *Mecp2<sup>-/-</sup>*-Hirnschnittkulturen. Es zeigten sich keine eindeutigen Effekte, weder bei WT-Schnittkulturen ( $0,6 \pm 1,4\%$ ,  $n = 14$ ) noch bei den *Mecp2<sup>-/-</sup>*-Schnittkulturen ( $0,1 \pm 1\%$ ,  $n = 15$ ) (siehe Abbildung 18). Der Isoform-unabhängige Hemmer der NO-Synthase L-NMMA (100  $\mu$ M, 8 min) verursachte nur einen sehr schwachen Abfall des roGFP1-Verhältnisses. Dieser Abfall betrug bei WT-Schnitten  $1,0 \pm 0,6\%$  ( $n = 14$ ) und war bei den *Mecp2<sup>-/-</sup>*-Schnitten noch geringer ( $-0,4 \pm 0,7\%$ ,  $n = 15$ ,  $p = 0,011$ ) (siehe Abbildung 18).



**Abbildung 18: Einfluss auf das roGFP1-Verhältnis durch den NO-Metabolismus**

Bei der Beeinflussung des NO-Metabolismus durch Inhibition der NO-Synthase durch L-NMMA (100 μM, 8 min) und durch Gabe eines NO-Donators Nitroprussid (100 μM, 8 min) zeigen sich nur geringe Veränderungen des roGFP1-Verhältnisses. Aufgrund dieser geringen Veränderung sind hier keine Beispielspuren gezeigt. Die Applikation von Glutamat (100 μM, 30 min) führte ebenfalls zu einer Abnahme des roGFP1-Verhältnisses, was einer Verschiebung Richtung Reduktion entspricht.

Glutamat gehört zu den erregenden Neurotransmittern und führt unter anderem zu  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem ER (Endoplasmatisches Retikulum) oder zu  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom.  $\text{Ca}^{2+}$  seinerseits ist eng an neuronale Aktivität und Erregbarkeit gekoppelt und stimuliert unter anderem die mitochondriale Atmungskette und damit die ROS-Produktion. Allerdings zeigten die Veränderungen der zellulären Aktivität und Erregbarkeit durch Applikation von 100 μM Glutamat (30 min) keinen Anstieg der ROS-Produktion. Die Glutamat-Gabe führte bei den WT-Schnitten zu einer Abnahme des roGFP1-Verhältnisses um  $2,2 \pm 1,9\%$  ( $n = 14$ ), während sich dieses Verhältnis bei den *Mecp2*<sup>-/-</sup>-Schnitten um  $0,9 \pm 1,7\%$  ( $n = 16$ ) verringerte (siehe Abbildung 18). Diese Abnahme des roGFP1-Verhältnisses steht für eine Redox-Verschiebung hin zur Reduktion.

### 3.6 Visualisierung oxidativer Schäden mittels C11-Bodipy<sup>581/591</sup>

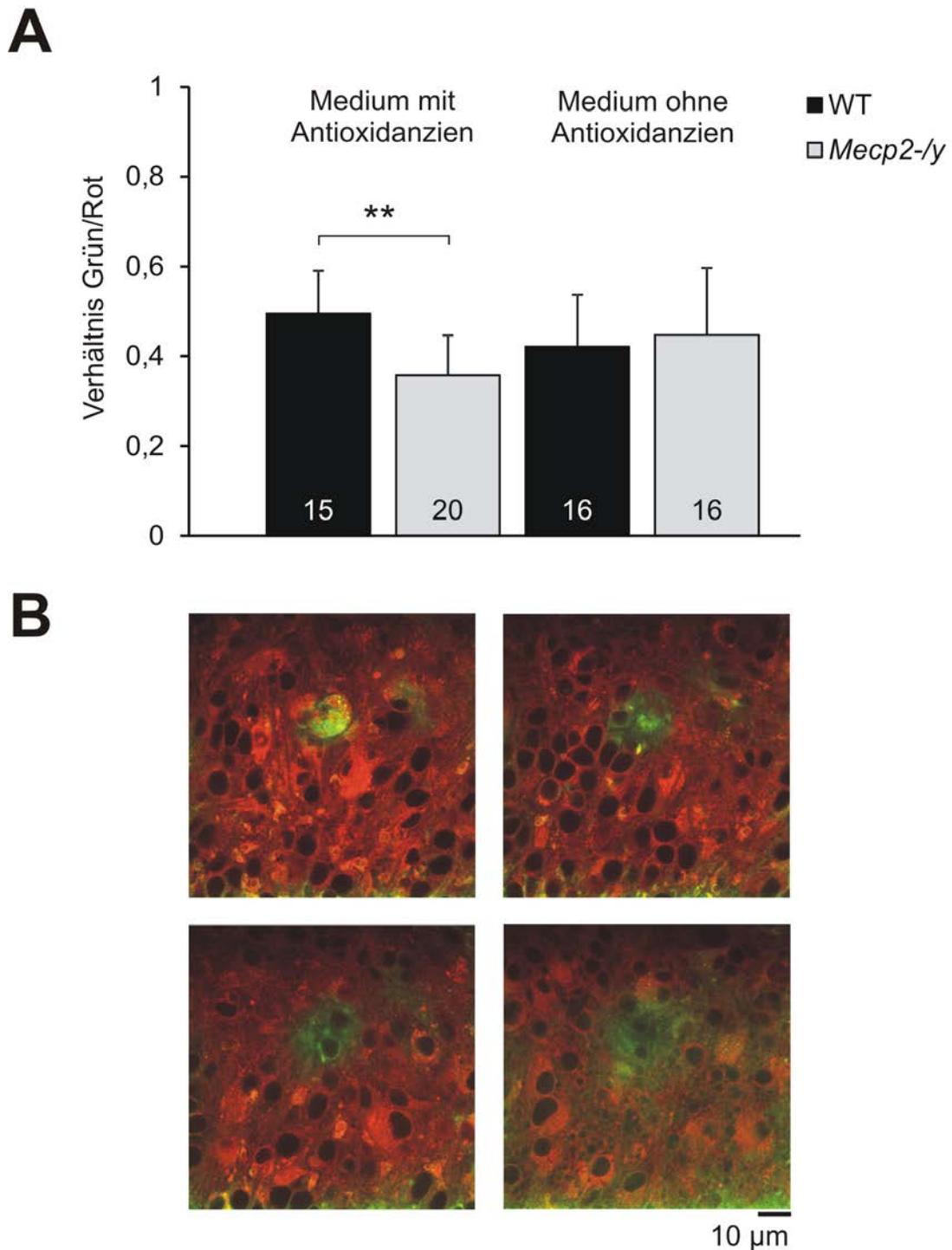
Durch oxidativen Stress kommt es neben DNA-Schäden unter anderem auch zur strukturellen Schädigung von Lipiden, Kohlenhydraten und Proteinen. Um zu untersuchen, inwieweit die Lipidperoxidation beim Rett-Syndrom intensiviert ist, wurde der Fluoreszenzfarbstoff C11-Bodipy<sup>581/591</sup> verwendet (Drummen et al. 2002). Bei Oxidation zeigt C11-Bodipy<sup>581/591</sup> eine Verschiebung der Fluoreszenz von Rot nach Grün, daher steigt bei der durch freie Radikale induzierten Oxidation das Fluoreszenzverhältnis Grün/Rot an.

In dieser Versuchsreihe wurden 4 verschiedene Versuchsgruppen untersucht. Zum einen *Mecp2*<sup>-/-</sup>- und WT-Hirnschnitte, die im normalen Medium kultiviert wurden, und zum anderen Schnittkulturen, die mit dem Antioxidanzien-freien B27 Zusatz im Medium versorgt wurden (siehe Abbildung 19A). Beim Vergleich der WT-Schnitte fanden sich kaum Abweichungen im Grün/Rot-Fluoreszenzverhältnis zwischen den unterschiedlich kultivierten Schnittkulturen. Die im normalen Medium kultivierten Schnitte zeigten einen Unterschied von  $0,49 \pm 0,1\%$  ( $n = 15$ ). Die Schnitte, die zuvor mit dem Antioxidanzien-freien Medium behandelt wurden, zeigten Werte von  $0,42 \pm 0,12\%$  ( $n = 16$ ). Beim Vergleich der *Mecp2*<sup>-/-</sup>-Schnitte untereinander zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Schnitten. Die Schnitte, die im normalen Medium kultiviert wurden, zeigten ein Grün/Rot-Fluoreszenzverhältnis von  $0,36 \pm 0,1\%$  ( $n = 20$ ) während die Schnitten, die vorher im Antioxidanzien-freien Medium kultiviert wurden ein Grün/Rot-Fluoreszenzverhältnis von  $0,45 \pm 0,15\%$ ,  $n = 16$  darstellten.

Allerdings schien auch die für die Schnittkultivierung benutzte Membran selbst zu fluoreszieren, weswegen die Trägermembran alleine ohne Hirnschnittkulturen untersucht wurde. Bei diesen Aufnahmen der Trägermembranen ergab sich ein erhöhtes Grün/Rot-Fluoreszenzverhältnis von

0,75 ± 0,01% (n = 5), sodass die mit C11-Bodipy<sup>581/591</sup> erhobenen Ergebnisse schwer zu interpretieren sind.

Daraufhin wurden noch Aufnahmen mit dem TPLSM gemacht, denn durch die fokale Anregung mit hoher axialer Auflösung wird nur spezifisch eine dünne Schicht des Gewebes angeregt, wodurch die Anregung der Trägermembran selbst umgangen werden kann. Nach nur einem Scan aber zeigte C11-Bodipy<sup>581/591</sup> bereits eine deutliche Bleichung der Fluoreszenzintensität, wodurch C11-Bodipy<sup>581/591</sup> für Messungen mit den TPLSM unbrauchbar ist (siehe Abbildung 19B). Mit C11-Bodipy<sup>581/591</sup> sind daher auch unter diesen Bedingungen keine zuverlässigen Aussagen über Veränderungen der Lipidperoxidation möglich.



**Abbildung 19: Visualisierung oxidativer Schäden mittels C11-Bodipy<sup>581/591</sup>**

**A)** In dem Balkendiagramm sind die Messdaten der Fluoreszenzmessungen mittels C11-Bodipy<sup>581/591</sup> dargestellt. Ein statistisch signifikanter Unterschied wurde nur zwischen den Genotypen innerhalb der Gruppen festgestellt, die im Medium mit Antioxidanzien kultiviert wurden. **B)** Die vier Bilder entstammen den Aufnahmen einer C11-Bodipy<sup>581/591</sup>-transfizierten Hirnschnittkultur, die mit dem TPLSM gemacht wurden. Das Präparat wurde mit 800 nm angeregt (63x 1,0 NA Objektiv). Der Z-Stapel wurde mit einer Pixelauflösung von 937 nm und einem Z-Abstand von 0,5  $\mu$ m aufgenommen. Die dargestellten Bilder sind jeweils 4-5  $\mu$ m voneinander entfernt.

## 4 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die oxidative Belastung der *Mecp2*<sup>-/-</sup>-Mäuse weiter untersucht. Dazu kam der optische Redoxindikator roGFP1 zum Einsatz und der mögliche Einfluss verschiedener Enzyme auf die ROS-Produktion wurde mittels fluoreszenzmikroskopischer Untersuchungen analysiert. Analysen aus Vorexperimenten durch andere Arbeitsgruppenmitgliedern bestätigten Veränderungen der mitochondrialen Funktionen sowie eine Verschiebung des zytosolischen Redox-Status, die eine erhöhte oxidative Belastung im hippokampalen Netzwerk bei *Mecp2*<sup>-/-</sup>-Mäusen verursacht. Darüber hinaus wurde bereits nachgewiesen, dass der *Mecp2*<sup>-/-</sup>-Hippokampus empfindlicher auf oxidativen Stress reagiert als der korrespondierende WT (Großer et al. 2012). Als Präparate dienten organotypische hippokampale Hirnschnittkulturen, die von einem Mausmodell für das Rett-Syndrom oder von WT-Mäusen gewonnen wurden.

Da Mitochondrien eine wichtige ROS-Quelle darstellen, wurden in dieser Dissertation zunächst gezielt verschiedene Enzymkomplexe der Atmungskette gehemmt, um zu beurteilen, woher genau die erhöhte ROS-Produktion stammt. Zudem wurde auch der Beitrag der extramitochondrialen Oxidasen an der zellulären ROS-Produktion untersucht. Mögliche Einflüsse durch die zellulären NO-Spiegel oder durch den Calciumhaushalt spielten ebenfalls eine Rolle in dieser Arbeit und wurden durch entsprechende pharmakologische Modulation abgeschätzt. Da wahrscheinlich auch die Lipidperoxidation durch erhöhte ROS-Spiegel intensiviert ist, wurden einige Messungen zudem mit dem Fluoreszenzfarbstoff C11-Bodipy<sup>581/591</sup> durchgeführt.

Für die meisten Messungen wurde der optische Redoxindikator roGFP1 benutzt. Bereits vor einiger Zeit bestätigte die Arbeitsgruppe Müller die Zuverlässigkeit von roGFP1 für hippokampale Hirnschnittkulturen der Ratte und beschrieb ausführlich die einmaligen Vorteile von roGFP1 gegenüber redox-sensitiven Farbstoffen (Funke et al. 2011). Von den verschiedenen roGFPs (Dooley et al. 2004; Hanson et al. 2004) wurde bei diesen Messungen das zytosolisch exprimierte roGFP1 verwendet, da so die zytosolischen Veränderungen, die möglicherweise intrazelluläre Signalwege, Organellen, Ionenkanäle und Rezeptoren modulieren, untersucht werden können. Da roGFP1 nicht nur spezifische ROS erfasst, sondern vielmehr einen Indikator für den intrazellulären Redox-Status darstellt, ist diese Eigenschaft sehr vorteilhaft im Hinblick auf die rasche Umwandlung verschiedener ROS. Zudem kann roGFP1 auch die ROS-Dynamik darstellen. Im Gegensatz zu den redox-sensitiven Farbstoffen detektiert roGFP1 nicht nur oxidierende sondern auch reduzierende Stimuli und somit eine verminderte ROS-Bildung. Dies ist eine wertvolle Information, die mit den redox-sensitiven Farbstoffen nicht abgeschätzt werden kann. Potentielle Artefakte, die zum Beispiel darauf beruhen, dass der Fluorophor bleicht oder sich seine zellulären Konzentrationen ändern, werden durch die ratiometrischen Eigenschaften von roGFP1 aufgehoben, sodass semiquantitative Analysen möglich sind.

Die Quantifizierung der Redox-Verhältnisse durch roGFP1-Derivate basiert auf einer freien Sulfhydroxyl-Gruppe (-SH-Rest von Cystein), die in Abhängigkeit von den zellulären Redox-Bedingungen entweder eine intramolekulare Disulfid-Brücke bilden oder aufbrechen. Unter diesem Aspekt verhalten sich roGFP-Sonden wie andere redox-sensitive Proteine und sind vollständig in das zelluläre Redox-Gleichgewicht integriert (Dooley et al. 2004; Funke et al. 2011; Hanson et al. 2004). Diese quantitative Eigenschaft ist für molekulare Analysen entscheidend, da dies einen direkten Vergleich über die Auswirkungen von genetischen Erkrankungen erlaubt, die zum Beispiel die mitochondrialen

Funktionen, das zelluläre Redox-Gleichgewicht oder die ROS-Verteidigungsmechanismen beeinflussen. Darüber hinaus ist GFP, von welchem roGFP1 abgeleitet ist, auch besonders stabil, wenn es zum Beispiel denaturierenden Agenzien oder Proteasen ausgesetzt ist (Bokman and Ward 1981). Zudem zeigt GFP auch eine gute Photostabilität, da seine äußere Hülle das Chromophor schützt (Tsien 1998) und somit ziemlich resistent gegen Ausbleichen ist. Um roGFP1-kodierende DNA bzw. Plasmide in die Zelle zu schleusen, wurde Lipofectamin verwendet. Im Rahmen der transienten Transfektion wurde meist nur in Gliazellen roGFP1 exprimiert. Daher wurde nicht zwischen Neuronen und Gliazellen differenziert, sondern alle Zellen gemessen und dann zusammengefasst.

Zunächst wurde der Kalibrierungsbereich für roGFP1 bestimmt, um semi-quantitative Analysen durchführen zu können. Dazu wurde die Reaktion von roGFP1 auf maximale Reduktion (DTT) und Oxidation ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) bestimmt. Obwohl diese Kalibrierung zuvor am gleichen Messplatz schon unter ähnlichen Bedingungen durchgeführt wurde (Großer et al. 2012), wiederholte ich diese Versuche, da die Vorversuche bereits einige Monate zuvor liefen und in der Zwischenzeit auch ein Wechsel der Xenon-Hochdrucklampe der Lichtquelle stattfand. Anhand dieser Kalibrierungsdaten konnten nun semi-quantitative Analysen durchgeführt werden. Beim Vergleich meiner Kalibrierungsdaten mit der Kalibrierung, die zuvor durchgeführt wurde, fällt auf, dass in dieser Versuchsreihe die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Antworten wesentlich intensiver ausfielen, als bei Großer et al. 2012. Dies könnte zum Beispiel darauf zurückzuführen sein, dass in der Zwischenzeit Membranen von einem anderen Hersteller bestellt und zur Kultivierung der organotypischen Hirnschnittkulturen benutzt wurden.

Die Mehrzahl der analysierten Schnitte wurden in einem Medium mit regelrechtem B-27-Zusatz kultiviert, was eine Mischung verschiedener Antioxidanzien unbekannter Konzentration enthält. Dieser regelrechte B-27-

Zusatz ist in der Zellkultur ein Standardzusatz (Brewer 1997) und die enthaltenen Antioxidanzien verbessern das Überleben von kultivierten Zellen und Geweben (Brewer et al. 1993). Um eventuelle Einflüsse dieser Antioxidanzien zu überprüfen und zu quantifizieren, wurden entsprechende Kontrollversuche durchgeführt.

Beim Vergleich der Redox-Grundlinien im Ruhezustand zeigte sich bei den Zellkulturen, die im Medium ohne die Antioxidanzien kultiviert wurden, ein signifikant erhöhtes roGFP1-Verhältnis in den *Mecp2*<sup>-/-</sup>-Schnitten, was auf einen erhöhten oxidativen Redox-Status schließen lässt. In Analysen der Schnittkulturen, die im normalen Medium mit diversen Antioxidanzien kultiviert wurden, ergaben sich keine signifikanten Unterschiede des Redox-Gleichgewichts unter Ruhebedingungen. In den vorherigen Analysen durch andere Arbeitsgruppenmitgliedern fiel auf, dass das Verhältnis der roGFP1-Grundlinie in *Mecp2*<sup>-/-</sup>-Schnitten höher war und der Grad der Oxidation von roGFP1 im Vergleich zu den WT-Schnitten ca. 35% erhöht war (Großer et al. 2012). Zusammen mit meinen Daten der Schnittkulturen, die im Antioxidanzien-freien Medium kultiviert wurden, wird eine erhöhte oxidative Belastung der Mausmodelle für das Rett-Syndrom bestätigt. Es ist daher anzunehmen, dass auch andere zelluläre Proteine einen erhöhten Oxidations-Grad zeigen und somit eine veränderte Aktivität im Hippokampus der *Mecp2*<sup>-/-</sup>-Mäuse haben könnten. Zytosolische Redox-Veränderungen beeinflussen zum Beispiel verschiedene Ionenkanäle und Rezeptoren und können daher zu einer kritischen Modulation der neuronalen Erregbarkeit führen. Beispiele für solche redox-sensitiven Kanäle sind spannungsabhängige Natrium-Kanäle (Hammarström and Gage 2000) und Kalium-Kanäle (Müller and Bittner 2002), NMDA-Glutamat-Rezeptoren (Aizenman et al. 1989) und GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren (Sah et al. 2002).

In der Publikation Großer et al. 2012 zeigt sich bei den Versuchen, die zwei Jahre zuvor im Standardmedium mit Antioxidanzien angefertigt wurden, auch ein

signifikanter Unterschied zwischen den Grundlinien der WT- und der *Mecp2<sup>-/-</sup>*-Mäuse (WT:  $1,26 \pm 0,18$ ,  $n = 81$ ,  $P = 0,005$ ; *Mecp2<sup>-/-</sup>*:  $1,38 \pm 0,33$ ,  $n = 61$ ) (Großer et al. 2012). Im Rahmen meiner Dissertation konnte dieser Unterschied nicht beobachtet werden, der genaue Grund dafür ist nicht eindeutig zu benennen. Eine mögliche Ursache ist, dass diese älteren Messungen unter leicht abweichenden Versuchsbedingungen erfolgten (Membranträgersysteme von einem anderen Hersteller und leicht unterschiedliche optische Filtersysteme).

Neben dem erhöhten oxidativen Redox-Verhältnis bei den *Mecp2<sup>-/-</sup>*-Schnitten, die im Medium ohne Antioxidanzien kultiviert wurden, konnte außerdem eine Überreaktion auf akuten oxidativen Stress beobachtet werden. Die Antworten auf akute oxidative Belastung durch  $200 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$  waren bei den im Antioxidanzien-freien Medium kultivierten Schnitten intensiver. Daher scheint es, als wären die Antworten der Schnitte, die im Antioxidanzien enthaltendem Medium kultiviert wurden, etwas gedämpft.

Zusätzlich zur Kalibrierung wurde in dieser Arbeit auch noch geprüft, ob roGFP1 sensibel auf das starke Oxidationsmittel TBHP reagiert. Schon in vorherigen Analysen der Arbeitsgruppe Müller wurde gezeigt, dass roGFP1 reversibel auf verschiedene ROS wie  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\bullet\text{OH}$  und  $\bullet\text{O}_2^-$  reagiert (Funke et al. 2011). Diese Tatsache folgt dem Konzept, dass Sulfhydrylgruppen durch verschiedene ROS oxidiert werden können, ebenso auch durch unterschiedliche Oxidationsmittel. Durch diese Eigenschaft ist roGFP1 vielmehr ein Indikator für den intrazellulären Redox-Status und detektiert nicht nur eine bestimmte Sorte ROS. Nach Beenden der ROS-Stimulation erholt sich roGFP1 vollständig. Diese Erholung des Redoxindikators von Oxidation wird durch zelluläres Glutaredoxin oder Thioredoxin vermittelt (Björnberg et al. 2006). Dies bestätigt eine vollständige Integration von roGFP1 in die zellulären Redox-Systeme (Funke et al. 2011). Durch die Applikation von TBHP wurde nicht nur bestätigt, dass roGFP1 auf verschiedene Arten von ROS reagiert, sondern TBHP fördert zudem die

Lipidperoxidation. Daher ist es aufgrund der erhöhten oxidativen Belastung wahrscheinlich, dass auch die Lipidperoxidation bei den Rett-Mäusen intensiviert ist. Bei der Applikation der hohen Konzentration von 0,1 mM TBHP konnten zwischen den beiden Genotypen keine unterschiedlichen Reaktionen beobachtet werden. Das könnte darauf zurückzuführen sein, dass es sich bei der Konzentration um eine sättigende Dosis handelt. Bei Applikation von 20  $\mu$ M TBHP ließ sich erkennen, dass das roGFP1-Verhältnis der WT-Schnitte stärker zunahm als das Verhältnis der *Mecp2*<sup>-/-</sup>-Schnitte und es somit bei den WT-Schnitte zu einer intensiveren Redox-Verschiebung hin zur Oxidation kam.

Wie bereits erwähnt, wurde durch vorherige Arbeiten durch andere Arbeitsgruppenmitgliedern eine intensivere ROS-Bildung und eine oxidative Verschiebung des zytosolischen Redox-Status bei einer erhöhten Belastung der Mitochondrien in *Mecp2*<sup>-/-</sup>-Mäusen bestätigt. Unter anderem wurde schon gezeigt, dass die Hemmung von Komplex III der Atmungskette durch Applikation von Antimycin A zu einem verstärkten Anstieg des roGFP1-Verhältnisses bei *Mecp2*<sup>-/-</sup>-Mäusen führte (Großer et al. 2012). Zur weiteren Untersuchung der mitochondrialen ROS-Produktion kamen hier die Modulanzen FCCP und Oligomycin zum Einsatz. Obwohl die mitochondriale Atmung durch FCCP maximal stimuliert wird, da FCCP Protonenkanäle in der inneren Mitochondrienmembran ausbildet und die Mitochondrien dadurch nahezu vollständig depolarisieren (Cotton et al. 1981), zeigen verschiedene Literaturberichte trotz dieser mitochondrialen Entkopplung kaum erhöhte ROS-Produktionen (Abramov et al. 2007; Funke et al. 2011; Starkov and Fiskum 2003; Vergun et al. 2001). Und in der Tat deutet auch in dieser Versuchsreihe das verringerte roGFP1-Verhältnis während FCCP-Applikation auf eine verminderte ROS-Produktion hin. Dies unterstützt zunehmend die schon bestehende Vermutung, dass die mitochondriale ROS-Produktion unter anderem auch von einem intakten mitochondrialen Membranpotenzial abhängt (Funke et al. 2011).

Weniger übereinstimmend sind die Effekte des ATP-Synthase-Inhibitors Oligomycin beschrieben. In vorherigen Analysen wurden bei der Hemmung der ATP-Synthase erhöhte ROS-Produktionen durch roGFP1 und den redox-sensitiven Farbstoff HEt (Dihydroethidium) gemessen (Funke et al. 2011), was mit früheren Beobachtungen an Hirngewebe isolierten Mitochondrien übereinstimmte (Starkov and Fiskum 2003). Andere beobachteten, dass es erst einige Minuten nach Applikation von Oligomycin zu einer vermehrten ROS-Produktion kam (Abramov et al. 2007). Diese Ergebnisse wurden damals durch die unterschiedlichen experimentellen Bedingungen erklärt (Funke et al. 2011), denn für die Messungen verwendetet die Studie von Abramov zum Beispiel eine HEPES-gepufferte Kochsalzlösung während die Arbeitsgruppe Müller die Zellen mit einer Carbogen-Gasgemisch begasten ACSF-Lösung umspülte (Abramov et al. 2007, Funke et al. 2011). Im Rahmen dieser Arbeit kam es durch die Applikation von 10 µg/ml Oligomycin zu einer Abnahme des roGFP1-Verhältnis, was auf eine verringerte ROS-Produktion hinweist. Da hier Schnittkulturen der Maus verwendet wurden und zuvor Zellkulturen der Ratte sind auch hier methodische Unterschiede eine mögliche Erklärung.

In Voruntersuchungen ließ sich bereits eine Verringerung des roGFP1-Verhältnisses bei schwerer Hypoxie beobachten und damit eine gedämpfte ROS-Produktion. Offensichtlich ist diese verminderte ROS-Produktion auf eine Erschöpfung notwendiger Substrate für die Atmungskette sowie auf eine Hemmung der O<sub>2</sub>-abhängigen extramitochondrialen ROS-Quellen, wie die NAD(P)H-Oxidase und die Xanthin-Oxidase zurückzuführen (Funke et al. 2011). Bei der gezielten Untersuchung der zellulären Oxidasen, die nur etwa 15% zur gesamten zellulären ROS-Produktion beitragen (Boveris and Chance 1973; Dröge 2002), konnten keine Hinweise auf eine erhöhte extramitochondriale ROS-Produktion in *Mecp2*<sup>-/-</sup>-Mäusen erhalten werden. In der Tat waren die Redox-Veränderungen bei Inhibition der NAD(P)H-Oxidase durch DPI in den *Mecp2*<sup>-/-</sup>-Schnitten sogar weniger intensiv. Hemmung der Xanthin-Oxidase mit Allopurinol

und Hemmung der Cyclooxygenase mit Indomethacin zeigte eine identische Abnahme des roGFP1-Verhältnisses bei *Mecp2<sup>-/-</sup>*- und WT-Schnitten. Daraus lässt sich eher eine gedämpfte extramitochondriale ROS-Produktion durch die NAD(P)H-Oxidase im *Mecp2<sup>-/-</sup>*-Hippokampus vermuten. Die NAD(P)H-Oxidase in *Mecp2<sup>-/-</sup>*-Mäusen scheint daher weniger aktiv zu sein als in WT-Mäusen.

Zusätzlich zu bisher beschriebenen ROS-Quellen richtete ich meine Aufmerksamkeit auch noch auf andere Systeme, die einen modulatorischen Einfluss auf den Redox-Status einer Zelle haben. Bei der Modulation der zellulären NO-Spiegel kam es bei der Inhibition der NO-Synthase durch L-NMMA zu einer Verschiebung des Redox-Gleichgewichts hin zur Reduktion. Dabei ließ sich beobachten, dass diese Abnahme in den *Mecp2<sup>-/-</sup>*-Mäusen weniger ausgeprägt war, was vermuten lässt, dass das NO-System in *Mecp2<sup>-/-</sup>*-Mäusen weniger aktiv sein könnte. Bei der Modulation durch den NO-Donor Nitroprussid ließen sich hingegen keine signifikanten Unterschiede feststellen.

Die Beurteilung der Auswirkungen von Glutamat ist schwieriger. In früheren Untersuchungen zeigte sich eine Glutamat-vermittelte ROS-Bildung, welche durch den redox-sensitiven Farbstoff HET detektiert wurde (Vergun et al. 2001). Des Weiteren beobachtete die Arbeitsgruppe Müller bei hippokampalen Zellkulturen der Ratte einen Anstieg der ROS-Produktion bei Applikation von niedrigen Glutamat-Konzentrationen. Die Applikation von hohen Konzentrationen führte allerdings zu einer verminderten ROS-Bildung (Funke et al. 2011). Bei der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuchsreihe wurde durch Applikation von Glutamat eine Abnahme des roGFP1-Verhältnisses beobachtet, was auf eine Redox-Verschiebung Richtung Reduktion hinweist. Glutamat führt zu einer Depolarisation der Mitochondrien was wiederum ein Sinken ihres Membranpotentials zur Folge hat (Vergun et al. 2001). Möglicherweise ist diese mitochondriale Depolarisation die Ursache für die verminderte ROS-Produktion. Ein interessanter Aspekt in diesem

Zusammenhang könnte ebenso sein, dass der NMDA-Rezeptor selber redox-sensitiv ist (Aizenman et al. 1989) und dass auch NO diesen Rezeptor beeinflusst. Abhängig von den zellulären Redox-Bedingungen führt NO durch S-Nitosylierung des NMDA-Rezeptors, was dessen anschließende Inaktivierung bewirkt, zu Neuroprotektion oder aber NO vermittelt über die Bildung von Peroxynitrit eine neurodestruktive Wirkung (Lipton et al. 1993).

Bei den Untersuchungen der Lipidperoxidation beim Rett-Syndrom als Beispiel einer vermuteten Schädigung der zytosolischen Redox-Homöostase mittels dem Fluoreszenzfarbstoff C11-Bodipy<sup>581/591</sup> konnte nur festgestellt werden, dass C11-Bodipy<sup>581/591</sup> für die bisher angewandten Messmethoden (Fluoreszenzmikroskopie und TPLSM) und zumindest für die Untersuchungen an Schnittkulturen wenig geeignet ist. Bei der Fluoreszenzmikroskopie bestätigten die Aufnahmen von der Trägermembran des Zellkultivierungssystems eine ausgeprägte Eigenfluoreszenz und somit sind die zuvor gemessenen Daten der Hirnschnittkulturen nicht eindeutig zu beurteilen. Bei der Messung mit dem 2-Photonen-Laser-Scanning-Mikroskop zeigte C11-Bodipy<sup>581/591</sup> zudem bereits nach einem einzigen Scan eine deutliche Photobleichung. Die gute Photostabilität von C11-Bodipy<sup>581/591</sup>, die in der Literatur beschrieben wurde (Drummen et al. 2002), konnte hier nicht bestätigt werden.

## 5 Zusammenfassung und Ausblick

Ziel dieser Dissertation war es, mögliche Einflüsse verschiedener Enzyme auf die ROS-Produktion zu untersuchen und somit die Erkenntnisse aus vorangegangenen Arbeiten zu erweitern. Im Fokus dieser Untersuchungen lagen zum einen die mitochondriale ROS-Produktion sowie die extramitochondriale ROS-Produktion. Durch unterschiedliche pharmakologische Modulationen wurden beide Systeme beeinflusst, um den jeweiligen Beitrag zur gesamten ROS-Produktion abzuschätzen. Neben der mitochondrialen und der extramitochondrialen ROS-Produktion wurden auch mögliche Einflüsse durch die zellulären NO-Spiegel oder durch den Calcium-Haushalt betrachtet.

Zuvor wurden die Vorteile des verwendeten Redoxindikators roGFP1 ausführlich beschrieben. Natürlich wäre es von Interesse zu klären, ob das Redox-Ungleichgewicht und die oxidative Belastung bei Neuronen intensiver ausgeprägt ist, da diese mehr Mitochondrien enthalten und einen erhöhten metabolischen Bedarf haben. Doch derzeit verhindern verschiedene technische Einschränkungen noch die Verwendung von roGFP1 für solche Analysen, da es bisher noch nicht gelungen ist, roGFP1 spezifisch in Neuronen zu exprimieren. Seit kurzem gibt es einen viralen roGFP1-Vektor, mit dessen Hilfe es in Zukunft möglich sein wird, diese gewünschten Untersuchungen spezifisch an Neuronen durchzuführen.

Schlussfolgernd zeigen sich schon sehr früh, im neonatalen Stadium, Redox-Veränderungen der hippokampalen Hirnschnittkulturen. Der Unterschied in der Redox-Grundlinie unter Ruhebedingungen bei den Hirnschnitten, die im Antioxidanzien-freien Medium kultiviert wurden, sowie die Ergebnisse der verschiedenen Versuche verdeutlichen nochmals, dass das zytosolische Redox-

Gleichgewicht von *Mecp2*<sup>-/-</sup>-Schnitten verglichen mit den WT-Mäusen stärker durch oxidative Belastung oder mitochondriale Hemmung beeinflusst wird. Dies deutet auf ein anfälligeres Redox-Gleichgewicht bei den *Mecp2*<sup>-/-</sup>-Mäusen hin. Die primäre Ursache scheint eine erhöhte mitochondriale, jedoch nicht extramitochondriale ROS-Produktion zu sein. Eine weitere mögliche Ursache ist eine verminderte enzymatische Aktivität der SOD, welche bereits in Blutproben von Rett-Patientinnen nachgewiesen wurde (de Felice et al. 2009; Sierra et al. 2001). Diese verminderte enzymatische Aktivität der SOD führt zu einer weniger effizienten ROS-Pufferung im *Mecp2*<sup>-/-</sup>-Hippokampus. Die auf mRNA-Ebene für den *Mecp2*<sup>-/-</sup>-Hippokampus nachgewiesene Hochregulation des Schutzzyms SOD1, das Superoxidradikale in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> umwandelt, könnte ein kompensatorischer Ansatz zur Bekämpfung der erhöhten ROS-Produktion der Mitochondrien und des zellulären Redox-Ungleichgewichts sein (Großer et al. 2012).

Weiterführende Untersuchungen der Arbeitsgruppe Müller haben bereits gezeigt, dass eine Behandlung mit dem Radikalfänger Trolox, ein wasserlösliches Vitamin-E-Derivat, die Redox-Grundlinie der *Mecp2*<sup>-/-</sup>-Mäuse bis auf die Höhe der WT-Mäuse vermindert. Auch die übertriebene Reaktion auf akute oxidative Belastung wurde gedämpft. Darüber hinaus wurde die erhöhte Hypoxie-Anfälligkeit der erwachsenen *Mecp2*<sup>-/-</sup>-Schnitte deutlich herabgesetzt und die synaptische Plastizität wurde spürbar verbessert. Somit wurde gezeigt, dass Trolox erfolgreich das zelluläre Redox-Gleichgewicht verbessert, die Hypoxie Anfälligkeit dämpft und die synaptische Plastizität wiederherstellt (Janc et al. 2012, 2013). Diese Ergebnisse identifizieren Radikalfänger als eine sehr vielversprechende pharmakotherapeutische Behandlungsmöglichkeit der verschiedenen Aspekte der neuronalen Dysfunktion beim Rett-Syndrom.

## 6 Anhang

### 6.1 Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: STADIEN DER ENTWICKLUNG UND CHARAKTERISTISCHE SYMPTOME BEIM RETT-SYNDROM .....	9
ABBILDUNG 2: ROS-PRODUKTION DER MITOCHONDRIALEN ATMUNGSKETTE.....	16
ABBILDUNG 3: STRUKTURELLE DARSTELLUNG DES OPTISCHEN REDOXINDIKATORS roGFP1 .....	20
ABBILDUNG 4: DAS FÜR DIE HERSTELLUNG DER SCHNITTKULTUREN VERWENDETE PRÄPARATIONSBESTECK .....	23
ABBILDUNG 5: AUFTEILUNG DER 6-Well-KULTURPLATTE.....	24
ABBILDUNG 6: AUFBAU DES OPTISCHEN MESSPLATZES .....	27
ABBILDUNG 7: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER OPTISCHEN MESSUNG .....	29
ABBILDUNG 8: DARSTELLUNG VON TILL VISION® .....	30
ABBILDUNG 9: ZYTOSOLISCHE EXPRESSION VON roGFP1 .....	41
ABBILDUNG 10: KALIBRIERUNG DES roGFP1-ANTWORTBEREICHS .....	43
ABBILDUNG 11: RATIOMETRISCHE MESSUNGEN VON TBHP MIT roGFP1 .....	45
ABBILDUNG 12: VERGLEICH DER roGFP1-GRUNDLINIEN UNTER RUHEBEDINGUNGEN .....	46
ABBILDUNG 13: OXIDATIVE BELASTUNG DURCH 200µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	47
ABBILDUNG 14: WIRKUNG VON FCCP AUF DEN MITOCHONDRIALEN METABOLISMUS.....	49
ABBILDUNG 15: WIRKUNG VON OLIGOMYCIN AUF DEN MITOCHONDRIALEN METABOLISMUS .....	50
ABBILDUNG 16: WIRKUNG VON DPI UND ROTENON AUF DEN REDOX-ZUSTAND DER ZELLE.....	52
ABBILDUNG 17: HEMMUNG DER EXTRAMITOCHONDRIALEN OXIDASEN.....	54
ABBILDUNG 18: EINFLUSS AUF DAS roGFP1-VERHÄLTNIS DURCH DEN NO-METABOLISMUS .....	56
ABBILDUNG 19: VISUALISIERUNG OXIDATIVER SCHÄDEN MITTELS C11-BODIPY <sup>581/591</sup> .....	59

## 6.2 Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: ÜBERBLICK ÜBER VERSCHIEDENE ROS .....	13
TABELLE 2: ZUSAMMENFASSUNG DER FÜR LÖSUNGEN UND ZELLKULTUREN VERWENDETEN FEINCHEMIKALIEN .....	37
TABELLE 3: VERWENDETE PHARMAKA UND MODULANZIEN.....	38

## 6.3 Abkürzungsverzeichnis

ACSF	artifizielle cerebrospinale Flüssigkeit
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
CCD-Kamera	<i>charge-coupled device</i>
CDKL5-Gen	<i>Cyclin-dependent Kinase-like 5-Gen</i>
COX	Cyclooxygenasen
DIV	Tage nach Anlegen der Schnittkulturen, engl. <i>days in vitro</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPI	Diphenyleneiodonium-Chlorid
DTT	DL-Dithiothreitol
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FCCP	Carbonylcyanid-4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazon
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GSH/GSSG	Glutathion/Glutathiondisulfid
GSH-System	Glutathion-System
HBSS	<i>Hanks balanced salt solution</i>
H <sub>2</sub> O	Wasser

## Anhang

---

H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
KO	Knockout
L-NMMA	L-NG-Monomethyl-Arginincitrat
MeCP2	<i>methyl CpG binding protein 2</i> , vom <i>MECP2</i> -Gen kodiertes Protein
Mecp2 <sup>-/y</sup>	Mausmodell des Rett-Syndroms, MeCP2-Knockout-Maus, männliches Tier
mRNA	mitochondriale Ribonukleinsäure
n	Anzahl der Experimente
NAD(P)H-Oxidase	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-(Phosphate) – Oxidase
NO	Stickstoffmonoxid
O <sub>2</sub>	Sauerstoffmolekül
•O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Superoxidanion-Radikal
•OH	Hydroxyl-Radikal
p	Wahrscheinlichkeit, Signifikanzwert
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
roGFP1	<i>reduction/oxidation sensitive GFP</i> , redox-sensitives GFP
ROI	<i>region of interest</i>
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
SOD	Superoxiddismutase
TBHP	<i>tert</i> -Butylhydroperoxid
TPLSM	2-Photonen-Laser-Scanning-Mikroskop
WT	Wildtyp

## 7 Literaturverzeichnis

Abramov AY, Scorziello A, Duchen MR (2007): Three distinct mechanisms generate oxygen free radicals in neurons and contribute to cell death during anoxia and reoxygenation. *J. Neurosci.* 27, 1129–1138

Aizenman E, Lipton SA, Loring RH (1989): Selective modulation of NMDA responses by reduction and oxidation. *Neuron* 2, 1257–1263

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

Babior BM (1999): NADPH oxidase: an update. *Blood* 93, 1464–1476

Beckman JS, Koppenol WH (1996): Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am. J. Physiol.* 271, C1424-37

Beckman JS (2009): Understanding peroxynitrite biochemistry and its potential for treating human diseases. *Arch. Biochem. Biophys.* 484, 114–116

Bedard K, Krause K (2007): The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol. Rev.* 87, 245–313

Behl C, Moosmann B (2002): Oxidative nerve cell death in Alzheimer's disease and stroke: antioxidants as neuroprotective compounds. *Biol. Chem.* 383, 521–536

Belichenko PV, Wright EE, Belichenko NP, Masliah E, Li HH, Mobley WC, Francke U (2009): Widespread changes in dendritic and axonal morphology in Mecp2-mutant mouse models of Rett syndrome: evidence for disruption of neuronal networks. *J. Comp. Neurol.* 514, 240–258

Björnberg O, Ostergaard H, Winther JR (2006): Measuring intracellular redox conditions using GFP-based sensors. *Antioxid. Redox Signal.* 8, 354–361

Bokman SH, Ward WW (1981): Renaturation of Aequorea green-fluorescent protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 101, 1372–1380

Boveris A, Chance B (1973): The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem. J.* 134, 707–716

Boveris A, Cadenas E, Stoppani AO (1976): Role of ubiquinone in the mitochondrial generation of hydrogen peroxide. *Biochem. J.* 156, 435–444

- Brendel C, Belakhov V, Werner H, Wegener E, Gärtner J, Nudelman I, Baasov T, Huppke P (2011): Readthrough of nonsense mutations in Rett syndrome: evaluation of novel aminoglycosides and generation of a new mouse model. *J. Mol. Med.* 89, 389–398
- Brewer GJ (1997): Isolation and culture of adult rat hippocampal neurons. *J. Neurosci. Methods* 71, 143–155
- Brewer GJ, Torricelli JR, Evege EK, Price PJ (1993): Optimized survival of hippocampal neurons in B27-supplemented Neurobasal, a new serum-free medium combination. *J. Neurosci. Res.* 35, 567–576
- Brookes PS, Yoon Y, Robotham JL, Anders MW, Sheu S (2004): Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *Am. J. Physiol., Cell. Physiol.* 287, C817-33
- Buyse IM, Fang P, Hoon KT, Amir RE, Zoghbi HY, Roa BB (2000): Diagnostic testing for Rett syndrome by DHPLC and direct sequencing analysis of the MECP2 gene: identification of several novel mutations and polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* 67, 1428–1436
- Cadenas E, Davies KJ (2000): Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic. Biol. Med.* 29, 222–230
- Cannon MB, Remington SJ (2008): Redox-sensitive green fluorescent protein: probes for dynamic intracellular redox responses. A review. *Methods Mol. Biol.* 476, 51–65
- 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 STC, Qin J, Zoghbi HY (2008): MeCP2, a key contributor to neurological disease, activates and represses transcription. *Science* 320, 1224–1229
- Chalfie M (1995): Green fluorescent protein. *Photochem. Photobiol.* 62, 651–656
- Chan PH (1996): Role of oxidants in ischemic brain damage. *Stroke* 27, 1124–1129
- Chan PH (2001): Reactive oxygen radicals in signaling and damage in the ischemic brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 21, 2–14
- Chen Q (2003): Production of Reactive Oxygen Species by Mitochondria: Central Role of Complex III. *J. Biol. Chem.* 278, 36027–36031

- Chung HY, Baek BS, Song SH, Kim MS, Im Huh J, Shim KH, Kim KW, Lee KH (1997): Xanthine dehydrogenase/xanthine oxidase and oxidative stress. *Age* 20, 127–140
- Cleeter MW, Cooper JM, Darley-Usmar VM, Moncada S, Schapira AH (1994): Reversible inhibition of cytochrome c oxidase, the terminal enzyme of the mitochondrial respiratory chain, by nitric oxide. Implications for neurodegenerative diseases. *FEBS Lett.* 345, 50–54
- Coker SB, Melnyk AR (1991): Rett syndrome and mitochondrial enzyme deficiencies. *J. Child. Neurol.* 6, 164–166
- Cooper JM, Schapira AH (1997): Mitochondrial dysfunction in neurodegeneration. *J. Bioenerg. Biomembr.* 29, 175–183
- Cornford ME, Philippart M, Jacobs B, Scheibel AB, Vinters HV (1994): Neuropathology of Rett Syndrome: Case Report With Neuronal and Mitochondrial Abnormalities in the Brain. *J. Child. Neurol.* 9, 424–431
- Cotton NPJ, Clark AJ, Jackson JB (1981): The effect of venturicidin on light and oxygen-dependent electron transport, proton translocation, membrane potential development and ATP synthesis in intact cells of *Rhodospseudomonas capsulata*. *Arch. Microbiol.* 129, 94–99
- Dahl HH (1998): Getting to the nucleus of mitochondrial disorders: identification of respiratory chain-enzyme genes causing Leigh syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 63, 1594–1597
- Dean RT, Fu S, Stocker R, Davies MJ (1997): Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem. J.* 324, 1–18
- De Felice C, Ciccoli L, Leoncini S, Signorini C, Rossi M, Vannuccini L, Guazzi G, Latini G, Comporti M, Valacchi G et al. (2009): Systemic oxidative stress in classic Rett syndrome. *Free Radic. Biol. Med.* 47, 440–448
- Demchenko IT, Oury TD, Crapo JD, Piantadosi CA (2002): Regulation of the brain's vascular responses to oxygen. *Circ. Res.* 91, 1031–1037
- Denk W, Strickler JH, Webb WW (1990): Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science* 248, 73–76
- Dodd-o JM, Zheng G, Silverman HS, Lakatta EG, Ziegelstein RC (1997): Endothelium-independent relaxation of aortic rings by the nitric oxide synthase inhibitor diphenyleneiodonium. *Br. J. Pharmacol.* 120, 857–864

- Dooley CT, Dore TM, Hanson GT, Jackson WC, Remington SJ, Tsien RY (2004): Imaging dynamic redox changes in mammalian cells with green fluorescent protein indicators. *J. Biol. Chem.* 279, 22284–22293
- Dröge W (2002): Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* 82, 47–95
- Drummen GPC, van Liebergen LCM, Op den Kamp JAF, Post JA (2002): C11-BODIPY(581/591), an oxidation-sensitive fluorescent lipid peroxidation probe: (micro)spectroscopic characterization and validation of methodology. *Free Radic. Biol. Med.* 33, 473–490
- Eeg-Olofsson O, al-Zuhair AG, Teebi AS, Daoud AS, Zaki M, Bessiso MS, Al-Essa MM (1990): Rett syndrome: a mitochondrial disease? *J. Child. Neurol.* 5, 210–214
- Ellaway C, Williams K, Leonard H, Higgins G, Wilcken B, Christodoulou J (1999): Rett syndrome: randomized controlled trial of L-carnitine. *J. Child. Neurol.* 14, 162–167
- Erecińska M, Silver IA (1989): ATP and brain function. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 9, 2–19
- Finkel T (1998): Oxygen radicals and signaling. *Curr. Opin. Cell Biol.* 10, 248–253
- Fischer M, Reuter J, Gerich FJ, Hildebrandt B, Hägele S, Katschinski D, Müller M (2009): Enhanced hypoxia susceptibility in hippocampal slices from a mouse model of rett syndrome. *J. Neurophysiol.* 101, 1016–1032
- Foster KA, Galeffi F, Gerich FJ, Turner DA, Müller M (2006): Optical and pharmacological tools to investigate the role of mitochondria during oxidative stress and neurodegeneration. *Prog. Neurobiol.* 79, 136–171
- Freilinger M, Bebbington A, Lanator I, Klerk N de, Dunkler D, Seidl R, Leonard H, Ronen GM (2010): Survival with Rett syndrome: comparing Rett's original sample with data from the Australian Rett Syndrome Database. *Dev. Med. Child. Neurol.* 52, 962–965
- Funke F, Gerich FJ, Müller M (2011): Dynamic, semi-quantitative imaging of intracellular ROS levels and redox status in rat hippocampal neurons. *Neuroimage* 54, 2590–2602
- Gadalla KKE, Bailey MES, Cobb SR (2011): MeCP2 and Rett syndrome: reversibility and potential avenues for therapy. *Biochem. J.* 439, 1–14
- Gerich FJ, Funke F, Hildebrandt B, Fasshauer M, Müller M (2009): H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-mediated modulation of cytosolic signaling and organelle function in rat hippocampus. *Pflügers Arch.* 458, 937–952

- Gibson JH, Slobedman B, K N H, Williamson SL, Minchenko D, El-Osta A, Stern JL, Christodoulou J (2010): Downstream targets of methyl CpG binding protein 2 and their abnormal expression in the frontal cortex of the human Rett syndrome brain. *BMC Neurosci.* 11, 53
- Göppert-Mayer M (1931): Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen. *Ann. Phys.* 9, 273–94
- Gordeeva AV, Zvyagilskaya RA, Labas YA (2003): Cross-talk between reactive oxygen species and calcium in living cells. *Biochemistry. Mosc.* 68, 1077–1080
- Graubner B: ICD-10-GM 2012 Systematisches Verzeichnis: Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme, 10. Revision - German Modification Version 2012; Deutscher Ärzte-Verlag, Köln 2012
- Großer E, Hirt U, Janc OA, Menzfeld C, Fischer M, Kempkes B, Vogelgesang S, Manzke TU, Opitz L, Salinas-Riester G, Müller M (2012): Oxidative burden and mitochondrial dysfunction in a mouse model of Rett syndrome. *Neurobiol. Dis.* 48, 102–114
- 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
- Haas RH, Light M, Rice M, Barshop BA (1995): Oxidative metabolism in Rett syndrome: 1. Clinical studies. *Neuropediatrics.* 26, 90–94
- Haas RH, Rice MA, Trauner DA, Merritt TA (1986): Therapeutic effects of a ketogenic diet in Rett syndrome. *Am. J. Med. Genet. Suppl.* 1, 225–246
- Hagberg B (1985): Rett syndrome: Swedish approach to analysis of prevalence and cause. *Brain Dev.* 7, 276–280
- Hagberg B, Witt-Engerström I (1986): Rett syndrome: a suggested staging system for describing impairment profile with increasing age towards adolescence. *Am. J. Med. Genet. Suppl.* 1, 47–59
- 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
- Hagberg B, Goutières F, Hanefeld F, Rett A, Wilson J (1985): Rett syndrome: criteria for inclusion and exclusion. *Brain Dev.* 7, 372–373

- Halliwell B, Gutteridge JM (1984): Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.* 219, 1–14
- Hammarström AK, Gage PW (2000): Oxygen-sensing persistent sodium channels in rat hippocampus. *J. Physiol. (Lond.)* 529, 107–118
- Hanson GT, Aggeler R, Oglesbee D, Cannon M, Capaldi RA, Tsien RY, Remington SJ (2004): Investigating mitochondrial redox potential with redox-sensitive green fluorescent protein indicators. *J. Biol. Chem.* 279, 13044–13053
- Harrison R (2004): Physiological roles of xanthine oxidoreductase. *Drug Metab. Rev.* 36, 363–375
- Janc OA, Hirt U, Großer E, Menzfeld C, Müller M (2012). Radical scavengers improve cellular redox balance, hypoxia tolerance and synaptic plasticity in a mouse model of Rett syndrome; Poster Abstract: Neuroscience Meeting Planner. New Orleans, LA: Society for Neuroscience, 2012. Online. Program No. 246.04
- Janc OA, Hirt U, Großer E, Müller M (2013). Trolox treatment improves cellular redox balance, hypoxia tolerance and synaptic plasticity in a mouse model of Rett syndrome; Poster Abstract to be presented at the 10<sup>th</sup> Göttingen Meeting of the German Neuroscience Society. T 10-5 C
- Julu PO, Kerr AM, Apartopoulos F, Al-Rawas S, Engerström IW, Engerström L, Jamal GA, Hansen S (2001): Characterisation of breathing and associated central autonomic dysfunction in the Rett disorder. *Arch. Dis. Child.* 85, 29–37
- Kim TK, Eberwine JH (2010): Mammalian cell transfection: the present and the future. *Anal. Bioanal. Chem.* 397, 3173–3178
- 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 Suppl 1, 71–74
- Kong J, Xu Z (1998): Massive mitochondrial degeneration in motor neurons triggers the onset of amyotrophic lateral sclerosis in mice expressing a mutant SOD1. *J. Neurosci.* 18, 3241–3250
- Kron M, Müller M (2010): Impaired hippocampal Ca<sup>2+</sup> homeostasis and concomitant K<sup>+</sup> 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

Lipton SA, Choi YB, Pan ZH, Lei SZ, Chen HS, Sucher NJ, Loscalzo J, Singel DJ, Stamler JS (1993): A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. *Nature* 364, 626–632

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

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

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. (Lond.)* 587, 2473–2485

Moreira PI, Zhu X, Wang X, Lee H, Nunomura A, Petersen RB, Perry G, Smith MA (2010): Mitochondria: a therapeutic target in neurodegeneration. *Biochim. Biophys. Acta* 1802, 212–220

Müller W, Bittner K (2002): Differential oxidative modulation of voltage-dependent K<sup>+</sup> currents in rat hippocampal neurons. *J. Neurophysiol.* 87, 2990–2995

Percy AK (2002): Clinical trials and treatment prospects. *Ment. Retard. Dev. Disabil. Res. Rev.* 8, 106–111

Percy AK, Glaze DG, Schultz RJ, Zoghbi HY, Williamson D, Frost JD, Jankovic JJ, del Junco D, Skender M, Waring S (1994): Rett syndrome: controlled study of an oral opiate antagonist, naltrexone. *Ann. Neurol.* 35, 464–470

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

Ruch A, Kurczynski TW, Velasco ME (1989): Mitochondrial alterations in Rett syndrome. *Pediatr. Neurol.* 5, 320–323

Sah R, Galeffi F, Ahrens R, Jordan G, Schwartz-Bloom RD (2002): Modulation of the GABA<sub>A</sub>-gated chloride channel by reactive oxygen species. *J. Neurochem.* 80, 383–391

Schulz JB, Beal MF (1994): Mitochondrial dysfunction in movement disorders. *Curr. Opin. Neurol.* 7, 333–339

Segawa M, Nomura Y (2005): Rett syndrome. *Curr. Opin. Neurol.* 18, 97–104

- Shahbazian M, Young J, Yuva-Paylor L, Spencer C, Antalffy B, Noebels J, Armstrong D, Paylor R, Zoghbi H (2002): Mice with truncated MeCP2 recapitulate many Rett syndrome features and display hyperacetylation of histone H3. *Neuron* 35, 243–254
- Shimomura O, Johnson FH, Saiga Y (1962): Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J. Cell. Comp. Physiol.* 59, 223–239
- Sierra C, Vilaseca MA, Brandi N, Artuch R, Mira A, Nieto M, Pineda M (2001): Oxidative stress in Rett syndrome. *Brain Dev.* 23, 236–239
- Sies H (1993): Strategies of antioxidant defense. *Eur. J. Biochem.* 215, 213–219
- Simmons DL (2004): Cyclooxygenase Isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacol. Rev.* 56, 387–437
- Starkov AA, Fiskum G (2003): Regulation of brain mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production by membrane potential and NAD(P)H redox state. *J. Neurochem.* 86, 1101–1107
- Steffenburg U, Hagberg G, Hagberg B (2001): Epilepsy in a representative series of Rett syndrome. *Acta Paediatr.* 90, 34–39
- Stoppini L, Buchs PA, Muller D (1991): A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *J. Neurosci. Methods* 37, 173–182
- Stuehr DJ, Fasehun OA, Kwon NS, Gross SS, Gonzalez JA, Levi R, Nathan CF (1991): Inhibition of macrophage and endothelial cell nitric oxide synthase by diphenyleneiodonium and its analogs. *FASEB J.* 5, 98–103
- Trappe R, Laccone F, Cobilanschi J, Meins M, Huppke P, Hanefeld F, Engel W (2001): MECP2 mutations in sporadic cases of Rett syndrome are almost exclusively of paternal origin. *Am. J. Hum. Genet.* 68, 1093–1101
- Tsien RY (1998): The green fluorescent protein. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 509–544
- Turrens JF (1997): Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Biosci. Rep.* 17, 3–8
- Turrens JF (2003): Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J. Physiol. (Lond.)* 552, 335–344
- Turrens JF, Boveris A (1980): Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *Biochem. J.* 191, 421–427
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J (2007): Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 39, 44–84

Vergun O, Sobolevsky AI, Yelshansky MV, Keelan J, Khodorov BI, Duchen MR (2001): Exploration of the role of reactive oxygen species in glutamate neurotoxicity in rat hippocampal neurones in culture. *J. Physiol. (Lond.)* 531, 147–163

Villard L (2007): MECP2 mutations in males. *J. Med. Genet.* 44, 417–423

Watson CM, Pelka GJ, Radziewicz T, Shahbazian MD, Christodoulou J, Williamson SL, Tam PPL (2005): Reduced proportion of Purkinje cells expressing paternally derived mutant *Mecp2*<sup>308</sup> allele in female mouse cerebellum is not due to a skewed primary pattern of X-chromosome inactivation. *Hum. Mol. Genet.* 14, 1851–1861

Weaving LS, Williamson SL, Bennetts B, Davis M, Ellaway CJ, Leonard H, Thong M, Delatycki M, Thompson EM, Laing N et al. (2003): Effects of MECP2 mutation type, location and X-inactivation in modulating Rett syndrome phenotype. *Am. J. Med. Genet. A* 118, 103–114

## **Danksagung**

Ein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Michael Müller für die engagiert Betreuung und Förderung meiner Arbeit. Ohne seine fachliche Beratung und großartige Unterstützung wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Vielen Dank für die zahlreichen und wertvollen Anregungen bei der schriftlichen Ausarbeitung, die geduldige Beantwortung meiner Fragen sowie für die Korrektur dieser Arbeit.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei Belinda Kempkes bedanken, die mich in alle verwendeten Methoden eingearbeitet hat und mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand.

Insgesamt möchte ich mich bei der ganzen Arbeitsgruppe Müller und der Arbeitsgruppe Hülsmann für die tolle Zeit bedanken, die durch gemeinsames Fußballspielen, Kartfahren und schöne Oktoberfest-, Grill- und Halloween-Abende komplett abgerundet wurde.

Des Weiteren danke ich meinen Eltern, die mir das Studium ermöglicht und mich über die ganzen Jahre hinweg immer unterstützt haben.