

Aus dem Institut für Neuro- und Sinnesphysiologie
(Prof. Dr. rer. nat. S. O. Rizzoli)
im Zentrum Physiologie und Pathophysiologie
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Transgene Redoxindikator-Mäuse mit mitochondrialer
roGFP1-Expression: Phänotypisierung, neuronales
Verteilungsmuster und Sensorfunktionalität**

INAUGURAL-DISSERTATION

ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES

DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT DER

GEORG-AUGUST-UNIVERSITÄT ZU GÖTTINGEN

vorgelegt von

Kerstin Charlotte Wagener

aus

Gütersloh

Göttingen 2017

Dekan:	Prof. Dr. H. K. Kroemer
Referent:	Prof. Dr. M. Müller
Ko-Referent:	Prof. Dr. S. Jakobs
Drittreferentin:	Prof. Dr. M. Schön
Datum der mündlichen Prüfung:	6. Dezember 2017

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel „Transgene Redoxindikator-Mäuse mit mitochondrialer roGFP1-Expression: Phänotypisierung, neuronales Verteilungsmuster und Sensorfunktionalität“ eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den
.....
(Unterschrift)

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	III
Abkürzungsverzeichnis.....	IV
1 Einleitung	1
1.1 Reaktive Sauerstoff- und Stickstoffverbindungen.....	1
1.2 Antioxidantien.....	4
1.3 Redoxbalance und oxidativer Stress.....	7
1.4 Mitochondrien und ROS.....	10
1.5 Optische Redoxsensoren und roGFP1.....	11
1.6 Generierung der mitochondrialen Redoxindikator-Maus.....	15
1.7 Ziele der Arbeit.....	17
2 Material und Methoden	19
2.1 Die Mäuse.....	19
2.1.1 Herkunft und Zucht.....	19
2.1.2 Haltung und Pflege.....	19
2.1.3 Genotypisierung	20
2.2 Entwicklung und Verhalten.....	22
2.2.1 Gewicht und Größe	22
2.2.2 Rota-Rod®	22
2.2.3 Open-Field.....	23
2.2.4 Ganzkörperplethysmographie	24
2.3 Herstellung der Hirnpräparate	27
2.3.1 Präparation der akuten Hirnschnitte und Blutgewinnung	27
2.3.2 Herstellung und immunhistochemische Färbung der PFA-fixierten Hirnschnitte	28
2.3.3 Zellkulturen aus neonatalem Gewebe.....	29
2.4 Optische Messung zur Erfassung der Sensorfunktionalität	30
2.4.1 Theorie und Aufbau.....	30
2.4.2 Kalibrierung des roGFP1-Antwortbereichs.....	33
2.4.3 Applikation von Pharmaka	34
2.5 Optische Analyse des Expressionsmusters	34
2.5.1 Die klassische Fluoreszenzmikroskopie	34
2.5.2 Die 2-Photonen-Laser-Scanning-Mikroskopie.....	35
2.6 Zusammensetzung der Lösungen und verwendete Chemikalien	38
2.7 Statistik.....	39
3 Ergebnisse.....	41
3.1 Der roGFPm-Phänotyp	41
3.1.1 Allgemeine Entwicklung	41

3.1.2	Motoroordination und Explorationsverhalten	44
3.1.3	Plethysmographische Analysen	49
3.2	Das mitochondriale roGFP1-Expressionsmuster.....	50
3.3	Die Funktionalität des Redoxsensors.....	61
3.3.1	Kalibrierung des roGFPm-Antwortbereichs	61
3.3.2	Relatives Ausmaß der Oxidation	64
3.3.3	Quantifizierung des roGFPm-Oxidationszustandes	65
3.3.4	Modulation des mitochondrialen ROS-Levels	66
4	Diskussion.....	69
4.1	Phänotypische Merkmale der roGFPm-Maus	69
4.2	Das roGFPm-Expressionsmuster	73
4.3	Verifizierung der geeigneten Sensorfunktionalität	80
5	Zusammenfassung und Ausblick	84
6	Literaturverzeichnis	86

Abbildungsverzeichnis

1	Mitochondriale ROS-Produktion.....	2
2	Entstehungsweg der häufigsten ROS und RNS	4
3	Einige Vertreter des antioxidativen Schutzsystems.....	6
4	Das redoxensitive grün fluoreszierende Protein roGFP	13
5	Pränukleäre Mikroinjektion.....	17
6	Polymerase-Kettenreaktion.....	21
7	Gelelektrophorese.....	22
8	Das Rota-Rod®-Messsystem.....	23
9	Die Open-Field-Testung.....	24
10	Die Ganzkörperplethysmographie.....	26
11	Das Prinzip der immunhistochemischen Gegenfärbung	29
12	Fotografische Aufnahme des optischen Arbeitsplatzes	31
13	Schematischer Aufbau des CCD-Kamera-basierten optischen Messsystems.....	32
14	Prinzip der 1-Photon-Exzitation und der 2-Photonen-Exzitation im Vergleich	36
15	Schematischer Aufbau des 2-Photonen-Laser-Scanning-Mikroskops	38
16	Beurteilung des Allgemeinzustandes der Tiere	42
17	Blutwerte zum Zeitpunkt des finalen Experiments	44
18	Motorkoordination und motorisches Lernen.....	46
19	Explorationsverhalten der Mäuse im Open-Field	48
20	Analyse des Atemverhaltens	50
21	Rekonstruierter Sagittalschnitt eines adulten roGFPm-Weibchen (pd55)	52
22	RoGFP1-Expression des Hippokampus	54
23	Kortikale roGFP1-Expression.....	55
24	RoGFP1-Expressionsmuster im Kleinhirn	57
25	Nachweis der Mitochondrienspezifität	58
26	RoGFP1-Expression im Rückenmark.....	58
27	Fluoreszenzvergleich eines transgenen und eines WT-Tieres	60
28	Kalibrierung des roGFP1-Antwortbereichs für die untersuchten Hirnregionen.....	63
29	Die relative <i>Baseline</i> -Oxidation von mitochondrialem roGFP1.....	65
30	Mittlere Redoxpotentiale des mitochondrialen roGFP1	66
31	Pharmakologische ROS-Modulation.....	68
32	Hippokampale roGFPc- und roGFPm-Expression im Vergleich.....	75

Abkürzungsverzeichnis

ACSF	<i>artificial cerebrospinal fluid</i> , artifizielle zerebrospinale Flüssigkeit
AMV	Atemminutenvolumen
AOI	<i>area of interest</i>
ATP	Adenosintriphosphat
<i>Baseline</i>	Redox-Ruheniveau
Bp	Basenpaar(e)
BSA	bovines Serumalbumin
CA	<i>cornu ammonis</i> , Ammonshorn des Hippokampus
CCD-Kamera	<i>Charge-Coupled Device</i> - Kamera
ddH₂O	doppelt destilliertes Wasser
DEDTC	Diethyldithiocarbamat
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
DTT	1,4-Dithio-DL-threitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
FADH₂	Flavin-Adenin-Dinukleotid (reduziert)
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GSH / GSSG	Glutathion / Glutathiondisulfid
H⁺	Proton
H₂O	Wasser
H₂O₂	Wasserstoffperoxid
HyPer	<i>hydrogen peroxide-sensitive fluorescent sensor</i> , Wasserstoffperoxid-sensitiver Sensor
n	Anzahl der Experimente
NA	numerische Apertur
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (reduziert)
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotidphosphat (reduziert)
•NO	Stickstoffmonoxid
O₂	Sauerstoff

O₂^{•-}	Superoxid-Anion
•OH	Hydroxyl-Radikal
ONOO⁻	Peroxinitrit-Anion
p	Signifikanzwert
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i> , Phosphatgepufferte Salzlösung
pd	<i>postnatal day</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
RNS	reaktive Stickstoffspezies
roGFP1	<i>reduction / oxidation green fluorescent protein 1</i>
roGFPc	zytosolisches roGFP1
roGFPm	mitochondriales roGFP1
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rpm	<i>revolutions per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
rxYFP	redoxsensitives YFP
SOD	Superoxiddismutase
Thy1.2	<i>thymocyte differentiation antigen</i> , zellspezifisches Oberflächenantigen
TPLMS	<i>Two Photon Laser Scanning Microscopy</i>
WT	Wildtyp
wtGFP	Wildtypvariante des GFP
YFP	<i>yellow fluorescent protein</i>

1 Einleitung

1.1 Reaktive Sauerstoff- und Stickstoffverbindungen

Sauerstoff (O_2) ist ein elementarer Bestandteil unseres Lebens. Im Rahmen der Zellatmung ist er wesentlich an der Bereitstellung des biochemischen Energielieferanten Adenosintriphosphat (ATP) beteiligt und dient dadurch der Aufrechterhaltung des Stoffwechsels aller aeroben Organismen. Sauerstoff kann jedoch auch bestimmte reaktive Verbindungen eingehen, denen sowohl eine Vielzahl potentiell pathophysiologischer Eigenschaften als auch physiologische Signalfunktionen zugeschrieben werden. Ebendies gilt für Verbindungen des Stickstoffs. Unter diesen sogenannten reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und reaktiven Stickstoffspezies (RNS) werden eine Gruppe reaktionsfreudiger Derivate des Sauerstoffs bzw. Stickstoffs zusammengefasst, die bis zu einem gewissen Grad unter physiologischen Bedingungen kontinuierlich im Rahmen des zellulären Metabolismus anfallen (Valko et al. 2007). Meist handelt es sich dabei um freie Radikale, also Atome oder Moleküle, die ein oder mehrere ungepaarte Elektronen besitzen und deswegen danach streben, mit anderen chemischen Verbindungen zu reagieren und Elektronen aufzunehmen (Turrens 2003), wodurch sie reduziert und letztere oxidiert werden. Andere ROS bzw. RNS verfügen über stabile Elektronenkonfigurationen und sind somit keine Radikale im engeren Sinne, weisen aber ebenfalls oxidierende Eigenschaften auf und werden genauso zu den reaktiven Verbindungen gezählt. All diesen ROS und RNS ist gemeinsam, dass sie durch Oxidationsprozesse an zellulären Makromolekülen wie Lipiden, Proteinen oder Nukleinsäuren Zellschäden hervorrufen können und dadurch die Integrität und Funktionalität der Zelle gefährden (Valko et al. 2007).

Als eine der Hauptquellen der endogenen ROS-Produktion gelten die Mitochondrien (Boveris und Chance 1973; Valko et al. 2007). Diese Organellen beherbergen in ihrer inneren Phospholipidmembran die Komplexe der ATP- produzierenden Atmungskette, weshalb sie auch als Kraftwerke der Zelle bezeichnet werden (Abbildung 1A). Die Atmungskette besteht aus hintereinandergeschalteten Proteinkomplexen (I-IV), entlang derer Elektronen via Redoxreaktionen von den reduzierbaren/oxidierbaren (Redox)-Molekülen der Kette weiter transportiert werden und letztlich am Komplex IV in der mitochondrialen Matrix auf den finalen Elektronenakzeptor Sauerstoff übertragen werden, wodurch dieser zu Wasser (H_2O) reduziert wird. Die Elektronen werden dabei von den Reduktionsäquivalenten Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (NADH) und Flavin-Adenin-

Dinukleotid (FADH_2) bereitgestellt, die die Endprodukte energiegewinnender Stoffwechselwege wie der Glykolyse oder des Abbaus von Fettsäuren darstellen. Die Reduktion von Sauerstoff zu Wasser ist also in mehrere Teilschritte aufgeteilt. Die dabei schrittweise freiwerdende Energie ermöglicht einen Protonen (H^+)-Transport an Komplex I, III und IV und erzeugt einen transmembranösen elektrochemischen H^+ -Gradienten. An einem weiteren Komplex, der ATP-Synthase, folgen die Elektronen ihrem Konzentrationsgradienten und liefern dabei letztlich die Energie zur Synthese von ATP aus Adenosindiphosphat und anorganischem Phosphat (Abbildung 1B). Allerdings durchlaufen nicht alle Elektronen diese Transportkette vollständig. Durch ein sogenanntes „Elektronen-Leck“ an Komplex I und III können 1-3% der Elektronen entweichen und direkt mit Sauerstoff reagieren (Boveris und Chance 1973). Durch die univalente Reduktion (1-Elektron-Übertragung) des molekularen Sauerstoffs entsteht das Superoxid-Anion O_2^\bullet als primäre reaktive Sauerstoffverbindung (Abbildung 1B) und wird an Komplex I in die Matrix und an Komplex III zu gleichen Teilen in die Matrix und in den Intermembranraum abgegeben (Brand 2010).

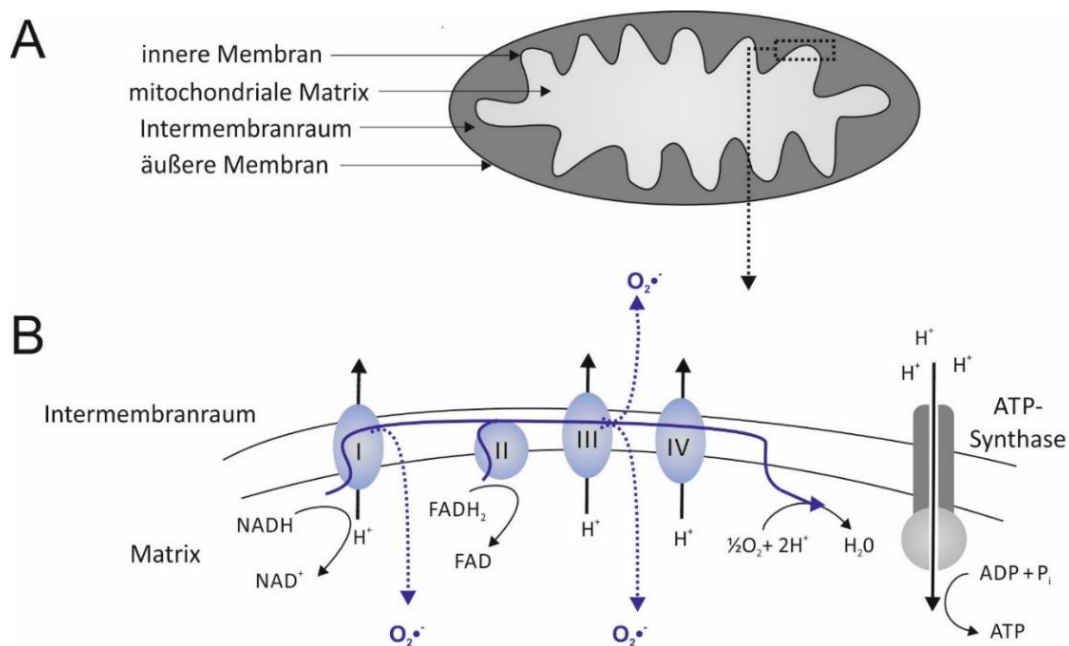


Abbildung 1: Mitochondriale ROS-Produktion

(A) Membranverhältnisse und Kompartimente eines Mitochondriums. (B) Vereinfachte Darstellung der Elektronentransportkette in der inneren Mitochondrienmembran. Der blaue Pfeil gibt den Weg der Elektronen wieder. 1-3% der Elektronen entweichen an Komplex I und III (gestrichelter Pfeil) und generieren Superoxid-Anionen (O_2^\bullet) anstatt zur kontrollierten Reduktion des Sauerstoffs (O_2) zu Wasser (H_2O) an Komplex IV beizutragen. NADH/NAD^+ : Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (reduziert/oxidiert); FADH_2/FAD : Flavin-Adenin-Dinukleotid (reduziert/oxidiert); H^+ : Proton; ADP/ATP : Adenosindi- bzw. Adenosintriphosphat; P_i : *inorganic phosphate*, anorganisches Phosphat.

Das Superoxid-Anion $O_2^{\bullet-}$ stellt das Ausgangsprodukt für die Synthese einer Reihe weiterer ROS dar. So wird das reaktionsfreudige $O_2^{\bullet-}$ rasch unter Anlagerung von zwei Protonen spontan oder durch das Enzym Superoxiddismutase (SOD) zu Wasserstoffperoxid (H_2O_2) reduziert. H_2O_2 verfügt über eine stabile Elektronenkonfiguration und zählt deswegen zu den nicht-radikalischen ROS. Dennoch gilt es als relativ reaktionsfreudig und reagiert in der metallkatalysierten Fenton-Reaktion in Anwesenheit von Eisenionen weiter zu dem hochreaktiven und aggressiven Hydroxyl-Radikal $\bullet OH$ (Boveris und Chance 1973; Milton und Sweeney 2012). Mit einem Redoxpotential von +185 mV gilt dieses als extrem starkes Oxidationsmittel, das mit einer Halbwertszeit von 10^{-9} s äußerst kurzlebig und radikal in biologischen Systemen mit nahezu allen umgebenden Makromolekülen reagiert und so zu vielfältigen Zellschäden führt (Valko et al. 2007). Begünstigt wird die Fenton-Reaktion durch die räumliche Nähe der Superoxid-Anion-Produktion und der in den Komplexen der Atmungskette gelegenen Eisenkomplexe (Cadenas und Davies 2000).

85% aller ROS fallen auf diese Weise als Nebenprodukt der Zellatmung in den Mitochondrien an (Boveris und Chance 1973; Milton und Sweeney 2012). Aber auch extramitochondrial werden reaktive Sauerstoffspezies generiert. Beispielsweise phagozytieren Zellen des Immunsystems, wie neutrophile Granulozyten und Makrophagen, Bakterien und Viren und bilden durch das Enzym NADPH-Oxidase Superoxid-Anionen, um die aufgenommenen Keime zu zersetzen und unschädlich zu machen (Bedard und Krause 2007). In nicht-phagozytierenden Zellen produziert die NADPH-Oxidase ebenfalls reaktive Verbindungen, die dort unter anderem an der Regulation des Blutdrucks und der Proteinbiosynthese beteiligt sind (Bedard und Krause 2007). Auch beim Purinabbau durch die Xanthinoxidase (Nathan und Ding 2010) und bei der Entgiftung toxischer Substanzen durch Cytochrom P450-Enzyme verarbeiten die Enzyme Sauerstoff, und es entstehen kontinuierlich reaktive Verbindungen (Milton und Sweeney 2012).

Neben reaktiven Sauerstoffspezies gibt es auch die bereits erwähnten reaktiven Verbindungen des Stickstoffs (RNS). Die in zahlreichen Geweben vorkommende Stickstoffmonoxid-Synthase katalysiert die Reaktion der Aminosäure L-Arginin zu L-Citrullin und Stickstoffmonoxid ($\bullet NO$). $\bullet NO$ gilt als wichtiges Signalprotein in diversen physiologischen Prozessen, wie beispielsweise der Neurotransmission, der Hämodynamik oder der Immunabwehr. Im Rahmen entzündlicher Prozesse entsteht in Abwehrzellen aus $\bullet NO$ und $O_2^{\bullet-}$ das radikale Peroxinitrit-Anion ($ONOO^{\bullet}$), welches als potentes Oxidationsmittel ebenfalls der Abwehr von Pathogenen dient, während es auf zellulärer Ebene, ähnlich wie das Hydroxyl-Radikal, zu Schäden von Makromolekülen führen kann (Halliwell 2006).

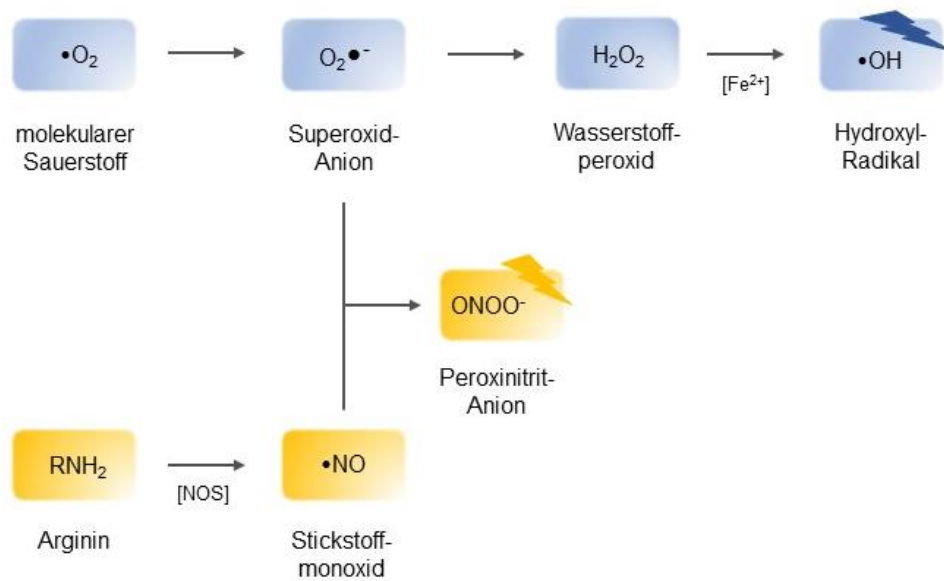


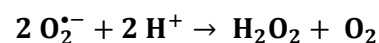
Abbildung 2: Entstehungsweg der häufigsten ROS und RNS

Ausgehend von molekularem Sauerstoff (O_2) entstehen folgende, zunehmend reduzierte, reaktive Derivate des Sauerstoffs (blau): Superoxid-Anion ($\text{O}_2\bullet^-$), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und das Hydroxyl-Radikal ($\bullet\text{OH}$) als reaktivste Form. ROS- und RNS-Stoffwechsel sind über die Bildung des Peroxinitrit-Anions (ONOO^-) aus Stickstoffmonoxid ($\bullet\text{NO}$) und dem Superoxid-Anion miteinander verknüpft. Das Peroxinitrit-Anion verfügt, wie das Hydroxyl-Radikal, über eine besonders ausgeprägte Oxidationskraft (Blitze) und gilt als äußerst zellschädigend. Die reaktiven Stickstoffspezies sind gelb dargestellt. NOS: Stickstoffmonoxid-Synthase.

1.2 Antioxidantien

ROS und RNS sind zelleigene Oxidantien. Aufgrund ihres radikalischen Charakters sind sie in der Lage, Strukturen, wie Lipide, Proteine und Desoxyribonukleinsäuren (*desoxyribonucleic acid*, DNA) zu oxidieren und dadurch zu schädigen. Aus diesem Grund hat die Zelle eine Reihe enzymatischer und nicht-enzymatischer Schutzmechanismen entwickelt, die einer übermäßigen ROS/RNS-Produktion entgegenwirken und als Antioxidantien bezeichnet werden (Abbildung 3).

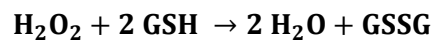
Hauptvertreter der enzymatischen Antioxidantien sind die Superoxiddismutase, die Katalase und die Glutathion-Peroxidase. Die Superoxiddismutase katalysiert die Umwandlung des instabilen $\text{O}_2\bullet^-$ zum stabileren und deswegen weniger aggressiven H_2O_2 .



[Formel 1]

Dieses kann in einer sich anschließenden enzymatischen Reaktion durch die Katalase zu Sauerstoff und Wasser abgebaut werden (Milton und Sweeney 2012). Die Beseitigung der $O_2\cdot^-$ durch die Superoxiddismutase bedingt zudem, dass weniger $O_2\cdot^-$ zur Verfügung stehen, um mit Stickstoffmonoxid zum hochreaktiven Peroxinitrit-Anion zu reagieren (Nathan und Ding 2010). Außerdem greift $O_2\cdot^-$ bevorzugt Proteine mit einem FE-S-Cluster an und entlässt Eisenionen, die dann wiederum für die Fenton-Reaktion zur Verfügung stehen. Die Reaktion der SOD und der zunehmende Abbau des $O_2\cdot^-$ verringern also die Bildung von Hydroxyl-Radikalen im Rahmen der Fenton-Reaktion (Halliwell 2006; Valko et al. 2007) (Abbildung 3).

Neben der Katalase ist auch die Glutathion-Peroxidase am Abbau des H_2O_2 beteiligt. Sie katalysiert die Reduktion von H_2O_2 zu H_2O unter Verwendung des Kofaktors Glutathion (GSH) als Reduktionsmittel (Mills 1957). Glutathion ist ein Tripeptid aus den Aminosäuren Glutaminsäure, Glycin und Cystein, wobei letztere über eine Thiolgruppe (R-SH) verfügt, die als Elektronen- bzw. Wasserstoffüberträger fungiert und reversibel oxidiert bzw. reduziert werden kann. Wird Glutathion oxidiert, bilden die Thiolgruppen zweier GSH-Monomere eine Disulfidbrücke aus, sodass entsprechend der folgenden Gleichung ein Glutathion-Dipeptid (GSSG) entsteht.



[Formel 2]

Durch die Oxidation des Glutathions wird das potentiell schädliche Oxidans, in diesem Fall das Wasserstoffperoxid, reduziert und dadurch neutralisiert. Unter Zuhilfenahme von Nicotinamid-Adenin-Dinukleotidphosphat (NADPH) als Elektronendonator reduziert die Glutathion-Reduktase das oxidierte GSSG dann wieder zu zwei reduzierten GSH-Monomeren (Abbildung 3). Das Verhältnis von oxidiertem zu reduziertem Glutathion (GSSG/2GSH) ist nicht nur eines der wichtigsten Puffersysteme der Zelle, es dient auch als Indikator für den Redoxzustand der Zelle oder eines bestimmten Kompartiments (Meyer und Dick 2010).

Neben diesen antioxidativen Enzymen gibt es eine Reihe nicht-enzymatischer Moleküle, die einer übermäßigen ROS-Produktion entgegenwirken. Sie funktionieren nach dem Prinzip, dass sie selber bevorzugt durch ROS oxidiert werden und dadurch andere biologische Makromoleküle mit vielfältigen integrativen Funktionen vor der Oxidation bewahren (Halliwell 2006). Zu den endogenen Antioxidantien gehört das bereits erwähnte niedermolekulare Tripeptid Glutathion, das die Grundlage des Glutathion-Redoxsystems

darstellt. Bisweilen werden auch das Eisenspeichermolekül Ferritin und das Transportprotein Transferrin zu den Antioxidantien gezählt. Sie binden die für die Fenton-Reaktion notwendigen Eisenionen und unterbinden dadurch die Bildung von Hydroxyl-Radikalen (Halliwell 2006). Daneben existieren Antioxidantien, die dem Körper mit der Nahrung zugeführt werden müssen und deswegen als exogen bezeichnet werden. α -Tocopherol (Vitamin E) wirkt beispielsweise der Oxidation von Lipiden entgegen, während Ascorbinsäure (Vitamin C) unter anderem Superoxid-Anionen und Hydroxyl-Radikale entgiftet (Abbildung 3). Die durch die Oxidation aus α -Tocopherol und Ascorbinsäure entstehenden Radikale gelten ihrerseits als sehr reaktionsträge, sodass sie selber nicht weiter reagieren und dadurch die radikalische Kettenreaktion unterbrechen (Halliwell 2006). Weitere nennenswerte Radikalfänger sind Beta-Carotine, Harnsäure und Melatonin (Milton und Sweeney 2012).

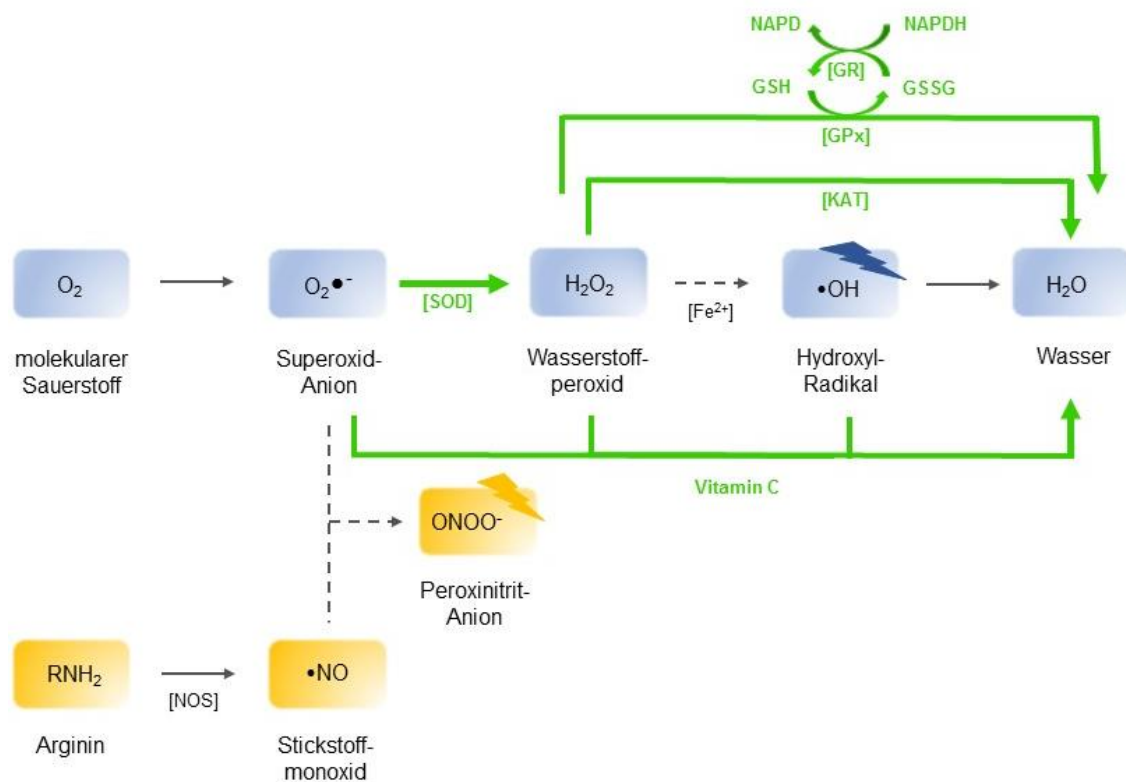


Abbildung 3: Einige Vertreter des antioxidativen Schutzsystems

Das antioxidative Schutzsystem ist grün dargestellt und führt zur Neutralisierung der ROS (blau) und RNS (gelb). Enzymatische Vertreter des antioxidativen Schutzsystems sind die Superoxiddismutase (SOD), die Katalase (KAT) und die Glutathion-Peroxidase (GPx). Daneben wirken das Tripeptid Glutathion (GSH) und Vitamin C den reaktiven Verbindungen entgegen. Die gestrichelten Pfeile markieren vermindert ablaufende Reaktionsschritte. NOS: Stickstoffmonoxid-Synthase.

1.3 Redoxbalance und oxidativer Stress

Besteht ein ausgeglichenes Verhältnis zwischen pro- und antioxidativen Einflüssen auf die Zelle, spricht man von Redoxbalance. Alle produzierten ROS und RNS können durch die antioxidativen Schutzmechanismen in ihren physiologischen Grenzen gehalten werden (Dröge 2002; Sinha et al. 2013; Valko et al. 2007). Die Aufrechterhaltung dieses ausgeglichenen Redoxstatus ist essentiell für die Physiologie der Zelle, da zahlreiche Stoffwechselwege und Zellfunktionen auf dem fein regulierten Zusammenspiel von Oxidation und Reduktion basieren.

Lange wurden ROS und RNS auf ihre schädliche Wirkung als zelluläre Oxidantien reduziert. Zunehmend verfestigt sich jedoch die Annahme, dass sie in Maßen, also in dem Zustand der Redoxbalance, durchaus einen wesentlichen Nutzen für den Organismus aufweisen. Neben der oben erwähnten Abwehrfunktion durch die Superoxid-Anionen in den Makrophagen und neutrophilen Granulozyten oder der Regulation des Gefäßtonus und des Blutdrucks durch Stickstoffmonoxid, werden den reaktiven Verbindungen immer mehr wichtige Signal- und Botenstofffunktionen zugesprochen (Dröge 2002; Valko et al. 2007). Beispielsweise konnte für das bakterielle Protein OxyR an *Escherichia coli* - und *Salmonella typhimurium* - Stämmen gezeigt werden, dass es im oxidierten Zustand die Genexpression von mindestens neun antioxidativen Enzymen induziert, darunter die der Katalase und der Glutathion-Peroxidase. Auf diese Weise aktivieren ROS und RNS das antioxidative Schutzsystem und kontrollieren ihre eigene zelluläre Konzentration (Dröge 2002; Storz und Tartaglia 1992). Ähnliches gilt für Stickstoffmonoxid. Über einen negativen Rückkopplungsmechanismus hemmt es die Stickstoffmonoxid-Synthase und übt dadurch eine Signalfunktion zur Erhaltung der zellulären Redoxbalance aus (Dröge 2002).

Der positive Effekt der reaktiven Spezies beschränkt sich allerdings nicht auf die In-schachhaltung ihrer eigenen Konzentration. Vielmehr wird angenommen, dass mehrere hundert verschiedene Proteine über redox-sensitive Cysteinreste verfügen und in ihrer Enzymaktivität einer ROS/RNS-vermittelten Modulation zugänglich sind (Finkel 2011; Weerapana et al. 2010). Als ein solches Beispiel können die Tyrosinkinase genannt werden. Bei ihnen handelt es sich um transmembranöse Rezeptormoleküle, die am Anfang unterschiedlicher Signalwege der Zelldifferenzierung und Zellproliferation stehen. Binden spezifische Wachstumsfaktoren an ihre extrazelluläre Domäne, wird eine intrazelluläre Domäne phosphoryliert und eine Kaskade, beispielsweise die sogenannte MAP-Kinase-Kaskade, in Gang gesetzt, an deren Ende sich die Phosphorylierung und Aktivierung spezifischer Transkriptionsfaktoren befindet (Valko et al. 2007). Eine spezifische Tyrosin-Phosphatase wiederum unterbindet den Ablauf der Signalkaskade, indem sie die

Tyrosinkinase dephosphoryliert und dadurch inaktiviert. Diese Phosphatase verfügt über ein Cysteinpaar in ihrem aktiven Zentrum, das durch ROS oxidiert werden kann. Durch Oxidation wird die Phosphatase inaktiviert, die Tyrosinkinase bleibt aktiviert und der Signalweg läuft verstärkt ab (Salmeen und Barford 2005). Des Weiteren wurde beobachtet, dass die Aktivierung dieses Signalwegs durch Wachstumsfaktoren einen initialen intrazellulären ROS-Anstieg hervorruft (Thannickal und Fanburg 2000). Die reaktiven Verbindungen scheinen demnach zum einen für die Funktionalität der Signalkaskade benötigt zu werden, zum anderen modulieren sie über die Oxidation der Phosphatase deren Aktivität.

Ein weiteres Beispiel für ROS-modulierte Signalwege stellt die Autophagie dar. Sie beschreibt einen intrazellulären Reinigungsprozess, der zur kontrollierten Beseitigung defekter Zellbestandteile führt. Dabei werden beispielsweise beschädigte Organellen oder fehlgefaltete Proteine von einer Vakuole umschlossen, um mit einem Lysosom zum sogenannten Autophagolysosom zu fusionieren, in dem sie schließlich abgebaut und ihre Bestandteile regeneriert werden. Aktiviert wird diese Form der zellulären Qualitätskontrolle durch die Oxidation des Enzyms Atg4 durch H_2O_2 (Bolisetty und Jaimes 2013). Auch in diesem Fall sind ROS entscheidend an der Aufrechterhaltung der physiologischen Zellhomöostase beteiligt.

Auch bei der Einleitung der Apoptose, dem kontrollierten Zelltod, der der Zelldifferenzierung oder der Elimination mutierter Zellen dient, spielen reaktive Verbindungen eine wichtige Rolle. Die Oxidation des redoxsensitiven Enzyms p66^{shc} führt zur Bildung von H_2O_2 in den Mitochondrien, welches wiederum die Membranpermeabilität erhöht und den Zelltod induziert (Giorgio et al. 2005).

Darüber hinaus wird angenommen, dass ROS und RNS einen Einfluss auf die Entwicklung und Verknüpfung neuronaler Synapsen, Lern- und Gedächtnisprozesse (Milton und Sweeney 2012) sowie die zirkadiane Rhythmik (Finkel 2011) ausüben.

Übersteigt die Produktion der ROS und RNS nun jedoch die Kapazität der antioxidativen Abwehr, spricht man von oxidativem bzw. nitrosativem Stress (Milton und Sweeney 2012; Rahman et al. 2012). Die übermäßige Oxidation durch reaktive Verbindungen kann nicht mehr ausreichend kompensiert werden, und es kommt zur Akkumulation oxidativer Zellschäden.

An Lipiden greifen Radikale die Methylengruppen mehrfach ungesättigter Fettsäuren der Membran an und setzen über die Bildung von Lipidperoxyradikalen und Lipidperoxiden

eine Kettenreaktion in Gang, die letztendlich zum Verlust der Membranintegrität der Zelle führt (Halliwell 2006).

Durch Oxidationsprozesse an Nukleinsäuren kann es zu Veränderungen der Pyrimidin- und Purinbasen und zur Schädigung des Desoxyribose-Gerüsts kommen, wodurch Doppelstrangbrüche, Mutationen und chromosomale Veränderungen hervorgerufen werden (Weitzman et al. 1994). Zudem verändern ROS und RNS das Methylierungsmuster der DNA als Teil des epigenetischen Codes, sodass die Regulation der Genexpression gestört wird (Holliday 1987). Kommt es zur Akkumulation dieser DNA-Modifikationen, begünstigen sie die maligne Entartung der Zelle und dadurch die Entstehung von Krebs (Weitzman et al. 1994).

Auch Proteine werden durch oxidativen Stress geschädigt. Vorrangig Hydroxyl-Radikale greifen die Peptidbindungen von Proteinen oxidativ an und induzieren die Fragmentierung der Polypeptidstränge (Berlett und Stadtman 1997). Die Oxidation von Aminosäureseitenketten führt unter anderem zur Bildung von Dityrosin aus zwei Tyrosin-Molekülen und zum Knüpfen von Disulfidverbindungen zwischen den Thiolgruppen zweier Cysteine (Milton und Sweeney 2012). Durch diese intramolekularen Verknüpfungen wird die Tertiärstruktur und folglich die Protein- bzw. Enzymfunktion entweder im Sinne eines *loss-* oder eines *gain-of-function* (Funktionsverlust oder Funktionsgewinn) modifiziert. Zudem entstehen durch intermolekulare Quervernetzungen benachbarter Proteine hochmolekulare Aggregate, die nicht mehr durch das Proteasom abgebaut werden können, sich in der Zelle anreichern und dadurch deren Funktionalität beeinträchtigen (Berlett und Stadtman 1997).

Die Akkumulation dieser Zellschäden begünstigt die Entstehung zahlreicher Erkrankungen, wie beispielsweise Arteriosklerose, Diabetes mellitus, Krebs, Trübungen der Augenlinse, Rheuma, Fertilitätsstörungen, Nierenleiden und unterschiedliche Hauterkrankungen (Rahman et al. 2012). Auch den Alterungsprozess sollen die im Laufe des Lebens akkumulierenden oxidativen Schäden wesentlich mit bedingen (Harman 1956; Valko et al. 2007). Daneben existiert eine enge Assoziation zwischen erhöhten ROS- und RNS-Spiegeln und dem Auftreten neurodegenerativer Erkrankungen wie Morbus Parkinson, Morbus Alzheimer und der Amyotrophischen Lateralsklerose (Andersen 2004). Dabei wird die besondere Vulnerabilität des Nervengewebes gegenüber oxidativem Stress zum einen durch die unzureichende Fähigkeit der Neurone zur Regeneration und zum anderen durch deren hohe Stoffwechselaktivität und die damit verbundene erhöhte endogene ROS-Produktion erklärt (Andersen 2004; Milton und Sweeney 2012). Auch das Rett-Syndrom, eine neuronale Entwicklungsstörung bei Mädchen, die durch eine Mutation des x-chromosomalen Methyl-CpG-Bindeprotein 2 (*MECP2*) - Gens hervorgerufen wird, wird

mit oxidativem Stress in Zusammenhang gebracht (Müller und Can 2014; Sierra et al. 2001). An einem Mausmodell für das Rett-Syndrom konnten von unserer Arbeitsgruppe erhöhte zelluläre ROS-Level nachgewiesen werden (Großer et al. 2012), weshalb auch dort eine Dysregulation der Redoxbalance an der Pathogenese beteiligt zu sein scheint. Welche Rolle oxidativer Stress genau in der Pathogenese dieser zahlreichen Krankheitsbilder spielt, ist im Detail jedoch noch nicht geklärt.

1.4 Mitochondrien und ROS

Wie oben bereits erwähnt, gelten die Mitochondrien als wichtige Quelle der zellulären ROS-Produktion. Ein Großteil der reaktiven Verbindungen wird an den Atmungskettenkomplexen I und III als Superoxid-Anion in die mitochondriale Matrix und an Komplex III zusätzlich in den Intermembranraum abgegeben, sodass die $O_2^{\bullet-}$ -Konzentration intramitochondrial etwa fünf- bis zehnfach höher ist, als im Zytosol der Zellen (Cadenas und Davies 2000). Die mitochondriale DNA (mtDNA) liegt frei in der Matrix der Mitochondrien und ist im Gegensatz zu der nukleären DNA weder durch einen Kern noch durch Histone geschützt. Durch die räumliche Nähe zu den an der inneren Mitochondrienmembran produzierten ROS ist sie dadurch besonders anfällig für oxidative Schäden (Cadenas und Davies 2000). Da die mtDNA für einige mitochondriale Proteine, wie beispielsweise Bestandteile der Atmungskette, codiert, können sich Schäden am mitochondrialen Erbgut direkt auf die Funktionalität des Mitochondriums und dadurch auch auf die ROS-Produktion auswirken. Zudem stehen die in den Mitochondrien gebildeten ROS direkt mit dem Zytosol in Verbindung. Das Wasserstoffperoxid, das aus der Dismutation der Superoxid-Anionen entsteht, kann durch die Zellmembran diffundieren und stellt damit die direkte Kopplung von mitochondrialem und zytosolischem Redoxstatus dar (Brand 2010).

In dem bereits erwähnten Mausmodell für das Rett-Syndrom konnte eine erhöhte ROS-Konzentration in den Mitochondrien der erkrankten Mäuse nachgewiesen werden. Als Ursache wird ein Protonenleck an der Atmungskette vermutet, das den elektrochemischen Protonengradienten verringert. Die Atmungskette muss zur ausreichenden ATP-Produktion kompensatorisch hochreguliert werden, und mehr ROS werden gebildet (Großer et al. 2012). Dysfunktionale Mitochondrien und eine erhöhte ROS-Produktion scheinen demnach miteinander einherzugehen. Neben dem Rett-Syndrom werden sie für diverse weitere neurodegenerative Erkrankungen sowie den Alterungsprozess der Neurone verantwortlich gemacht (Beal 1998; Cadenas und Davies 2000). In der Pathogenese des Morbus Parkinson wird zum Beispiel ein Defekt des Atmungskettenkomplexes I

angenommen (Schulz und Beal 1994) und auch beim Morbus Alzheimer scheinen dysfunktionale Mitochondrien und erhöhte ROS-Level eine Rolle zu spielen (Behl und Moosmann 2002).

1.5 Optische Redoxsensoren und roGFP1

Um das komplexe Zusammenspiel sowohl der Redoxsysteme untereinander als auch deren Einfluss auf die Zellfunktion besser untersuchen zu können, ist die Entwicklung zuverlässiger optischer Redoxsensoren unerlässlich. In der Vergangenheit wurden bereits unterschiedliche Methoden entwickelt, die hier kurz vorgestellt werden sollen.

Eine Möglichkeit zur Messung des Redoxstatus stellt die direkte Quantifizierung von Glutathion, Thioredoxin, NADPH oder Ascorbinsäure mittels enzymatischer Assays oder Gel-Trennverfahren dar. Um die Redoxpaare zu isolieren, müssen die Zellen jedoch zerstört werden. Anstelle einer dynamischen *in vivo* -Messung der Redoxsysteme, ist demnach nur eine Momentaufnahme der Puffersysteme möglich. Zudem kommt es im Rahmen der Präparation zu Artefakten durch Oxidationsprozesse. Auch eine kompartiment- oder zellspezifische Messung ist durch die Zerstörung der Zellen nicht mehr möglich (Meyer und Dick 2010).

Um an lebenden Zellen Redoxmessungen durchführen zu können, wurden zunehmend fluoreszierende Farbstoffe als Sensoren eingesetzt. Dichlorodihydrofluorescein akkumuliert beispielsweise im Zytosol der Zelle (LeBel et al. 1992), während Dihydrorhodamin 123 sich speziell in den Mitochondrien anreichert (Dugan et al. 1995). Die Oxidation der Farbstoffe führt zu einem messbaren Fluoreszenzsignal und ermöglicht dadurch eine optische Darstellung des Redoxstatus. Allerdings sind die Anwendungsmöglichkeiten dieser Redoxsensoren deutlich begrenzt. Sind die Farbstoffe einmal oxidiert, bleibt das Fluoreszenzsignal irreversibel erhöht, sodass keine dynamischen Messungen möglich sind. Zudem sind die Farbsensoren besonders störanfällig gegenüber autooxidativen und phototoxischen Einflüssen und können nur oxidierende, nicht aber reduzierende Veränderungen detektieren (Funke et al. 2011; Meyer und Dick 2010).

Als Methode erster Wahl gilt heute die Fluoreszenzprotein-basierte Redoxmessung, die viele dieser Limitationen zu umgehen vermag. 1962 gelang es Shimomura und Kollegen ein grün fluoreszierendes Protein (*green fluorescent protein*, GFP) aus der Qualle *Aequorea victoria* zu isolieren. Die Wildtypvariante des GFP (wtGFP) ist ein 27 kDa großes zylindrisches Protein, in dessen Zentrum sich ein Chromophor befindet. Dabei handelt es sich um den Teil des Proteins, der das Fluoreszenzsignal aussendet. Das Prinzip der Fluoreszenz basiert

darauf, dass Materie Photonen von Licht einer bestimmten Wellenlänge absorbiert und dadurch (optisch) angeregt wird, um anschließend spontan auf den energetischen Grundzustand zurückzufallen und dabei Licht in Form des Fluoreszenzsignals zu emittieren. Dabei ist das Fluoreszenzlicht im Vergleich zum Anregungslicht in der Regel in den langwelligeren Spektralbereich verschoben, ist also energieärmer. Das wtGFP verfügt über zwei Absorptionsmaxima von 395 nm und 470 nm sowie ein Emissionsmaximum bei 509 nm (Hanson et al. 2004).

Da es sich beim GFP um ein Protein handelt, kann die entsprechende codierende Gensequenz in das Genom der zu untersuchenden Zellen integriert und durch die dortige Proteinbiosynthese exprimiert werden. Spezifische Promotoren ermöglichen die gezielte Expression in bestimmten Zelltypen und Signalpeptidsequenzen den posttranslationalen Transport des exprimierten Proteins in bestimmte Kompartimente. Zudem gilt GFP als besonders stabil gegenüber Proteasen. Dadurch wurde es zu einem zuverlässigen Werkzeug zum Nachweis von Genexpression und Proteinlokalisierung oder zur farblichen Darstellung bestimmter molekularer Strukturen (Hanson et al. 2004).

Ausgehend von diesem wtGFP wurden diverse Abkömmlinge generiert, die über modifizierte Fluoreszenzeigenschaften verfügen. Um ein deutlich stärkeres Fluoreszenzsignal zu erzielen, wurde beispielsweise die Mutation S65T, die zu einem Aminosäureaustausch von Serin durch Threonin an Position 65 führt, in das GFP-Gerüst eingefügt und dadurch das sogenannte *enhanced* GFP (EGFP) erzeugt (Heim et al. 1995). Das gelb fluoreszierende Protein (*yellow fluorescent protein*, YFP) dagegen weist nur noch ein Anregungs- und ein Emissionsmaximum auf, fluoresziert dafür aber wie der Name schon vermuten lässt, im gelben Spektralbereich (Wachter et al. 1998).

Der Arbeitsgruppe um J.S. Remington gelang es schließlich eine redox-sensitive Variante des Proteins zu generieren (Abbildung 4). Dazu ersetzten sie zwei exponiert gelegene Aminosäurereste (Glutaminsäure an Position 204 und Serin an Position 147) durch zwei Cysteine. Durch Oxidation der Thiolgruppen der beiden Cysteine kommt es zur Bildung einer intramolekularen Disulfidbrücke (S-S), die durch Reduktion wieder gelöst werden kann (Abbildung 4B). Durch Einfügen dieses „Thiolschalters“ wurde aus dem wtGFP das redox-sensitive grün fluoreszierende Protein roGFP1 (Dooley et al. 2004; Hanson et al. 2004).

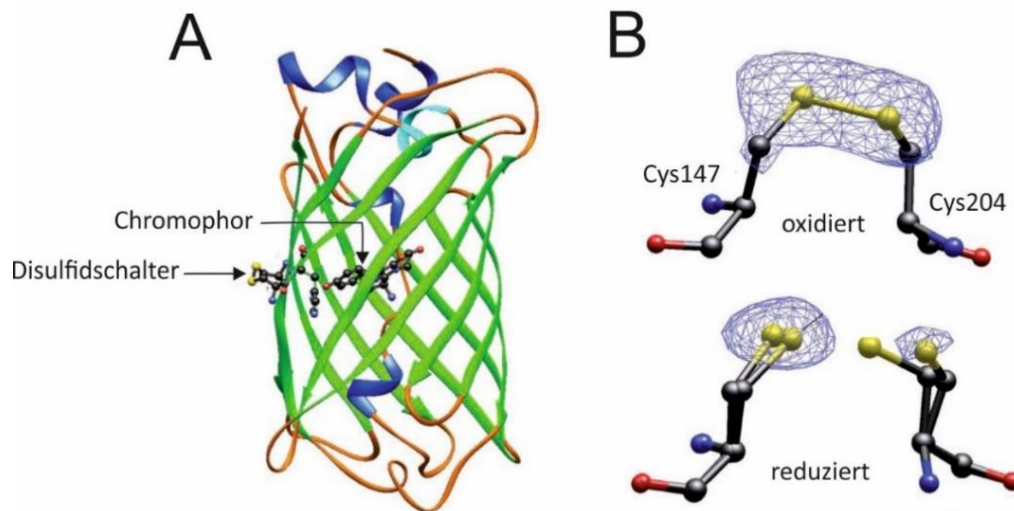


Abbildung 4: Das redoxensitive grün fluoreszierende Protein roGFP

(A) Elf β -Faltblattstrukturen (grün) bilden das zylindrische Gerüst des Proteins in dessen Zentrum sich eine α -Helix (blau) und das Chromophor befinden. Der Aminosäureaustausch Q204C/S147C erfolgte in zwei dem Chromophor räumlich benachbarten β -Faltblattstrukturen. (B) Vergrößerte Darstellung des „Disulfidschalters“: Durch Oxidation bilden die beiden Cysteinreste eine Disulfidverbindung aus, die reversibel wieder reduziert werden kann. Abbildung modifiziert nach Hanson et al. 2004, J. Biol. Chem., Band 279, Nr.13, S. 13049 mit freundlicher Genehmigung der *American Society for Biochemistry and Molecular Biology*.

Durch Oxidation und Reduktion dieser Disulfidbrücke ändert sich die Tertiärstruktur des Proteins und dadurch auch die Konfiguration des sich in unmittelbarer räumlicher Nähe befindlichen Chromophors (Abbildung 4A). Durch Ausbildung der Disulfidbrücke und folgender Proteinstrukturänderung wird das Chromophor in einer neutralen Konfiguration stabilisiert, die ihr Absorptionsmaximum bei 395 nm hat. Unter reduzierenden Einflüssen löst sich die Disulfidverbindung und die Tertiärstruktur des GFP stabilisiert eine anionische Form des Chromophors, die vornehmlich Anregungslicht der Wellenlänge 470 nm absorbiert. Je nach Redoxstatus wird also die eine oder die andere Konfiguration des Chromophors mit ihren Fluoreszenzeigenschaften begünstigt. Das Ausmaß der Oxidation hängt dabei hauptsächlich vom Glutathion-Status und dadurch indirekt vom ROS-Level der Zelle ab (Dooley et al. 2004; Meyer et al. 2007; Meyer und Dick 2010). Aus dem Quotienten der emittierten Fluoreszenzintensitäten bei ratiometrischer Anregung des roGFP1-Sensors mit Licht von 395 nm und 470 nm Wellenlänge (F_{395}/F_{470}) kann das Verhältnis von oxidiert zu reduziert vorliegendem roGFP1 durch optische Messverfahren quantitativ erfasst werden (Dooley et al. 2004; Hanson et al. 2004). Die ratiometrische Darstellung erlaubt es zudem, mögliche Messungenauigkeiten durch unterschiedlich starke Sensorkonzentrationen, Zellbewegungen oder Zellschwellungen während der Messung sowie ein Bleichen der Fluoreszenz auszuschließen (Hanson et al. 2004).

Neben dem roGFP1 wurden durch das Einfügen von Cysteinpaaren in das GFP-Gerüst diverse weitere Redoxsensoren generiert. Eine sich in ihren Fluoreszenzeigenschaften unterscheidende Variante des roGFP, das roGFP2, entstand auf ähnliche Weise, jedoch nicht als ein Derivat des wtGFP, sondern des EGFP. Allerdings zeigt sich roGFP2, anders als roGFP1, den Schwankungen des pH-Wertes unterlegen und fluoresziert im sauren Milieu nur schwach (Dooley et al. 2004; Hanson et al. 2004). Basierend auf dem YFP generierte die Arbeitsgruppe um Ostergaard bereits 2001 das rxYFP (redoxsensitive YFP), das auf Oxidation mit einer Intensitätsänderung der Fluoreszenz reagierte (Ostergaard et al. 2001). Da das rxYFP, genau wie das YFP, nur über ein Absorptionsmaximum verfügt, besitzt es allerdings keine exzitationsratiometrischen Eigenschaften (Meyer und Dick 2010). Diese wurden erst durch die Fusion eines modifizierten zyklisch umgestellten YFP mit dem bakteriellen H₂O₂-detektierenden Protein OxyR zum sogenannten Wasserstoffperoxid-sensitiven HyPer (*hydrogen peroxide-sensitive fluorescent sensor*) erzielt (Belousov et al. 2006). Die Oxidation von HyPer bewirkt eine Spektralverschiebung der Absorption von 420 nm auf 490 nm, sodass hiermit wiederum ratiometrische Messungen möglich sind (Belousov et al. 2006). Ein Nachteil des HyPer ist jedoch, dass es in unseren Untersuchungen im Zytosol von kultivierten Neuronen reduzierende Einflüsse nicht ausreichend detektieren kann, da es bereits nahezu vollständig in reduzierter Form vorliegt (Weller et al. 2014). Des Weiteren sind die Fluoreszenzeigenschaften dieses Sensors wie diejenigen des roGFP2 durch Schwankungen des pH-Wertes beeinflussbar (Meyer und Dick 2010; Weller et al. 2014).

Aufgrund dieser Eigenschaften stellt das roGFP1 für uns den vielversprechendsten Redoxsensor dar (Funke et al. 2011). Im Gegensatz zu den konventionellen Methoden, die auf der Bestimmung der Enzymkonzentrationen oder den fluoreszierenden Eigenschaften von Farbstoffen beruhen, sind die Protein-basierten Sensoren durch das reversible Antwortverhalten auf Oxidation und Reduktion in der Lage, dynamische Änderungen des Redoxstatus in Echtzeit zu erfassen. Darunter sind nur HyPer und roGFP ratiometrische Sensoren, von denen wiederum nur roGFP1 weitestgehend pH-stabil ist (Funke et al. 2011; Großer et al. 2012). Da für roGFP1 ein sehr stark negatives Redoxpotential zwischen -288 mV (Hanson et al. 2004) und -294 mV (Dooley et al. 2004) angenommen wird, ist es besonders geeignet, Redoxschwankungen einer ähnlich reduzierenden Umgebung zu detektieren, wie sie zum Beispiel in den Mitochondrien und dem Zytosol vorherrschen. So zeigten Hanson und Kollegen, dass roGFP1 in den Mitochondrien von HeLa-Zellen (menschliche Epithelzellen aus Tumorgewebe, die zahlreichen Forschungsprojekten dienen) zu $67 \pm 7\%$ in reduzierter Form vorliegt und dadurch einen effektiven Antwortbereich für Redoxänderungen in beide Richtungen, d.h. hin zu stärker oxidierten wie reduzierten Werten, aufweist (Hanson et al. 2004). In oxidierenden Kompartimenten

wie beispielsweise dem endoplasmatischen Retikulum wäre dagegen eine weitgehende Oxidation des roGFP1 zu erwarten, sodass oxidative Einflüsse nur unzureichend detektiert werden könnten (Meyer und Dick 2010).

In den letzten Jahren wurde die Sensorfunktionalität für roGFP1 bereits für organotypische Schnitt- und dissoziierte Zellkulturen hippocampalen Mausgewebes nachgewiesen (Funke et al. 2011; Großer et al. 2012). Allerdings war die Methodik zum Einschleusen des roGFP1-Genkonstrukts in die Zellen sehr aufwendig und vergleichsweise ineffektiv. Die Transfektion der kultivierten Zellen mittels Lipofectamin zeigte sich in <3% der Fälle erfolgreich (Funke et al. 2011; Großer et al. 2012). Durch virale Transduktionsverfahren mit Hilfe von Adeno-assoziierten Viren konnte die DNA immerhin in 15% der Fälle in das Genom integriert werden (Can 2016). Allerdings benötigte der Zellstoffwechsel 2-3 Tage, um das Protein in ausreichender Menge zu exprimieren, was die Anwendung dieser Verfahren auf kultivierbares, neonatales Hirngewebe beschränkte. Ein Einbringen des roGFP1 in adultes Gewebe würde dagegen eine direkte virale Injektion des Genkonstruktes in das Gehirn der lebenden Maus einige Tage vor dem Experiment erforderlich machen. Um derartige komplikationsträchtige chirurgische Eingriffe zu umgehen und dennoch auch in reifem Gewebe eine effiziente *in vivo* - Expression des roGFP1-Sensors für die Redoxmessung zu ermöglichen, haben wir die transgene Mauslinie C57BL/6-TG (Thy1.2-roGFP1m) generiert, die roGFP1 stabil in der mitochondrialen Matrix der Neurone exprimiert.

1.6 Generierung der mitochondrialen Redoxindikator-Maus

In der Vergangenheit haben bereits mehrere Arbeitsgruppen transgene Mauslinien zur *in vivo* - Redoxmessung etabliert. So wurde beispielsweise eine Mauslinie mit roGFP2-Expression in den dopaminergen Neuronen der *Substantia nigra* zur Parkinsonforschung entwickelt (Guzman et al. 2010). Wolf und Kollegen berichteten über eine stabile roGFP1-Expression in den Mitochondrien oder dem Zytosol von Keratinozyten der Haut unter dem spezifischen Elongationsfaktor 1 α - Promotor und untersuchten den Zusammenhang von zellulären Oxidationsprozessen und der Hautalterung (Wolf et al. 2014). Unserem Mausmodell am ähnlichsten ist die von Breckwoldt und Kollegen (Breckwoldt et al. 2015) beschriebene Mauslinie, die den roGFP2-Sensor in den Mitochondrien der Nervenzellen unter *Thy1.2*-Promotorkontrolle exprimiert.

Im Vorfeld meiner Arbeit wurden von der Forschungsgruppe um Michael Müller in Kooperation mit dem Max-Planck-Institut für Experimentelle Medizin Göttingen zwei transgene Mauslinien mit stabiler *in vivo* - Expression des Redoxsensors roGFP1 im Zytosol

(roGFPc) und in den Mitochondrien (roGFPm) der Nervenzellen generiert. Das roGFP1-Genkonstrukt stellt einen festen Bestandteil des Genoms der transgenen Mäuse dar. Damit es jedoch nicht etwa von jeder Körperzelle, sondern nur gezielt in den Nervenzellen exprimiert wird, unterliegt das roGFP1-Gen der Kontrolle des neuronenspezifischen *Thy1.2*-Promotors (Caroni 1997). Die roGFPc-Maus wurde bereits eingehend charakterisiert und konnte als zuverlässige Methode zur Redoxmessung im Zytosol etabliert werden (Kolbrink 2015; Wagener et al. 2016). Ziel meiner Dissertation war es nun, dass roGFPm-Mausmodell mit spezifischer roGFP1-Expression in den neuronalen Mitochondrien zu untersuchen.

Zur Generierung dieses sogenannten C57BL/6-TG (Thy1.2-roGFP1m) - Mausmodells wurde das Verfahren der prä nukleären Mikroinjektion (Ittner und Götz 2007) gewählt. Verwendet wurden Mäuse vom Stamm C57BL/6J. Die roGFP1-codierende Gensequenz wurde in ein Expressionsplasmid (pTSC α 2A) übertragen. Neben der roGFP1-codierenden Sequenz enthielt das Gen-Konstrukt noch die Information für eine spezifische Peptidsequenz am N-Terminus des Translationsproduktes, die den Transport des roGFP1 in die mitochondriale Matrix vermittelte. Bei diesem codierten Protein handelt es sich um eine Untereinheit der Cytochrom-c-Oxidase, einem intramitochondrialen Bestandteil des Komplexes IV der Atmungskette. Durch dieses Signalpeptid wird das roGFP1 im Anschluss an die Proteinbiosynthese in die mitochondriale Matrix transportiert. Das Plasmid mit dem gesamten Gen-Konstrukt wurde mit Hilfe von kompetenten DH5 α -Zellen eines *Escherichia coli* - Stammes amplifiziert, das DNA-Konstrukt anschließend wieder isoliert (*Protus vulgaris* - Restriktionsstellen), gereinigt und gelöst.

Am Tag 0,5 *post coitum* wurden einem C57BL/6N-Weibchen die befruchteten Eizellen (Zygoten) entnommen. Zu diesem Zeitpunkt war das genetische Material der Eltern noch nicht in einer gemeinsamen Mitose verschmolzen, sodass noch zwei Vorkerne mit haploidem Chromosomensatz vorlagen. Das DNA-Konstrukt wurde nun mit einer feinen Kapillare in den Vorkern injiziert und die Zygoten in den Eileiter einer scheinträchtigen Amme reimplantiert und von selbiger ausgetragen. Die so erzeugten Nachkommen wurden mittels Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) auf das Vorhandensein des Transgens überprüft. Die Tiere, bei denen der Gentransfer erfolgreich war, begründeten mit einem C57BL/6J-Wildtypier eine eigene transgene Linie, eine sogenannte Founderlinie (Abbildung 5). Da das injizierte DNA-Konstrukt hinsichtlich Genort und Anzahl der Kopien zufällig in das Genom integriert wurde, war eine phänotypische

Variabilität der Tiere nicht auszuschließen. Aus diesem Grund sollte jede Founderlinie separat analysiert werden.

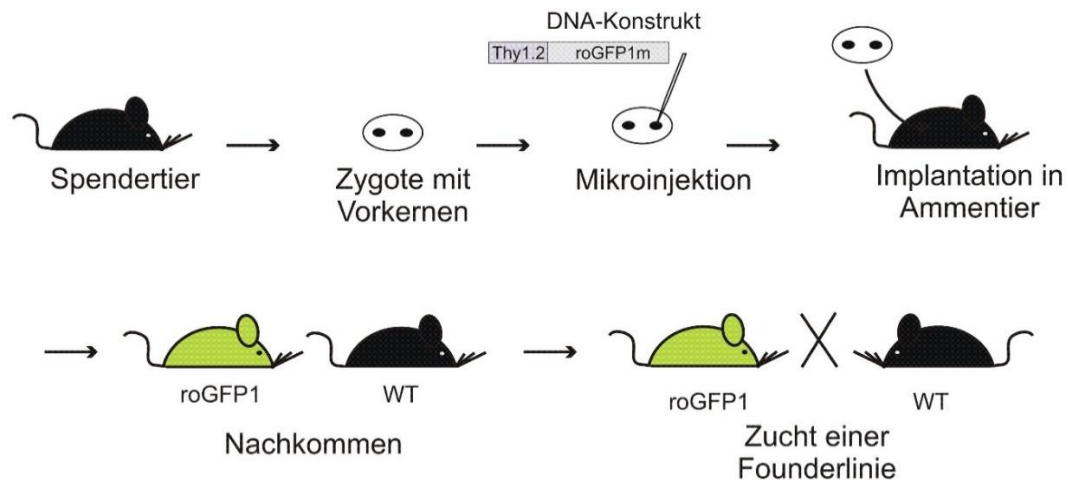


Abbildung 5: Pränukleäre Mikroinjektion

Jeder transgene Nachkomme (grün) des Ammentiers geht aus einer erfolgreich mit dem DNA-Konstrukt mikroinjizierten Zygote hervor. Als Foundertier wird es mit einer C57BL/6J-Wildtypmaus (schwarz) verpaart und begründet eine eigene Founderlinie. Modifiziert nach: Schenkel 2006, S. 40, mit freundlicher Genehmigung von Springer (Schenkel 2006).

1.7 Ziele der Arbeit

Aufgrund der zentralen Rolle, die die Mitochondrien im zellulären ROS-Stoffwechsel einnehmen und ihrer vermuteten Beteiligung an der Pathogenese diverser neurologischer Erkrankungen, war es Ziel dieser Arbeit, eine stabile Zuchtlinie eines transgenen Mausmodells mit mitochondrialer roGFP1-Expression in den Nervenzellen zu etablieren und die ideale Founderlinie auszuwählen. Mit Hilfe dieser Linie sollten dynamische Redoxmessungen an akuten Hirnschnitten von Tieren jeden Alters ermöglicht werden und die Limitationen der bisherigen Messmethoden mit roGFP1 an kultivierbarem Gewebe (Großer et al. 2012) umgangen werden.

Da die Integration des Transgens in das Genom der Maus im Rahmen der pränukleären Mikroinjektion rein zufällig geschieht, kann nicht generell ausgeschlossen werden, dass andere Gene des Genoms dadurch geschädigt werden und ihre Funktion verlieren. Dazu kommt, dass das roGFP1 gezielt in den Mitochondrien der Tiere angereichert wird und diese einen besonders vulnerablen Stoffwechsel aufweisen. Als wesentlicher Ort der ROS-Produktion wird hier ein fein reguliertes und hoch komplexes Redoxpuffer-System vermutet. Nun wäre es beispielsweise denkbar, dass das roGFP1 als Protein mit

oxidierbaren Cysteinresten in den Mitochondrien nicht nur als Redoxsensor, sondern auch als Redoxpuffer fungiert, ROS und RNS in gewissem Umfang abfängt und dadurch selbst in den mitochondrialen ROS-Stoffwechsel eingreift. Um einen solchen Einfluss des Transgens auf den Phänotyp der roGFPm-Tiere zu ermitteln, sollten die körperliche Entwicklung und das Verhalten der transgenen Mäuse genau untersucht und mit dem der Wildtypiere verglichen werden. Dies ist besonders deshalb von Bedeutung, da das roGFPm-Mausmodell in Zukunft auch in Mausmodelle für verschiedene Erkrankungen eingekreuzt werden soll, um die jeweiligen Redoxverhältnisse zu untersuchen. Nur nach genauer Analyse der roGFPm-Maus ist es möglich, eventuelle Beeinträchtigungen doppelt-transgener Tiere sicher auf die eingekreuzte Krankheit und nicht etwa auf das roGFP1 zurückzuführen.

Die neuronenspezifische Expression wurde durch den murinen *Thy1.2*-Promotor gesichert (Caroni 1997; Feng et al. 2000). Allerdings konnte an anderen fluoreszierenden Proteinen unter der Kontrolle des *Thy1.2*-Promotors bereits gezeigt werden, dass die Expression bei unterschiedlichen Founderlinien trotz des gleichen Promotors in Verteilung und Ausmaß durchaus variieren kann, was auf die zufällige Integration des DNA-Konstrukts hinsichtlich Lokalisation und Anzahl der Kopien in das Genom zurückzuführen ist (Feng et al. 2000). Deswegen ist es notwendig, das Expressionsmuster unseres Redoxindikator-Mausmodells genau zu analysieren und zu beschreiben, insbesondere auch im Vergleich der unterschiedlichen Founderlinien. Ein wesentliches Ziel der Arbeit war es daher, die Verteilung des Redoxsensors entlang der Hirnregionen und besonders detailliert im Bereich des Hippokampus zu kartieren, da dieser besonders vulnerabel gegenüber oxidativem Stress ist und an der Pathogenese unterschiedlicher neurodegenerativer Prozesse beteiligt zu sein scheint (Großer et al. 2012; Weller et al. 2014). Außerdem sollte die spezifische Expression in den Neuronen und den Mitochondrien durch Gegenfärbung und hochauflösende 2-Photonen-Laser-Scanning-Mikroskopie belegt werden.

Zudem sollte die vollständige Funktionalität des Redoxsensors nachgewiesen werden. Dazu wurde an akuten Hirnschnitten geprüft, ob der Sensor tatsächlich ein reversibles Antwortverhalten auf Oxidation und Reduktion zeigt und durch Redox-Modulation der zellendogenen Prozesse induzierte Schwankungen des mitochondrialen ROS-Spiegels ausreichend sensitiv zu erfassen vermag.

2 Material und Methoden

Im Rahmen des Versuchsvorhabens G12/0992 wurden Herstellung, Zucht und Phänotypisierung des transgenen Mausmodells und alle damit verbundenen Prozeduren von der Tierschutzkommission der Universitätsmedizin Göttingen und dem Niedersächsischen Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (LAVES), Oldenburg, ausdrücklich genehmigt.

2.1 Die Mäuse

2.1.1 Herkunft und Zucht

Die von mir verwendeten Mäuse verfügten über eine stabile, *Thy1.2*-Promotor-kontrollierte Expression des redoxsensitiven grün fluoreszierenden Proteins roGFP1 (Dooley et al. 2004; Hanson et al. 2004) in den Mitochondrien der Nervenzellen. Das Mausmodell wurde im Vorfeld von der Arbeitsgruppe um Michael Müller in Kooperation mit dem Max-Planck-Institut für Experimentelle Medizin Göttingen durch das Verfahren der prä nukleären DNA-Mikroinjektion (Kapitel 1.6) generiert (Ittner und Götz 2007). Die erzeugten C57BL/6N-Foundertiere wurden in der Zentralen Tierexperimentellen Einrichtung (ZTE) der Universitätsmedizin Göttingen mit C57BL/6J-Wildtyp-Tieren verpaart und begründeten eine eigene Zuchtlinie. Zum Zeitpunkt meiner Datenerhebung brachte die Founderlinie Nr.4 die meisten Nachkommen hervor, sodass Verhalten und Entwicklung der Tiere sowie die Funktionalität des Redoxsensors anhand dieser Linie analysiert wurden.

2.1.2 Haltung und Pflege

Im Tierstall herrschte eine konstante Temperatur von $24 \pm 1^\circ\text{C}$. Eine Zeitschaltuhr sorgte für regelmäßige Belichtung von 07:00–19:00 Uhr. Die Tiere hatten freien Zugang zu Wasser und Futter (Haltungsfutter für Ratten und Mäuse, 19% Rohprotein, sniff Spezialdiäten GmbH). Die Käfige enthielten Birkenstreu der Firma ABEDD und wurden zweimal pro Woche mit Wasser und einem Universalreiniger gesäubert. Am 20. Lebenstag wurden die Nachkommen eines Wurfes von den Elterntieren abgesetzt und nach Geschlecht getrennt gehalten.

2.1.3 Genotypisierung

Da das roGFP1-Genkonstrukt vom Foundertier entsprechend den Mendelschen Gesetzen zufällig an seine Nachkommen weitervererbt wurde, musste jede Maus auf Vorhandensein des Transgens im Genom überprüft werden, um geeignete Tiere für Zucht und Versuche auswählen zu können. Anhand einer vom Tierpfleger entnommenen Schwanzbiopsie (pd 4-6, *postnatal day 4-6*) wurde die DNA isoliert und gereinigt, der spezifische Genabschnitt mittels PCR amplifiziert und die Proben per Gelelektrophorese aufgetrennt.

2.1.3.1 Isolierung der DNA

Die Schwanzbiopsien wurden in einem Ansatz aus 300 µl Lysepuffer und 10 µl Proteinase K (Roth) bei 55°C unter Agitation für 4 h lysiert. Mittels Zentrifugation (10 min, 13 500 rpm) wurden letzte Gewebsreste entfernt und die DNA mit 300 µl Isopropanol (Roth) präzipitiert. Die durch einen weiteren Zentrifugationsschritt pelletierte DNA wurde nun mit 250 µl 70%igem reinen Ethanol (Roth) gewaschen, der Ansatz erneut zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die aufgearbeitete DNA wurde mit 100 µl Nuklease-freiem Wasser (Roth) versetzt und bei 4°C gelagert.

2.1.3.2 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion ermöglichte die spezifische Amplifikation des roGFP1-Gens. Das Primer-Paar für das obligat vorkommende Aktin-Gen diente der Kontrolle. Für jede Probe wurde ein standardisierter Reaktionsansatz von 20 µl pipettiert (Abbildung 6A). Das standardisierte PCR-Protokoll im Thermozykler (TPersonal, Biometra®) umfasste einen primären Denaturierungsschritt bei 94°C für 2 min. Anschließend wurden 29 Reaktionszyklen eines standardisierten Schemas durchlaufen (Abbildung 6C). Nach einem abschließenden Elongationsschritt bei 8°C für 10 min lagen die spezifischen DNA-Fragmente im Reaktionsansatz vervielfältigt vor und konnten mittels Gelelektrophorese analysiert werden.

A		B		
DNA	1 μ l	EGFP/fw:	5'-CCT ACG GCG TGC AGT GCT TCA GC-3'	
Puffer (Promega)	4 μ l	EGFP/rv:	5'-CGG CGA GCT GCA CGC TGC CGT CCT C-3'	
MgCl ₂ (Promega)	1 μ l	Actin/fw:	5'-GAT GAC ATC GCT GCG CTG GTC G-3'	
dNTPs (Peqlab)	0,5 μ l	Actin/rv:	5'-GCC TGT GGT ACG ACC AGA GGC ATA CAG-3'	
EGFP/fw (Metabion)	0,5 μ l	C		
EGFP/rv (Metabion)	0,5 μ l	Denaturierung	94°C	30 s
Actin/fw (Metabion)	0,5 μ l	Annealing	62°C	45 s
Actin/rv (Metabion)	0,5 μ l	Elongation	72°C	1 min
Taq-Polymerase (Promega)	0,1 μ l			
Nuklease-freies Wasser (Roth)	11,4 μ l			

Abbildung 6: Polymerase-Kettenreaktion

(A) Für eine DNA-Probe wurde dieser Reaktionsansatz aus 20 μ l Volumen pipettiert, (B) zeigt die Sequenzen der verwendeten Primer, (C) einen standardisierten Reaktionszyklus des Thermozyklers.

2.1.3.3 Gelelektrophorese

Zum Auftrennen der Proben wurde für 30-60 min eine Spannung von 50-100 V angelegt. Als Trägermedium diente eine Gelmatrix aus 1% Agarose (Roth)/1x TRIS-Borat-EDTA-Puffer. Um die DNA-Proben im ultravioletten Licht darstellen zu können, wurden dem Gel 5 μ l/100 ml des interkalierenden Farbstoffes Roti[®]-GelStain (Roth) beigelegt. Die Bildanalyse erfolgte mittels eines Gel-Dokumentationssystems (QUANTUM ST4, Vilber Lourmat) und der Analyse-Software QuantumKept[®]. Die Aktin-Bande bei 1000 Bp (Basenpaaren) bestätigte den fehlerfreien Reaktionsablauf und eine ausreichende DNA-Menge. Bei den transgenen Tieren konnte zusätzlich eine zweite Bande bei 300 Bp detektiert werden, die den amplifizierten roGFP1-Genabschnitt nachwies.

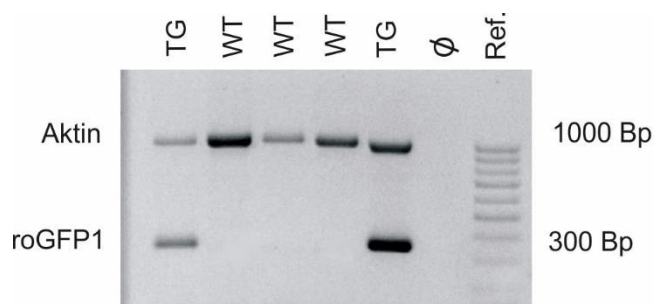


Abbildung 7: Gelelektrophorese

Jede DNA-Probe lässt eine Aktin-Bande erkennen und belegt dadurch, dass die Replikation erfolgreich abgelaufen ist. Die Biopsien der transgenen Tiere (TG) weisen eine zusätzliche Bande bei 300 Basenpaaren (Bp) auf. Die Negativprobe dient dem Kontaminationsausschluss (∅), die DNA-Leiter ist ein Gemisch aus DNA bekannter Längen und bildet eine Skala zur Größenbestimmung der Banden (Referenz, Ref.). WT: Wildtyp.

2.2 Entwicklung und Verhalten

Um einen möglichen Einfluss des roGFP1 auf den Phänotyp der Tiere zu beurteilen, wurden Entwicklung, Verhalten und physiologische Parameter, wie Blutwerte und Atmungseigenschaften, erhoben und mit denen der Wildtypiere verglichen.

2.2.1 Gewicht und Größe

Die körperliche Entwicklung der Tiere wurde durch regelmäßiges Wiegen (Laborwaage Kern[®], PCB 1000-2) in Abständen von 3-5 Tagen erfasst. Außerdem wurde vor dem Finalversuch (pd50-pd55) die Körperlänge von der Schnauze bis zum Schwanzansatz bestimmt.

2.2.2 Rota-Rod[®]

Zur Untersuchung der motorischen Fähigkeiten und des Lernverhaltens in Bezug auf Bewegungsabläufe wurde das Rota-Rod[®]-Testverfahren (Dunham und Miya 1957) mit dem Messsystem von Ugo Basile gewählt. Hierzu wurde die Maus auf eine sich drehende Stange gesetzt, deren Rotationsgeschwindigkeit sich über eine Testdauer von 5 min von 5 auf 50 rpm (*revolutions per minute*, Umdrehungen pro Minute) erhöhte (Abbildung 8). Die Maus musste also kontinuierlich schneller laufen, um nicht hinunterzufallen. Bestimmt wurde die Dauer, bis das jeweilige Versuchstier vom Rota-Rod[®] fiel oder sich für fünf volle Umdrehungen an die Stange klammerte und nicht mehr selber weiterlief. Eine Messung wurde erst ab einer Messdauer von 20 s gewertet. Bei geringerer Versuchsdauer wurde ein neuer Versuch gestartet.

Jede Maus wurde an drei aufeinanderfolgenden Versuchstagen ($pd45$ - $pd47 \pm 1$ Tag) getestet. Der erste Versuchstag diente der Maus zur Adaption an die neue Situation, während der zweite und dritte Tag Auskunft über das motorische Lernverhalten liefern sollten. Damit sich die Tiere nicht gegenseitig irritierten, lief immer nur eine Maus auf dem Rota-Rod[®]. Das Gerät wurde nach jedem Durchgang mit Ethanol (70%) gründlich gereinigt.

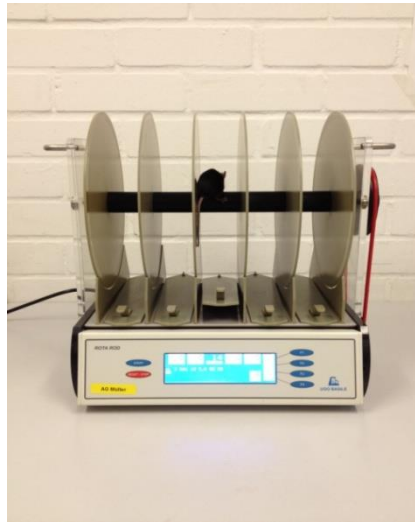


Abbildung 8: Das Rota-Rod[®]-Messsystem

Zur Erfassung der Koordination und des motorischen Lernverhaltens lief die Maus auf einer rotierenden Stange, bis sie hinunterfiel und die Messung dadurch beendete. Alle Messungen wurden im Beschleunigungsmodus durchgeführt (5-50 rpm in 5 min).

2.2.3 Open-Field

Das Explorationsverhalten der Tiere in einer neuartigen Umgebung wurde unmittelbar vor dem Finalversuch ($pd50$ - $pd55$) mit Hilfe des Open-Field-Testverfahrens beurteilt (Walsh und Cummins 1976). Ein „freies Feld“ wurde durch eine offene, hell erleuchtete Testfläche imitiert, die keinerlei Rückzugsmöglichkeiten für das Tier bot. Da Mäuse solche Areale wegen möglicher Fressfeinde instinktiv meiden, wird ihr exploratives Verhalten durch Angst auf der einen und Neugierde auf der anderen Seite motiviert (Markel et al. 1989).

Die Bewegungen der Maus wurden in einem 45x45 cm großen Testfeld (Actimeter, Panlab, Harvard Apparatus) (Abbildung 9A) durch ein horizontales Raster aus 16 regelmäßig angeordneten Infrarotstrahlen auf 2 und 6 cm Höhe erfasst und mittels ActiTrack - Software (Panlab, Harvard Apparatus) analysiert. Dabei wurden die vom Tier zurückgelegte Wegstrecke, die Geschwindigkeit der Fortbewegung, die prozentuale Verweildauer in drei unterschiedlichen, vom Programm definierten Zonen (Abbildung 9B), die relativen

Ruhezeiten und die Häufigkeit, mit der sich die Maus aufrichtete, detektiert. Jedes Tier wurde mittig auf die Testfläche gesetzt und konnte das Areal anschließend 5 min lang frei erkunden. Der Raum war hell erleuchtet, Geräusche wurden während der Messung weitestgehend unterbunden, und es herrschte Raumtemperatur (21°C). Zwischen den Messungen der verschiedenen Tiere wurde die Apparatur gründlich mit Ethanol (70%) gereinigt.

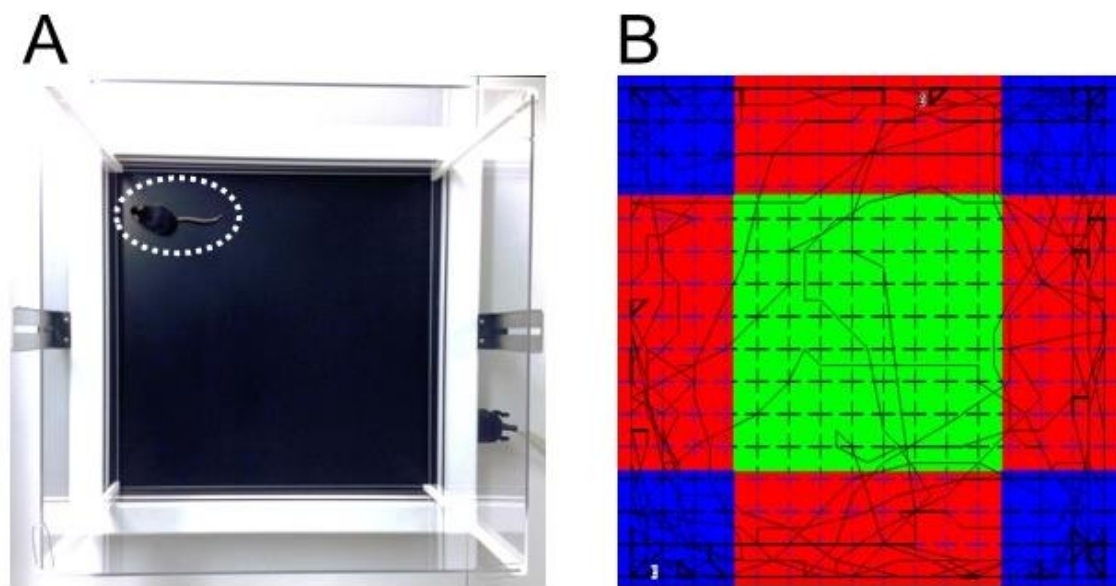


Abbildung 9: Die Open-Field-Testung

(A) Die Maus konnte das Testareal frei erkunden. Die Testfläche wurde seitlich von Plexiglasscheiben begrenzt. Der gestrichelte Kreis markiert das Versuchstier. **(B)** Mittels Analyse-Software ActiTrack wurde das Bewegungsprofil des Versuchstieres aufgezeichnet und das Areal in drei Zonen – blau: „Ecken“, rot: „Kanten“, grün: „Zentrum“ – aufgeteilt. Für jede Zone wurde die relative Verweildauer bestimmt. Die schwarze Linie stellt die Laufspur einer Maus dar.

2.2.4 Ganzkörperplethysmographie

Plan unserer Arbeitsgruppe war es, die roGFPm-Mauslinie in ein Mausmodell für das Rett-Syndrom (B6129P2[©]-Mecp2^{tm-1-1Bird}) einzukreuzen. Da bei diesen Rett-Mäusen Atemunregelmäßigkeiten und Apnoen bekannt sind (Guy et al. 2001), sollten die Redoxindikator-Mäuse zuvor mittels Ganzkörperplethysmographie hinsichtlich ihres Atemverhaltens beurteilt werden, um einen möglichen Einfluss des roGFP1-Transgens auf die Atmung der Tiere zu bewerten.

Die barometrische Ganzkörperplethysmographie basiert auf der Detektion von Druckänderungen, die durch Erwärmung der Luft während der Inspiration und Abkühlung

während der Expiration hervorgerufen werden (Drorbaugh und Fenn 1955). Ein Sensor erfasst die Druckdifferenz zwischen zwei Kammern: der Messkammer, in der sich das Versuchstier befindet, und der Referenzkammer, die den Umgebungsdruck widerspiegelt.

Während meines Versuchs konnte sich die Maus innerhalb der Testkammer (Data Sciences International[®], Modell 600-2500-001) frei bewegen und ungehindert atmen (Abbildung 10C). Eine Haltevorrichtung oder Sedierung war nicht erforderlich.

An die Messkammer schloss sich eine Saugpumpe an (Data Science International[®], Modell 600-1200-001), die einen kontinuierlichen Luftstrom (1 l/min) erzeugte. Über eine Öffnung konnte Luft in die Messkammer nachströmen. So wurde die Frischluftzufuhr sichergestellt und eine CO₂-Akkumulation verhindert. Das Messsignal des Drucksensors wurde verstärkt, von einem AD (Analog-Digital) - Wandler umgesetzt und mittels Analyse-Software Ponemah v5 aufgezeichnet (Abbildung 10A). Zur Auswertung mittels Clampfit 10.3 (Molecular Devices[®], Sunnyvale, CA) wurden die Daten zunächst als ASCII-Dateien exportiert und anschließend Bandpass-gefiltert (0.5-20 Hz) dargestellt. Eine semiautomatische Analysemethode erfasste alle Maximalwerte der inspiratorischen Atemflussgeschwindigkeit, die einen zuvor definierten Schwellenwert überschritten (*threshold based event detection*), wobei eine manuelle Anpassung der Grundlinie erfolgte (Abbildung 10B). Die Testdauer betrug 15 min. Die ersten 12 min dienten der Maus zur Adaption an die Messkammer, sodass nur die letzten 3 min ausgewertet wurden. Die Mäuse waren zum Zeitpunkt der plethysmographischen Analyse zwischen 45 und 55 Tage alt.

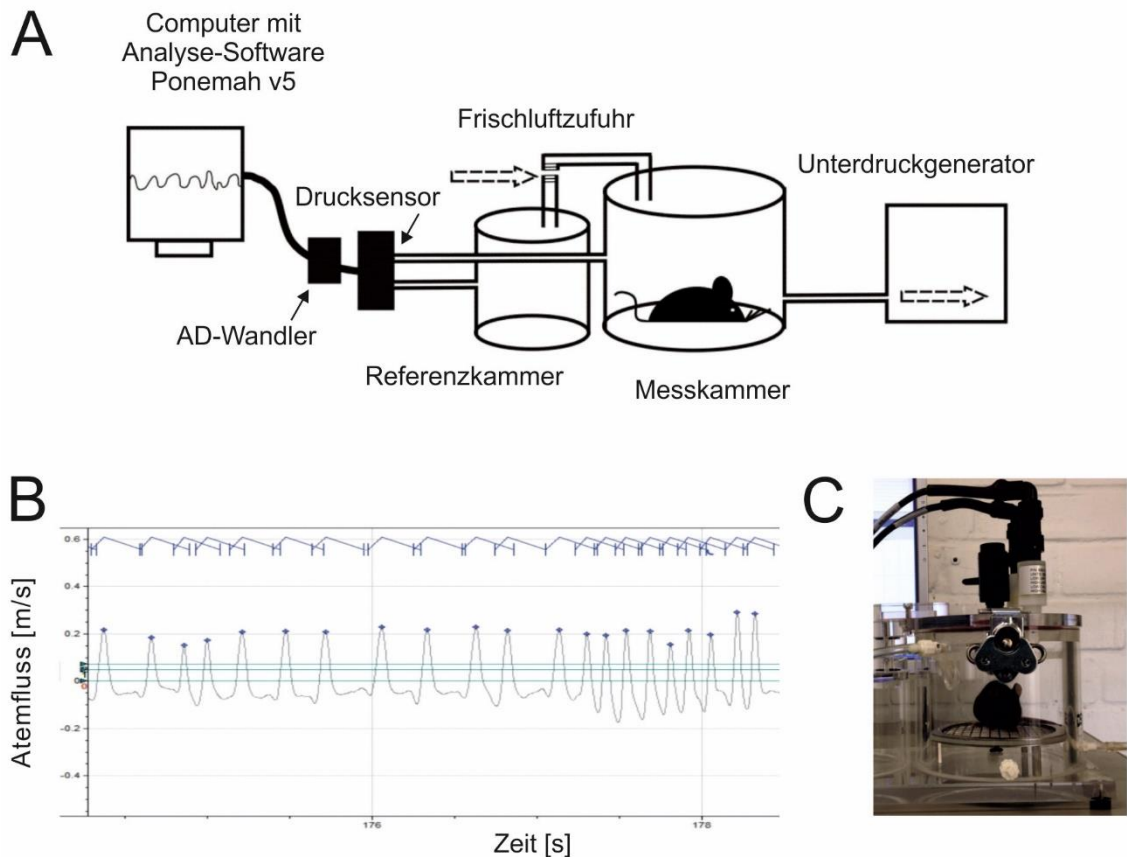


Abbildung 10: Die Ganzkörperplethysmographie

(A) Schematische Darstellung des Messaufbaus. Der erzeugte Unterdruck in der Messkammer verhinderte die Anreicherung von CO_2 und rief einen konstanten Basis-Luftstrom von 1 l/min hervor. Das Atemzugvolumen wurde während der Inspiration erwärmt und dehnte sich aus, sodass der Druck in der Messkammer stieg. Die Druckdifferenz zwischen den beiden Kammern wurde vom Drucksensor erfasst. AD-Wandler: Analog-Digital-Wandler. (B) Die Auswertung erfolgte semiautomatisch mittels Analyse-Software Clampfit 10.3. Ein Schwellenwert wurde definiert und die Grundlinie bei größeren Schwankungen manuell angepasst. Dargestellt ist eine exemplarische Atemströmungsmessung über wenige Sekunden. Die vom Programm detektierten Atemereignisse sind mit einem blauen Punkt markiert. (C) Die Maus konnte sich während der Messung frei innerhalb der Plexigaskammer bewegen.

Die Atemfrequenz wurde als Kehrwert der durchschnittlichen Atemzyklusdauer berechnet und als Anzahl der Atemereignisse pro Minute (*breaths per minute*, BPM) angegeben. Um das durchschnittliche Atemminutenvolumen (AMV) zu bestimmen, wurden die durch Ponemah v5 berechneten Atemzugvolumina gemittelt - nachdem 20% der Extremwerte als Ausreißer verworfen wurden - und mit dem BPM-Wert multipliziert. Da Temperatur und Luftfeuchtigkeit der Messkammer jedoch nicht erfasst wurden, konnten keine absoluten Atemzugvolumina und dadurch auch keine absoluten Minutenvolumina errechnet und verglichen werden. Das auf diesem Wege ermittelte AMV war also ein relativer Wert. Deswegen wurde das durchschnittliche AMV der männlichen bzw. weiblichen Wildtypen als 100% normiert, um relative Unterschiede zu den Minutenvolumina der transgenen

Vergleichsgruppen auszumachen. Atempausen >1 s wurden als Apnoe gewertet. Zur Beurteilung der Atemregelmäßigkeit wurde zudem ein Irregularitäts-Parameter ermittelt, der die Frequenzunterschiede aufeinanderfolgender Atemzyklen beschreibt (Telgkamp et al. 2002; Wegener et al. 2014).

2.3 Herstellung der Hirnpräparate

Im Rahmen dieser Arbeit wurden sowohl akute als auch PFA (Paraformaldehyd) - fixierte Hirnschnitte von adulten roGFPm-Tieren ($>pd50$) angefertigt. Während an akut gewonnenem, intaktem Gewebe funktionelle Redoxanalysen durchgeführt wurden, dienten die fixierten Präparate der Charakterisierung des Expressionsmusters des Proteins. Darüber hinaus wurden Zellkulturen zur Beurteilung neonatalen Gewebes ($pd2$) und zur Färbung mit einem mitochondrialen Marker hergestellt.

2.3.1 Präparation der akuten Hirnschnitte und Blutgewinnung

Im Zuge des sogenannten Finalversuchs wurde die Maus in einem Exsikkator in eine tiefe Ethernarkose (Diethylether, Sigma) versetzt und mit einer chirurgischen Schere rasch dekapitiert. Kopfhaut und Schädeldecke wurden vorsichtig mit einer feinen Schere entlang der Scheitellinie eingeschnitten und mit Hilfe einer Pinzette zur Seite gebogen. Das Hirn wurde mit einem kleinen Spatel frei präpariert und für 2 min in eisgekühlte artifizielle zerebrospinale Flüssigkeit (*artificial cerebrospinal fluid*, ACSF) überführt. Dadurch wurde das Gewebe gekühlt und der Stoffwechsel der Neurone verlangsamt, um ischämischen Schäden vorzubeugen. Um einen konstanten pH-Wert der ACSF-Lösung von 7,4 einzustellen, wurde sie durchgehend mit einem Carbogen-Gasgemisch (95% O₂, 5% CO₂) begast. Nach dem Abkühlen wurden Kleinhirn und Frontalhirn mittels Skalpell abgetrennt und das Hirn mit einem Tropfen Sekundenkleber (Roti[®]Coll1, Roth) mit der kaudalen Schnittfläche auf einem Teflonblock befestigt. Mit Hilfe eines vollautomatischen Mikrotoms mit vibrierender Klinge (752M Vibroslice, Campden Instruments) wurde eine koronare Schnittserie von 400 μ m Schichtdicke angefertigt, wobei das Gewebe während des gesamten Schneidevorgangs von eiskalter ACSF-Lösung umspült wurde. Im Anschluss wurden alle Schnitte, die über deutliche hippokampale Anteile verfügten, entlang der sagittalen Mittellinie halbiert und für mindestens 90 min in eine mit ACSF gefüllte, Carbogen-begaste Prä-Inkubationskammer überführt, damit sich das isolierte Hirngewebe vom Präparationsstress erholen konnte.

Zudem wurde das anfallende Dekapitationsblut für die Bestimmung der Blutparameter Hämatokrit und Blutglukosespiegel verwendet. Dazu wurden zwei Mikro-

Hämatokritkapillaren (Brand GmbH&Co KG) mit Blut vollgesogen und bei 13 000 rpm für 5 min zentrifugiert (Mikro 2200, Hettich Zentrifugen). Der Wert beider Röhren wurde anhand einer Skala im Hämatokritrotor abgelesen. Um Messungenauigkeiten zu minimieren, wurden die Werte der beiden Proben gemittelt. Mit Hilfe eines Blutzuckermessgeräts (Contour[®], Bayer) wurde der Glukosespiegel im Dekapitationsblut der Mäuse bestimmt.

2.3.2 Herstellung und immunhistochemische Färbung der PFA-fixierten Hirnschnitte

Die im Rahmen des Versuchsvorhabens G12/0992 explizit genehmigte transkardiale Perfusion zur PFA-Fixierung des Gewebes wurde ausschließlich von dazu berechtigten Mitarbeitern der Arbeitsgruppe durchgeführt.

Im Anschluss an die Perfusion wurden die Hirne und das Rückenmark freipräpariert, für 24 h in 4% PFA/PBS (*phosphate-buffered saline*, Phosphatgepufferte Salzlösung) nachfixiert und anschließend in reine PBS überführt. Es sollten Sagittalschnitte des Gehirns von 30 µm Schichtdicke angefertigt werden. Dazu wurden die beiden Hemisphären entlang der Medianachse getrennt und die mediale Schnittfläche mit einem Tropfen Sekundenkleber auf einen Schneideblock geklebt. Zur weiteren Stabilisierung wurden die Hemisphäre in einen Agarblock (2% Agar in PBS) eingegossen. Während des Schneidevorgangs mit dem Vibratom (Leica VT1200S; Vorschubgeschwindigkeit 0,7 mm/s, Amplitude 1 mm) wurde das Gewebe von PBS umspült, um ein Austrocknen zu vermeiden. Je nach weiterem Vorhaben wurden die Schnitte nun entweder unmittelbar auf einen SuperFrost[®]Plus-Objektträger (Thermo Scientific) aufgezogen und nach 30-minütigem Trocknen mit Fluoreszenz-Medium (DakoCytomation) eingedeckt oder bei 4°C in einer Multiwellplatte in PBS/0,02% Natriumazid gelagert, um später immunhistochemisch gefärbt zu werden. Das Prozedere zur Anfertigung von Rückenmarkpräparaten zeigte insofern Abweichungen, als dass das Gewebe wegen der geringen Größe zum Schneiden stärker stabilisiert werden musste. Das Rückenmark wurde deswegen von allen Seiten in einen Agarwürfel eingegossen und erst dann auf den Schneideblock geklebt.

Zur immunhistochemischen Färbung der Schnitte wurde ein Antikörper verwendet, der gegen das ausschließlich in reifen Neuronen vorkommende DNA-bindende nukleare Protein NeuN (*Neuronal Nuclei*) gerichtet ist (Mullen et al. 1992). Die parallele Darstellung des roGFPm und der immunhistochemisch gefärbten Nervenzellen sollte später im Rahmen der Bildgebung die Neuronenspezifität der Redoxindikator-Expression nachweisen (Abbildung 11). Die Schnitte wurden 3x5 min in PBS gewaschen und bei

Raumtemperatur 30 min in 0,2% des nicht-ionischen Tensids Triton[®] X-100 (Sigma-Aldrich) in PBS permeabilisiert. Dadurch wurde die Zellmembran durchlässig, um die Reaktion des Antikörpers mit dem intrazellulären Antigen zu ermöglichen. Zur Absättigung unspezifischer Proteinbindungen und der Reduktion des Hintergrundsignals wurde das Gewebe für 45 min bei Raumtemperatur mit 10% Ziegen Serum/PBS behandelt und anschließend über Nacht bei 4°C mit dem primären Antikörper (MAB377, Anti-NeuN-Antikörper, Merck-Millipore) in einer Konzentration von 1 µg/ml in 2% BSA (Bovines Serumalbumin, Sigma-Aldrich)/PBS inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Schnitte erneut 3x5 min in PBS gewaschen, um den nicht gebundenen primären Antikörper zu entfernen. Im Anschluss reagierten sie 2 h lang mit dem Fluoreszenzmarkergekoppelten sekundären Antikörper (ab96880, Goat Anti-Mouse IgG H&L (DyLight550[®]), Abcam) in einer Konzentration von 2 µg/ml in 2% BSA/PBS. Nachdem ein letzter Waschschritt (3x5 min in PBS) überschüssigen sekundären Antikörper entfernt hatte, wurden die Schnitte auf SuperFrost[®] Plus-Objektträger aufgezogen und nach dem Trocknen mit Dako-Fluoreszenz-Medium eingedeckt. Alle Wasch- und Inkubationsschritte fanden unter sanfter Agitation statt. Die fertigen Präparate wurden unter Ausschluss von Tageslicht aufbewahrt, um ein Bleichen der Fluoreszenz zu vermeiden.

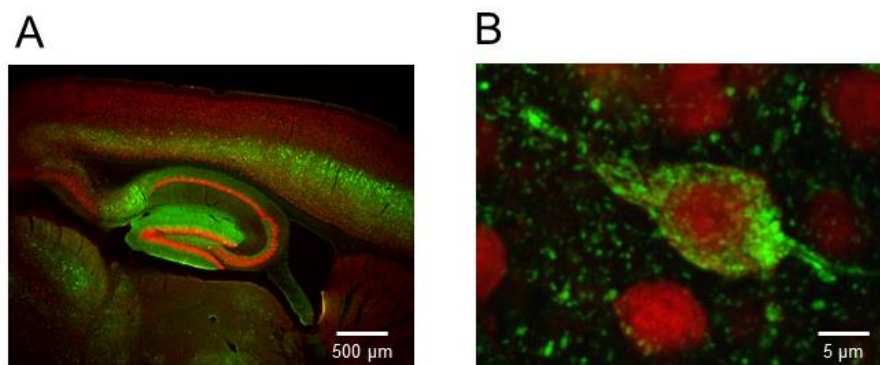


Abbildung 11: Das Prinzip der immunhistochemischen Gegenfärbung

(A) Übersichtsaufnahme der Hippokampusformation und **(B)** Darstellung eines kortikalen Neurons auf Einzelzellebene. Bei entsprechender Anregung bewirkt Anti-NeuN eine kräftige rote Färbung des Nukleus und eine schwächere Färbung des Somas der Nervenzelle. Die Mitochondrien fluoreszieren aufgrund des exprimierten roGFP1 grün. So wird die neuronenspezifische Expression des Redoxindikators belegt.

2.3.3 Zellkulturen aus neonatalem Gewebe

Um früh postnatale Neurone hinsichtlich der roGFP1-Expression zu untersuchen, fertigte eine wissenschaftliche Mitarbeiterin der Arbeitsgruppe nach bekanntem Schema (Funke et al. 2011; Gerich et al. 2009) dissoziierte hippocampale Zellkulturen an. Die Mäuse wurden

am zweiten postnatalen Tag präpariert, die hippocampalen Neurone kultiviert und am dritten Tag *in vitro* von mir für das Experiment verwendet. Zudem nutzte ich die Kultur, um die Mitochondrien-spezifische roGFP1-Expression durch Gegenfärbung mit einem mitochondrialen Marker zu belegen, da diese Färbung an fixierten Schnitten wegen eines zu hohen Hintergrundsignals bisher keine optimalen Darstellungen zugelassen hatte. Zur Visualisierung der Mitochondrien wurden die Zellen 20 min lang mit dem in ACSF gelösten Mitotracker (Mitotracker® Red 580, Molecular Probes) in einer Konzentration von 1 $\mu\text{M}/\mu\text{l}$ inkubiert und anschließend mittels 2-Photonen-Laser-Scanning-Mikroskopie dargestellt.

2.4 Optische Messung zur Erfassung der Sensorfunktionalität

2.4.1 Theorie und Aufbau

Das roGFP1 wird in der mitochondrialen Matrix exprimiert und ist aufgrund seiner redoxsensitiven Disulfidverbindung vollständig in das dortige Redoxpuffersystem integriert. Veränderungen des Oxidationsstatus der Mitochondrien beeinflussen die Struktur und dadurch die Fluoreszenzeigenschaften des roGFP1. Herrschen oxidative Bedingungen, ändert sich die Struktur des Proteins und das benachbart gelegene Chromophor wird in einer protonierten Konfiguration stabilisiert, die ihr Absorptionsmaximum bei 395 nm Wellenlänge hat. Eine reduzierende Umgebung hingegen begünstigt die deprotonierte Form des Chromophors und die Absorption bei 470 nm Wellenlänge (Dooley et al. 2004; Hanson et al. 2004). Basierend auf diesen zwei Absorptionsmaxima kann das Protein als dynamischer Redoxindikator fungieren. Im Rahmen eines optischen Messverfahrens wurde das roGFP1 alternierend mit Licht besagter Wellenlängen angeregt, die Emissionsstrahlung detektiert und das Ausmaß der Oxidation als Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten (F_{395}/F_{470}) errechnet. Durch die Darstellung als Quotient werden potentielle Fehlerquellen herausgerechnet, da sich eine variable Proteinexpression zu gleichen Teilen auf beide Fluoreszenzsignale auswirkt. Aus diesem Grund haben weder ein Bleichen der Fluorophore noch eine unterschiedlich starke Expression innerhalb der verschiedenen Hirnregionen oder Artefakte durch Zell- oder Schnittbewegungen einen Einfluss auf die Signalantwort.

Die akuten Hirnschnitte wurden in eine Tauchschnittkammer überführt und dort kontinuierlich mit erwärmter ACSF-Lösung umspült, um die Vitalität der Zellen zu erhalten. Dazu wurde die Flüssigkeit in einem Wasserbad (Haake) auf 39°C erwärmt und mit Carbogen begast. Eine Rollenpumpe sog die Lösung mit 35 rpm an und beförderte sie

über einen Windkessel und dünne Tygon®-Schläuche zur Messkammer. Der Windkessel verhinderte, dass beim Lösungswechsel Luftblasen in das Schlauchsystem und letztlich an das Präparat gelangten und wandelte den diskontinuierlichen Flüssigkeitsstrom der Rollenpumpe in einen gleichmäßigen Lösungsfluss von 3-4 ml/min um. Da beim Lösungstransport Wärme an die Umgebung verloren ging, führte das Schlauchsystem unmittelbar vor der Messkammer durch einen Wärmeaustauscher, sodass die Schnitte konstant mit 30-33°C warmer ACSF-Lösung umspült wurden. Eine Unterdruckpumpe sog die Flüssigkeit aus der Kammer in eine 5 Liter-Sammelflasche ab (Abbildung 12).

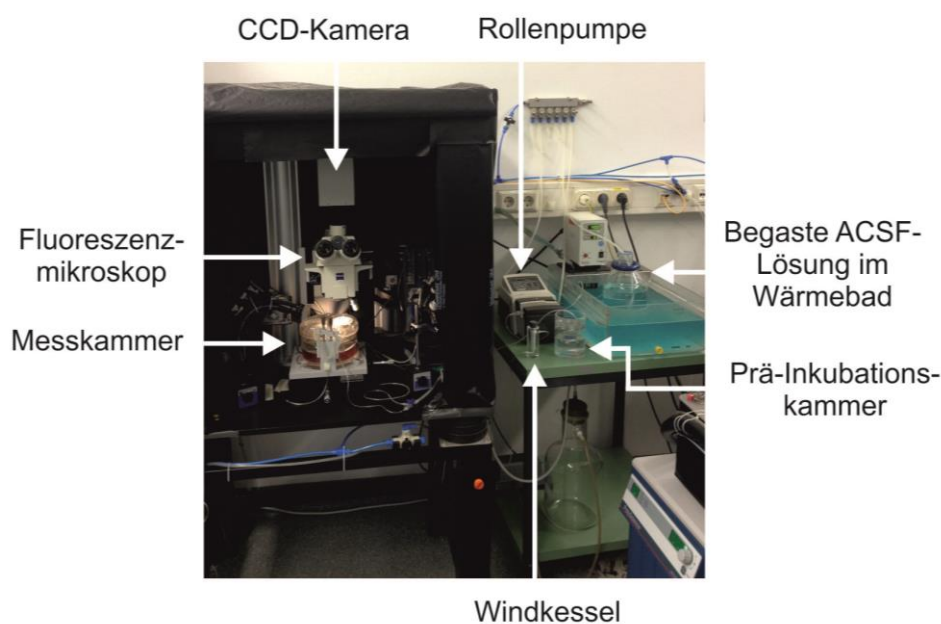


Abbildung 12: Fotografische Aufnahme des optischen Arbeitsplatzes

Alle benötigten Geräte befanden sich in unmittelbarer Nähe. Messkammer, Mikroskop und CCD-Kamera standen auf einem schwingungsgedämpften Tisch.

Zur ratiometrischen Messung wurde ein computergesteuertes Fluoreszenz-*Imaging*-System aus polychromatischer Xenon-Hochdrucklampe als Lichtquelle (Polychrom V, Till Photonics) und hochsensitiver CCD (*Charge-Coupled Device*) - Kamera (Imago QE, PCO Imaging, Kelheim, Deutschland) verwendet (Abbildung 13). Letztere diente der Detektion der Fluoreszenz und war einem aufrechten Fluoreszenzmikroskop (Axiotech vario, Zeiss) aufgesetzt. Die Lichtquelle wurde über Glasfaserlichtleiter in das Mikroskop eingekoppelt und regte das Präparat alternierend mit 395/470 nm Wellenlänge an. In den Strahlengang war ein dichroitischer Spiegel (DC 495) eingebracht - eine optische Komponente, die Licht frequenzabhängig reflektiert oder passieren lässt. Der Dichroit DC 495 reflektierte Licht bis zu einer Wellenlänge von 495 nm, während langwelligeres Licht hindurch gelangen konnte. Das Anregungslicht wurde also reflektiert und durch das Objektiv auf das Präparat

geworfen. Das Fluorophor als fluoreszierendes Molekül des roGFP1 wurde in einen angeregten Zustand versetzt, fiel spontan in den Ausgangszustand zurück und emittierte dabei energieärmere und somit längerwelligere Strahlung in Form von Fluoreszenz, die den Dichroiten passieren konnte und so vom kurzwelligeren Anregungslicht getrennt wurde. Ein 525/50 nm-Bandpass-Emissionsfilter grenzte das roGFP1-Signal von unspezifischer Autofluoreszenz ab, bevor die CCD-Kamera die Fluoreszenzintensitäten erfasste. Mittels der Steuerungs- und Bilderfassungssoftware Till Vision® (Till Photonics, Gräfelfing, Deutschland) wurde das Verhältnis dieser Intensitäten (F_{395}/F_{470}) errechnet und aufgezeichnet (Abbildung 13).

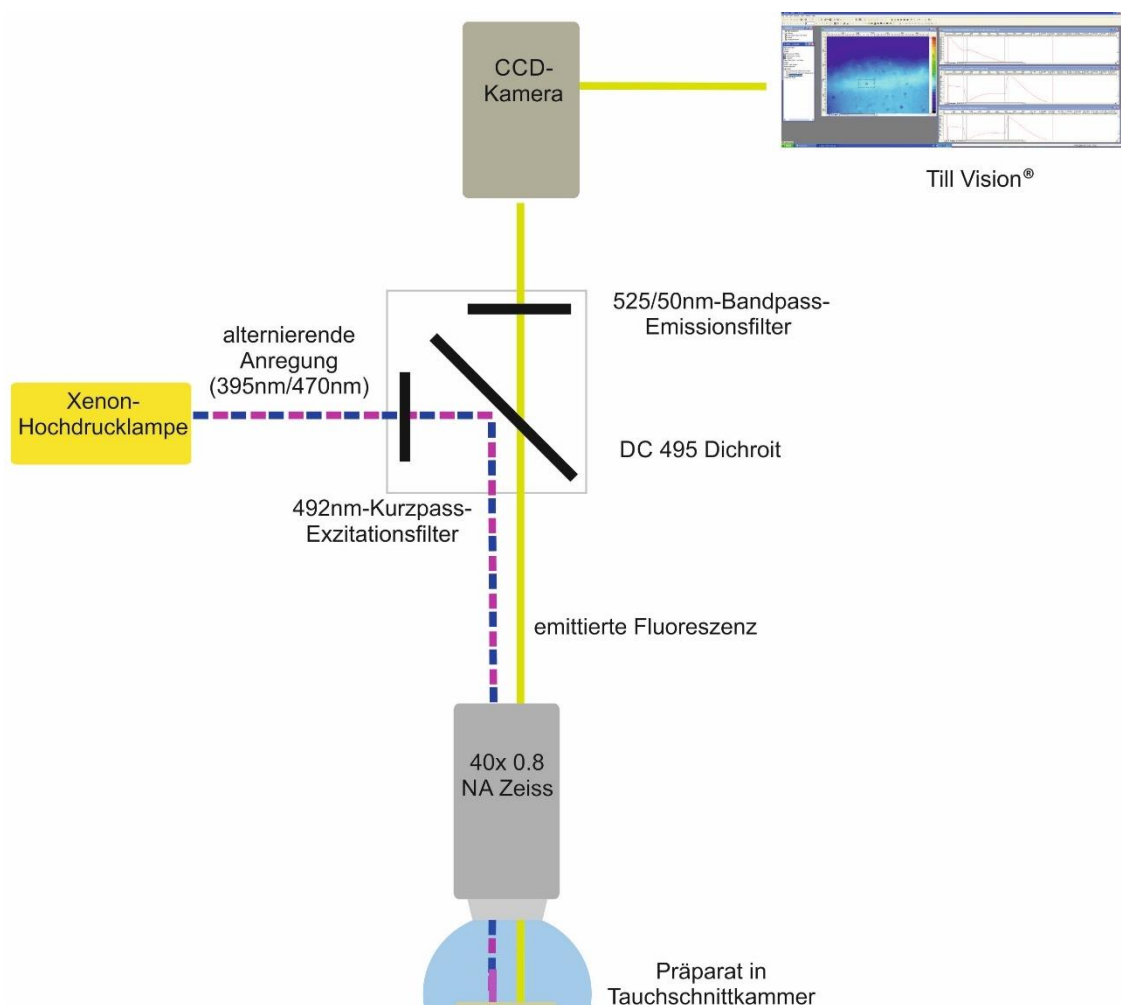


Abbildung 13: Schematischer Aufbau des CCD-Kamera-basierten optischen Messsystems

Die Xenon-Hochdrucklampe wirft abwechselnd Licht der Wellenlängen 395 nm und 470 nm über den Dichroiten durch das Objektiv auf das Präparat. Die emittierte Fluoreszenz passiert den dichroitischen Spiegel und einen Bandpassfilter, wird von der CCD-Kamera erfasst und von Till Vision® aufgezeichnet.

Es wurde ein definiertes Protokoll mit einer Belichtungszeit von 15 ms und einer Bildrate von 0,1 Hz gewählt. Eine Pixelreduktion von 2x2 bewirkte, dass vier aneinandergrenzende Pixel zu einem zusammengefasst und deren Helligkeiten addiert wurden. Dadurch wurde ein Empfindlichkeitsgewinn bei der Erfassung der Fluoreszenz erreicht und zugleich die zu speichernde Datenmenge reduziert. Auf der anderen Seite ging diese Reduktion der Primärdaten mit einem Verlust der räumlichen Auflösung einher.

Vor der Messung wurde der Schnitt mit einem 5x Objektiv (Epiplan, Zeiss, 0.13 NA) fokussiert, die zu untersuchende Hirnregion aufgesucht und eine Übersichtsaufnahme erstellt. Zur eigentlichen Messung wurde ein 40x Wasserimmersionsobjektiv (Achroplan, Zeiss, 0.8 NA) verwendet. Wegen der geringen Größe und der Eigenbeweglichkeit der Mitochondrien war es nicht möglich, ein solches Zellorganell separat zu fokussieren, sodass der fokussierte Messbereich (*area of interest*, AOI) auf Gewebsebene gewählt wurde. Untersucht wurden die hippocampalen Bereiche CA1 (*cornu ammonis*, Ammonshorn-Region des Hippokampus) und CA3 im Bereich des *Stratum pyramidale*, der ebenfalls hippocampale Gyrus dentatus sowie Areale der Großhirnrinde.

Till Vision[®] stellte die Werte sowohl numerisch als auch graphisch auf dem Computer dar, sodass die Messung in Echtzeit anhand einer Messspur mitzuverfolgen war. Die quantitative und statistische Auswertung der Daten sowie die Rekonstruktion der Messspuren und Diagramme erfolgte mittels Microsoft Excel[®].

2.4.2 Kalibrierung des roGFP1-Antwortbereichs

Zur Bewertung des relativen Oxidationsstatus der mitochondrialen Matrix musste der Antwortbereich des roGFP1 kalibriert werden, indem die Reaktion des Proteins auf maximale Oxidation und maximale Reduktion ermittelt wurde. Dazu ging man davon aus, dass bei Applikation eines Oxidationsmittels in Sättigungsdosen (5 mM H₂O₂, 7 min) das gesamte roGFP1 der Zelle oxidiert vorlag. Im Gegensatz dazu bewirkte die Zugabe sättigender Dosen 1,4-Dithio-DL-threitol (DTT) als Reduktionsmittel (10 mM, 7 min), dass 100% des Proteins in reduzierter Form vorlagen. Unter dieser Annahme wurden die ratiometrischen Fluoreszenzwerte für die maximale und minimale Oxidation ermittelt und als obere und untere Grenze des Antwortbereichs festgelegt. Auf Grundlage dieser Kalibrierungswerte konnte das relative Ausmaß der Oxidation des mitochondrialen roGFP1 (Kapitel 3.3.2) sowie das absolute vorherrschende Redoxpotential in mV errechnet werden (Kapitel 3.3.3). Diese Kalibrierung wurde für jede Hirnregion durchgeführt, die im Rahmen der ratiometrischen Messungen detaillierter analysiert werden sollte, um

unterschiedlichen Gewebsstrukturen, optischen Eigenschaften und Redox-Puffereigenschaften Rechnung zu tragen.

2.4.3 Applikation von Pharmaka

Im Zuge der ratiometrischen Messungen wurden die Hirnschnitte mit zwei Substanzen behandelt, die in den zellulären ROS-Stoffwechsel eingreifen: Antimycin A (20 μ l, 10 min) als bekannter Inhibitor des mitochondrialen Atmungskettenkomplexes III sowie dem Hemmer des Radikalfängers Superoxiddismutase, DEDTC (Diethyldithiocarbaminsäure, 5 mM, 5 min). Die roGFPm-Fluoreszenz wurde aus dem *Stratum pyramidale* der hippocampalen Region CA1 detektiert und der Effekt der pharmakologischen Inhibition auf den Oxidationsstatus der Mitochondrien beurteilt.

2.5 Optische Analyse des Expressionsmusters

Die auf dem Prinzip der Fluoreszenz basierende Bildgebung ermöglichte die Analyse der mitochondrialen roGFP1-Expression in Hirn und Rückenmark. Dazu wurden Präparate von adulten und neonatalen Mäusen beider Geschlechter und unterschiedlicher Founderlinien betrachtet.

2.5.1 Die klassische Fluoreszenzmikroskopie

Zur mikroskopischen Darstellung der fixierten Hirnschnitte wurde ein aufrechtes Fluoreszenzmikroskop (Olympus, BX51WI) mit hochauflösender CCD-Kamera (Retiga Exi Fast 1394, QImaging, 12 bit, 1392x1040 Pixel) verwendet. Ein LED-Beleuchtungssystem (pE-4000, CoolLED) warf Licht der Wellenlänge 490 nm für die roGFP1-Anregung und 565 nm für die DyLight550[®]-Exzitation auf das Präparat. Zur Trennung von Anregungslicht und Fluoreszenzsignal war ein Dichroit (roGFP1: DC499, DyLight550[®]: DC565) sowie ein Kurzpass-Exzitationsfilter (roGFP1: *Exciter* 492, DyLight550[®] *Exciter* 543) und ein Emissionsbandpassfilter (roGFP1: *Emitter* BP 525/50, DyLight550[®] *Emitter* BP 605/70) in den Strahlengang integriert. Mittels 4x Objektiv (Olympus, XLFluor, 0.28 NA) sowie eines 20x Wasserimmersionsobjektivs (Olympus, XLUMPlanF, 0.95 NA) wurden Übersichtsaufnahmen und detailliertere Aufnahmen der kortikalen bzw. hippocampalen Regionen erstellt, da diese im besonderen Fokus der Arbeitsgruppe Müller stehen. Die Software QCapture Suite[®] (QImaging, Surrey, British Columbia, Canada) steuerte die CCD-Kamera an, eine 2x2 Pixelreduktion verringerte die Daten zugunsten der Detektionsempfindlichkeit, bevor die Bilder in Metamorph Offline 7.5 (Molecular Devices) rekonstruiert und bearbeitet wurden. Da der Bildausschnitt zu

gering war, um den Sagittalschnitt des Mäusehirns als Ganzes zu erfassen, wurden mit dem 4x Objektiv acht einzelne Bilder aufgenommen und anschließend mittels Bildbearbeitungsprogramm CorelDRAW® (Graphics Suite X6, Corel) zu einem Übersichtsbild zusammengefügt.

2.5.2 Die 2-Photonen-Laser-Scanning-Mikroskopie

Das physikalische Prinzip der 2-Photonen-Laser-Scanning-Mikroskopie (*Two Photon Laser Scanning Microscopy*, TPLSM) wurde bereits 1931 von der Nobelpreisträgerin Maria Göppert-Mayer theoretisch beschrieben (Göppert-Mayer 1931), zur praktischen Umsetzung mangelte es damals jedoch an einem Laser für die Erzeugung der benötigten hohen Anregungsintensität. Nach der Erfindung des Lasers konnte die 2-Photonen-Absorption 1961 erstmals experimentell an fluoreszierenden Kalziumfluoridkristallen nachgewiesen werden (Kaiser und Garrett 1961). Im Feld der praktischen Mikroskopie wurde die TPLSM 1990 von der Arbeitsgruppe um Watt W. Webb etabliert (Denk et al. 1990).

Im Gegensatz zur klassischen Fluoreszenzmikroskopie, bei der das Fluorophor durch nur ein hochenergetisches Photon zur Fluoreszenzemission angeregt wird, basiert die Exzitation bei der TPLSM auf zwei Photonen doppelter Wellenlänge, d.h. halber Energie, die simultan absorbiert werden. Dadurch summiert sich die Anregungsenergie der beiden Photonen auf und erzeugt den gleichen Effekt wie ein Photon der halben Wellenlänge (Abbildung 14A).

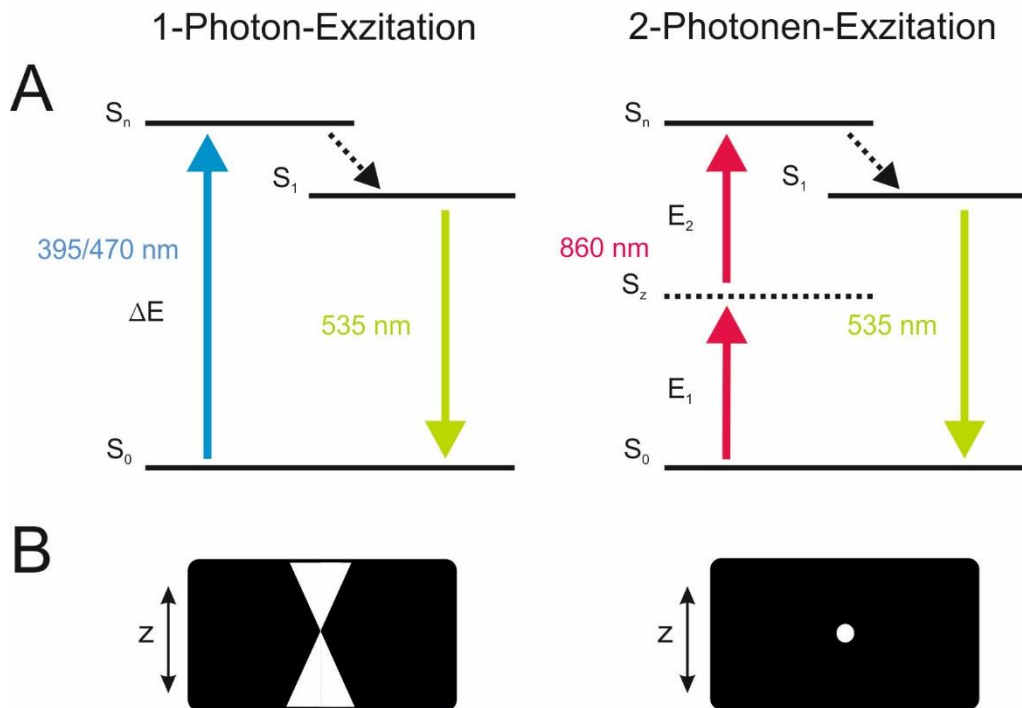


Abbildung 14: Prinzip der 1-Photon-Exzitation und der 2-Photonen-Exzitation im Vergleich

(A) Bei der 1-Photon-Exzitation wird ein Elektron durch Absorption eines Photons aus dem Grundzustand S_0 auf ein höheres Energieniveau S_n gehoben, gibt einen Teil der Energie an die Umgebung ab (S_1) und fällt dann spontan auf das Ausgangsenergieniveau S_0 zurück, wobei Fluoreszenzstrahlung emittiert wird. Bei der 2-Photonen-Exzitation erfolgt die Anregung durch die praktisch simultane Absorption zweier Photonen, deren Energien E_1 und E_2 zusammen die benötigte Energiedifferenz ΔE zum Erreichen des S_n -Zustandes ergeben. Dargestellt ist ein vereinfachtes Jablonski-Diagramm. S_z : Energetischer Zwischenzustand. **(B)** Während die Anregung bei der 1-Photon-Exzitation mit zunehmendem Abstand vom Fokus nur allmählich schwächer wird, ist die Fluoreszenzanregung bei der 2-Photonen-Exzitation nahezu auf den Brennpunkt beschränkt, da die Energie außerhalb des Fokus exponentiell abfällt und für eine 2-Photonen-Absorption nicht mehr ausreicht.

Die Vorteile dieses Mikroskopie-Prinzips sind vielfältig. So werden bei der TPLSM fast ausschließlich die Fluorophore im eng umschriebenen Fokus des Laserstrahls angeregt, weshalb das gesamte Fluoreszenzsignal im sogenannten Weit-Feld-Detektionsmodus (*non descanned*) erfasst werden kann. Anders als bei der konfokalen Mikroskopie wird keine Lochblende benötigt, um emittiertes Licht außerhalb des Fokus auszublenden, weil es praktisch keine Emission außerhalb des Brennpunktes gibt. Dies bedingt einen sehr guten Kontrast und dadurch letztlich eine hohe apparente räumliche Auflösung (Abbildung 14B). Mittels Scan-Spiegel wird das Präparat Pixel für Pixel in allen Ebenen des Raumes abgetastet und jedes Signal zeitlich einem bestimmten Bildpunkt zugeordnet, sodass ein hochauflösendes dreidimensionales Bild im Sub-Mikrobereich entsteht. Zudem streut das zur Anregung verwendete langwellige Infrarotlicht weniger als das bisher verwendete Licht aus dem blauen Spektrum und erzielt dadurch eine höhere Eindringtiefe in das Präparat.

Laserlicht längerer Wellenlänge hat außerdem einen geringeren phototoxischen Effekt auf das Gewebe und führt nur unmittelbar im Brennpunkt zu einem Bleichen der fluoreszierenden Moleküle.

Das von mir verwendete Messsystem basierte auf einem aufrechten Mikroskop (BX51 WI, Olympus), einem ultrakurz gepulsten Titan-Saphir-Laser (Mai Tai eHP DeepSee, Newport Spectra Physics) und einem TriM Scope II - Scan - Kopf mit integriertem Spiegelsystem, das den Laserstrahl mittels Steuerungssoftware ImSpectra (LasVision, BioTec) systematisch über das Präparat führte. Die emittierte Fluoreszenzstrahlung und das Laserlicht wurden durch einen 670 nm-Dichroiten (670DCXXR) im Strahlengang spektral voneinander getrennt. Mit dem Infrarot-Sperrfilter CalflexX[®] (HC680/SP) wurde der Durchtritt von Laserstreustrahlung in das Emissionssignal verhindert. Die Emissionsstrahlung wurde durch einen dichroitischen Spiegel (565DCXR) und zwei Bandpassfilter (grün: D535/40, rot: D617/73) in die grünen Anteile des roGFP1 und die roten des DyLight550[®] aufgeteilt und von zwei hochempfindlichen Photomultipliern (H7421/H7422 Serie, Hamamatsu) detektiert (Abbildung 15). Zusätzlich wurde die Trennung der Fluoreszenzsignale durch Anregung mit zwei unterschiedlichen Wellenlängen optimiert (roGFP1: 890 nm, Daylight550[®]: 1040 nm). Mit einem 20x Objektiv (XLUMPlanFI, Olympus, 0.95 NA) wurde das Expressionsmuster unterschiedlicher Hirnregionen visualisiert, während mit einem 63x Objektiv (Apochromat, Zeiss, 1.0 NA) Detaillaufnahmen einzelner Neurone und Mitochondrien erstellt werden konnten. Mittels TPLSM-System konnten neben PFA-fixierten Hirnpräparaten auch akute Schnitte analysiert werden. Diese wurden ähnlich dem Versuchsaufbau der Ratiometrie während der Messung in einer Tauchschnittkammer von erwärmter ACSF-Lösung umspült. Auch die mit Mitotracker[®] Red 580 gefärbten Zellkulturen wurden kontinuierlich mit ACSF-Lösung versorgt. Zur Anregung des roten Fluoreszenzsignals des Mitotrackers wurden Wellenlängen und Filtersysteme entsprechend der DyLight550[®]-Exzitation verwendet.

Für die Aufnahmen wurde typischerweise ein Bildausschnitt von 142,86x142,86 μm mit einer Auflösung von 999x999 Pixeln gewählt, was einer Pixelgröße von 143 nm entspricht. Mit einem z-Ebenen-Abstand von 250 nm wurden Bildstapel zwischen 3 und 12 μm Dicke erstellt, die im Anschluss mit der Bearbeitungssoftware Metamorph Offline[®] dreidimensional rekonstruiert wurden.

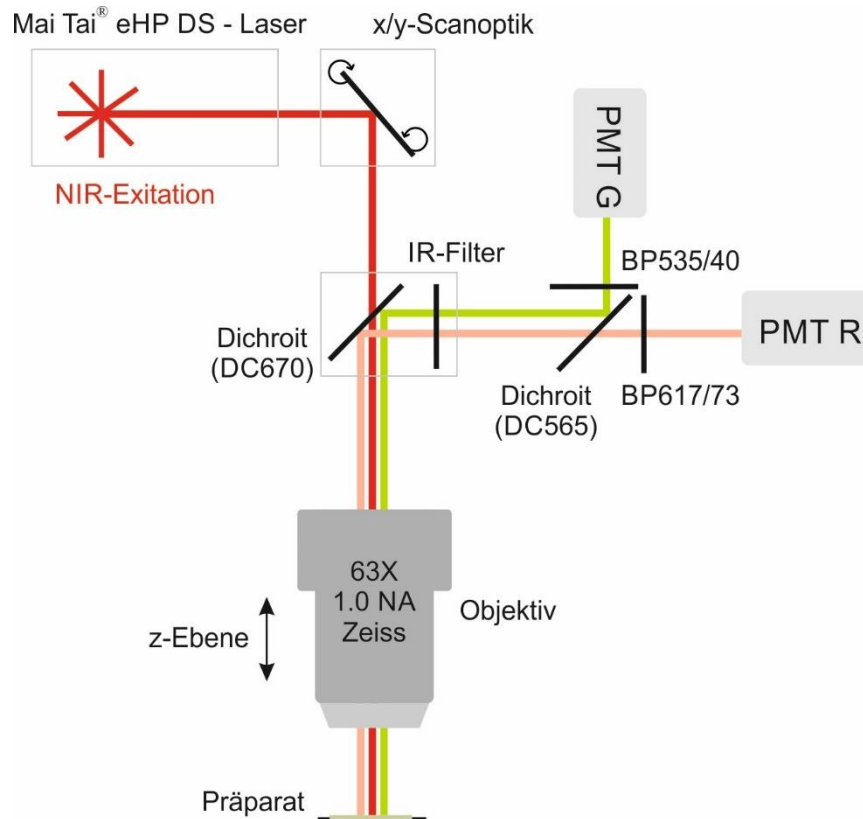


Abbildung 15: Schematischer Aufbau des 2-Photonen-Laser-Scanning-Mikroskops

Ein Spiegel im Scan-Kopf leitet den Laserstrahl definiert in x- und y- Ebene über das Präparat (x/y-Scanoptik). Die z-Ebene wird durch einen motorisierten Feintrieb des Mikroskops reguliert. Die Emissionsstrahlung wird durch ein vielfältiges Filtersystem spektral in rote und grüne Anteile getrennt und auf zwei Photomultiplier (PMT R, PMT G) aufgeteilt. NIR: *near infrared*, Laseranregung; BP: Bandpassfilter; DC: Dichroit; NA: numerische Apertur.

2.6 Zusammensetzung der Lösungen und verwendete Chemikalien

Sofern nicht anders erwähnt, wurden alle Chemikalien von Sigma-Aldrich Chemie GmbH bezogen.

Für die Genotypisierung der Tiere wurde von der Technischen Assistentin eine zehnfache Stammlösung des TRIS-Borat-EDTA-Puffers aus 0,89 M TRIS (Tris-aminomethan, Roth), 0,89 M Borsäure (Roth) und 0,02 M EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure) und ein Lysepuffer, bestehend aus 1 M TRIS, 5 M NaCl, 0,5 M EDTA und 10% SDS (Roth), hergestellt.

Die zur Präparation der akuten Hirnschnitte und zur optischen Messung verwendete artifizielle zerebrospinale Flüssigkeit (*artificial cerebrospinal fluid*, ACSF) setzte sich aus 130 mM NaCl, 3,5 mM KCl, 1,25 mM NaH_2PO_4 , 24 mM NaHCO_3 , 1,2 mM CaCl_2 ,

1,2 mM MgSO_4 und 10 mM Dextrose zusammen. Zur Herstellung eines Liters wurden zunächst 0,5 l ddH₂O (doppelt destilliertes Wasser) in einen Kolben vorgelegt und unter gleichmäßigem Schwenken mit je 1 M MgSO_4 - und CaCl_2 -Stammlösungen vermennt. Anschließend wurden die zehnfache ACSF-Stammlösung (NaCl , KCl , NaH_2PO_4 , NaHCO_3) und Dextrose beigefügt und das restliche Volumen mit ddH₂O ergänzt. Durch Einhalten dieser Reihenfolge wurde ein Ausfällen v.a. der divalenten Kationen vermieden. Die ACSF-Lösung wurde durchgehend mit Carbogen (95% O₂, 5% CO₂) begast, um einen konstanten pH-Wert von 7,4 einzustellen und die zwingend erforderliche Oxygenierung des Gewebes zu gewährleisten.

Die PBS-Lösung (*phosphate-buffered saline*, Phosphatgepufferte Salzlösung) für die Herstellung der immunhistochemisch gefärbten Hirnschnittpräparate bestand aus (in mM) 137 NaCl , 2,7 KCl und 12 Phosphatpuffer aus HPO_4^{2-} und H_2PO_4^- . Die Lösung wurde aus einer Stammlösung zehnfacher Konzentration hergestellt und mit 1 M Natronlauge auf einen pH-Wert von 7,4 titriert.

Zur Kalibrierung des ratiometrischen Antwortbereichs wurden H₂O₂ (Wasserstoffperoxid) und DTT (1,4-Dithio-DL-threitol) als Oxidations- bzw. Reduktionsmittel verwendet. Aus einer wässrigen H₂O₂-Stammlösung (8,8 M) wurde mit ddH₂O eine 1 M Lösung hergestellt und daraus unmittelbar vor dem Experiment eine 5 mM Lösung/ACSF angesetzt. Das DTT wurde dem ACSF direkt in gewünschter Konzentration (10 mM) beigefügt.

Antimycin A als Inhibitor der mitochondrialen Respiration wurde in reinem Ethanol gelöst und als 40 mM Stammlösung bei -20°C gelagert. Für das Experiment wurde durch Verdünnen mit ACSF die Endkonzentration von 20 μM erreicht. Der Superoxiddismutase-Inhibitor DEDTC (Diethyldithiocarbaminsäure) wurde 10 min lang in einem Kolben mit ACSF verrührt und für weitere 40 min im Wasserbad unter Carbogen-Begasung gelöst (5 mM).

Der Mitochondrienfarbstoff Mitotracker[®] Red 580 (Molecular Probes) wurde als 1 mM Stammlösung in DMSO (Dimethylsulfoxid) gelöst.

2.7 Statistik

Für die Datenerhebung dieser Arbeit wurden 74 Mäuse der roGFPm-Zucht herangezogen, wobei 41 Tiere einen transgenen und 33 einen Wildtypgenotyp aufwiesen. Für die Verhaltens- und Entwicklungstests wurden mindestens zwölf Versuchstiere in jeder Vergleichsgruppe verwendet. Die Stichprobengröße n beschreibt die Anzahl der

Versuchstiere, an denen das Experiment durchgeführt wurde. Eine Ausnahme stellt die ratiometrische Messung (Kapitel 2.4) dar. Hier steht n für die Anzahl der untersuchten Hirnschnitte, wobei 2-5 Schnitte pro Maus herangezogen wurden. Dennoch wurde für jede Messreihe sichergestellt, dass Gewebeschnitte mindestens drei verschiedener Tiere zum Einsatz kamen.

Für den Vergleich der transgenen Tiere mit ihren Wildtypgeschwistern wurden die erhobenen Daten quantitativ und statistisch mit Microsoft Excel[®] ausgewertet. Die Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen wurden mit dem ungepaarten zweiseitigen t-Test nach Student auf Signifikanz geprüft.

Ein zweiseitiger Einstichproben-t-Test ermittelte den Effekt der modulierenden Substanzen auf den Oxidationszustand des roGFP1, indem er die induzierte relative Veränderung mit dem *Baseline*- (Redox-Ruhe-niveau-) Oxidationswert als Ausgangsbedingung (definiert als 1,0 oder 100%) verglich. Ebenso wurde die Laufleistung des dritten Versuchstages beim Rota-Rod[®] mit der des zweiten verglichen, um einen möglichen Lernzuwachs festzustellen.

Die *Baseline*-Oxidationswerte der verschiedenen Hirnregionen wurden in einem Mehrfachvergleich mittels Varianzanalyse ANOVA (*analysis of variance*) untereinander verglichen, um mögliche signifikante Unterschiede auszumachen.

Die Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt. Genotypbedingte statistisch signifikante Unterschiede zwischen Wildtypen und transgenen Tieren wurden in den Abbildungen 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 (***) gekennzeichnet. Geschlechtsbedingte signifikante Unterschiede zwischen Männchen und Weibchen wurden nach dem gleichen Prinzip mit einem (#), zwei (##) oder drei (###) Doppelkreuzen markiert.

3 Ergebnisse

Gegenstand meiner Arbeit war die Charakterisierung eines transgenen Mausmodells, das den Redoxsensor roGFP1 spezifisch in den Mitochondrien der Nervenzellen exprimiert. Der Phänotyp der sogenannten roGFPm-Mäuse sowie das neuronale Expressionsmuster und die Sensoreigenschaften des roGFP1 wurden genau untersucht, um die mitochondriale Redoxindikator-Maus als zuverlässige Methode zur *in vitro* - Redoxmessung und möglicherweise sogar für zukünftige *in vivo* - Analysen zu etablieren.

3.1 Der roGFPm-Phänotyp

Um einen möglichen negativen Einfluss des Redoxsensors roGFP1 auf die Entwicklung der Mäuse zu erfassen, wurden diese hinsichtlich ihrer körperlichen Entwicklung, der Motorkoordination, des Explorationsverhaltens und der Atmungsregelmäßigkeit untersucht und mit den Wildtypgeschwistern verglichen.

3.1.1 Allgemeine Entwicklung

Aus fünf Foundertieren konnten zwei stabile Zuchtlinien aufgebaut werden, die sowohl männliche als auch weibliche transgene Nachkommen hervorgebracht, sodass eine autosomale Vererbung des roGFP1-Genkonstruktes angenommen werden konnte. Das Verhältnis von transgenen zu WT (Wildtyp) - Nachkommen verhielt sich entsprechend den Mendelschen Gesetzen ausgeglichen. Die Nachkommen waren fertil und die Zucht konnte bereits in die F3-Generation weitergeführt werden. Zum Zeitpunkt meiner Datenerhebung brachte die Founderlinie Nr. 4 die meisten Nachkommen hervor und zeigte zudem das gewünschte Expressionsmuster, sodass der Fokus meiner Untersuchungen auf diesen Tieren lag.

Rein optisch unterschieden sich die transgenen Mäuse im direkten Vergleich nicht von ihren Wildtypgeschwistern (Abbildung 16C).

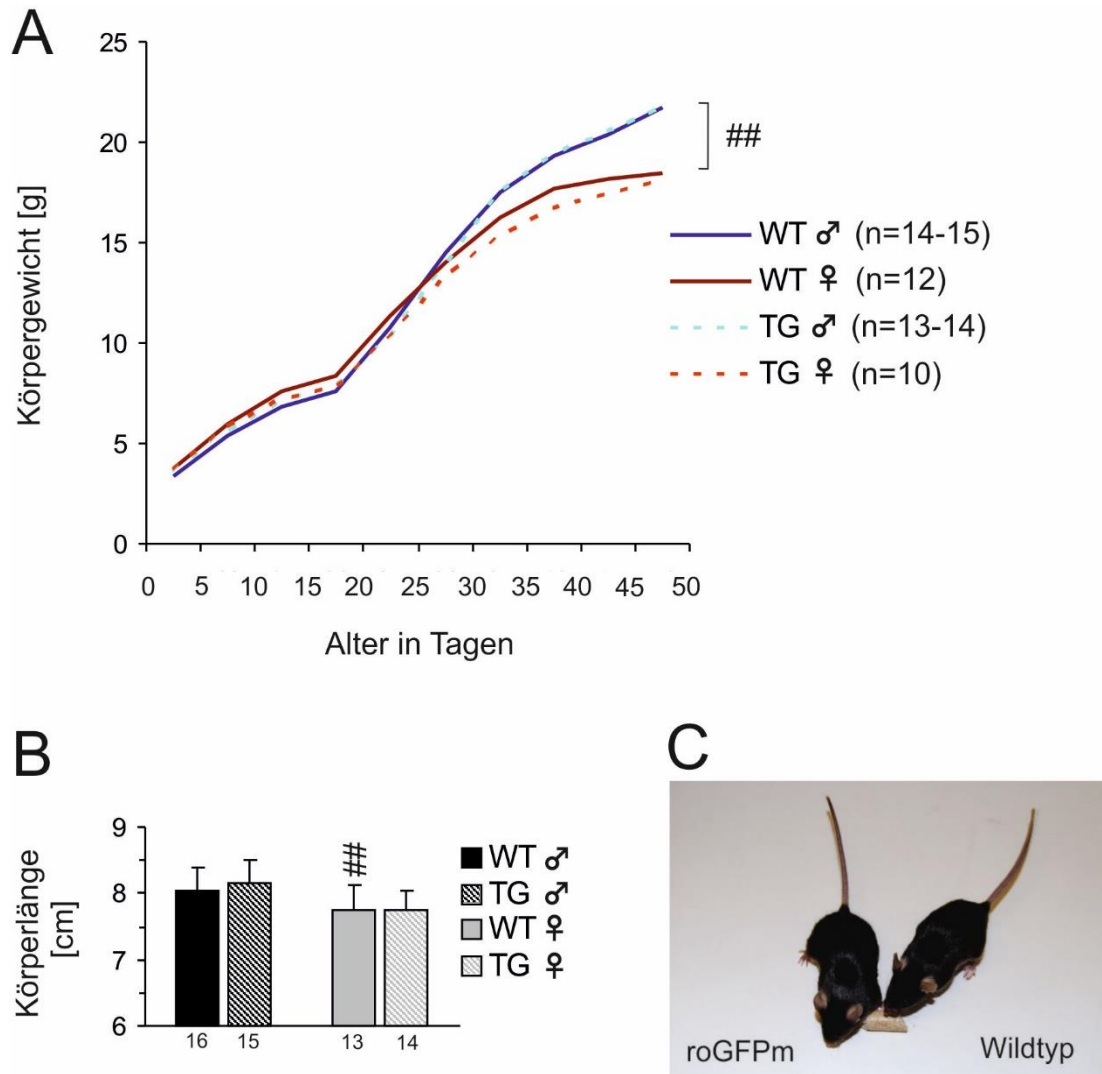


Abbildung 16: Beurteilung des Allgemeinzustandes der Tiere

(A) Körpergewichtszunahme der Tiere zwischen dem 5. und 50. Lebenstag. Der Übersicht halber wurde auf die Auftragung der Datenpunkte und Standardabweichungen verzichtet. Die roGFPm-Tiere nahmen in vergleichbarem Ausmaß Gewicht zu wie die Wildtypgeschwister. Ab dem 40. Lebenstag zeigten sich die transgenen Männchen, ab dem 45. Tag die WT-Männchen schwerer als die jeweiligen Weibchen (##: $p < 0,01$). (B) Durchschnittliche Körperlänge der jeweiligen Versuchsgruppe zum Zeitpunkt des Finalversuches (pd50-55). Signifikante Unterschiede zeigten sich zwischen den Geschlechtern (##: $p < 0,01$), nicht jedoch zwischen den transgenen und WT-Tieren. Die Stichprobengröße ist unter den Balken aufgetragen. WT♂: männliche Wildtypen; TG♂: männliche transgene Tiere; WT♀: weibliche Wildtypen; TG♀: weibliche transgene Tiere. (C) Zwei adulte (pd88) Männchen unterschiedlichen Genotyps aus einem Wurf. Optisch ließen sich keine Unterschiede ausmachen.

Um die körperliche Entwicklung genauer zu beurteilen, wurden die Tiere alle fünf Tage gewogen und die gemittelten Werte in einer Wachstumskurve aufgetragen (Abbildung 16A). Unter den 74 untersuchten Mäusen zeigte jeweils ein transgenes und ein WT-Männchen eine auffallend langsame Entwicklung und verstarb bereits im jugendlichen Alter (pd14, pd21). Abgesehen von diesen zwei Männchen nahmen alle Tiere

kontinuierlich an Gewicht zu und wiesen ähnlich verlaufende Wachstumskurven auf (Abbildung 16A): Nachdem die Tiere in den ersten drei postnatalen Wochen ein vergleichsweise rasches Wachstum zeigten, folgte eine Verzögerung der Gewichtszunahme ab dem 20. Lebenstag. Am stärksten ausgeprägt war das Wachstum in der vierten und fünften postnatalen Woche, während es sich mit Erreichen des jungen Erwachsenenalters (ab pd45) einer Plateauphase annäherte. Signifikante Gewichtsunterschiede zwischen den roGFPm-Mäusen und den gleichgeschlechtlichen Wildtyptieren zeigte sich dabei zu keinem Zeitpunkt der Entwicklung. Zwischen den Geschlechtern dagegen waren signifikante Unterschiede hinsichtlich des Körpergewichts ab dem frühen Erwachsenenalter (pd45) bei sowohl transgenen als auch WT-Tieren zu erkennen, wobei sich die männlichen Tiere in beiden Fällen schwerer als die weiblichen zeigten ($p < 0,01$) (Abbildung 16A). Auch die Körperlänge, die im Rahmen des Finalversuches gemessen wurde (pd50-pd55), war bei den transgenen Männchen signifikant höher als bei den transgenen Weibchen (Abbildung 16B).

Zwischen dem 50. und 55. postnatalen Tag wurden die Blutwerte der Mäuse im Rahmen des Finalversuches ermittelt. Die roGFPm-Männchen zeigten einen durchschnittlichen Blutzuckerwert von $205,8 \pm 21,7$ mg/dl ($n=12$) und unterschieden sich damit nicht signifikant von ihrer Vergleichsgruppe aus 16 WT-Männchen, die einen mittleren Wert von $208,2 \pm 32,0$ mg/dl aufwiesen. Auch bei den Weibchen waren beim Blutzuckerwert keine signifikanten Unterschiede zwischen transgenen und wildtypischen Tieren zu erkennen. Bei den transgenen Weibchen wurde ein Durchschnittswert von $188,8 \pm 24,3$ mg/dl ($n=13$) gemessen, während die WT-Weibchen im Mittel $182,1 \pm 21,5$ mg/dl ($n=13$) Glukose im Blut hatten. Ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) ließ sich lediglich zwischen den beiden Geschlechtern der WT-Tiere ermitteln (Abbildung 17A).

Hinsichtlich des Hämatokritwertes unterschieden sich die transgenen Tiere ebenfalls nicht von den Wildtypen. Der Wert der roGFPm-Männchen lag bei durchschnittlich $44,7 \pm 2,2\%$ ($n=12$), der der Wildtyp-Männchen bei $45,1 \pm 2,1\%$ ($n=16$). Bei den Weibchen zeigten die transgenen Tiere einen Durchschnittswert von $45,3 \pm 1,6\%$ ($n=13$) und die Wildtypen einen von $44,5 \pm 2,6\%$ ($n=13$). Auch zwischen den Geschlechtern innerhalb eines Genotyps konnte beim Hämatokrit, anders als beim Blutzuckerwert, kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (Abbildung 17B).

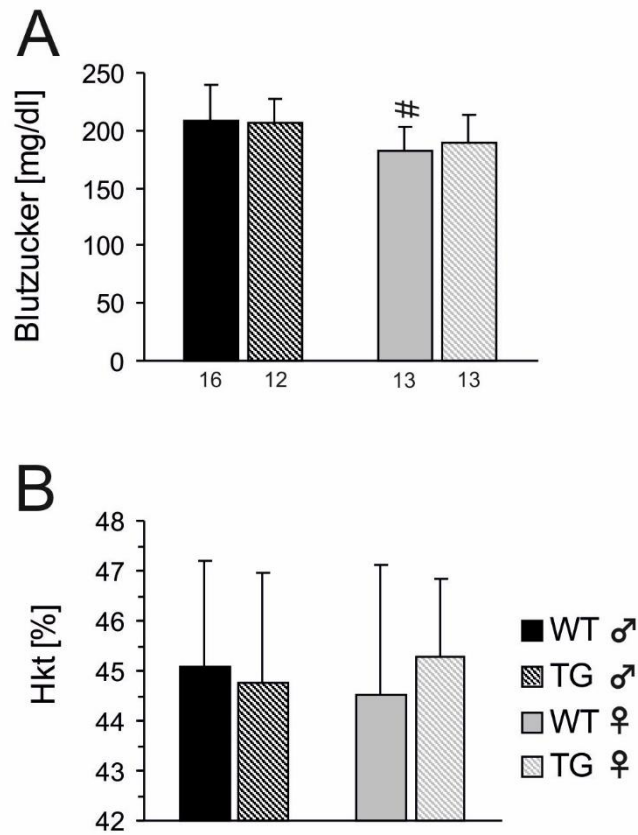


Abbildung 17: Blutwerte zum Zeitpunkt des finalen Experiments

(A) Gemittelte Blutzuckerwerte der vier Vergleichsgruppen. Signifikante Unterschiede zwischen den Geschlechtern sind durch das Doppelkreuz markiert (#: $p < 0,05$). Die Stichprobengrößen sind unter den jeweiligen Balken vermerkt. (B) Mittlere Hämatokritwerte der Vergleichsgruppen. Es waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen oder den Geschlechtern auszumachen. Die Stichprobengröße entspricht der in (A). WT♂: männliche Wildtypen; TG♂: männliche transgene Tiere; WT♀: weibliche Wildtypen; TG♀: weibliche transgene Tiere.

3.1.2 Motorkoordination und Explorationsverhalten

Zur Beurteilung der Motorkoordination der Mäuse und ihres motorischen Lernverhaltens wurde ein Rota-Rod®-Test durchgeführt. Dabei wurde ermittelt, wie lange sich die Tiere der unterschiedlichen Vergleichsgruppen an drei aufeinander folgenden Messtagen auf der sich zunehmend schneller rotierenden Walze halten konnten. Mögliche motorische Einschränkungen oder neuronale Defizite der transgenen Mäuse sollten dadurch aufgedeckt werden.

Bei den Männchen liefen die roGFPm-Tiere ($n=18$) am ersten Versuchstag durchschnittlich $140,7 \pm 74,3$ s, am zweiten $165,3 \pm 75,5$ s und am dritten $203,7 \pm 62,4$ s

lang auf dem Rota-Rod[®]. Im Vergleich dazu konnten sich die Wildtyp-Männchen (n=17) im Mittel $105,5 \pm 78,1$ s am ersten, $134,1 \pm 74,5$ s am zweiten und $156,9 \pm 68,8$ s am dritten Messtag auf der rotierenden Stange halten. Für alle drei Versuchstage zeigten die transgenen Tiere einen Trend hin zu höheren Laufzeiten als die Wildtypgruppe (Tag 1: $p=0,18$; Tag 2 $p=0,23$; Tag 3: $p=0,04$). Das Signifikanzniveau ($p<0,05$) wurde dabei jedoch nur für den dritten Versuchstag erreicht (Abbildung 18).

Bei den Weibchen konnten sich die transgenen Tiere (n=17) am ersten Versuchstag $121,1 \pm 73,2$ s, am zweiten $184,1 \pm 51,4$ s und am dritten $243,1$ s auf dem Laufrad halten. Die weiblichen Wildtypen (n=13) liefen dagegen durchschnittlich $98,9 \pm 72,3$ s, $143,9 \pm 81,4$ s und $186,5 \pm 61,4$ s lang auf dem Rota-Rod[®]. Wie bei den transgenen Männchen, liefen auch die transgenen Weibchen an allen drei Versuchstagen tendenziell länger auf dem Laufrad als ihre wildtypische Vergleichsgruppe (Tag 1: $p=0,42$, Tag 2: $p=0,11$, Tag 3: $p=0,02$). Signifikante Unterschiede zeigten sich wiederum nur für den dritten Tag ($p<0,05$) (Abbildung 18).

Der erste Versuchstag galt den Tieren zur Adaption an das Testverfahren. Um den motorischen Lernzuwachs zu beurteilen, wurde die Verbesserung der durchschnittlichen Laufleistung vom zweiten auf den dritten Versuchstag für jede Testgruppe bestimmt. Bei den männlichen Tieren zeigten die transgenen einen durchschnittlichen Lernzuwachs von $158,7 \pm 127,7\%$ und unterschieden sich damit nicht signifikant von den Wildtypen ($130,9 \pm 46,8\%$). Die weiblichen roGFPm-Tiere verbesserten sich im Mittel um $161,7 \pm 80,4\%$, die weiblichen Wildtypen um $134,9 \pm 53,6\%$. Für alle Versuchsgruppen war die Streuung der Werte so hoch, dass die durchschnittliche Laufleistung vom dritten Tag gegenüber dem zweiten keinen signifikanten Lernzuwachs zeigte.

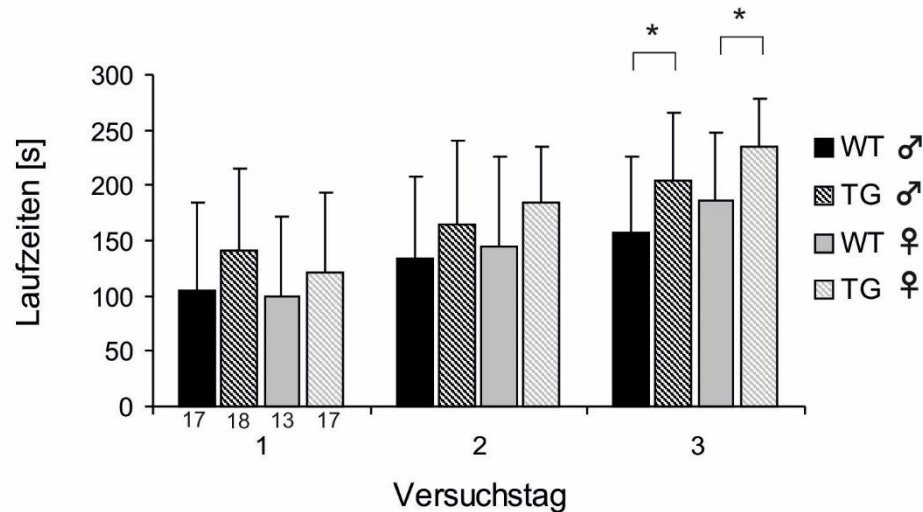


Abbildung 18: Motorkoordination und motorisches Lernen

Ergebnisse des Rota-Rod®-Tests: Dargestellt sind die durchschnittlichen Laufzeiten der vier Versuchsgruppen an drei aufeinanderfolgenden Versuchstagen. Signifikante Unterschiede zwischen roGFPm- und WT-Tieren hinsichtlich der Laufzeiten wurden mit einem Stern markiert (*: $p < 0,05$). Am dritten Versuchstag konnten sich die roGFPm-Tiere beider Geschlechter signifikant länger auf dem Rota-Rod® halten als die jeweilige WT-Vergleichsgruppe. WT♂: männliche Wildtypen; TG♂: männliche transgene Tiere; WT♀: weibliche Wildtypen; TG♀: weibliche transgene Tiere.

Das Explorationsverhalten der Mäuse wurde mit Hilfe des Open-Field-Tests untersucht. Dabei konnten sich die Tiere fünf Minuten lang frei innerhalb einer Testfläche bewegen und die für sie neuartige Umgebung erkunden. Gemessen wurde die prozentuale Verweildauer der Tiere in drei zuvor definierten Zonen (Ecken, Kanten, Zentrum), die zurückgelegte Laufdistanz, die mittlere Laufgeschwindigkeit, der Anteil der Bewegungspausen sowie die Häufigkeit, mit der sich die Tiere aufrichteten. Um auf dieser Grundlage mögliche Verhaltensauffälligkeiten oder neuronale Defizite der transgenen Tiere zu ermitteln, wurde das so erstellte Bewegungsprofil mit dem der Wildtypgeschwister verglichen (Abbildung 19).

Bei den Männchen hielten sich die transgenen Tiere ($n=15$) während der Messung zu $59,4 \pm 12,1\%$ der Zeit in den Ecken, zu $34,2 \pm 10,0\%$ im Bereich der Kanten und zu $6,4 \pm 3,5\%$ der Zeit im Zentrum der Testfläche auf. Im Vergleich dazu befanden sich die WT-Männchen ($n=15$) zu $60,3 \pm 11,7\%$ in den Ecken, zu $32,7 \pm 9,3\%$ im Kantenbereich und zu $6,7 \pm 5,1\%$ der Messdauer im Zentrum (Abbildung 19A). Diese Verteilung ließ keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Vergleichsgruppen erkennen. Die mittlere Laufgeschwindigkeit betrug $4,8 \pm 1,0$ cm/s bei den roGFPm-Männchen und $4,9 \pm 1,1$ cm/s bei den Wildtypen (Abbildung 19C), die zurückgelegte Laufdistanz bei den transgenen Tieren $14,5 \pm 3,1$ m und bei den WT-Tieren $14,6 \pm 3,4$ m (Abbildung 19B).

Die Zeit, in der sich die Tiere nicht bewegten, wurde prozentual auf die Gesamtmessdauer bezogen und betrug $32,1 \pm 8,0\%$ für die roGFPm- und $33,9 \pm 8,8\%$ für die WT-Männchen (Abbildung 19D). Die transgenen Männchen richteten sich im Durchschnitt $41,3 \pm 14,8$ -mal auf, die WT-Männchen dagegen $30,1 \pm 12,8$ -mal (Abbildung 19E). Auch hierbei wichen die erhobenen Parameter der roGFPm-Männchen nicht signifikant von denen der WT-Männchen ab.

Bei den Weibchen hielten sich die transgenen Tiere ($n=17$) zu $55,4 \pm 10,6\%$ der Testphase in den Ecken, zu $35,4 \pm 8,0\%$ im Bereich der Kanten und zu $8,3 \pm 4,2\%$ in der zentralen Zone auf. Damit zeigten auch sie hinsichtlich der Verweildauer keinen signifikanten Unterschied zu den WT-Weibchen ($n=13$) (Ecken: $58,5 \pm 12,4\%$; Kanten: $33,7 \pm 9,1$; Zentrum: $7,8 \pm 4,9\%$) (Abbildung 19A). Mit einer mittleren Laufgeschwindigkeit von $6,3 \pm 1,6$ cm/s und einer durchschnittlich zurückgelegten Strecke von $19,0 \pm 4,1$ m unterschieden die roGFPm-Weibchen sich ebenfalls nicht signifikant von den WT-Weibchen ($5,9 \pm 1,5$ cm/s; $17,7 \pm 4,5$ m) (Abbildung 19C und B). Auch im Hinblick auf die eingelegten Bewegungspausen wiesen die Vergleichsgruppen keine Unterschiede auf (roGFPm: $24,0 \pm 9,7\%$ vs. WT: $28,7 \pm 9,7\%$) (Abbildung 19D). Allerdings richteten sich die transgenen Weibchen im Open-Field durchschnittlich $48,6 \pm 21,7$ -mal auf und verhielten sich damit signifikant ($p<0,05$) aktiver als ihre WT-Geschwister, die sich lediglich $33,0 \pm 10,6$ -mal aufrichteten (Abbildung 19E).

Abgesehen davon unterschied sich das Explorationsverhalten teilweise signifikant zwischen den beiden Geschlechtern innerhalb eines Genotyps. So wiesen sowohl die transgenen als auch die WT-Weibchen eine höhere Durchschnittsgeschwindigkeit und eine größere zurückgelegte Laufstrecke als die jeweiligen Männchen auf (Abbildung 19C und B). Zudem legten die weiblichen roGFPm-Tiere signifikant weniger Bewegungspausen ein als die männlichen (Abbildung 19D).

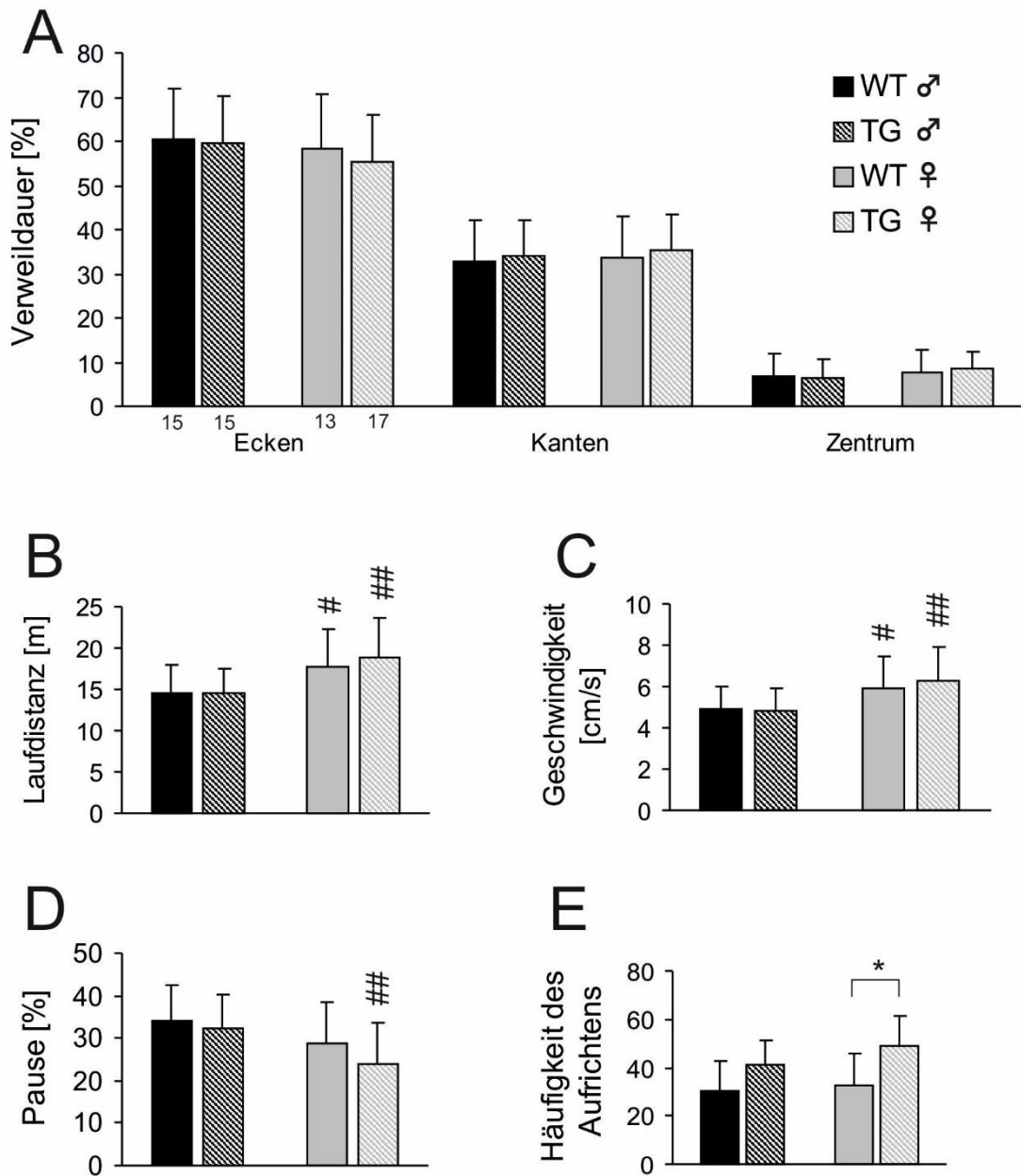


Abbildung 19: Explorationsverhalten der Mäuse im Open-Field

(A) Prozentuale Verweildauer der vier Versuchsgruppen in den unterschiedlichen Testarealen, (B) die zurückgelegte Laufdistanz, (C) die durchschnittliche Laufgeschwindigkeit, (D) der Anteil an Bewegungspausen und (E) wie häufig sich die jeweiligen Tiere aufrichteten. Signifikante Unterschiede zwischen den transgenen und den WT-Tieren wurden durch einen Stern markiert (*: $p < 0,05$), Unterschiede zwischen den Geschlechtern durch das Doppelkreuz (#: $p < 0,05$; ##: $p < 0,01$). Die Stichprobengröße n ist stellvertretend in (A) angegeben. WT♂: männliche Wildtypen; TG♂: männliche transgene Tiere; WT♀: weibliche Wildtypen; TG♀: weibliche transgene Tiere.

3.1.3 Plethysmographische Analysen

Als nächstes wurden mittels Ganzkörperplethysmographie unterschiedliche Atemparameter der roGFPm-Tiere und der Wildtypen erhoben, um einen potentiellen Einfluss des roGFP1 der neuronalen Mitochondrien auf das Atemverhalten zu ermitteln.

Sowohl die transgenen Männchen als auch die transgenen Weibchen zeigten eine höhere Atemfrequenz als die Wildtypen (Abbildung 20A und B). Die transgenen Männchen (n=11) unterschieden sich mit 470 ± 55 Atemzügen pro Minute (*breath per minute*, BPM) signifikant von den WT-Männchen (395 ± 45 BPM, n=17), die transgenen Weibchen atmeten mit 489 ± 49 BPM (n=12) ebenfalls signifikant schneller als ihre Vergleichsgruppe (431 ± 52 BPM, n=13) (Abbildung 20B). Um zu beurteilen, ob die roGFPm-Tiere lediglich eine schnellere, aber flachere Atmung, oder auch einen erhöhten Sauerstoffverbrauch zeigten, wurde das Atemminutenvolumen (AMV) bestimmt. Allerdings konnten Temperatur und Luftfeuchtigkeit der Messkammer nicht erfasst werden, weshalb keine absoluten Atemzugvolumina und dadurch auch keine absoluten Minutenvolumina errechnet und verglichen werden konnten. Von den durch Ponemah v5 erhobenen, nicht absoluten Zugvolumina wurden bei jeder Maus zunächst die 20% Ausreißer verworfen, der Wert gemittelt und mit dem BPM-Wert multipliziert, um den (ebenfalls nicht absoluten) Wert für das Atemminutenvolumen zu erhalten. Das so erhobene durchschnittliche AMV der WT-Männchen bzw. Weibchen wurde als 100% normiert und die relativen Abweichungen der jeweiligen transgenen Vergleichsgruppen ermittelt (Abbildung 20C). Dabei zeigten sich weder zwischen den roGFPm- und den WT-Tieren noch zwischen den Geschlechtern signifikant unterschiedliche AMV. Der errechnete Irregularitäts-Parameter diente der Erfassung von Schwankungen in der Frequenz aufeinander folgender Atemzyklen. Auch er zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den transgenen und den WT-Tieren. Die männlichen Wildtypen atmeten allerdings signifikant ($p < 0,05$) unregelmäßiger als die weiblichen Wildtypen, sodass hier also lediglich ein Unterschied zwischen den Geschlechtern festgestellt werden konnte (Abbildung 20D). Atemaussetzer > 1 s, die als Apnoe gewertet wurden, zeigten sich in allen Versuchsgruppen bei einzelnen Tieren. Weder zwischen roGFPm- und WT-Tieren noch zwischen den Geschlechtern konnten hierbei signifikante Unterschiede ermittelt werden.

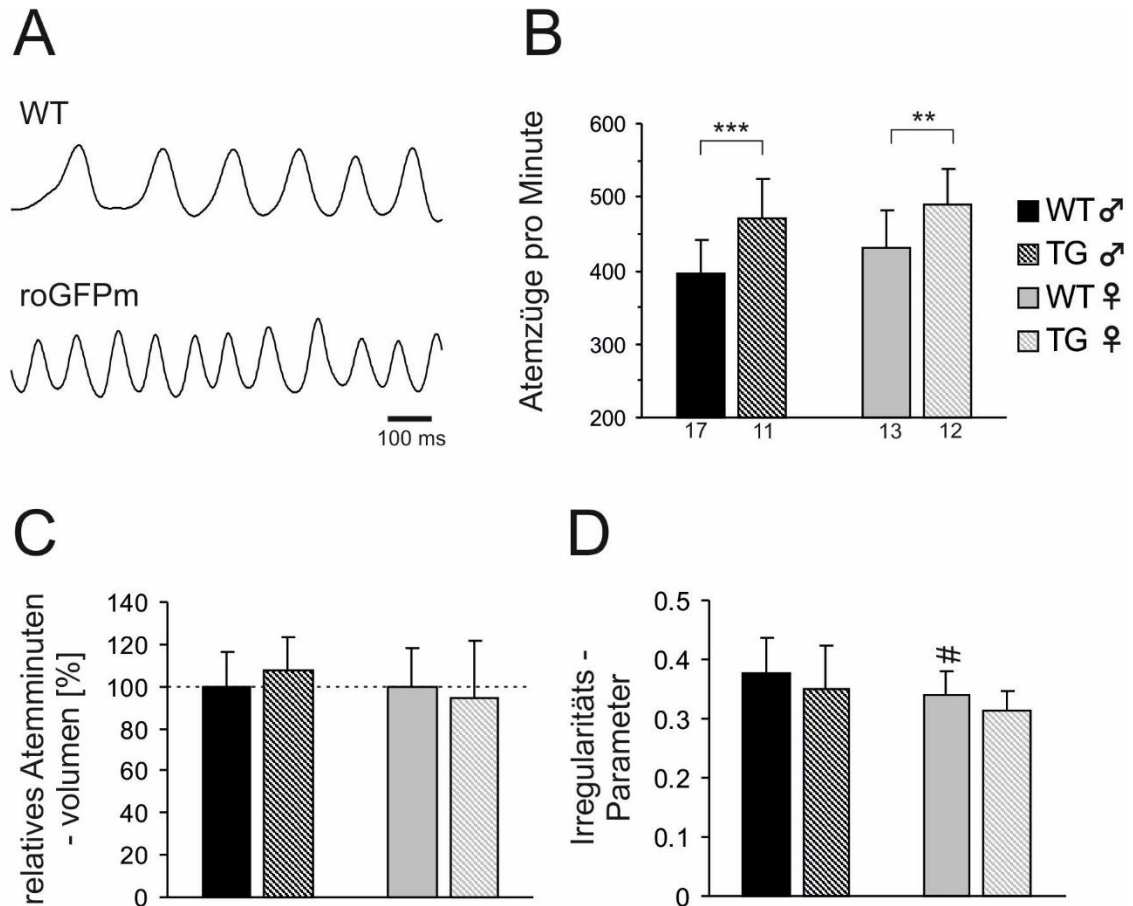


Abbildung 20: Analyse des Atemverhaltens

(A) Beispielhafte Messung eines adulten männlichen WT- und roGFPm-Tieres im Vergleich. Die Messspur stellt die Atemereignisse innerhalb einer Sekunde dar. (B) Gemittelte Anzahl der Atemzüge pro Minute der jeweiligen Vergleichsgruppen. Sowohl die männlichen als auch die weiblichen roGFPm-Tiere atmeten signifikant häufiger als die jeweiligen WT-Tiere (***: $p > 0,001$; **: $p < 0,01$). (C) Die relativen Atemminutenvolumina der transgenen Tiere wurden auf die auf 100% normierten Volumina der WT-Tiere bezogen. Es zeigten sich keine signifikant erhöhten oder erniedrigten Atemminutenvolumina unter den Vergleichsgruppen. (D) Das Diagramm vergleicht den Irregularitäts-Parameter der vier Versuchsgruppen. Bei den Wildtyptieren atmeten die Männchen unregelmäßiger als die Weibchen (#: $p < 0,05$). Die Stichprobengröße n ist stellvertretend in (B) angegeben.

3.2 Das mitochondriale roGFP1-Expressionsmuster

Die fluoreszierenden Eigenschaften des roGFP1 machten es möglich, das Expressionsmuster des Redoxsensors mittels mikroskopischer Verfahren im Detail zu analysieren. Da das Expressionsmuster zwischen den Founderlinien wegen der unterschiedlichen Insertionsstellen des Transgens im Genom und der variablen Anzahl der Genkopien durchaus variieren kann (Feng et al. 2000), wurden Tiere mehrerer Linien untersucht. Diese Analysen erfolgten an akutem und perfusionsfixiertem Hirngewebe.

Um die Neuronenspezifität des roGFP1 nachzuweisen, wurden 30 µm dicke PFA-fixierte Schnitte mit dem nervenzellspezifischen Antikörper NeuN (DyLight550[®]) immunhistochemisch gegengefärbt (Kapitel 2.3.2). Dieser Marker färbt den Nukleus und in schwächerem Ausmaß das Soma einer Vielzahl von Nervenzellsubtypen und emittiert bei entsprechender Anregung eine rote Fluoreszenz. Durch die parallele Darstellung der NeuN- und roGFPm-Fluoreszenz in einer Abbildung (*Overlay*-Darstellung) konnte die genaue subzelluläre Anordnung der Mitochondrien in Bezug zum Nukleus veranschaulicht und dadurch die neuronenspezifische Expression des roGFPm belegt werden. Zudem ermöglichte es die Gegenfärbung, eine quantitative Aussage über die roGFP1-exprimierenden Zellen zu treffen. So war es möglich, den Anteil an Neuronen, die in ihren Mitochondrien roGFP1 bildeten (roGFP1-positive Zellen), an allen NeuN-markierten Nervenzellen der Region zu ermitteln. Zum Nachweis der Mitochondrienspezifität wurden die Neurone mit einem spezifischen mitochondrialen Marker (Mitotracker[®] Red 580) gegengefärbt.

Zur Beurteilung der mitochondrialen roGFP1-Expression wurden 16 transgene Tiere analysiert. Darunter befanden sich Tiere beider Geschlechter und unterschiedlichen Alters (pd2-pd139) aus unterschiedlichen Founderlinien.

Zunächst wurden mit dem klassischen Fluoreszenzmikroskop Übersichtsaufnahmen (4x Objektiv, 0.28 NA) und Aufnahmen in stärkerer Vergrößerung (20x Objektiv, 0.95 NA) erstellt. Anschließend wurden hochauflösende Detailaufnahmen der einzelnen Zellen und sogar Zellkompartimente mit dem 2-Photonen-Laser-Scanning-Mikroskop (63x Objektiv, 1.0 NA) aufgenommen.

In einer Übersichtsaufnahme des gesamten Sagittalschnitts der adulten roGFPm-Maus konnte das grün fluoreszierende Protein in nahezu allen Bereichen des Gehirns nachgewiesen werden (Abbildung 21). Eine besonders deutliche Expression wurde in der Hippokampusformation, der Großhirnrinde und dem Kleinhirn festgestellt, sodass von diesen Bereichen höher auflösende Bilder zur genaueren Analyse erstellt wurden. Eine vergleichsweise starke roGFPm-Expression fiel zudem im piriformen Kortex, im *Colliculus inferior* sowie in Kernbereichen des Hirnstammes (Olivenkomplex, Trigeminuskern, *Formatio reticularis*) auf. Eine etwas schwächere aber ebenfalls gut erkennbare Expression zeigten die subkortikalen Bereiche des Thalamus und des Striatum (Abbildung 21).

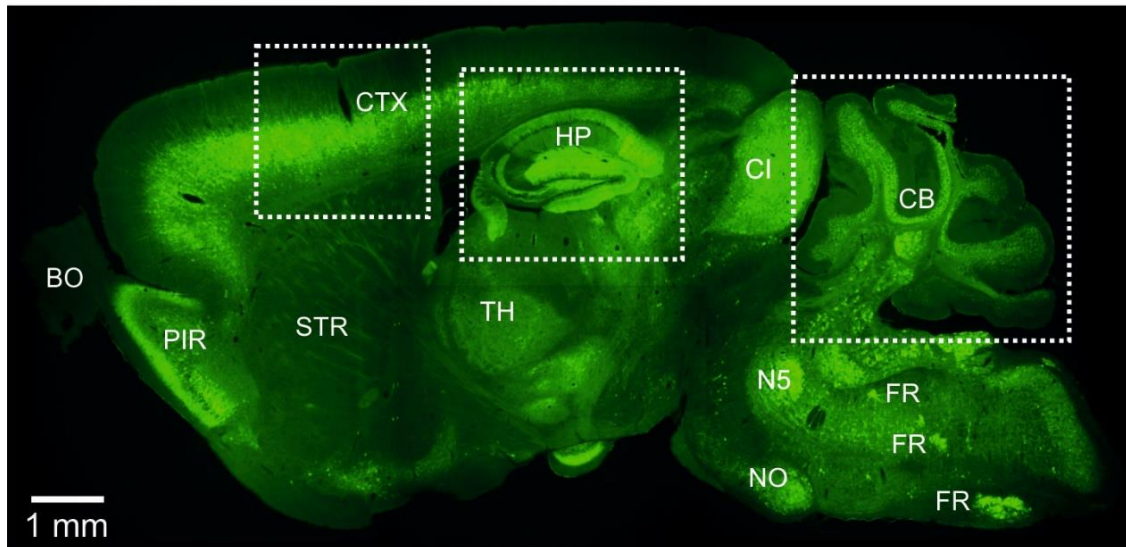


Abbildung 21: Rekonstruierter Sagittalschnitt eines adulten roGFPm-Weibchen (pd55)

Mittels klassischer Fluoreszenzmikroskopie (4x Objektiv, 0.28 NA) wurden acht einzelne Aufnahmen in CorelDRAW® zu einer Übersichtsaufnahme des Mäusehirns zusammengefügt. Die markierten Regionen des Kortex (*Cortex*, CTX), des Hippokampus (HP) und des Kleinhirns (*Cerebellum*, CB) sollten im Folgenden genauer analysiert werden. Im Hirnstamm zeigten Kerngebiete des Olivenkomplexes (*Nuclei olivares*, NO) und des fünften Hirnnervens (N5) sowie der sich diffus durch den Hirnstamm erstreckenden *Formatio reticularis* (FR) eine kräftige roGFP1-Expression. CI: *Colliculus inferior*; PIR: piriformer Kortex; STR: Striatum; TH: Thalamus; BO: *Bulbus olfactorius*.

Bei der Untersuchung der Hippokampusformation lässt sich in der CA1-Region in der Übersichtsaufnahme (Abbildung 22B, links) eine deutliche roGFP1-Expression des faserreichen *Stratum oriens* erkennen. Hier verlaufen die basalen Zellfortsätze der Pyramidenzellen. Auch das *Stratum radiatum*, in dem die apikalen Dendriten der Pyramidenzellen verlaufen, zeigt eine kräftige roGFP1-Expression. Das *Stratum pyramidale* mit den Zellkörpern der Pyramidenzellen weist dagegen eine vergleichsweise schwache Färbung auf. Dies liegt zum einen daran, dass nicht alle Nervenzellen roGFP1 exprimieren. Betrachtet man die *Overlay*-Abbildung (Abbildung 22B, rechts), erkennt man, dass in dem gewählten Ausschnitt der Pyramidenzellschicht nur ca. 25% aller Nervenzellen roGFP1 enthalten. Zum anderen scheinen die Mitochondrien durch den prominenten Nukleus an den Rand des Somas gedrängt zu werden, sodass die Pyramidenzellschicht, in der hauptsächlich Somata liegen, wenig fluoreszierende Strukturen enthält. Die Detailaufnahme des 2-Photonen-Mikroskops lässt deutlich erkennen, wie die Mitochondrien einen schmalen Saum um den NeuN-gefärbten Zellkern bilden (Abbildung 22B, rechts).

In der CA3-Region zeigt sich ein ähnliches Expressionsmuster wie in der CA1-Region. Eine für die CA3-Region spezifische Zellschicht ist das *Stratum lucidum*. Sie befindet sich

zwischen dem *Stratum pyramidale* und dem *Stratum radiatum* und enthält die sogenannten Moosfasern, die als Efferenzen des Gyrus dentatus auf die Pyramidenzellen der CA3-Region projizieren. Das *Stratum lucidum* zeigt eine auffallend starke roGFP1-Expression (Abbildung 22C, links). Das Pyramidenzellband dagegen weist eine noch schwächere Fluoreszenz als in der CA1-Region auf. In der Detailaufnahme zeigt nur ein Neuron des Bildausschnittes eine grüne Fluoreszenz (Abbildung 22C, rechts). In allen betrachteten Schnitten der CA3-Region exprimierten durchschnittlich weniger als 10% der Pyramidenzellen roGFP1.

Eine besonders intensive Färbung zeigt sich im Gyrus dentatus des Hippokampus. Vor allem die faserreiche *Lamina molecularis*, in der die Dendriten der Körnerzellen verlaufen, weist eine auffallend kräftige Färbung auf. Auch die Körnerzellen der *Lamina granularis* fluoreszieren deutlich. Der Anteil roGFP1-positiver Neurone liegt hier mit ca. 90% deutlich höher als in den Pyramidenzellschichten von CA1 und CA3. Auch in dieser zellreichen Schicht zeigt sich das Phänomen, dass der Nukleus die fluoreszierenden Mitochondrien an den Rand des Somas drängt. In der *Lamina plexiformis* verlassen die Axone der Körnerzellen als so genannte Moosfasern den Gyrus dentatus und projizieren in die anderen Hippokampusregionen. In der NeuN-Gegenfärbung lassen sich im plexiformen Gyrus dentatus zudem vereinzelte Nervenzellkörper anfärben. Diese inhomogene Schicht ist also ein Nebeneinander von Zellen und Fasern. Sie weist wie der übrige Gyrus dentatus eine deutliche roGFP1-Expression auf (Abbildung 22D).

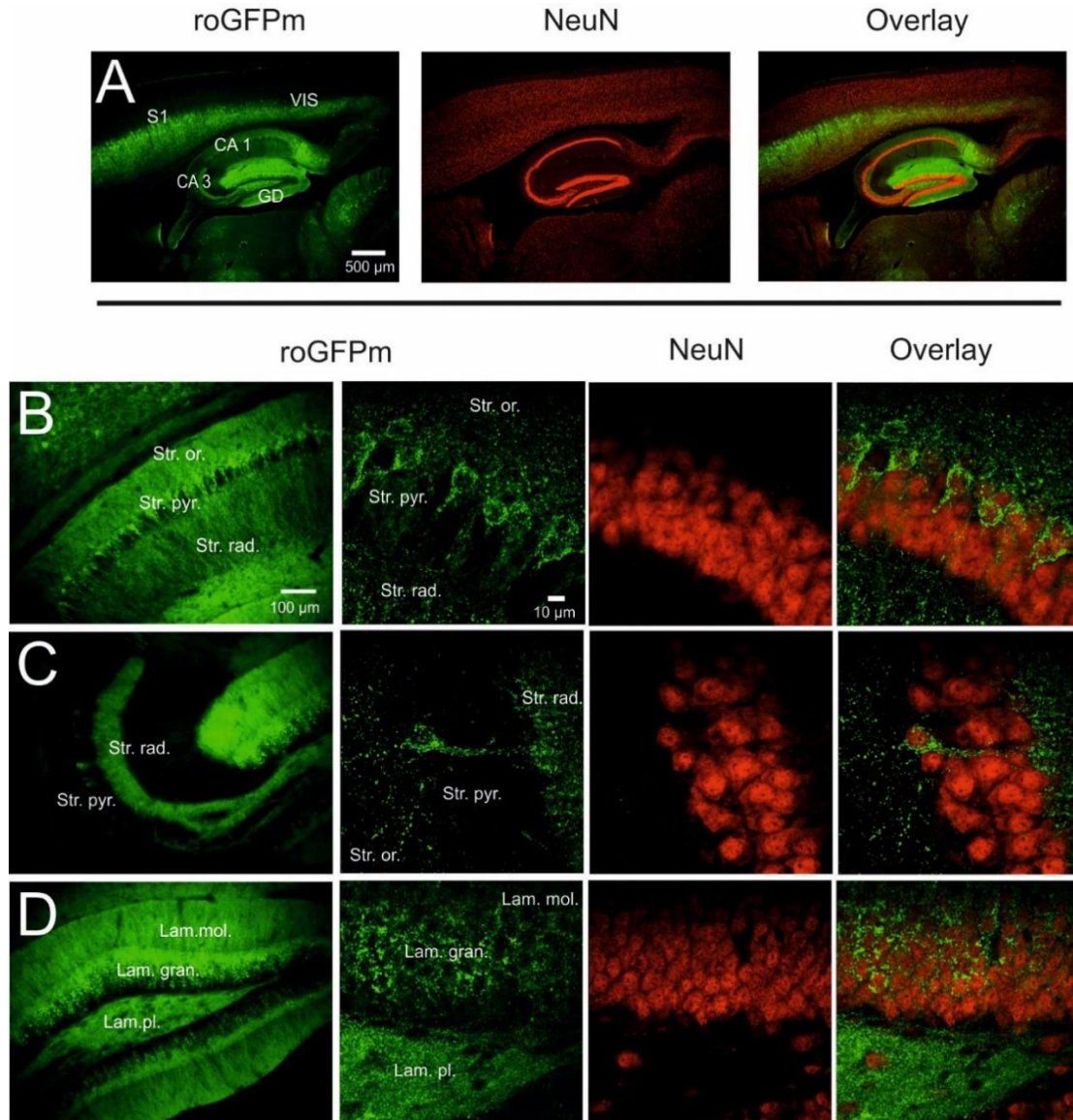


Abbildung 22: RoGFP1-Expression des Hippokampus

(A) Die Übersichtsaufnahme des Sagittalschnitts erfasst die Hippokampusformation mit der CA1-Region, der CA3-Region und dem Gyrus dentatus (GD) sowie angrenzende kortikale Areale eines 55 Tage alten roGFPm-Weibchens. Die NeuN-Färbung lässt ein deutliches Band aus dicht gepackten Nervenzellkörpern erkennen. In der *Overlay*-Darstellung fällt eine konträre Fluoreszenz der faserreichen und der zellreichen Regionen auf. **(B)** Analyse der CA1-Region: Das faserreiche *Stratum oriens* (Str. or.) und *Stratum radiatum* (Str. rad.) fluoreszieren deutlich, die Pyramidenzellschicht (Str. pyr.) dagegen vergleichsweise schwach. In den Detailaufnahmen sind die einzelnen Mitochondrien zu erkennen. Die NeuN-Gegenfärbung verdeutlicht die zentrifugale Anordnung dieser Organellen um den Zellkern herum. **(C)** Das *Str. pyramidale* der CA3-Region zeigt den geringsten Anteil roGFP1-positiver Neuronen. In der *Overlay*-Darstellung zeigt nur eine der zahlreichen NeuN-gefärbten Zellen eine grüne Fluoreszenz. **(D)** Im Gyrus dentatus zeigt die Körnerzellschicht (Lam. gran.) einen hohen Anteil roGFP1-positiver Neurone. Auch die *Lamina molecularis* (Lam. mol.) und die *Lamina plexiformis* (Lam. pl.) fluoreszieren hier besonders stark. **(B-D)** V.l.n.r. zeigt das jeweils erste Bild der Reihe den Hippokampus eines adulten Weibchens (pd55) in der Vergrößerung des Fluoreszenzmikroskops (20x Objektiv, 0,95 NA). Die anderen drei Aufnahmen wurden mit dem 2-Photonen-Laser-Scanning-Mikroskop (63x Objektiv, 1,0 NA) und entsprechend hoher Auflösung an einem roGFPm-Männchen (pd50) erstellt. S1: primärer sensibler Kortex; VIS: visuelle Rindenareale.

Auch die Neurone der Großhirnrinde exprimieren roGFP1 (Abbildung 23). Während die NeuN-Gegenfärbung Neurone aller kortikalen Schichten darstellt, beschränkt sich die roGFP1-Expression auf die Lamina V des Kortexes. Hier liegen die großen Pyramidenzellen, auch Betz-Riesenzellen genannt, die mit ihren langen Axonen als sogenannte Projektionsneurone in andere Hirnareale oder als Teil der Pyramidenbahn ins Rückenmark entsendet werden. Besonders deutlich ist diese Pyramidenzellschicht im primären motorischen Kortex zu erkennen, aber auch in sensiblen und visuellen Rindenarealen exprimieren die Pyramidenzellen in dieser Schicht roGFP1 (Abbildung 23A).

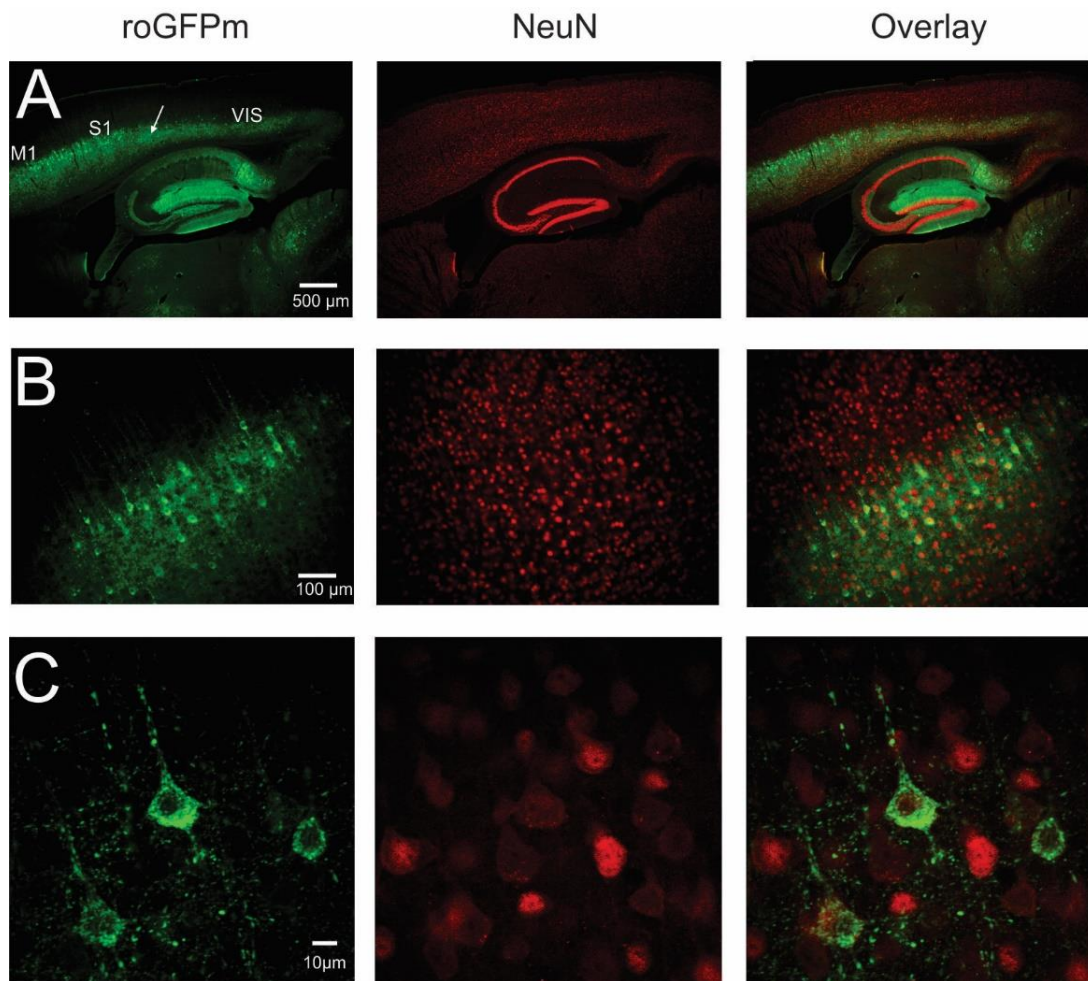


Abbildung 23: Kortikale roGFP1-Expression

(A) Übersichtsaufnahme eines Sagittalschnittes mit Hippokampusformation und benachbarten Arealen des Isokortexes. Die Lamina V der Großhirnrinde exprimiert deutlich roGFP1 und ist mit einem Pfeil gekennzeichnet. Im Bereich des primären Motorkortexes (M1) erscheinen die fluoreszierenden Somata besonders groß. Dorsal schließen sich die primären sensiblen (S1) und visuellen Rindenareale (VIS) an. **(B)** Vergrößerte Aufnahme der Lamina V: Ca. die Hälfte der Neurone sind roGFP1-positiv, während die angrenzenden Schichten des Isokortexes keine Expression zeigen. **(C)** Aufnahme einzelner kortikaler Pyramidenzellen mit dem 2-Photonen-Laser-Scanning-Mikroskop. Die kegelförmigen Somata zeigen eine kräftige roGFP1-Expression um den Zellkern herum, die sich in die Zellausläufer fortsetzt.

In den stärkeren Vergrößerungen (Abbildung 23B und Abbildung 23C) indiziert die Gegenfärbung mit NeuN, dass ca. 50% der Neurone in der Lamina V der Großhirnrinde das fluoreszierende Protein bilden. Die Detailaufnahme des 2-Photonen-Mikroskops zeigt besonders deutlich die Somata der großen Pyramidenzellen, die mit Ausnahme der Zellkernregion sehr kräftig und homogen gefärbt sind (Abbildung 23C).

Auch das Kleinhirn wurde hinsichtlich seines roGFP1-Expressionsmusters untersucht (Abbildung 24). Von den drei Schichten der Kleinhirnrinde zeigten jedoch nur die Körnerzellen des *Stratum granulosum* eine deutliche Färbung. Die großen Purkinjezellen des *Stratum purkinjense* dagegen exprimierten kein roGFP1. Sie sitzen dem *Stratum granulosum* perlenschnurartig auf und entsenden ihre Dendritenbäume in das faserreiche äußere *Stratum moleculare*. Da sie kein roGFP1 exprimieren und bekannt ist, dass sie eine der wenigen Zellgruppen sind, die durch NeuN nicht darstellbar sind (Caroni 1997), markiert der Pfeil in der Abbildung die mutmaßliche Lage der Purkinjezellen (Abbildung 24B). Da das *Stratum moleculare* vor allem die Dendriten der Purkinjezellen enthält, ist es nur schlüssig, dass es ebenfalls kein Fluoreszenzsignal erkennen lässt. Das Kleinhirnmark zeigt eine diffuse, wenn auch schwache roGFP1-Expression, während die Kleinhirnkerne deutlich fluoreszieren.

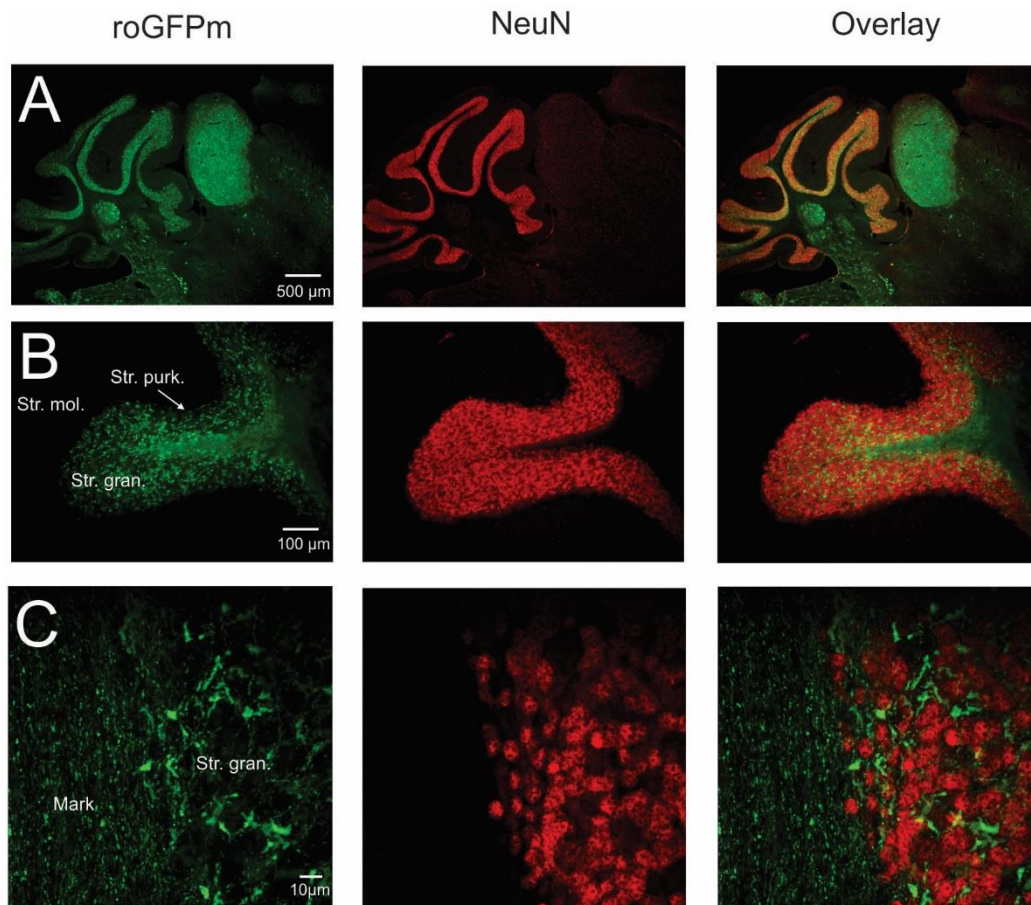


Abbildung 24: RoGFP1-Expressionsmuster im Kleinhirn

(A) Die Übersichtsaufnahme des Fluoreszenzmikroskops zeigt das Kleinhirn eines 55 Tage alten roGFPm-Weibchens. (B) Vergrößerte Aufnahme der Kleinhirnrinde: Von den drei Rindenschichten zeigt nur das innere *Stratum granulosum* (Str. gran.) eine deutliche roGFP1-Expression. Der Pfeil markiert die nicht fluoreszierende Purkinjzellschicht (Str. purk.). (C) Die Detailaufnahme des 2-Photonen-Mikroskops lässt eine diffuse Färbung einzelner Mitochondrien im faserreichen Kleinhirnmark erkennen. Das roGFP1 des *Stratum granulosum* umgibt die gegengefärbten Somata netzartig.

Um ganz sicherzugehen, dass es sich bei der grün fluoreszierenden Struktur um die Mitochondrien und nicht etwa um andere Zellorganellen handelt, wurde der Mitochondrien-spezifische Farbstoff Mitotracker® Red 580 zur molekularen Gegenfärbung eingesetzt. Da diese Färbung an fixierten Hirnschnitten wegen eines zu hohen Hintergrundsignals bisher keine eindeutigen Darstellungen zuließ, wurden kultivierte Neurone aus neonatalem Hirngewebe (pd2) verwendet. Das roGFP1 und der Mitotracker einzelner Neurone wurden zunächst separat angeregt und die erstellten Bilder in einer *Overlay*-Darstellung abgeglichen. Wie erwartet zeigte die Fluoreszenz des roGFPm das exakt gleiche Fluoreszenzmuster wie das des Mitotrackers. Zudem erbrachte diese Methode den Nachweis für die bereits neonatale Expression des roGFP1 (Abbildung 25).

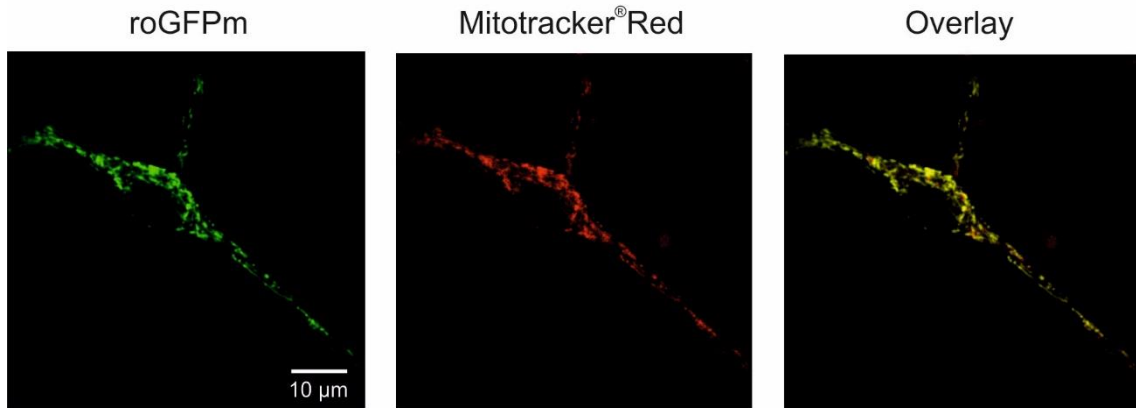


Abbildung 25: Nachweis der Mitochondrienspezifität

Zellkultur aus neonatalem (pd2) Hippokampusgewebe. Zur Darstellung diente die 2-Photonen-Laser-Scanning-Mikroskopie (63x Objektiv, 1.0 NA). Die Mitochondrien wurden unmittelbar vor der Bildgebung für 20 min mit einem spezifischen Marker (Mitotracker® Red 580, 1 µM) inkubiert. Die nahezu vollständige Konvergenz in der *Overlay*-Darstellung belegt die ausschließlich mitochondriale Expression des roGFP1.

Im Rückenmark zeigte sich eine Ansammlung roGFP1-positiver Zellen in der gesamten grauen Substanz, sowohl in den motorischen Neuronen des Vorderhorns als auch in den sensiblen Zellen des Hinterhorns. Die weiße Substanz wies im Vergleich dazu eine relativ schwache und diffuse Expression auf. Die junge Maus unterschied sich dabei nicht wesentlich von dem adulten Tier (Abbildung 26).

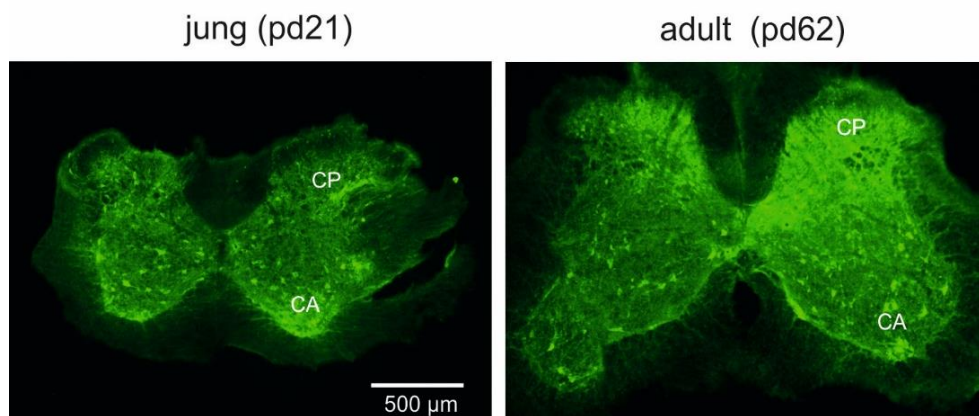


Abbildung 26: RoGFP1-Expression im Rückenmark

Die Aufnahmen mit dem klassischen Fluoreszenzmikroskop (4x Objektiv, 0.28 NA) zweier roGFPm-Weibchen zeigten eine deutliche Expression in der grauen Substanz des Rückenmarks, sowohl im jugendlichen (pd21) als auch im adulten Alter (pd62). Die 30 µm dicken PFA-fixierten Präparate wurden in transversaler Schnittführung angefertigt.

Als nächstes sollte geprüft werden, ob es sich bei der detektierten Fluoreszenz tatsächlich um die reine roGFP1-Emission handelte oder in wieweit das Fluoreszenzsignal von einer möglichen endogenen Autofluoreszenz anderer zellulärer Strukturen kontaminiert wurde. Dazu wurde die emittierte Fluoreszenz eines adulten roGFPm-Weibchens (pd139) mit der eines WT-Weibchens (pd255) verglichen. Unter den exakt gleichen Bedingungen wurden die Tiere transkardial perfundiert, 30 μm dicke Sagittalschnitte angefertigt und mittels CCD-Kamera-basierter Fluoreszenzmikroskopie Aufnahmen des Hirngewebes erstellt. Während eine Belichtungsdauer von 5 ms an dem roGFPm-Präparat ein deutliches Fluoreszenzsignal in dem schon beschriebenen Expressionsmuster hervorrief, konnte mit den gleichen Einstellungen von Mikroskop und Kamera an dem WT-Schnitt lediglich eine sehr schwach zu erahnende Fluoreszenzantwort detektiert werden (Abbildung 27A).

Erst bei einer deutlichen Verlängerung der Belichtungszeit um das Siebenfache konnte eine prägnante Fluoreszenzemission an dem WT-Schnitt hervorgerufen werden. Allerdings war diese deutlich diffuser und hob sich weniger kontrastreich vom Hintergrund ab (Abbildung 27B). Unter diesen Aufnahmebedingungen ist der Einfluss der endogenen Autofluoreszenz auf das roGFPm-Signal demnach vernachlässigbar gering.

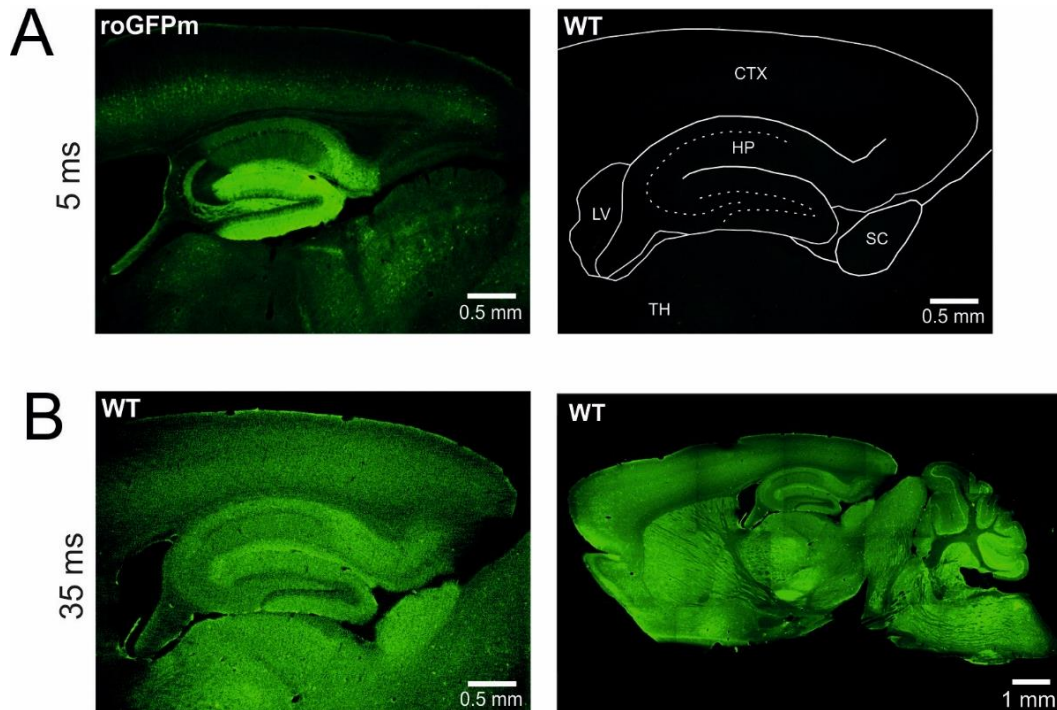


Abbildung 27: Fluoreszenzvergleich eines transgenen und eines WT-Tieres

Abgebildet sind sagittale Hirnschnitte eines adulten roGFPm-Weibchens (pd139) und eines WT-Weibchens (pd255). Die Aufnahmen wurden unter den exakt gleichen Bedingungen erstellt. **(A)** Gezeigt sind roGFPm- und WT-Signal bei einer Belichtungsdauer von 5 ms. Die Strukturen, die wegen mangelnder Fluoreszenzstärke am WT-Schnitt nicht erkannt werden konnten, wurden mittels CorelDRAW® skizziert. CTX: Kortex; HP: Hippokampus; LV: linker Ventrikel; SC: *Colliculus superior*. **(B)** Gezeigt ist dasselbe WT-Präparat wie in **(A)**. Bei einer Verlängerung der Belichtungsdauer auf 35 ms konnte eine deutliche, aber weniger kontrastreiche Fluoreszenz detektiert werden. Der komplette Sagittalschnitt wurde aus acht einzelnen Bildern in CorelDRAW® zu einer Gesamtübersicht zusammengefügt.

Alle bisher betrachteten Aufnahmen von transgenen Tieren entstammten der Founderlinie Nr. 4. Sie zeigten im Vergleich zu den Tieren der anderen stabil etablierten Linie Nr. 1 eine stärkere roGFP1-Expression. Hinsichtlich des Expressionsmusters ließen sich nur wenige Abweichungen erkennen. So zeigte die Linie Nr. 1 keine Expression in der Lamina V des Kortexes, sondern in der Schichten IV und VI. Die Expression der Hippokampusformation entsprach der der Linie Nr. 4, allerdings fluoreszierte das gesamte roGFP1 deutlich schwächer. Die Linie Nr. 3 zeigte eine ähnliche Expression wie die Linie Nr. 4, sowohl in Stärke als auch in Muster. Allerdings konnte sie nicht erfolgreich weitergezüchtet werden und starb im Laufe meiner Datenerhebung aus. Die anderen beiden Foundertiere brachten gar nicht erst transgene Nachkommen hervor, sodass die Linie Nr. 4 sich als am besten geeignet herausstellte, um später in andere Mausmodelle eingekreuzt zu werden und hier vorrangig charakterisiert werden sollte.

3.3 Die Funktionalität des Redoxsensors

Die spezifische Expression des roGFP1 in der mitochondrialen Matrix der Nervenzellen konnte durch bildgebende Verfahren bereits verifiziert werden. Nun sollte gezeigt werden, dass der Sensor tatsächlich vollständig in das Redoxpuffersystem integriert wurde und in der Lage ist, den vorherrschenden Redoxzustand durch reversible Änderung des Fluoreszenzverhältnisses (F_{395}/F_{470}) adäquat widerzuspiegeln. Dazu wurden CCD-Kamera-basierte ratiometrische Messungen an akuten Hirnschnitten adulter roGFPm-Mäuse beider Geschlechter durchgeführt und das Antwortverhalten des Redoxsensors in den hippokampalen Regionen CA1, CA3 und Gyrus dentatus sowie im kortikalen Bereich untersucht (Kapitel 2.4).

3.3.1 Kalibrierung des roGFPm-Antwortbereichs

Zunächst sollte der maximal mögliche Antwortbereich des Redoxsensors ermittelt werden. Diese Kalibrierung konnte von anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe an Schnitt- und Zellkulturen bereits erfolgreich durchgeführt werden (Funke et al. 2011; Großer et al. 2012). Sie beruht auf der Annahme, dass die Applikation von Sättigungsdosen des Oxidationsmittels H_2O_2 (5 mM, 7 min) das gesamte roGFP1 der Zelle oxidiert. Entsprechend bewirkt die Applikation des Reduktionsmittels DTT in sättigenden Dosen (10 mM DTT, 7 min), dass 100% des Sensorproteins in reduzierter Form vorliegen. Aus den ermittelten Werten für die maximal mögliche Oxidation wurde für jede Hirnregion der obere bzw. aus den Werten für die minimal mögliche Oxidation die untere Grenze des roGFP1-Antwortbereichs festgelegt (Abbildung 28A).

Im *Stratum pyramidale* der CA1-Region lag der roGFP1-Ratiowert unter Ruhebedingungen bei $2,2 \pm 0,3$ ($n=13$) (Abbildung 28B). Durch Applikation des Oxidationsmittels H_2O_2 wurde ein Ansteigen der Fluoreszenzratio auf $3,1 \pm 0,2$ ($n=8$) verzeichnet, was einem Anstieg um $55,0 \pm 15,3\%$ entsprach (Abbildung 28C). In der CA3-Region des Hippokampus zeigte sich die mitochondriale Matrix deutlich oxidiierter als die der CA1-Neurone. Der Ausgangswert lag mit $2,6 \pm 0,3$ ($n=12$) signifikant ($p<0,01$) höher als in den CA1-Neuronen (Abbildung 28B). Durch die Gabe von H_2O_2 stieg die Fluoreszenzratio lediglich um $19,9 \pm 9,7\%$ ($n=9$) an (Abbildung 28C). Das höhere Grundniveau und der vergleichsweise geringe Anstieg bestätigten die Vermutung, dass bereits vor der Gabe des Oxidationsmittels mehr roGFP1 in oxidiertem Form vorlag als in den Zellen der CA1-Region. Die Mitochondrien des Gyrus dentatus zeigten einen *Baseline*-Oxidationswert von $2,1 \pm 0,3$ ($n=13$) und unterschieden sich damit nicht wesentlich von dem Wert der CA1-Region. Durch maximale Oxidation konnte ein Fluoreszenzverhältniswert von $3,0 \pm 0,4$

(n=8) und ein Anstieg um $37,8 \pm 15,6\%$ erzielt werden (Abbildung 28C). Als nächstes wurde der Sensor in der mitochondrialen Matrix der kortikalen Neurone maximal oxidiert. Der *Baseline*-Wert lag hier bei $2,1 \pm 0,4$ (n=14) (Abbildung 28B) und stieg durch H_2O_2 -Gabe um durchschnittlich $33,4 \pm 12,0\%$ (n=8) auf einen Wert von $2,9 \pm 0,4$ an (Abbildung 28C).

Anschließend wurde das DTT auf den Schnitt appliziert, um die vollständige Reduktion des mitochondrialen roGFP1 hervorzurufen. Dazu wurde entweder ein neuer Schnitt verwendet oder gewartet, bis das H_2O_2 vollständig aus dem Schnitt ausgewaschen war und sich die *Baseline* wieder erholt hatte.

In der CA1-Region fiel der Verhältniswert durch die Applikation von DTT ausgehend von der *Baseline* um $48,6 \pm 5,8\%$ auf $1,1 \pm 0,1$ ab. In der CA3-Region konnte ein durchschnittlicher Abfall des Fluoreszenzverhältnisses um $53,2 \pm 8,9\%$ (n=9) auf einen Wert von $1,3 \pm 0,2$ erzielt werden. In den neuronalen Mitochondrien des Gyrus dentatus bewirkte die DTT-Gabe ein Absinken der Ratio auf $1,1 \pm 0,1$ (n=8), was einem prozentualen Abfall um $50,7 \pm 5,5\%$ entsprach, während für die kortikalen Mitochondrien ein Abfall um $49,4 \pm 9,6\%$ (n=8) auf $1,1 \pm 0,07$ verzeichnet wurde (Abbildung 28D).

Die Neurone der CA3-Region reagierten damit durchschnittlich am stärksten auf die herbeigeführte Reduktion (Abbildung 28D). Dies bestätigte die Beobachtung, dass das Redoxgleichgewicht in den Mitochondrien dieser Zellen bereits unter Ruhebedingungen stärker oxidativen als reduzierenden Einflüssen unterliegt.

So ergaben sich für die vier Hirnregionen unterschiedliche Fluoreszenzratio-Antwortbereiche des roGFP1 (Abbildung 28E). Während die Antwortbereiche sich in ihrem Ausmaß nicht wesentlich voneinander unterschieden, konnte eine leichte Verschiebung der CA3-Antwort in Richtung stärker oxidiertes Werte detektiert werden.

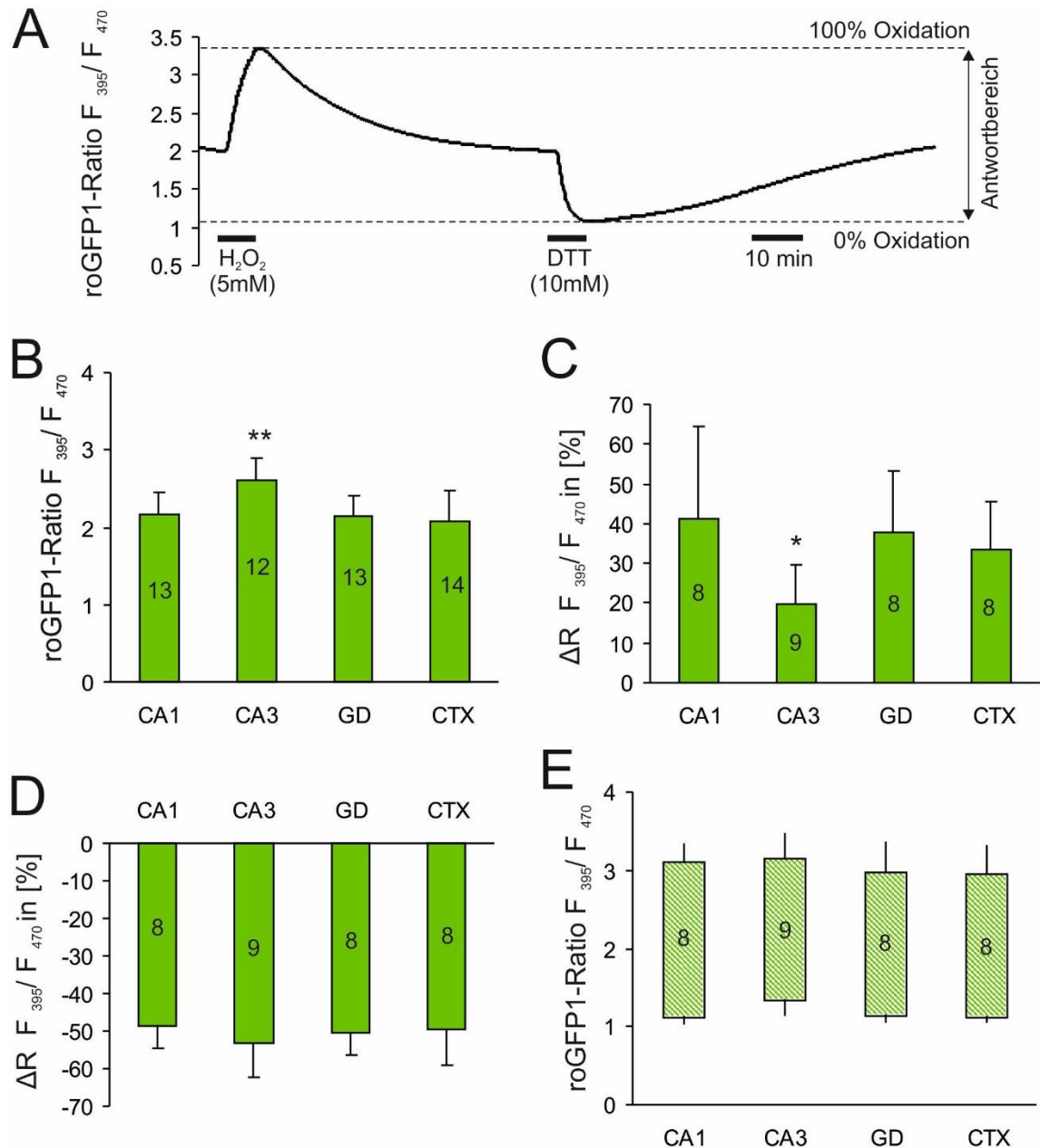


Abbildung 28: Kalibrierung des roGFP1-Antwortbereichs für die untersuchten Hirnregionen

(A) Beispielhafte Messspur zur Kalibrierung des Antwortbereichs. Die Applikationszeiträume der Reagenzien sind zur Orientierung an der Abszisse markiert. (B) Absolute *Baseline*-Werte der Fluoreszenzratio für die Regionen CA1, CA3, Gyrus dentatus (GD) und Kortex (*Cortex*, CTX): Die Neurone der CA3-Region wiesen bezogen auf die CA1-Region ein signifikant höheres Grundniveau auf (**: $p < 0,01$). (C) Dargestellt sind die relativen Veränderungen der Fluoreszenzratio nach Gabe von H_2O_2 in Bezug zu dem 50 ms vor Applikation gemessenen *Baseline*-Wert (B). Das Fluoreszenzverhältnis in den neuronalen Mitochondrien der CA3-Region stieg signifikant weniger stark an als das der übrigen Bereiche (*: $p < 0,05$). (D) Gezeigt ist die Reaktion der Fluoreszenzratio auf DTT-Applikation. (E) Der maximale Antwortbereich des roGFP1 für die vier Hirnregionen ist als Boxplot dargestellt. Die obere Grenze wurde durch den durchschnittlich erreichten Maximalwert nach H_2O_2 -Gabe, die untere durch den durch DTT hervorgerufenen Abfall der Fluoreszenzratio festgelegt. Die jeweilige Stichprobengröße n ist durch die Zahl im Balken angegeben.

3.3.2 Relatives Ausmaß der Oxidation

Um semiquantitative Aussagen über den Oxidationszustand der Mitochondrien in den unterschiedlichen Hirnregionen treffen zu können, sollte der relative *Baseline*-Oxidationswert oder auch das Ausmaß der Oxidation ($\text{OxD}_{\text{roGFP1}}$) des Redoxsensors errechnet werden. Dazu reichte es nicht aus, den absoluten Fluoreszenzratio-Wert für die *Baseline* (Abbildung 28B) in Bezug zum kalibrierten Antwortbereich (Abbildung 28E) zu setzen, da für das roGFP1 kein lineares Verhältnis von Fluoreszenzratio zum Ausmaß der Oxidation angenommen werden kann (Meyer und Dick 2010). Um den relativen *Baseline*-Oxidationswert zu berechnen, ging neben den Kalibrierungsdaten noch ein für den Messaufbau spezifischer Faktor in die Berechnung ein, der die Beziehung in ein nicht-lineares Verhältnis umwandelte (Meyer und Dick 2010).

$$\text{Ausmaß der Oxidation (OxD)}_{\text{roGFP1}} = \frac{R - R_{\text{red}}}{\frac{F470_{\text{ox}}}{F470_{\text{red}}} * (R_{\text{ox}} - R) + (R - R_{\text{red}})}$$

[Formel 3]

Dieser spezifische Faktor ist das Verhältnis der absoluten Fluoreszenzintensitäten bei Anregung mit 470 nm Wellenlänge unter oxidierten und reduzierten Bedingungen ($F470_{\text{ox}}/F470_{\text{red}}$). Er wurde an allen Schnitten erhoben, an denen die Kalibrierung in beide Richtungen, das heißt hin zu maximaler Oxidation und maximaler Reduktion, stattgefunden hatte. R_{red} beschreibt den durch DTT hervorgerufenen Minimalwert der Fluoreszenzratio, R_{ox} dementsprechend den mit H_2O_2 ermittelten Maximalwert, R den absoluten *Baseline*-Oxidationswert.

Für die CA1-Region wurde anhand dieser Formel eine relative *Baseline*-Oxidation von $69,7 \pm 12,0\%$ ($n=13$) ermittelt (Abbildung 29). Das roGFP1 der CA3-Neurone lag zu $82,7 \pm 12,0\%$ ($n=12$) in oxidierte Form vor und war damit auf einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ deutlich oxidierte als in allen anderen gemessenen Hirnregionen. In den Neuronen des Gyrus dentatus lagen $71,8 \pm 12,4\%$ ($n=13$) des roGFPm im Ruhezustand in oxidierte Form vor, während die relative *Baseline*-Oxidation in den Nervenzellen der Großhirnrinde bei $69,4 \pm 16,6\%$ ($n=14$) lag. Dadurch wies das roGFP1 in den Regionen CA1, Gyrus dentatus und Kortex einen vergleichbar oxidierte Grundzustand auf, während es in den Mitochondrien der CA3-Zellen wesentlich stärker oxidierte Einflüssen ausgesetzt zu sein schien.

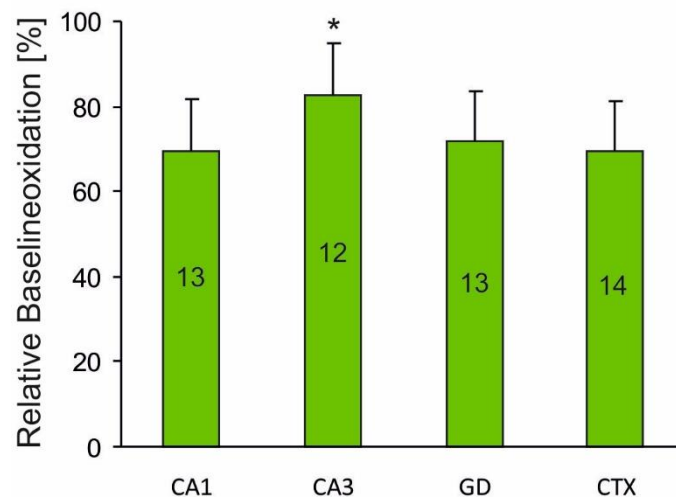


Abbildung 29: Die relative *Baseline*-Oxidation von mitochondrialem roGFP1

Dargestellt ist das relative Ausmaß der Oxidation von roGFP1 (OxD_{roGFP1}) in den hippocampalen Hirnregionen CA1, CA3 und Gyrus dentatus (GD) sowie der Großhirnrinde (*Cortex*, CTX). Im Vergleich zur *Baseline*-Oxidation der Mitochondrien der CA1-Region war die relative *Baseline*-Oxidation in der CA3-Region signifikant (*: $p < 0,05$) erhöht. Das Ausmaß der roGFP1-Oxidation in den Regionen CTX und GD unterschied sich nicht wesentlich von dem in CA1.

3.3.3 Quantifizierung des roGFPm-Oxidationszustandes

Während der relative Oxidationswert nur semiquantitative Aussagen über den aktuellen Oxidationsstatus zuließ, wurde im nächsten Schritt mit Hilfe der Nernst-Gleichung das absolute Redoxpotential ermittelt und dadurch eine echte Quantifizierung des Redoxstatus ermöglicht.

Das Redoxpotential einer Substanz beschreibt seine Reduktionskraft, das heißt, seine Bereitschaft Elektronen in einer Redoxreaktion abzugeben und dadurch oxidiert zu werden. Je negativer dieses Redoxpotential ist, desto höher ist die Reduktionskraft. Die Nernst-Gleichung ermöglicht die Berechnung des aktuellen Redoxpotentials des roGFPm-Redoxpaares (E_{roGFP1}) aus dem von Dooley und Kollegen (Dooley et al. 2004) ermittelten Standardredoxpotential für roGFP1 ($E^0_{roGFP1} = -291 \text{ mV}$) und den aktuell vorherrschenden Konzentrationen der beteiligten Reaktionspartner, also der oxidierten und der reduzierten Form des roGFP1. Das zuvor ermittelte Ausmaß der Oxidation OxD_{roGFP1} entspricht dabei dem oxidierten Anteil, $1 - OxD_{roGFP1}$ dem reduzierten. Der Term aus universeller Gaskonstante R : $8,3 \text{ J/mol/K}$, absoluter Temperatur T in Kelvin [K] und Faraday'scher Konstante F : 96490 J/mol/Volt bezieht die aktuellen Messbedingungen mit ein.

$$E_{\text{roGFP1}} = E^0_{\text{roGFP1}} - \frac{RT}{2F} \ln \left(\frac{1 - \text{OxD}_{\text{roGFP1}}}{\text{OxD}_{\text{roGFP1}}} \right)$$

[Formel 4]

Mit dieser Formel konnte das Redoxpotential unter Ruhebedingungen für die roGFP1-exprimierenden neuronalen Mitochondrien innerhalb der unterschiedlichen Hirnregionen ermittelt und untereinander verglichen werden.

Für die CA1-Region des Hippokampus konnte ein Redoxpotential von $-279,1 \pm 8,6$ mV (n=13) bestimmt werden, für die CA3-Region eines von $-267,7 \pm 11,7$ mV (n=12) und für den Gyrus dentatus eines von $-277,9 \pm 8,1$ mV (n=13). Die neuronalen Mitochondrien der Großhirnrinde wiesen ein Redoxpotential von $-277 \pm 17,7$ mV (n=14) auf. Ausgehend von der CA1-Region zeigte sich wiederum nur das Redoxpotential der CA3-Region signifikant ($p < 0,05$) weniger negativ und dadurch oxidierter.

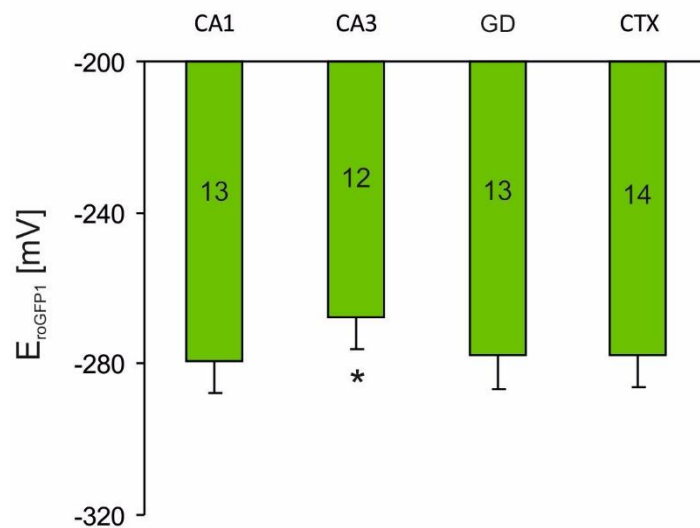


Abbildung 30: Mittlere Redoxpotentiale des mitochondrialen roGFP1

Die Redoxpotentiale E_{roGFP1} der vier untersuchten Hirnregionen unter Ruhebedingungen: Das signifikant weniger negative Redoxpotential der CA3-Region im Vergleich zur CA1-Region ist mit einem Stern gekennzeichnet (*: $p < 0,05$).

3.3.4 Modulation des mitochondrialen ROS-Levels

Als nächstes sollte gezeigt werden, dass die Signalantwort des mitochondrialen roGFP1 nicht nur durch exogen applizierte Drogen hervorgerufen werden kann, sondern dass es

auch auf endogen gebildete reaktive Sauerstoffspezies reagiert. Dazu wurden zwei pharmakologische Substanzen appliziert, von denen bekannt ist, dass sie in den mitochondrialen Stoffwechsel eingreifen und den dortigen ROS-Spiegel erhöhen. Die emittierte Fluoreszenz wurde für die CA1-Region erfasst.

Antimycin A ist ein Hemmstoff des Atmungskettenkomplexes III und führt zu einer pathologisch gesteigerten mitochondrialen ROS-Produktion (Brand 2010; Chen et al. 2003). Durch die irreversible Inhibition des Komplexes III kann der Elektronenfluss die Atmungskette nicht mehr vollständig durchlaufen und es kommt zu einer Akkumulation reduzierter Intermediate an dem blockierten Komplex, was zu einem dortigen erhöhten Elektronenleck führt (Brand 2010; Funke et al. 2011). Diese Annahme stützend stieg die Fluoreszenzratio im Rahmen der Messung einige Minuten nach der Applikation von Antimycin A (20 μ M, 10 min) an und indizierte dadurch eine zunehmend oxidierte mitochondriale Matrix. 40 min nach Applikationsende war das Fluoreszenzverhältnis um durchschnittlich $34,1 \pm 9,5\%$ angestiegen ($n=7$) ($p<0,001$). Die Signalantwort blieb irreversibel erhöht und auch nach über einer Stunde konnte nicht beobachtet werden, dass sich der Schnitt erholte (Abbildung 31A).

Als weiterer Modulator der ROS-Formation wurde DEDTC (5 mM, 5 min) appliziert. Als Inhibitor des antioxidativ wirkenden Enzyms Superoxiddismutase rief DEDTC an allen gemessenen Schnitten ($n=5$) ein konstantes biphasisches Antwortmuster des Fluoreszenzsignals hervor: auf einen initialen transienten Anstieg der Fluoreszenzratio um $2,7 \pm 1,3\%$ ($p<0,01$) folgte ein zweiter, länger andauernder Anstieg um $4,6 \pm 2,9\%$ ($p<0,01$) (Abbildung 31B). Im Gegensatz zu Antimycin A war nach dem Auswaschen von DEDTC üblicherweise eine vollständige Erholung der Redoxbedingungen auf das Basislevel zu beobachten.

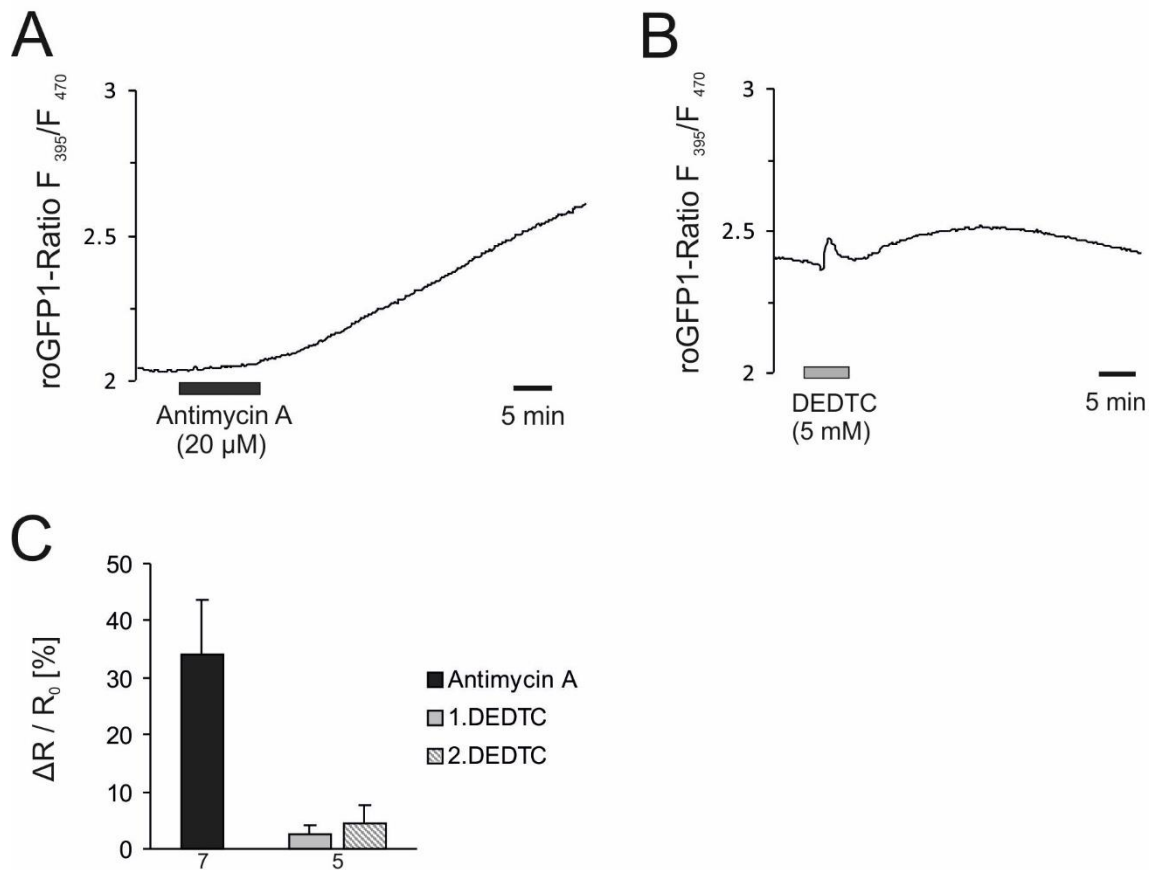


Abbildung 31: Pharmakologische ROS-Modulation

(A) Beispielhafte Messspur nach Applikation von Antimycin: Die irreversible Erhöhung der roGFP1-Fluoreszenzratio (roGFP1-Ratio F_{395}/F_{470}) regeneriert sich auch nach dem Auswaschen nicht wieder. **(B)** Der Inhibitor der Superoxiddismutase DEDTC führt zu einem biphasischen Anstieg des Fluoreszenzverhältnisses. **(C)** Statistisch gemittelte Daten des prozentualen Fluoreszenzratio-Anstiegs ($\Delta R / R_0$) nach Applikation von Antimycin A und DEDTC. Die Anzahl der Messungen ist unter den jeweiligen Balken angegeben.

4 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein neues transgenes Mausmodell mit neuronenspezifischer mitochondrialer Expression des Redoxsensors roGFP1 untersucht. In der Einleitung wurden bereits drei andere zurzeit etablierte Mausmodelle mit stabiler roGFP-Expression zur Redoxmessung vorgestellt, die jedoch entweder das deutlich mehr pH-sensitive roGFP2 exprimieren (Kapitel 1.5), keine Mitochondrienspezifität aufweisen oder das Transgen unter der Kontrolle eines anderen Promotors exprimieren, dessen Expressionsmuster keine Forschungen an insbesondere hippokampalem Gewebe und Projektionsneuronen zulässt (Kapitel 1.6). Damit ist die roGFPm-Redoxindikator-Maus die erste, die sowohl die Vorteile des roGFP1- gegenüber dem roGFP2-Sensor als auch das gewünschte Expressionsmuster in den neuronalen Mitochondrien aufweist.

4.1 Phänotypische Merkmale der roGFPm-Maus

Für die Integration des Transgens in das Mausgenom wurde das Verfahren der prä nukleären Mikroinjektion gewählt. Dabei wurde das DNA-Konstrukt hinsichtlich Ort und Anzahl der Gen-Kopien zufällig in das Genom integriert, sodass nicht ausgeschlossen werden konnte, dass dieser Einbau andere Gene zerstört und das Genom der Maus über das Einfügen des Transgens hinaus verändert hatte. Ein wesentlicher Teil der Arbeit befasste sich deshalb damit, die transgenen Tiere im Hinblick auf ihr phänotypisches Erscheinungsbild, ihre Entwicklung und ihr Verhalten zu analysieren und mögliche Unterschiede zu den Wildtypen auszumachen. Dazu wurde die körperliche Entwicklung anhand von Gewichtskurven und Körperlänge beurteilt, der Blutzucker- und der Hämatokritwert ermittelt sowie das Koordinationsverhalten mit Hilfe eines Rota-Rod[®]-Testverfahrens und die Umweltexploration der Tiere mittels Open-Field-Test untersucht.

Rein optisch unterschieden sich die transgenen Tiere nicht von den Wildtypen. Auch beim Vergleich der Gewichtskurven war kein Unterschied zwischen der Gewichtszunahme der roGFPm- und Wildtypen zu erkennen, sodass das Transgen keinen Einfluss auf das Fressverhalten oder auf die Verwertung der Nahrung und somit das Wachstum zu haben scheint. Lediglich zwischen den Geschlechtern ließen sich sowohl bei den transgenen als auch bei den WT-Tieren Unterschiede im Körpergewicht ausmachen. Zudem fiel bei allen Vergleichsgruppen ein verlangsamtes Wachstum ab dem 20. Lebenstag auf. Dies lässt sich dadurch erklären, dass die Jungtiere zu diesem Zeitpunkt von ihrer Mutter getrennt wurden und ihre Nahrungsaufnahme von Milch auf feste Nahrung umstellen mussten. Die

Verlangsamung der Gewichtszunahme beruht vermutlich darauf, dass die Tiere sich erst einige Tage an die neuartige Fresssituation gewöhnen mussten. Beim Vergleich der Körperlänge zum Zeitpunkt des Finalversuches (pd50-pd55) war ebenfalls nur ein Unterschied zwischen Männchen und Weibchen, nicht jedoch zwischen roGFPm- und WT-Tieren auszumachen. Der Verlauf der Wachstumskurven und die Werte für die Körperlänge beider Geschlechter entsprachen den Erhebungen des *The Jackson Laboratory*, des Lieferanten der C57BL/6J- Mäuse.

Hämatokrit- und Blutzuckerwerte der transgenen Tiere wichen ebenfalls nicht von denen der Wildtypen ab. Demnach scheint der Redoxsensor in den Mitochondrien keinen Einfluss auf die Zusammensetzung des Blutes zu haben. Die relativ hohe Streuung der erhobenen Blutzuckerwerte beruht vermutlich darauf, dass die Tiere bis kurz vor dem Experiment freien Zugang zur Nahrung hatten und deswegen nicht alle gleichermaßen bis zuletzt gefressen hatten. Um die Blutzuckermessung zu optimieren, könnten zukünftige Experimente das Futter einige Stunden zuvor aus den Käfigen entfernen, um einen besser vergleichbaren Nüchternblutzuckerwert zu erhalten.

Die Motorkoordination und das motorische Lernverhalten der Mäuse wurden an drei aufeinanderfolgenden Tagen mit Hilfe des Rota-Rod[®]-Testverfahrens untersucht. Dabei diente den Tieren der erste Versuchstag zur Gewöhnung an das Messsystem, während sich vom zweiten auf den dritten Tag ein Lernzuwachs zeigen sollte. Wegen zu hoher Streuung der Werte konnte jedoch für keine Versuchsgruppe ein solcher signifikanter Lernzuwachs nachgewiesen werden. Da sich jedoch der Trend zeigte, dass die Tiere von Tag zu Tag länger liefen, wäre mit einer größeren Stichprobengröße eventuell ein Signifikanzniveau erreicht worden. Dies erwies sich für mich in der begrenzten Zeit und dem damit verbundenen limitierten Mäuseangebot jedoch als nicht realisierbar. Signifikante Unterschiede zwischen den Genotypen zeigten die Versuchsgruppen hinsichtlich der Laufleistungen der einzelnen Tage. Sowohl bei den Männchen als auch bei den Weibchen war für jeden Versuchstag der Trend zu erkennen, dass die transgenen Tiere sich länger auf dem Rota-Rod[®] hielten als die Wildtypen. Für den dritten Tag wurde das Signifikanzniveau jeweils erreicht. Ähnliches konnte bereits bei Untersuchungen an den Mäusen mit zytosolischer roGFP1-Expression (roGFPc-Tiere) ermittelt werden, die im Vorfeld meiner Arbeit charakterisiert wurden. Dort liefen die transgenen Weibchen an allen drei Versuchstagen signifikant länger auf dem Rota-Rod[®] als das WT-Vergleichskollektiv (Kolbrink 2015; Wagener et al. 2016). Das Transgen scheint also sowohl bei den roGFPm- also auch bei den roGFPc-Tieren aktivitätssteigernd auf das Verhalten der Tiere zu wirken. Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen wäre, dass das roGFP1 selber als

Redoxpuffer fungiert. Als Protein mit redoxsensitiven Cysteinresten ist es direkt in das Redoxpuffersystem der Zelle integriert. Indem es je nach vorherrschendem Redoxstatus selber reduziert und oxidiert werden kann, verhält es sich genauso wie andere redoxensitive Proteine. Wird es selbst oxidiert, reduziert es im Rahmen einer Redoxreaktion dadurch einen Reaktionspartner. So ist es durchaus denkbar, dass das roGFP1 in gewissem Maße direkt zur Neutralisierung reaktiver Verbindungen beiträgt und das Mitochondrium bzw. die Zelle vor dessen schädlichen Einflüssen bewahrt.

Stützen kann man diese Hypothese durch die Beobachtungen an einem Mausmodell, das ebenfalls durch einen Eingriff in das mitochondriale Redox-Puffersystem und eine Verringerung des ROS-Levels einen direkten Vorteil für die Mäuse mit sich bringt. Bei den sogenannten MCAT-Mäusen handelt es sich um Tiere, die die Katalase in den Mitochondrien überexprimieren. Die Katalase ist ein antioxidativ wirkendes Enzym, das den Abbau von H_2O_2 zu Wasser beschleunigt. Tatsächlich konnte bei einem Mausmodell von Schriener und Kollegen an einer Founderlinie mit hochregulierter Katalase in den Mitochondrien der Kardiomyozyten ein verminderter H_2O_2 -Spiegel eben dieser Organellen nachgewiesen werden und die Tiere zeigten weniger oxidativ begünstigte Herzkrankungen. Nicht zuletzt konnte eine um durchschnittlich fünf Monate verlängerte Lebenserwartung für diese Katalase-Überexprimierer ermittelt werden (Schriener et al. 2005). Wiederum andere konnten an MCAT-Mäusen zeigen, dass die übliche altersbedingte ROS-Produktion in den Spermien und die damit verbundene verminderte Fruchtbarkeit durch den Eingriff in das mitochondriale Puffersystem reduziert wird. Bei männlichen WT-Mäusen konnte eine Abnahme der Spermienqualität im Alter beobachtet werden, die sich in einer verminderten Fortpflanzungsrate widerspiegelte. Bei dem MCAT-Vergleichskollektiv hingegen wurde eine verringerte ROS-Produktion gemessen und keine Beeinträchtigung der Fortpflanzungsrate im Alter festgestellt. Die hochregulierte Katalase in den Mitochondrien der MCAT-Mäuse scheint also die ROS-Generierung zu vermindern und dadurch die Spermienproduktion vor altersassoziiertem oxidativen Stress zu bewahren (Selvaratnam und Robaire 2016).

Eine weitere Erklärung für die bessere körperliche Leistung der Redoxindikator-Mäuse könnte der zufällige Einbau des Transgens in das Genom der Tiere sein. Möglicherweise zerstört das Konstrukt Gene mit Regulatorfunktion und bewirkt ein Hochregulieren von Genprodukten mit einem günstigen Effekt oder eine verminderte Expression schädlicher Moleküle. Gegen letztere Hypothese spricht jedoch, dass eine vergleichbare Aktivitätssteigerung auch bei den roGFPc-Tieren beobachtet werden konnte (Kolbrink 2015; Wagener et al. 2016). Da das Transgen jedoch zufällig in das Genom integriert wird,

wäre es sehr unwahrscheinlich, dass bei beiden separat betrachteten Founderlinien ein gleichartiger Genbereich von der Mutation betroffen gewesen wäre. Ein negativer Effekt des roGFP1-Genkonstruktes bzw. des Proteins auf die Motorkoordination der Tiere konnte im Rahmen des Rota-Rod[®]-Testverfahrens jedoch klar ausgeschlossen werden.

Um die Umweltexploration der Tiere zu analysieren, wurde das Open-Field-Verfahren gewählt. Dabei wurde das explorative Verhalten der Mäuse in einem freien Feld aufgezeichnet und analysiert. Hinsichtlich des Bewegungsmusters zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen. Es ließ sich beobachten, dass beide Gruppen sich bevorzugt in den geschützten Ecken, dann im Bereich der Kanten und nur möglichst wenig im ungeschützt liegenden Zentrum aufhielten. Für die Laufgeschwindigkeit, die zurückgelegte Strecke und die eingelegten Bewegungspausen konnten Unterschiede zwischen den Geschlechtern ermittelt werden. Die Weibchen bewegten sich durchschnittlich schneller, weiter und prozentual häufiger als die Männchen. Rein spekulativ könnte man vermuten, dass die Weibchen aufgrund ihres geringeren Körpergewichtes agiler und weniger träge seien als die entsprechenden Männchen. In meinen Recherchen konnte ich jedoch keine Beobachtungen finden, die diese These stützen und die weiblichen C57BL/6J-Tiere als generell aktiver beschreiben. Ein signifikanter Unterschied zwischen roGFPm-Mäusen und Wildtyptieren zeigte sich lediglich bei der Häufigkeit des Aufrichtens. Die transgenen Weibchen richteten sich durchschnittlich häufiger auf als ihr Vergleichskollektiv und zeigten sich damit etwas aktiver als die Wildtypen. Auch hier schienen die transgenen Tiere durch das roGFP1 jedoch keinen Nachteil zu erfahren.

Im Rahmen der Atemanalyse konnte bei den transgenen Tieren eine signifikant höhere Atemfrequenz als bei den Wildtypen beobachtet werden. Da die ermittelten Atemminutenvolumina jedoch keine Unterschiede aufwiesen, scheint die erhöhte Frequenz nicht auf einen erhöhten Sauerstoffbedarf, sondern auf vermehrte Schnüffelpbewegungen mit einer schnelleren, aber flacheren Atmung zurückzuführen zu sein. Ein vermehrtes Schnüffeln könnte für ein explorationsfreudigeres Verhalten sprechen. Diese Beobachtung stützt die Hypothese, dass das roGFP1 das Aktivitätsniveau der Tiere messbar steigert. In Bezug auf Atemaussetzer oder die Regelmäßigkeit der Atmung wurden keine Unterschiede zwischen den Genotypen beobachtet.

Das roGFP1-Transgen scheint in einigen dieser Analysen also einen leistungssteigernden Einfluss auszuüben. An einem weiteren MCAT-Mausmodell, für das eine Katalase-Überexpression in den neuronalen Mitochondrien von Hippokampus, Kortex und Kleinhirn nachgewiesen wurde, konnte bei den transgenen Tieren ein weniger ängstliches

Verhalten nachgewiesen werden (Olsen et al. 2014). Im Rahmen eines sogenannten ZeroMaze[®]-Testverfahrens, bei dem die Tiere in einer kreisförmigen Spur laufen, die in abgedunkelte und freie, belichtete Areale unterteilt ist, hielten sich die MCAT-Tiere signifikant länger in den hellen Zonen auf. Dies stellt für Mäuse generell ein riskanteres Verhalten dar, da sie dabei in freier Natur ungeschützt vor Fressfeinden wären (Olsen et al. 2014). In der Annahme, dass ein weniger ängstliches Verhalten mit mehr Neugierde und Explorationsfreudigkeit einhergeht, könnte man die beobachteten vermehrten Schnüffelbewegungen in der Atemkammer und das häufigere Aufrichten im Open-Field damit durchaus untermauern. Nicht ganz ins Bild passt, dass lediglich dieser eine Parameter des Open-Field-Tests für ein explorationsfreudigeres Verhalten spricht, während sich die Vergleichsgruppen hinsichtlich der anderen Parameter nicht unterscheiden. Ob das roGFP1 selber Eigenschaften als Redoxpuffer besitzt und ROS und RNS abfängt (was die ähnlichen Verhaltensauffälligkeiten des MCAT-Modells von Olsen und Kollegen erklären würde) oder ob die Integration des Genkonstruktes durch die Modulation des Genoms einen positiven Effekt auf die Tiere ausübt, bleibt unklar. Eine Beeinträchtigung des Wohlbefindens der Tiere durch das roGFP1 in den Mitochondrien kann durch diese umfassenden Verhaltensanalysen jedoch klar ausgeschlossen werden.

4.2 Das roGFPm-Expressionsmuster

Im Rahmen der prä nukleären Mikroinjektion erfolgte die Integration des roGFP1-Genkonstruktes in das Erbgut der Tiere rein zufällig. Dabei kann die Kopienzahl des Transgens zwischen 1-50 Kopien variieren (Feng et al. 2000), sodass sich die verschiedenen Founderlinien unter Umständen in der Anzahl ihrer roGFP1-Genkopien deutlich unterscheiden können. Liegt das roGFP1-Gen mehrfach vor, wird bei den Tieren dieser Founderlinie folglich auch mehr roGFP1 in den Neuronen synthetisiert, sodass dort eine stärkere Expression nachgewiesen werden kann.

Neben der Expressionsstärke habe ich die Tiere unterschiedlicher Founderlinien hinsichtlich ihres Expressionsmusters analysiert, also untersucht, in welchen Bereichen des Gehirns das roGFP1 vorrangig gebildet wird. Das roGFP1-Genkonstrukt steht bei der Redoxindikator-Maus unter der Kontrolle des *Thy1.2*-Promotors. Beim *Thy1.2* handelt es sich um ein zellspezifisches Oberflächenantigen, das weit verbreitet insbesondere in Projektionsneuronen des zentralen und peripheren Nervensystems gebildet wird. Daneben kommt *Thy1.2* in den nicht-neuronalen Zellen des namensgebenden Thymus vor (Caroni 1997; Feng et al. 2000). In den *Thy1.2*-bildenden Zelltypen wird der Promotor also in der Regel durch spezifische Transkriptionsfaktoren aktiviert und das dahinter geschaltete Gen,

unser Konstrukt, auf diese Weise der Proteinbiosynthese zugänglich gemacht. Dennoch ist in der Literatur mehrfach beschrieben, dass Proteine unter der Kontrolle des *Thy1.2*-Promotors nicht in allen Zellarten und nicht in allen Zellen einer neuronalen Subgruppe auch tatsächlich in gleichem Umfang exprimiert werden müssen, sodass die Verteilung des fluoreszierenden Sensors im Gehirn durchaus variieren kann. Dieser Unterschied ist häufig für Tiere unterschiedlicher Founderlinien, kaum jedoch für Tiere eines genetischen Ursprungs beschrieben worden (Caroni 1997; Feng et al. 2000). Deswegen ist es essentiell, genau diese Linie auszumachen und im Detail zu beschreiben, die den Sensor in hohem Ausmaß in denjenigen neuronalen Subtypen bildet, welche für das angestrebte Mausmodell von Interesse sind.

Meine Analysen des Expressionsmusters der roGFPm-Tiere an 30 µm dicken, PFA-fixierten Frontal- und Sagittalschnitten des Mäusehirns sowie des Rückenmarks ließen eine weit verbreitete, nahezu ubiquitäre neuronale Expression des Redoxsensors erkennen. Zudem deckten sich meine Beobachtungen bezüglich des Verteilungsmusters wesentlich mit Erkenntnissen in der Literatur. Feng und Kollegen untersuchten beispielsweise 25 transgene Mauslinien mit ebenfalls *Thy1.2*-regulierter Fluoreszenzprotein-Expression. Dabei wurde eine besonders deutliche Expression des Proteins in den Neuronen des Kortexes sowie in den Moosfasern des Kleinhirns beschrieben, während Tiere weniger Linien in den Purkinjellen fluoreszierten und nur vereinzelt Founderlinien eine Expression im *Str. moleculare* des Kleinhirns zeigten (Feng et al. 2000).

Die von mir untersuchten Redoxindikator-Mäuse zeigten ebenfalls deutlich fluoreszierende kortikale Neurone, insbesondere in der Lamina V, in der die Motorneurone als wichtige Projektionsneurone lokalisiert sind. Auch im Kleinhirn zeigten meine Analysen ähnliche Ergebnisse wie Feng und Kollegen (Feng et al. 2000). Die Moosfasern als wichtige Afferenzen des Kleinhirns ziehen durch das faserreiche Mark in die Körnerzellschicht. Beide diese Schichten ließen in meinen Untersuchungen an der roGFPm-Redoxindikator-Maus ein deutliches Fluoreszenzsignal erkennen. Weitere Parallelen konnten hinsichtlich des *Str. purkinjense* und des *Str. moleculare* ermittelt werden. So zeigte ebenfalls keine der von mir untersuchten Redoxindikator-Mäuse eine Expression des Proteins in den Purkinjellen oder in der daran anschließenden Faserschicht, dem *Str. moleculare*, in dem die Dendritenbäume der Purkinjellen und verschiedene Interneurone liegen.

Besonders kräftig zeigte sich die Expression zudem im Bereich der Hippokampusformation, insbesondere in der CA1-Region und im Gyrus dentatus, während die CA3-Region eine schwächere Expression aufwies. Auch Caroni und Kollegen (Caroni 1997) beschrieben eine deutliche *Thy1.2*-gesteuerte Proteinexpression für den

Hippokampus. Im Rahmen meiner Analysen ließ die genaue Betrachtung dieses Bereichs erkennen, wie die Mitochondrien innerhalb des Neurons angeordnet sind, da der Hippokampus entwicklungsbedingt aus gefaltet angeordneten Schichten von Zellbändern und faserreichen Strukturen aufgebaut ist. In der Aufnahme des Hippokampus erkennt man die Regionen CA1 und CA3 mit ihrem *Str. pyramidale* (Abbildung 32B), indem die Somata der Pyramidenzellen liegen. Im Gegensatz zu dem Fluoreszenzmuster einer Maus mit zytosolischer roGFP1-Expression (Abbildung 32A) ist das Pyramidenzellband eher fluoreszenzarm.

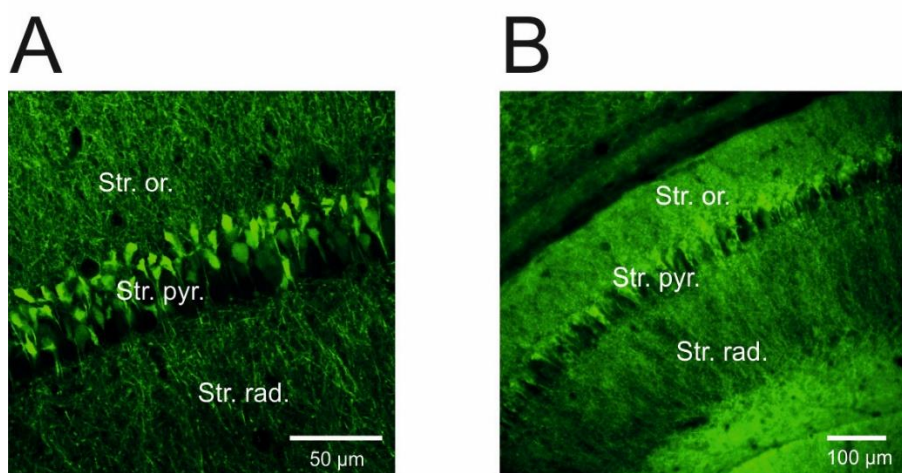


Abbildung 32: Hippokampale roGFPc- und roGFPm-Expression im Vergleich

(A) Die Pyramidenzellsomata des hippocampalen *Stratum pyramidale* (Str. pyr.) fluoreszieren kräftig bei dem 50 Tage alten roGFPc-Männchen und bilden ein leuchtendes Band im Präparat. Aufgenommen wurde der PFA-fixierte Schnitt mit einem 20× 0.95 NA Objektiv von einem Mitglied der Arbeitsgruppe. **(B)** Bei den roGFPm-Tieren dagegen werden die fluoreszierenden Mitochondrien vermehrt vom Zellkern in die Nervenzellfortsätze der angrenzenden faserreichen Schichten (Str. or.: *Stratum oriens*; Str. rad.: *Stratum radiatum*) gedrückt, sodass in der Übersicht ein vergleichsweise leer erscheinendes Band imponiert. Bei dem Tier handelt es sich um ein 55 Tage altes roGFPm-Weibchen.

Bei stärkerer Vergrößerung erkennt man, dass die Mitochondrien durch den Zellkern an den Rand des Somas gedrückt werden. Die faserreichen Schichten des Hippokampus dagegen, insbesondere die *Lamina moleculare* des Gyrus dentatus, exprimieren viel kräftiger. Die Mitochondrien scheinen auch hier vermehrt in den Zellfortsätzen zu liegen. Noch deutlicher sieht man die genauen Lagebeziehungen der Mitochondrien zum Nukleus der Zelle bei der immunhistologischen Gegenfärbung mit dem neuronenspezifischen Antikörper NeuN, der bekanntlich spezifisch das ausschließlich in reifen Neuronen vorkommende DNA-bindende nukleare Protein NeuN bindet und dort eine kräftige Färbung des Nukleus und eine schwächere des restlichen Somas bewirkt (Mullen et al. 1992). In der Detailaufnahme mit dem 2-Photonen-Laser-Scanning-Mikroskop bestätigte

sich die Annahme, dass sich die Mitochondrien um den Zellkern herum anordnen und von ihm an den Rand des Somas gedrückt werden (Abbildung 22B).

Zudem lässt die Gegenfärbung eine genaue quantitative Analyse zu. Mit wenigen Ausnahmen, wie zum Beispiel den Purkinjezellen, exprimieren alle Neurone NeuN (Mullen et al. 1992). Nur ein gewisser Anteil der rot markierten Zellen weist allerdings zusätzlich grün fluoreszierende Mitochondrien auf, sodass der genaue Anteil roGFP1-positiver Neurone für die unterschiedlichen Regionen analysiert werden konnte. Dieser Anteil roGFP1-positiver Zellen an allen Neuronen einer Subgruppe kann sich theoretisch von Linie zu Linie unterscheiden (Caroni 1997; Feng et al. 2000). Warum kann es jetzt jedoch sein, dass nicht alle Zellen einer Untergruppe das roGFP1 bilden, obwohl sie doch alle der Kontrolle des gleichen Promotors unterliegen? Und warum variiert dieses Muster der Expression zwischen den Founderlinien, wo doch alle transgenen Mäuse das gleiche Genkonstrukt in ihrem Genom tragen? Dafür werden in der Literatur unterschiedliche ursächliche Hypothesen diskutiert. Die Menge an exprimiertem roGFP1 in einer Zelle wird wie oben bereits erwähnt am ehesten auf die variable Anzahl der roGFP1-Genkopien im Genom zurückgeführt (Feng et al. 2000). Der Variation des Anteils an roGFP1-exprimierenden Zellen einer Subpopulation liegt am ehesten die zufällige Integration des Transgens hinsichtlich des Genortes zugrunde. Da die Chromatinstruktur des Genoms zwischen den unterschiedlichen Chromosomen und den einzelnen Genen variiert, beeinflusst sie möglicherweise das Erkennen und Ablesen des Transgens durch die entsprechenden Transkriptionsfaktoren (Feng et al. 2000). So zeigte bei meinen Untersuchungen die Linie Nr. 1 Abweichungen hinsichtlich des Fluoreszenzmusters im Kortex. Sie exprimierte nicht wie die anderen untersuchten Linien vorrangig in Layer V, sondern verstärkt in Layer IV und VI roGFP1. Möglicherweise ist die Chromatinstruktur der Tiere der Founderlinie Nr. 1 an der Stelle des Einbaus stärker oder schwächer kondensiert und wird nicht so gut von den Transkriptionsfaktoren für Layer V, sondern besser von denen für das Layer IV und VI erkannt. Die Chromatinstruktur könnte also ein Grund dafür sein, weshalb manche Zellbereiche einen höheren Anteil an roGFP1-positiven Zellen aufweisen als andere.

Zudem kann eine von Zelltyp zu Zelltyp variierende Promotoraktivität vermutet werden. Beispielsweise könnte es in bestimmten zellulären Subpopulationen mit erhöhtem metabolischen Umsatz von Vorteil sein, zelluläre Proteine schneller auszutauschen, um sie vor vermehrt anfallenden ROS und den damit einhergehenden degenerativen Oxidationsprozessen zu bewahren. Eine Hochregulation der *Thy1.2*-Promotoraktivität in diesen Zellen würde bei unserer Redoxindikator-Maus folglich eine intensivierte roGFP1-

Produktion einer bestimmten Subpopulation bedingen. Alles in allem unterschieden sich die von mir untersuchten Linien hinsichtlich ihres Expressionsmusters nicht wesentlich voneinander. Wegen der kräftigsten Expression und der ergiebigsten Zucht fokussierten wir uns darauf, die Founderlinie Nr. 4 als Redoxindikator-Mauslinie zu etablieren.

Vor allem aber sollte mit der NeuN-Gegenfärbung der Neurone gezeigt werden, dass roGFP1 ausschließlich in Neuronen und nicht etwa in anderen Zellen des Nervensystems exprimiert wird. Der Nachweis dieser Neuronenspezifität ist deswegen so wichtig, da es bei Expression des Sensors in anderen Zellen, beispielsweise Gliazellen, zu einer Überlagerung des Fluoreszenzsignals der Redoxsensoren aus den unterschiedlichen Zellentypen kommen würde und die Messung keine brauchbaren Aussagen über den explizit neuronalen Redoxstatus zuließe. Durch das Zusammenspiel aus NeuN-*Labeling* und der hochauflösenden 2-Photonen-Laser-Scanning-Mikroskopie belegten meine Aufnahmen, dass die Mitochondrien konzentrisch angeordnet sind und sich in der *Overlay*-Darstellung um einen rot gegengefärbten Zellkern gruppieren. Grün fluoreszierende Zellorganellen ohne ein rotes NeuN-Äquivalent konnte ich nicht beobachten. Limitationen bei diesem Nachweisverfahren zeigen sich allerdings für die fasserreichen Regionen, da NeuN lediglich das Soma und den Nukleus der Neurone darstellt. Die Faserschichten dagegen zeigen diffuse grün fluoreszierende Mitochondrien ohne eine entsprechende NeuN-gefärbte Struktur. Dem ist natürlich schwer zu entnehmen, ob es sich nun ausschließlich um neuronale Mitochondrien handelt oder ob auch mitochondrienreiche Gliafasern fluoreszieren.

Zur optimalen Gegenfärbung auch dieser fasserreichen Schichten könnte man in Zukunft noch einmal einen immunhistochemischen Marker nutzen, der nicht nur das Soma der Nervenzellen färbt, sondern auch axonale Proteine als Zielstruktur besitzt. Der Anti-MAP2-Antikörper beispielsweise bindet spezifisch an ein Mikrotubuli-assoziiertes Protein der Nervenzelle und stellt damit das neuronale Zytoskelett und eben auch die Nervenzellfortsätze dar (Izant und McIntosh 1980). Eine entsprechende Gegenfärbung und *Overlay*-Darstellung mit diesem Antikörper könnte die Neuronenspezifität gerade bei den roGFP1-Redoxindikator-Mäusen mit mitochondrialer Expression ergänzend belegen, da die Mitochondrien vermehrt in den Zellfortsätzen anzufinden sind. Dadurch könnte sichergestellt werden, dass die fluoreszierenden Mitochondrien der Faserschichten in den Zellfortsätzen von Nerven- und nicht von Gliazellen liegen. Dennoch sehen wir die Neuronenspezifität als eindeutig belegt an, da in den Arealen der Perikaryen gezeigt wird, dass alle Zellen mit konzentrisch im Soma angeordneten Mitochondrien einen NeuN-gegengefärbten Zellkern aufweisen. Zudem schließen Untersuchungen in der Literatur eine

extraneuronale Expression von *Thy1.2*-kontrollierten Proteinen im peripheren und zentralen Nervensystem klar aus (Caroni 1997; Feng et al. 2000).

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass es sich bei den fluoreszierenden Organellen tatsächlich um die Mitochondrien und nicht etwa um andere Zellkompartimente handelt. Zum einen legt die Detailaufnahme der Nervenzell-Topographie dies nahe, zum anderen belegten wir die Mitochondrienspezifität explizit durch eine mitochondriale Gegenfärbung mit dem Mitotracker® Red 580. Die *Overlay*-Darstellung dieser Mitochondrienfärbung und des roGFPm-Fluoreszenzmusters ließen eine exakt identische Verteilung im Neuron erkennen (Abbildung 25).

Die Mitotracker-Färbung gelang in meinen Experimenten am besten an kultivierten Neuronen. Dabei wurde neonatales hippocampales Mäusehirngewebe vom zweiten postnatalen Tag kultiviert und am dritten Tag *in vitro* für den Versuch herangezogen. Mit Hilfe der Färbung konnte neben der Mitochondrienspezifität auch die bereits neonatale Expression des Sensors belegt werden. Dem widersprechend wurde der Beginn der *Thy1.2*-gesteuerten Expression in der Literatur ursprünglich für reife, postmitotische Neurone zwischen dem sechsten und zehnten Lebenstag (Caroni 1997) beschrieben. Ebenso wurde ein erst allmählicher Anstieg der Proteinmenge in der Postnatalperiode angegeben (Morris 1985). Andere Untersuchungen wiederum stützten meine Beobachtungen der frühen neonatalen Transgenbildung und beschreiben sogar eine bereits embryonale Expression unter der Kontrolle des *Thy1.2*-Promotors. An einem transgenen Mausmodell mit *Thy1.2*-regulierter YFP-Expression konnte bereits am 13. Tag der Embryonalentwicklung eine Expression in den Motorneuronen nachgewiesen werden, was die detailliertere Forschung der Synapsenausbildung embryonaler Nervenzellen ermöglichte (Feng et al. 2000; Noakes et al. 1993). Wieder ein anderes Mausmodell zeigte bereits am elften Tag der Embryonalentwicklung eine *Thy1.2*-regulierte Cre-Rekombinase-Synthese in unreifen, noch teilungsfähigen Vorläuferzellen von Neuronen, den Neuroblasten (Campsall et al. 2002). Eine Expression des roGFP1 in den Mitochondrien der Redoxindikator-Mäuse am zweiten Lebenstag kann also durchaus in Einklang mit anderweitigen Forschungsergebnissen gebracht werden.

Die stabile roGFP1-Expression der Redoxindikator-Maus von der Neonatalperiode an bis zum später von mir hier getesteten Entwicklungsstand (pd139) eröffnet ein weites Feld an Forschungsmöglichkeiten. Anders als bisherige Verfahren der Redoxmessung mit roGFP1, bei denen das codierende Genkonstrukt zunächst mittels Lipofektion oder viralen Transduktionsverfahren in die Zelle geschleust werden musste, was nur an kultivierbarem, neonatalem Gewebe realisierbar war (Funke et al. 2011; Großer et al. 2012), ermöglichte

die Redoxindikator-Maus wegen ihrer endogenen Expression des Sensors Analysen an Tieren unterschiedlichster Entwicklungsstadien. Die stabile *in vivo* - Expression revolutionierte dadurch geradezu die Redoxmessung. Insbesondere bei doppelt-transgenen Mausmodellen für roGFP1 und einem Krankheitsbild mit stadienhaftem Verlauf oder einem protrahierten Krankheitsbeginn ist dies von Nutzen, um den Redoxstatus von Tieren unterschiedlichster Altersstufen beurteilen zu können. Beim Rett-Syndrom beispielsweise, das neben dem Redox-*Imaging* einen weiteren Forschungsschwerpunkt unserer Arbeitsgruppe darstellt, ist ein verzögerter Krankheitsbeginn typisch. Bei betroffenen Patientinnen manifestieren sich erste Symptome der Erkrankung erst nach sechs bis 16 Lebensmonaten (Hagberg et al. 1983; Percy 2016). Ein Mausmodell, mit dem man Untersuchungen an Tieren unterschiedlicher Entwicklungsstadien durchführen kann, vermag gerade für solche neurologischen Erkrankungen mit verzögertem Krankheitsbeginn diverse neue Untersuchungen zu ermöglichen.

Des Weiteren können die Mitochondrien durch das stabil exprimierte fluoreszierende Protein mit einem Mikroskop genügend hoher Auflösung hinsichtlich ihrer Morphologie, Mobilität und Vitalität beurteilt werden. Bei bestimmten Erkrankungen, auch hier beispielsweise dem Rett-Syndrom, wurden Vakuolen und Schrumpfung der Mitochondrien an Hirnpräparaten von Rett-Patientinnen beschrieben (Cornford et al. 1994; Ruch et al. 1989). An den Rett-Mäusen konnten mittels Cyanin-Farbstoffen ebenfalls ultrastrukturelle Defekte der Mitochondrien festgestellt werden (Belichenko et al. 2009). Das stabil in den Mitochondrien gebildete roGFP1 der Redoxindikator-Maus ermöglicht nun eine genaue optische Analyse dieses Zellkompartiments in direktem Bezug zum aktuell vorherrschenden Redoxstatus. Es kann also live detektiert werden, ob und in welcher Art und Weise sich der Oxidationsstatus der mitochondrialen Matrix auf die Morphologie der Zellorganelle auswirkt.

Durch vergleichende Aufnahmen der roGFPm-Präparate mit denen eines Wildtyptieres konnte gezeigt werden, dass eine Kontamination des Fluoreszenzsignals durch autofluoreszierende Strukturen unter unseren Messbedingungen vernachlässigbar gering ist. Erst bei siebenfach längerer Anregung des WT-Schnittes konnte ein vergleichbar starkes, wenn auch diffuseres Fluoreszieren des nicht transgenen Mäusegewebes festgestellt werden (Abbildung 27B). Bei dem von uns verwendeten Filtersystem kommen als Quelle der möglichen Autofluoreszenz vor allem Flavoproteine in Frage. Diese verfügen über ein besonders weites Emissions- und Exzitationsspektrum und werden in der Literatur am häufigsten als Ursache für Autofluoreszenzphänomene verantwortlich gemacht (Billinton und Knight 2001). Mit einem Exzitationsbereich von 380 bis 490 nm und einer Emission

im Spektralbereich von 520 bis 560 nm Wellenlänge (Billinton und Knight 2001) weisen sie ähnliche Fluoreszenzeigenschaften wie roGFP1 auf. Da der von uns verwendete Bandpassfilter Fluoreszenz im Bereich von 500-550 nm passieren lässt, wäre eine Überlagerung der Signale durchaus denkbar. Zudem weist das Muster des Autofluoreszenzsignals eine ähnliche regionale Verteilung im Hirnschnitt auf wie das des roGFPm. Beispielsweise scheinen auch hier die Zellkerne die fluoreszierenden Strukturen aus dem Zellkörperband der CA1-Region in die Zellfortsätze zu verdrängen (Abbildung 27B). Da es sich bei einem Großteil der Flavoproteine um Coenzyme, wie beispielsweise FAD handelt, die als Teil des Elektronentransfersystems hauptsächlich in den Mitochondrien lokalisiert sind (Lienhart et al. 2013), könnte ein ähnliches Fluoreszenzmuster die Hypothese der Flavoprotein-Autofluoreszenz untermauern. Neben den Flavoproteinen könnten auch Nicotinamid-Adenin-Dinukleotide oder Lipofusazine zu der dezenten Autofluoreszenz am Wildtypschnitt beitragen. Allerdings würde unser optisches Filtersystem einen Großteil ihrer Emission blockieren und auch das Fluoreszenzmuster würde dem der roGFPm-Tiere vermutlich nicht so sehr ähneln, da sie als weniger mitochondrienspezifisch gelten. Dennoch muss ganz klar hervorgehoben werden, dass sich unter den gewählten Messeinstellungen zur Anregung des roGFP1 keine wesentliche Autofluoreszenzantwort zeigt, die die Sensorfunktionalität beeinträchtigen könnte. Die kurze Belichtungszeit, die vermutlich wegen der vergleichbar hohen Expressionsdichte des roGFP1-Sensors ein deutliches Fluoreszenzsignal hervorruft, reicht nicht aus, um die mutmaßlich autofluoreszierenden Flavoproteine anzuregen.

4.3 Verifizierung der geeigneten Sensorfunktionalität

Mit Hilfe von CCD-Kamera-basierten ratiometrischen Messungen an akuten Hirnschnitten adulter roGFPm-Mäuse konnte die Funktionalität des Redoxsensors erfolgreich nachgewiesen werden. Dazu wurden die hippokampalen Regionen CA1, CA3 und der Gyrus dentatus sowie Areale im Kortex untersucht, indem die Fluoreszenzratio bei alternierender Anregung mit 395/470 nm Wellenlänge kalkuliert wurde. Die ratiometrische Darstellung der Fluoreszenzantworten ermöglichte es, unabhängig von der Konzentration des Sensors zuverlässige Aussagen über den Redoxstatus zu liefern (Funke et al. 2011; Gryniewicz et al. 1985). Um quantitative Aussagen aus dem Verhältniswert von oxidiertem zu reduzierten roGFP1 ziehen zu können, musste dazu jedoch zunächst der mögliche Antwortbereich des Sensors festgelegt werden. Durch die sättigende Applikation des Oxidationsmittels H_2O_2 und des Reduktionsmittels DTT wurden die maximal mögliche Oxidation sowie die maximal mögliche Reduktion bestimmt und dadurch die Spanne der möglichen Signalantwort kalibriert. Dabei zeigte der Sensor ein vollständig reversibles

Antwortverhalten auf die Modulation des mitochondrialen Redoxstatus. An Schnitt- und Zellkulturen konnte dies bereits erfolgreich für das roGFP1 durchgeführt werden (Funke et al. 2011; Großer et al. 2012). Auch hier antwortete der Sensor sowohl reversibel auf Reduktion als auch auf Oxidation. Allerdings reichte bei dem kultivierten Gewebe eine Applikationsdauer der Lösungen von drei Minuten, während an den akuten Hirnschnitten der roGFPm-Mäuse eine siebenminütige Applikationsdauer zur optimalen Sättigung erforderlich war. Dies liegt vermutlich daran, dass die Wirkstoffe zunächst in das Gewebe diffundieren müssen und die Myelinisierung der Neurone (Norton und Poduslo 1973) sowie die Dichte des Gewebes im Laufe des Lebens immer weiter zunehmen, sodass das applizierte Pharmakon bei dem adulten Gewebe zunächst ein engeres Interstitium und eine kräftigere Myelinschicht überwinden muss, um an die Nervenzelle zu gelangen.

Das Ausmaß der Oxidation der unterschiedlichen Bereiche wurde für alle untersuchten Regionen als relativer Oxidationswert in Prozent und als absolutes Redoxpotential in mV angegeben, wodurch eine quantitative und direkt vergleichbare Aussage über den absoluten Redoxstatus in den Mitochondrien der unterschiedlichen Hirnareale möglich wurde. In der CA3-Region des Hippokampus wurden signifikant oxidiertere Redoxbedingungen nachgewiesen als in allen anderen untersuchten Hirnarealen. Dieses Phänomen wurde auch an dem bereits charakterisierten roGFPc-Mausmodell beschrieben (Kolbrink 2015; Wagener et al. 2016). Kann und Kollegen zeigten an Hippokampus-Präparaten von Mäusen und Ratten, dass Gamma-Wellen, von denen angenommen wird, dass sie mit höheren integrativen Prozessen und gesteigertem neuronalen Metabolismus einhergehen, vermehrt in der CA3-Region detektiert werden können. Zudem wies die CA3-Region bei ihren Untersuchungen den höchsten O_2 -Verbrauch und die größte Atmungskettenkomplex I - Expression des Hippokampus auf (Kann et al. 2011). Diese gesteigerte neuronale Aktivität bedingt möglicherweise eine vermehrte Bildung und Akkumulation von ROS in den Zellen der CA3-Region und stellt somit einen Erklärungsansatz für den stärker oxidierten Redoxstatus in den CA3-Zellen bzw. deren Mitochondrien dar.

In allen untersuchten Bereichen schienen die oxidierenden Einflüsse unter Ruhebedingungen stärker auf den Redoxstatus der mitochondrialen Matrix einzuwirken als die reduzierenden, da der mittlere *Baseline*-Oxidationswert jeweils deutlich über 50% lag, also mehr als die Hälfte des roGFP1 in der Disulfidkonfiguration vorlag. Bei dem roGFPc-Mausmodell dagegen lagen die Werte der *Baseline*-Oxidation deutlich unter 50%. Diese Beobachtung bestärkt die Bedeutung der Mitochondrien als primäre Quelle der ROS-Produktion (Boveris und Chance 1973; Valko et al. 2007), lässt sich in diesem Kompartiment doch eine deutlich oxidiertere Umgebung messen als im Zytosol der

Neurone. Ähnliches zeigte sich bei Studien von Waypa und Kollegen (Waypa et al. 2010), die kompartimentspezifische Redoxverhältnisse an Muskelzellen mit Hilfe von roGFP2-Redoxsensoren untersuchten. Dabei betrug der mittlere Oxidierungsgrad (OxyD) im Zytosol 19-22%, während in den Mitochondrien der Muskelzellen 49-63% des Redoxsensors in oxidiert Form vorlagen. Eine gegensätzliche Beobachtung machten Dooley und Kollegen (Dooley et al. 2004) mit dem roGFP1-Redoxsensor an HeLa-Zellen. Dort zeigte sich die mitochondriale Matrix stärker reduziert als das Zytosol der Zellen. Ob diese abweichenden Beobachtungen auf den unterschiedlichen Zelltypen oder aber auf nicht ausreichend standardisierten Messbedingungen beruhen, ist nicht endgültig geklärt. Die Bedeutung standardisierter und stabil etablierter Methoden zur Redoxmessung kommt hierdurch jedoch erneut zum Ausdruck.

Durch gezieltes pharmakologisches Eingreifen in den mitochondrialen ROS-Stoffwechsel konnte gezeigt werden, dass unser Redoxsensor roGFP1 nicht nur auf exogen applizierte Pharmaka reagiert, sondern ebenso sensitiv auch die endogen in den Mitochondrien erzeugten reaktiven Spezies zu detektieren vermag. Antimycin A als irreversibler Inhibitor des Atmungskettenkomplexes III führt über einen Aufstau von Elektronen an dem blockierten Komplex zu einem erhöhten Elektronenleck und einer vermehrten Bildung von Superoxid-Anionen an eben diesem (Brand 2010; Funke et al. 2011). Wie erwartet zeigte sich bei Applikation von Antimycin A an den akuten Hirnschnitten eine deutliche Verschiebung des mitochondrialen roGFP1-Fluoreszenzverhältnisses in Richtung Oxidation. Da Antimycin A den Komplex III irreversibel hemmt, entsprach es ebenfalls unseren Erwartungen, dass der relative Anstieg des Redoxpotentials auch nach vollständigem Auswaschen des Pharmakons eine stetige weitere Zunahme zeigte und sich nicht erholte. Weiterführende Versuche unserer Arbeitsgruppe an akuten Hirnpräparaten der roGFPm-Mäuse konnten zudem zeigen, dass eine Vorbehandlung der Schnitte mit dem antioxidativ wirkenden Superoxiddismutase-Analogen mitoTEMPO den oxidierenden Effekt in den Mitochondrien deutlich abschwächte (Wagener et al. 2016). Vermutlich werden die durch die Antimycin A-Gabe vermehrt gebildeten Superoxid-Anionen durch das SOD-Analogen effektiv abgefangen und können verstärkt zu H_2O_2 und weiter zu Wasser abgebaut werden. Es gelang uns also, das feinregulierte Zusammenspiel in den Mitochondrien aus endogener ROS-Produktion auf der einen und mitochondrialen antioxidativen Prozessen auf der anderen Seite durch die Änderung des roGFP1-Fluoreszenzverhältnisses adäquat widerzuspiegeln und dadurch den aktuellen Redoxstatus der mitochondrialen Matrix zu erfassen.

Auch die Applikation des SOD-Inhibitors DEDTC führte zu Veränderungen des mitochondrialen ROS-Levels, die von roGFP1 detektiert werden konnten. Die SOD bewirkt die Dismutation von $O_2^{\bullet-}$ zu H_2O_2 , welches wiederum durch die Katalase oder die Glutathion-Peroxidase weiter zu Wasser abgebaut wird, sodass eine Hemmung dieses antioxidativen Enzyms eine zelluläre bzw. mitochondriale Akkumulation von $O_2^{\bullet-}$ bewirkt. Wie erwartet zeigte sich nach DEDTC-Applikation eine oxidative Verschiebung der roGFP1-Ratio, die ebenfalls von Funke und Großer an roGFP1-transduzierten Schnitt- und Zellkulturen beobachtet werden konnte (Funke et al. 2011; Großer et al. 2012). Auch dort zeigte sich ein transienter Anstieg des Redoxstatus, der sich nach Auswaschen des Pharmakons wieder erholte. Das stabil biphasische Antwortverhalten zeigte sich jedoch nur bei den Untersuchungen an den Redoxindikator-Mäusen. Eine mögliche Erklärung dafür könnte in den methodischen Unterschieden begründet sein. So wurden bei meinen Versuchen intakte Schnitte und kein kultiviertes Gewebe verwendet. Zudem wurden hier adulte Tiere herangezogen, während die vorherigen Untersuchungen nur an neonatalen oder sehr jungen Tieren möglich waren.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Reaktive Sauerstoffspezies determinieren in wesentlichem Ausmaß den sensiblen Redoxstatus der Zelle und beeinflussen dadurch sowohl physiologische Signalfunktionen als auch die Entstehung vielfältiger (neuro)degenerativer Prozesse. Da die aktuelle Forschung erst am Beginn steht, das feinregulierte Zusammenspiel aus Oxidation und Reduktion mit seinen Auswirkungen für die zelluläre Funktionalität zu verstehen, ist die Entwicklung zuverlässiger Methoden zur Redoxmessung unerlässlich. Als wissenschaftlich gesichert gilt dagegen, dass die Mitochondrien als wesentlicher Ort der Sauerstoffutilisation eine der Hauptquellen der ROS-Produktion darstellen. Gegenstand meiner Arbeit war es deswegen, eine neue transgene Mauslinie mit stabiler Expression des ratiometrischen Redoxindikator-Proteins roGFP1 in den neuronalen Mitochondrien zu untersuchen und als zuverlässige Messmethode für die neurophysiologische Forschung zu etablieren.

Dazu wurde zunächst geprüft, ob die Integration des roGFP1-Genkonstruktes in das Genom der Mäuse irgendeinen phänotypischen Nachteil für die transgenen Tiere mit sich brachte oder ob sie sich wie ihre Wildtyp-Geschwister unauffällig entwickelten. Mit Hilfe von unterschiedlichen fluoreszenzbasierten Mikroskopieverfahren wurde anschließend das genaue Expressionsmuster des Redoxsensors innerhalb der unterschiedlichen Hirnregionen und Tiere unterschiedlicher Founderlinien analysiert. Ratiometrische Messungen an akuten Hirnschnitten sollten prüfen, inwieweit der Indikator den vorherrschenden Redoxstatus der mitochondrialen Matrix tatsächlich zuverlässig und reversibel zu erfassen vermochte.

Im Rahmen meiner Datenerhebung ließen die transgenen Tiere im direkten Vergleich mit ihren Wildtyp-Geschwistern keine Beeinträchtigungen hinsichtlich Entwicklung und Verhalten erkennen. Einige erhobene Parameter deuteten auf ein aktiveres Verhalten der roGFPm-Tiere hin, ein negativer Einfluss auf den Gesundheitszustand durch das Transgen konnte jedoch klar ausgeschlossen werden. Das neuronale roGFPm-Verteilungsmuster zeigte sich entsprechend der Kontrolle durch den *Tby1.2*-Promotor besonders deutlich in den Projektionsneuronen von Hippokampus und Großhirnrinde sowie im Kleinhirn, dem Rückenmark und in weiten Teilen des restlichen Gehirns. Die Neuronenspezifität des Redoxsensors wurde mit Hilfe von immunhistochemischer Gegenfärbung mit NeuN und der detaillauflösenden 2-Photonen-Laser-Scanning-Mikroskopie belegt, der Nachweis der mitochondrienspezifischen Expression gelang mittels Mitotracker[®] Red 580 - Färbung. Auch die Testung der Sensorfunktionalität zeigte valide Ergebnisse. So konnte der Antwortbereich des Sensors erfolgreich kalibriert werden und das Redox-Ruhe-niveau

innerhalb verschiedener hippokampaler und kortikaler Areale ermittelt und quantifiziert werden. Dabei zeigte sich die CA3-Region des Hippokampus deutlich oxidierter als alle anderen untersuchten Bereiche. Zudem konnten die durch pharmakologisches Eingreifen hervorgerufenen, endogen in den Mitochondrien erzeugten reaktiven Verbindungen adäquat durch das roGFP1 erfasst und widergespiegelt werden. Alles in allem können die gestellten Anforderungen an die roGFPm-Mauslinie als erfüllt angesehen werden, sodass einer Verwendung der Tiere im Rahmen weiterführender neurophysiologischer Testungen nichts im Wege steht.

Im Rahmen weiterführender Forschungen unserer Arbeitsgruppe konnte die roGFPm-Mauslinie mittlerweile erfolgreich in ein Mausmodell für das Rett-Syndrom eingekreuzt werden. Das Rett-Syndrom ist eine neuronale Entwicklungsstörung, bei der krankheitsauslösend dysfunktionale Mitochondrien und vermehrter oxidativer Stress vermutet werden. Ein großer Vorteil der doppelt-transgenen roGFPm-Rett-Maus ist, dass die stabile Expression des Indikator-Proteins jetzt Redoxmessungen an Tieren aller Altersstufen ermöglicht. Im Gegensatz hierzu waren roGFP1-Messungen an Schnitt- und Zellkulturen nur an neonatalem, kultivierbarem Gewebe durchzuführen. Viele neurologische Erkrankungen, so auch das Rett-Syndrom, weisen einen stadienhaften Krankheitsverlauf auf, sodass longitudinale Studien an Tieren unterschiedlicher Entwicklungsstadien möglicherweise grundlegende neue Erkenntnisse im Verständnis dieser Erkrankung mit sich bringen werden. Die Erstellung einer Redoxkartierung, d.h. des Redoxstatus der unterschiedlichen Hirnregionen der doppelt-transgenen Tiere während der Krankheitsprogression könnte Aufschluss über die genaue Lokalisation möglicher dysfunktionaler Zelltypen bzw. deren Mitochondrien geben. Durch gezieltes pharmakologisches Eingreifen könnten zudem medikamentöse Heilungsansätze und deren Einfluss auf den Redoxstatus der erkrankten Tiere evaluiert werden.

Neben dem Rett-Syndrom ist oxidativer Stress bekanntlich an der Pathogenese zahlreicher weiterer Erkrankungen beteiligt. Die forcierte Redoxmessung in den neuronalen Mitochondrien könnte durch ein Einkreuzen diverser Krankheitsmodelle in unsere roGFPm-Maus auch hierbei Forschung, Therapieentwicklung und Heilungschancen grundlegend vorantreiben.

6 Literaturverzeichnis

- Andersen JK (2004): Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? *Nat Med* 10 Suppl, S18-25
- Beal MF (1998): Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases. *Biochim Biophys Acta* 1366, 211-223
- Bedard K, Krause KH (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
- Belousov VV, Fradkov AF, Lukyanov KA, Staroverov DB, Shakhbazov KS, Terskikh AV, Lukyanov S (2006): Genetically encoded fluorescent indicator for intracellular hydrogen peroxide. *Nat Methods* 3, 281-286
- Berlett BS, Stadtman ER (1997): Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem* 272, 20313-20316
- Billinton N, Knight AW (2001): Seeing the wood through the trees: a review of techniques for distinguishing green fluorescent protein from endogenous autofluorescence. *Anal Biochem* 291, 175-197
- Bolisetty S, Jaimes EA (2013): Mitochondria and reactive oxygen species: physiology and pathophysiology. *Int J Mol Sci* 14, 6306-6344
- Boveris A, Chance B (1973): The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J* 134, 707-716
- Brand MD (2010): The sites and topology of mitochondrial superoxide production. *Exp Gerontol* 45, 466-472
- Breckwoldt MO, Wittmann C, Misgeld T, Kerschensteiner M, Grabher C (2015): Redox imaging using genetically encoded redox indicators in zebrafish and mice. *Biol Chem* 396, 511-522
- Cadenas E, Davies KJ (2000): Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic Biol Med* 29, 222-230
- Campsall KD, Mazerolle CJ, De Repentigny Y, Kothary R, Wallace VA (2002): Characterization of transgene expression and Cre recombinase activity in a panel of Thy-1 promoter-Cre transgenic mice. *Dev Dyn* 224, 135-143
- Can K: Redox imbalance and oxidative stress in Mecp2 deficient neurons. Diss. Göttingen 2016
- Caroni P (1997): Overexpression of growth-associated proteins in the neurons of adult transgenic mice. *J Neurosci Methods* 71, 3-9

- Chen Q, Vazquez EJ, Moghaddas S, Hoppel CL, Lesnefsky EJ (2003): Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. *J Biol Chem* 278, 36027-36031
- 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
- Denk W, Strickler JH, Webb WW (1990): Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science* 248, 73-76
- 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
- Drorbaugh JE, Fenn WO (1955): A barometric method for measuring ventilation in newborn infants. *Pediatrics* 16, 81-87
- Dugan LL, Sensi SL, Canzoniero LM, Handran SD, Rothman SM, Lin TS, Goldberg MP, Choi DW (1995): Mitochondrial production of reactive oxygen species in cortical neurons following exposure to N-methyl-D-aspartate. *J Neurosci* 15, 6377-6388
- Dunham NW, Miya TS (1957): A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. *J Am Pharm Assoc* 46, 208-209
- Feng G, Mellor RH, Bernstein M, Keller-Peck C, Nguyen QT, Wallace M, Nerbonne JM, Lichtman JW, Sanes JR (2000): Imaging neuronal subsets in transgenic mice expressing multiple spectral variants of GFP. *Neuron* 28, 41-51
- Finkel T (2011): Signal transduction by reactive oxygen species. *J Cell Biol* 194, 7-15
- 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
- Gerich FJ, Funke F, Hildebrandt B, Faßhauer M, Müller M (2009): H₂O₂-mediated modulation of cytosolic signaling and organelle function in rat hippocampus. *Pflügers Arch* 458, 937-952
- Giorgio M, Migliaccio E, Orsini F, Paolucci D, Moroni M, Contursi C, Pelliccia G, Luzi L, Minucci S, Marcaccio M, et al. (2005): Electron transfer between cytochrome c and p66Shc generates reactive oxygen species that trigger mitochondrial apoptosis. *Cell* 122, 221-233
- Göppert-Mayer M (1931): Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen. *Ann Phys* 9, 273-294
- Großer E, Hirt U, Janc OA, Menzfeld C, Fischer M, Kempkes B, Vogelgesang S, Manzke TU, Opitz L, Salinas-Riester G, et al. (2012): Oxidative burden and mitochondrial dysfunction in a mouse model of Rett syndrome. *Neurobiol Dis* 48, 102-114
- Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY (1985): A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 260, 3440-3450
- 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

- Guzman JN, Sanchez-Padilla J, Wokosin D, Kondapalli J, Ilijic E, Schumacker PT, Surmeier DJ (2010): Oxidant stress evoked by pacemaking in dopaminergic neurons is attenuated by DJ-1. *Nature* 468, 696-700
- 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
- Halliwell B (2006): Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol* 141, 312-322
- 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
- Harman D (1956): Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 11, 298-300
- Heim R, Cubitt AB, Tsien RY (1995): Improved green fluorescence. *Nature* 373, 663-664
- Holliday R (1987): DNA methylation and epigenetic defects in carcinogenesis. *Mutat Res* 181, 215-217
- Ittner LM, Götz J (2007): Pronuclear injection for the production of transgenic mice. *Nat Protoc* 2, 1206-1215
- Izant JG, McIntosh JR (1980): Microtubule-associated proteins: a monoclonal antibody to MAP2 binds to differentiated neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77, 4741-4745
- Kaiser W, Garrett CGB (1961): Two-Photon Excitation in CaF_2 : Eu^{2+} . *Phys Rev Lett* 7, 229-231
- Kann O, Huchzermeyer C, Kovács R, Wirtz S, Schuelke M (2011): Gamma oscillations in the hippocampus require high complex I gene expression and strong functional performance of mitochondria. *Brain* 134, 345-358
- Kolbrink B: Charakterisierung eines transgenen Mausmodells mit spezifischer zytosolischer Expression des optischen Redox-Indikators roGFP1 in Neuronen. Med. Diss. Göttingen 2015
- LeBel CP, Ischiropoulos H, Bondy SC (1992): Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem Res Toxicol* 5, 227-231
- Lienhart WD, Gudipati V, Macheroux P (2013): The human flavoproteome. *Arch Biochem Biophys* 535, 150-162
- Markel AL, Galaktionov Yu K, Efimov VM (1989): Factor analysis of rat behavior in an open field test. *Neurosci Behav Physiol* 19, 279-286
- Meyer AJ, Dick TP (2010): Fluorescent protein-based redox probes. *Antioxid Redox Signal* 13, 621-650
- Meyer AJ, Brach T, Marty L, Kreye S, Rouhier N, Jacquot JP, Hell R (2007): Redox-sensitive GFP in *Arabidopsis thaliana* is a quantitative biosensor for the redox potential of the cellular glutathione redox buffer. *Plant J* 52, 973-986
- Mills GC (1957): Hemoglobin catabolism. I. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. *J Biol Chem* 229, 189-197

- Milton VJ, Sweeney ST (2012): Oxidative stress in synapse development and function. *Dev Neurobiol* 72, 100-110
- Morris R (1985): Thy-1 in developing nervous tissue. *Dev Neurosci* 7, 133-160
- Mullen RJ, Buck CR, Smith AM (1992): NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development* 116, 201-211
- Müller M, Can K (2014): Aberrant redox homeostasis and mitochondrial dysfunction in Rett syndrome. *Biochem Soc Trans* 42, 959-964
- Nathan C, Ding A (2010): SnapShot: Reactive Oxygen Intermediates (ROI). *Cell* 140, 951-951 e952
- Noakes PG, Phillips WD, Hanley TA, Sanes JR, Merlie JP (1993): 43K protein and acetylcholine receptors colocalize during the initial stages of neuromuscular synapse formation in vivo. *Dev Biol* 155, 275-280
- Norton WT, Poduslo SE (1973): Myelination in rat brain: changes in myelin composition during brain maturation. *J Neurochem* 21, 759-773
- Olsen RH, Marzulla T, Raber J (2014): Impairment in extinction of contextual and cued fear following post-training whole-body irradiation. *Front Behav Neurosci* 8, 231
- Ostergaard H, Henriksen A, Hansen FG, Winther JR (2001): Shedding light on disulfide bond formation: engineering a redox switch in green fluorescent protein. *Embo J* 20, 5853-5862
- Percy AK (2016): Progress in Rett Syndrome: from discovery to clinical trials. *Wien Med Wochenschr* 166, 325-332
- Rahman T, Hosen I, Islam MMT, Shekhar HU (2012): Oxidative stress and human health. *Adv Biosci Biotechnol* 3, 997-1019
- Ruch A, Kurczynski TW, Velasco ME (1989): Mitochondrial alterations in Rett syndrome. *Pediatr Neurol* 5, 320-323
- Salmeen A, Barford D (2005): Functions and mechanisms of redox regulation of cysteine-based phosphatases. *Antioxid Redox Signal* 7, 560-577
- Schenkel J: *Transgene Tiere*. 2. Auflage; Springer, Berlin 2006
- Schriner SE, Linford NJ, Martin GM, Treuting P, Ogburn CE, Emond M, Coskun PE, Ladiges W, Wolf N, Van Remmen H, et al. (2005): Extension of murine life span by overexpression of catalase targeted to mitochondria. *Science* 308, 1909-1911
- Schulz JB, Beal MF (1994): Mitochondrial dysfunction in movement disorders. *Curr Opin Neurol* 7, 333-339
- Selvaratnam J, Robaire B (2016): Overexpression of catalase in mice reduces age-related oxidative stress and maintains sperm production. *Exp Gerontol* 84, 12-20
- Sierra C, Vilaseca MA, Brandi N, Artuch R, Mira A, Nieto M, Pineda M (2001): Oxidative stress in Rett syndrome. *Brain Dev* 23 Suppl 1, S236-239
- Sinha K, Das J, Pal PB, Sil PC (2013): Oxidative stress: the mitochondria-dependent and mitochondria-independent pathways of apoptosis. *Arch Toxicol* 87, 1157-1180
- Storz G, Tartaglia LA (1992): OxyR: a regulator of antioxidant genes. *J Nutr* 122, 627-630
- Telgkamp P, Cao YQ, Basbaum AI, Ramirez JM (2002): Long-term deprivation of substance P in PPT-A mutant mice alters the anoxic response of the isolated respiratory network. *J Neurophysiol* 88, 206-213

- Thannickal VJ, Fanburg BL (2000): Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279, L1005-1028
- Turrens JF (2003): Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol* 552, 335-344
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J (2007): Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 39, 44-84
- Wachter RM, Elsliger MA, Kallio K, Hanson GT, Remington SJ (1998): Structural basis of spectral shifts in the yellow-emission variants of green fluorescent protein. *Structure* 6, 1267-1277
- Wagener KC, Kolbrink B, Dietrich K, Kizina KM, Terwitte LS, Kempkes B, Bao G, Müller M (2016): Redox-indicator mice stably expressing genetically-encoded neuronal roGFP: Versatile tools to decipher subcellular redox dynamics in neuropathophysiology. *Antioxid Redox Signal* 25, 41-58
- Walsh RN, Cummins RA (1976): The Open-Field Test: a critical review. *Psychol Bull* 83, 482-504
- Waypa GB, Marks JD, Guzy R, Mungai PT, Schriever J, Dokic D, Schumacker PT (2010): Hypoxia triggers subcellular compartmental redox signaling in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 106, 526-535
- Weerapana E, Wang C, Simon GM, Richter F, Khare S, Dillon MB, Bachovchin DA, Mowen K, Baker D, Cravatt BF (2010): Quantitative reactivity profiling predicts functional cysteines in proteomes. *Nature* 468, 790-795
- Wegener E, Brendel C, Fischer A, Hülsmann S, Gärtner J, Huppke P (2014): Characterization of the MeCP2^{R168X} knockin mouse model for Rett syndrome. *PLoS ONE* 9, e115444
- Weitzman SA, Turk PW, Milkowski DH, Kozlowski K (1994): Free radical adducts induce alterations in DNA cytosine methylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 1261-1264
- Weller J, Kizina KM, Can K, Bao G, Müller M (2014): Response properties of the genetically encoded optical H₂O₂ sensor HyPer. *Free Radic Biol Med* 76C, 227-241
- Wolf AM, Nishimaki K, Kamimura N, Ohta S (2014): Real-time monitoring of oxidative stress in live mouse skin. *J Invest Dermatol* 134, 1701-1709

Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe im Institut für Neuro- und Sinnesphysiologie der Universität Göttingen für die große Unterstützung und Hilfsbereitschaft bei Labor- und Computerarbeiten sowie für das wundervolle zwischenmenschliche Miteinander bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt dabei meinem Doktorvater Herrn Prof. Michael Müller für die Überlassung des interessanten Themas, die Möglichkeit der experimentellen Durchführung meiner Arbeiten und vor allem die hervorragende Betreuung. Ohne seine vielfältigen fachlichen Anregungen und die stets motivierende Unterstützung wäre diese Arbeit undenkbar gewesen. Danke für das große entgegengebrachte Vertrauen und die unvergleichbar schnellen E-Mail-Antworten und Korrekturen!

Ein herzlicher Dank gebührt zudem Belinda Kempkes, die mich hervorragend in die Laborarbeiten eingewiesen hat und mir bei meinen Versuchen immer wieder geduldig und wie selbstverständlich mit Rat und Tat zur Seite stand. Danke auch Dr. Karolina Can für das Anfertigen der Zellkulturen und Prof. Swen Hülsmann für Bereitstellung und Einweisung in die Plethysmographischen Messmethoden.

Ebenso danke ich Dr. Katharina Dietrich für konstruktive inhaltliche und sprachliche Anregungen zur Gestaltung dieser Dissertation sowie meiner Schwester Henrike Wagener für sorgfältiges und unermüdliches Korrekturlesen.

Für die Finanzierung des im Rahmen dieser Promotionsarbeit verwendeten 2-Photonen-Laser-Scanning-Mikroskops danke ich zudem der Universitätsmedizin Göttingen und dem Land Niedersachsen (Großgeräte-Antrag INST 1525/14-1 FUGG).

Lebenslauf

Am 22. September 1990 wurde ich, Kerstin Charlotte Wagener, als zweite Tochter der Eheleute Dr. Christine Wagener, geb. Schümann, und Jochen Wagener in Gütersloh geboren.

Von 1997 bis 2001 besuchte ich die Grundschule Altenholz-Stift bei Kiel, anschließend wechselte ich auf das Gymnasium Altenholz. 2010 beendete ich meine schulische Laufbahn mit Erlangen der Allgemeinen Hochschulreife.

Mit der Erstimmatrikulation zum Sommersemester 2011 nahm ich das Studium der Humanmedizin an der Georg-August-Universität zu Göttingen auf und legte hier im März 2013 den Ersten und im Oktober 2016 den Zweiten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung ab. Anschließend begann ich mein Praktisches Jahr und werde voraussichtlich im Wintersemester 2017/2018 mit dem letzten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung meine Approbation erlangen.

Im Wintersemester 2014/2015 habe ich die Promotionsarbeit am Zentrum für Physiologie und Pathophysiologie der Georg-August-Universität zu Göttingen im Institut für Neuro- und Sinnesphysiologie unter der Leitung von Herrn Professor Dr. rer. nat. Michael Müller begonnen. Die von mir im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten wurden bereits auf internationalen Tagungen präsentiert und 2016 in der Fachzeitschrift „Antioxidants & Redox Signaling“ veröffentlicht.

Publikation

Wagener KC, Kolbrink B, Dietrich K, Kizina KM, Terwitte LS, Kempkes B, Bao G, Müller M (2016): Redox-indicator mice stably expressing genetically-encoded neuronal roGFP: Versatile tools to decipher subcellular redox dynamics in neuropathophysiology. *Antioxid Redox Signal* **25**, 41-58

Tagungsbeiträge

Kolbrink B, Wagener K, Kempkes B, Müller M (2015). Redox-indicator mice stably expressing genetically-encoded roGFP. *Acta Physiol* **213** (699), P256

Wagener K, Kolbrink B, Can K, Kempkes B, Müller M (2015). Transgenic redox-indicator mice expressing cytosolic and mitochondrial roGFP1. *Physiological Bioenergetics: From Bench to Bedside*, 7.1

Can K, Wagener KC, Kolbrink B, Dietrich K, Kempkes B, Müller M (2016). Deciphering oxidative stress in Rett Syndrome with genetically-encoded redox sensors. *Society for Neuroscience Abstracts*, 496.03