

AUS DEM INSTITUT FÜR NEURO- UND SINNESPHYSIOLOGIE  
(PROF. DR. S. O. RIZZOLI)  
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT DER UNIVERSITÄT GÖTTINGEN

---

**Oxidativer Stress und mitochondriale Dysfunktion in  
einem Mausmodell des Rett - Syndroms**

---

INAUGURAL - DISSERTATION  
ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES  
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT DER  
GEORG - AUGUST - UNIVERSITÄT ZU GÖTTINGEN

vorgelegt von  
Emanuel Großer  
aus  
Dresden

Göttingen 2016

Dekan:	Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer
I. Berichterstatter:	Prof. Dr. rer. nat. M. Müller
II. Berichterstatter:	Prof. Dr. rer. nat. F. S. Wouters
III. Berichterstatter:	Prof. Dr. med. M. Oppermann
Tag der mündlichen Prüfung:	02.08.2016

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Oxidativer Stress und mitochondriale Dysfunktion in einem Mausmodell des Rett - Syndroms" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den .....

.....

(Unterschrift)

# Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	III
Abkürzungsverzeichnis	IV
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Geschichte und klinische Darstellung des Rett-Syndroms . . . . .	1
1.2 Genetik des Rett-Syndroms . . . . .	2
1.3 Reaktive Sauerstoffspezies und zelluläre Redox-Homöostase . . . . .	5
1.4 Antioxidative Mechanismen der Zelle und oxidativer Stress . . . . .	10
1.5 Das Rett-Syndrom: eine Störung der Redox-Homöostase? . . . . .	14
1.6 Fragestellung und Zielsetzung dieser Arbeit . . . . .	17
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>18</b>
2.1 Mausmodell des Rett-Syndroms und Versuchsgewebe . . . . .	18
2.2 Präparation der organotypischen Schnittkulturen . . . . .	19
2.3 Aufbewahrung der Schnittkulturen und Versuchsaufbau . . . . .	22
2.4 Transfektion . . . . .	24
2.4.1 roGFP1 . . . . .	24
2.4.2 Transfektion mit Lipofectamin 2000 . . . . .	26
2.5 Applizierte Pharmaka und Chemikalien . . . . .	27
2.6 Lösungen und Kulturmedien . . . . .	28
2.6.1 Artificielle zerebrospinale Flüssigkeit (ACSF) . . . . .	28
2.6.2 Präparationslösung . . . . .	28
2.6.3 Wachstumsmedium . . . . .	28
2.7 Fluoreszenzmikroskopie . . . . .	30
2.8 Statistik und Datenauswertung . . . . .	32
<b>3 Ergebnisse</b>	<b>33</b>
3.1 Kalibrierung des roGFP1- Antwortbereichs in hippokampalen Hirnschnitten	33
3.2 Bestimmung der zytosolischen Redox- <i>Baselines</i> . . . . .	35
3.3 Überprüfung der intrazellulären Redox-Systeme . . . . .	36
3.3.1 Simulation akuten oxidativen Stresses mit H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . . . . .	36

3.3.2	Inhibition der SOD mit DEDTC . . . . .	37
3.3.3	Inhibition der Katalase und des Glutathionsystems . . . . .	38
3.3.4	Modulation der Redox-Verhältnisse durch Antioxidantien . . . . .	42
3.4	Störung der mitochondrialen Funktion . . . . .	45
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>49</b>
4.1	Erhöhte <i>Baseline</i> -Level in <i>Mecp2</i> <sup>-/-</sup> -Schnittkulturen . . . . .	49
4.2	Funktionalität der intrazellulären Redox-Systeme . . . . .	51
4.3	Modulation der intrazellulären Redox-Verhältnisse . . . . .	52
4.4	Störung der mitochondrialen Funktion . . . . .	53
4.5	Methodenkritik . . . . .	54
4.6	Fazit und Ausblick . . . . .	56
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>57</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>58</b>

## Abbildungsverzeichnis

1	Mitochondriale Wege der Sauerstoffreduktion . . . . .	6
2	Atmungskette . . . . .	7
3	Superoxid- Anion- Entstehung an Komplex III . . . . .	9
4	ROS- Abbauenzyme und Hemmstoffe der Atmungskette . . . . .	11
5	Interaktion zwischen Redox- Status und Zellfunktion . . . . .	13
6	Präparation des Hippokampus und Herstellung von Hirnschnittkulturen . .	21
7	Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus und Detailansicht der Sub- mersionskammer . . . . .	23
8	Strukturelle Besonderheiten von roGFP1 . . . . .	25
9	Vereinfachtes Jablonski- Schema . . . . .	30
10	Prinzip der Fluoreszenzmikroskopie . . . . .	31
11	Zytosolische roGFP1- Expression einer Gliazelle . . . . .	33
12	Beispiel einer Kalibrierungsspur eines <i>Mecp2<sup>-y</sup></i> -Hirnschnitts . . . . .	34
13	roGFP1- Kalibrierungsmessung und Ermittlung des <i>Baseline</i> - Niveaus in <i>Mecp2<sup>-y</sup></i> - und WT- Hirnschnitten . . . . .	36
14	Provokation von oxidativem Stress durch 200 $\mu$ M H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . . . . .	37
15	Inhibition der SOD mit DEDTC . . . . .	38
16	Inkubation mit ATZ und BSO . . . . .	40
17	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> - Applikation nach Inkubation mit ATZ und BSO . . . . .	41
18	Externe Modulation der Redox- Verhältnisse mit Ascorbat und der Parallel- applikation von Ascorbat und Trolox . . . . .	42
19	Externe Modulation der Redox- Verhältnisse durch Inkubation mit Trolox und Melatonin . . . . .	44
20	Störung des mitochondrialen Metabolismus durch N <sub>2</sub> . . . . .	45
21	Störung des mitochondrialen Metabolismus durch CN <sup>-</sup> . . . . .	46
22	Störung des mitochondrialen Metabolismus durch Antimycin A . . . . .	47

## Tabellenverzeichnis

1	Übersicht der verwendeten Pharmaka und Chemikalien . . . . .	27
2	Detailzusammensetzung der Medien . . . . .	28
3	Verwendete Substanzen und deren Hersteller . . . . .	29

## Abkürzungsverzeichnis

$\Delta\Psi_m$	Mitochondriales Membranpotential
ACSF	<i>artificial cerebrospinal fluid</i> , artifizielle zerebrospinale Flüssigkeit
AOI	<i>area of interest</i> , Areal von Interesse
ATP	Adenosin - 5' - triphosphat
ATZ	3- Amino - 1,2,4 - triazol
<b>BDNF</b>	<i>brain - derived neurotrophic factor</i>
BSO	Buthioninsulfoximin
CCD - Kamera	<i>Charge - coupled Device</i> - Kamera
<b>CDKL5 - Gen</b>	<i>cyclin - dependent Kinase - like 5</i> - Gen
<b>CREB</b>	<i>cAMP - responsive binding element</i> - Gen
CN <sup>-</sup>	Cyanid
DEDTC	Diethyldithiocarbamat
DIV	<i>days in - vitro</i> , Tage nach Anlegen der Schnittkulturen
DTT	1,4 - Dithio - DL - threitol
FAD	<i>Flavin - Adenin - Dinukleotid</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i> , fetales Kälberserum
FMN	Flavoprotein
<b>FOXG1</b>	<i>forkhead box protein G1</i>
GSH / GSSG	Glutathion / Glutathiondisulfid
GSH - System	Glutathion - System
HEPES	2 - (4 - (2 - Hydroxyethyl) - 1 - piperazinyl) - ethansulfonsäure
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
KO	<i>Knockout</i>
Lsg.	Lösung
<b>Mecp2</b>	<i>methyl CpG binding protein 2</i> , nicht - humanes Gen
<b>MECP2</b>	<i>methyl CpG binding protein 2</i> , humanes Gen
MeCP2	<i>methyl CpG binding protein 2</i> , Genprodukt des <i>MECP2</i> - Gens

<b><i>Mecp2<sup>-/y</sup></i></b>	Mausmodell des Rett - Syndroms, männliche <i>Mecp2 - Knockout</i> - Maus
<b>MEM</b>	<i>Minimal Essential Medium</i>
<b>n</b>	Anzahl der Experimente
<b>N<sub>2</sub></b>	Stickstoff
<b>NAD<sup>+</sup></b>	Nicotinamid - Adenin - Dinukleotid
<b>NaHCO<sub>3</sub></b>	Natriumhydrogencarbonat
<b>NO</b>	Stickstoffmonoxid
<b>NPBI</b>	<i>non - protein - bound iron</i> , ungebundenes Plasma - Eisen
<b>O<sub>2</sub></b>	Sauerstoff
<b>•O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	Superoxid - Anion
<b>•OH</b>	Hydroxyl - Radikal
<b>p</b>	Signifikanzwert
<b><i>Prodh</i></b>	Prolin - Dehydrogenase - Gen
<b>qPCR</b>	quantitative Polymerase - Kettenreaktion
<b><i>Baseline</i></b>	Grundniveau (Ruhe - Redox - Niveau)
<b>roGFP1</b>	<i>reduction / oxidation sensitive green fluorescent protein 1</i>
<b>ROS</b>	<i>reactive oxygen species</i> , reaktive Sauerstoffspezies
<b>SH</b>	Sulphydryl
<b>SOD1</b>	Cu, Zn - Superoxid - Dismutase; Kupfer, Zink - Superoxid - Dismutase
<b>SOD2</b>	Mn - Superoxid - Dismutase, Mangan - Superoxid - Dismutase
<b><i>Sqle</i></b>	Squalenepoxidase - Gen
<b>Trolox</b>	± - 6 - Hydroxy - 2,5,7,8 - tetramethylchroman - 2 - carbonsäure
<b>UQ</b>	Ubichinon
<b>UQH<sub>2</sub></b>	Ubichinol
<b>UQ<sup>-</sup></b>	Semichinon
<b>Uqcrc1</b>	Ubiquinol - Cytochrom - c - Reduktase Kern Protein 1
<b>WT</b>	Wildtyp

# 1 Einleitung

## 1.1 Geschichte und klinische Darstellung des Rett - Syndroms

Das Rett-Syndrom ist eine X-chromosomal dominant vererbte neurologische Entwicklungsstörung, die zu Hirnatrophie und einer verringerten Dendritendichte der kortikalen Neuronen führt (Hagberg et al. 1985; Armstrong et al. 1995). Die Erkrankung wird nach ICD-10 den tiefgreifenden Entwicklungsstörungen zugeordnet, zu denen auch andere Erkrankungen des autistischen Formenkreises, wie das Asperger-Syndrom und der frühkindliche Autismus, zählen (Graubner 2014). Mit einer Prävalenz von 1:10.000 bis 1:22.000 ist das Rett-Syndrom für knapp ein Drittel der geistigen Behinderungen bei Mädchen verantwortlich (Percy 2002).

Obwohl das Rett-Syndrom relativ häufig vorkommt, wurde es erst 1965 von dem Wiener Neuropädiater Andreas Rett beschrieben, der bei zwei seiner Epilepsie-Patientinnen unabhängig voneinander stereotype Handwaschbewegungen und eine apathische Mimik beobachtete. Er veröffentlichte diese Befunde in der Wiener Medizinischen Wochenschau unter dem Titel „Über ein eigenartiges hirnatrophisches Syndrom bei Hyperammonämie im Kindesalter“ und stellte bereits wesentliche Symptome des Syndroms zusammen (Rett 1966).

Da die Publikation in deutscher Sprache verfasst war, fand sie international allerdings kaum Beachtung. Erst die englischsprachige Veröffentlichung „*A progressive syndrome of autism, dementia, ataxia, and loss of purposeful hand use in girls: Rett's syndrome: report of 35 cases*“ (Hagberg et al. 1983) brachte das Rett-Syndrom in das Bewusstsein einer breiteren fachlichen Öffentlichkeit. Neben den wesentlichen morphologischen Charakteristika der Patientinnen beschreibt der Autor auch die dynamische Progression des Syndroms als ein charakteristisches Merkmal der Erkrankung. Es werden vier Abschnitte unterschieden (Hagberg et al. 1983; Hagberg und Witt-Engerström 1986):

**I. Stagnation und Entwicklungsstillstand:** Nach einer normal verlaufenen Schwangerschaft, einer unauffälligen Geburt und einer regelrechten frühkindlichen Entwicklung innerhalb der ersten sechs Monate weisen die Patientinnen präklinisch noch keine Erkrankungsindizien auf. Die vorerst normale geistige Entwicklung, die mit dem Erreichen der frühkindlichen Meilensteine quantifizierbar ist, mündet zwischen dem 8. und 18. Lebensmonat in einer Stagnation der psychomotorischen Weiterentwicklung. Den Krankheitsbeginn markiert oftmals eine Dezeleration des Kopfwachstums, die zu einer sekundären Mikrozephalie führt (Hagberg et al. 1983).

**II. Regressionsphase:** Innerhalb der ersten vier Lebensjahre ist die Progredienz des Rett-Syndroms durch die Regression bereits erworbener Fähigkeiten gekennzeichnet. Es treten vielfältige neurologische Symptome, wie autistisch-ataktische Demenz, stammbe-

tonte muskuläre Hypotonie und der Verlust sinnvoller manueller Fertigkeiten sowie der sozialen Interaktionsfähigkeit, auf (Kunze 2009). Darüber hinaus prägen mit zunehmender Schwere des Syndroms weitere Symptome, wie epileptische Krampfanfälle und motorische Stereotypien, das Bild der Erkrankung (Percy 2002). Die Betroffenen leiden unter respiratorischen Anomalien, wie Hyperventilation, Aerophagie und länger anhaltenden Apnoephasen, die zu systemischen Hypoxien führen. Circa 25 % der Patientinnen versterben eines plötzlichen Todes aufgrund einer schwerwiegenden Störung der kardiorespiratorischen Kontrolle (Kerr et al. 1997; Julu et al. 2001).

**III. Plateauphase:** Die Stagnations- und Regressionsphase innerhalb der ersten vier Lebensjahre geht für gewöhnlich in eine Plateauphase (auch pseudostationäre Phase genannt) über, in der sich der Zustand der Patientinnen stabilisiert. In diesem Stadium manifestiert sich häufig eine kyphoskoliotische Verformung der Wirbelsäule und 80 % der Patientinnen entwickeln Epilepsien (Steffenburg et al. 2001; Glaze 2005; Percy et al. 2010). Diese Phase kann Jahre bis Jahrzehnte andauern und ist nur bei einigen wenigen Patientinnen von kleinen Entwicklungsfortschritten begleitet.

**IV. Phase der motorischen Verschlechterung:** Der übliche Krankheitsverlauf geht ab dem 10. Lebensjahr mit einem zunehmenden motorischen Verfall einher, der zu Mobilitätsverlust bis hin zur Rollstuhlpflichtigkeit führt. Wenn die Patientinnen nicht zuvor ihren Atemstörungen erliegen, können sie im Plateaustadium unter schwersten Behinderungen die siebte Lebensdekade erreichen (Chahrour und Zoghbi 2007).

Vermutungen, dass es sich beim Rett-Syndrom um eine X-chromosomal dominante Erkrankung handelt, wurden bereits in der 1983 erschienenen Publikation von Hagberg et al. aufgrund der gynäkotropen Ausprägung und des heterogenen Phänotyps formuliert. Der genaue Genlokus war allerdings bis 1998 unbekannt, weshalb die Diagnose ursprünglich anhand eines präzise definierten Kriterienkatalogs gestellt wurde (Hagberg et al. 1985).

## 1.2 Genetik des Rett-Syndroms

Mit der Entdeckung des *MECP2*-Gens (*methyl CpG binding protein 2*) auf dem Lokus Xq28 bestätigte sich die Annahme einer X-chromosomal dominanten Erkrankung und die genetische Testung neugeborener Kinder wurde möglich. Es zeigte sich, dass in 95 % der Fälle eine Mutation des *MECP2*-Gens zu dessen Dysfunktionalität führt (Amir et al. 1999).

Inzwischen wurden 218 verschiedene *MECP2*-Mutationen identifiziert, von denen 80 % mit einer typischen Krankheitsentwicklung einhergehen (Hagberg 2002; Miltenberger-Miltenyi und Laccone 2003). In der Literatur sind noch weitere atypische Formen des Rett-Syndroms beschrieben, denen Mutationen in den Genen *CDKL5* (*cyclin-dependent Kinase-like 5*) und *FOXG1* (*forkhead box protein G1*) zugrunde liegen (Neul und Zoghbi 2004). Mutationen in *CDKL5* führen zu einer sog. *early-onset seizure variant*, deren Verlauf durch einen

besonders frühen Beginn der Epilepsien geprägt ist (Bahi-Buisson et al. 2008). *FOXP1*-Mutationen verursachen eine kongenitale Variante der Krankheit (Ariani et al. 2008). Die vorliegende Arbeit bezieht sich ausschließlich auf das durch *MECP2*-Mutation verursachte Rett-Syndrom, da für die Experimente das entsprechende Mausmodell genutzt wurde.

Genetische Screeningverfahren identifizieren auch Rett-Patientinnen, deren Phänotyp wesentlich schwächer ausgeprägt ist und nicht die klassischen Krankheitskriterien erfüllt. Diese Variabilität lässt sich teilweise mit der Lyon-Hypothese erklären, die besagt, dass in jeder Zelle des weiblichen Organismus eines der beiden X-Chromosome zufällig inaktiviert wird (Lyon 1961). Somit hängt die Schwere der Symptomatik von der Häufigkeit der Aktivierung des pathologischen X-Chromosoms ab. Die Bandbreite der Krankheitsausprägung reicht von asymptomatischen Konduktorinnen bis hin zu schweren letalen Verläufen im frühen Kindesalter (Weaving et al. 2003).

Jüngere Studien zeigen inzwischen allerdings, dass die Krankheitsausprägung hauptsächlich vom genauen Mutationsort auf *MECP2* abhängt und nur zu 20 % der X-Inaktivierung geschuldet ist (Monros et al. 2001; Archer et al. 2007; Neul et al. 2008). Durch das breitere Screening konnten auch Jungen mit einer *MECP2*-Mutation identifiziert werden (Schüle et al. 2008). Das Beschwerdebild des Rett-Syndroms prägt sich bei männlichen Mutationsträgern maximal aus, da sie nur über ein X-Chromosom verfügen und der Gendefekt nicht kompensiert werden kann. Im Regelfall werden betroffene männliche Feten bereits intrauterin abortiert oder es kommt bereits im Säuglingsalter zu schwersten Behinderungen, die zu einem frühen Tod führen. Die Wahrscheinlichkeit, dass ein Junge die Mutation erbt, ist jedoch sehr gering, da es sich meist um Keimbahnmutationen des Vaters handelt (Zhu et al. 2010). In seltenen Fällen kann die Mutation allerdings auch von gesunden Müttern vererbt werden, wenn diese ein Gonadenmosaik aufweisen (Amir et al. 1999).

*MECP2* kodiert das Methyl-CpG-bindende Protein 2 (MeCP2), einen Transkriptionsfaktor der an methylierte CpG-Promotorregionen der DNA bindet und dort weitere Zielgene ein- bzw. ausschaltet (Bienvenu und Chelly 2006). Wie bereits angedeutet, konnte gezeigt werden, dass MeCP2 wesentlich an der Neuronenreifung beteiligt ist. Die Expression des Transkriptionsfaktors ist in reifenden Hirnarealen deutlich stärker ausgeprägt als in komplett unentwickelten oder bereits ausgereiften Arealen. Die Expressionsmaxima wandern entsprechend der ontogenetischen Entwicklung der jeweiligen Strukturen. Postnatal wird MeCP2 forciert in den medullären und spinalen Neuronen exprimiert, deren archaische Funktion vor allem im Erhalt der vitalen Grundfunktionen, wie der Kreislaufsteuerung und Atmungsregulation, liegt. Im Zuge der weiteren Hirnreifung verschiebt sich das Expressionsmaximum in später differenzierende Areale, wie den Hippokampus und den Neokortex (Shahbazian et al. 2002; Zoghbi 2003).

Aus der Expressionsdynamik folgerte man, dass MeCP2 eine Schlüsselrolle in der postnatalen Reifung des neuronalen Netzwerks hat. *MECP2*-Mutationen schränken folglich die physiologische Neuronenentwicklung ein.

Als epigenetischer Regulator koordiniert MeCP2 die Expression weiterer Proteine, die unter anderem für den neuronalen Strukturhalt und den zerebralen Fettstoffwechsel verantwortlich sind (Chahrour et al. 2008). Weitere molekulare Ziele sind die Gene für das *cAMP-responsive binding element* (*CREB*) und die Prolin-Dehydrogenase (*Prodh*) (Pugazhenti et al. 2006; Urdinguio et al. 2008).

Die Expressionssteuerung des *brain-derived neurotrophic factor* (*BDNF*) durch MeCP2 scheint von zentraler Bedeutung für die Pathogenese des Rett-Syndroms zu sein (Binder und Scharfman 2004; Kline et al. 2010). *BDNF* gehört zur Familie der Wachstumsfaktoren und sorgt für die Differenzierung und den Erhalt von Neuronen des zentralen und peripheren Nervensystems (Acheson et al. 1995; Huang und Reichardt 2001). Vor allem im Hippokampus und im Neokortex weist *BDNF* hohe Konzentrationen auf und ist deshalb bedeutsam für das Langzeitgedächtnis und höhere Denkleistungen (Bekinschtein et al. 2008). Die schwerwiegenden intellektuellen Defizite von Rett-Patientinnen werden unter anderem auf eine insuffiziente Synapsenbildung und eine eingeschränkte synaptische Plastizität zurückgeführt. Diese Phänomene können partiell mit dem Verlust der MeCP2-gesteuerten Expressionskontrolle von *BDNF* erklärt werden (Yamada und Nabeshima 2003; Asaka et al. 2006).

Auch der hepatische und der neuronale Fettstoffwechsel unterstehen dem Einfluss von MeCP2. Durch die Regulation des *Sqle*-Gens (Squalenepoxidase-Gen) limitiert MeCP2 die Expression der Squalenepoxidase, die in der Cholesterinbiosynthese eine geschwindigkeitsbestimmende Funktion einnimmt (Buchovecky et al. 2013). Fehlt diese Regulation, wie es beim Rett-Syndrom der Fall ist, kommt es zu einer erhöhten Cholesterolproduktion, die für die Ausprägung des Krankheitsbildes mitverantwortlich gemacht wird. Durch Lipidsenker, namentlich Statine, konnte die Cholesterolproduktion im Mausmodell reduziert werden, was die Symptomatik bei *Mecp2<sup>-/y</sup>*-Tieren (*Mecp2<sup>-/y</sup>*: männliche *Mecp2*-Knockout-Maus) deutlich verbesserte (Buchovecky et al. 2013). Obwohl sich die Aussage dieser Studie derzeit noch auf Mäuse beschränkt, gibt es bereits Hinweise, dass auch junge Rett-Patientinnen erhöhte Serumcholesterin-Konzentrationen vorweisen (Segatto et al. 2014). Sollten sich die Daten von Buchovecky et al. (2013) beim Menschen reproduzieren lassen, könnten Statine in Zukunft einen hoffnungsvollen Therapieansatz für Rett-Patientinnen darstellen.

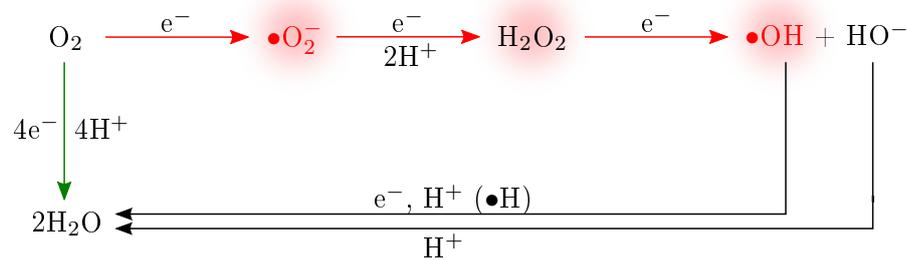
Einen weiteren entscheidenden Einfluss auf den zellulären Stoffwechsel übt MeCP2 über die Kontrolle des Ubiquinol-Cytochrom-c-Reduktase Kern Protein 1-Promotors (*Uqcrc1*-Promotor) aus. Das Genprodukt reguliert eine Komplex III-Untereinheit der mitochondrialen Atmungskette. Im Tierversuch führte die fehlende Regulation durch MeCP2 zu einer Überexpression dieser Untereinheit, wodurch es zu einer insuffizienten Zellatmung kam (Kriaucionis et al. 2006). Somit ist die physiologische Funktionsfähigkeit der Mitochondrien, speziell der Atmungskette, auf die ungestörte MeCP2-Expression angewiesen. Eine erhöhte Rate der oxidativen Phosphorylierung geht mit einer vermehrten Bildung reaktiver Sauerstoffspezies einher, was im Folgenden ausführlicher dargelegt wird.

### 1.3 Reaktive Sauerstoffspezies und zelluläre Redox - Homöostase

Die moderne Radikalforschung begann 1954, als es Barry Commoner gelang, freie Radikale in biologischen Organismen nachzuweisen (Commoner et al. 1954). Das damals vorhandene Wissen um die aggressiven Eigenschaften dieser Molekülgruppe führte schnell zu der Vermutung, dass freie Radikale in einem engem Zusammenhang mit pathologischen Prozessen und der Zellalterung stehen müssten (Gerschman et al. 1954; Harman 1956). Die Wahrnehmung von freien Radikalen als ausschließlich schädigende Verbindungen änderte sich erst Anfang der 1970er Jahre. Damals beobachtete man erstmals, wie Immunzellen gezielt freie Radikale produzieren, um körperfremde Pathogene anzugreifen (Babior et al. 1973). Außerdem entdeckte man die Signalfunktion von Stickstoffmonoxid (NO), das unter anderem vom Gefäßendothel gebildet wird, um die Gefäßmuskulatur zu relaxieren (Furchgott 1993). Die ursprünglich ausschließlich negativ besetzte Sicht auf freie Radikale wurde zunehmend von der Erkenntnis abgelöst, dass es sich bei ihrer überwiegenden Mehrheit um integrale Bestandteile zellulärer Stoffwechsel- und Signalwege handelt. Die moderne Wissenschaft betrachtet freie Radikale als physiologisches Phänomen, solange ihre Konzentration im Organismus gewisse Grenzen nicht überschreitet. Außerdem wurde der Radikalbegriff vor allem im biologischen Kontext weiter ausdifferenziert.

Im Allgemeinen werden die Termini „freie Radikale“ und „reaktive Sauerstoffspezies“ (ROS, *reactive oxygen species*) synonym verwendet. Dies ist nur bedingt korrekt, da nicht alle ROS zwangsläufig freie Radikale sind. Umgekehrt umfasst der Begriff „freie Radikale“ mehrere Gruppen reaktiver Spezies, die sich auch von anderen Grundstoffen als Sauerstoff ( $O_2$ ) ableiten (Lushchak 2014). Als freie Radikale werden generell Moleküle bezeichnet, die mindestens ein ungepaartes Elektron auf der Molekülaufenschale besitzen und somit äußerst reaktionsfreudig und instabil sind. Diese können sich beispielsweise auch von Stickstoff oder Kohlenstoff ableiten und zählen dann entsprechend zu den reaktiven Stickstoffspezies (RNS, *reactive nitrogen species*) bzw. zu den reaktiven Kohlenstoffspezies (RCS, *reactive carbonyl species*). Auch wenn letztgenannte Gruppen biologisch relevant für die Zellphysiologie sind und ihre Homöostase eng mit der ROS-Homöostase verknüpft ist, beschränken sich die Betrachtungen dieser Arbeit auf die Entstehung, Konversion und Elimination von reaktiven Sauerstoffspezies. ROS spielen im Kontext der oxidativen Phosphorylierung in aeroben Organismen eine zentrale Rolle und stellen den relevantesten prooxidativen Einflussfaktor auf die zelluläre Redox-Homöostase dar.

Der Begriff „reaktive Sauerstoffspezies“ umfasst eine inhomogene Gruppe chemisch reaktiver Moleküle, die sich von Sauerstoff ableiten. Zu dieser Gruppe gehören vor allem Zwischenprodukte, die bei der sequentiellen Reduktion von Sauerstoff zu Wasser entstehen. Hierzu zählen neben Singulett-Sauerstoff ( $^1O_2$ ) auch Superoxid-Anion ( $\bullet O_2^-$ ), Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) und Hydroxyl-Radikal ( $\bullet OH$ ) (Abb. 1). Weiterhin werden den reaktiven Sauerstoffspezies Hypochlorit (HOCl) und NO sowie Peroxyl- ( $\bullet ROO$ ) und Alkoxy-Radikale ( $\bullet RO$ ) zugeordnet (Sies 1993).



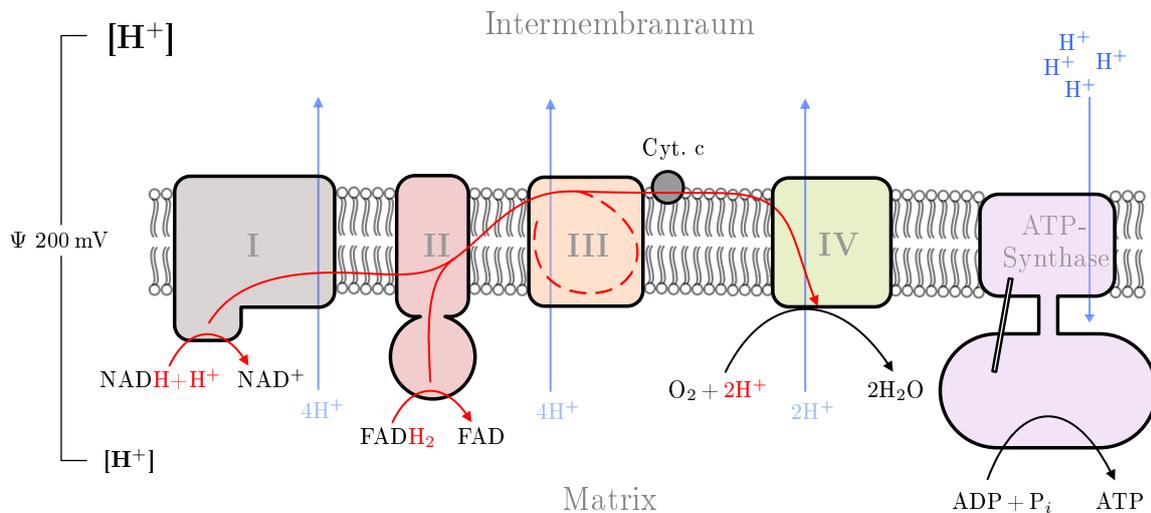
**Abb. 1 – Mitochondriale Wege der Sauerstoffreduktion**

Der grüne Pfeil stellt den Weg der direkten Reduktion von molekularem Sauerstoff ( $\text{O}_2$ ) zu Wasser ( $\text{H}_2\text{O}$ ) durch vier Elektronen ( $e^-$ ) und die konsekutive Aufnahme von vier Protonen ( $\text{H}^+$ ) dar. Aerobe Organismen reduzieren so mehr als 90% des konsumierten Sauerstoffs während der Endoxidation durch die Cytochrom-*c*-Oxidase (Komplex IV der mitochondrialen Atmungskette). Es entstehen dabei keine reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). Die roten Pfeile zeigen den Weg der übrigen 5 – 10% Sauerstoffmoleküle, die durch die sequentielle Aufnahme einzelner  $e^-$  zu ROS reduziert werden. Die einfache Reduktion von  $\text{O}_2$  führt zur Entstehung von Superoxid-Anion ( $\bullet\text{O}_2^-$ ), das enzymatisch oder spontan durch ein weiteres  $e^-$  und zwei  $\text{H}^+$  zu Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) reagiert. Die weitere Reduktion von  $\text{H}_2\text{O}_2$  teilt das Molekül in Hydroxyl-Radikal ( $\bullet\text{OH}$ ) und Hydroxyl-Anion ( $\text{OH}^-$ ). Die rote Schattierung, zeigt die ROS-Zugehörigkeit an. Rote Schrift signalisiert, dass es sich um ein freies Radikal handelt. [Quelle: modifiziert nach Lushchak 2014, S. 165, mit freundlicher Genehmigung von Elsevier<sup>©</sup>]

Circa 85% der entstehenden ROS, vor allem  $\bullet\text{O}_2^-$ , werden in der mitochondrialen Atmungskette durch ein „versehentliches“ Entweichen von Elektronen gebildet, die molekularen Sauerstoff reduzieren. Die verbleibenden 15% werden extramitochondrial durch zytosolische Oxidasen (z.B. Xanthin-Oxidase oder NADPH-Oxidase) und durch Enzyme der Cytochrom P450 Familie produziert (Boveris und Chance 1973; Dröge 2002; Lushchak 2014).

Die Atmungskette erzeugt über der inneren Mitochondrienmembran einen Protonengradienten, der die grundlegende Triebkraft für die Herstellung von Adenosin-5'-triphosphat (ATP) durch die  $\text{F}_0/\text{F}_1$ -ATPase darstellt (Mitchell et al. 1961; Senior 1988)(Abb. 2). Die Energie für den  $\text{H}^+$ -Ionen-Transport zur Generierung des Protonengradienten entstammt Redox-Reaktionen, die in den vier Atmungskettenkomplexen stattfinden :

- Komplex I: NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase
- Komplex II: Succinat-Dehydrogenase
- Komplex III: Ubichinol-Cytochrom-*c*-Oxidoreduktase
- Komplex IV: Cytochrom-*c*-Oxidase



**Abb. 2 – Atmungskette**

Rot dargestellt ist der Weg der Elektronen durch die einzelnen Atmungskettenkomplexe der inneren Mitochondrienmembran. Die fraktionierte Energieabgabe der einzelnen Elektronen wird in den Komplexen I, III und IV jeweils genutzt, um Protonen ( $\text{H}^+$ ; blau dargestellt) aus der Matrix in den Intermembranraum zu pumpen. Der so entstehende Protonengradient trägt maßgeblich zum mitochondrialen Membranpotential ( $\Delta\Psi_m$ ) bei. In Komplex IV, der Cytochrom-*c*-Oxidase, wird Sauerstoff in der Knallgasreaktion zu Wasser reduziert. Der Protonenrückstrom durch die  $\text{F}_0/\text{F}_1$ -ATPase ermöglicht die Fusion von ADP und anorganischem Phosphat ( $\text{P}_i$ ) zu ATP (Abrahams et al. 1994). Die gestrichelte rote Linie in Komplex III stellt den Q-Zyklus dar, der die Effizienz der Atmungskette steigert.

Nachdem die Elektronen die Atmungskette bis Komplex III durchlaufen haben, reduzieren sie im Rahmen der Endoxidation in Komplex IV molekularen Sauerstoff ( $\text{O}_2$ ) zu Wasser ( $\text{H}_2\text{O}$ ) (Saraste 1999) (Abb. 2). Unter aeroben Bedingungen werden in der Atmungskette somit über 90% des aufgenommenen  $\text{O}_2$  verbraucht (Abb. 2). Die Übertragung der vier Elektronen auf  $\text{O}_2$  findet hierbei während der sog. Knallgasreaktion ohne die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies statt (Ott et al. 2007) (Abb. 1, grüner Weg).

Etwa 5–10% der Elektronen können der Atmungskette, wie oben bereits angedeutet, unkontrolliert entweichen und entziehen sich somit der Weiterleitung durch die Transportmoleküle der Atmungskette. Vor allem an den Komplexen I und III kommt es zu derartigen Elektronenentweichungen (Boveris und Chance 1973). Der nähere Mechanismus ist für den Komplex III gut aufgeklärt und hängt mit dem Transporter Ubichinon (Coenzym Q) zusammen, der den Elektronentransfer zwischen den Komplexen I und III bzw. II und III vermittelt. In Abb. 3 ist dies exemplarisch dargestellt. Bei der Transduktion auf Komplex III werden zwei Elektronen vereinzelt. Während ein Elektron den Komplex III für den Wei-

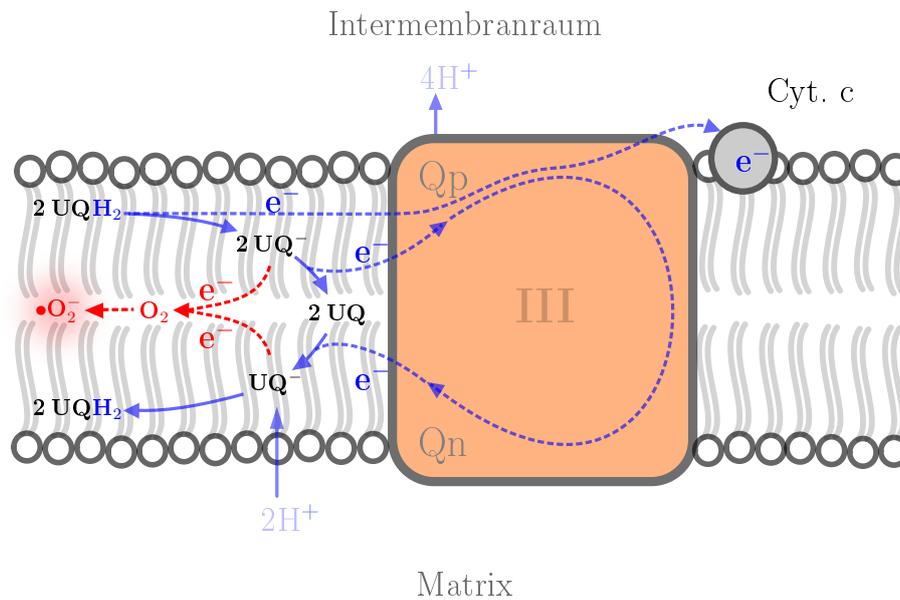
tertransport zu Komplex IV durchwandert, verweilt das andere im Komplex III und durchläuft den sog. Q-Zyklus. Letztgenannter Prozess dient unter physiologischen Bedingungen der Effektivierung der Atmungskette, da er den Transport von vier gradientenwirksamen Protonen in den Intermembranraum ermöglicht (Mitchell 1975).

Im Zuge der Elektronenübertragungen entsteht aus Ubichinon (UQ) bzw. Ubichinol (UQH<sub>2</sub>) zwischenzeitlich das Radikal Semichinon (UQ<sup>-</sup>; Abb. 3). Dieses ist aufgrund seines hohen Reduktionspotentials in der Lage, Elektronen auf molekularen Sauerstoff anstatt auf die vorgesehene Ubichinol-Bindungsstelle von Komplex III (Qp) zu übertragen, was zur Bildung von  $\bullet\text{O}_2^-$  führt (Turrens 2003; Karihtala und Soini 2007)(Abb. 1 und 3). Da Sauerstoff intrazellulär ubiquitär vorhanden ist, steht er als konkurrierendes Oxidationsmittel permanent zur Verfügung (Kowaltowski et al. 2009). Ein ähnlicher Mechanismus wird auch für die Komplex I-assozierte  $\bullet\text{O}_2^-$ -Entstehung vermutet, da die Elektronentransmission zwischen der NADH-Q-Reduktase und Ubichinon dem gleichen Prinzip folgt (Lambert und Brand 2004).

$\bullet\text{O}_2^-$  ist ein zentrales Ausgangssubstrat weiterer reaktiver Sauerstoffspezies und reagiert in erster Linie durch spontane oder enzymatische Konversion zu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Abb. 1). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> besitzt keine unpaaren Elektronen mehr, weshalb es nicht zu den freien Radikalen gezählt wird. Da H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aber chemisch aktiver als molekularer Sauerstoff ist, wird es den ROS zugeordnet (Lushchak 2014). Aufgrund seiner Membrangängigkeit und Stabilität kann H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> weit von seinem originären Entstehungsort wirken (Gerich et al. 2006) und beeinflusst als wichtiges Signalmolekül den Zellzyklus sowie den intrazellulären Energie- und Kalzium-Haushalt (Dröge 2002; Gerich et al. 2009). Außerdem aktiviert H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> autoregulatorische Signalwege der Zelle, die die Atmungskette bremsen und somit die ROS-Entstehung limitieren (Facundo et al. 2007). Konvertiert H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durch die Fenton- bzw. Haber-Weis-Reaktion zu  $\bullet\text{OH}$ , wirkt es stark toxisch (Halliwell und Gutteridge 1984)(Abb. 1).  $\bullet\text{OH}$  gilt als eines der instabilsten und reaktionsfreudigsten ROS und kann durch die willkürliche Oxidation der DNA sowie mehrfach gesättigter Fett- und Aminosäuren schwere Zellschäden verursachen (Dean et al. 1997; Valko et al. 2004).

Die Elektronenentweichung und die damit verbundene ROS-Entstehung hängt stark vom physiologischen Status des Organismus und der Laufgeschwindigkeit der Atmungskette ab (Boveris und Chance 1973; Dröge 2002). Da viele zelluläre Prozesse auf eine bestimmte Grundkonzentration reaktiver Sauerstoffspezies angewiesen sind, wird die ROS-Entstehung durch ein fein justiertes antioxidatives System innerhalb eines bestimmten Konzentrations-Korridors konstant gehalten. Diese ROS-Basalkonzentration stellt den größten prooxidativen Einflussfaktor auf die intrazelluläre Redox-Homöostase dar. Letztere bezeichnet das konstante Verhältnis zwischen allen oxidierenden und reduzierenden Verbindungen innerhalb der Zelle (Sies 2015)(Abb. 5 A).

Ein balancierter Redox-Status ist für die Zellfunktion essentiell. Vor allem die neuronale Erregbarkeit ist eng mit dem Redox-Status verknüpft, da einige spannungsgesteuerte



### Abb. 3 – Superoxid - Anion - Entstehung an Komplex III

Es handelt sich um eine vereinfachte Darstellung der Elektronentransmission (blau dargestellt) zwischen Ubichinon (UQ) und Komplex III. Von Komplex I bzw. II kommend, überträgt die reduzierte Form von Ubichinon (Ubichinol; UQH<sub>2</sub>) sequentiell Elektronen (e<sup>-</sup>) an die Ubichinol-Bindungsstelle (Q<sub>p</sub>) des Komplexes. Nach Abgabe des ersten e<sup>-</sup> oxidiert UQH<sub>2</sub> zu Semichinon (UQ<sup>-</sup>). Zu 90-95% wird das zweite e<sup>-</sup> ebenfalls an Q<sub>p</sub> abgegeben und UQ<sup>-</sup> oxidiert weiter zu UQ. Ein e<sup>-</sup> durchwandert den Komplex und wird auf Cytochrom c (Cyt. c) zum Weitertransport übertragen. Das zweite e<sup>-</sup> zirkuliert innerhalb des Komplexes und wandert zur Ubichinon-Bindungsstelle (Q<sub>n</sub>), die sich auf der Innenseite der Innenmembran befindet. An Q<sub>n</sub> werden zwei e<sup>-</sup> wieder auf UQ übertragen. Das entstandene UQH<sub>2</sub> zirkuliert zu Q<sub>p</sub> und schließt den Kreis. Dieser als Q-Zyklus bezeichnete Ablauf ermöglicht eine Effektivitätssteigerung der Atmungskette, da pro übertragenem e<sup>-</sup> ein gradientenwirksames Proton (H<sup>+</sup>) in den Intermembranraum abgegeben wird. Die Entstehung von Superoxid-Anion (•O<sub>2</sub><sup>-</sup>), durch die e<sup>-</sup>-Übertragung von UQ<sup>-</sup> auf molekularen Sauerstoff (O<sub>2</sub>) ist in der Abbildung rot unterlegt. Dies ist in 5-10% der e<sup>-</sup>-Transmissionen der Fall.

Na<sup>+</sup>- und K<sup>+</sup>-Kanäle (Hammarström und Gage 2000; Müller und Bittner 2002) sowie NMDA- und GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren (Aizenman et al. 1989; Sah et al. 2002) redoxsensitiv sind, sodass sich ihre Öffnungswahrscheinlichkeit in Abhängigkeit der oxidativen Verhältnisse ändert. Ähnlich wird die Kalzium-Homöostase durch den zellulären Redox-Status moduliert, da auch spannungsabhängige Ca<sup>2+</sup>-Kanäle (Todorovic et al. 2001), Ryanodin- und IP3-Rezeptoren (Hidalgo et al. 2004; Gerich et al. 2009) sowie die endoplasmatische Ca<sup>2+</sup>-ATPase SERCA (Kuster et al. 2010) redoxsensitiv sind. Übersteigt die ROS-Konzentration ein kompensierbares Ausmaß, löst dies den Caspase-Signalweg aus, der die Apoptose initiiert (Cheng et al. 2012).

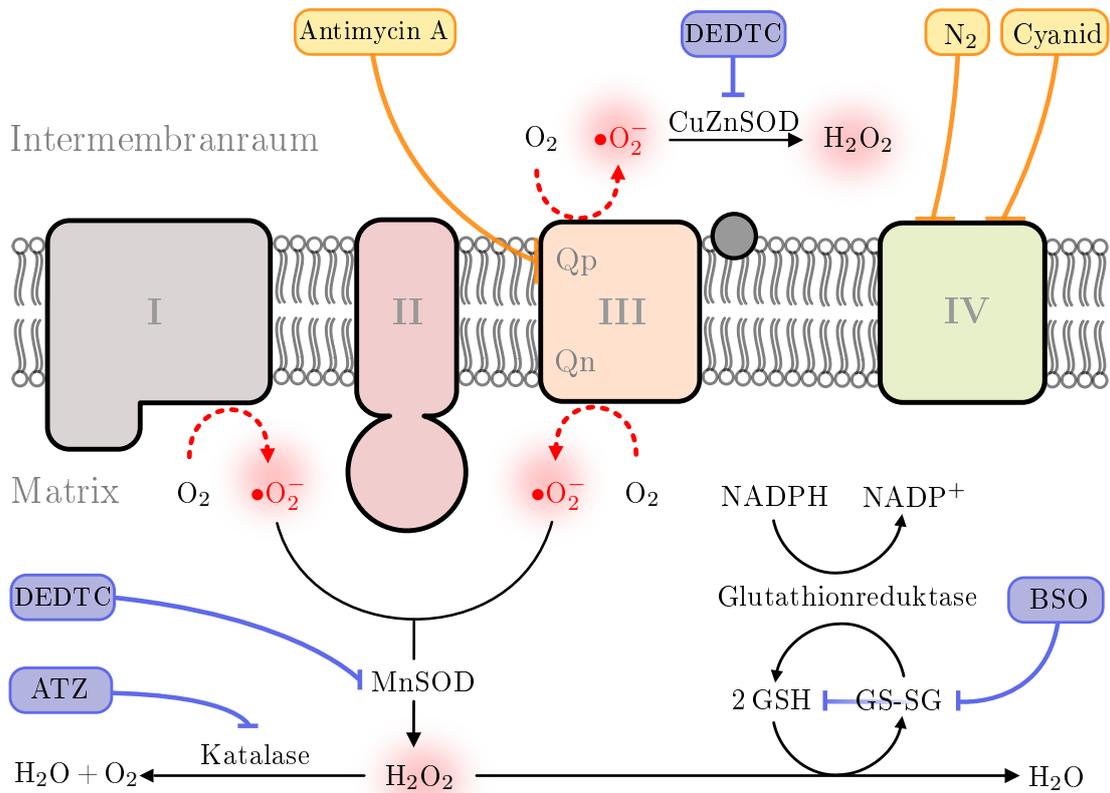
Vor dem Hintergrund der ambivalenten Rolle reaktiver Sauerstoffspezies verfügen aerob lebende Organismen über komplexe Abbaumechanismen, die die enge Regulation der intrazellulären ROS-Konzentration ermöglichen und eine Verschiebung des Redox-Status in Richtung oxidativer Bedingungen verhindern (Sies 1993)(Abb. 4). Dies wird im folgenden Kapitel ausführlicher dargestellt.

## 1.4 Antioxidative Mechanismen der Zelle und oxidativer Stress

Die bisher bekannten Mechanismen zum Abbau reaktiver Sauerstoffspezies können in niedermolekulare (Molekulargewicht kleiner einem Kilodalton) und hochmolekularen Antioxidantien (Molekulargewicht größer einem Kilodalton) eingeteilt werden. Zu den hochmolekularen Antioxidantien zählen in erster Linie intrazelluläre Enzymsysteme, die verschiedenen Zellkompartimenten angehören (Lushchak 2014). In der mitochondrialen Matrix wird die Mn-Superoxid-Dismutase (Mangan-Superoxid-Dismutase; MnSOD; SOD 2) exprimiert. Das Enzym reagiert innerhalb von zwei Teilschritten mit je zwei  $\bullet\text{O}_2^-$  und zwei  $\text{H}^+$  zu  $\text{O}_2$  und  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Abb. 4). Ihre Isoform, die Cu, Zn-Superoxid-Dismutase (Kupfer, Zink-Superoxid-Dismutase; CuZnSOD; SOD 1) kommt sowohl zytosolisch als auch im mitochondrialen Intermembranraum vor (Weisiger und Fridovich 1973a; Weisiger und Fridovich 1973b).

Um die bereits beschriebene Konversion von  $\text{H}_2\text{O}_2$  zu  $\bullet\text{OH}$  und  $\text{OH}^-$  zu verhindern, sind der SOD zwei weitere Enzymsysteme nachgeschaltet, die eine zügige Entfernung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  gewährleisten – die Katalase und das Glutathionsystem. Bisher wurde noch kein Enzymsystem zur  $\bullet\text{OH}$ -Entgiftung gefunden, weshalb die vorangehende  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Eliminierung wahrscheinlich sicherheitshalber durch diese zwei synergistischen Systeme abgedeckt wird (Lushchak 2014). Die Katalase ist ein Enzym, das mithilfe seines Häm-Zentrums in der Lage ist,  $\text{H}_2\text{O}_2$  in  $\text{H}_2\text{O}$  und  $\text{O}_2$  zu disproportionieren (Abb. 4). Sie kann mehrere Millionen Wasserstoffperoxidmoleküle pro Sekunde neutralisieren, weshalb sie als eines der umsatzstärksten Enzyme überhaupt gilt (Putnam et al. 2000; Chelikani et al. 2005). Das Glutathionsystem reduziert  $\text{H}_2\text{O}_2$  zu  $\text{H}_2\text{O}$  (Abb. 4). Die Reaktion wird durch das Enzym Glutathionperoxidase katalysiert, die zwei reduzierte Glutathionmonomere (GSH) unter der Bildung einer Disulfidbrücke zu Glutathiondisulfid (GS-SG) oxidiert. GS-SG wird durch die Glutathion-Reduktase reduziert, wodurch sich die Disulfidbrücke wieder löst (Abb. 4). Die zur Reduktion nötigen Elektronen bezieht die Glutathion-Reduktase von NADPH, welches dem Pentosephosphatweg entstammt.

Neben weiteren enzymatischen Mechanismen, wie dem Thioredoxin-System, existieren noch niedermolekulare bzw. nichtenzymatische Antioxidantien, die den zellulären Redox-Status beeinflussen können. Es handelt sich um eine sehr große inhomogene Gruppe unterschiedlichster Stoffe, sodass im Folgenden vor allem die Vertreter besprochen werden, die in den Experimenten dieser Arbeit zum Einsatz kamen. Grundlegend können hydrophile und hydrophobe nichtenzymatische Antioxidantien unterschieden werden. Während



**Abb. 4 – ROS- Abbauenzyme und Hemmstoffe der Atmungskette**

Superoxid- Anionen ( $\bullet\text{O}_2^-$ ), die auf der Matrixseite entstehen, werden von der mitochondrialen MnSOD (SOD2) zu Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) reduziert.  $\text{H}_2\text{O}_2$  kann durch die Katalase in  $\text{H}_2\text{O}$  und  $\text{O}_2$  oder durch das Glutathionssystem zu  $\text{H}_2\text{O}$  reduziert werden. Die Glutathionperoxidase wird während dieser Reaktion oxidiert. Durch die Glutathionreduktase wird sie wieder regeneriert, die dafür NADPH als Elektronenquelle nutzt.  $\bullet\text{O}_2^-$  das in den Intermembranraum gelangt, wird von der zytosolischen CuZnSOD (SOD1) in  $\text{H}_2\text{O}_2$  umgewandelt. Die gelben und blauen Boxen zeigen Hemmstoffe, die während der Experimente zum Einsatz kamen. In den gelben Boxen sind Blocker einzelner Atmungskettenkomplexe aufgeführt, die blauen Boxen zeigen spezifische Hemmstoffe der enzymatischen Antioxidantien (siehe Ergebnisteil). [Quelle: modifiziert nach Kowaltowski et al. 2009, S. 334, mit freundlicher Genehmigung von Elsevier<sup>©</sup>]

hydrophile Antioxidantien ubiquitär im Cytoplasma und im Blut vorkommen um ROS zu eliminieren, lagern sich hydrophobe Antioxidantien in Zellmembranen ein und schützen diese vor der Schädigungen durch Lipidperoxidation (Sies und Stahl 1995; Lushchak 2014). Einer der wichtigsten Vertreter hydrophiler Antioxidantien ist Ascorbat (Vitamin C; Ascorbinsäure). Neben seiner Funktion als Koenzym der Prolyl-4-Hydroxylase während der Kollagensynthese kommt ihm eine starke Bedeutung als Reduktionsmittel bei

der Neutralisation von ROS zu (May 1998). Das hydrophile Tripeptid Glutathion gilt als relevantestes Antioxidans, da es intrazellulär hohe Konzentrationen aufweist und selbst antioxidativ wirksam ist. Aufgrund seiner Rolle innerhalb des oben beschriebenen Glutathionsystems ist es maßgeblich an der zellulären Redox-Regulation beteiligt (Meister und Anderson 1983).

Zu Beginn der 1990er Jahre wurde die stark antioxidative Wirkung des Epiphysenhormons Melatonin entdeckt (Tan et al. 2002). Seine amphiphile Struktur ermöglicht ihm die Passage von Zellmembranen und der Blut-Hirn-Schranke. Melatonin erwies sich sowohl direkt als auch indirekt als potentes Antioxidans. Über die Stimulation antioxidativer Enzymwege und eine Verminderung der Elektronenentweichung aus der Atmungskette entfaltet es einen systemischen Effekt und wirkt äußerst effektiv gegen oxidativen Stress (Reiter et al. 2003). Melatonin gilt als Suizid-Antioxidans, da es – im Gegensatz zu den bisher vorgestellten Antioxidantien – nicht dem intrazellulären Redox-Zyklus unterliegt und folglich nicht regeneriert werden kann (Korkmaz et al. 2009).

Der wichtigste Repräsentant lipophiler Antioxidantien ist  $\alpha$ -Tocopherol, das besser als Vitamin E bekannt ist. Aufgrund seiner Fettlöslichkeit wird es in Membranen zum Schutz vor Lipidradikalen eingebaut (Herrera und Barbas 2001). Durch die Lipidperoxidation bildet sich  $\alpha$ -Tocopherol-Radikal, das durch einen Protonendonator wie Ascorbat wieder reduziert werden kann (Wang und Quinn 1999). Auch Ubichinol zählt aufgrund seiner Membranständigkeit und Elektronentransportfunktion zu den lipophilen Antioxidantien. Ähnlich wie  $\alpha$ -Tocopherol beugt es der Bildung von Lipid-Peroxy-Radikalen und der Lipidoxidation vor. Wie im vorhergehenden Kapitel beschrieben, ist Ubichinol auch maßgeblich an der Entstehung von ROS beteiligt (Abb. 3). Abhängig vom jeweiligen Redox-Zustand kann Ubichinol als Elektronenakzeptor (Antioxidans) oder als Elektronendonator (Prooxidans) wirken (James et al. 2004).

Geraten ROS-Eliminierung und ROS-Entstehung aus dem Gleichgewicht, kommt es zu einer Verschiebung der Redox-Homöostase. Ursachen können eine erhöhte ROS-Produktion, verminderte Reserven nichtenzymatischer Antioxidantien oder die Inaktivierung enzymatischer Antioxidantien sein. Diese Zustände führen dazu, dass mehr ROS anfallen, als für den Erhalt des physiologischen Redox-Status nötig wären. Führt die vermehrte ROS-Produktion zu einer Verschiebung des Gleichgewichts zwischen Pro- und Antioxidantien in Richtung oxidierender Bedingungen, sodass es zu einer Schädigung molekularer Strukturen und einer gestörten Redox-Signalgebung kommt, spricht man von oxidativem Stress (Sies 2015)(Abb. 5 B).

Vor allem chronischer oxidativer Stress – also ein stabil erhöhter pathologischer Redox-Status – kann im Zusammenhang mit vielen Erkrankungen beobachtet werden (Drel und Sybirna 2010; Fernandez-Checa et al. 2010; Mei et al. 2014). Insbesondere neurodegenerative Krankheitsbilder, wie die Alzheimerdemenz (Behl und Moosmann 2002; Swomley et al. 2014), die Parkinsonkrankheit (Götz et al. 1990) und die amyotrophe Lateralsklerose (Kong



nol-Bindungsstelle (Qp; siehe Abb. 3) an Komplex III (Potter und Reif 1952; Huang et al. 2005)(Abb. 4). Cyanid bindet, wie Azid und Kohlenstoffmonoxid, an das zentrale Eisen(III)-Ion des Cytochroms a<sub>3</sub> von Komplex IV und unterbricht dort den Elektronenfluss (Stannard und Horecker 1948)(Abb. 4).

Auch die Blockade von hochmolekularen Schutzenzymen kann intrazellulär zu oxidativem Stress führen. Im Rahmen der Experimente wurden beide Isoformen der SOD mit Diethyldithiocarbamat (DEDTC) blockiert (Heikkila et al. 1976). Die Katalase wurde mithilfe von 3-Amino-1,2,4-triazol (ATZ) inhibiert (Margoliash und Novogrodsky 1958) und die Glutathionsynthese wurde durch die Inkubation mit Buthioninsulfoximin (BSO) unterbunden (Griffith und Meister 1979)(Abb. 4), was stets zu einer Erhöhung des Redox-Status führte (siehe Ergebnisteil).

## 1.5 Das Rett-Syndrom: eine Störung der Redox-Homöostase?

Die pathogenetische Einordnung des Rett-Syndroms war lange nicht eindeutig zu treffen und wandelte sich im Verlauf ihrer Erforschung. Spezifische Symptome der Erkrankung, wie der Verlust motorischer Fertigkeiten und die Ausprägung einer autistisch-ataktischen Demenz, sowie die Krankheitsentwicklung ähneln am ehesten dem Erscheinungsbild neurodegenerativer Erkrankungen. Letztere gehen charakteristischerweise mit morphologisch fassbaren Veränderungen, wie Entzündungsreaktionen oder neuronalen Nekrosen, einher, die sich oft in den klinischen Symptomen spiegeln.

Beim Rett-Syndrom ist dies nicht der Fall. Bisher wurden nur wenige strukturelle Veränderungen in Rett-Gehirnen gefunden. Generell sind die Gehirne verhältnismäßig klein und zeigen nur vereinzelt Atrophien. Die Neuronen sind ebenfalls klein und dicht gepackt. Ihre Dendriten sind geringer verzweigt und weisen im Vergleich zu Gesunden eine verminderte Anzahl von Dornfortsätzen auf (Armstrong et al. 1995; Armstrong et al. 1999). Im Gegensatz zur Erkrankung unterliegen diese Veränderungen aber keiner Progression, weshalb weder die Pathogenese noch die Dynamik des Syndroms mit den kortikalen Befunden erklärbar ist. Die Identifizierung der MeCP2-Defizienz als Ursache der Erkrankung (Amir et al. 1999) rückte die Untersuchung der MeCP2-Zielgene in den Vordergrund der Rett-Forschung, um die gestörte Expression des Gens in einen kausalen Zusammenhang mit den Symptomen zu stellen.

Wie bereits oben beschrieben, konnte demonstriert werden, dass MeCP2 eng mit der ontogenetischen Entwicklung des Gehirns verbunden ist und einen wesentlichen Einfluss auf die Neuronenreifung hat. Ein Ausfall dieser Regulation bedingt wahrscheinlich, dass gewisse neuronale Entwicklungsstadien nicht erreicht werden können. Weiterhin scheint MeCP2 auch für die Ausbildung und Aufrechterhaltung funktioneller Synapsen zuständig zu sein, was zumindest teilweise die mentale Beeinträchtigung der Patientinnen erklärt (Shahbazian et al. 2002; Zoghbi 2003). Im Mausmodell konnten sämtliche Symptome aufgehoben werden, indem man Rett-Mäusen *Mecp2* wieder zur Verfügung stellte (Guy et al. 2007). Dieses

Ergebnis spricht für die Reversibilität der zugrunde liegenden Pathomechanismen, sodass beim Rett - Syndrom folglich eher von einer neuronalen Erhaltungsstörung – im Sinne eines veränderten Zellmetabolismus – als von einer degenerativen Erkrankung auszugehen ist.

Tatsächlich reguliert der Transkriptionsfaktor MeCP2 im gesunden Organismus über Zwischenproteine maßgeblich den zellulären Stoffwechsel mit. Sowohl im Mausmodell des Rett - Syndroms als auch bei Rett - Patientinnen zeigten sich, wie oben bereits beschrieben, ein beeinträchtigter neuronaler Lipidstoffwechsel (Buchovecky et al. 2013; Segatto et al. 2014) und vielfältige Indizien einer gestörten Redox - Homöostase (Sofic et al. 1987; Formichi et al. 1998; Sierra et al. 2001; de Felice et al. 2009). Da der Redox - Status bisher nur eingeschränkt messbar war, wurden anfangs vor allem indirekte Marker genutzt, um einen Eindruck der oxidativen intrazellulären Verhältnisse zu bekommen. Antioxidative Schutzenzyme und -substanzen dienen hierfür als gut messbare Parameter, da sich ihre intrazelluläre Konzentration im Allgemeinen antiproportional zur ROS - Konzentration verhält.

Bereits 1987 wurden im Rahmen postmortaler Untersuchungen erniedrigte Vitamin C - und Glutathionkonzentrationen des neuronalen Gewebes festgestellt (Sofic et al. 1987). Spätere Publikationen zeigten verminderte Vitamin E - Konzentrationen im Serum und erniedrigte SOD - Konzentrationen der Erythrozyten bei Rett - Patientinnen, was für eine systemische oxidative Belastung des Organismus spricht (Formichi et al. 1998; Sierra et al. 2001). Expressionsanalysen kortikaler Gewebeproben von verstorbenen Rett - Patientinnen zeigten eine erhöhte Katalase - Expression, die als antioxidative Reaktion der Zellen auf Enzymebene interpretiert werden kann (Colantuoni et al. 2001). Darüber hinaus wurden noch viele weitere indirekte Indikatoren erhöhten oxidativen Stresses im Rett - Syndrom gefunden. Aktuellere Publikationen zeigten Lipid- und Proteinschäden der neuronalen Zellmembranen und der weißen Substanz sowie abnormale Morphologien der Erythrozytenmembranen, die auf oxidative Schädigung zurückzuführen sind (de Felice et al. 2009; de Felice et al. 2011; Signorini et al. 2011). Außerdem wurden erhöhte Konzentrationen freien Eisens (*non-protein-bound-iron*, NPBI) in Plasma und Erythrozyten von Rett - Patientinnen gemessen. NPBI werden aus erythrozytären Hämoglobinkomplexen gelöst, wenn diese erhöhtem oxidativen Stress ausgesetzt sind. Das dabei frei werdende dreiwertige Eisen ist wiederum selbst ein starkes Oxidans, welches mit Proteinen und Lipiden interagieren kann (de Felice et al. 2009). Als Fenton - Reagenz kann NPBI freie Elektronen auf  $H_2O_2$  übertragen, wodurch das bereits beschriebene Hydroxyl - Radikal ( $\bullet OH$ ) entsteht (Halliwell und Gutteridge 1984). Im Jahr 2011 konnten erhöhte  $H_2O_2$  - Serum - Konzentrationen bei Rett - Patientinnen gezeigt werden, wodurch erstmals ein direkter systemischer Nachweis der bis dahin nur vermuteten ROS - Belastung erbracht wurde (Carmeli et al. 2011).

Auf der Suche nach einer mechanistischen Erklärung der Redox - Imbalance widmeten sich viele Untersuchungen den Mitochondrien, da Dysfunktionen dieser Organellen das erhöhte ROS - Aufkommen im Rett - Syndrom gut erklären könnten (Müller und Can 2014). Schon zu Beginn der 1990er Jahre fielen die Mitochondrien in Gewebeproben von Rett - Patientinnen bei neuropathologischen Untersuchungen durch abnormale Formen, Schwel-

lungen, Vakuolisierungen, granuläre Einschlüsse und Membranveränderungen auf (Ruch et al. 1989; Eeg - Olofsson et al. 1990; Cornford et al. 1994). Diese Befunde konnten später auch in den Mitochondrien von Rett-Mäusen erhoben werden (Belichenko et al. 2008). Neben strukturellen Auffälligkeiten zeigten Enzymuntersuchungen an zerebralen und muskulären Geweben, dass die Komplexe II, III und IV sowie die Malatdehydrogenase vermindert aktiv sind bzw. geringer exprimiert werden (Coker und Melnyk 1991; Heilstedt et al. 2002).

Die These einer insuffizienten Atmungskettenfunktion wird auch durch erhöhte Laktatspiegel in Blut und Liquor von Rett-Patientinnen gestützt. Als Nebenprodukt der Glykolyse weist Laktat auf eine ausgeschöpfte Kapazität der oxidativen Phosphorylierung oder eine unzureichende Sauerstoffversorgung hin. Atmungsanomalien und anoxische Episoden sind typische Symptome des Rett-Syndroms und könnten den Befund erklären. Alternativ wäre noch denkbar, dass strukturelle Schädigungen der Mitochondrien zu einer zellulären ATP-Minderversorgung führen, die mithilfe der Glykolyse kompensiert werden soll (Armstrong 1992; Matsuishi et al. 1992; Lappalainen und Riikonen 1994; Haas et al. 1995).

Der Zusammenhang zwischen MeCP2-Defizienz und Mitochondrienfunktion wurde erstmals 2006 hergestellt, als im Mausmodell und später auch bei der Untersuchung von Frontalhirnbiopsien gezeigt werden konnte, dass eine Untereinheit des Komplex III der direkten Expressionskontrolle von MeCP2 unterliegt. Auf Grundlage dieser Daten wurde ein Leck der inneren Mitochondrienmembran postuliert, das den  $F_0/F_1$ -ATPase antreibenden Protonengradienten vermindert. Um dennoch die gleiche ATP-Menge produzieren zu können, müsste die Atmungskette schneller laufen, was mit einer gesteigerten ROS-Produktion verbunden wäre (Kriaucionis et al. 2006). Außerdem wird die Untereinheit 1 des Komplex IV vermindert exprimiert, wie PCR-Analysen von Patientehirnproben zeigten (Gibson et al. 2010).

Oxidierende zelluläre ROS-Konzentrationen sind nicht nur die Folge der MeCP2-Defizienz, sondern aggravieren vermutlich auch die Dysfunktion des Transkriptionsfaktors. Es zeigte sich, dass ROS schädigend auf Methyl-CpG-Sequenzen der DNA wirken, wodurch sich die Bindungsaffinität von MeCP2 für diese DNA-Regionen vermindert. Somit kann ein verschobener Redox-Status offenbar auch zu epigenetischen Änderungen der Chromatinorganisation führen. Erhöhte Redox-Level können also einerseits durch die Abwesenheit von MeCP2 entstehen und andererseits auch dessen Funktionalität beeinträchtigen (Valinluck et al. 2004). Somit ist es denkbar, dass MeCP2 trotz adäquater Expression nicht in der Lage ist, an der DNA zu binden. Dies hätte ähnliche Konsequenzen wie die Nichtexpression des Transkriptionsfaktors.

## 1.6 Fragestellung und Zielsetzung dieser Arbeit

Trotz der Fülle an Befunden und Hinweisen fehlten bislang noch detaillierte Untersuchungen der mitochondrialen Funktionsweise und des zytosolischen Redox-Status bei MeCP2-Defizienz. Dies lässt sich damit begründen, dass es keine suffiziente Möglichkeit gab, ROS in neuronalem Gewebe dynamisch darzustellen.

Andere Mitglieder der Arbeitsgruppe Müller führten im Vorfeld dieser Arbeit bereits ratiometrische Autofluoreszenz-Messungen der FAD/NADH-Ratio an hippokampalen Hirnschnittkulturen MeCP2-defizienter Mäuse durch und lieferten erste konkrete Hinweise einer gestörten Redox-Balance und einer veränderten Mitochondrienaktivität auf zellulärer Ebene (Großer et al. 2012).

Vor dem Hintergrund dieser Ergebnisse wurden folgende Zielsetzungen für die vorliegende Arbeit formuliert:

1. Ist der bereits mehrfach postulierte erhöhte oxidative Stress auch auf zellulärer Ebene in neuronalem Gewebe MeCP2-defizienter Mäuse nachweisbar?
2. Ist die Ursache des erhöhten oxidativen Stresses mitochondrialer Genese?
3. Welchen Einfluss haben die Rett-typischen anoxischen Episoden auf den intrazellulären Redox-Status?
4. Kann durch den gezielten Einsatz von Antioxidantien der verschobene Redox-Haushalt korrigiert werden, um somit mögliche Angriffspunkte für eine pharmakologische Beeinflussung zu identifizieren?

Für die Experimente wurde ein etabliertes Mausmodell des Rett-Syndroms gewählt, das nicht in der Lage ist, MeCP2 zu exprimieren. Um direkte Messungen der ROS-Konzentrationen und ihre Entwicklung zu beobachten, wurde das redox-sensitive Fluorophor roGFP1 (*reduction-oxidation sensitive green fluorescent protein 1*) eingesetzt, das dynamische semiquantitative Messungen der reaktiven Sauerstoffspezies ermöglicht (Hanson et al. 2004; Funke et al. 2011). Erste Untersuchungen widmeten sich dem Vergleich der zytosolischen Redox-Baselines in organotypischen hippokampalen Hirnschnittkulturen von Wildtyp- und *Mecp2*<sup>-/-</sup>-Mäusen. Das in der vorliegenden Arbeit genutzte roGFP1 zur Darstellung von ROS in neuronalem Gewebe stellt einen innovativen Ansatz dar, um direkte Einblicke in die zelluläre Redox-Homöostase und ihre Modulierbarkeit durch endogene und exogene Stressfaktoren zu erlangen.

Die 2010-2011 erhobenen Daten dieser Arbeit sind in eine umfangreiche Publikation (Großer et al. 2012) eingeflossen und stellen die Grundlage für weitere intensive Forschungsaktivitäten der AG Müller am Rett-Syndrom dar.

## 2 Material und Methoden

Der folgende Abschnitt der Arbeit beschäftigt sich mit den angewandten Methoden und soll einen detaillierten Überblick über die in den Experimenten verwendeten Techniken geben. Bei der Gewinnung der Hirnschnitte handelte es sich um Tiertötung mit Organentnahme. Dieser Sachverhalt wurde dem Tierschutzbeauftragten der Universität Göttingen mitgeteilt und durch ihn legitimiert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden keine Versuche an lebenden Tieren gemacht. Alle angefertigten Schnittkulturen wurden genutzt und es wurden nicht mehr Tiere getötet, als für die Experimente und die Erfassung einer eindeutigen Datenlage nötig war.

### 2.1 Mausmodell des Rett - Syndroms und Versuchsgewebe

Sämtliche Experimente fanden an kultivierten organotypischen hippocampalen Schnittkulturen statt. Die Hippokampi wurden aus den Hirnen von Wildtyp - Mäusen (WT) und MeCP2 - defizienten Mäusen des Stammes B6.129P2(C) - *Mecp2*<sup>2tm-1-1Bird</sup> (Guy et al. 2001) präpariert.

In diesem etablierten Mausmodell des Rett - Syndroms fehlen die Exons 3 und 4 des *Mecp2* - Gens, wodurch die phänotypischen Ausprägungen des Rett - Syndroms bei den Mäusen authentisch zu Tage treten. Es konnte gezeigt werden, dass die Defizienz des Transkriptionsfaktors MeCP2 bei der Maus, wie auch beim Menschen, zu motorischen Störungen, Epilepsien, Atmungs - und Wachstumsanomalien sowie Verhaltensauffälligkeiten führt (Guy et al. 2001; Chen et al. 2001). Hemizygoten Männchen verfügen im Gegensatz zu den heterozygoten Weibchen nur über ein X - Chromosom, weshalb die *Mecp2* - Mutation nicht kompensiert werden kann. Anders als bei den Weibchen, die erst nach ca. 60 Tagen deutliche Pathologien entwickeln, zeigen betroffene Männchen bereits wenige Wochen nach der Geburt erste Symptome. Der krankheitsspezifische Phänotyp prägt sich bei ihnen im Wesentlichen stärker und homogener aus. Liegt bei Weibchen Heterozygotie vor (*Mecp2*<sup>+/-</sup>) kommt es – entsprechend der Lyonhypothese (Lyon 1961) – in jeder Zelle zu einer willkürlichen X - Inaktivierung, was zu sehr variablen und im Allgemeinen auch schwächeren phänotypischen Ausprägung der Symptomatik führt. Heterozygote Weibchen wurden zur Aufrechterhaltung der Zucht benötigt.

Für die Experimente wurden ausschließlich organotypische Schnittkulturen männlicher Tiere verwendet, um die bekannte neuroprotektive Wirkung von Östrogenen auszuschließen (Suzuki et al. 2006) und um eine konstante Ausprägung des Krankheitsbildes zu gewährleisten. Die Tiere waren zwei bis maximal zwölf Tage alt (P 2 – P 12), da die Schnittkulturen älterer Tiere nur schwierig mit der Zellkulturmembran verwachsen. Diese Beobachtung wurde bei *Mecp2*<sup>-y</sup> - Hirnschnitten auch unabhängig vom Alter gemacht. Möglicherweise vermindert die MeCP2 - Defizienz die Regenerationsfähigkeit der Gliazellen.

Für die Darstellung dynamischer Redox-Verhältnisse in neuronalen Zellen bietet sich der Hippokampus an, da er eine gut messbare ROS-Grundproduktion aufweist (Bindokas et al. 1996) und als äußerst anfällig gegenüber Sauerstoffmangel und Anoxie gilt (Pulsinelli et al. 1982; Schmidt-Kastner und Freund 1991). Weiterhin konnte eine gesteigerte Empfindlichkeit der MeCP2-defizienten hippocampalen Neurone gegenüber oxidativem Stress nachgewiesen werden (Fischer et al. 2009; Kron und Müller 2010).

Diese Vulnerabilität macht hippocampale Schnittkulturen zum optimalen Untersuchungs-gewebe von zellulären Redox-Dynamiken, da selbst geringfügige metabolische Änderungen registrierbare Gewebereaktionen hervorrufen.

## 2.2 Präparation der organotypischen Schnittkulturen

### Vorbereitung der 6-Well-Zellkulturplatten

Durchschnittlich 30 min vor der eigentlichen Präparation wurden die Zellkulturplatten (Corning<sup>®</sup>) in der keimarmen Atmosphäre einer Sterilbank mit je 1 ml Wachstumsmedium (siehe Kapitel 2.6) befüllt und Kulturmembranen (wahlweise Millicell<sup>®</sup>, Millipore<sup>®</sup> oder Transwell Permeable Support, Corning<sup>®</sup>) in die Wells eingesetzt.

Dann wurden drei bis vier autoklavierte hydrophile Membranstücke (z.B. Confetti; Millipore<sup>®</sup>) auf die Kulturmembranen gelegt, um darauf die Hippokampusschnitte zu platzieren. Dies erleichterte später das Abheben der Hirnschnitte für den Transport zum Fluoreszenzmikroskop. Außerdem konnte die mechanische Beanspruchung der Hirnschnitte minimiert werden, da sie für die Messungen nicht aus den Kulturmembranen ausgeschnitten werden mussten. Die vorbereiteten Kulturplatten wurden für 20 min inkubiert (37 °; 5 % CO<sub>2</sub>), um das Medium zu temperieren und um den pH-Wert auf 7,35 einzustellen.

### Dekapitation des Versuchstieres und Isolation des Gehirns

Nach gewissenhafter Reinigung der Sterilbank mit Ethanol (70 %) und dem Aufbau des Gewebeschniders (Campden-McIlwain Tissue Chopper<sup>®</sup>) folgte die Reinigung der spezialgehärteten Rasierklinge (Campden Instruments<sup>®</sup>) mit Ethanol (96 %) zur Entfettung und Desinfektion. Anschließend wurde die Klinge in den Gewebeschnider eingespannt und justiert.

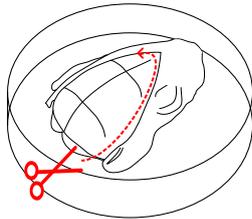
Nachdem der Nacken der Maus mit Alkohol (70 %) desinfiziert wurde, erfolgte die rasche Dekapitation mit einer chirurgischen Schere. Der abgetrennte Kopf wurde sofort in kaltem Präparationsmedium (siehe Kapitel 2.6) gekühlt, um darin die Isolation des Zerebrums vorzunehmen (Abb. 6 A). Die Kühlung sollte den Zellmetabolismus der Hirnschnitte absenken und Ischämie-Schäden minimieren, um die Vitalität der Hirnschnitte zu verbessern. Nach Eröffnung des Schädels mit einer Mikroschere wurde das Gehirn mithilfe eines gebogenen Spatels entnommen (Abb. 6 B).

## Hippokampuspräparation und Kultivierung

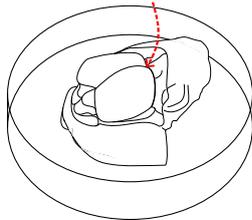
Die weitere Präparation wurde entsprechend der Stoppini- Methode (Stoppini et al. 1991; Funke et al. 2011) durchgeführt. Das Gehirn wurde in einem frischen, ebenfalls mit Präparationsmedium befülltem, Glasschälchen unter einem Binokular und unter sterilen Bedingungen präpariert. Die Hemisphären wurden nach der Entfernung von Hirnstamm und Kleinhirn voneinander getrennt (Abb. 6 C). Anschließend erfolgte die Isolierung der Hippokampi (Abb. 6 D und 6 E).

Als Orientierungshilfe zum Auffinden der Hippokampi diente die A. cerebri anterior, die auf der Medialseite der Hemisphären deutlich zu erkennen ist. Nach erfolgter Isolation wurde das Medium gewechselt. Aus den Hippokampi wurden dann mit dem Gewebescheider 350  $\mu\text{m}$ - dicke Hirnschnitte angefertigt (Abb. 6 F), die anschließend auf die permeablen Membranen übertragen wurden. Empirisch zeigte sich, dass die Hirnschnitte auf Corning<sup>®</sup>- Membranen besser anwuchsen, als auf Millipore<sup>®</sup>- Membranen.

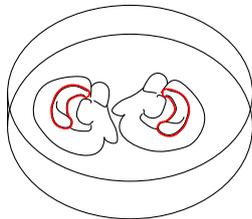
Die Schnittkulturen wurden mit Wachstumsmedium (siehe Kapitel 2.6) versorgt, das nach den ersten 24 Stunden komplett ausgewechselt wurde. Im weiteren Verlauf wurde nur noch die Hälfte des Wachstumsmediums im Zeitraum von 48–98 Stunden gewechselt. Somit konnten Metabolitintoxikationen verhindert und gleichzeitig eine ausreichende Nährstoffzufuhr garantiert werden. Die anschließende Lagerung der Hirnschnitte im Inkubator (37 °C; 5 % CO<sub>2</sub>- Atmosphäre) ermöglichte ihre Verwendung für fünf bis zehn Tage nach der Präparation.



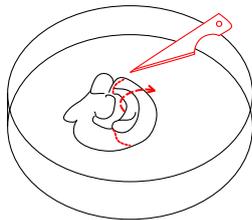
**A)** Nach Dekapitation und behutsamer Abpräparation der Kopfhaut, wurde die Kalotte mithilfe einer Augenschere zirkulär eröffnet.



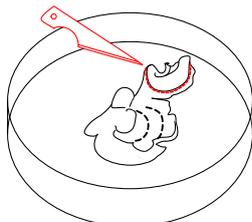
**B)** Die Bulbi olfactorii und das Kleinhirn wurden rostral und okzipital vom Zerebrum gelöst. Danach wurden die Hemisphären mithilfe eines gebogenen Spatels vorsichtig aus den Schädelgruben geborgen und in ein frisches Kulturschälchen mit gekühltem Präparationsmedium transferiert.



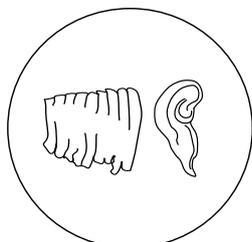
**C)** Die Hemisphären wurden durch Teilung des Corpus callosum mit einem Schnitt in der Saggitalebene voneinander separiert. Auf der Medialseite der Hemisphären war nun der Hippokampus ersichtlich.



**D)** Dann erfolgte eine minimale Inzision am okzipitalen Ende des Hippokampus mithilfe eines sterilisierten Skalpells, um den Hippokampus zu mobilisieren.



**E)** Der Hippokampus wurde nun behutsam aus der Hemisphäre gerollt und von den septo-hippokampalen Verbindungen gelöst.



**F)** Anschließend wurden die Hippokampi mithilfe des Gewebeschniders in  $350\ \mu\text{m}$ -dicke Scheiben geschnitten und mittels Pasteurpipette auf die Kulturmembranen übertragen (Darstellung des geschnittenen Hippokampus, Perspektive durch das Binokular).

**Abb. 6 – Präparation des Hippokampus und Herstellung von Hirnschnittkulturen**

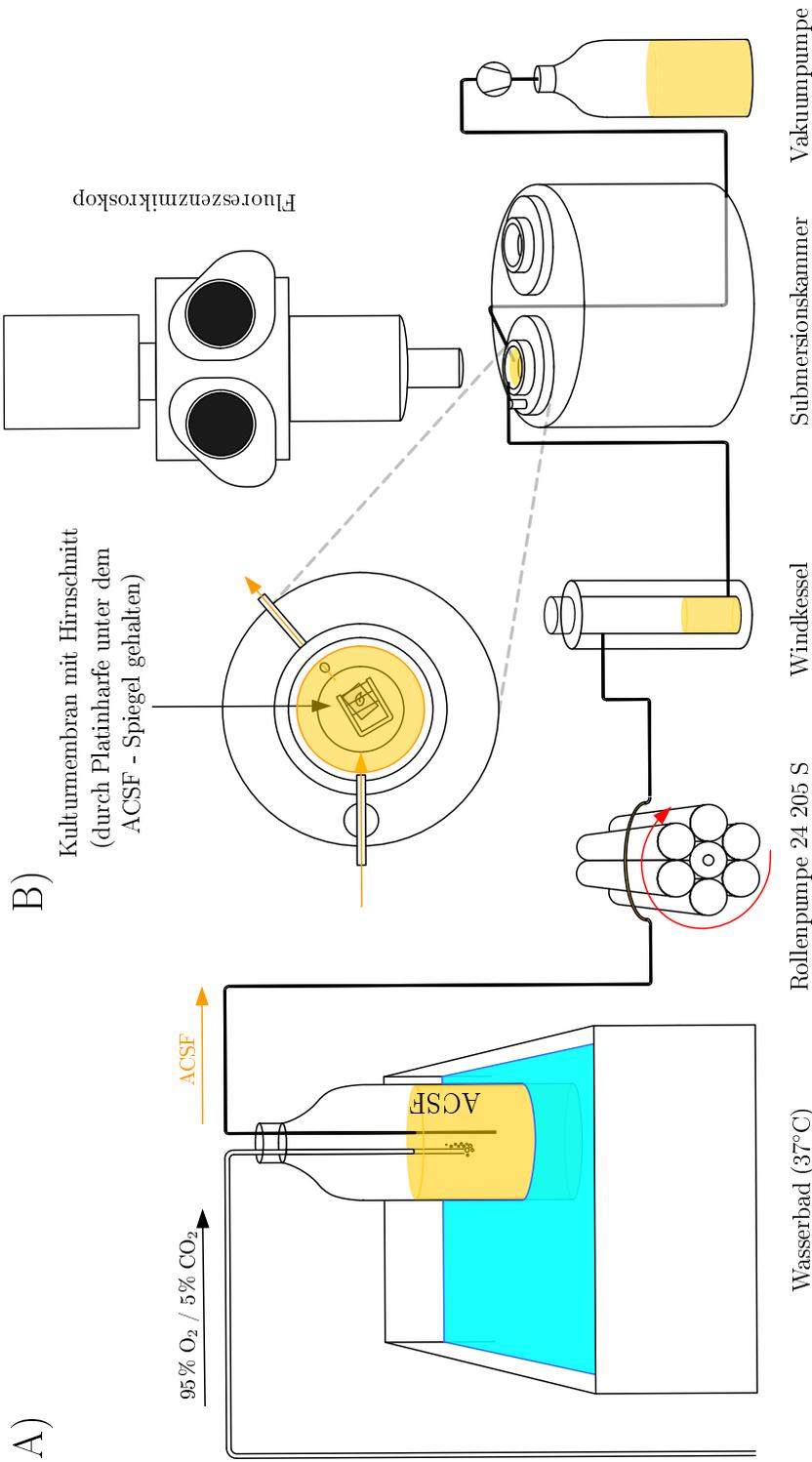
### 2.3 Aufbewahrung der Schnittkulturen und Versuchsaufbau

Grundsätzlich wurden die hippokampalen Schnittkulturen nach Präparation für mindestens 24 h im Inkubator bei 37°C unter 5%iger CO<sub>2</sub>-Atmosphäre aufbewahrt. Dort konnten sich die Hirnschnitte nach der Präparation regenerieren und mit der Membran verwachsen, was für die folgenden Messungen unabdingbar war.

Zur Durchführung der Messungen wurden die Hirnschnittkulturen in eine Submersionskammer (Eigenbau Feinmechanik, Zentrum Physiologie, Universität Göttingen; Abb. 7B) überführt. Während der Messungen wurden die Hirnschnitte durch artifizielle zerebrospinale Flüssigkeit (*artificial cerebrospinal fluid*, ACSF) mit Nährstoffen, Sauerstoff und Elektrolyten versorgt. Es zeigte sich, dass die Hirnschnitte auf den Transport vom Inkubator in die Submersionskammer und den damit verbundenen Milieuwechsel mit vermehrtem oxidativem Stress reagierten. Um diesen externen Einflussfaktor aus den Messungen zu eliminieren, wurden die Hirnschnitte 20 min in der neuen Umgebung belassen bevor mit den Versuchen begonnen wurde.

Während der Adaptation im neuen Milieu der Submersionskammer wurden die Hirnschnitte ausschließlich mit ACSF umspült, wodurch sich ihr oxidatives Grundniveau einstellte. Der ACSF-Zufluss in die Kammer wurde über eine Rollenpumpe vom Typ 24 205 S (Watson & Marlow GmbH, Rommerskirchen; Abb. 7A) geleistet. Das einzuwaschende ACSF wurde mit einer Flussrate von 4–5 ml/min über ein Schlauchsystem in die Submersionskammer transportiert. Um Pulsationen des Flüssigkeitsspiegels und Luftblasenbildungen zu verhindern, war der Pumpe ein Windkessel (Eigenbau Feinmechanik, Zentrum Physiologie, Universität Göttingen; Abb. 7A) nachgeschaltet.

Durch die kontinuierliche Absaugung von ACSF aus der Submersionskammer über eine Vakuumpumpe (Abb. 7A) wurde ein konstanter Flüssigkeitspegel erzeugt, sodass die Hirnschnitte komplett von ACSF umgeben waren und permanent mit frischer Lösung versorgt werden konnten. Vor der Einwaschung wurde ACSF in einem Wasserbad auf 37°C erwärmt und mit Carbogen (5% CO<sub>2</sub>; 95% O<sub>2</sub>) begast, um den pH-Wert auf 7,4 einzustellen. Zur Schaffung möglichst physiologischer Bedingungen wurden alle nachfolgend applizierten Lösungen und Pharmaka in ACSF gelöst und mit Carbogen vorbehandelt. Die Membranstücke mit den Hirnschnitten wurden während der Messungen durch eine mit Nylonfaden bespannten Platinharfe (Eigenanfertigung des Labors; Abb. 7B) unter der Flüssigkeitsoberfläche gehalten. Dies war nötig, um das Aufschwimmen der Membranstücke zu verhindern und sie auf dem Grund der Submersionskammer zu fixieren.



**Abb. 7 – Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus und Detailansicht der Submersionskammer**

A) ACSF und alle einzuwaschenden Lösungen wurden mit  $95\% \text{ O}_2 / 5\% \text{ CO}_2$  begast und auf  $37^\circ\text{C}$  erwärmt, bevor sie mithilfe einer Rollenpumpe durch ein Schlauchsystem in den Windkessel gepumpt wurden. Dieser verhinderte Schwankungen des Flüssigkeitspegels in der Messkammer und filterte Luftblasen aus dem System. Der Windkessel wurde über ein Schlauchsystem mit der Submersionskammer verbunden. Eine Vakuumpumpe sorgte für einen permanenten Lösungsabfluss.

B) Die Membranstücke wurden durch eine mit Nylonfaden bespannte Platinharfe unter dem Flüssigkeitspegel gehalten, um sie auf dem Grund der Submersionskammer zu fixieren. Die gelben Pfeile stellen den Zu- und Abfluss der jeweils eingewaschenen Lösung (hier ACSF) dar.

## 2.4 Transfektion

Die Zell-Transfektion bezeichnet eine Methode zur Einschleusung von Fremd-DNA in eine eukaryotische Zelle, um ein zellfremdes Protein zu exprimieren. In der vorliegenden Arbeit wurden Gliazellen und Neuronen durch Lipofectamin mit DNA transfiziert, die für das modifizierte grün fluoreszierende Protein roGFP1 kodiert. Obwohl die Methode zellunspecific ist, gelang die Transfektion fast ausschließlich bei Gliazellen. Im Folgenden werden sowohl roGFP1 als auch das genaue Vorgehen bei der Transfektion näher beschrieben.

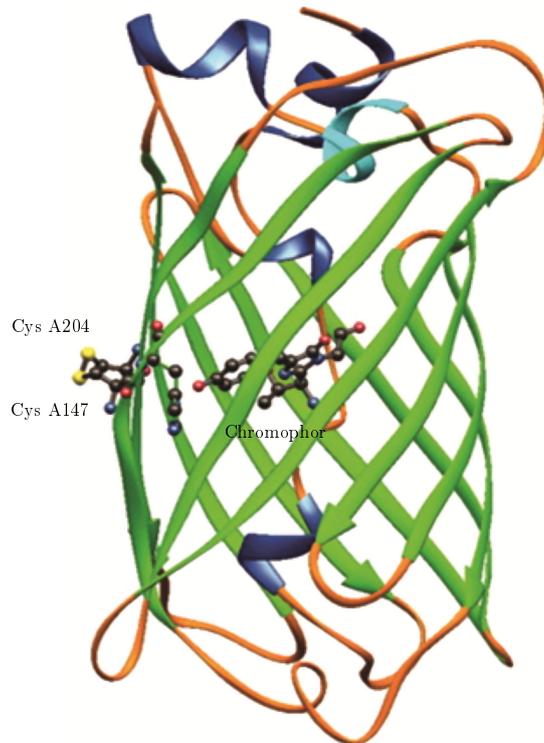
### 2.4.1 roGFP1

Zur Darstellung der zellulären Redox-Verhältnisse wurde der Vektor pEGFP-N1 (Clontech, Mountain view<sup>®</sup>, USA) verwendet, der roGFP1 exprimiert (Hanson et al. 2004). Dieses wurde von der Arbeitsgruppe um S. J. Remington am Institut für Molekularbiologie der Universität Oregon entwickelt und uns freundlicherweise für die vorliegende Arbeit zur Verfügung gestellt.

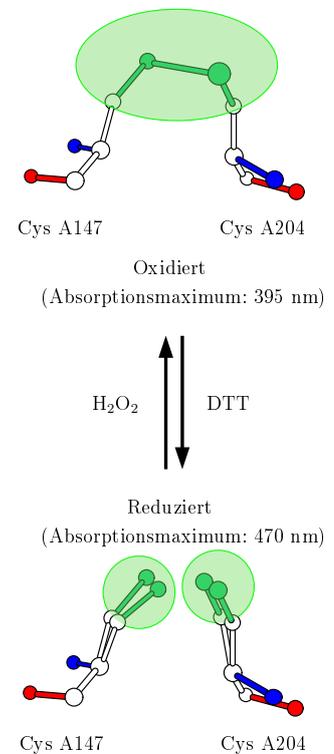
Durch Modifikation des Wildtyp-GFPs weist roGFP1 zwei an der Oberfläche des Proteins lokalisierte Cystein-Reste (147 und 204) auf (Abb. 8 A). Deshalb besitzt roGFP1 zwei Absorptionsmaxima bei 395 nm und bei 470 nm, die jeweils von den Redox-Bedingungen innerhalb der Zelle abhängen. Durch Oxidation bildet sich eine Disulfidbrücke zwischen den Cysteinresten, was zu einer Konformationsänderung des Proteins führt. Daraus ergibt sich eine Verstärkung des Absorptionsmaximums bei 395 nm und eine Schwächung des Maximums bei 470 nm. Umgekehrt verhält es sich im reduzierten Zustand. Ist keine Disulfidbrücke vorhanden, absorbiert roGFP1 bei 470 nm intensiver als bei 395 nm (Hanson et al. 2004).

Die Disulfidbrückenbildung ist durch Reduktion reversibel, weshalb roGFP1 dynamische Messungen zulässt. Konventionelle redox-sensitive Farbstoffe, die diesen Vorteil nicht besitzen, werden irreversibel oxidiert und akkumulieren in der Zelle, sodass man lediglich qualitative Aussagen über den zellulären Redox-Status treffen kann. Die Tatsache, dass roGFP1 über zwei Absorptionsmaxima verfügt, die sich jeweils grundsätzlich gegenläufig gegenüber Oxidation und Reduktion verstärken bzw. abschwächen, erlaubt ratiometrische Messungen. Dies schaltet übliche Fehlerquellen wie differente Fluorophor-Konzentration, ungleichmäßige Fluorophor-Verteilung, Fluorophor-Bleichen oder Beleuchtungsinstabilitäten aus. Somit sind mittels roGFP1 aussagekräftige Messungen über das intrazelluläre Redox-Verhalten möglich (Hanson et al. 2004; Dooley et al. 2004).

A)



B)



### Abb. 8 – Strukturelle Besonderheiten von roGFP1

**A)** Das redoxensitive roGFP1 ist prinzipiell ein Wildtyp- GFP. Die Mutationen C48S, S147C und Q204C bewirken die Exposition der Cysteinreste A147 und A204 auf der Oberfläche des Proteins.

**B)** Durch den Redox- Zustand der Cysteinreste A147 und A204 ändern sich die relativen Absorptionsverhältnisse von roGFP1. Liegen intrazellulär oxidierende Bedingungen vor, wie nach der Applikation von  $\text{H}_2\text{O}_2$ , bilden die zwei Cysteinreste eine Disulfidbrücke, die eine Konformationsänderung des Proteins herbeiführt. Das relative Absorptionsmaximum von roGFP1 liegt dann bei 395 nm. Mit DTT können intrazellulär künstlich reduzierende Bedingungen geschaffen werden. Die Reduktion der Disulfidbrücke löst die Verbindung zwischen Cys A204 und Cys A147, sodass sie als separate Sulphydrylreste vorliegen. Das relative Absorptionsmaximum von roGFP1 liegt dann bei 470 nm. [Quelle: modifiziert nach Hanson et al. 2004, S.13049, mit freundlicher Genehmigung von Elsevier<sup>©</sup>]

### 2.4.2 Transfektion mit Lipofectamin 2000

Als relativ zuverlässiges Verfahren zum Einbringen der Vektor-DNA in die Zelle hat sich die Transfektion mit Lipofectamin 2000 (Invitrogen<sup>®</sup>) erwiesen. Hierfür wurden die Hirnschnitte ein bis vier Tage nach der Präparation mit einer Transfektionslösung inkubiert, die auf der Basis von Opti-MEM (Invitrogen<sup>®</sup>) hergestellt wurde. Dem Herstellerprotokoll entsprechend, wurden zwei Ansätze mit jeweils 84  $\mu\text{l}$  Opti-MEM in zwei verschiedene Eppendorf-Reaktionsgefäße pipettiert. Dem einen Ansatz wurden 4  $\mu\text{g}$  (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) Plasmid-DNA zugesetzt, dem anderen 1  $\mu\text{l}$  Lipofectamin 2000 (0,4 %). Nach kurzer Durchmischung und anschließender Ruhigstellung bei Raumtemperatur für 10 min, wurden die Lösungen zusammengeführt, kurz manuell durchmischt und für weitere 20 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Jeder organotypische Hirnschnitt wurde mit 30–50  $\mu\text{l}$  dieser Lösung benetzt. Um zu gewährleisten, dass der gesamte Schnitt ausreichend lange von der Lösung umgeben ist, bewährte es sich eine Bande um den Schnitt zu legen, die als Becken fungierte. Hierfür wurden abgeschnittene Enden von Pipettenspitzen benutzt, die über dem Bunsenbrenner entgratet und entkeimt wurden. Je ein Schnitt wurde von einer Bande umgeben. Die Anzahl transfizierter Zellen stieg deutlich durch dieses Vorgehen, da die Hirnschnitte länger von der Lösung umgeben waren. Trotz der bekannten zytotoxischen Wirkung von Lipofectamin wurden die Hirnschnitte über Nacht inkubiert.

Nach durchschnittlich 12h erfolgte ein kompletter Medienwechsel. Die Transfektionsrate war generell relativ niedrig (ca. 1 %). Weiterhin beschränkte sich die roGFP1-Expression, wie oben bereits erwähnt, überwiegend auf Gliazellen. Es ist wahrscheinlich, dass dies auf die Transfektionsmethode mit Lipofectamin zurückzuführen ist. Die durch Lipofectamin in das Zytosol eingebrachte DNA muss in den Zellkern gelangen, um transkribiert zu werden. Während der Mitose geschieht dies relativ leicht, da sich die Kernmembran in diesem Zeitraum auflöst. Befindet sich die Zelle hingegen in der Postmitose oder in der G0-Phase – teilt sie sich also kaum oder gar nicht mehr – gelangt die DNA nur mithilfe bestimmter zytoplasmatischer Interaktoren in den Zellkern (Dalby et al. 2004).

Da neuronale Mitosen postnatal im Hippokampus nur noch in einigen wenigen Regionen stattfinden und relativ seltene Ereignisse sind (Lugert et al. 2010), wurden kaum Neuronen transfiziert. Die transfizierten Gliazellen exprimierten roGFP1 nach 24–48 h, sodass bereits am Tag nach der Transfektion Messungen möglich waren.

## 2.5 Applizierte Pharmaka und Chemikalien

Tab. 1 – Übersicht der verwendeten Pharmaka und Chemikalien

Reagenz	Wirkung	Gebrauchs- konzentration	Lösung/ Aufbewahrung
Aminotriazol (ATZ)	Inhibition Katalase	1 mM	1 M Lsg. in Aqua dest.; Lagerung: -20°C
Antimycin A	Komplex III- Inhibitor	20 $\mu$ M	20 mM Lsg. in abs. Ethanol; Lagerung: -20°C
Ascorbat	Antioxidans	2 mM	dir. Beimischung zur Lsg.; Lagerung: -20°C
Buthioninsulfox- amid (BSO)	Inhibition Glutathionsystem	1 mM	250 mM Lsg. in Aqua dest.; Lagerung: -20°C
Cyanid (CN <sup>-</sup> )	Komplex IV- Inhibitor	1-5 mM	1 M Lsg. in Aqua dest.; Lagerung: -20°C
Diethyldithio- carbamat (DEDTC)	SOD - Inhibitor	50 $\mu$ M - 2 mM	dir. Beimischung zur Lsg.; Lagerung: -20°C
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Oxidans	200 $\mu$ M - 5 mM	30 % Lsg. in Aqua dest.; Lagerung: -20°C
Melatonin	Antioxidans	50 $\mu$ M	dir. Beimischung zur Lsg.; Lagerung: -20°C
Na - Sulfit	O <sub>2</sub> - Fänger	1 mM	dir. Beimischung zur Lsg.; Lagerung: -20°C
Stickstoff (N <sub>2</sub> )	Hypoxie	95 % N <sub>2</sub> ; 5 % O <sub>2</sub>	dir. Begasung von ACSF anstelle von 95 % O <sub>2</sub> / 5 % CO <sub>2</sub>
Trolox <sup>1</sup>	Antioxidans	1 mM	dir. Beimischung zur Lsg.; Lagerung: -20°C

<sup>1</sup>± - 6 - Hydroxy - 2,5,7,8 - tetramethylchromane - 2 - carbonsäure

## 2.6 Lösungen und Kulturmedien

### 2.6.1 Artifizielle zerebrospinale Flüssigkeit (ACSF)

Die während der Messung für die Umspülung der Hirnschnitte benutzte ACSF entspricht chemisch dem Liquor cerebrospinalis und erzeugte somit ein physiologisches Messmilieu. Wie oben bereits beschrieben, wurde die Temperatur der ACSF bei 37°C gehalten und der pH von 7,4 durch konstante Begasung mit Carbogen (95 % O<sub>2</sub> / 5 % CO<sub>2</sub>) eingestellt. Die ACSF wurde entsprechend den Angaben in Tab. 2 zusammengesetzt.

### 2.6.2 Präparationslösung

Für die Präparationslösung wurden 9,5 g HBSS (*Hank's Balanced Salt Solution*) in einem Liter deionisiertem und aufgereinigtem Wasser gelöst. Im Anschluss wurden 4 mM NaHCO<sub>3</sub> sowie 1 mM HEPES als pH-Puffer hinzugefügt (siehe Tab. 2).

Diese Lösung wurde zur Präparation und zum Schneiden der Hippokampi sowie bei der Vereinzelung der Hirnschnitte eingesetzt. Um hypoxische Schäden auf ein Minimum zu reduzieren, erfolgten die oben genannten Schritte unter permanenter Kühlung zur Absenkung der metabolischen Gewebeaktivität. Die Gebrauchslösung wurde vor Benutzung immer durch eine Membran sterilfiltriert (Porengröße: 0,2 µm).

**Tab. 2 – Detailzusammensetzung der Medien**

ACSF	Wachstumsmedium	Präparationsmedium
NaCl 130 mM	MEM 47 ml	Deionat 1 l
KCl 3,5 mM	FCS 2,5 ml (5 %)	HBSS 9,5 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1,25 mM	Glucose 5 mg/ml	NaHCO <sub>3</sub> 4 mM
NaHCO <sub>3</sub> 24 mM	NaHCO <sub>3</sub> 0,1 mg/ml	HEPES 1 mM
CaCl <sub>2</sub> 1,2 mM	Transferrin 0,1 mg/ml	
MgSO <sub>4</sub> 1,2 mM	L - Glutamin 30 mg/ml	
Dextrose 10 mM	B - 27 Supplement 20 µl/ml	
	Penicillin - Streptomycin 100 µg/ml	

### 2.6.3 Wachstumsmedium

Das Wachstumsmedium diente zur Nährstoffversorgung der Zellkulturen. Im Detail wurden 100 ml des Mediums entsprechend Tab. 2 zusammengesetzt. Der Zusatz B - 27 Supplement (Invitrogen<sup>®</sup>) enthält Wachstumsfaktoren und Antioxidantien, die das Anwachsen

der Hirnschnitte an die Kulturmembran in den ersten zwei Tagen unterstützen sollten. Auf die Beigabe des sonst üblichen Cytosin - Arabinosid wurde verzichtet, da dieses Zytostatikum vor allem das Gliawachstum und somit das Anwachsen der Schnittkulturen auf der Membran gehemmt hätte.

Da Antibiotikakonzentrationen über 0,08 mM die synaptische Transmission beeinträchtigen können (Ritchie 1987), wurde dieser Grenzwert nicht überschritten. Vor allem Aminoglykoside, wie Streptomycin, scheinen in dieser Hinsicht bedeutsam zu sein (Parsons et. al 1992).

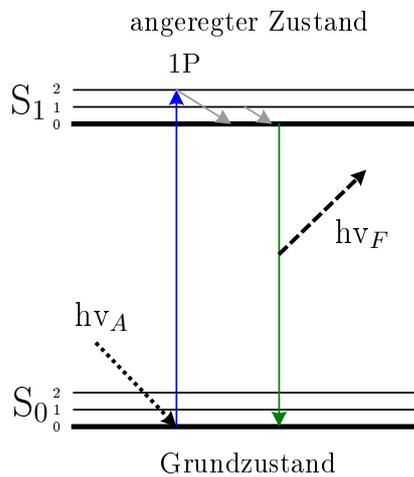
Die Gebrauchslösung wurde, wie das Präparationsmedium, vor Benutzung durch eine Membran mit 0,2  $\mu\text{m}$  großen Poren sterilfiltriert. Wachstums - und Präparationsmedium wurden bei 4°C gelagert.

**Tab. 3 – Verwendete Substanzen und deren Hersteller**

Substanz	Hersteller
B - 27 Supplement	Invitrogen <sup>®</sup>
Fötales Bovines Serum (FBS)	Biochrom <sup>®</sup>
Glucose	Sigma - Aldrich <sup>®</sup>
<i>Hank's Balanced Salt Solution</i> (HBSS)	Sigma - Aldrich <sup>®</sup>
2 - (4 - (2 - Hydroxyethyl) - 1 - piperazinyl) - ethansulfonsäure (HEPES)	Sigma - Aldrich <sup>®</sup>
Insulin	Sigma - Aldrich <sup>®</sup>
L - Glutamine	Invitrogen <sup>®</sup>
Lipofectamine 2000 Reagent	Invitrogen <sup>®</sup>
<i>Minimal Essential Medium</i> (MEM)	Invitrogen <sup>®</sup>
NaHCO <sub>3</sub>	Invitrogen <sup>®</sup>
Opti - MEM	Biochrom <sup>®</sup>
Penicillin / Streptomycin	Calbiochem <sup>®</sup>
Transferrin	Roth <sup>®</sup>

## 2.7 Fluoreszenzmikroskopie

Das grundlegende Messverfahren dieser Arbeit stellte die Fluoreszenzmikroskopie dar, mit der die zellulären Redox-Änderungen erfasst wurden. Proteinbasiertes roGFP1 ist ein Fluorophor. Diese Stoffe sind dadurch charakterisiert, dass sie durch energiereiches Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt werden können und daraufhin beginnen zu fluoreszieren. Das Jablonski-Schema (Abb. 9) verdeutlicht dieses Phänomen. Ein im Grundzustand  $S_0$  befindliches Valenzelektron des Fluorophors absorbiert ein Photon ( $h\nu_A$ ), das das Valenzelektron in einen höheren energetischen Zustand ( $S_1$ ) versetzt. Während der Rückkehr des Elektrons auf sein Ausgangsniveau gibt es einen Teil seiner aufgenommenen Photonenenergie in Form von emittiertem Licht wieder ab ( $h\nu_F$ ). Dieses energieärmere, weil langwelligere, Licht ist mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops detektier- und messbar.



**Abb. 9 – Vereinfachtes Jablonski-Schema**

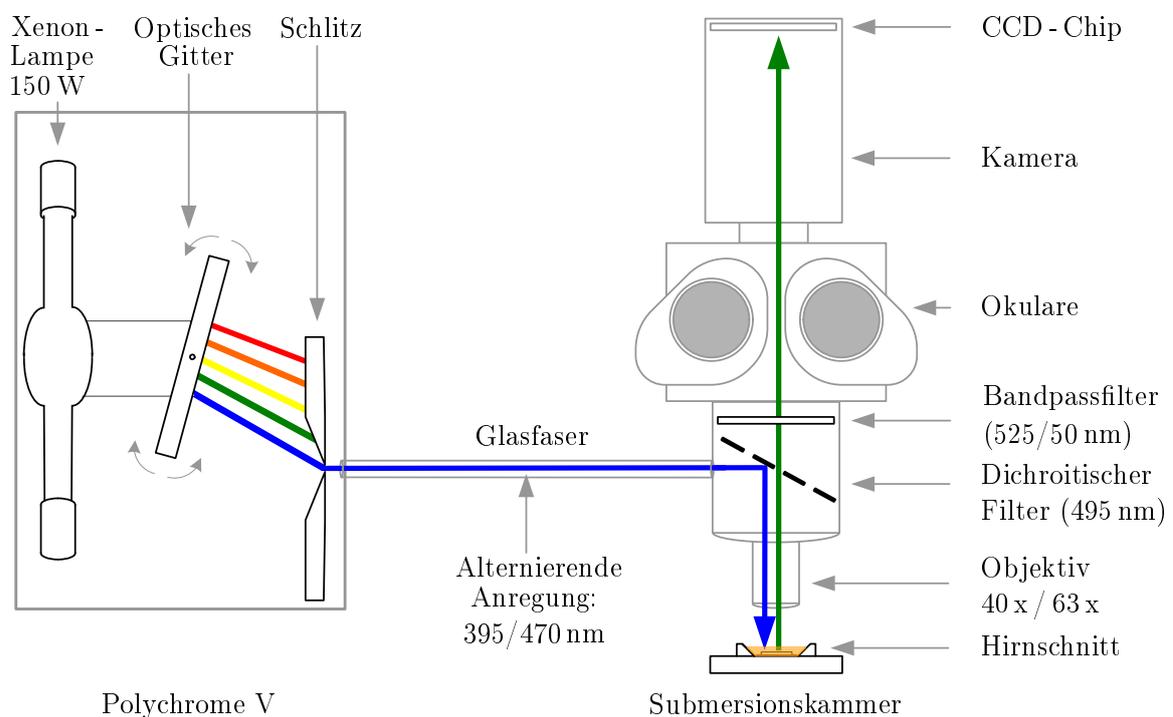
Durch Absorption eines Photons ( $h\nu_A$ ) mit kurzer Wellenlänge werden freie Elektronen angeregt und in einen energetisch höheren Zustand ( $S_1$ ) versetzt. Fällt das Elektron kurze Zeit später in seinen Grundzustand ( $S_0$ ) zurück, emittiert es dabei partiell die zuvor absorbierte Energie in Form langwelligerer Photonen ( $h\nu_F$ ).

Alle optischen Messungen wurden an einem aufrechten Fluoreszenzmikroskop (Axiotech vario, Zeiss, Oberkochen, Deutschland; Abb. 10) durchgeführt. Das Anregungslicht entstammte einer polychromatischen Lichtquelle mit Xenon Hochdrucklampe (Polychrom V, Till Photonics, Gräfelfing, Deutschland). Die Anregung von roGFP1 erfolgte mit den Wellenlängen 395 nm und 470 nm, bei einer Wechselfrequenz von 0,1 Hz.

Die Einstellung der Wellenlänge erfolgte durch ein galvanometrisch gesteuertes Gitter, das das spektral aufgetrennte Licht durch einen dünnen optischen Schlitz projizierte ( $\pm 15$  nm um die eingestellte Wellenlänge, entsprechend der Gaußschen Wellenlängeverteilung). Ein dichroitischer Filter (495 nm) reflektierte das kurzwellige Anregungslicht durch das Objektiv (40 x: Zeiss Achroplan, 0.8 NA; 63 x: Zeiss Apochromat, 1.0 NA) auf die Schnittkultur. Das langwellige, von den Fluorophoren emittierte Licht konnte den dichroitischen Filter passieren. Ein Emissions-Bandpassfilter ließ lediglich die Frequenzanteile um  $525 \pm 25$  nm durch, sodass weitestgehend das von roGFP1 emittierte Licht von der CCD-Kamera

(*Charge - coupled Device* - Kamera, Imago QE, PCO Imaging, Kelheim, Deutschland) aufgenommen wurde.

Dann wurde die Fluoreszenz - Ratio bei 395 und 470 nm (F395/F470) bestimmt, um daraus Rückschlüsse auf den zellulären Redox - Status zu ziehen (Funke et al. 2011). Die weitere Bearbeitung wurde mithilfe des Programms TILLvisION (Version 4.0.1; Till Photonics) vorgenommen, das die Bestimmung selektiver Fluoreszenz - Intensitäten in festgelegten Arealen (*area of interest*, AOI) ermöglichte.



**Abb. 10 – Prinzip der Fluoreszenzmikroskopie**

Das Licht der Xenon-Lampe wird von dem optischen Gitter gebeugt, in seine spektralen Anteile aufgespalten und dann durch einen nachgestellten Spalt projiziert. Dadurch kann lediglich der gewünschte Wellenlängenbereich passieren. Der dichroitische Filter hat die Aufgabe, den Lichtstrahl durch das Mikroskop auf das Präparat zu lenken. Das kurzwellige Licht regt das Fluorophor an, welches daraufhin langwelliges Licht emittiert. Dieses Licht kann den dichroitischen Filter passieren und wird nach weiterer engerer Frequenzfilterung durch einen Bandpassfilter auf den CCD-Chip der Kamera projiziert.

## 2.8 Statistik und Datenauswertung

Die Daten dieser Arbeit wurden an den kultivierten organotypischen Hirnschnittkulturen von insgesamt 46 Mäusen erhoben.

Die Präparation der Hirnschnitte, die Kultivierung und die Messungen fanden verblindet statt.

Sämtliche Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind als Mittelwert mit der zugehörigen Standardabweichung angegeben ( $MW \pm SD$ ). Die Anzahl der Experimente ( $n$ ) bezieht sich auf die Anzahl der gemessenen Zellen. Folglich können die Daten sowohl innerhalb einer als auch mehrerer organotypischer Schnittkulturen erhoben worden sein. Die Signifikanzniveaus der Veränderung des Redox-Status unterschiedlicher Genotypen bzw. die Reaktion auf die Applikation spezifischer Pharmaka wurden mithilfe des ungepaarten zweiseitigen  $t$ -Tests nach Student in Microsoft Excel<sup>®</sup> ermittelt. Die Darstellung des Signifikanzniveaus in den Abbildungen bzw. Diagrammen wurde durch Asterisken vorgenommen:

5 %- Niveau	( $p < 0,05$ )	→ *
1 %- Niveau	( $p < 0,01$ )	→ **
0,1 %- Niveau	( $p < 0,001$ )	→ ***

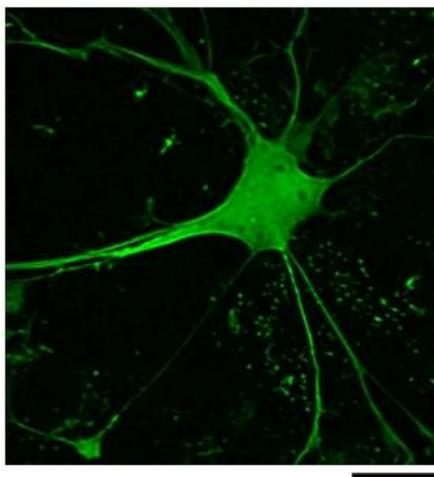
## 3 Ergebnisse

### 3.1 Kalibrierung des roGFP1 - Antwortbereichs in hippocampalen Hirnschnitten

Die erste Versuchsreihe sollte die Frage beantworten, ob ein Unterschied im basalen Redox-Status von Wildtyp- und *Mecp2*<sup>-/-</sup>-Hirnschnitten besteht. Von besonderem Interesse war, ob die in Kapitel 1.5 beschriebenen Hinweise einer verstärkten ROS-Entstehung im Rett-Syndrom auch mit dem konzipierten Versuchsaufbau sichtbar sind.

Um die zytosolische Konzentration von ROS in den organotypischen hippocampalen Hirnschnitten zu ermitteln, wurde der in Kapitel 2.4.1 beschriebene optische Redox-Indikator roGFP1 genutzt, dessen verlässliche Antwortdynamik auf Änderungen des Redox-Status bereits mehrfach gezeigt werden konnte (Hanson et al. 2004; Dooley et al. 2004). Auch kommerziell erhältlichen Redox-Sensoren, wie beispielsweise HyPer, ist roGFP1 vor allem aufgrund seiner pH-Unabhängigkeit überlegen (Weller et al. 2014). Da roGFP1 bereits in dissoziierten Zellkulturen und organotypischen Hirnschnittkulturen von Ratten eingehend getestet wurde (Funke et al. 2011), erschien es als geeigneter Indikator für die geplanten Experimente am Maus-Hippokampus.

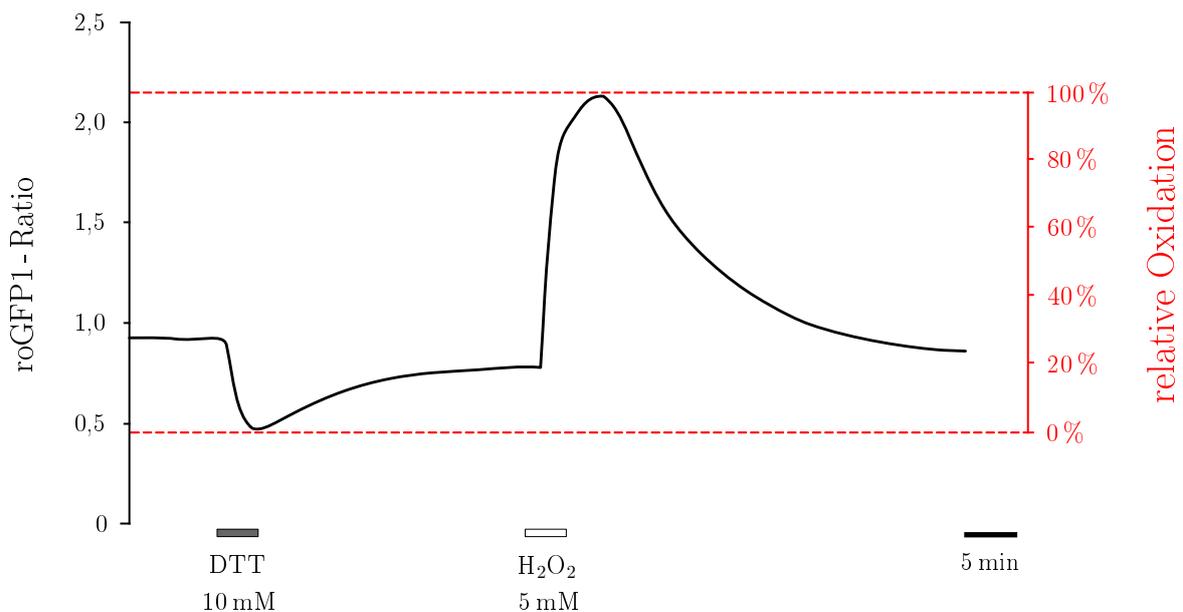
Das zytosolische Verteilungsmuster von roGFP1 ist äußerst homogen und schließt auch periphere Ausläufer der Zellen ein. Dies ermöglicht eine verlässliche Gesamtevaluation des zellulären Redox-Status (Abb. 11). Im Zytosol liegt roGFP1, den zytosolischen Redox-Bedingungen entsprechend, eher reduziert vor. Deshalb fallen Antworten auf oxidierende Einflüsse stärker aus als auf reduzierende. Da eine absolute Bestimmung des Redox-Potentials der Zellen mit roGFP1 nicht möglich war, wurde der Redox-Status stellvertretend mit dem relativen Oxidationsgrad von roGFP1 beschrieben (Funke et al. 2011).



**Abb. 11 – Zytosolische roGFP1-Expression einer Gliazelle**

Die Verteilung von roGFP1 erfolgte homogen im gesamten Zytosol bis in die distalen Ausläufer. Das Bild wurde aus 73 Fokalebene konstruiert, die mit einem 2-Photonen-Mikroskop aufgenommen wurden (63 x Objektiv, Pixel-Größe: 485 nm, z-Distanz: 250 nm). Der schwarze Balken am rechten Unterend des Bildes entspricht 10 µm.

Dementsprechend kann man annehmen, dass der relative Redox-Status von roGFP1 im Zytoplasma der Zelle bei 0 % liegt, wenn alle roGFP1-Komplexe reduziert vorliegen und bei 100 % liegt, wenn sämtliche roGFP1-Komplexe oxidiert sind (Hanson et al. 2004). Diese zwei Extremzustände definieren den maximal möglichen Antwortbereich, in dem sich die Zellantworten auf Redox-Einflüsse bewegen können. Die Ermittlung der Fluoreszenz-Intensität von roGFP1 unter maximaler Oxidation (5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) und maximaler Reduktion (10 mM DTT) diente somit der Kalibrierung des ratiometrischen Antwortbereichs für die geltenden Versuchsbedingungen (Abb. 12). Dies ermöglichte im weiteren Verlauf die semiquantitative Einordnung des basalen Redox-Status und der Fluoreszenz-Antworten von roGFP1 auf spezifische Drogenapplikationen (Hanson et al. 2004; Funke et al. 2011). Für die Berechnung der relativen Oxidationsstufen wurde ein lineares Antwortverhalten angenommen (Abb. 12). Da die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- und DTT-Messungen jeweils an der gleichen Zelle vorgenommen wurden, erschien es sinnvoll, die Applikationsreihenfolge von Zelle zu Zelle zu variieren. Dadurch sollte verhindert werden, dass die Vorbehandlung durch die erste Droge den Effekt der zweiten Droge beeinflusst. Diese Überlegung bestätigte sich jedoch



**Abb. 12 – Beispiel einer Kalibrierungsspur eines *Mecp2*<sup>-/-</sup>-Hirnschnitts**

Man erkennt die roGFP1-Ratio nach Einwaschen einer sättigenden DTT-Lösung (10 mM; 3 min). Diese reduzierte das zytosolische roGFP1, weshalb die Fluoreszenz-Antwort als 0 % Oxidation definiert wurde. Nach Wiedererreichen der *Baseline* wurde eine sättigende Dosis H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (5 mM; 3 min) appliziert. Entsprechend der Annahme, dass dies alle zytosolischen roGFP1-Komplexe oxidiert, wurde die Fluoreszenz-Antwort als 100 % oxidiert definiert. [Quelle: modifiziert nach Großer et al. 2012, S.108, mit freundlicher Genehmigung von Elsevier<sup>©</sup>]

nicht, da der Redox-Status während der Kalibrierungsmessungen in aller Regel wieder auf sein Ausgangsniveau zurückkehrte, und zwar unabhängig davon, ob zuerst DTT oder H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gegeben wurde. Beide Lösungen bewirkten ähnliche Antwortmuster der Genotypen, weshalb die Daten gemittelt ausgewertet wurden.

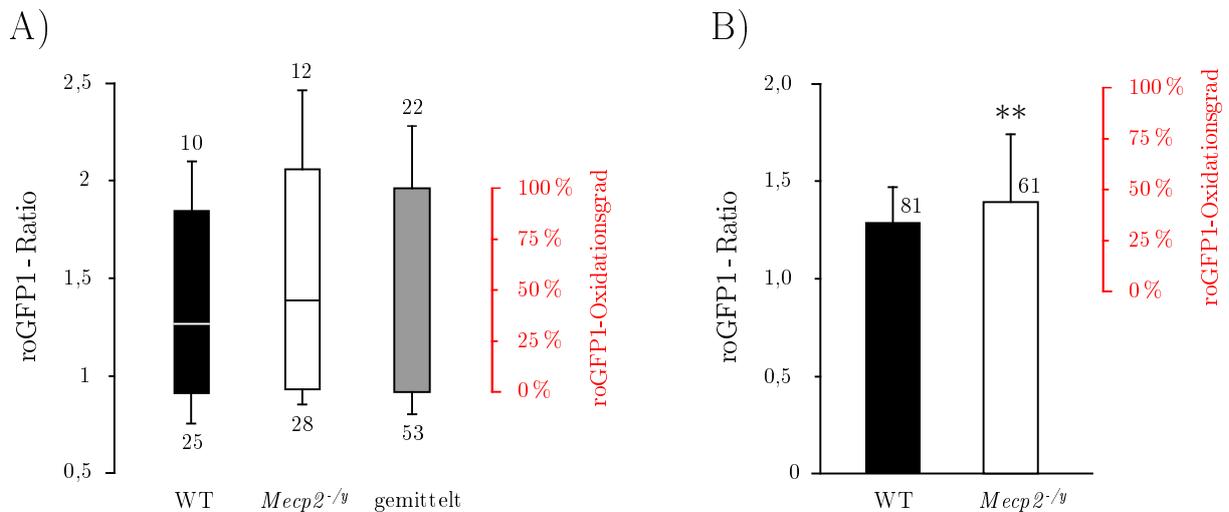
Die Applikation von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und DTT erfolgte in sättigenden Dosen, was dazu führte, dass sich nicht alle untersuchten Zellen vollständig erholten. In diesen Fällen wurde ggf. nur die erste Drogengabe ausgewertet, was die unterschiedlichen Anzahlen (n) der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und DTT-Messungen erklärt. Um roGFP1 definitionsgemäß zu 100 % zu oxidieren, wurden 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3 min) eingewaschen. Hierbei konnten maximale Änderungen der roGFP1-Ratio von  $1,98 \pm 0,36$  (n = 22) beobachtet werden (Abb. 13). Um eine maximale Reduktion von roGFP1 zu erzielen, wurden 10 mM DTT (3 min) appliziert. Das definitionsgemäß 0 % oxidierte roGFP1 zeigte eine Antwort-Ratio von  $0,92 \pm 0,11$ . Damit ergibt sich für die gewählten Versuchsbedingungen ein Antwortbereich der roGFP1-Ratio von 0,81 bis 2,34 (Abb. 13).

### 3.2 Bestimmung der zytosolischen Redox-*Baselines*

Aufgrund seines Reduktionspotentials eignet sich roGFP1 gut zur Untersuchung zytosolischer Redox-Bedingungen. Durch die Bestimmung des ratiometrischen Antwortbereichs von roGFP1 durch DTT und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konnte auch der Ruhe-Redox-Status der Zellen, die Redox-*Baseline*, ermittelt werden.

Grundsätzlich erfolgte die *Baseline*-Bestimmung vor Drogengabe, um den Redox-Status der Zelle unverfälscht feststellen zu können. Eine exaktere Bestimmung des absoluten Redox-Potentials wäre nur mithilfe ergänzender Messverfahren möglich gewesen, zum Beispiel mit parallelen pH-Messungen. Dies war im Rahmen der Experimente allerdings weder möglich noch nötig. Da keine quantitativen Messungen des Redox-Potentials durchgeführt werden sollten, beschränken sich die Aussagen über den Redox-Status der Zellen auf den relativen Oxidationsgrad von roGFP1. Dieser ist ausreichend, um zuverlässige Vergleiche zwischen Zellen, Geweben, Genotypen oder diversen Drogenapplikationen durchzuführen.

Die mittlere *Baseline*-Ratio von WT-Hirnschnitten lag bei  $1,26 \pm 0,18$  (n = 81) und die von *Mecp2*<sup>-/-</sup>-Hirnschnitten bei  $1,38 \pm 0,33$  (n = 61, Abb. 13 B). Es zeigte sich bereits unter Kontrollbedingungen ein signifikanter Unterschied (p = 0,005) zwischen den Redox-Status von WT- und *Mecp2*<sup>-/-</sup>-Hirnschnitten. Unter der Annahme, dass die Fluoreszenz-Antworten linear verlaufen und in Relation zu den vorangegangenen Kalibrierungsmessungen lag roGFP1 im Mittel in WT-Hirnschnitten zu 32,1 % und in *Mecp2*<sup>-/-</sup>-Hirnschnitten zu 43,3 % oxidiert vor (Abb. 13 B). Der Redox-Status der *Mecp2*<sup>-/-</sup>-Hirnschnitte war während der Messungen grundsätzlich höher, was auf eine erhöhte oxidative Belastung des Gewebes hinweist.



**Abb. 13 – roGFP1 - Kalibrierungsmessung und Ermittlung des *Baseline* - Niveaus in *Mecp2*<sup>-/-</sup> - und WT - Hirschnitten**

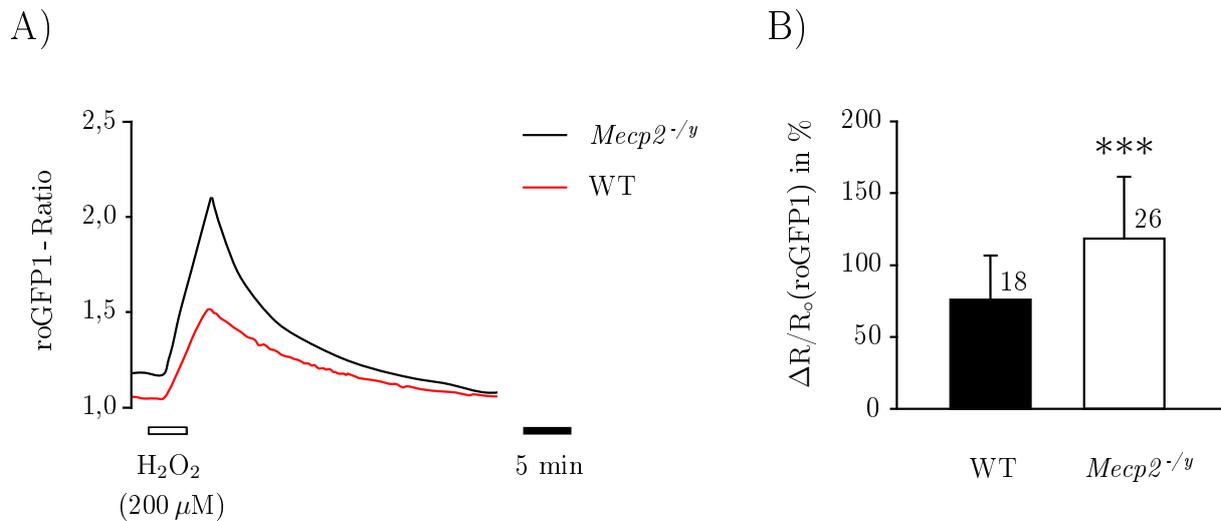
**A)** Dargestellt sind die jeweiligen roGFP1 - Antwort - Ratios von WT - und *Mecp2*<sup>-/-</sup> - Hirschnitten auf maximale Oxidation mittels H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und maximale Reduktion durch DTT, wodurch das Antwortspektrum von roGFP1 festgelegt wurde. Da die Unterschiede zwischen *Mecp2*<sup>-/-</sup> - und WT - Hirschnitten nur geringfügig ausfielen, wurden die Daten für die Kalibrierung gemittelt und daraus der prozentuale Oxidationsgrad für roGFP1 errechnet. Die Anzahl der untersuchten Zellen sind jeweils ober- bzw. unterhalb der Standardabweichung angegeben. In der WT - und *Mecp2*<sup>-/-</sup> - Box zeigt der Median jeweils die durchschnittliche *Baseline* - Ratio an.

**B)** Darstellung der roGFP1 - *Baseline* - Ratio von WT - und *Mecp2*<sup>-/-</sup> - Hirschnitten. Sowohl die roGFP1 - Ratio als auch der daraus abgeleitete Oxidationsgrad sind in *Mecp2*<sup>-/-</sup> - Hirschnitten hochsignifikant erhöht. [Quelle: modifiziert nach Großer et al. 2012, S. 108, mit freundlicher Genehmigung von Elsevier<sup>©</sup>]

### 3.3 Überprüfung der intrazellulären Redox - Systeme

#### 3.3.1 Simulation akuten oxidativen Stresses mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Nach erfolgter Kalibrierung und der Feststellung eines relativ erhöhten Redox - Status in *Mecp2*<sup>-/-</sup> - Hirschnitten war es naheliegend, das intrazelluläre Redox - System weiteren Untersuchungen zu unterziehen. Um einen Eindruck des grundsätzlichen Antwortverhaltens der roGFP1 - Ratio auf oxidative Belastungen beider Genotypen zu bekommen, wurde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in einer Konzentration von 200 μM für 3 min eingewaschen (Abb. 14 A). Durch diese Behandlung verschob sich die roGFP1 - Ratio sowohl in *Mecp2*<sup>-/-</sup> - Hirschnitten (118,7 ± 42,8 %; n = 26) als auch in WT - Hirschnitten (74,0 ± 31,6 %; n = 18; Abb. 14 B) in Richtung oxidativer Bedingungen.



**Abb. 14 – Provokation von oxidativem Stress durch 200  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$**

**A)** Beispielspuren von *Mecp2*<sup>-/-</sup>- und WT-Hirnschnitten vergleichend in einem Diagramm dargestellt. Die Applikation von  $\text{H}_2\text{O}_2$  (200  $\mu\text{M}$ ; 3 min) führte in *Mecp2*<sup>-/-</sup>-Hirnschnitten zu erheblich gesteigerten Fluoreszenz-Antworten von roGFP1, was einen instabileren Redox-Status von *Mecp2*<sup>-/-</sup>-Zellen vermuten lässt.

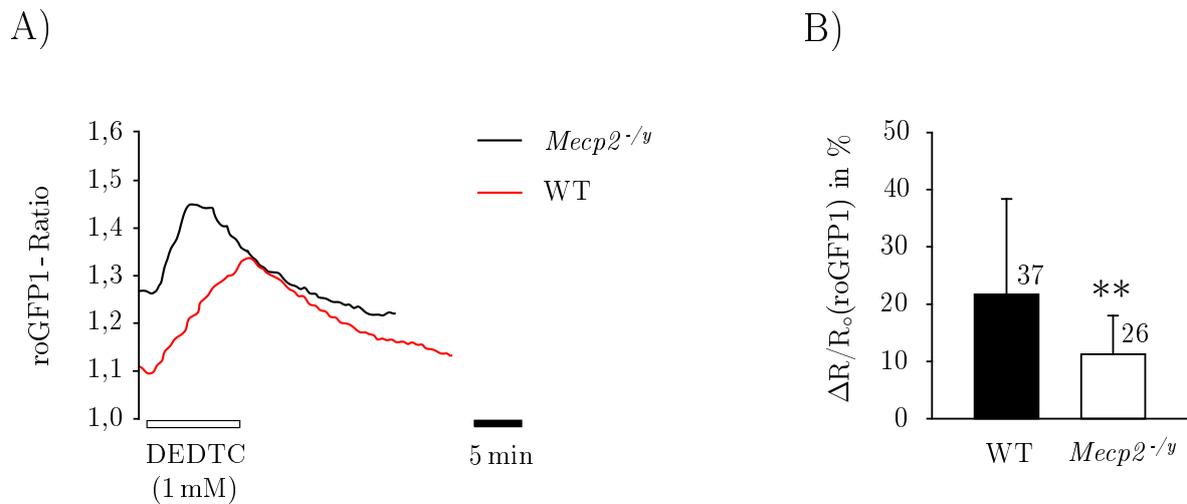
**B)** Prozentuale Darstellung der roGFP1-Ratio nach Applikation von 200  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ . *Mecp2*<sup>-/-</sup>-Hirnschnitte zeigten im Vergleich zu WT-Hirnschnitten eine um durchschnittlich 60 % gesteigerte, d.h. mehr oxidierte, Antwort. [Quelle: modifiziert nach Großer et al. 2012, S. 109, mit freundlicher Genehmigung von Elsevier<sup>©</sup>]

Zwischen den roGFP1-Antworten beider Genotypen zeigten sich hochsignifikante Unterschiede ( $p < 0,001$ ; Abb. 14B). Durchschnittlich lag die roGFP1-Ratio der *Mecp2*<sup>-/-</sup>-Hirnschnitte ca. 60 % höher als in WT-Hirnschnitten, was als Überreaktion auf oxidativen Stress gedeutet wurde. Die Erholung der Hirnschnitte war aber stets vollständig und das *Baseline*-Niveau wurde wieder erreicht. Dies führte zu der Überlegung, dass die zelluläre Redox-Balance von *Mecp2*<sup>-/-</sup>-Zellen instabiler sein könnte bzw. die intrazellulären Redox-Systeme weniger effektiv funktionieren. Um die Ursache der gesteigerten roGFP1-Ratio in *Mecp2*<sup>-/-</sup>-Hirnschnitten zu ermitteln, wurden gezielte Experimente zur genaueren Untersuchung der intrazellulären Schutzenzyme durchgeführt.

### 3.3.2 Inhibition der SOD mit DEDTC

Die SOD ist für die intrazelluläre Dismutation von Superoxid-Anion ( $\bullet\text{O}_2^-$ ) in  $\text{H}_2\text{O}_2$  und  $\text{O}_2$  zuständig und stellt somit das initiale Enzym beim ROS-Abbau dar (siehe Kap. 1.4, Abb. 4). Die SOD wurde mit Diethyldithiocarbamat (DEDTC; 1 mM; 10 min) inhibiert.

Infolge dessen kam es zur vermehrten Akkumulation von  $\bullet\text{O}_2^-$ , was zu einem Anstieg der roGFP1-Ratio beider Genotypen in Richtung gesteigerter oxidativer Bedingungen führ-



### Abb. 15 – Inhibition der SOD mit DEDTC

**A)** Die Inhibition der SOD mit DEDTC (1 mM; 10 min) führte in WT-Zellen zu einer intensiven Verschiebung der roGFP1-Ratio in Richtung oxidativer Bedingungen. Die relative *Mecp2<sup>-/-y</sup>*-Antwort fiel, verglichen mit der relativen WT-Antwort, geringer aus.

**B)** Darstellung der prozentualen Veränderung der roGFP1-Ratio bezogen auf die jeweilige *Baseline*-Ratio während der SOD-Inhibition. [Quelle: modifiziert nach Großer et al. 2012, S. 109, mit freundlicher Genehmigung von Elsevier<sup>©</sup>]

te (Abb. 15 A). Dabei konnte beobachtet werden, dass der relative Anstieg innerhalb der *Mecp2<sup>-/-y</sup>*-Hirnschnitte mit  $11,4 \pm 7,0\%$  ( $n=26$ ) deutlich geringer ausfiel, als in WT-Hirnschnitten, deren Oxidationsniveau durchschnittlich auf  $21,7 \pm 16,7\%$  ( $n=37$ ) stieg (Abb. 15 B). Der Unterschied war in den vorliegenden Daten hochsignifikant ( $p=0,004$ ). Es ist daher anzunehmen, dass die Funktionsfähigkeit der SOD durch die MeCP2-Defizienz beeinträchtigt bzw. die Expression vermindert ist. Nach Umwandlung von  $\bullet\text{O}_2^-$  zu  $\text{H}_2\text{O}_2$  durch die SOD, wird  $\text{H}_2\text{O}_2$  durch die zwei parallel arbeitenden Schutzenzyme Katalase und Glutathionperoxidase neutralisiert (siehe Kap. 1.4, Abb. 4). Die gezielte Beeinflussung dieser Schutzenzyme sollte einen weiteren Einblick in die Regulationsmechanismen der intrazellulären Redox-Homöostase gewähren.

### 3.3.3 Inhibition der Katalase und des Glutathionsystems

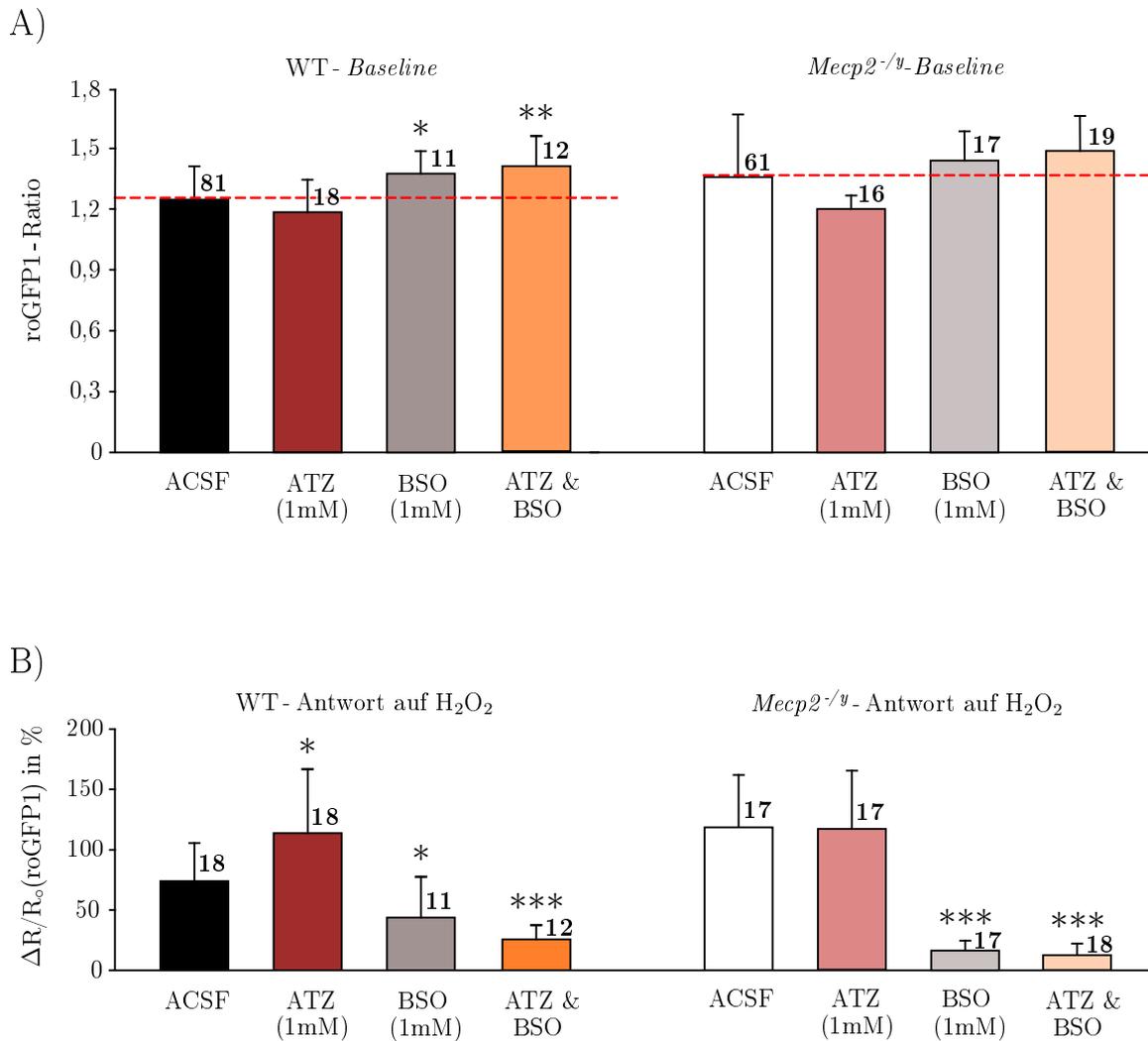
Um die beiden Enzymsysteme jeweils separat beurteilen zu können, wurden Buthioninsulfoximin (BSO) zur Inhibition des Glutathionsystems und 3-Amino-1,2,4-triazol (ATZ) zur Inhibition der Katalase genutzt (siehe Kap. 1.4, Abb. 4). Die Akutbehandlung der Hirnschnitte mit BSO (1 mM; 3 min) und ATZ (1 mM; 3 min) zeigte keine Änderungen des zellulären Redox-Status. Deshalb wurden die Hirnschnitte über Nacht mit den Substanzen inkubiert, um die Einwirkzeit zu verlängern.

Die mit 1 mM ATZ inkubierten Hirnschnitte zeigten weder in der WT-Gruppe noch in der *Mecp2*<sup>-/-</sup>-Gruppe einen signifikanten *Baseline*-Unterschied gegenüber den unbehandelten Hirnschnitten (Abb. 16 A). Erst die Gabe von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (200 μM; 3 min) provozierte bei ATZ-behandelten WT-Hirnschnitten, im Vergleich zu unbehandelten WT-Hirnschnitten, eine deutliche Antwort ( $113,3 \pm 45,1\%$ ; n = 18; p = 0,012; Abb. 16 B). Für *Mecp2*<sup>-/-</sup>-Hirnschnitte galt dies nicht. Hier war kein Unterschied zwischen inkubierten und unbehandelten Hirnschnitten bezüglich des Antwortverhaltens auf H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> auszumachen ( $116,8 \pm 49,7\%$ ; n = 13; Abb. 16 B).

Die Inhibition des Glutathionsystems sollte Aufschluss über die Arbeitsweise der Katalase geben. Nach nächtlicher Inkubation mit 1 mM BSO zeigte sich nur in WT-Hirnschnitten eine signifikante Verschiebung des *Baseline*-Niveaus hin zu erhöhten oxidativen Verhältnissen. Diese entsprachen in etwa der normalen roGFP1-*Baseline*-Ratio unbehandelter *Mecp2*<sup>-/-</sup>-Hirnschnitte ( $1,39 \pm 0,12$ ; n = 11; p = 0,019; Abb. 16 A). Unter BSO-Behandlung provozierte akuter oxidativer Stress durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (200 μM; 3 min) in beiden Genotypen signifikant verminderte Antworten im Vergleich zu den jeweils unbehandelten Genotypen (WT:  $43,2 \pm 34,4\%$ ; n = 11; p = 0,02; *Mecp2*<sup>-/-</sup>:  $15,8 \pm 7,6\%$ ; n = 17; p < 0,001; Abb. 16 B).

Wurden die Hirnschnitte mit jeweils 1 mM BSO und ATZ parallel über Nacht inkubiert, entsprachen die *Baseline*-Niveaus ungefähr den Niveaus nach alleiniger BSO-Inkubation (Abb. 16 A). Die roGFP1-*Baseline*-Ratios der WT-Hirnschnitte glichen sich den Niveaus der *Mecp2*<sup>-/-</sup>-*Baseline*-Ratios an ( $1,43 \pm 0,14$ ; n = 12; p = 0,002; Abb. 16 A). Die roGFP1-*Baseline*-Ratios der *Mecp2*<sup>-/-</sup>-Hirnschnitte blieben unverändert (*Mecp2*<sup>-/-</sup>:  $1,49 \pm 0,19$ ; n = 19; Abb. 16 A).

Die prozentualen roGFP1-Antworten ATZ- und BSO-inkubierter Hirnschnitten auf die Behandlung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (200 μM; 3 min) fiel sowohl in WT-Hirnschnitten ( $24,5 \pm 11,4\%$ ; n = 12), als auch in *Mecp2*<sup>-/-</sup>-Hirnschnitten ( $10,5 \pm 8,0\%$ ; n = 18) signifikant niedriger aus (p < 0,001) als die entsprechenden H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Antworten unbehandelter oder ausschließlich mit BSO behandelter Hirnschnitte der jeweiligen Genotypen (Abb. 16 B).

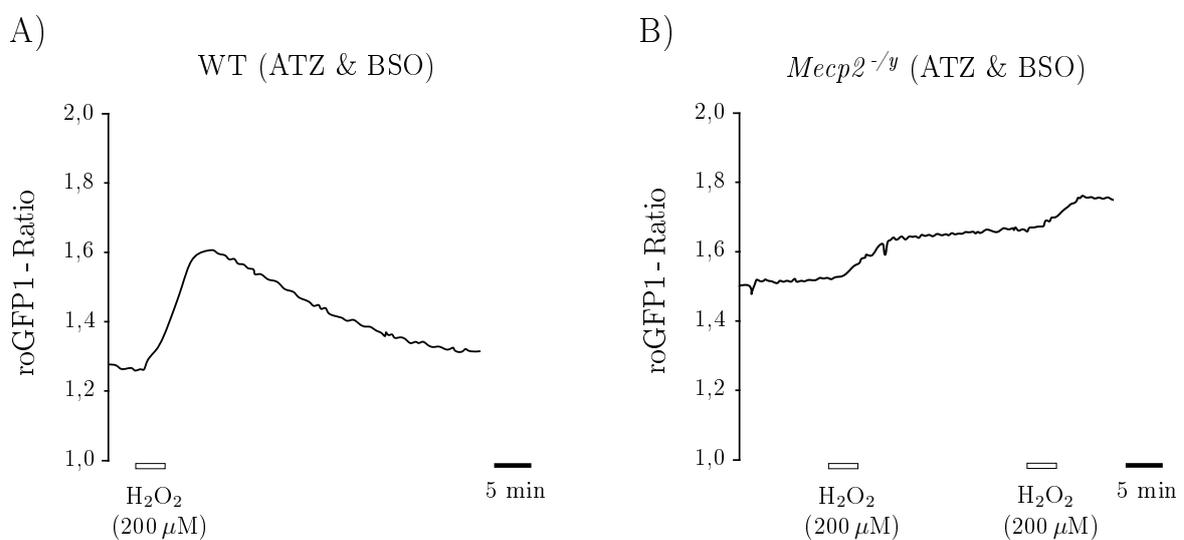


### Abb. 16 – Inkubation mit ATZ und BSO

**A)** Die Inkubation der Hirnschnitte mit 1 mM ATZ über Nacht führte weder in *Mecp2*<sup>-/-</sup>- noch in WT-Hirnschnitten zu signifikanten Unterschieden der roGFP1- *Baseline* - Ratios. Als Referenz wurden unbehandelte Hirnschnitte hinzugezogen. Die Inhibition des Glutathionsystems durch die Inkubation mit 1 mM BSO über Nacht steigerte das *Baseline* - Niveau der WT-Hirnschnitte signifikant, während in *Mecp2*<sup>-/-</sup>-Hirnschnitten keine signifikante Veränderung registrierbar war. Das *Baseline* - Niveau der WT-Hirnschnitte näherte sich unter BSO-Inkubation dem normalen *Baseline* - Niveau der *Mecp2*<sup>-/-</sup>-Hirnschnitte an.

**B)** Mit ATZ behandelte WT-Hirnschnitte zeigten infolge der Applikation von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (200 μM; 3 min) eine signifikante Erhöhung der prozentualen roGFP1-Ratio in Richtung oxidativer Bedingungen. Bei *Mecp2*<sup>-/-</sup>-Hirnschnitten konnte kein Unterschied zwischen behandeltem und unbehandeltem Gewebe ausgemacht werden. Die Provokation akuten oxidativen Stresses mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (200 μM; 3 min) führte in beiden Genotypen zu verminderten Antworten, verglichen mit unbehandelten *Mecp2*<sup>-/-</sup>-Hirnschnitten. [Quelle: modifiziert nach Großer et al. 2012, S. 110, mit freundlicher Genehmigung von Elsevier<sup>©</sup>]

Es konnte gezeigt werden, dass sich die roGFP1-Ratios der WT-Hirnschnitte trotz Inkubation mit BSO und ATZ sowohl von Einzelgaben als auch von repetitiven Behandlungen mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  erholen und sich wieder auf das ursprüngliche *Baseline*-Niveau einstellen (Abb. 17 A). *Mecp2*<sup>-/-</sup>-Hirnschnitte konnten derartigen oxidativen Stress nicht kompensieren. Repetitive  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Gaben führten zu irreversiblen Verschiebungen der roGFP1-Ratio und schienen sich ohne zelluläre Gegenregulation zu addieren (Abb. 17 B). Es ist anzunehmen, dass die *Mecp2*<sup>-/-</sup>-Hirnschnitte durch die kombinierte Inhibition von Katalase und Glutathionperoxidase ihre Fähigkeit zur Regulation des zellulären Redox-Status verloren haben, was auf eine schwere Beeinträchtigung der zellulären Vitalität deutet.



**Abb. 17 –  $\text{H}_2\text{O}_2$ - Applikation nach Inkubation mit ATZ und BSO**

**A)** WT-Hirnschnitte, die mit ATZ und mit BSO (jeweils 1 mM) über Nacht inkubiert wurden, zeigten nach der Applikation von 200  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  einen langsamen Anstieg der roGFP1-Ratio. Nach Erreichen des Peaks erholten sich die Zellen wieder und kehrten langsam zu ihrem ursprünglichen Niveau zurück. Die Antwort fiel wesentlich geringer aus als bei unbehandelten Hirnschnitten.

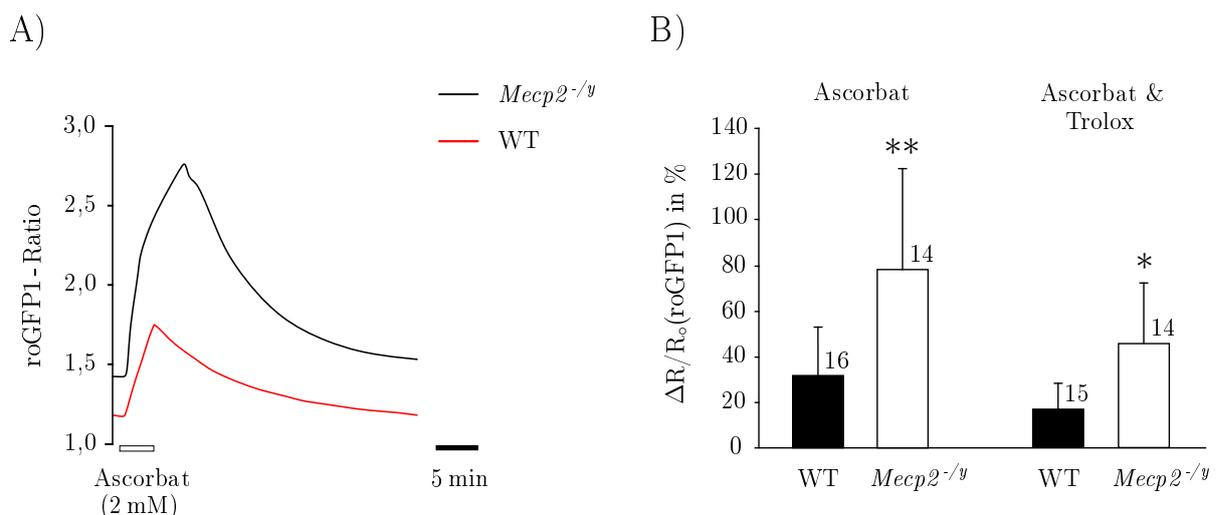
**B)** *Mecp2*<sup>-/-</sup>-Hirnschnitte waren durch die zweifache Inhibition ihrer Schutzenzyme nicht mehr in der Lage, die Belastung durch  $\text{H}_2\text{O}_2$  zu kompensieren. Jede  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Gabe hob die roGFP1-Ratio auf ein höheres Niveau, das von der Zelle nicht mehr auf das Ausgangsniveau zurück reguliert werden konnte. [Quelle: modifiziert nach Großer et al. 2012, S. 110, mit freundlicher Genehmigung von Elsevier<sup>©</sup>]

### 3.3.4 Modulation der Redox-Verhältnisse durch Antioxidantien

**Ascorbat** ist ein nichtenzymatisches Antioxidans, das als Protonendonator in der Lage ist  $\bullet\text{O}_2^-$  zu reduzieren, wodurch  $\text{H}_2\text{O}_2$  entsteht (Padayatty et al. 2003). Somit erfüllt Ascorbat eine ähnliche Funktion wie die SOD. Durch roGFP1 werden sowohl  $\bullet\text{O}_2^-$  als auch  $\text{H}_2\text{O}_2$  detektiert. Letzteres stellt allerdings die wesentlich stabilere Verbindung dar und wird deshalb eindeutiger identifiziert (Funke et al. 2011)(siehe Kap. 1.4, Abb. 4).

Die Gabe von 2 mM Ascorbat über 3 min diente dazu, die vermutete Dysfunktion der SOD in *Mecp2<sup>-y</sup>*-Hirnschnitten differenzierter zu untersuchen. Wie erwartet, steigerte die kurzzeitige Gabe die roGFP1-Ratio eminent. Die prozentualen roGFP1-Antworten der *Mecp2<sup>-y</sup>*-Hirnschnitte ( $76,9 \pm 45,5\%$ ;  $n = 14$ ) lagen hierbei hochsignifikant ( $p < 0,001$ ) über denen der WT-Hirnschnitte ( $31,1 \pm 22,3\%$ ;  $n = 16$ ; Abb. 18).

**Trolox** ist ein wasserlösliches Vitamin E-Derivat. Da es stark antioxidativ wirksam ist, wurde mithilfe von Trolox versucht, die intrazelluläre roGFP1-Baseline-Ratio zu senken.



**Abb. 18 – Externe Modulation der Redox-Verhältnisse mit Ascorbat und der Parallelapplikation von Ascorbat und Trolox**

**A)** Die Applikation von Ascorbat (2 mM; 3 min) führte offenbar dazu, dass in beiden Genotypen instabiles  $\bullet\text{O}_2^-$  in das stabilere und besser detektierbare  $\text{H}_2\text{O}_2$  umgewandelt wurde. Die roGFP1-Antworten fielen in *Mecp2<sup>-y</sup>*-Hirnschnitten hochsignifikant stärker aus.

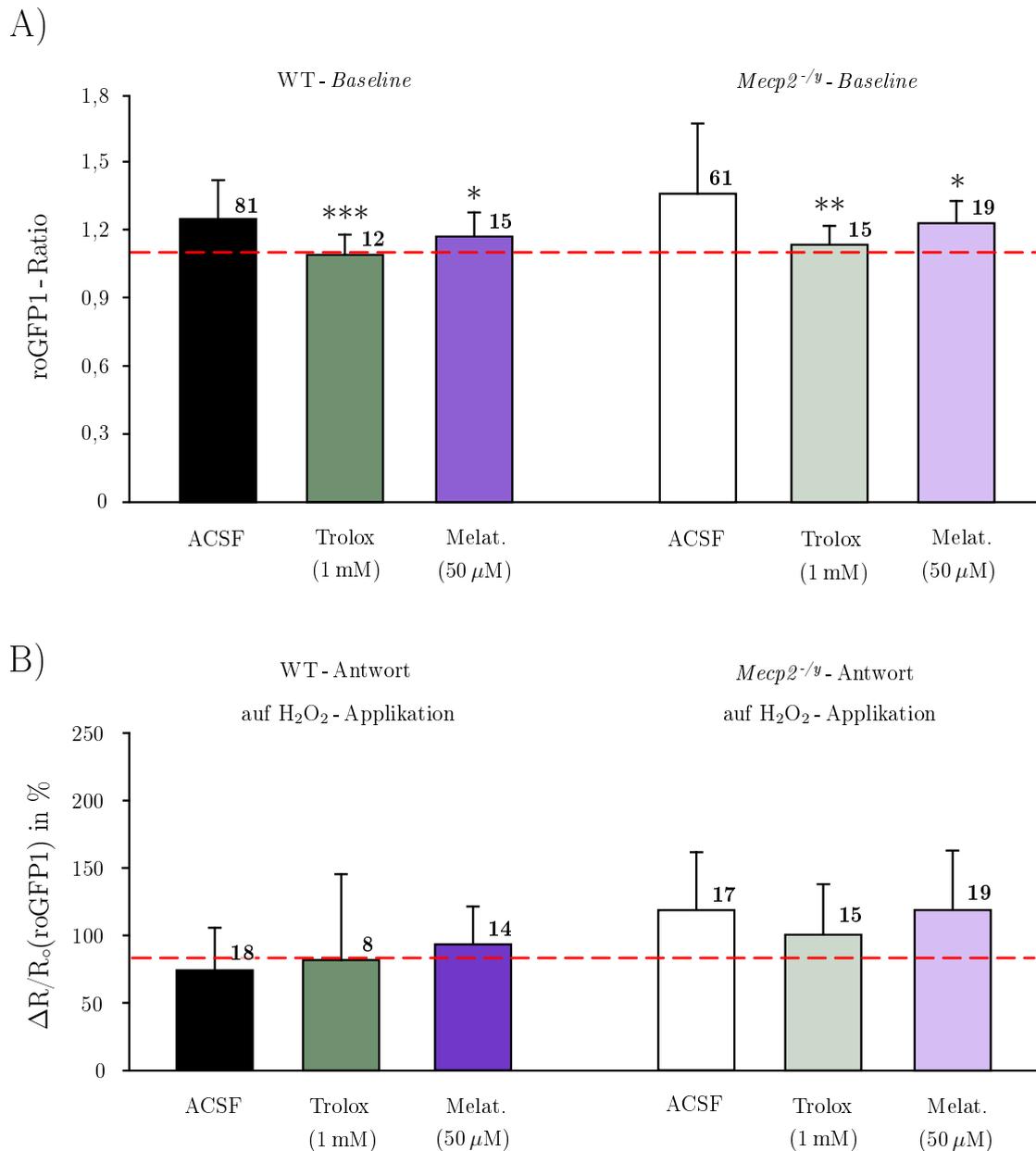
**B)** Die gleichzeitige Gabe von 1 mM Trolox und 2 mM Ascorbat (3 min) konnte die Antwortintensität von roGFP1 in beiden Genotypen etwas verringern. Der Antwortgradient zwischen den beiden Genotypen blieb aber weiterhin bestehen. [Quelle: modifiziert nach Großer et al. 2012, S. 109, mit freundlicher Genehmigung von Elsevier<sup>©</sup>]

Während der ersten Experimente wurde die akute Behandlung der Hirnschnitte mit 1 mM Trolox über 15 min vorgenommen ( $n = 8$ ). Die alleinige akute Troloxgabe führte zu keinem Effekt. Allerdings zeigte die Parallelapplikation von 1 mM Trolox mit 1 mM Ascorbat (3 min), dass Trolox offenbar in der Lage ist, die starke roGFP1-Antwort auf Ascorbat in WT-Hirnschnitten um 46 % ( $16,8 \pm 12,1$ ;  $n = 15$ ;  $p = 0,036$ ) und in *Mecp2<sup>-/-</sup>*-Hirnschnitten um 40,6 % ( $45,7 \pm 27,3$  %;  $n = 14$ ;  $p = 0,037$ , Abb. 18 B) abzuschwächen. Zwischen beiden Genotypen blieb der Unterschied bezüglich der Antwortintensitäten auf Ascorbat auch während der Parallelgabe von Trolox bestehen.

Wie oben beschrieben zeigte die Akutgabe von Trolox, abgesehen von der Kombination mit Ascorbat, keinen Effekt. Deshalb wurden die Hirnschnitte über Nacht mit Trolox (1 mM) inkubiert, um zu überprüfen, ob Trolox einer längeren Einwirkzeit bedarf. Dies führte zu einer signifikante Abnahme der roGFP1-*Baseline*-Ratio in Relation zu den unbehandelten Hirnschnitten der jeweiligen Genotypen von 18,8 % ( $1,12 \pm 0,09$ ;  $p = 0,004$ ;  $n = 15$ ) in *Mecp2<sup>-/-</sup>*-Hirnschnitten und von 15,1 % ( $1,07 \pm 0,09$ ;  $p < 0,001$ ;  $n = 12$ ) in WT-Hirnschnitten. Die *Baseline* der *Mecp2<sup>-/-</sup>*-Hirnschnitte pegelte sich unter Troloxbehandlung in etwa auf dem Niveau Trolox-behandelter WT-Hirnschnitte ein (Abb. 19 A; vgl.: rot gestrichelte Linie). Somit konnte der *Baseline*-Unterschied zwischen den Genotypen durch die Trolox-Behandlung aufgehoben werden.

Die Reizung Trolox-inkubierter Hirnschnitte mit  $H_2O_2$  ( $200 \mu M$ ; 3 min) führte zu einer Verminderung der Antwortintensität in *Mecp2<sup>-/-</sup>*-Hirnschnitten. WT-Hirnschnitte zeigten einen Anstieg der roGFP1-Ratio um  $80,1 \pm 63,4$  % ( $n = 8$ ) und *Mecp2<sup>-/-</sup>*-Hirnschnitte von  $101,8 \pm 36,5$  % ( $n = 15$ ) (Abb. 19 B). Somit fiel auch bei diesen Experimenten der zwischen unbehandelten Hirnschnitten beider Genotypen bestehende Antwortgradient auf oxidativen Stress mit  $H_2O_2$  weg (Abb. 19 B; vgl.: rot gestrichelte Linie).

**Melatonin** (N-acetyl-5-methoxytryptamin) gilt als eines der stärksten Antioxidantien, da es in der Lage ist bis zu zehn verschiedene ROS zeitgleich zu neutralisieren (Hodgkin 1959). Um die Wirkung von Melatonin auf die roGFP1-*Baseline* in WT- und *Mecp2<sup>-/-</sup>*-Zellen zu untersuchen, wurden Hirnschnitte beider Genotypen über Nacht mit  $50 \mu M$  Melatonin inkubiert. Während der anschließenden Messungen konnte eine leichte Absenkung der roGFP1-*Baseline* in beiden Genotypen beobachtet werden. In *Mecp2<sup>-/-</sup>*-Hirnschnitten sank die roGFP1-*Baseline* um durchschnittlich 10,9 % ( $1,23 \pm 0,11$ ,  $n = 19$ ,  $p = 0,045$ ), in WT-Hirnschnitten um 7,9 % ( $1,16 \pm 0,11$ ,  $n = 19$ ,  $p = 0,043$  Abb. 19 A). Die roGFP1-Antworten der Hirnschnitte auf die Applikation von  $H_2O_2$  ( $200 \mu M$ ; 3 min) änderten sich durch die Inkubation mit Melatonin jedoch nicht (Abb. 19 B).



**Abb. 19 – Externe Modulation der Redox-Verhältnisse durch Inkubation mit Trolox und Melatonin**

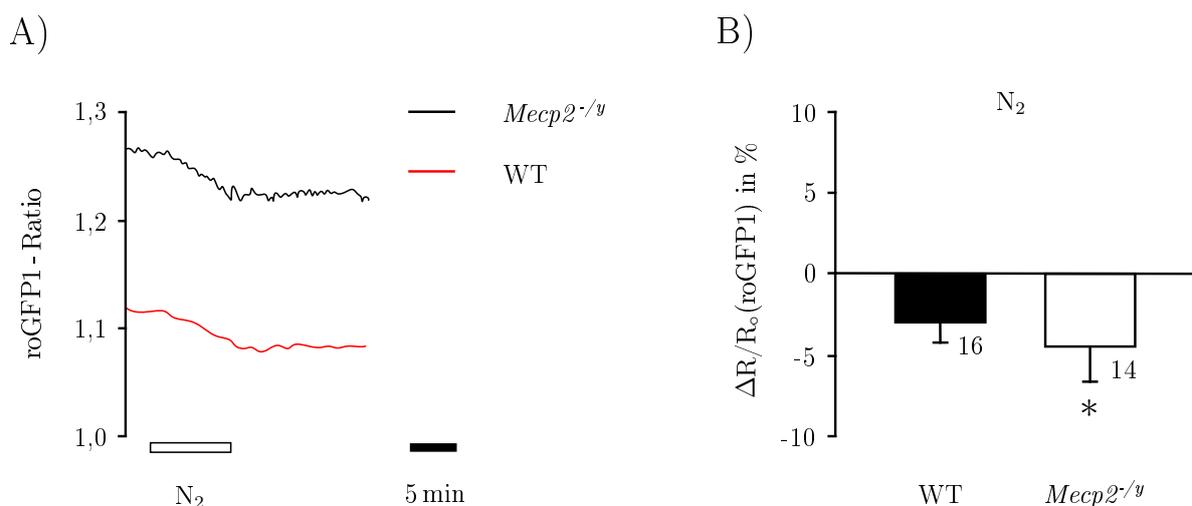
**A)** Die Inkubation der Hirnschnitte über Nacht mit Trolox (1 mM) oder Melatonin (50 μM) führte zu einer Absenkung der roGFP1-*Baselines* in beiden Genotypen. Die Behandlung der Hirnschnitte mit Trolox hob den *Baseline*-Unterschied zwischen *Mecp2<sup>-/-</sup>*- und WT-Hirnschnitten auf (rot gestrichelte Linie).

**B)** Die roGFP1-Antworten auf oxidativen Stress mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (200 μM; 3 min) wurden durch die Inkubation mit Trolox oder Melatonin nur geringfügig beeinflusst. Lediglich bei *Mecp2<sup>-/-</sup>*-Hirnschnitten führte Trolox zu einer leichten Dämpfung. [Quelle: modifiziert nach Großer et al. 2012, S. 110, mit freundlicher Genehmigung von Elsevier<sup>©</sup>]

### 3.4 Störung der mitochondrialen Funktion

Die folgenden Experimente widmeten sich der Blockade einzelner Atmungskettenkomplexe. Es sollte festgestellt werden, welchen Einfluss die gezielte Beeinträchtigung der mitochondrialen Funktion und der damit verbundenen veränderten endogenen ROS-Bildung auf den zytosolischen Redox-Status von *Mecp2<sup>-/-</sup>*- und WT-Hirnschnitten hat. Sämtliche Manöver zur Modulation der endogenen ROS-Bildung oder des ROS-Abbaus führten zu deutlich kleineren Änderungen der roGFP1-Ratio als die direkte Applikation von starken Oxidantien ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) oder Reduktionsmitteln (DTT).

**Stickstoff** ( $\text{N}_2$ ) wurde anstelle von  $\text{O}_2$  zur Begasung der ACSF-Lösung verwendet, um ein sauerstoffarmes Zellmilieu zu erzeugen. Zur Untersuchung der intrazellulären Redox-Status unter anoxischen Bedingungen wurde ACSF mit einem Gemisch aus  $\text{N}_2/\text{CO}_2$  (95%/5%) begast und mit 1 mM Na-Sulfit versetzt. Na-Sulfit ist in der Lage verbliebenen Sauerstoff aus der Lösung zu binden und so den Schweregrad der induzierten Hypoxie zu maximieren (Macagno 1980). Mit dieser sauerstoffarmen Lösung wurden sowohl WT- als auch *Mecp2<sup>-/-</sup>*-Hirnschnitte für 8 min behandelt, um eine Anoxie zu induzieren.



**Abb. 20 – Störung des mitochondrialen Metabolismus durch  $\text{N}_2$**

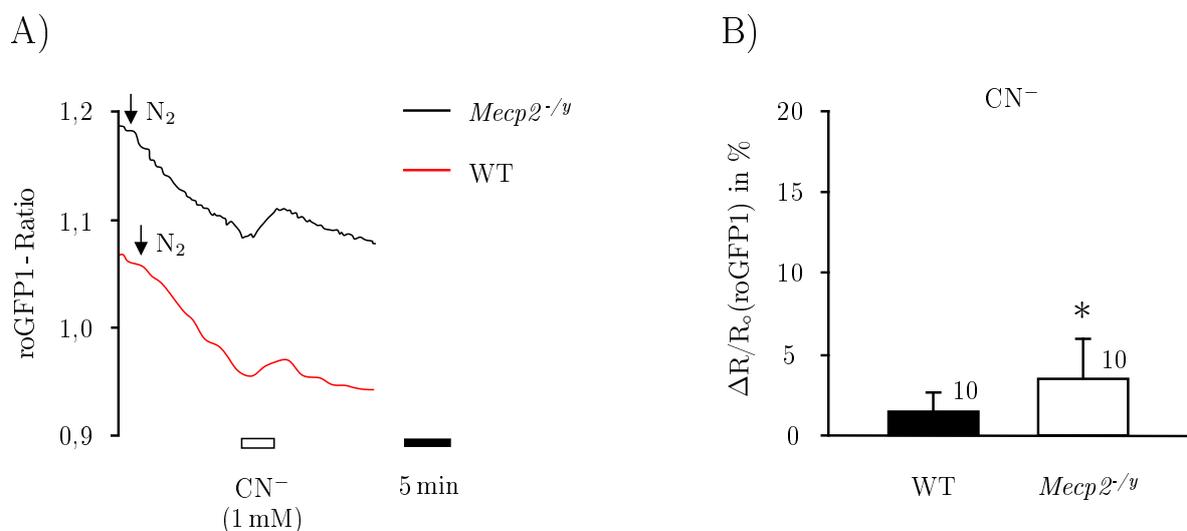
**A)** Beispielspur zur Induktion einer schwerwiegenden Hypoxie durch Sauerstoffentzug mit  $\text{N}_2/\text{CO}_2$ -begastem ACSF und dem Zusatz des  $\text{O}_2$ -Fängers Na-Sulfit (1 mM; 8 min). Der Abfall der roGFP1-Ratio war in *Mecp2<sup>-/-</sup>*-Hirnschnitten signifikant stärker.

**B)** Durch die induzierte Anoxie verschiebt sich in beiden Genotypen die prozentuale roGFP1-Ratio in Richtung reduzierter Redox-Verhältnisse. Während die Antwort der WT-Hirnschnitte eher moderat ausfiel, zeigten *Mecp2<sup>-/-</sup>*-Hirnschnitte eine signifikante *Baseline*-Verschiebung. [Quelle: modifiziert nach Großer et al. 2012, S. 111, mit freundlicher Genehmigung von Elsevier<sup>©</sup>]

In beiden Genotypen führte diese Behandlung zu einem Abfall der roGFP1-Ratio, da die Mitochondrien ohne kontinuierliche  $O_2$ -Zufuhr weder ATP noch ROS generieren können (Abb. 20 A). Der Abfall der *Mecp2*<sup>-/-</sup>-roGFP1-Ratio um knapp  $4,9 \pm 2,3\%$  ( $n = 11$ ) fiel – verglichen mit dem Abfall der roGFP1-Ratio in WT-Hirnschnitten um  $3,2 \pm 1,4\%$  ( $n = 15$ ) – signifikant stärker aus ( $p = 0,025$ ; Abb. 20 B).

Dies bestätigte die Annahme, dass die *Mecp2*<sup>-/-</sup>-Hirnschnitte grundsätzlich erhöhten oxidativen Bedingungen ausgesetzt sind und dass *Mecp2*<sup>-/-</sup>-Mitochondrien vermutlich verstärkt ROS freisetzen. Nach der Reoxygenierung kehrten die *Baselines* beider Genotypen nur sehr langsam wieder auf ihr Ausgangsniveau zurück (Abb. 20 A).

**Cyanide** ( $CN^-$ ) sind, wie Azide, Kohlenmonoxid und Schwefelwasserstoff, in der Lage, die  $O_2$ -Bindungsstelle im aktiven Zentrum der Cytochrom-c-Oxidase (Komplex IV der Atmungskette) zu inhibieren (siehe Kap. 1.4, Abb. 4). Dadurch wird der Elektronenfluss zwischen den Komplexen unterbrochen und die Zellatmung kommt zum Erliegen (Stannard und Horecker 1948). Hirnschnitte beider Genotypen wurden mit einer  $CN^-$ -Lösung (1 mM; 3 min) behandelt um die Atmungskettenfunktion zu beeinträchtigen. Allerdings führte dies zu sehr uneinheitlichen Antworten.



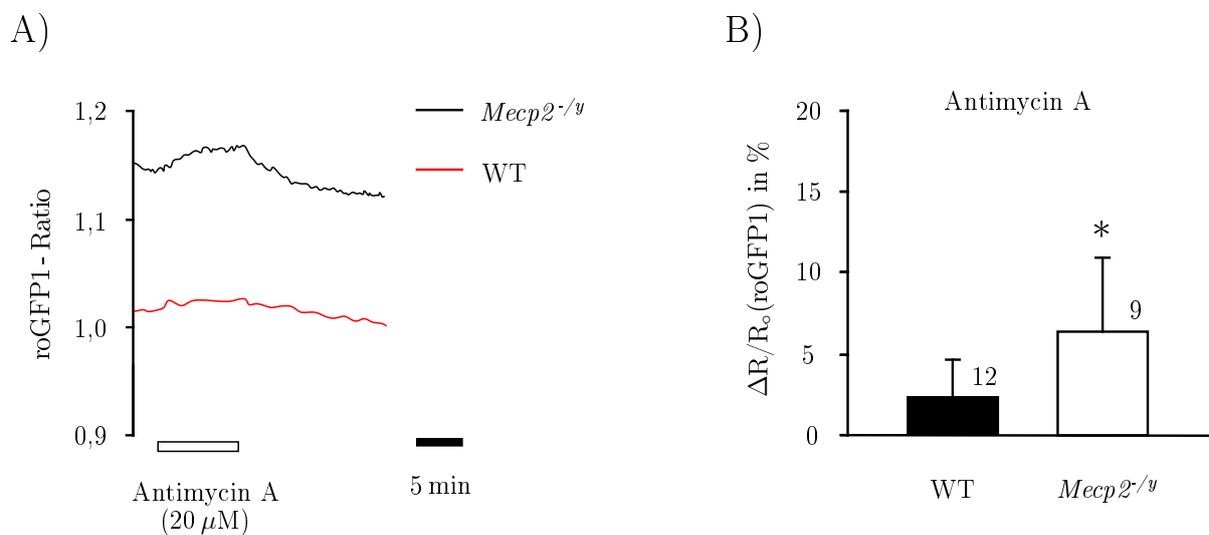
**Abb. 21 – Störung des mitochondrialen Metabolismus durch  $CN^-$**

**A)** Um einheitliche roGFP1-Antworten auf die Behandlung mit  $CN^-$  zu erhalten, wurde zuvor eine hypoxische Episode mit  $N_2$  (10 min) induziert. Die Pfeile markieren den Beginn der  $N_2$ -induzierten Hypoxie.

**B)** Die Verabreichung von  $CN^-$  (1 mM; 3 min) im Anschluss an die hypoxische Episode führte kurzzeitig zu einer Verschiebung der prozentualen roGFP1-Ratio in Richtung oxidativer Verhältnisse. In *Mecp2*<sup>-/-</sup>-Hirnschnitten fiel diese deutlicher aus als in WT-Hirnschnitten. [Quelle: modifiziert nach Großer et al. 2012, S. 111, mit freundlicher Genehmigung von Elsevier<sup>©</sup>]

Als zugrunde liegende Ursache dieser inhomogenen Antworten wurden zwei Möglichkeiten diskutiert. Zum einen kam eine direkte Interaktionen zwischen  $\text{CN}^-$  und den SH-Gruppen von roGFP1 in Betracht, was zu einer direkten Beeinflussung der roGFP1-Ratios geführt hätte (Jocelyn 1972). Zum anderen erschien auch die Maskierung der  $\text{CN}^-$ -Antworten durch einen verhältnismäßig zu hohen zytosolischen Redox-Status als plausible Erklärung. Deshalb wurde eine Versuchsreihe unternommen, in der  $\text{CN}^-$  erst nach transients Hypoxie durch Sauerstoffentzug ( $\text{N}_2/\text{CO}_2$ -begastes ACSF versetzt mit 1 mM Na-Sulfit; 10 min) appliziert wurde. Unter diesen stärker reduzierten intrazellulären Bedingungen führte die Gabe von  $\text{CN}^-$  (1 mM; 3 min) tatsächlich zu einer leichten Steigerung der roGFP1-Ratio (Abb. 21 A). Die prozentuale roGFP1-Antwort fiel in *Mecp2*<sup>-/-</sup>-Hirnschnitten ( $3,5 \pm 2,4\%$ ,  $n = 10$ ) deutlicher aus, als in WT-Hirnschnitten ( $1,5 \pm 1,1\%$ ,  $n = 10$ ,  $p = 0,023$ , Abb. 21 B). Dies spricht für eine erhöhte Anfälligkeit der *Mecp2*<sup>-/-</sup>-Hirnschnitte gegenüber mitochondrialen Beeinträchtigungen.

**Antimycin A** ist ein Antibiotikum, das von Streptomyceten produziert wird. Es bindet an der Ubichinon-Bindestelle der Cytochrom-c-Reduktase (Komplex III) und blockiert somit die Elektronenübertragung von Coenzym Q auf Cytochrom c (Potter und Reif 1952; Huang et al. 2005)(siehe Kap 1.4, Abb. 4). Dadurch wird die Zellatmung gehemmt, weil die ATP-Synthase (Komplex V) sekundär zum Erliegen kommt.



**Abb. 22 – Störung des mitochondrialen Metabolismus durch Antimycin A**

**A)** Die pharmakologische Inhibition von Komplex III durch Antimycin (20  $\mu\text{M}$ ; 10 min) führte vor allem in *Mecp2*<sup>-/-</sup>-Hirnschnitten zu einem deutlichen Anstieg der roGFP1-Ratio.

**B)** In *Mecp2*<sup>-/-</sup>-Hirnschnitten verschob sich die prozentuale roGFP1-Ratio in Richtung oxidativer Bedingungen. WT-Hirnschnitte zeigten nur einen geringfügigen Anstieg. [Quelle: modifiziert nach Großer et al. 2012, S. 111, mit freundlicher Genehmigung von Elsevier<sup>©</sup>]

Da der Elektronentransport unterbrochen wird, kommt es zu einer Elektronenakkumulation und zur Reduktion sämtlicher Atmungskettenkomplexe vor dem Block. Die Komponenten dahinter liegen, wie oben bereits beschrieben, oxidiert vor (siehe Kap. 1.4, Abb. 4).

Um die Befunde der  $\text{CN}^-$  - Versuche noch einmal zu validieren und um den schwer interpretierbaren roGFP1 - Antworten durch  $\text{CN}^-$  aus dem Weg zu gehen, wurde eine weitere Versuchsreihe mit Antimycin A ( $20\mu\text{M}$ ; 10 min) unternommen. Die Behandlung zeigte in beiden Genotypen einen Anstieg der roGFP1 - Ratio (Abb. 22 A). In *Mecp2<sup>-/-</sup>* - Hirnschnitten war der Anstieg mit  $6,4 \pm 4,7\%$  ( $n = 9$ ) deutlicher als in WT - Hirnschnitten ( $2,3 \pm 2,3\%$ ,  $n = 12$ ;  $p = 0,016$ ; Abb. 22 B). Dieses Ergebnis erhärtete den Verdacht, dass die Blockade der *Mecp2<sup>-/-</sup>* - Mitochondrien zu einer gesteigerten ROS - Entstehung führt und der zytosolische Redox - Status grundsätzlich stärker oxidiert vorliegt, da die *Mecp2<sup>-/-</sup>* - Hirnschnitte die Antimycin - Behandlung nur schlecht kompensieren konnten. Zugleich bestätigte dies die  $\text{CN}^-$  - Ergebnisse, die bereits eine vulnerable Redox - Balance der *Mecp2<sup>-/-</sup>* - Hirnschnitte suggerierten.

## 4 Diskussion

### 4.1 Erhöhte *Baseline* - Level in *Mecp2*<sup>-/*y*</sup> - Schnittkulturen

Bereits mehrere Publikationen konnten darstellen, dass das Rett-Syndrom mit erhöhtem oxidativen Stress verbunden ist, da indirekte Hinweise einer vermehrten ROS-Entstehung gefunden wurden (de Felice et al. 2012; Müller und Can 2014) (siehe Kapitel 1.2.1). Allerdings ist es bisher weder gelungen, die zugrunde liegende Ursache zu finden, noch die erhöhten Redox-Level direkt dynamisch darzustellen.

Anfang der 1990er Jahre wurden morphologische Auffälligkeiten der Mitochondrien (Armstrong 1992) sowie erhöhte Blut- und Liquorlaktatwerte bei Rett-Patientinnen festgestellt (Matsuishi et al. 1992; Lappalainen und Riikonen 1994; Haas und Selbach 2000). Diese Befunde lieferten erste Hinweise für eine offensichtliche Beteiligung der Mitochondrien an der Pathophysiologie der Erkrankung. Konkrete molekulare Korrelate wurden allerdings erst durch Expressionsanalysen von isolierten Mitochondrien aus den Gehirnen von *Mecp2*<sup>-/*y*</sup>-Mäusen entdeckt (Kriaucionis et al. 2006). Neben veränderten Expressionsmustern der Cytochrom-c-Oxidase konnte gezeigt werden, dass diese Mitochondrien – im Vergleich zu gesunden Mitochondrien – einen höheren Sauerstoffverbrauch aufweisen. Weiterhin konnte ein gesteigerter Elektronentransfer über die innere Membran der Atmungskette festgestellt werden. Vor diesem Hintergrund wurde die Hypothese formuliert, dass die Defizienz von MeCP2 zu einem Leck in der inneren Mitochondrienmembran führt, das mit einer kompensatorisch erhöhten metabolischen Aktivität der Mitochondrien ausgeglichen wird (Kriaucionis et al. 2006).

Tatsächlich ergaben jüngere Untersuchungen des Hippokampus von neonatalen *Mecp2*<sup>-/*y*</sup>-Tieren erhöhte ATP-Werte und einen gesteigerten ATP-Umsatz (Toloe et al. 2014). Die ATP-Level akuter Hippokampusschnitte adulter Tiere zeigten unter Ruhebedingungen keinen Unterschied zwischen den zwei Genotypen (*Mecp2*<sup>-/*y*</sup> und WT), sodass anzunehmen ist, dass es zu einem reaktiv erhöhten Umsatz der Atmungskette von *Mecp2*<sup>-/*y*</sup>-Mitochondrien kommt, um das Protonenleck zu kompensieren (Fischer et al. 2009). Nähere Untersuchungen der *Mecp2*<sup>-/*y*</sup>-Mitochondrien mit dem Fluoreszenz-Farbstoff Rh123 zeigten, dass die Mitochondrien offenbar auch weniger stark polarisiert sind. Auch dieses Ergebnis spricht für die Protonenleck-These, da der gesteigerte Übertritt von Protonen über die innere Mitochondrienmembran zu einer Erniedrigung des Membranpotentials führt (Großer et al. 2012).

Da das Ausmaß der Entstehung von ROS maßgeblich von der Atmungskettenaktivität abhängt, lag die Überlegung nahe, dass ein kompensatorisch erhöhter Umsatz der Mitochondrien zu einem erhöhten Redox-Status der betroffenen Zellen führen müsste. Experimente, die die FAD/NADH-Autofluoreszenz in akuten hippokampalen Hirnschnitten juveniler und adulter Tiere untersuchten, bestätigten diese Annahme, da die Redox-Äquivalente der untersuchten *Mecp2*<sup>-/*y*</sup>-Hippokampusneurone verstärkt oxidiert vorlagen (Großer et

al. 2012). An diesem Punkt knüpften die Experimente der vorliegenden Arbeit an. Um den intrazellulären Redox-Status weitreichender untersuchen zu können, wurden hippokampale Schnittkulturen von WT- und *Mecp2*<sup>-/-</sup>-Mäusen mit roGFP1 transfiziert. Bereits während der Kalibrierungsmessungen von roGFP1 unter Ruhebedingungen zeigten sich signifikante Unterschiede der Redox-*Baselines* zwischen WT- und *Mecp2*<sup>-/-</sup>-Schnittkulturen. Durchschnittlich lag roGFP1 in *Mecp2*<sup>-/-</sup>-Zellen zu rund 35% stärker oxidiert vor als in WT-Zellen.

Da die Detektion von ROS durch roGFP1 auf der Oxidation bzw. Reduktion zweier Disulfidreste basiert, die abhängig vom intrazellulären Redox-Status Disulfidbrücken ausbilden bzw. lösen, kann davon ausgegangen werden, dass sich roGFP1 komplett in den vorherrschenden ROS-Metabolismus integriert und sowohl die Pufferungs- als auch die Signaleigenschaften anderer redoxsensitiver Proteine widerspiegelt (Dooley et al. 2004; Hanson et al. 2004; Funke et al. 2011). Infolgedessen kann man annehmen, dass auch andere redox-sensitive Proteine im *Mecp2*<sup>-/-</sup>-Hippokampus, ebenso wie roGFP1, Aktivitätsänderungen unterliegen, da sie genauso über SH-Gruppen Redox-moduliert werden.

Zytosolische Redox-Veränderungen modulieren verschiedene Ionenkanäle und Rezeptoren und haben somit einen kritischen Einfluss auf die neuronale Erregbarkeit (siehe Kapitel 1.3). Dies schließt unter anderem Ionenkanäle ein, die an der Generierung des Aktionspotentials beteiligt sind. So zeigte sich, wie oben bereits beschrieben, dass spannungsgesteuerte Na<sup>+</sup>-Kanäle (Hammarström und Gage 2000) und K<sup>+</sup>-Kanäle (Müller und Bittner 2002) sowie NMDA-Rezeptoren (Aizenman et al. 1989) und GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren (Sah et al. 2002) redoxsensitiv sind.

Auch die zelluläre Kalzium-Homöostase hängt, wie oben bereits beschrieben, über mehrere redox-sensitive Proteine vom intrazellulären Redox-Status ab. Bedeutende Beispiele sind spannungsabhängige Ca<sup>2+</sup>-Kanäle (Todorovic et al. 2001), Ryanodin- sowie IP3-Rezeptoren (Hidalgo et al. 2004; Gerich et al. 2009), die endoplasmatische Ca<sup>2+</sup>-ATPase SERCA und der Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-Austauscher (Kuster et al. 2010). Eben diese Kalzium-Signalwege beeinflussen auch maßgeblich die dentritische Plastizität (Nakamura et al. 2002; Li et al. 2004).

Die gestörte synaptische Plastizität beim Rett-Syndrom wird als wesentlicher Einflussfaktor der intellektuellen Beeinträchtigungen der Patientinnen diskutiert (Asaka et al. 2006). Vor diesem Hintergrund stellt die Redox-Imbalance der *Mecp2*<sup>-/-</sup>-Hippokampi, die unter Umständen eine konsekutive Fehlregulation des intrazellulären Kalzium-Haushalts bedingt, einen möglichen Erklärungsansatz der bisher unverstandenen Pathophysiologie des Rett-Syndroms dar. Entscheidend könnte vor allem sein, dass die Redox-Änderungen bereits bei neonatalen Tieren, also in der präsymptomatischen Phase, nachweisbar sind. Somit handelt es sich um frühe Veränderungen, die zum weiteren Krankheitsverlauf beitragen und/oder diesen vorantreiben könnten.

## 4.2 Funktionalität der intrazellulären Redox - Systeme

Als Ursachen für das grundsätzlich erhöhte Redox-Level in den untersuchten *Mecp2<sup>-y</sup>*-Zellen wurde eingangs die Möglichkeit einer insuffizienten Atmungskette diskutiert. Da erhöhte ROS-Konzentrationen auch durch einen verminderten ROS-Abbau erklärt werden können, war die Funktion der intrazellulären Kompensationsmechanismen für oxidativen Stress in *Mecp2<sup>-y</sup>*-Mäusen von hohem Interesse für die Untersuchungen.

Die Inhibition der SOD durch DEDTC führte dazu, dass sowohl in *Mecp2<sup>-y</sup>*- als auch in WT-Schnittkulturen eine Verschiebung des Redox-Potentials in Richtung erhöhter oxidativer Bedingungen stattfand. Der relative Anstieg des Redox-Potentials war in *Mecp2<sup>-y</sup>*-Schnittkulturen signifikant niedriger als in WT-Hirnschnitten, was eine verminderte SOD-Aktivität unter Kontrollbedingungen vermuten lässt. Diese Minderaktivität wäre theoretisch damit zu erklären, dass die SOD, bedingt durch die MeCP2-Defizienz, eventuell strukturell verändert ist und folglich nicht adäquat funktioniert. Weiterhin wäre eine Minderexpression der SOD in *Mecp2<sup>-y</sup>*-Hirnschnitten denkbar, was mit früheren Untersuchungen von Rett-Patientinnen korrespondiert, bei denen eine erniedrigte Konzentration der erythrozytären SOD festgestellt wurde (Sierra et al. 2001).

Hinweise für eine erhöhte extramitochondriale ROS-Produktion wurden im Rahmen weiterführender Untersuchungen durch andere Mitglieder der Arbeitsgruppe nicht gefunden. Es zeigte sich sogar, dass die Änderungen des Redox-Status nach Inhibition der NADPH-Oxidase und der NO-Synthase in *Mecp2<sup>-y</sup>*-Hirnschnitten geringer ausfielen (Großer et al. 2012; Hirt 2014). Anschließende qPCR-Analysen zeigten eine moderate Hochregulation der SOD1, was ebenfalls als zellulärer Kompensationsmechanismus interpretiert werden könnte, um dem chronisch erhöhten Redox-Level bzw. der verminderten SOD1-Aktivität entgegenzuwirken (Großer et al. 2012). Im Anschluss an die SOD wurden die sequentiell nachgeschalteten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-eliminierenden Enzyme Katalase und Glutathionperoxidase untersucht.

Vorausgegangene Publikationen zeigten, dass beide Enzymsysteme unterschiedliche  $K_m$ -Werte aufweisen und dementsprechend bei verschiedenen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentrationen ihre halbmaximale Geschwindigkeit erreichen. Der  $K_m$ -Wert von Glutathion liegt demnach bei 5 mM und ist somit wesentlich niedriger als der  $K_m$ -Wert von der Katalase, der bei 1,1 M liegt (Masaki et al. 1998). Somit ist anzunehmen, dass dem Gluthationsystem die tragende Rolle bei der Einstellung der basalen Redox-Verhältnisse zukommt, wohingegen die Katalase eher Spitzen oxidativen Stresses abfängt (Masaki et al. 1998). Da beide Systeme parallel arbeiten, musste jeweils ein Enzym blockiert werden, um die Funktionalität des anderen zu beurteilen. Die Inkubation der Hirnschnitte mit BSO sollte eine Suppression des Glutathionsystems bewirken.

Es zeigt sich, dass die WT-*Baseline* nach nächtlicher Inkubation mit BSO um ca. 30% stieg und somit den Redox-Status un behandelter *Mecp2<sup>-y</sup>*-Hirnschnitte erreichte. Die

Inkubation von *Mecp2<sup>-/-</sup>*-Hirnschnitten mit BSO führte zu keiner signifikanten Verschiebung der *Baseline* im Vergleich zu unbehandelten *Mecp2<sup>-/-</sup>*-Hirnschnitten. Daraus lässt sich ableiten, dass das Glutathionsystem im *Mecp2<sup>-/-</sup>*-Hippokampus von vornherein nicht adäquat funktioniert, da die Inhibition des Enzyms wirkungslos bleibt. Somit lässt sich in WT-Zellkulturen der gesteigerte Ruhe-Redox-Status von *Mecp2<sup>-/-</sup>*-Hirnschnitten reproduzieren. Verminderte Glutathionkonzentrationen wurden bereits in einer neuropathologischen Einzelfalluntersuchung einer Rett-Patientin im Jahr 1987 dokumentiert. In dieser Publikation wurde erstmals der Zusammenhang zwischen Rett-Syndrom und oxidativem Stress hergestellt (Sofic et al. 1987).

Die Antworten auf künstlichen oxidativen Stress durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fielen nach BSO-Behandlung, verglichen mit nicht inkubierten Hirnschnitten, bei beiden Genotypen vermindert aus. Diese Beobachtung wurde bereits an Ratten-Hippokampi gemacht (Funke et al. 2011) und könnte für eine Beeinträchtigung der zellulären Überlebensfähigkeit durch die Inhibition der Glutathionperoxidase sprechen. Auch eine kompensatorische Überexpression der Katalase könnte theoretisch zu verminderten Fluoreszenz-Antworten auf oxidativen Stress führen, was aufgrund der relativ langen Inkubationszeit mit BSO einen durchaus plausiblen Erklärungsansatz darstellt.

Die Hemmung der Katalase durch ATZ führte bei keinem der beiden Genotypen zu einer Änderung der Ausgangs-*Baselines*, was entsprechend ihrer Funktion als spitzenglätendes Enzym auch nicht zu erwarten war. Allerdings reagierten ATZ-inkubierte WT-Hirnschnitte mit deutlich erhöhten Fluoreszenz-Antworten auf künstlich provozierten oxidativen Stress durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Die Antwortintensität entsprach dem Fluoreszenz-Niveau unbehandelter *Mecp2<sup>-/-</sup>*-Hirnschnitte auf die selbe Dosis H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Da ATZ in *Mecp2<sup>-/-</sup>*-Hirnschnitten keine Änderungen bewirkte, scheint die Katalaseaktivität in *Mecp2<sup>-/-</sup>*-Hippokampi ebenfalls beeinträchtigt zu sein.

Die Parallelinkubation der Schnittkulturen mit BSO und ATZ wurde von beiden Genotypen nicht toleriert. Die Kulturen wurden offensichtlich essentiell geschädigt und konnten künstlich generierten oxidativen Stress nicht mehr adäquat kompensieren.

### 4.3 Modulation der intrazellulären Redox-Verhältnisse

Nachdem die Kalibrierungsmessungen ein erhöhtes Redox-Niveau gezeigt hatten, stellte sich die Frage, ob es eine Möglichkeit gibt, die ROS-Konzentration der *Mecp2<sup>-/-</sup>*-Hirnschnitte auf das Niveau von Wildtyp-Hirnschnitten herunterzukorrigieren und somit pharmakologische Interventionsmöglichkeiten zu schaffen.

Die Applikation von Ascorbat führte zu einem Anstieg der roGFP1-Ratio in beiden Genotypen. Die prozentuale roGFP1-Antwort fiel in *Mecp2<sup>-/-</sup>*-Hirnschnitten mit einer Steigerung um  $76,9 \pm 45,5\%$  wesentlich intensiver aus als in WT-Hirnschnitten, deren roGFP1-Antwort sich lediglich um  $31,1 \pm 22,3\%$  steigerte. Ascorbat überführt Hydroxyradikale in

das wesentlich stabilere  $\text{H}_2\text{O}_2$  und hat somit eine ähnliche Funktion wie die SOD. Aufgrund seiner Stabilität und relativ langen Lebenszeit (Pryor 1986) wird  $\text{H}_2\text{O}_2$  von roGFP1 besser detektiert als bspw. das hochreaktive Hydroxyradikal. Somit unterstreichen die roGFP1 - Antworten der *Mecp2*<sup>-y</sup> - Hirnschnitte das gesteigerte ROS - Aufkommen. Erniedrigte Ascorbat - Konzentrationen im neuronalen Gewebe von Rett - Patientinnen wurden bereits beschrieben (Sofic et al. 1987). Vor dem Hintergrund einer dysfunktionalen SOD im Rett - Syndrom ist es denkbar, dass das Gehirn von Rett - Patientinnen vermehrt Ascorbat verbraucht, um die SOD - Dysfunktion und die erhöhten ROS - Konzentrationen zu kompensieren.

Ein vielversprechendes Ergebnis lieferten die Inkubationsversuche mit Trolox. Mithilfe des antioxidativ hochwirksamen Vitamin E - Derivates gelang es, die erhöhte *Baseline* - Fluoreszenz in *Mecp2*<sup>-y</sup> - Hirnschnitten auf das Niveau von WT - Hirnschnitten herunterzuregulieren. Auch gegenüber künstlich appliziertem oxidativem Stress mit  $200 \mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  zeigten sich die *Mecp2*<sup>-y</sup> - Hirnschnitte resistenter und kompensierten die Provokation besser. *In - vitro* - Experimente an akuten hippokampalen Hirnschnitten konnten bereits zeigen, dass Trolox erfolgreich die neuronale Hyperexzitabilität der *Mecp2*<sup>-y</sup> - Hirnschnitte dämpft. Weiterhin verbesserte sich die Hypoxietoleranz der Hirnschnitte und die Plastizität der Synapsen normalisierte sich (Janc und Müller 2014). Es wäre folglich von Interesse, ob eine postnatale Behandlung mit Trolox die Symptome der MeCP2 - Defizienz in einem *In - vivo* - Experiment lindern kann und somit eine potentielle Pharmatherapieoption darstellt. Derartige systemische Untersuchungen werden bereits am Mausmodell durchgeführt und scheinen die Wirksamkeit von Trolox auch auf systemischer Ebene bei den Rett - Mäusen zu bestätigen (Janc 2015; Janc et al. 2015).

Die Inkubation der Hirnschnitte mit dem Hypophysenhormon Melatonin führte ebenfalls zu moderaten Absenkungen des Ruhe - Redox - Niveaus bei beiden Genotypen. Der Effekt war in *Mecp2*<sup>-y</sup> - Hirnschnitten mit rund 11% Absenkung gegenüber 8% in WT - Hirnschnitten etwas deutlicher zu beobachten. Melatonin gilt als eines der stärksten natürlich vorkommenden Antioxidantien, da es in der Lage ist bis zu zehn verschiedene reaktive Sauerstoffspezies zu neutralisieren (Tan et al. 2007). In seiner Eigenschaft als hormoneller Regulator der zirkadianen Rhythmik zeigte Melatonin bereits in mehreren klinischen Studien einen positiven Einfluss auf die Gesamtsymptomatik des Rett - Syndroms (Rossignol und Frye 2011), da es den Patientinnen hilft, nachts durchzuschlafen. Somit wirkt sich Melatonin unter Umständen sogar auf mehreren Ebenen günstig auf die Syptomatik des Rett - Syndroms aus.

#### 4.4 Störung der mitochondrialen Funktion

Die Beeinträchtigung der mitochondrialen Funktion der Atmungskette äußerte sich bei beiden Genotypen unterschiedlich. Der Entzug von  $\text{O}_2$  durch die Begasung von ACSF mit  $\text{N}_2$  führte bei beiden Genotypen zu einem Abfall des intrazellulären Redox - Status. Allerdings war der Abfall in *Mecp2*<sup>-y</sup> - Hirnschnitten signifikant stärker, was aufgrund des prinzipiell erhöhten *Baseline* - Levels und der offenbar gesteigerten Mitochondrienaktivität

auch zu erwarten war. Das prähypoxische Niveau wurde nach Oxygenierung bloß langsam wieder erreicht. Das Experiment spiegelt auf zellulärer Ebene die Entstehung von ROS während der Rett-typischen Apnoephasen (Julu et al. 2001) wider und zeigte, dass *Mecp2*<sup>-y</sup>-Hirnschnitte den Sauerstoffentzug schlechter kompensieren können als WT-Hirnschnitte.

Eine weitere Möglichkeit, experimentell hypoxische Episoden zu erzeugen, stellte die Unterbrechung des Elektronenflusses zwischen den einzelnen Atmungskettenkomplexen dar. Wie oben bereits geschildert, bewirkt der Elektronenstau die Oxidation der beteiligten Proteine vor der Blockade und führt zur Reduktion der dahinter liegenden Komplexe. Die Elektronenakkumulation bedingt eine vermehrte Entweichung einzelner Elektronen, was zu einer gesteigerten ROS-Entstehung führt (Adam-Vizi 2005). Dieser Effekt konnte mit CN<sup>-</sup> künstlich herbeigeführt werden, da CN<sup>-</sup> an das aktive Zentrum der Cytochrom-c-Oxidase (Komplex IV) bindet und dort den Elektronentransport hemmt. Die CN<sup>-</sup>-Behandlung von Hirnschnitten beider Genotypen führte zu äußerst variablen roGFP1-Antworten, was im Gegensatz zu früheren Beobachtungen in Ratten-Hippokampi steht, bei denen CN<sup>-</sup> einen einheitlichen Anstieg des Redox-Status bewirkte (Funke et al. 2011). Diese Beobachtung lässt sich damit erklären, dass das Oxidationsniveau von Mäusen grundsätzlich höher ist als das von Ratten. Weiterhin ist eine direkte Interaktion zwischen CN<sup>-</sup> und den Sulfhydrylgruppen von roGFP1 nicht auszuschließen, da diese durch CN<sup>-</sup> direkt reduziert werden können (Jocelyn 1972). Wurde CN<sup>-</sup> nach transients Hypoxie durch Sauerstoffentzug appliziert, zeigte sich ein moderater Anstieg der roGFP1-Ratio in beiden Genotypen, der in *Mecp2*<sup>-y</sup>-Hirnschnitten allerdings signifikant deutlicher war. Dieser Befund impliziert eine erhöhte Redox-Vulnerabilität der *Mecp2*<sup>-y</sup>-Hippokampi gegenüber Einschränkungen der mitochondrialen Funktion.

Um dieses Ergebnis zu bestätigen und um die uneinheitlichen CN<sup>-</sup>-Antworten zu umgehen, wurden weitere Untersuchungen mit dem Komplex III-Blocker Antimycin A vorgenommen. Antimycin A zeigte erwartungsgemäß keine direkten Interaktionen mit roGFP1 und führte bei beiden Genotypen unter Anwesenheit von O<sub>2</sub> zu einer Erhöhung der roGFP1-Ratio, die in *Mecp2*<sup>-y</sup>-Hirnschnitten signifikant intensiver ausfiel. Somit zeigte auch dieser Versuch, dass die Mitochondrien von *Mecp2*<sup>-y</sup>-Mäusen auf Blockaden der Atmungskette und auf Hypoxien empfindlich mit einer erhöhten ROS-Produktion reagieren, wodurch der zelluläre Redox-Status in Richtung oxidativer Verhältnisse verschoben wird.

## 4.5 Methodenkritik

Für die Transfektion der Zellen mit der roGFP1-exprimierenden DNA kam Lipofectamin zum Einsatz, wodurch die Redox-Analysen auf neonatale und folglich präsymptomatische hippokampale Hirnschnittkulturen beschränkt waren. Dies liegt darin begründet, dass für die adäquate Transfektion Mitosen nötig sind, die in neuronalem Gewebe postnatal nur in äußerst beschränktem Umfang stattfinden (Kempermann 2006). Da in den kultivierten Hirnschnitten vor allem Gliazellen mitotisch aktiv bleiben, wurden überwiegend diese transfiziert. Dennoch zeigten sich deutliche Anzeichen einer erhöhten oxidativen Belastung

dieser Zellen bereits in präsymptomatischen Stadien. Jüngere Publikationen erhärten den Verdacht, dass die MeCP2-Defizienz in Gliazellen maßgeblich an der Pathogenese des Rett-Syndroms beteiligt ist (Derecki et al. 2012). Gerade vor dem Hintergrund der auftretenden funktionalen Störungen, die nicht mit einer neuronalen Degeneration begründet werden können, rücken Gliazellen als integraler Bestandteil eines funktionsfähigen neuronalen Netzwerkes zunehmend in den Fokus der aktuellen Rett-Forschung (Lioy et al. 2011).

Es wäre natürlich von weiterem Interesse, ob auch Neuronen intensivere Redox-Verschiebungen aufweisen und auf die provozierten Stimuli ähnliche Antwortverhalten zeigen wie die untersuchten Gliazellen. Da Neuronen einen höheren Stoffwechsel und eine erhöhte Mitochondrienkonzentration aufweisen, wäre dies vor allem bei älteren und symptomatischen Mäusen eine besonders interessante Fragestellung. Technische Beschränkungen verhindern bisher allerdings die Verwendung von roGFP1 für solche Analysen. Eine Lösung dieses Problems stellt die Herstellung eines transgenen Mausmodells dar, das roGFP1 bereits von Geburt an exprimiert. Dies würde Untersuchungen aller Entwicklungsstadien zulassen und die aufwendige Lipofectamin-Transfektion umgangen werden. Ein transgenes Mausmodell wird bereits im Detail getestet (Kolbrink et al. 2015). Weiterhin wäre der Einsatz der viralen Transduktion denkbar, um eine neuronale Expression von roGFP1 zu erreichen. Auch dieser Ansatz wird in der Arbeitsgruppe Müller bereits erprobt (Can et al. 2014).

Einen weiteren kritischen Punkt der Untersuchungen stellte das Kulturmedium dar, das B-27 Supplement enthielt. Hierbei handelt es sich um ein Gemisch unbekannter Zusammensetzung, das als Standardwerkzeug in der Zellkultur eingesetzt wird, um die Überlebensrate kultivierter Zellen und Gewebe zu verbessern (Brewer et al. 1993). Allerdings enthält B-27 Supplement verschiedene Antioxidantien, die die Messungen der Arbeit potentiell beeinflussen könnten. Detaillierte Angaben zur geheimen Rezeptur wurden vom Hersteller jedoch kategorisch verweigert.

Aus diesem Grund wurden weiterführende Untersuchungen mit antioxidantienfreiem B-27-Zusatz durch weitere Mitglieder der Arbeitsgruppe durchgeführt. Es zeigten sich jedoch bei keinem Genotyp Auswirkungen auf die Redox-*Baselines* (Hirt 2014). Allerdings fielen die Antworten auf akuten oxidativen Stress in Form von  $H_2O_2$  im antioxidantienfreien B-27 Supplement intensiver aus. Daraus lässt sich schließen, dass die beobachteten Antworten auf oxidative Stimuli in B-27-kultivierten Hirnschnitten etwas geringer waren. Da allerdings roGFP1-Ratios gemessen wurden und die Hirnschnitte beider Genotypen jeweils im gleichen Medium kultiviert wurden, ist die entstandene Verfälschung der Werte durch diese Antioxidantien minimal, da lediglich die Absolutwerte gedämpft wurden (Großer et al. 2012; Hirt 2014).

## 4.6 Fazit und Ausblick

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass der *Mecp2*<sup>-/-</sup>-Hippokampus vermehrt oxidativen Belastungen ausgesetzt und gegenüber Redox-Änderungen vulnerabler ist als das entsprechende Gewebe von WT-Mäusen. Die zugrunde liegenden Auslöser manifestieren sich bereits im Neugeborenen-Stadium und umfassen – neben einer verstärkten mitochondrialen Atmung und einer erhöhten mitochondrialen ROS-Bildung – eine Effektivitätsminderung der zellulären Abwehrmechanismen gegenüber oxidativem Stress. Durch den Einsatz des Vitamin E-Derivates Trolox ist es gelungen, die erhöhte Redox-*Baseline* und die ausgeprägten Antworten auf oxidativen Stress auf Normalwerte zu senken. Diese entsprachen nach der Behandlung in etwa den *Baselines* der WT-Hirnschnitte. Radikalfänger oder andere Maßnahmen, die zur Normalisierung des zytosolischen Redox-Status beitragen, erscheinen als vielversprechender pharmakologischer Ansatz, um die neuronale Übererregbarkeit zu dämpfen und die synaptische Plastizität in *Mecp2*<sup>-/-</sup>-Netzwerken zu verbessern. Erste Studien des Labors an symptomatischen *Mecp2*<sup>-/-</sup>-Mäusen bestätigen dies (Janc und Müller 2014; Janc et al. 2015).

Eine randomisierte Untersuchung von 20 Rett-Patientinnen in den Anfangsstadien des Rett-Syndroms zeigte, dass eine spezielle Diät, reich an mehrfach ungesättigten  $\omega$ 3-Fettsäuren, die Symptome mildern und verschiedene systemische Marker oxidativen Stresses senken kann (de Felice et al. 2012). Auf Grundlage dieser vielversprechenden Ergebnisse läuft derzeit eine klinische Phase-II-Studie an der Universität von Siena (Siena, Italien), um die therapeutische Wirksamkeit des Vitamin-E-Derivats EPI-743 ( $\alpha$ -Trocotrienol-Quinone) an Patientinnen zu untersuchen.

Buchovecky et al. (2013) konnten interessanterweise zeigen, dass der Einsatz von Statinen zu signifikanten Besserungen der Symptome im Mausmodell des Rett-Syndroms führt. Der Effekt wird damit erklärt, dass im Gehirn kranker Mäuse vermehrt Cholesterin akkumuliert, da ein geschwindigkeitsbestimmendes Enzym, die Squalenepoxidase, durch die Abwesenheit von MeCP2 nicht supprimiert wird. Es ist zwar nachgewiesen, dass die Cholesterin-Homöostase einen wesentlichen Einfluss auf die synaptische Plastizität und die adäquate Interaktion zwischen Gliazellen und Neuronen hat (Pfrieger und Ungerer 2011), allerdings fehlt bislang eine zugrunde liegende Erklärung für den Statineffekt.

Statine induzieren antioxidative Enzyme wie die SOD und die Glutathionperoxidase und wirken somit erhöhtem oxidativen Stress entgegen (Saeidnia und Abdollahi 2013). Es ist also denkbar, dass sich die beobachteten Symptombesserungen auf eine Korrektur des verschobenen Redox-Status zurückführen lassen. Die erhöhten Cholesterinspiegel sind unter Umständen auch mit einem erhöhten Zellmembran-*Turnover* des neuronalen Gewebes erklärbar, der die oxidative Mehrbelastung kompensieren soll. Meines Erachtens würde sich der in dieser Arbeit beschriebene Versuchsaufbau für die nähere Untersuchung des Statineffekts sehr gut eignen.

## 5 Zusammenfassung

Es gibt vielfältige Hinweise dafür, dass die Pathogenese des Rett - Syndroms im Zusammenhang mit einer beeinträchtigten Mitochondrienfunktion steht. Genetische Untersuchungen des Rett - Genoms zeigten, dass eine Untereinheit des Komplex III dysreguliert ist und die innere Mitochondrienmembran ein Protonenleck aufweist. Weiterhin fanden sich Hinweise für erhöhten oxidativen Stress in Blut- und Liquoruntersuchungen.

Vor diesem Hintergrund untersuchte diese Arbeit die mitochondriale Funktion und die damit verbundene Redox - Homöostase in einem Mausmodell des Rett - Syndroms (*Mecp2<sup>-y</sup>*). Um den intrazellulären Redox - Status zu quantifizieren, wurde die genetisch kodierte optische Sonde roGFP1 verwendet, die semiquantitative Messungen reaktiver Sauerstoffspezies ermöglichte. Es zeigte sich, dass *Mecp2<sup>-y</sup>* - Hirnschnitte bereits unter Ruhebedingungen erhöhtem oxidativen Stress ausgesetzt sind. Auf der Suche nach der Ursache wurden die intrazellulären antioxidativen Schutzenzyme Superoxid - Dismutase, die Katalase und das Glutathionsystem überprüft. Alle drei Enzymsysteme zeigten Funktionsstörungen und waren nicht in der Lage, extern applizierten oxidativen Stress ( $200\mu\text{M H}_2\text{O}_2$ ) im gleichen Umfang zu kompensieren wie die Enzyme der Wildtyp - Vergleichsgruppe.

Um die zytosolischen Redox - Verhältnisse zu beeinflussen, wurden Untersuchungen mit den Antioxidantien Ascorbat, Trolox und Melatonin vorgenommen. Dabei zeigte sich, dass Antioxidantien eine potentielle pharmakologische Maßnahme darstellen, um die zu oxidativen Verhältnissen verschobene Redox - Homöostase in *Mecp2<sup>-y</sup>* - Hippokampi zu senken und somit zu normalisieren. Vor allem das Vitamin E - Derivat Trolox stellte sich als wirkungsvoller Radikalfänger heraus und bietet sich für weitere detaillierte Untersuchungen hinsichtlich einer therapeutischen Option des Rett - Syndroms an. Die externe Störung der mitochondrialen Funktion durch die Induktion einer transienten Hypoxie sowie die gezielte Inhibition verschiedener Atmungskettenkomplexe zeigte eine deutlich erhöhte Hypoxieempfindlichkeit der *Mecp2<sup>-y</sup>* - Hippokampi und war mit einer erhöhten ROS - Produktion verbunden.

In der Arbeit gelang es erstmals, die bereits mehrfach postulierte Störung der Redox - Homöostase im Rett - Syndrom auf zellulärer Ebene direkt nachzuweisen. Die erhobenen Befunde liefern mögliche mechanistische Erklärungsansätze für die Störung der synaptischen Plastizität im Rett - Syndrom, da es klare Verbindungen zwischen dem zellulären Redox - Status und dem Kalziumhaushalt gibt, der durch redoxsensitive Proteine mitreguliert wird. Somit konnte eine zentrale Dysregulation der Erkrankung identifiziert werden, die unter Umständen auch neue pharmakologische Angriffspunkte aufzeigt. In weiteren Experimenten muss jetzt noch geklärt werden, ob die Daten in einem *In - vivo* - Modell reproduzierbar sind und ob z.B. die therapeutische Anwendung von bluthirnschrankengängigen Antioxidantien bei neonatalen *Mecp2<sup>-y</sup>* - Mäusen eine Linderung der Symptomatik bewirken kann. Sollte dies der Fall sein, könnten Radikalfänger eine neue Therapieoption für Rett - Patientinnen darstellen.

## 6 Literaturverzeichnis

- Abrahams JP, Leslie AG, Lutter R, Walker JE (1994): Structure at 2.8 Å resolution of F<sub>1</sub>-ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature* 370, 621–628
- Acheson A, Conover JC, Fandl JP, de Chiara TM, Russell M, Thadani A, Squinto SP, Yancopoulos GD, Lindsay RM (1995): A BDNF autocrine loop in adult sensory neurons prevents cell death. *Nature* 374, 450–453
- Adam-Vizi V (2005): Production of reactive oxygen species in brain mitochondria: contribution by electron transport chain and non-electron transport chain sources. *Antioxid Redox Signal* 7, 1140–1149
- Aizenman E, Lipton SA, Loring RH (1989): Selective modulation of NMDA responses by reduction and oxidation. *Neuron* 2, 1257–1263
- Amir RE, van den Veyver IB, Wan M, Tran CQ, Francke U, Zoghbi HY (1999): Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2. *Nat Genet* 23, 185–188
- Anand A, Thakur K, Gupta PK (2013): ALS and oxidative stress: the neurovascular scenario. *Oxid Med Cell Longev* 2013, 635831
- Archer H, Evans J, Leonard H, Colvin L, Ravine D, Christodoulou J, Williamson S, Charman T, Bailey MES, Sampson J et al. (2007): Correlation between clinical severity in patients with Rett syndrome with a p.R168X or p.T158M MECP2 mutation, and the direction and degree of skewing of X-chromosome inactivation. *J Med Genet* 44, 148–152
- Ariani F, Hayek G, Rondinella D, Artuso R, Mencarelli MA, Spanhol-Rosseto A, Pollazzon M, Buoni S, Spiga O, Ricciardi S et al. (2008): FOXP1 is responsible for the congenital variant of Rett syndrome. *Am J Hum Genet* 83, 89–93
- Armstrong D, Dunn JK, Antalffy B, Trivedi R (1995): Selective dendritic alterations in the cortex of Rett syndrome. *J Neuropathol Exp Neurol* 54, 195–201
- Armstrong DD (1992): The neuropathology of the Rett syndrome. *Brain Dev* 14, 89–98
- Armstrong DD, Dunn JK, Schultz RJ, Herbert DA, Glaze DG, Motil KJ (1999): Organ growth in Rett syndrome: A postmortem examination analysis. *Pediatr Neurol* 20, 125–129
- Asaka Y, Jugloff DG, Zhang L, Eubanks JH, Fitzsimonds RM (2006): Hippocampal synaptic plasticity is impaired in the Mecp2-null mouse model of Rett syndrome. *Neurobiol Dis* 21, 217–227
- Babior BM, Kipnes RS, Curnutte JT (1973): Biological defense mechanisms. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. *J Clin Invest* 52, 741–744

- Bahi-Buisson N, Nectoux J, Rosas-Vargas H, Milh M, Boddaert N, Girard B, Cances C, Ville D, Afejar A, Rio M et al. (2008): Key clinical features to identify girls with CDKL5 mutations. *Brain* 131, 2647–2661
- Behl C, Moosmann B (2002): Oxidative nerve cell death in Alzheimer's disease and stroke: antioxidants as neuroprotective compounds. *Biol. Chem.* 383, 521–536
- Bekinschtein P, Cammarota M, Katche C, Slipczuk L, Rossato JI, Goldin A, Izquierdo I, Medina JH (2008): BDNF is essential to promote persistence of long-term memory storage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 2711–2716
- Belichenko NP, Belichenko PV, Li HH, Mobley WC, Francke U (2008): Comparative study of brain morphology in *Mecp2* mutant mouse models of Rett syndrome. *J Comp Neurol* 508, 184–195
- Bienvenu T, Chelly J (2006): Molecular genetics of Rett syndrome: when DNA methylation goes unrecognized. *Nat Rev Genet* 7, 415–426
- Binder DK, Scharfman HE (2004): Brain-derived neurotrophic factor. *Growth Factors* 22, 123–131
- Bindokas VP, Jordan J, Lee CC, Miller RJ (1996): Superoxide production in rat hippocampal neurons: selective imaging with hydroethidine. *J Neurosci* 16, 1324–1336
- Boveris A, Chance B (1973): The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J* 134, 707–716
- Brewer GJ, Torricelli JR, Evege EK, Price PJ (1993): Optimized survival of hippocampal neurons in B27-supplemented Neurobasal, a new serum-free medium combination. *J Neurosci Res* 35, 567–576
- Buchovecky CM, Turley SD, Brown HM, Kyle SM, McDonald JG, Liu B, Pieper AA, Huang W, Katz DM, Russell DW et al. (2013): A suppressor screen in *Mecp2* mutant mice implicates cholesterol metabolism in Rett syndrome. *Nat Genet* 45, 1013–1020
- Can K, Toloe J, Kügler S, Müller M (2014): Aberrant redox homeostasis in Rett syndrome affects cytosol and mitochondria. *Abstr Soc Neurosci*, 515.17
- Carmeli E, Bachar A, Beiker R (2011): Expression of global oxidative stress and matrix metalloproteinases is associated with rett syndrome. *Neurochem J* 5, 141–145
- Chahrour M, Zoghbi HY (2007): The story of Rett syndrome: from clinic to neurobiology. *Neuron* 56, 422–437
- Chahrour M, Jung SY, Shaw C, Zhou X, Wong ST, Qin J, Zoghbi HY (2008): MeCP2, a key contributor to neurological disease, activates and represses transcription. *Science* 320, 1224–1229
- Chelikani P, Ramana T, Radhakrishnan TM (2005): Catalase: A repertoire of unusual features. *Indian J Clin Biochem* 20, 131–135

- Chen RZ, Akbarian S, Tudor M, Jaenisch R (2001): Deficiency of methyl-CpG binding protein-2 in CNS neurons results in a Rett-like phenotype in mice. *Nat Genet* 27, 327–331
- Cheng G, Kong R, Zhang L, Zhang J (2012): Mitochondria in traumatic brain injury and mitochondrial-targeted multipotential therapeutic strategies. *Br J Pharmacol* 167, 699–719
- Coker SB, Melnyk AR (1991): Rett syndrome and mitochondrial enzyme deficiencies. *J Child Neurol* 6, 164–166
- Colantuoni C, Jeon OH, Hyder K, Chenchik A, Khimani AH, Narayanan V, Hoffman EP, Kaufmann WE, Naidu S, Pevsner J (2001): Gene expression profiling in postmortem Rett Syndrome brain: differential gene expression and patient classification. *Neurobiol Dis* 8, 847–865
- Commoner B, Townsend J, Pake GE (1954): Free radicals in biological materials. *Nature* 174, 689–691
- 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
- Dalby B, Cates S, Harris A, Ohki EC, Tilkins ML, Price PJ, Ciccarone VC (2004): Advanced transfection with Lipofectamine 2000 reagent: primary neurons, siRNA, and high-throughput applications. *Methods* 33, 95–103
- De Felice C, Ciccoli L, Leoncini S, Signorini C, Rossi M, Vannuccini L, Guazzi G, Latini G, Comporti M, Valacchi G et al. (2009): Systemic oxidative stress in classic Rett syndrome. *Free Radic Biol Med* 47, 440–448
- De Felice C, Signorini C, Durand T, Oger C, Guy A, Bultel-Ponce V, Galano J, Ciccoli L, Leoncini S, D'Esposito M et al. (2011): F2-dihomo-isoprostanes as potential early biomarkers of lipid oxidative damage in Rett syndrome. *J Lipid Res* 52, 2287–2297
- De Felice C, Signorini C, Leoncini S, Pecorelli A, Durand T, Valacchi G, Ciccoli L, Hayek J (2012): The role of oxidative stress in Rett syndrome: an overview. *Ann N Y Acad Sci* 1259, 121–135
- Dean RT, Fu S, Stocker R, Davies MJ (1997): Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem J* 324, 1–18
- Derecki NC, Cronk JC, Lu Z, Xu E, Abbott SGB, Guyenet PG, Kipnis J (2012): Wild-type microglia arrest pathology in a mouse model of Rett syndrome. *Nature* 484, 105–109
- 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

- Drel VR, Sybirna N (2010): Protective effects of polyphenolics in red wine on diabetes associated oxidative/nitrative stress in streptozotocin-diabetic rats. *Cell Biol Int* 34, 1147–1153
- Dröge W (2002): Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82, 47–95
- Eeg-Olofsson O, al-Zuhair AG, Teebi AS, Daoud AS, Zaki M, Besisso MS, Al-Essa MM (1990): Rett syndrome: a mitochondrial disease? *J Child Neurol* 5, 210–214
- Facundo HTF, Paula JG de, Kowaltowski AJ (2007): Mitochondrial ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels are redox-sensitive pathways that control reactive oxygen species production. *Free Radic Biol Med* 42, 1039–1048
- Fernandez-Checa JC, Fernandez A, Morales A, Mari M, Garcia-Ruiz C, Colell A (2010): Oxidative stress and altered mitochondrial function in neurodegenerative diseases: lessons from mouse models. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 9, 439–454
- Fischer M, Reuter J, Gerich FJ, Hildebrandt B, Hägele S, Katschinski D, Müller M (2009): Enhanced hypoxia susceptibility in hippocampal slices from a mouse model of Rett syndrome. *J Neurophysiol.* 101, 1016–1032
- Formichi P, Battisti C, Dotti MT, Hayek G, Zappella M, Federico A (1998): Vitamin E serum levels in Rett syndrome. *J Neurol Sci* 156, 227–230
- 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
- Furchgott RF (1993): Introduction to EDRF research. *J Cardiovasc Pharmacol* 22Suppl7, 1–2
- Gerich FJ, Hepp S, Probst I, Müller M (2006): Mitochondrial inhibition prior to oxygen-withdrawal facilitates the occurrence of hypoxia-induced spreading depression in rat hippocampal slices. *J Neurophysiol* 96, 492–504
- Gerich FJ, Funke F, Hildebrandt B, Fasshauer M, Müller M (2009): H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-mediated modulation of cytosolic signaling and organelle function in rat hippocampus. *Pflugers Arch* 458, 937–952
- Gerschman R, Gilbert DL, Nye SW, Dwyer P, Fenn WO (1954): Oxygen poisoning and x-irradiation: a mechanism in common. *Science* 119, 623–626
- Gibson JH, Slobedman B, K NH, Williamson SL, Minchenko D, El-Osta A, Stern JL, Christodoulou J (2010): Downstream targets of methyl CpG binding protein 2 and their abnormal expression in the frontal cortex of the human Rett syndrome brain. *BMC Neurosci* 11, 53
- Glaze DG (2005): Neurophysiology of Rett syndrome. *J Child Neurol* 20, 740–746
- Götz ME, Freyberger A, Riederer P (1990): Oxidative stress: a role in the pathogenesis of Parkinson's disease. *J Neural Transm Suppl* 29, 241–249

- Graubner B: ICD-10-GM 2014 Systematisches Verzeichnis: Internationale statistische Klassifikation der Krankheit und verwandter Gesundheitsprobleme 10. Revision-German Modification Version 2014. Deutscher Ärzteverlag. Köln 2014, F84.2
- Griffith OW, Meister A (1979): Potent and specific inhibition of glutathione synthesis by buthionine sulfoximine (S-n-butyl homocysteine sulfoximine). *J Biol Chem* 254, 7558–7560
- 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
- Guy J, Hendrich B, Holmes M, Martin JE, Bird A (2001): A mouse Mecp2-null mutation causes neurological symptoms that mimic Rett syndrome. *Nat Genet* 27, 322–326
- Guy J, Gan J, Selfridge J, Cobb S, Bird A (2007): Reversal of neurological defects in a mouse model of Rett syndrome. *Science* 315, 1143–1147
- Haas HL, Selbach O (2000): Functions of neuronal adenosine receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 362, 375–381
- Haas RH, Nasirian F, Hua X, Nakano K, Hennessy M (1995): Oxidative metabolism in Rett syndrome: 2. Biochemical and molecular studies. *Neuropediatrics* 26, 95–99
- Hagberg B (2002): Clinical manifestations and stages of Rett syndrome. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 8, 61–65
- Hagberg B, Witt-Engerström I (1986): Rett syndrome: a suggested staging system for describing impairment profile with increasing age towards adolescence. *Am J Med Genet Suppl* 1, 47–59
- Hagberg B, Aicardi J, Dias K, Ramos O (1983): A progressive syndrome of autism, dementia, ataxia, and loss of purposeful hand use in girls: Rett's syndrome: report of 35 cases. *Ann Neurol* 14, 471–479
- Hagberg B, Goutieres F, Hanefeld F, Rett A, Wilson J (1985): Rett syndrome: criteria for inclusion and exclusion. *Brain Dev* 7, 372–373
- Halliwell B, Gutteridge JM (1984): Free radicals, lipid peroxidation, and cell damage. *Lancet* 2, 1095
- Hammarström AK, Gage PW (2000): Oxygen-sensing persistent sodium channels in rat hippocampus. *J Physiol* 529, 107–118
- Hanson GT, Aggeler R, Oglesbee D, Cannon M, Capaldi RA, Tsien RY, Remington SJ (2004): Investigating mitochondrial redox potential with redox-sensitive green fluorescent protein indicators. *J Biol Chem* 279, 13044–13053
- Harman D (1956): Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 11, 298–300

- Heikkilä RE, Cabbat FS, Cohen G (1976): In vivo inhibition of superoxide dismutase in mice by diethyldithiocarbamate. *J Biol Chem* 251, 2182–2185
- Heilstedt HA, Shahbazian MD, Lee B (2002): Infantile hypotonia as a presentation of Rett syndrome. *Am J Med Genet* 111, 238–242
- Herrera E, Barbas C (2001): Vitamin E: action, metabolism and perspectives. *J Physiol Biochem* 57, 43–56
- Hidalgo C, Bull R, Behrens MI, Donoso P (2004): Redox regulation of RyR-mediated Ca<sup>2+</sup> release in muscle and neurons. *Biol Res* 37, 539–552
- Hirt U: Extramitochondriale und mitochondriale Produktion reaktiver Sauerstoffspezies im Hippokampus MeCP2-defizienter Mäuse. Med. Diss. Göttingen 2014
- Hodgkin AHP (1959): The influence of potassium and chloride ions on the membrane potential of single muscle fibres. *J Physiol* 148, 127–160
- Huang EJ, Reichardt LF (2001): Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci* 24, 677–736
- Huang L, Cobessi D, Tung EY, Berry EA (2005): Binding of the respiratory chain inhibitor antimycin to the mitochondrial bc<sub>1</sub> complex: a new crystal structure reveals an altered intramolecular hydrogen-bonding pattern. *J Mol Biol* 351, 573–597
- James AM, Smith RAJ, Murphy MP (2004): Antioxidant and prooxidant properties of mitochondrial Coenzyme Q. *Arch Biochem Biophys* 423, 47–56
- Janc OA: Pharmacotreatment of a mouse model of Rett syndrome with the radical scavenger Trolox: Detailed assessment of potential merits in vitro and in vivo. Diss. Göttingen 2015
- Janc OA, Müller M (2014): The free radical scavenger Trolox dampens neuronal hyperexcitability, reinstates synaptic plasticity, and improves hypoxia tolerance in a mouse model of Rett syndrome. *Front Cell Neurosci* 8, 56
- Janc OA, Kempkes B, Müller M (2015): Systemic radical scavenger treatment of a mouse model of Rett syndrome. *Acta Physiol Scand*, 213Suppl699, 253
- Jocelyn PC: Biochemistry of the SH group: The occurrence, chemical properties, metabolism and biological function of thiols and disulphides. Academic Press, London 1972
- Julu PO, Kerr AM, Apartopoulos F, Al-Rawas S, Engerström IW, Engerström L, Jamal GA, Hansen S (2001): Characterisation of breathing and associated central autonomic dysfunction in the Rett disorder. *Arch Dis Child* 85, 29–37
- Karihtala P, Soini Y (2007): Reactive oxygen species and antioxidant mechanisms in human tissues and their relation to malignancies. *APMIS* 115, 81–103
- Kempermann G: Adult neurogenesis: Stem cells and neuronal development in the adult brain; Oxford University Press, New York 2006

- Kerr AM, Armstrong DD, Prescott RJ, Doyle D, Kearney DL (1997): Rett syndrome: analysis of deaths in the British survey. *Eur Child Adolesc Psychiatry* 6Suppl1, 71–74
- Kline DD, Ogier M, Kunze DL, Katz DM (2010): Exogenous brain-derived neurotrophic factor rescues synaptic dysfunction in Mecp2-null mice. *J Neurosci* 30, 5303–5310
- Kolbrink B, Wagener K, Kempkes B, Müller M (2015): Redox-indicator mice stably expressing genetically-encoded roGFP. *Acta Physiol Scand* 213Suppl699, 256
- Kong J, Xu Z (1998): Massive mitochondrial degeneration in motor neurons triggers the onset of amyotrophic lateral sclerosis in mice expressing a mutant SOD1. *J Neurosci* 18, 3241–3250
- Korkmaz A, Reiter RJ, Topal T, Manchester LC, Oter S, Tan D (2009): Melatonin: an established antioxidant worthy of use in clinical trials. *Mol Med* 15, 43–50
- Kowaltowski AJ, Souza-Pinto NC de, Castilho RF, Vercesi AE (2009): Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med* 47, 333–343
- Kriaucionis S, Paterson A, Curtis J, Guy J, MacLeod N, Bird A (2006): Gene expression analysis exposes mitochondrial abnormalities in a mouse model of Rett syndrome. *Mol Cell Biol* 26, 5033–5042
- Kron M, Müller M (2010): Impaired hippocampal Ca<sup>2+</sup> homeostasis and concomitant K<sup>+</sup> channel dysfunction in a mouse model of Rett syndrome during anoxia. *Neuroscience* 171, 300–315
- Kunze J (2009): Wiedemanns Atlas klinischer Syndrome: Phänomenologie, Ätiologie, Differenzialdiagnose. 6. Auflage; Schattauer, Stuttgart 2009
- Kuster GM, Lancel S, Zhang J, Communal C, Trucillo MP, Lim CC, Pfister O, Weinberg EO, Cohen RA, Liao R et al. (2010): Redox-mediated reciprocal regulation of SERCA and Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger contributes to sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> depletion in cardiac myocytes. *Free Radic Biol Med* 48, 1182–1187
- Lambert AJ, Brand MD (2004): Inhibitors of the quinone-binding site allow rapid superoxide production from mitochondrial NADH: ubiquinone oxidoreductase (complex I). *J Biol Chem* 279, 39414–39420
- Lappalainen R, Riikonen RS (1994): Elevated CSF lactate in the Rett syndrome: cause or consequence? *Brain Dev* 16, 399–401
- Li Z, Okamoto K, Hayashi Y, Sheng M (2004): The importance of dendritic mitochondria in the morphogenesis and plasticity of spines and synapses. *Cell* 119, 873–887
- Lioy DT, Garg SK, Monaghan CE, Raber J, Foust KD, Kaspar BK, Hirrlinger PG, Kirchhoff F, Bissonnette JM, Ballas N et al. (2011): A role for glia in the progression of Rett's syndrome. *Nature* 475, 497–500

- Lugert S, Basak O, Knuckles P, Haussler U, Fabel K, Gotz M, Haas CA, Kempermann G, Taylor V, Giachino C (2010): Quiescent and active hippocampal neural stem cells with distinct morphologies respond selectively to physiological and pathological stimuli and aging. *Cell Stem Cell* 6, 445–456
- Lushchak VI (2014): Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chem Biol Interact* 224C, 164–175
- Lyon MF (1961): Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.). *Nature* 190, 372–373
- Macagno ER (1980): Number and distribution of neurons in leech segmental ganglia. *J Comp Neurol* 190, 283–302
- Margoliash E, Novogrodsky A (1958): A study of the inhibition of catalase by 3-amino-1:2:4-triazole. *Biochem J* 68, 468–475
- Masaki H, Okano Y, Sakurai H (1998): Differential role of catalase and glutathione peroxidase in cultured human fibroblasts under exposure to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or ultraviolet B light. *Arch Dermatol Res* 290 113–118
- Matsuishi T, Urabe F, Komori H, Yamashita Y, Naito E, Kuroda Y, Horikawa M, Ohtaki E (1992): The Rett syndrome and CSF lactic acid patterns. *Brain Dev* 14, 68–70
- May JM (1998): Ascorbate function and metabolism in the human erythrocyte. *Front Biosci* 3, 1–10
- Meister A, Anderson ME (1983): Glutathione. *Annu Rev Biochem* 52, 711–760
- Miltenberger-Miltenyi G, Laccone F (2003): Mutations and polymorphisms in the human methyl CpG-binding protein MECP2. *Hum Mutat* 22, 107–115
- Mitchell P (1961): Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature* 191, 144–148
- Mitchell P (1975): The protonmotive Q cycle: a general formulation. *FEBS Lett* 59, 137–139
- Monros E, Armstrong J, Aibar E, Poo P, Canos I, Pineda M (2001): Rett syndrome in Spain: mutation analysis and clinical correlations. *Brain Dev* 23Suppl1, 251–253
- Müller M, Can K (2014): Abberant redox homeostasis and mitochondrial dysfunction in Rett syndrome. *Biochem Soc Trans* 24, 959–964
- Müller W, Bittner K (2002): Differential oxidative modulation of voltage-dependent K<sup>+</sup> currents in rat hippocampal neurons. *J Neurophysiol.* 87, 2990–2995
- Nakamura T, Lasser-Ross N, Nakamura K, Ross WN (2002): Spatial segregation and interaction of calcium signalling mechanisms in rat hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Physiol* 543, 465–480

- Neul JL, Zoghbi HY (2004): Rett syndrome: a prototypical neurodevelopmental disorder. *Neuroscientist* 10, 118–128
- Neul JL, Fang P, Barrish J, Lane J, Caeg EB, Smith EO, Zoghbi H, Percy A, Glaze DG (2008): Specific mutations in Methyl-CpG-Binding Protein 2 confer different severity in Rett syndrome. *Neurology* 70, 1313–1321
- Ott M, Gogvadze V, Orrenius S, Zhivotovsky B (2007): Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis* 12, 913–922
- Padayatty SJ, Katz A, Wang Y, Eck P, Kwon O, Lee JH, Chen S, Corpe C, Dutta A, Dutta SK et al. (2003): Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention. *J Am Coll Nutr* 22, 18–35
- Parsons TD, Obaid AL, Salzberg BM (1992): Aminoglycoside antibiotics block voltage-dependent calcium channels in intact vertebrate nerve terminals. *J Gen Physiol* 99, 491–504
- Percy AK (2002): Rett syndrome. Current status and new vistas. *Neurol Clin* 20, 1125–1141
- Percy AK, Lee H, Neul JL, Lane JB, Skinner SA, Geerts SP, Annese F, Graham J, McNair L, Motil KJ et al. (2010): Profiling scoliosis in Rett syndrome. *Pediatr Res* 67, 435–439
- Pfriefer FW, Ungerer N (2011): Cholesterol metabolism in neurons and astrocytes. *Prog Lipid Res* 50, 357–371
- Potter VR, Reif AE (1952): Inhibition of an electron transport component by antimycin A. *J Biol Chem* 194, 287–297
- Pryor WA (1986): Oxy-radicals and related species: their formation, lifetimes, and reactions. *Annu Rev Physiol* 48, 657–667
- Pugazhenth S, Phansalkar K, Audesirk G, West A, Cabell L (2006): Differential regulation of c-jun and CREB by acrolein and 4-hydroxynonenal. *Free Radic Biol Med* 40, 21–34
- Pulsinelli WA, Waldman S, Rawlinson D, Plum F (1982): Moderate hyperglycemia augments ischemic brain damage: a neuropathologic study in the rat. *Neurology* 32, 1239–1246
- Putnam CD, Arvai AS, Bourne Y, Tainer JA (2000): Active and inhibited human catalase structures: ligand and NADPH binding and catalytic mechanism. *J Mol Biol* 296, 295–309
- Reiter RJ, Tan D, Mayo JC, Sainz RM, Leon J, Czarnocki Z (2003): Melatonin as an antioxidant: biochemical mechanisms and pathophysiological implications in humans. *Acta Biochim Pol* 50, 1129–1146
- Rett A (1966): Über ein eigenartiges hirnatrophisches Syndrom bei Hyperammonämie im Kindesalter. *Wien Med Wochenschr* 116, 723–726

- Ritchie JM (1987): Voltage-gated cation and anion channels in mammalian Schwann cells and astrocytes. *J Physiol (Paris)* 82, 248–257
- Rossignol DA, Frye RE (2011): Melatonin in autism spectrum disorders: a systematic review and meta-analysis. *Dev Med Child Neurol* 53, 783–792
- Ruch A, Kurczynski TW, Velasco ME (1989): Mitochondrial alterations in Rett syndrome. *Pediatr Neurol* 5, 320–323
- Saeidnia S, Abdollahi M (2013): Toxicological and pharmacological concerns on oxidative stress and related diseases. *Toxicology and Applied Pharmacology* 273, 442–455
- Sah R, Galeffi F, Ahrens R, Jordan G, Schwartz-Bloom RD (2002): Modulation of the GABA A-gated chloride channel by reactive oxygen species. *J Neurochem* 80, 383–391
- Saraste M (1999): Oxidative phosphorylation at the fin de siecle. *Science* 283, 1488–1493
- Schmidt-Kastner R, Freund TF (1991): Selective vulnerability of the hippocampus in brain ischemia. *Neuroscience* 40, 599–636
- Schüle B, Armstrong DD, Vogel H, Oviedo A, Francke U (2008): Severe congenital encephalopathy caused by MECP2 null mutations in males: central hypoxia and reduced neuronal dendritic structure. *Clin Genet* 74, 116–126
- Segatto M, Trapani L, Di Tunno I, Sticozzi C, Valacchi G, Hayek J, Pallottini V (2014): Cholesterol metabolism is altered in Rett Syndrome: a study on plasma and primary cultured fibroblasts derived from patients. *PLoS One* 9, e104834
- Senior AE (1988): ATP synthesis by oxidative phosphorylation. *Physiol Rev* 68, 177–231
- Shahbazian MD, Antalffy B, Armstrong DL, Zoghbi HY (2002): Insight into Rett syndrome: MeCP2 levels display tissue- and cell-specific differences and correlate with neuronal maturation. *Hum Mol Genet* 11, 115–124
- Sierra C, Vilaseca MA, Brandi N, Artuch R, Mira A, Nieto M, Pineda M (2001): Oxidative stress in Rett syndrome. *Brain Dev* 23Suppl1, 236–9
- Sies H (1993): Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem* 215, 213–219
- Sies H (2015): Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biology* 4, 180–183
- Sies H, Stahl W (1995): Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidants. *Am J Clin Nutr* 62, 1315S–1321S
- Signorini C, de Felice C, Leoncini S, Giardini A, D’Esposito M, Filosa S, Della Ragione F, Rossi M, Pecorelli A, Valacchi G et al. (2011): F(4)-neuroprostanes mediate neurological severity in Rett syndrome. *Clin Chim Acta* 412, 1399–1406

- Sofic E, Riederer P, Killian W, Rett A (1987): Reduced concentrations of ascorbic acid and glutathione in a single case of Rett syndrome: a postmortem brain study. *Brain Dev* 9, 529–531
- Stannard JN, Horecker BL (1948): The in vitro inhibition of cytochrome oxidase by azide and cyanide. *J Biol Chem* 172, 599–608
- Steffenburg U, Hagberg G, Hagberg B (2001): Epilepsy in a representative series of Rett syndrome. *Acta Paediatr* 90, 34–39
- Stoppini L, Buchs PA, Muller D (1991): A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *J Neurosci Methods* 37, 173–182
- Suzuki S, Brown CM, Wise PM (2006): Mechanisms of neuroprotection by estrogen. *Endocrine* 29, 209–215
- Swomley AM, Forster S, Keeney JT, Triplett J, Zhang Z, Sultana R, Butterfield DA (2014): Aβ, oxidative stress in Alzheimer disease: Evidence based on proteomics studies. *Biochim Biophys Acta* 1842, 1248–1257
- Tan D, Reiter RJ, Manchester LC, Yan M, El-Sawi M, Sainz RM, Mayo JC, Kohen R, Allegra M, Hardeland R (2002): Chemical and physical properties and potential mechanisms: melatonin as a broad spectrum antioxidant and free radical scavenger. *Curr Top Med Chem* 2, 181–197
- Tan D, Manchester LC, Terron MP, Flores LJ, Reiter RJ (2007): One molecule, many derivatives: A never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species? *J Pineal Res* 42, 28–42
- Todorovic SM, Jevtovic-Todorovic V, Meyenburg A, Mennerick S, Perez-Reyes E, Romano C, Olney JW, Zorumski CF (2001): Redox modulation of T-type calcium channels in rat peripheral nociceptors. *Neuron* 31, 75–85
- Toloe J, Mollajew R, Kugler S, Mironov SL (2014): Metabolic differences in hippocampal 'Rett' neurons revealed by ATP imaging. *Mol Cell Neurosci* 59, 47–56
- Turrens JF (2003): Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol* 552, 335–344
- Urduinguio RG, Lopez-Serra L, Lopez-Nieva P, Alaminos M, Diaz-Uriarte R, Fernandez AF, Esteller M (2008): Mecp2-null mice provide new neuronal targets for Rett syndrome. *PLoS One* 9, e3669
- Valinluck V, Tsai H, Rogstad DK, Burdzy A, Bird A, Sowers LC (2004): Oxidative damage to methyl-CpG sequences inhibits the binding of the methyl-CpG binding domain (MBD) of methyl-CpG binding protein 2 (MeCP2). *Nucleic Acids Res* 32, 4100–4108
- Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes CJ, Telser J (2004): Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol Cell Biochem* 266, 37–56

- Wang X, Quinn PJ (1999): Vitamin E and its function in membranes. *Prog Lipid Res* 38, 309–336
- Waris G, Ahsan H (2006): Reactive oxygen species: role in the development of cancer and various chronic conditions. *J Carcinog* 5, 14
- Watabe M, Nakaki T (2008): Mitochondrial complex I inhibitor rotenone inhibits and redistributes vesicular monoamine transporter 2 via nitration in human dopaminergic SH-SY5Y cells. *Mol Pharmacol* 74, 933–940
- Weaving LS, Williamson SL, Bennetts B, Davis M, Ellaway CJ, Leonard H, Thong M, Delatycki M, Thompson EM, Laing N et al. (2003): Effects of MECP2 mutation type, location and X-inactivation in modulating Rett syndrome phenotype. *Am J Med Genet A* 118, 103–114
- Weisiger RA, Fridovich I (1973a): Mitochondrial superoxide simutase. Site of synthesis and intramitochondrial localization. *J Biol Chem* 248, 4793–4796
- Weisiger RA, Fridovich I (1973b): Superoxide dismutase. Organelle specificity. *J Biol Chem* 248, 3582–3592
- Weller J, Kizina KM, Can K, Bao G, Müller M (2014): Response properties of the genetically encoded optical HO sensor HyPer. *Free Radic Biol Med* 76C, 227–241
- Yamada K, Nabeshima T (2003): Brain-derived neurotrophic factor/TrkB signaling in memory processes. *J Pharmacol Sci* 91, 267–270
- Zhu X, Li M, Pan H, Bao X, Zhang J, Wu X (2010): Analysis of the parental origin of de novo MECP2 mutations and X chromosome inactivation in 24 sporadic patients with Rett syndrome in China. *J Child Neurol* 25, 842–848
- Zoghbi HY (2003): Postnatal neurodevelopmental disorders: meeting at the synapse? *Science* 302, 826–830

## Danksagung

Ich möchte mich bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Michael Müller im Institut für Neuro- und Sinnesphysiologie der Georg-August-Universität Göttingen für die Unterstützung und Beratung während der Laborarbeit bedanken.

In erster Linie möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Müller für die Anregung zu dieser Arbeit und seine Begleitung während des gesamten Prozesses bedanken. Die ständige Unterstützung und permanente Rückkoppelung haben das Gelingen überhaupt erst möglich gemacht.

Mein besonderer Dank gilt auch Frau Belinda Kempes, die mich geduldig an die Laborarbeit herangeführt hat und mich stets unterstützte.

Weiterhin danke ich meiner Mutter Frau Dr. Marianne Großer, die mir permanent mit Rat und Tat bei der Verfassung dieser Arbeit zur Seite stand und immer wieder Korrekturlesungen auf sich genommen hat.