

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

**Therapeutischer Nutzen einer
stabilisierten systemischen
Redoxbalance im Rett-Syndrom:
Bewertung plethysmographischer und
elektrophysiologischer Parameter**

INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von

Stefanie Auel

aus

Stadthagen

Göttingen 2021

Dekan: Prof. Dr. med. W. Brück

Betreuungsausschuss

Betreuer/in: Prof. Dr. M. Müller

Ko-Betreuer/in: Prof. Dr. T. Dresbach

Prüfungskommission

Referent/in: Prof. Dr. M. Müller

Ko-Referent/in: Prof. Dr. T. Dresbach

Drittreferent/in:

Datum der mündlichen Prüfung: 14. März 2022

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Therapeutischer Nutzen einer stabilisierten systemischen Redoxbalance im Rett-Syndrom: Bewertung plethysmographischer und elektrophysiologischer Parameter" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den
.....
(Unterschrift)

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung	1
1.1 Das Rett-Syndrom	1
1.1.1 Symptomatik beim Rett-Syndrom.....	1
1.2 Molekularer und genetischer Hintergrund des Rett Syndroms	2
1.3 Die zelluläre Redoxbalance	3
1.4 Reaktive Sauerstoffspezies.....	5
1.5 Mitochondriale Dysfunktionen beim Rett-Syndrom.....	6
1.6 Respiratorische Dysfunktionen beim Rett-Syndrom	8
1.7 Synaptische Plastizität	10
1.8 <i>Spreading depression</i>	12
1.9 Therapeutischer Nutzen einer stabilisierten systemischen Redoxbalance durch Antioxidantien	14
1.10 Ziele der Arbeit	15
2 Material und Methoden	17
2.1 Mausmodell des Rett-Syndroms	17
2.2 Antioxidantienfütterung.....	18
2.3 Analyse der respiratorischen Dysfunktionen.....	19
2.3.1 Ganzkörperplethysmographie.....	20
2.3.2 Plethysmographische Messungen.....	20
2.3.3 Plethysmographische Auswertungen	22
2.3.4 Auswirkung des explorativen Verhaltens auf das Atemmuster	23
2.4 Elektrophysiologische Untersuchungen.....	23
2.4.1 Herstellung akuter hippocampaler Schnitte.....	23
2.4.2 Elektrophysiologische Messungen	25
2.4.3 Auswertung der elektrophysiologischen Messungen	27
2.5 Statistiken	29
3 Ergebnisse	30
3.1 Plethysmographische Analysen.....	30
3.1.1 Vergleich der männlichen Wildtypen und hemizygoten Mäuse	31
3.1.2 Vergleich der weiblichen Wildtypen und heterozygoten Mäuse p50.....	34
3.1.3 Auswirkung des explorativen Verhaltens auf das Atemmuster	40
3.2 Elektrophysiologische Analysen	41

3.2.1	Überprüfung der basalen Synapsenfunktion	42
3.2.2	Bewertung der synaptischen Kurzzeitplastizität	47
3.2.3	Bewertung der Anoxievulnerabilität	49
4	Diskussion	58
4.1	Plethysmographische Befunde.....	58
4.2	Elektrophysiologische Befunde	61
5	Zusammenfassung.....	65
6	Literaturverzeichnis	67

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Hypoxieinduzierte <i>spreading depression</i>	13
Abbildung 2: Phänotypischer Vergleich einer <i>Mecp2^{+/-}</i> - mit einer <i>Mecp2^{-/-}</i> - Maus	18
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Ganzkörperplethysmographie	21
Abbildung 4: Praktische Durchführung der Ganzkörperplethysmographie	22
Abbildung 5: Plethysmographische Auswertung mit Clampfit	23
Abbildung 6: Schematische Darstellung der elektrophysiologischen Messungen	25
Abbildung 7: Hippokampaler Schnitt einer Maus mit schematischer Elektrodenplatzierung.....	26
Abbildung 8: Ausschnitte aus Clampfit 10.4 (Molecular Devices®)	28
Abbildung 9: Verminderte Atemfrequenzen in männlichen <i>Mecp2^{-/-}</i> -Mäusen (p50).....	31
Abbildung 10: Spektrale Zusammensetzung der Atemfrequenzen der männlichen Tiere zeigt eine deutliche Linksverschiebung in <i>Mecp2^{-/-}</i> -Mäusen (p50)	32
Abbildung 11: Die Verteilung der <i>intereventintervalle</i> der männlichen Tiere belegt eine deutlich unregelmäßigere Atmung in <i>Mecp2^{-/-}</i> -Mäusen (p50)	33
Abbildung 12: Der <i>irregularity score</i> ist in <i>Mecp2^{-/-}</i> -Mäusen (p50) signifikant höher	33
Abbildung 13: Verminderte Atemfrequenzen in weiblichen <i>Mecp2^{+/-}</i> -Mäusen (p50, p200)	35
Abbildung 14: Eindeutige Linksverschiebung der spektralen Atemfrequenzen in weiblichen <i>Mecp2^{+/-}</i> -Mäusen (p50).....	36
Abbildung 15: Progrediente Linksverschiebung der Atemfrequenzen in älteren weiblichen <i>Mecp2^{+/-}</i> -Mäusen (p200).....	37
Abbildung 16: <i>Intereventintervalle</i> bestätigen eine unregelmäßigere Atmung in allen <i>Mecp2^{+/-}</i> - Mäusen (p50).....	38
Abbildung 17: AO-Futter führt zu regelmäßigerer Atmung in älteren <i>Mecp2^{+/-}</i> -Mäusen (p200)	39
Abbildung 18: Erhöhter <i>irregularity score</i> in jungen weiblichen <i>Mecp2^{+/-}</i> -Mäusen (p50)	40
Abbildung 19: Spezifische Verhaltensweisen während der Ganzkörperplethysmographie zeigen repetitive Atemmuster	41
Abbildung 20: Der MeCP2-Mangel der hemizygoten Männchen lässt die basale synaptische Funktion intakt	43
Abbildung 21: Das AO-Futter führt zu einer Hypererregbarkeit der weiblichen <i>Mecp2^{+/-}</i> -Mäuse	44
Abbildung 22: Verminderte Erregbarkeit in männlichen Wildtypen durch das AO-Futter	45
Abbildung 23: AO-Futter führt zu einer Hypererregbarkeit in weiblichen <i>Mecp2^{+/-}</i> -Mäusen	45
Abbildung 24: AO-Futter führt bei den <i>Input-output</i> -Kurven postsynaptischer Potenziale (fEPSPs), normalisiert auf den <i>fiber volley</i> , zu einer eindeutig verminderten Erregbarkeit bei den männlichen Tieren	46
Abbildung 25: <i>Input-output</i> -Kurven postsynaptischer Potenziale (fEPSPs) der weiblichen Tiere, normalisiert auf den <i>fiber volley</i> , zeigen eine eindeutig verminderte Erregbarkeit durch die Substitution des AO-Futters	47
Abbildung 26: Tendenziell verminderte synaptische Kurzzeitplastizität in <i>Mecp2^{-/-}</i> -Mäusen.....	48
Abbildung 27: Verminderte synaptische Kurzzeitplastizität in <i>Mecp2^{+/-}</i> -Mäusen.....	49
Abbildung 28: Nach Sauerstoffentzug zeigen die <i>Mecp2^{-/-}</i> -Mäuse ein langsames synaptisches Versagen.....	50
Abbildung 29: Normalgefütterte <i>Mecp2^{+/-}</i> -Mäuse zeigen das langsamste synaptische Versagen nach Sauerstoffentzug.....	51
Abbildung 30: <i>Mecp2^{-/-}</i> -Mäuse zeigen die schnellste synaptische Regeneration nach der HSD und Reoxygenation.....	52

Abbildung 31: AO-gefütterte <i>Mecp2^{+/-}</i> -Mäuse zeigen die schnellste synaptische Regeneration nach der HSD und Reoxygenation.....	52
Abbildung 32: <i>Mecp2^{-/-}</i> -Mäuse zeigen sich hypoxietoleranter als die Wildtypen.....	53
Abbildung 33: AO-Futter erniedrigt bei den <i>Mecp2^{+/-}</i> -Mäusen die Hypoxietoleranz	54
Abbildung 34: Männliche <i>Mecp2^{-/-}</i> -Mäuse zeigen schnellere Regeneration des DC-Potentials nach der HSD als die Wildtypen.....	55
Abbildung 35: Tendenziell zügigere DC-Potential-Regeneration bei den weiblichen <i>Mecp2^{+/-}</i> -Mäusen gegenüber den Wildtypen.....	55
Abbildung 36: Männliche <i>Mecp2^{-/-}</i> -Mäuse zeigen während der HSD tendenziell niedrigere maximale Amplituden (ΔV) als die Wildtypen.....	56
Abbildung 37: Das AOF mindert bei den weiblichen <i>Mecp2^{+/-}</i> -Mäusen die maximale Amplitude (ΔV) während der HSD.....	57

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Inhaltsstoffe des Zuchtfutters	19
Tabelle 2: Die Versuchsgruppen der plethysmographischen Messungen.....	19
Tabelle 3: Zusammensetzung der artifiziellen cerebrospinalen Flüssigkeit	23

Abkürzungsverzeichnis

ACSF	artifizielle cerebrospinale Flüssigkeit
AMPA	<i>α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid</i>
AO	Antioxidantien
AOF	antioxidantienangereichertes Futter
ATP	Adenosintriphosphat
BPM	<i>breaths per minute</i>
CA	<i>cornu ammonis</i>
DC	<i>direct current</i>
EPSP	exzitatorisches postsynaptisches Potential
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
fEPSP	exzitatorisches postsynaptisches Feldpotential
GABA	γ-Aminobuttersäure
GSH	Glutathion (reduzierte Form)
GSSG	Glutathiondisulfid (oxidierte Form)
HSD	Hypoxie induzierte <i>spreading depression</i>
IGF	<i>insulin-like growth factor</i> , insulinähnlicher Wachstumsfaktor
<i>i.o.-curve</i>	<i>input-output-curve</i>
MBD	Methyl-CpG-bindende Domäne
MeCP2	Methyl-CpG-bindendes Protein 2
<i>Mecp2</i>	Methyl-CpG-bindendes Protein 2, kodierendes Gen Maus
<i>MECP2</i>	Methyl-CpG-bindendes Protein 2, kodierendes Gen Mensch
n	Anzahl
nAChR	nikotinischer Acetylcholinrezeptor
NAD	Nikotinamidadenindinukleotid
NADP	Nikotinsäureamidadenindinukleotidphosphat
NE	Norepinephrin
NF	Normalfutter
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
p200	Tiere im postnatalen Alter von ca. 200 Tagen
p50	Tiere im postnatalen Alter von ca. 50 Tagen
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
SD	<i>spreading depression</i>
TRD	Transkriptionsunterdrückungsdomäne

1 Einleitung

1.1 Das Rett-Syndrom

Das Rett-Syndrom ist eine neurologische Entwicklungsstörung, deren Ursache Mutationen im X-chromosomalen *MECP2*-Gen sind und 1966 erstmals von Dr. Andreas Rett beschrieben wurde (Rett 1966; Amir et al. 1999). Erst im Jahr 1987 wurde das Rett-Syndrom zum ersten Mal in der Medizin als Krankheit anerkannt (Hagberg et al. 1983).

Da der Gendefekt des Rett-Syndroms auf dem X-Chromosom lokalisiert ist, betrifft das Rett-Syndrom mit einer Prävalenz von 1:10000 - 15000 in erster Linie Mädchen. Bei männlichen Embryonen führt der Gendefekt aufgrund des hemizygot vorliegenden Chromosoms häufig zu einer schweren neonatalen Enzephalopathie und infolgedessen meist vor dem ersten Lebensjahr zum Tod (Chahrour und Zoghbi 2007; Villard 2007).

1.1.1 Symptomatik beim Rett-Syndrom

Die Symptomatik beim Rett-Syndroms verläuft über vier Stadien (Chahrour und Zoghbi 2007). Im ersten Stadium, das als Stagnationsphase bezeichnet wird, zeigen die Mädchen typischerweise nach sechs bis 18 Monaten normaler Entwicklung die ersten Symptome, welche sich in einer Stagnation der Entwicklung äußern. Etwa ab dem zweiten Lebensjahr kommt es zur Mikrozephalie, die als frühes Anzeichen einer neurologischen Beteiligung gilt, einhergehend mit Wachstumsverzögerung, Gewichtsverlust und Muskelhypotonie (Chahrour und Zoghbi 2007).

Im zweiten Stadium, der Regressionsphase, folgt ein schneller Rückgang in Form von Sprachverlust, motorischen Einschränkungen, mentaler Retardierung, Angst, Schlafstörungen und Handstereotypien, die sich als Waschbewegung der Hände äußern (Hagberg et al. 1983; Chahrour und Zoghbi 2007). Hinzu kommen autismusähnliche Merkmale, zunächst als Bedürfnis nach verlängertem Schlaf und Ruhe am Tag, später in Form ausgeprägter autistischer Merkmale wie Schallüberempfindlichkeit, sichtbare Ausdruckslosigkeit im Gesicht, herabgesetzte Reaktionen im Sozialverhalten und vermindertem Augenkontakt (Nomura und Segawa 1990; Nomura 2005). Außerdem wurde das Auftreten epileptischer Anfälle (sowohl fokal, als auch generalisiert) beschrieben. Am häufigsten kommen partiell komplexe, tonisch-klonische, tonische und myoklonische Anfälle vor (Steffenburg et al. 2001). Erwähnenswert sind zudem die respiratorischen

Dysfunktionen der Patientinnen, welche sich in Form von Atmungsunregelmäßigkeiten, Apnoen mit daraus folgender intermittierender Hypoxie, sowie Hyperventilation äußern (Glaze et al. 1987; Bissonnette und Knopp 2006; Weese-Mayer et al. 2006; Stettner et al. 2008). Diese Atmungsstörungen können zu kardialen Dysregulationen führen oder sie verstärken, welche zusammen mit den epileptischen Anfällen ursächlich für das Auftreten eines plötzlichen Todes sind (Julu et al. 2001; Steffenburg et al. 2001).

Innerhalb des dritten Stadiums erreicht die Krankheit eine pseudostationäre Phase, die durch eine Stabilisierung der Symptome geprägt ist. Die autismusähnlichen Symptome können sich verringern, die Ataxie und Apraxie ist in dieser Zeit, die sich über mehrere Jahre erstrecken kann, jedoch weitestgehend stark ausgeprägt (Hagberg und Witt-Engerström 1986; Chahrour und Zoghbi 2007).

Das vierte Stadium, die Phase der späten motorischen Verschlechterung, beginnend etwa ab dem zehnten Lebensjahr, zeichnet sich durch eine zunehmende Degeneration der Motorik mit steigender Spastik, Muskelschwäche, allgemeinem Versteifen und Skoliose aus. Der emotionale Kontakt hingegen verbessert sich und die epileptischen Anfälle nehmen tendenziell ab (Hagberg et al. 1983; Hagberg und Witt-Engerström 1986; Chahrour und Zoghbi 2007).

Trotz der Schwere der Symptome erreichen einige Patienten ein Lebensalter von 40 bis 50 Jahren (Hagberg et al. 2001).

1.2 Molekularer und genetischer Hintergrund des Rett Syndroms

Die Ursache für die Ausbildung des Rett-Syndroms ist bei über 90% der Patienten eine Mutation im Methyl-CpG-bindenden-Protein-2(*MECP2*)-Gen (Amir et al. 1999). Das *MECP2*-Gen befindet sich an der Spitze des langen Arms des X-Chromosoms (Xq28). Es kodiert für das MeCP2 (Methyl-CpG-bindendes Protein 2), das als transkriptioneller Regulator agiert und die Transkription verschiedener Gene sowohl stimulieren als auch hemmen kann und außerdem am alternativen Spleißen neuronaler Gene beteiligt ist (Chahrour et al. 2008). Diese Eigenschaften erhält es durch seine zwei funktionellen Domänen, die 85 Aminosäuren Methyl-CpG-Bindungsdomäne (MBD) und die 104 Aminosäuren Transkriptionsunterdrückungsdomäne (TRD) (Amir et al. 1999).

Das MeCP2-Protein bindet selektiv 5-Methylcytosinreste in symmetrisch positionierten CpG-Dinukleotiden (Lewis et al. 1992), die sich bevorzugt in den Promotorregionen befinden, welche nach der DNA-Methylierung transkriptionell stillgelegt werden. Die

MBD dient der Bindung an 5-Methylcytosin, die TRD interagiert mit der Histondeacetylase und dem transkriptionellen Protein SIN3A (Nan et al. 1993). Diese Interaktionen führen schließlich zur Deacetylierung von Kernhistonen und dadurch zur transkriptionellen Repression (Jones et al. 1998; Nan et al. 1998). Die MeCP2-Expression ist nicht ubiquitär, die höchsten Werte werden in zentralen Neuronen gemessen (Jung et al. 2003).

In den über 700 identifizierten *MECP2*-Mutationen kommen sowohl *Missense*-, *Nonsense*-, als auch *Frameshift*-Mutationen vor, die in der unterschiedlichen Zusammensetzung den Schweregrad des Rett-Syndroms bestimmen. So ist beispielsweise in einer Studie, die die acht häufigsten Mutationen verglich, die *Nonsense*-Mutation p.R270X mit den meisten Todesfällen verbunden (Jian et al. 2005).

Das vornehmliche Auftreten des Rett-Syndroms bei Frauen erklärt sich dadurch, dass die *De-novo*-Mutation vor allem paternalen Ursprungs ist (Girard et al. 2001; Trappe et al. 2001). Die häufigste Mutation stellt hier die Transition von Cytosin und Thymin dar (Wan et al. 1999).

Das *Mecp2*-Gen unterliegt der zufälligen X-Chromosomeninaktivierung, was bei den weiblichen Mäusen zur Expression von mosaikähnlichen Mustern des MeCP2 und in der Folge zur Ausbildung heterogener Phänotypen führt (Young und Zoghbi 2004; Chahrour et al. 2008). Den oft in Studien verwendeten männlichen hemizygoten Mäusen fehlt das MeCP2 hingegen vollständig (Guy et al. 2001).

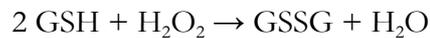
1.3 Die zelluläre Redoxbalance

Die zelluläre Redoxbalance beschreibt einen Zustand, in dem Reduktions- und Oxidationsprozesse der Zelle fein reguliert sind (Sinha et al. 2013). Sichergestellt wird diese Balance durch eine Reihe von Enzymen und zellendogenen, niedermolekularen Verbindungen, wie beispielsweise Glutathion (GSH/GSSG), Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NAD(P)H/NAD(P)), Ascorbinsäure (Vitamin C) sowie die in dieser Arbeit substituierten Tocopherole (Vitamin E-Derivate), α -Liponsäure und N-Acetyl-L-Cystein. Als regulierende Enzyme sind hier in erster Linie die Glutathion-Peroxidase, die Glutathionreduktase, die Glutathiontransferasen, die Katalase und die Superoxiddismutase zu nennen (Halliwell 1997; Mruk et al. 2002).

Glutathion ist ein Tripeptid aus den Aminosäuren Glutaminsäure, Cystein und Glycin, das in den Zellen reduzierende Bedingungen aufrecht erhält (Meister 1992). Insbesondere ist es für die Reduktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) zuständig, um die Zelle so vor

oxidativen Schäden zu schützen. Als funktionelle Gruppe enthält es durch den Bestandteil Cystein eine Sulfhydrylgruppe, die bei der Reduktion von H_2O_2 durch die Glutathion-Peroxidase oxidiert wird und sich mit der entsprechenden Sulfhydrylgruppe eines zweiten Glutathions durch eine Disulfidbrücke verbindet (Formel 1) (Mills 1957).

Formel 1



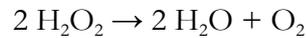
Die Glutathionreduktase gewinnt durch eine NADPH-abhängige Reduktion der Disulfidbrücke das Glutathion zurück (Mills 1957). Das Gesamtverhältnis von GSH/GSSG liegt im Bereich von 30:1 und 100:1 (Bass et al. 2004; Raturi und Mutus 2007; Zhang et al. 2012).

In den Untersuchungen dieser Arbeit werden insbesondere die Wirkungen von Tocopherol, α -Liponsäure und N-Acetyl-L-Cystein begutachtet. Tocopherole sind Derivate des Vitamin E und schützen als Antioxidans vor allem mehrfach ungesättigte Fettsäuren, indem sie mit Peroxylradikalen reagieren und so eine Peroxylradikalkettenreaktion verhindern (Wang und Quinn 1999; Traber und Atkinson 2007). Die so entstandenen Tocopherolradikale können durch Vitamin C oder Glutathion reduziert werden und Tocopheroldimere bilden, die dann oxidiert werden und als Proantioxidantien wirken (Lee und Han 2018). Die α -Liponsäure ist als Coenzym an oxidativen Decarboxylierungen beteiligt, das seine Wirkung sowohl in reduzierter als auch in oxidiert Form entfaltet. Es ist zudem an der Regeneration verbrauchter Antioxidantien wie Vitamin C, Vitamin E und Glutathion beteiligt (Bast und Haenen 1988; Sumathi et al. 1996; Packer 1998). N-Acetyl-L-Cystein erhält sein antioxidative Wirkung vor allem als Vorläufer für die Bildung von Glutathion in defekten Zellen (Rushworth und Megson 2014).

Unter den regulierenden Enzymen der zellulären Redoxbalance sind insbesondere die Superoxiddismutase und die Katalase hervorzuheben. Die Superoxiddismutase entfernt Sauerstoffradikale, wie etwa das Superoxidion, durch die Übertragung des überschüssigen Elektrons auf sich selbst. Zur Regeneration der Superoxiddismutase wird sie durch ein weiteres Superoxidion und Wasserstoff oxidiert. Das nun entstehende Wasserstoffperoxid kann wiederum durch den oben genannten Weg des GSH/GSSG entschärft werden (Fridovich 1986; McCord und Fridovich 1988). Zur Umsetzung von Wasserstoffperoxid zu Wasser und Sauerstoff dient außerdem die Katalase (Chance 1948). Beginnend mit einer Reduktion des Wasserstoffperoxids und Oxidation der Katalase entsteht zunächst Wasser.

Im nächsten Schritt werden sowohl Wasserstoffperoxid als auch die Katalase reduziert, Sauerstoff oxidiert und damit zusätzlich zum vorher entstandenen Wasser freigesetzt (Formel 2) (Chance et al. 1952).

Formel 2



1.4 Reaktive Sauerstoffspezies

Allgemein dienen Antioxidantien der Zelle als Schutz vor oxidativem Stress. Oxidativer Stress bezeichnet eine Stoffwechsellage, bei der eine außerordentlich hohe Konzentration reaktiver Sauerstoffspezies vorhanden ist und sich die Redoxbalance so aus dem Gleichgewicht bewegt (Milton und Sweeney 2012). ROS gelten als schädliche Formen des Sauerstoffs, die im Rahmen von sauerstoffabhängigen Redoxreaktionen entstehen (Harman 1956).

Zu den bekanntesten ROS gehören das Hyperoxid Anion (O_2^-), Hydroxyl-Radikal ($\text{HO}\cdot$), Peroxylradikal ($\text{ROO}\cdot$), Alkoxyradikal ($\text{RO}\cdot$), Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Hydroperoxid (ROOH), Ozon (O_3), Hypochlorit-Anion (OCl^-) und der Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$). Sie entstehen sowohl in Mitochondrien als auch in endoplasmatischen Retikula, in den Peroxisomen, in NADPH-Oxidasen und Lysosomen (Boveris et al. 1972; Bokoch und Knaus 2003; Liu et al. 2004; Kurz et al. 2008). Bei der mitochondrialen Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies sind vor allem die Komplexe I und III der Atmungskette beteiligt (Kushnareva et al. 2002; Chen et al. 2003).

Reaktive Sauerstoffspezies wurden mit einigen neurodegenerativen Erkrankungen, wie beispielsweise Morbus Alzheimer und Morbus Parkinson in Verbindung gebracht (Andersen 2004). Übermäßige Konzentrationen von ROS und mitochondriale Dysfunktionen können zudem die Apoptose aktivieren (Lin und Beal 2006).

In physiologischer Konzentration wird einigen ROS eine wichtige Funktion in der Signaltransduktion zugeschrieben. Hier sind in erster Linie Wasserstoffperoxid und Superoxid zu nennen. Sie sind im Gehirn sowohl bei der Signaltransduktion, als auch bei der synaptischen Plastizität, genauer der Langzeitpotenzierung beteiligt (Kishida und Klann 2007). Die Langzeitpotenzierung ist an einigen Prozessen beteiligt, die u. a. für das Lernen und das Gedächtnis erforderlich sind (Shapiro 2001; Lynch 2004). Im Gehirn stellt die NADPH-Oxidase eine der wichtigsten Quellen für ROS, vor allem für Superoxid dar, da sie für einige Signaltransduktionskaskaden, synaptische Plastizität und auch kognitives

Verhalten erforderlich ist (Kishida und Klann 2007). Gestützt wird diese These durch Untersuchungen an Mäusen, die eine verringerte Superoxidproduktion mit verringerter synaptischen Plastizität und kognitiven Funktion in Zusammenhang bringen (Kishida et al. 2006).

1.5 Mitochondriale Dysfunktionen beim Rett-Syndrom

Mitochondrien sind bekannt durch ihre enorme Adenosintriphosphat(ATP)-Produktion in ihrer Matrix, die den Raum darstellt, der von der inneren Membran umschlossen wird (Mitchell 1961; Erecinska und Silver 1989). Allerdings produzieren sie auch die für unsere Untersuchungen relevanten ROS (Turrens 1997; Murphy et al. 1999). Die ROS werden vor allem an den Atmungskettenkomplexen I und III generiert (Kushnareva et al. 2002; Chen et al. 2003).

Früher wurde davon ausgegangen, dass eine Stoffwechselstörung ursächlich für die Ausbildung des Rett-Syndroms ist (Matsuishi et al. 1994). Diese Vermutung wurde auf das Auftreten einiger klinischer Symptome, wie etwa Hyperventilation und Apnoen, zurückgeführt, die Hinweise auf bekannte Stoffwechselstörungen wie beispielsweise Pyruvatdehydrogenase-Mangel, Pyruvatcarboxylasemangel und Thiaminmangel gaben. Unterstützt wurde dies durch den Nachweis von erhöhten und schwankenden Lactat- und Pyruvatspiegeln im Blutserum und Liquor einiger Patienten mit Rett-Syndrom. Dies konnte jedoch nur bei Patienten mit Atmungsstörungen nachgewiesen werden, was den Zusammenhang zwischen erhöhten Lactat- und Pyruvat-Spiegeln und Atemwegsanomalien abbildet (Matsuishi et al. 1994; Haas et al. 1995). Zudem wurde eine leicht erhöhte Glukoseverwertung bei Patienten mit Rett-Syndrom gefunden, die auf eine Störung im Glucosestoffwechsel hinwies (Haas et al. 1995; Villemagne et al. 2002).

Auffällig war zunächst die Morphologie der Mitochondrien der Patienten mit Rett-Syndrom. Mittels Elektronenmikroskopie an Frontallappen- und Muskelbiopsiegewebeproben konnten Besonderheiten der Mitochondrien in Form von Vergrößerung, kontrastarmen Aussehen, einem sehr hohen Ribosomengehalt, eingeschlossenen Granulaten, Vakuolisierung und unregelmäßigen Cristae dargestellt werden (Eeg-Olofsson et al. 1990; Dotti et al. 1993; Cornford et al. 1994). Ursächlich für die Symptome beim Rett-Syndrom wurden aufgrund dieser morphologischen Veränderungen auch funktionelle Defekte der oxidativen Phosphorylierung angenommen (Eeg-Olofsson et al. 1990). Dies bestätigte sich in Analysen von Muskelbiopsiematerial, in dem verminderte Aktivitäten von einigen Enzymen der Atmungskette (NADH-

Cytochrom-c-Reduktase, Succinat-Cytochrom-c-Reduktase, Cytochrom-c-Oxidase) festgestellt wurden (Coker und Melnyk 1991). Selbst bei stabilisierten neurologischen Symptome von Patienten wurde ein zunehmender mitochondrialer Abbau nachgewiesen (Cornford et al. 1994). Zudem wurde eine Überexpression des Ubiquinol-Zytochrom-C-Reduktase-Kernproteins 1 (Uqcrc 1), mit dessen Promotor MeCP2 interagiert und das eine Untereinheit des mitochondrialen Atmungskomplexes III kodiert, festgestellt. Dies gilt ursächlich für einen erhöhten mitochondrialen Sauerstoffverbrauch (Kriaucionis et al. 2006).

In Hippokampus-Schnitten von Rett-Mäusen wurden erhöhte FAD/NADH-Autofluoreszenzwerte und eine Verringerung der Membranpolarisation in Form eines weniger negativen Membranpotenzials gemessen. Enzymaktivitätstests und Aufzeichnungen von Sauerstoffelektroden zeigten eine bis zu 30% gesteigerte Atemfrequenz und reduzierte mitochondriale Kopplung. Dies stützt die Mutmaßung eines Protonenlecks über der inneren Mitochondrienmembran und einer kompensatorischen Erhöhung der mitochondrialen Atmung (Kriaucionis et al. 2006; Großer et al. 2012).

Ursächlich für die mitochondrialen Veränderungen wurden sowohl Mutationen der mitochondrialen DNA, als auch eine X-Chromosom-getragene Genmutation und eine funktionelle Dysregulation der Mitochondrien angenommen (Eeg-Olofsson et al. 1990).

Als weitere Anomalie des Energiestoffwechsels, infolge der funktionsbeeinträchtigten Mitochondrien, wurden mittels Magnetresonanztomographie reduzierte ATP-Spiegel im Gehirn von *Mecp2^{fl/y}*-Mäusen gemessen, die zu Hirnschäden und Dysfunktionen führen oder solche darstellen können (Saywell et al. 2006). Im Hippokampus von adulten *Mecp2^{fl/y}*-Mäusen wurden jedoch ein normaler zellulärer ATP-Gehalt festgestellt, was die These einer kompensatorischen gesteigerten mitochondrialen Atmung zur Gewährleistung der ATP-Versorgung stärkt (Fischer et al. 2009). Parallel zur gesteigerten basalen mitochondrialen Respiration wurde eine erhöhte mitochondriale ROS-Generation festgestellt (Can et al. 2019). Diese konnte in unserer Arbeitsgruppe hinsichtlich einer verstärkten mitochondrialen H₂O₂-Freisetzung über der gesamten Lebensspanne männlicher und weiblicher Rett-Mäuse in allen Hirnregionen, bei den weiblichen Tieren insbesondere im Hippokampus, Hirnstamm und Mittelhirn, eindeutig nachgewiesen werden (Adebayo et al. 2020).

1.6 Respiratorische Dysfunktionen beim Rett-Syndrom

Patienten mit dem Rett-Syndrom leiden häufig unter Atmungsstörungen, die durch Hyperventilation mit anschließenden Atemdepressionen und Atemaussetzern charakterisiert sind (Glaze et al. 1987; Southall et al. 1988; Ramirez et al. 2020). Es konnten bisher zwar keine spezifischen Mutationen nachgewiesen werden, die mit Atmungsstörungen korrelieren, jedoch wiesen Patienten mit trunkierenden Mutationen eine höhere Inzidenz wacher respiratorischer Dysfunktionen auf als Patienten mit *missense*-Mutationen (Amir et al. 2000; Van den Veyver und Zoghbi 2000).

Als mögliche Ursachen für die Atemstörungen wurden eine dysfunktionale kortikale Strukturen (Marcus et al. 1994) und eine Unterentwicklung des Hirnstamms diskutiert (Julu et al. 1997). Für eine Störung von Mechanismen im zentralen Nervensystem spricht zudem das episodische Auftreten der Atemstillstände (Weese-Mayer et al. 2006; Ramirez et al. 2020). Das bei Rett-Patienten vermehrte Auftreten von Atmungsunregelmäßigkeiten wird insbesondere in einer gestörten Kontrolle der postinspiratorischen Phase vermutet (Stettner et al. 2007). Die postinspiratorische Phase ist neben der vorhergehenden inspiratorischen und nachfolgenden expiratorischen Phase Teil des Atemzyklus, der in der *Medulla oblongata*, genauer im Kerngebiet der dorsalen respiratorischen Gruppe und der ventralen respiratorischen Gruppe, durch die Generierung des basalen Atemrhythmus bestimmt wird. Die Neurone in der ventralen respiratorischen Gruppe bilden mit sechs verschiedenen Neuronengruppen, die jeweils synchron aktiv werden, das respiratorische Netzwerk. Als wesentlicher Produzent des Atemrhythmus stellte sich der Pre-Bötzinger Komplex in der ventralen respiratorischen Gruppe heraus (Smith et al. 1991; Rekling und Feldman 1998). Es konnte bisher kein klarer Zusammenhang zwischen einer respiratorischen Dysregulation und einem MeCP2-Zielgen gefunden werden. Vermutet werden Störungen in der Signaltransduktion des respiratorischen Netzwerkes, genauer eine verringerte Expression des *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) (Chang et al. 2006; Wang et al. 2006), verminderte Konzentrationen biogener Amine (Ide et al. 2005) und eine verminderte γ -Aminobuttersäure (GABA) vermittelte Signaltransduktion (Medrihan et al. 2008). Metabolite des biogenen Amins Norepinephrin (NE), dem eine Schlüsselfunktion bei der Entwicklung und Modulation des respiratorischen Netzwerkes zugeordnet wird (Hilaire et al. 2004; Viemari et al. 2004), wurde bei Rett-Syndrom-Patienten in verminderten Mengen gefunden (Zoghbi et al. 1985). Ursächlich für den NE-Mangel wurde eine mangelhafte Expression der Tyrosin-Hydroxylase und Dopamin- β -Hydroxylase in den Neuronen des *Locus caeruleus* angenommen (Zhang et al. 2010). Obwohl die Genese

der respiratorischen Dysfunktionen noch diskutiert wird, konnte durch die gezielte Entfernung von MeCP2 aus dem Hirnstamm und Rückenmark von Mäusen eine erhöhte Letalität, eine verminderte Herzfrequenz und ausgeprägte respiratorische Reaktionen auf Hypoxie und bei Wiederherstellung der Expression des MeCP2 in diesen Regionen eine eindeutige Verbesserung der genannten Symptome festgestellt werden (Ward et al. 2011).

Die Atemdepressionen nach einer Hyperventilation bedürfen eines ubiquitären Mangels an MeCP2. Eine verstärkte Reaktion auf Hypoxie lässt sich bereits bei einem auf Neuronen beschränkten Mangel feststellen (Bissonnette und Knopp 2006). Zudem ist jede Apnoe mit einer anfänglich raschen Abnahme der Herzfrequenz verknüpft, an deren Anschluss ein Überschwingen der Herzfrequenz folgt, sodass durch diese Verkettung vermutlich ein erhöhter hypoxischer und oxidativer Stress und daraus folgende kardiorespiratorische Dysregulationen resultieren (Nanduri et al. 2009). Kehren die Apnoen häufig wieder, so können sie zu einer Verlängerung des QT-Intervalls sowie niedrigeren Herzratenvariabilitäten führen (Sekul et al. 1994; Guideri et al. 1999). Die Herzratenvariabilität bezeichnet physiologische Schwankungen der Herzfrequenz im Sinne einer Verlängerung des RR-Abstandes als Reaktion und stellt einen Parameter für die autonome Funktion des Herzens dar (Guyton et al. 1951; Guyton und Harris 1951; Akselrod et al. 1981). Eine verringerte Herzratenvariabilität ist ein Marker für eine autonome Störung des Herzens und ein Hinweis auf ein hohes Risiko für den plötzlichen Herztod (Akselrod et al. 1981; Schwartz und Stone 1982). Die kardiorespiratorische Dysregulation der Patienten mit Rett-Syndrom wurde sowohl während als auch vor und nach den Apnoen festgestellt und steht in Zusammenhang mit dem häufigen plötzlichen Tod der Patientinnen (Weese-Mayer et al. 2006). Studien, in denen Mädchen mit dem Rett-Syndrom im Vergleich zu gesunden Mädchen eine niedrigere Herzfrequenzvariabilität und längere korrigierte QT-Intervalle aufwiesen, stellten außerdem eine Progression der Dysfunktionen mit fortschreitendem Stadium des Syndroms fest (Guideri et al. 2001). Obwohl die kardiorespiratorischen Dysfunktionen sowohl am Tag als auch in der Nacht festgestellt wurden, traten die Atmungsstörungen bei Rett-Syndrom-Patientinnen im wachen Zustand schwerwiegender als im Schlaf auf, was schlussfolgern lässt, dass das dysregulatorische Ausmaß in der Nacht weniger Konsequenzen als am Tag trägt (Weese-Mayer et al. 2008).

1.7 Synaptische Plastizität

Es folgt zunächst ein kurzer Überblick über die Grundlagen der synaptischen Plastizität im Hippokampus, da sie für die elektrophysiologischen Untersuchungen dieser Arbeit von hoher Relevanz sind.

In den Pyramidenzellen des Hippokampus sind vornehmlich ionotrope Glutamatrezeptoren, genauer NMDA(N-Methyl-D-Aspartat)- und AMPA(α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic-acid)-Rezeptoren, an denen der exzitatorische Neurotransmitter Glutamat bindet (Watkins und Evans 1981; Mayer und Westbrook 1987; Collingridge und Lester 1989), lokalisiert. Glutamat führt in erster Linie zu einem Einstrom von Natrium-Ionen. Dies erklärt sich daraus, dass die NMDA-Rezeptoren bei normalem Ruhepotential der Zelle durch Magnesiumionen blockiert sind und die freien AMPA-Rezeptoren nur Natriumionen passieren lassen (Nowak et al. 1984). Bindet Glutamat an die AMPA-Rezeptoren der Postsynapse, so kommt es dort zu einem Einstrom von Natriumionen und in der Folge zu einer Depolarisation der Postsynapse und einem exzitatorischen postsynaptischen Potential (EPSP). Hält die Depolarisation an oder ist ausreichend hoch, löst sich die Magnesiumblockade der NMDA-Rezeptoren und es können zusätzlich Kalziumionen in die Postsynapse einströmen (Mayer und Westbrook 1987; Stern et al. 1992; Bliss und Collingridge 1993). Die EPSPs, die meist an den Dornfortsätzen der Dendriten entstehen, werden weitergeleitet zum Axonhügel des postsynaptischen Neurons und können dort je nach Größe des Potentials zur Entstehung eines Aktionspotenzials führen.

Die Stärke der präsynaptischen Neurotransmitterfreisetzung hängt zu einem großen Teil von der intraterminalen Kalziumkonzentration ab, da die intraterminalen Kalziumionen über eine Bindung an das Membranprotein Synaptotagmin, das daraus resultierend mit Synaptobrevin, SNAP-25 und Syntaxin interagiert, die schließlich die Verschmelzung der Vesikelmembran mit der Plasmamembran vermitteln, die Transmitterabgabe in den synaptischen Spalt induzieren (Han und Jackson 2006; Hui et al. 2011; Krishnakumar et al. 2011). Gesteuert wird die intraterminale Kalziumkonzentration einerseits durch spannungsabhängige Kalziumkanäle, andererseits jedoch auch durch die Frequenz der eintreffenden Aktionspotenziale. Treffen an der Präsynapse bspw. zwei aufeinanderfolgende Aktionspotenziale innerhalb von weniger als 200 ms ein, wird das zweite Aktionspotential durch das vom ersten Aktionspotential noch vorhandene residuale Kalzium ein größeres EPSP als das vorherige Aktionspotential auslösen. Dieser Vorgang wird als synaptische Plastizität bezeichnet. Hält diese Plastizität nur einen kurzen Zeitraum

von Millisekunden bis Sekunden an, so wird sie als Kurzzeitplastizität bezeichnet, dauert sie länger an, wird von Langzeitplastizität gesprochen (Bliss und Lomo 1973; Zucker und Regehr 2002). Folgt auf eine zweite Stimulation eine verminderte Reizantwort, handelt es sich um eine synaptische Depression. Deren Ursache wird in einer verminderten Menge fusionsbereiter Vesikel an der präsynaptischen Membran gesehen (Mori et al. 1994; Zucker 1999).

Der Hippokampus, der sich beim Menschen an der Innenseite des Temporallappens befindet und ein wesentlicher Bestandteil des limbischen Systems ist, wird im Frontalschnitt in die Bereiche *Gyrus dentatus*, *Cornu ammonis* (CA) und *Subiculum* eingeteilt. Im *Cornu ammonis* werden die vier Felder CA1, CA2, CA3 und CA4 unterschieden. Für diese Arbeit ist v.a. die Verbindung der CA3- zu den CA1-Neuronen von Bedeutung. Auf die CA3-Neurone wird von den Axonen der Körnerzellen des *Gyrus dentatus*, die ihre Informationen aus dem entorhinalen Kortex erhalten, projiziert (Andersen et al. 1969; Andersen et al. 1971). Die CA3-Neurone stehen über die Schaffer-Kollaterale, die durch ihre gebündelten Axone gebildet werden, mit den apikalen Dendriten der CA1-Neurone in Verbindung. Die CA1-Neurone senden schließlich Afferenzen über das *Subiculum* zurück in den entorhinalen Kortex. Die Pyramidenzellen des Hippokampus sind über exzitatorische glutamaterge Synapsen, insbesondere mit AMPA- und NMDA-Rezeptoren verbunden (Andersen et al. 1971; Swanson et al. 1978).

Studien zufolge ist die basale Synapsenfunktion bei Rett-Syndrom-Patientinnen zwar intakt, jedoch ist eine Hypererregbarkeit bis hin zu epileptischen Anfällen nachweisbar (Glaze 2005). Als Ursache dieser Übererregbarkeit wird eine an MeCP2-Null-Mäusen nachgewiesene verminderte basale inhibitorische, rhythmische Aktivität gesehen, die in Verbindung mit verringerten synaptischen Strömen in den hippocampalen CA3-Neuronen auftrat (Zhang et al. 2008). Zudem wurde eine Beeinträchtigung der synaptischen Plastizität nachgewiesen. Synapsen der Schaffer Kollaterale wiesen eine erhöhte basale synaptische Übertragung und eine verringerte *paired pulse facilitation*, die eine verstärkte postsynaptische Antwort nach zweimaliger Stimulation der Präsynapse bezeichnet, auf. Da keine erhöhte postsynaptische Dichte festgestellt wurde, wird die Ursache in einer erhöhten synaptischen Neurotransmitterfreisetzung vermutet (Asaka et al. 2006; Moretti et al. 2006). Auch die Langzeitpotenzierung des Hippokampus wurde in vielen Untersuchungen im Rett-Syndrom als beeinträchtigt festgestellt (Guy et al. 2001; Malenka und Bear 2004; Asaka et al. 2006; Moretti et al. 2006; Janc und Müller 2014).

1.8 *Spreading depression*

Unter einer *spreading depression* (SD), die 1944 zum ersten Mal von Aristides Leão im Neokortex vom Kaninchen beschrieben wurde, wird eine massive Depolarisation von Neuronen und Gliazellen verstanden. Dabei kommt es zu einer Verschiebung von Ionen in Form eines Austausches zwischen dem Intra- und Extrazellularraum, in dessen Folge das Membranpotential zusammenbricht. Die SD breitet sich schließlich durch die graue Substanz aus. Dies geht mit einem kompletten transienten Verlust der neuronalen Funktion einher (Leão 1944; Leao 1947; Hansen und Zeuthen 1981; Hansen et al. 1982; Somjen 2001).

Es werden die in dieser Arbeit untersuchten hypoxischen SDs, welche durch Sauerstoffentzug oder auch Cyanidvergiftungen ausgelöst werden (Hypoxie induzierte SD (HSD)), von normoxischen SDs, die durch andere Faktoren wie Glutamat, erhöhte extrazelluläre Konzentrationen von Kaliumionen, alkalische pH-Werte, geringe Osmolarität, hochfrequente elektrische Impulse und Gleichstrom ausgelöst werden, unterschieden (Roitbak und Bobrov 1975; Lauritzen et al. 1988; Chebabo et al. 1995; El-Bacha et al. 1998; Hossmann 2003; Gerich et al. 2006). Beide Phänomene verbindet eine transiente Unterbrechung der neuronalen Aktivität, eine negative Verschiebung des extrazellulären Potentials, eine enorme Umverteilung der Ionen über der Membran sowie eine massive, fast vollständige Depolarisation von Neuronen und Gliazellen (Leão 1944; Leao 1947; Hansen und Zeuthen 1981; Somjen 2001). Die beschleunigende und regenerative Depolarisation, die einem „Alles-oder-Nichts“-Prinzip folgt, breitet sich wellenförmig mit ca. 3 bis 5 mm pro Minute aus (Lauritzen 1994; Somjen 2001).

Der Beginn einer HSD ist gekennzeichnet durch eine Hypoxie induzierte rückläufige ATP-Synthese. Da ATP über den Betrieb der Natrium/Kalium-ATPase zur Stabilisierung des Membranpotenzials notwendig ist, öffnen die Neuronen die Kaliumkanäle, um einer vollständigen ATP-Depletion entgegen zu wirken (Müller und Somjen 2000; Müller 2005). Auf den vermehrten Kaliumausstrom aus der Zelle strömen Natrium, Chlorid und Kalzium in die Zelle, woraufhin Wasser folgt und schließlich aufgrund der Zellschwellung der extrazelluläre Raum schrumpft (Hansen und Zeuthen 1981; Hansen 1985; Canals et al. 2005). Die Kaliumakkumulation im extrazellulären Raum führt über eine erhöhte Erregbarkeit der Neurone zu einer weiteren Depolarisation in Neuronen und Gliazellen, woraufhin sich ein erneuter Kaliumausstrom, verbunden mit einem Natriumeinstrom anschließt, in Folge dessen schließlich die neuronale Erregbarkeit verloren geht (Müller und Somjen 2000; Somjen 2001). An dieser Stelle ist zu erwähnen, dass Gliazellen eine

verzögernde Wirkung auf die Auslösung einer SD zugeschrieben werden. Sie sind in der Lage, Kaliumionen aus dem interstitiellen Raum aufzunehmen und so die dortige Kaliumakkumulation zunächst noch zu verlangsamen (Müller und Somjen 2000).

Während einer SD lassen sich, als Projektion der starken Depolarisation der Neuronen und Gliazellen, extrazellulär enorme Spannungsveränderungen des DC(*direct current*)-Potenzials von bis zu -30 mV ableiten. Es folgt auf die massive Negativierung eine kurze Phase der Repolarisation, die jedoch in einer zweiten, länger anhaltenden Negativierung mündet (Müller und Somjen 2000; Somjen 2001).

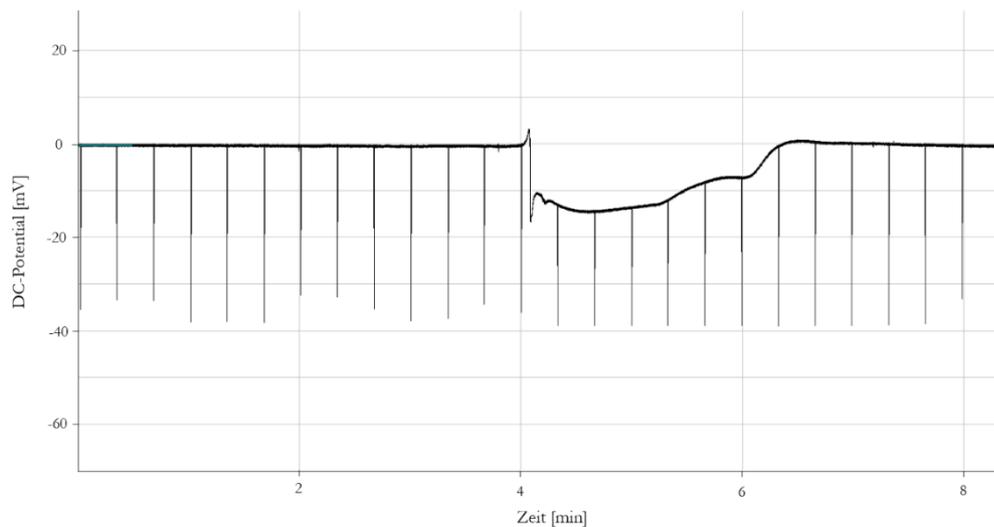


Abbildung 1: Hypoxieinduzierte *spreading depression*

Extrazelluläre Ableitung einer hypoxieinduzierten *spreading depression*, gekennzeichnet durch ein massiv abfallendes DC-Potenzial auf ca. -15 mV, welches die Depolarisation der Neuronen und Gliazellen widerspiegelt. Nach der Depolarisation folgt eine kurze Repolarisation, sichtbar durch einen transienten Anstieg des DC-Potenzials, an die sich eine erneute Depolarisation und Negativierung des DC-Potenzials anschließt. Nach der HSD kommt es häufig zu einer Hyperpolarisation der Neuronen und Gliazellen, die sich hier in einer Positivierung des DC-Potenzials darstellt.

Nach der Ausbreitung der zellulären Depolarisation folgt zunächst eine elektrische Stille, welche die sich entwickelnde Unterdrückung der elektrischen Aktivität in den Nervenzellen widerspiegelt (Leão 1944). Dieses Phänomen entsteht durch die anhaltenden überschwelligeren Depolarisationen, in dessen Folge die spannungsgesteuerten Natriumkanäle der Nervenzellen, die die Aktionspotenziale erzeugen, inaktiviert werden (Kager et al. 2002).

Die SD verursacht zwar in der Regel im intakten Hirngewebe keine neuronalen Schäden, kann aber dennoch bei wiederholtem Auftreten oder im vorgeschädigten Gewebe durch intrazelluläre Kalziumüberlastung zum Untergang der Zelle führen (Nedergaard und Hansen 1988; Dietz et al. 2008). Auch bei einer HSD kann sich das Gewebe, sofern die Sauerstoffversorgung rechtzeitig wiederhergestellt wird, ohne erkennbare neuronale Verletzungen erholen. Geschieht dies nicht, so können nach wenigen Minuten dauerhafte Schäden auftreten, besonders in Regionen, die empfindlich auf Hypoxie und Ischämie reagieren, zu denen beispielsweise die CA1-Region des Hippokampus gehört (Somjen et al. 1993; Richter et al. 2008). In dieser Region kommt es in den Pyramidenzellen zu einem depolarisationsbedingten Kalziumeinstrom in die Neurone und demzufolge zu einem irreversiblen zytotoxischen Prozess (Müller und Somjen 2000; Somjen 2001; Müller 2005). Zudem können depolarisationsbedingte Schäden auch durch die Zunahme der sauerstofffreien Radikalproduktion als Reaktion auf zwischenzeitliche Depolarisationen entstehen (Dreier et al. 1998).

Wird der lokale Verlauf einer HSD betrachtet, so nehmen die DC-Potenzialveränderungen ihren Beginn in den Dendriten und breiten sich anschließend in Richtung des Somas der Neurone fort (Somjen 2001).

1.9 Therapeutischer Nutzen einer stabilisierten systemischen Redoxbalance durch Antioxidantien

Das Rett-Syndrom steht in enger Beziehung zu oxidativem Stress (Sierra et al. 2001). In *Mecp2^{ly}*-Mäusen wurde eine Verschiebung der Redoxbalance in Richtung vermehrter Oxidationen im Gegensatz zu Wildtyp-Mäusen beobachtet (Großer et al. 2012). Zudem konnte eine mitochondriale Überproduktion von H₂O₂, beruhend auf einer defekten Komplex-II-Aktivität festgestellt und somit die Mitochondrien für die gesteigerte Generierung von ROS in Rett-Syndrom-Mausgehirnen verantwortlich gemacht werden (De Filippis et al. 2015). Der Komplex II spielt in Mitochondrien von Wildtypmäusen eine eher untergeordnete Rolle, da hier die ROS hauptsächlich durch die Komplexe I und III erzeugt werden (Kushnareva et al. 2002; Chen et al. 2003). Auch das Antioxidantienmanagement bei Patientinnen mit Rett-Syndrom scheint gestört zu sein, da bei ihnen nicht nur eine Abnahme der Superoxid-Dismutasen-Aktivität mit resultierender zunehmender Lipidoxidation, sondern auch ein verminderter Vitamin-E-Serumspiegel gemessen wurde (Formichi et al. 1998; Sierra et al. 2001). Jüngste Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe wiesen

zudem eine deutlich erhöhte mitochondriale H_2O_2 -Bildung in *Mecp2^{ly}*- und *Mecp2^{+/-}*-Mäusen nach (Adebayo et al. 2020).

Es lässt sich zusammenfassend sagen, dass oxidativer Stress ein zentrales Thema des Rett-Syndroms ist. Ein therapeutischer Nutzen wird sich in dieser Arbeit durch die Gabe eines antioxidantienangereicherten Futters (AOF) erhofft.

Vorangegangene Studien unserer Arbeitsgruppe zeigten bereits erste Erfolge einer Troloxinkubation akuter Hippokampuschnitte adulter *Mecp2^{ly}*-Mäuse in Form einer Dämpfung der neuronalen Übererregbarkeit, Verbesserung synaptischer Kurzzeitplastizität, vollständig wiederhergestellter Langzeitpotenzierung und einer verminderten Anfälligkeit gegenüber Hypoxie (Janc und Müller 2014). Auch eine systemische Trolox-Verabreichung mittels einer intraperitonealen Injektion zeigte unter anderem eine Verbesserung der Lipidperoxidation, der synaptischen Kurzzeitplastizität und der Hypoxietoleranz (Janc et al. 2016).

1.10 Ziele der Arbeit

Das Rett-Syndrom ist eine neuronale Entwicklungsstörung, die sich unter anderem durch eine beeinträchtigte Mitochondrienfunktion und einem daraus entstehenden erhöhten systemischen oxidativen Stress auszeichnet. Diese Veränderungen werden in Rett-Mäusen bereits vor dem Auftreten der ersten Symptome deutlich, sodass sich schlussfolgern lässt, dass eine frühe Gabe von Antioxidantien zu einer Stabilisation der neuronalen Funktion führen und damit auch Atemaussetzern entgegenwirken könnte. Da vorangegangene Studien bereits die Verbesserung neuronaler Symptome mittels Troloxinkubation und Troloxinjektion bewiesen (Janc und Müller 2014; Janc et al. 2016), soll nun auch die Wirkung oraler Supplemente von Antioxidantien auf die neuronalen Symptome des Rett-Syndroms untersucht werden. Eine orale Supplementation stellt hier im Gegensatz zur intraperitonealen Injektion eine stressminimierte Verabreichungsform und einen möglichen therapeutischen Ansatz für Rett-Patientinnen dar. Aufgrund dessen werden in dieser Arbeit normalgefütterte (NF) und antioxidantiengefütterte (AOF) *Mecp2*-Mäuse verglichen. Im Mittelpunkt dieser Untersuchungen steht der Nutzen einer oralen Supplementierung eines Futters, das mit den antioxidativ wirksamen Zusätzen α -Liponsäure, N-Acetyl-L-Cystein und Vitamin E angereichert wurde. Dabei wurden sowohl Männchen als auch Weibchen analysiert, da bei Weibchen im Gegensatz zu den Männchen der Gendefekt aufgrund der zwei X-Chromosomen heterozygot vorliegt und der Schweregrad des Rett-Syndroms somit milder ausfällt. Um den therapeutischen Nutzen der Antioxidantienfütterung über

eine längere Lebenszeit beurteilen zu können, werden bei der Analyse der respiratorischen Dysfunktionen sowohl Weibchen im Alter von ca. 50 Tagen, als auch von ca. 200 Tagen bewertet. Der Schwere des Krankheitsverlaufes bedingt, erreichen die *Mecp2^{fl/y}*-Mäuse kein hohes Lebensalter, sondern versterben meist zwischen dem 50. und 70. Lebenstag, sodass es nicht möglich ist, sie im höheren Alter zu messen.

Zur Analyse der Atmungsunregelmäßigkeiten wird das Atmungsverhalten der Mäuse mittels Ganzkörperplethysmographie bewertet. Dabei können die Häufigkeit und Ausprägung der Atmungsunregelmäßigkeiten sowie die Atemfrequenzen der verschiedenen Genotypen gezielt verglichen werden. Zudem werden einige Mäuse während ihrer Ganzkörperplethysmographiemessung gefilmt, um mögliche Verhaltensmuster und Atemmuster zueinander zuordnen zu können. Im Besonderen ist von Interesse, ob bestimmte Verhaltensmuster, wie beispielsweise exploratives Verhalten, während der Messung vermehrt gruppenspezifisch nachweisbar sind.

Die elektrophysiologischen Untersuchungen erfolgen an akuten hippocampalen Gewebeschnitten der jeweiligen Mäuse. Im Einzelnen wird der Einfluss des AO-Futters auf die Synapsenfunktion, das Ausmaß der synaptischen Plastizität und auf die Anoxievulnerabilität ermittelt. Die basale Synapsenfunktion und das Ausmaß der synaptischen Plastizität werden durch extrazellulär abgeleitete elektrische Feldpotentiale (fEPSP) bewertet, die zerebrale Anoxievulnerabilität wird mittels Auslösung einer hypoxieinduzierten *spreading depression* analysiert. Dabei steht besonders die Dauer, bis nach Auslösung der Hypoxie die HSD auftritt, sowie die Regenerationszeit nach Reoxygenierung im Fokus. Außerdem wird über den Verlauf der HSD der Verlust der synaptischen Funktion dokumentiert, um auch mögliche Änderungen in der posthypoxischen Erholungsphase in den verschiedenen Maus- und Behandlungsgruppen zu erfassen.

2 Material und Methoden

2.1 Mausmodell des Rett-Syndroms

Für die Untersuchungen in dieser Arbeit wurde das Mausmodell *Mecp2*^{tm-1-1Bird} aus der Zuchtlinie B6.129P2(C) gewählt. Es gab bereits Versuche, MeCP2-null-Mäuse mithilfe von embryonalen Stammzellen herzustellen, indem das X-verknüpfte *Mecp2*-Gen in embryonalen Stammzellen der männlichen Maus mit einer promoterfreien Genmodifikation, die ein lacZ-Gen enthielt, mutiert wurde. Allerdings wiesen die chimären Embryonen, die aus mehreren Mutationslinien stammten, Entwicklungsstörungen auf, deren Schwere mit dem Beitrag von mutierten Zellen korrelierte (Tate et al. 1996).

Die Zuchtlinie B6.129P2(C) wird hingegen mit der Cre-loxP-Technologie, die 1981 zum ersten Mal beschrieben wurde, erzeugt (Sternberg und Hamilton 1981). Dies ist ein Rekombinationssystem, das die Untersuchung spezifischer Genfunktionen in Zellpopulationen ermöglicht (McLellan et al. 2017). Das Cre-loxP-System beginnt mit der Konstruktion eines Tieres oder einer Zelllinie, die die DNA an einem Ort des Gens trägt, das von zwei 34-bp LoxP DNA-Motiven umrahmt wird (Sauer und Henderson 1988). Als Nächstes muss die Zelle mit diesen umrahmten Segmenten, die häufig als *floxed* bezeichnet werden, das Enzym Cre exprimieren (McLellan et al. 2017). Cre ist ein Enzym aus der Gruppe der Rekombinasen, was bedeutet, dass es die Spaltung und Neuverknüpfung von DNA katalysiert und die loxP-Sequenzen erkennt (Nagy 2000). *Promotor*- und *Enhancer*-Sequenzen steuern die Zellspezifität der Rekombination, indem sie die Cre-Expression in der Zelle antreiben und somit der *floxed locus* des Gens in der gesamten Linie entfernt wird (Gu et al. 1993; Gu et al. 1994). Bei der Zuchtlinie B6.129P2(C) weisen die Mäuse ein Fehlen der *exons* 3 und 4 des *Mecp2*-Gens auf (Guy et al. 2001).

Ziel der Zucht war die Generierung von heterozygoten Weibchen (*Mecp2*^{+/-}), hemizygoten Männchen (*Mecp2*^{/y}) und Wildtypen (WT; *Mecp2*^{+/+}; *Mecp2*^{+/y}). Dazu wurden heterozygote Weibchen (*Mecp2*^{+/-}), bezogen von Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME), mit C57BL/6J-Männchen (Wildtypen) gepaart.

Da das *Mecp2*-Gen der zufälligen X-Chromosomeninaktivierung unterliegt, kommt es bei den heterozygoten weiblichen Mäusen (*Mecp2*^{+/-}) zu dem Auftreten von mosaikähnlichen Expressionsmustern des MeCP2 und in der Folge zum Auftreten von heterogenen

Phänotypen (Young und Zoghbi 2004; Chahrour et al. 2008). Diese weisen häufig einen eher milden Krankheitsverlauf auf (Guy et al. 2011). Den hemizygoten Männchen (*Mecp2*^{/y}) fehlt das MeCP2 hingegen aufgrund der X-Chromosomenlokalisierung des *Mecp2*-Gens vollständig, was in einem schweren Krankheitsverlauf resultiert (Guy et al. 2001).



Abbildung 2: Phänotypischer Vergleich einer *Mecp2*^{+/*y*} - mit einer *Mecp2*^{/*y*} - Maus

Zu sehen sind zwei 50 Tage alten männliche Tiere unterschiedlichen Genotyps. Der Wildtyp (*Mecp2*^{+/*y*}; links) ist wesentlich größer als das hemizygoten Männchen (*Mecp2*^{/*y*}; rechts).

2.2 Antioxidantienfütterung

In dieser Arbeit wird der Einfluss eines mit Antioxidantien angereicherten Futters auf die Atmung und neuronalen Symptome der männlichen und weiblichen Rett-Mäuse untersucht.

Alle Mäuse werden mit speziellem Zuchtfutter der Firma ssniff Spezialdiäten GmbH (Soest) ernährt (Tabelle 1), das Zusätze von Vitamin A, Vitamin D₃, Vitamin E, Vitamin K₃, Vitamin C, Eisen(II)-sulfat Monohydrat, Zinksulfat Monohydrat, Mangan(II)-sulfat Monohydrat, Kupfer(II)-sulfat Pentahydrat, Selen, Natriumselenit, Jod und Calciumiodat Anhydrat enthält. Das mit Antioxidantien angereicherte Futter wurde zusätzlich mit 2,5g/kg α -Liponsäure, 2,5 g/kg N-Acetyl-L-Cystein und 125 mg/kg Vitamin E versetzt.

Tabelle 1: Inhaltsstoffe des Zuchtfutters

Inhaltsstoffe	%
Rohprotein	22,0
Rohfett	4,5
Rohfaser	3,9
Rohasche	6,7
Stärke	34,9
Zucker	5,2

2.3 Analyse der respiratorischen Dysfunktionen

In dieser Arbeit wurden sowohl ca. 50 Tage postnatal (p50) alte männliche und weibliche als auch ca. 200 Tage postnatal (p200) alte Weibchen untersucht, die sich weiterhin in männliche Wildtypen (*Mecp2^{+/-}*), weibliche Wildtypen (*Mecp2^{+/+}*), heterozygote Weibchen (*Mecp2^{+/-}*) und hemizygoten Männchen (*Mecp2^{-/y}*) unterteilen ließen. Jede dieser genannten Kategorien bestand aus zwei Versuchsgruppen, die sich in der Fütterung (Normalfütterung (NF) und Antioxidantien angereicherte Fütterung (AOF)) unterschieden, sodass insgesamt zwölf Versuchsgruppen entstanden (Tabelle 2). Es handelte sich bei den weiblichen Versuchsgruppen p50 und p200 mehrheitlich nicht um dieselben Mäuse, da sie nach dem 50. postnatalen Tag entweder frühzeitig verstarben oder für andere *in vitro* Experimente verwendet wurden.

Tabelle 2: Die Versuchsgruppen der plethysmographischen Messungen

Versuchsgruppe	Postnatales Alter [Tage]	Geschlecht	Genotyp	Fütterung	Bezeichnung
1	50	männlich	<i>Mecp2^{+/-}</i>	NF	<i>Mecp2^{+/-}</i> NF (p50)
2	50	männlich	<i>Mecp2^{+/-}</i>	AOF	<i>Mecp2^{+/-}</i> AOF (p50)
3	50	männlich	<i>Mecp2^{-/y}</i>	NF	<i>Mecp2^{-/y}</i> NF (p50)
4	50	männlich	<i>Mecp2^{-/y}</i>	AOF	<i>Mecp2^{-/y}</i> AOF (p50)
5	50	weiblich	<i>Mecp2^{+/+}</i>	NF	<i>Mecp2^{+/+}</i> NF (p50)

Versuchsgruppe	Postnatales Alter [Tage]	Geschlecht	Genotyp	Fütterung	Bezeichnung
6	50	weiblich	<i>Mecp2</i> ^{+/+}	AOF	<i>Mecp2</i> ^{+/+} AOF (p50)
7	50	weiblich	<i>Mecp2</i> ^{+/-}	NF	<i>Mecp2</i> ^{+/-} NF (p50)
8	50	weiblich	<i>Mecp2</i> ^{+/-}	AOF	<i>Mecp2</i> ^{+/-} AOF (p50)
9	200	weiblich	<i>Mecp2</i> ^{+/+}	NF	<i>Mecp2</i> ^{+/+} NF (p200)
10	200	weiblich	<i>Mecp2</i> ^{+/+}	AOF	<i>Mecp2</i> ^{+/+} AOF (p200)
11	200	weiblich	<i>Mecp2</i> ^{+/-}	NF	<i>Mecp2</i> ^{+/-} NF (p200)
12	200	weiblich	<i>Mecp2</i> ^{+/-}	AOF	<i>Mecp2</i> ^{+/-} AOF (p200)

2.3.1 Ganzkörperplethysmographie

Das Atmungsverhalten der *Mecp2*-Mäuse wurde mittels Ganzkörperplethysmographie aufgezeichnet. Dieses Verfahren beruht auf der Messung von Druckänderungen, die durch die In- und Expiration entstehen (Lundblad et al. 2002). Bei der Inspiration erwärmt sich die Luft, dehnt sich dadurch aus und vergrößert den Druck. Bei der Expiration hingegen kühlt die Luft ab, kontrahiert und der Druck sinkt (Drorbaugh und Fenn 1955). Diese Druckdifferenz kann durch einen Drucksensor aufgezeichnet werden.

2.3.2 Plethysmographische Messungen

Für diese Arbeit wurde ein Ganzkörperplethysmograph der Data Sciences International® (Modell 600-2500-001) verwendet. Dieser bestand aus zwei Kammern, einer Messkammer und einer Referenzkammer, deren beider Druckdifferenz von einem Drucksensor erfasst wurde (Abbildung 3, Abbildung 4).

Da die Ganzkörperplethysmographie die Handhabung lebendiger Mäuse erforderte, erfolgte die reine Durchführung dieser Messungen durch Mitarbeiter unserer Arbeitsgruppe, die erfolgreich an einem dafür vorgeschriebenen entsprechenden tierexperimentellen Kurs teilgenommen haben. Die umfassende Datenanalyse, Datenauswertung, sowie die statistische Deutung und entsprechende grafische Aufbereitung erfolgten von mir.

Die männlichen und weiblichen Mäuse waren zum Zeitpunkt der plethysmographischen Analyse zwischen 45 und 55 Tagen, die älteren Versuchsgruppen der weiblichen Mäuse zwischen 190 und 210 Tagen alt.

Die jeweilige Maus befand sich zehn Minuten in der Messkammer und konnte sich dort frei bewegen. Ausgewertet wurden die letzten drei Minuten der Messung, da die ersten sieben Minuten als Eingewöhnung der Maus an die Versuchsbedingungen dienten.

Angeschlossen an die Messkammer war zur Frischluftzufuhr eine Membranpumpe, die als Sog einen kontinuierlichen Luftstrom von 1 l/min erzeugte und die Anreicherung von CO₂ verhinderte. Die Referenzkammer erfasste den Umgebungsdruck und zur Übertragung des Messsignals wurde der Drucksensor mit einem Analog-Digital-Wandler und dem PC mit der Datenerfassungssoftware verbunden (Abbildung 3).

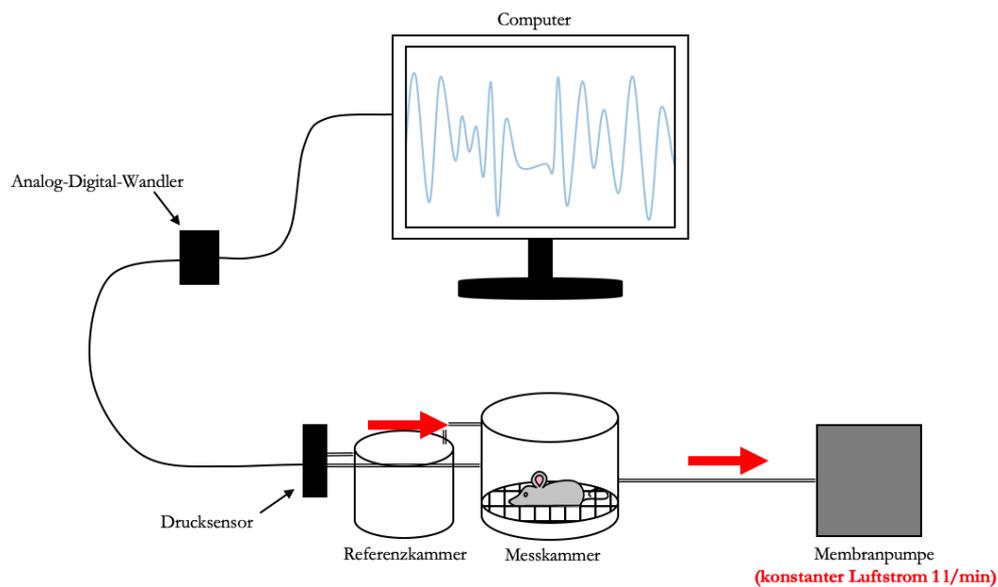


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Ganzkörperplethysmographie

Die Maus befand sich in der Messkammer, die wiederum an eine Membranpumpe angeschlossen war. Diese verhinderte die CO₂-Akkumulation und arbeitete mit einer Luftaustauschrate von 1 l/min. Zur Erfassung der Druckänderungen zwischen Referenz- und Messkammern diente der Drucksensor, der an beide Kammern angeschlossen war. Die Signale wurden im Folgenden durch den Analog-Digital-Wandler in digitale Signale umgewandelt und mittels der Analyse-Software Ponemah v5 aufgezeichnet.

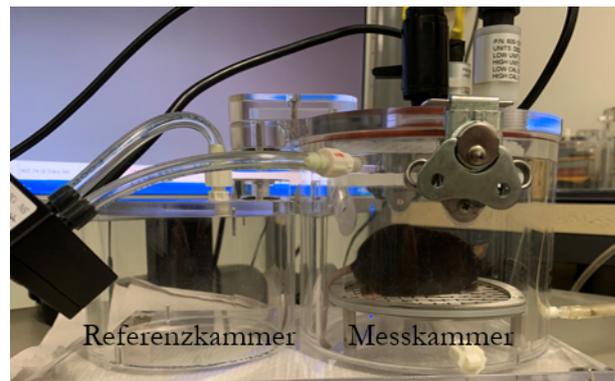


Abbildung 4: Praktische Durchführung der Ganzkörperplethysmographie

Die Abbildung zeigt eine weibliche Wildtypmaus (p200) während der plethysmographischen Untersuchung. Sie konnte sich innerhalb der Messkammer auf dem Gitter frei bewegen, um sich z. B. zu putzen oder zu schnüffeln.

2.3.3 Plethysmographische Auswertungen

Die Messsignale wurden mit der Software Ponemah v5 aufgezeichnet und anschließend als ASCII-Dateien exportiert. Die Auswertung der Messdaten erfolgte durch Clampfit 10.4 (Molecular Devices®) und begann zunächst mit einer *Bandpass*-Filterung von 0,5-20 Hz mit anschließender Limitierung der Messdaten auf die letzten drei Minuten der Messung. In der nun folgenden schwellenbasierten Ereigniserkennung wurden alle Maximalwerte des inspiratorischen Atemflusses, die einen zuvor definierten Schwellenwert überschritten, durch manuelles Angleichen der Grundlinie als Ereignisse markiert (Abbildung 5).

Die durchschnittliche Zeit der Intervalle zwischen den markierten Ereignissen entsprach der durchschnittlichen Dauer eines Atemzyklus und diente mittels Kehrwertbildung zur Berechnung der Atemfrequenz in Hz und schließlich in *breaths per minute* (BPM). Zur Beurteilung der Atmungsunregelmäßigkeiten wurde ein Irregularitäts-Parameter (*irregularity score*) ermittelt. Er beschreibt Abweichungen der Frequenzen aufeinanderfolgender Atemzyklen und identifiziert damit das Auftreten von Atmungsunregelmäßigkeiten (Telgkamp et al. 2002).

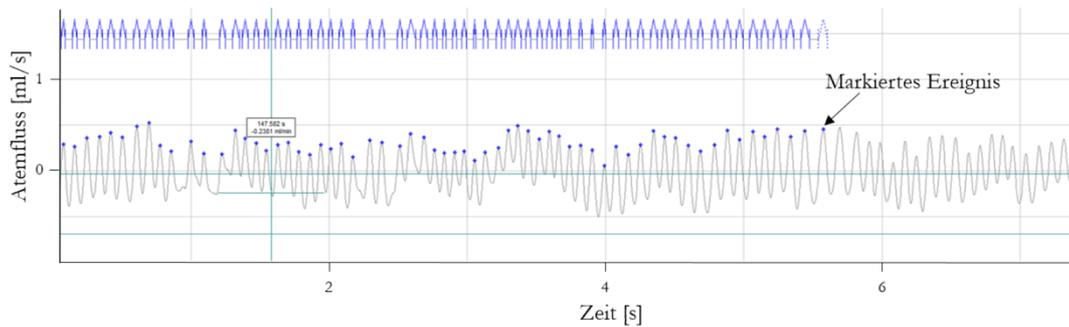


Abbildung 5: Plethysmographische Auswertung mit Clampfit

Nach der Bandpass-Filterung (0,5 – 20 Hz) wurden nach Einstellung eines festen Schwellenwertes alle über dieser Schwelle liegenden Ereignisse markiert und bei etwaigen Schwankungen die Grundlinie manuell angepasst. Dargestellt ist hier beispielhaft ein Auszug aus einer Messung über ca. sieben Sekunden. Die Atemereignisse sind in der Software mit einem blauen Kreuz markiert.

2.3.4 Auswirkung des explorativen Verhaltens auf das Atemmuster

Da die Tiere bei der Ganzkörperplethysmographie die Möglichkeit hatten, ihre Umgebung im Rahmen der Kammer zu erkunden, wurden einige Tiere während der plethysmographischen Messungen gefilmt, um repetitive Atemmuster dem jeweiligen explorativen Verhalten zuzuordnen. Anschließend wurden diese Aufnahmen mit den aufgezeichneten Atemsequenzen verglichen.

2.4 Elektrophysiologische Untersuchungen

2.4.1 Herstellung akuter hippocampaler Schnitte

Vor Beginn der Präparation wurden 200 ml artifizielle zerebrospinale Flüssigkeit (ACSF) (Tabelle 3) gekühlt und ca. 20 min mit Carbogen (Gasgemisch aus 95% O₂ und 5% CO₂) versetzt.

Tabelle 3: Zusammensetzung der artifiziellen cerebrospinalen Flüssigkeit

Substanz	NaCl	KCl	NaH ₂ PO ₄	NaHCO ₃	CaCl ₂	MgSO ₄	Dextrose
Konzentration in mM	130	3,5	1,25	24	1,2	1,2	10

Die Tiere wurden zunächst mit Diethyl-Ether anästhesiert und dekapitiert, wobei diese Schritte durch entsprechend autorisierte Mitarbeiter unserer Arbeitsgruppe durchgeführt wurden. Im Folgenden wurde von mir das Gehirn aus dem abgetrennten Schädel entfernt. Zu diesem Zweck wurde zunächst die Kopfhaut mit einer Schere vorsichtig von der Kalotte abgelöst, um die Kalotte im Anschluss bis zum Anfang des Gesichts durchzutrennen und mit einer Pinzette aufzubrechen. Danach konnte das Gehirn sorgfältig mit einem Spatel herausgelöst und für ein bis zwei Minuten in die gekühlte und oxygenierte artifizielle cerebrospinale Flüssigkeit gelegt werden.

Nach dem Abkühlen wurden das Kleinhirn und das frontale Drittel des Gehirns mit einem Skalpell abgetrennt und die so entstandene Schnittfläche auf einen zuvor gekühlten und mit Sekundenkleber benetzten Kunststoffblock geklebt. Dieser wurde nachfolgend bis knapp über dem Gehirnschnitt mit gekühlter ACSF gefüllt und mit einem Vibroslicer (752M Vibroslice, Campden Instruments) in Scheiben mit einer Dicke von 400 μm geschnitten.

Anschließend wurden einzelne Gewebeschnitte ausgewählt, die zur Messung verwendet wurden. Kriterien hierfür waren die ausreichend sichtbare Abbildung des Hippokampus und die grundsätzliche Unversehrtheit des Gewebes. Diese auserlesenen Schnitte wurden sagittal entlang der Mittellinie durchtrennt, sodass die Hemisphären schließlich separat vorlagen. Im Anschluss wurden die Schnitte in die zwei *Interface*-Kammern des *setups* gelegt und dort mindestens 90 Minuten zur Erholung des Gewebes von der Präparation in Ruhe gelassen (Abbildung 6).

Da die Experimente nicht länger als ca. 45 min dauerten, wurden bis zu maximal fünf Gewebeschnitte aus jedem Gehirn verwendet.

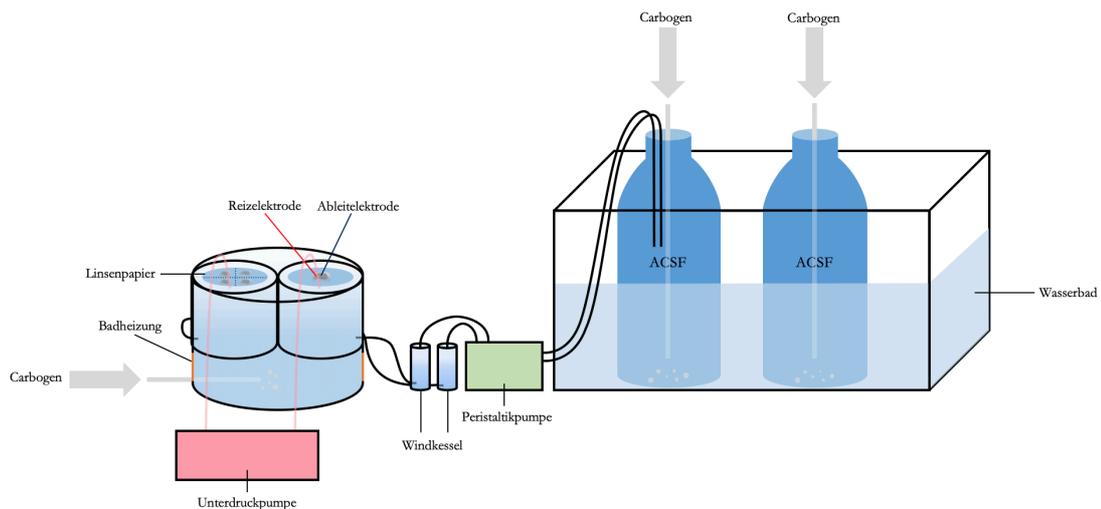


Abbildung 6: Schematische Darstellung der elektrophysiologischen Messungen

Die *Interface*-Kammern (links) bestanden aus einer linken und rechten Kammer. Die linke Kammer, die als Aufbewahrungskammer diente, bot Kapazitäten für ca. vier akute Gewebeschnitte. In der rechten Kammer wurden die Messungen durchgeführt. Sie konnte sowohl durch Carbogen, als auch bei Bedarf durch ein Stickstoff-Kohlenstoffdioxid-Gasgemisch (95% N₂, 5% CO₂) begast werden. Die Gewebeschnitte lagen zur besseren Justierung auf Linsenpapier. Beide Kammern hatten durch eine Badheizung einen konstanten Temperaturbereich von ca. 35 bis 36 °C und wurden mit ACSF, das zusätzlich durch ein Wasserbad aufgeheizt und mit Carbogen begast wurde, unterspült. Den steten Flüssigkeitsaustausch gewährleisteten eine Peristaltikpumpe, die mit 30 Umdrehungen pro Minute (ca. 4 ml pro Minute) in Kombination mit Windkesseln die Flüssigkeit kontrolliert in die Kammern pumpt, und einer an den Kammern angeschlossenen Unterdruckpumpe, die die über den gewünschten Pegel hinauslaufende Flüssigkeit absog.

2.4.2 Elektrophysiologische Messungen

Zu Beginn der Messungen wurden die Elektroden im Sinne einer extrazellulären Feldpotenzialableitung platziert. Die extrazelluläre Aufzeichnungselektrode wurde aus Borosilikatglas (GC150TF-10, Harvard Apparatus) hergestellt, an der Spitze auf einen Widerstand von ca. 5 M Ω gekappt und mit ACSF befüllt. Die Reizelektrode befand sich an den gebündelten Axonen der CA3-Neurone (Schaffer-Kollaterale) und die Ableitelektrode an den apikalen Dendriten der CA1-Neurone, an deren Dendriten durch die orthodrome Reizung der afferenten Fasern entsprechende EPSPs ausgelöst wurden (Abbildung 7). Die postsynaptischen Feldpotentiale (fEPSP) wurden durch unipolare 0,1-ms-Stimuli (Grass S88-Stimulator mit PSIU6-Stimulus-Isoliereinheiten; Grass Instruments) ausgelöst, die über Mikrodrahtelektroden aus Stahl (50 μ m Durchmesser, A-M-Systeme) geleitet wurden.

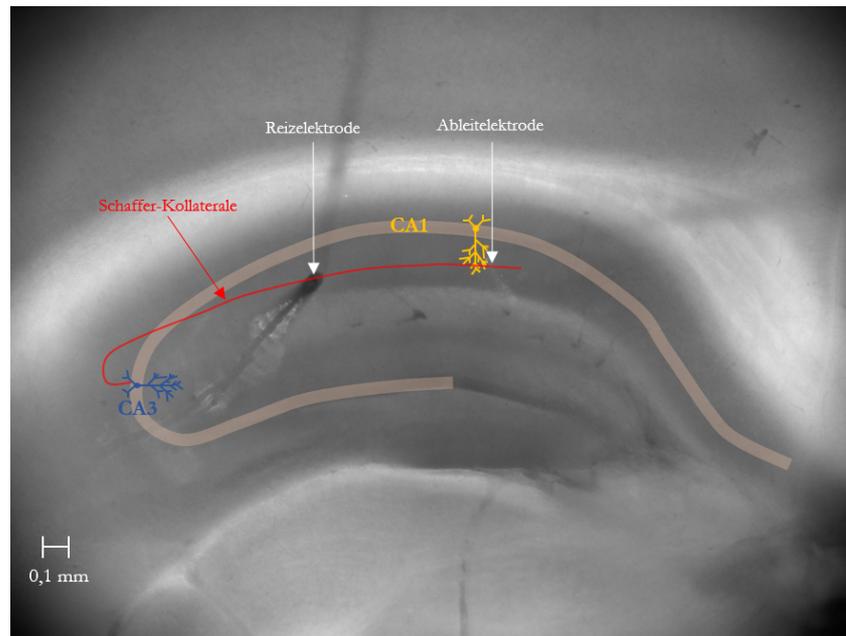


Abbildung 7: Hippokampaler Schnitt einer Maus mit schematischer Elektrodenplatzierung

In der Abbildung ist eine Hemisphäre mit dem Hippokampus im Zentrum zu sehen. Die Reizelektrode wurde in die Schaffer-Kollaterale, die durch die gebündelten Axone der CA3-Neurone gebildet werden, platziert. Die Ableitung der EPSPs erfolgt im Bereich der apikalen Dendriten der CA1-Neurone.

Alle im Folgenden beschriebenen Messungen wurde mit der pClamp 9.2-Software (Molecular Devices) aufgezeichnet und analysiert.

Im Mittelpunkt der Untersuchungen stand der Nutzen einer oralen Supplementierung antioxidantienangereicherten Futters auf die basale Synapsenfunktion, das Ausmaß der synaptischen Plastizität sowie die Anoxievulnerabilität. Zur Überprüfung der basalen Synapsenfunktion wurden die Neurone mit Reizen von 10 bis 150 μA in Schritten von 10 μA unipolar stimuliert. Bei jeder Reizstärke wurde ein Mittelwert aus vier aufeinanderfolgenden Reizantworten (fEPSPs) gebildet. Diese Reiz-Antwort-Beziehung wurde in einer *Input-output*-Kurve (*i.o.-Curve*) dargestellt (Abbildung 8). Das Ausmaß der synaptischen Kurzzeitplastizität wurde mittels Doppelreizen mit variiertem zeitlichem Abstand erhoben. Dazu wurde zunächst durch die vorherige Messung die Reizstärke bei der halben maximalen Reizantwort ermittelt und konstant eingestellt. Anschließend wurden die Neurone mit zwei aufeinanderfolgenden Reizen stimuliert. Der Abstand zwischen

beiden Reizen wurde von anfänglichen 25 ms auf 200 ms in Schritten von je 25 ms erhöht. Ebenfalls erfolgte hier eine Mittelwertbildung aus vier Reizantworten (fEPSPs) pro zeitlicher Stufe.

Die Bewertung der Anoxievulnerabilität fand durch Auslösung einer HSD statt. Während der gesamten Messung wurden im Abstand von 20 Sekunden mit 100 μ A fEPSPs ausgelöst. Nach ca. drei Minuten wurde die Versorgung des Gewebes von Carbogen auf ein Stickstoff-Kohlenstoffdioxid-Gasgemisch (95% N₂, 5% CO₂) umgestellt, was nach wenigen Minuten im Gewebe eine HSD auslöste. Bei Auftreten der HSD, angezeigt durch die charakteristische negative DC-Potential-Auslenkung (siehe Abbildung 1 und Abbildung 8D), wurden noch 60 Sekunden abgewartet, bis schließlich die Gasversorgung wieder auf Carbogen gewechselt wurde (Reoxygenierung). Die Messung wurde bis zur vollständigen Regeneration der Neurone protokolliert.

2.4.3 Auswertung der elektrophysiologischen Messungen

Alle Messungen wurden mit der Software Clampfit 10.4 (Molecular Devices®) ausgewertet. Bei den Messungen der basalen Synapsenfunktion und der synaptischen Plastizität wurden zunächst die Grundlinien festgelegt. Relativ dazu wurden die Größen (Amplituden) der einzelnen Reizantworten (fEPSPs) bei den verschiedenen Messungen berechnet (Abbildung 8). Zudem wurden anfänglich bei den Reizantworten nicht nur die Größe, sondern auch die Steigung (*slope*) ermittelt, da sich das an den Dendriten ausgelöste EPSP in Richtung des Somas ausbreitet und dort zu einem das EPSP trunkierenden Summenaktionspotential (*population spike*) führt. Die Steigung der Reizantwort ist höher, je größer die Reizantwort ist und stellt somit auch einen Parameter zur Größe der Reizantwort dar, jedoch ohne durch das folgende Aktionspotenzial beeinflusst zu werden. Gemessen wurde die Steigung erst im Bereich von 30 bis 70%, da sich im vorherigen Bereich die direkte präsynaptische Reizantwort (*fiber volley*) auf die Steigung auswirkt. Der *fiber volley* spiegelt das Aktionspotenzial in den CA3-Axonen wieder, dessen Amplitude proportional zur Anzahl der stimulierten präsynaptischen Fasern ist (Abbildung 8). Die *slopes* zeigten jedoch insbesondere im Bereich niedriger Reizantworten starke Störanfälligkeiten, was eine sinnvolle Auswertung nicht zuließ. Um einen Vergleich zu ermöglichen, wurden daher alle Reizantworten (fEPSP-Amplituden) des jeweiligen Gewebeschnittes zum einen auf die maximale Reizantwort und zum anderen auf den *fiber volley* normiert. Zur Beurteilung der synaptischen Kurzzeitplastizität wurde insbesondere das Verhältnis des zweiten Reizes zum ersten Reiz herangezogen.

Die Bewertung der Anoxievulnerabilität erfolgte sowohl durch die Bestimmung der zeitlichen Dauer, bis die HSD nach Umstellung des Gewebes auf das Stickstoff-Kohlenstoffdioxid-Gasgemisch auftrat, sowie der Regenerationszeit des Gewebes nach der Reoxygenierung als auch durch die Darstellung der evozierten Potentiale und somit auch des synaptischen Versagens unter Sauerstoffentzug über den gesamten Messzeitraum (Abbildung 8).

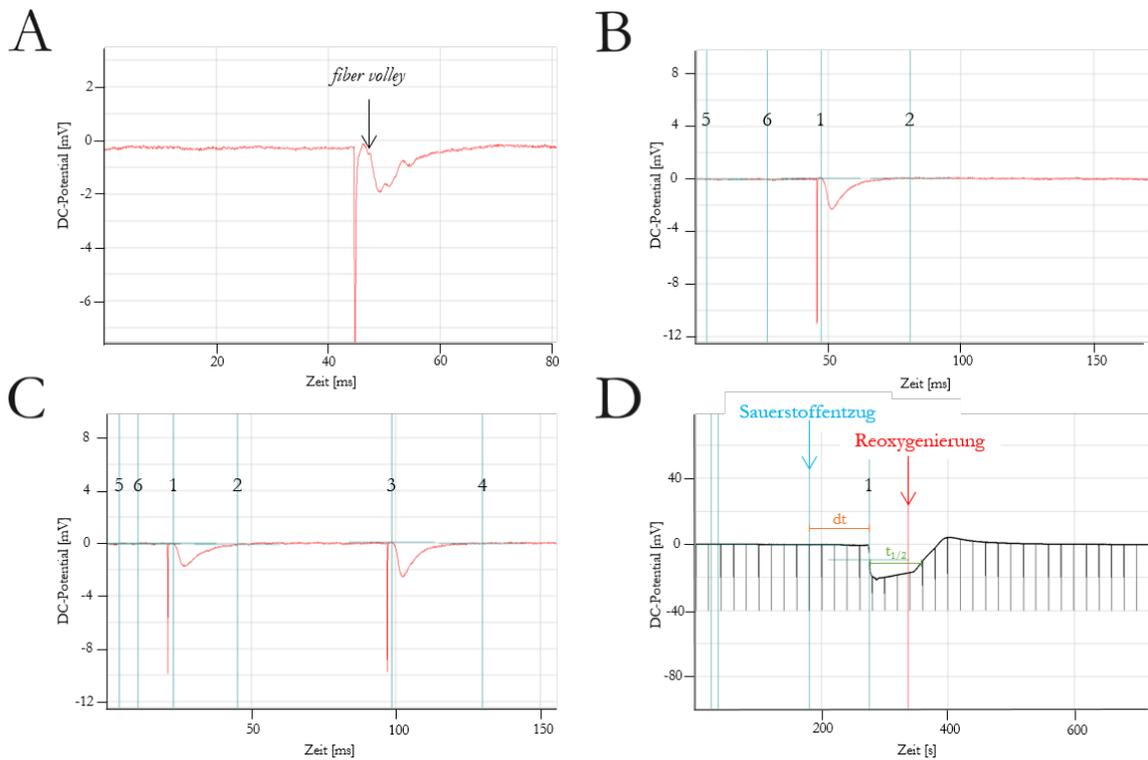


Abbildung 8: Ausschnitte aus Clampfit 10.4 (Molecular Devices®)

Beispielhafte Ausschnitte von Auswertungen der elektrophysiologischen Messungen. **A:** fEPSP in den apikalen Dendriten der CA1-Neurone nach Reizung der gebündelten Axone der CA3-Neurone (Schaffer-Kollaterale). Markiert ist der *fiber volley*, der das Aktionspotential in den CA3-Neuronen widerspiegelt. **B:** Einzelauswertung eines fEPSP, die Markierungen 5 und 6 legen das Basispotenzial fest, zwischen den Markierungen 1 und 2 wird die maximale Amplitude des DC-Potenzials berechnet. **C:** Auswertung einer Doppelstimulation: Die Markierungen 5 und 6 legen das Basispotenzial fest, zwischen 1 und 2 wird die maximale Amplitude des ersten und zwischen 3 und 4 die Amplitude des zweiten Stimulus ermittelt. **D:** Auswertung einer HSD mit dauerhafter Stimulation im Abstand von 20 s. Markiert sind der Sauerstoffentzug sowie die Reoxygenierung. Die Zeit zwischen dem Sauerstoffentzug und der Markierung 1, die den Beginn der HSD kennzeichnet, entspricht „ Δt “, die Dauer bis zur Regeneration des halben maximalen DC-Potenzials der Dauer $t_{1/2}$.

2.5 Statistiken

Die Anzahl der Experimente (n) bezieht sich auf die Anzahl der untersuchten Tiere oder Gewebeschnitte. Die Signifikanz der beobachteten Unterschiede zwischen den Genotypen wurde mit einem zweiseitigen, ungepaarten *Student-T-Test* und einem Signifikanzniveau von $P = 5\%$ getestet. Signifikante Veränderung werden entweder im Text erwähnt oder in den Diagrammen durch Sternchen angezeigt (* $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$).

3 Ergebnisse

3.1 Plethysmographische Analysen

In den folgenden Kapiteln der plethysmographischen Ergebnisse wurden zunächst die männlichen *Mecp2*-Mäuse, anschließend die 50 Tage alten und am Ende die 200 Tage alten weiblichen *Mecp2*-Mäuse verglichen. Zur Gegenüberstellung wurden die Atemfrequenzen (Atemzüge pro Minute, *breath per minute* (BPM)), das *intereventintervall* und der *irregularity score* (Ausmaß der Atmungsunregelmäßigkeiten) herangezogen.

Die BPM wurden sowohl in Form von Balkendiagrammen als auch in Histogrammen dargestellt. Die Balkendiagramme dienen der Darstellung des Vergleiches der BPM-Durchschnittswerte der einzelnen Versuchsgruppen, die Histogramme hingegen zeigten gruppenspezifische Häufigkeiten in den verschiedenen Frequenzbereichen auf.

Die *intereventintervalle* beschreiben den Zeitraum zwischen den markierten Einzelatemereignissen und dienen zur quantitativen Bewertung von Atmungsunregelmäßigkeiten. Je häufiger die Abstände zwischen den Einzelatemereignissen schwanken, desto mehr Atmungsunregelmäßigkeiten traten auf. Im Folgenden wurden sie ebenfalls in Form von Histogrammen dargestellt, um bestimmte *intereventintervalle* speziellen Phänotypen und Fütterungsarten zuzuordnen. Zusätzlich wurde der Irregularitäts-Parameter (*irregularity score*) ermittelt, der die Abweichungen der Frequenzen aufeinanderfolgender Atemzyklen beschreibt.

Zudem wurden durch die Videoaufnahmen einiger Tiere während der plethysmographischen Messungen repetitive Atemmuster dem jeweiligen explorativen Verhalten zugeordnet.

3.1.1 Vergleich der männlichen Wildtypen und hemizygoten Mäuse

Die normalgefütterten männlichen *Mecp2^{+/y}*-Mäuse (n = 24) wiesen mit $418,5 \pm 57,5$ Atemzügen pro Minute eine hoch signifikant verminderte Atemfrequenz als die männlichen Wildtypen ($581,7 \pm 39,7$, n = 25) auf (Abbildung 9). Die AO-gefütterten Wildtypen unterschieden sich mit $570,3 \pm 48,3$ (n = 25) BPM ebenso hoch signifikant von den AO-gefütterten *Mecp2^{+/y}*-Mäusen ($402,8 \pm 62,1$, n = 25).

Zwischen den Fütterungsarten ließen sich jedoch weder innerhalb der männlichen Wildtypen, noch innerhalb der hemizygoten Männchen signifikante Unterschiede feststellen.

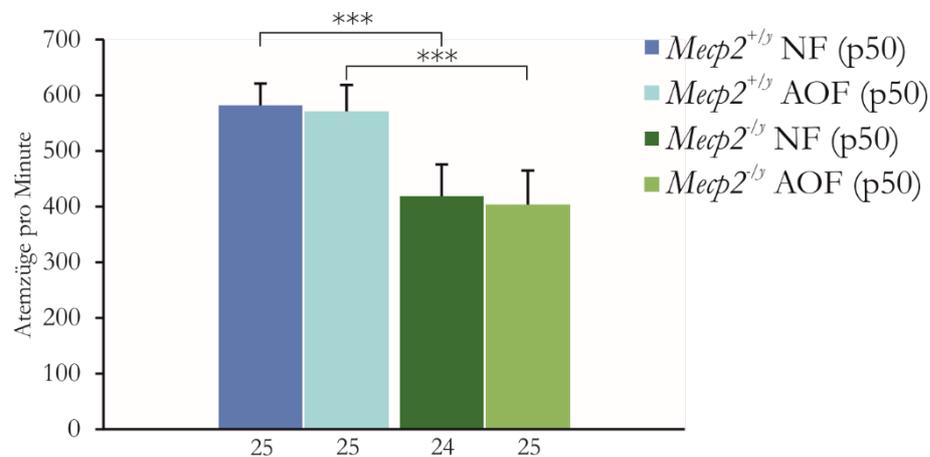


Abbildung 9: Verminderte Atemfrequenzen in männlichen *Mecp2^{+/y}*-Mäusen (p50)

Die mittleren Atemfrequenzen der Wildtypen lagen bei beiden Fütterungsarten (NF, AOF) hoch signifikant über den gleichgefütterten hemizygoten Tieren. Innerhalb gleicher Genotypen zeigte sich kein Effekt durch das AO-Futter. Unter den Balken ist jeweils die Anzahl der analysierten Tiere genannt.

Die komplexe spektrale Zusammensetzung der Atemfrequenzen aller männlichen Versuchsgruppen (*Mecp2^{+/y}* (NF), *Mecp2^{+/y}* (NF), *Mecp2^{+/y}* (AOF), *Mecp2^{+/y}* (AOF)) wurden zur besseren Verdeutlichung in Histogrammen aufgetragen (Abbildung 10). Die Wildtypgruppen beider Fütterungsarten zeigten vermehrte Häufigkeiten bei 640 BPM und 700 BPM. Den *Mecp2^{+/y}*-Mäusen hingegen fehlten diese markanten Frequenzspitzen. Beim Vergleich der Histogramme der BPM der Wildtypen und der *Mecp2^{+/y}*-Mäuse konnte jedoch eine Linksverschiebung zu geringeren Atemfrequenzen bei den *Mecp2^{+/y}*-Mäusen festgestellt werden.

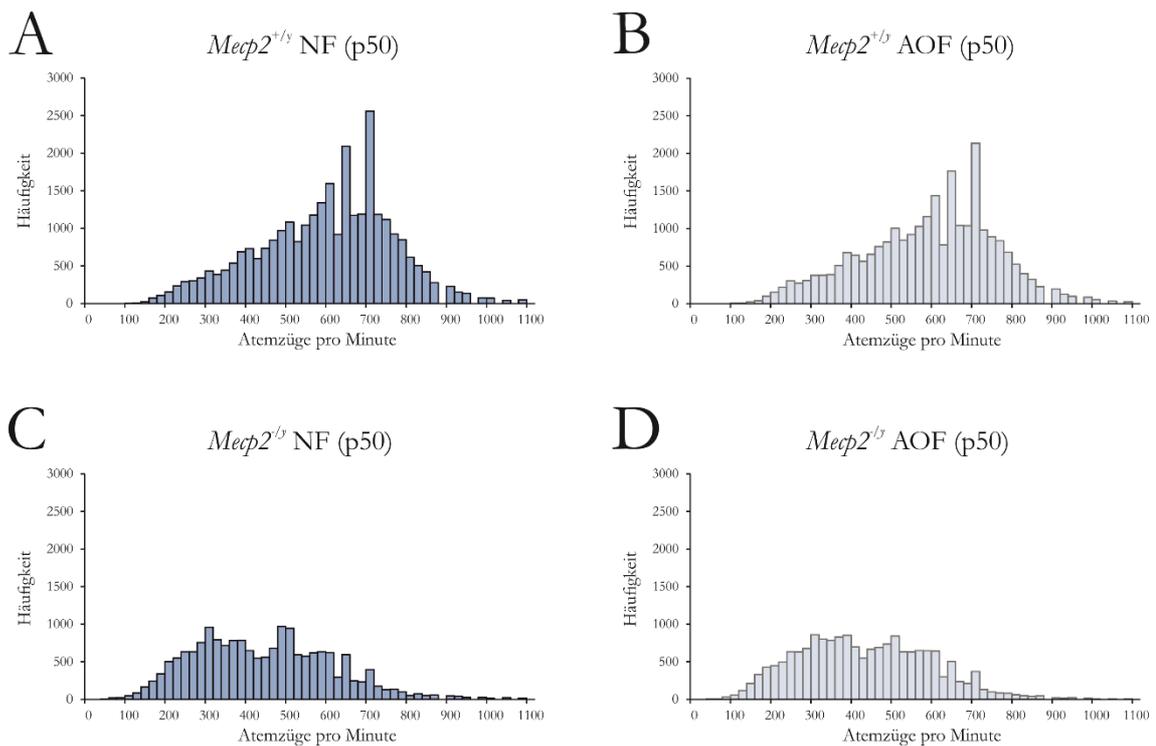


Abbildung 10: Spektrale Zusammensetzung der Atemfrequenzen der männlichen Tiere zeigt eine deutliche Linksverschiebung in *Mecp2^{-/y}*-Mäusen (p50)

A, B: Bei den Wildtypen beider Fütterungsarten traten vermehrt Atemfrequenzen von 640 BPM und 700 BPM auf. **C, D:** Bei den hemizygoten Tieren beider Fütterungsarten zeigten sich deutliche Linksverschiebungen zu niedrigeren Frequenzen.

Bei der Auftragung der einzelnen *intereventintervalle*, bzw. Abständen zwischen den Atemereignissen aller Versuchsgruppen in einer Häufigkeitsverteilung (Abbildung 11), zeigten sich in allen vier Versuchsgruppen Maxima zwischen 90 ms und 120 ms. In diesem Bereich wiesen beide Wildtypgruppen höhere Häufigkeiten als die *Mecp2^{-/y}*-Mäuse auf. Dazu fiel bei den normalgefütterten *Mecp2^{-/y}*-Mäusen im Bereich von 140 bis 200 ms die Häufigkeit der *intereventintervalle* ausgesprochen langsam ab. Dies konnte in abgeschwächter Form auch bei den AO-gefütterten *Mecp2^{-/y}*-Mäuse zwischen 140 ms und 200 ms beobachtet werden. Die Wildtypen hingegen wiesen in Bereichen zwischen 170 ms und 350 ms geringere Häufigkeitswerte als die *Mecp2^{-/y}*-Mäuse auf (siehe Pfeilmarke in Abbildung 11).

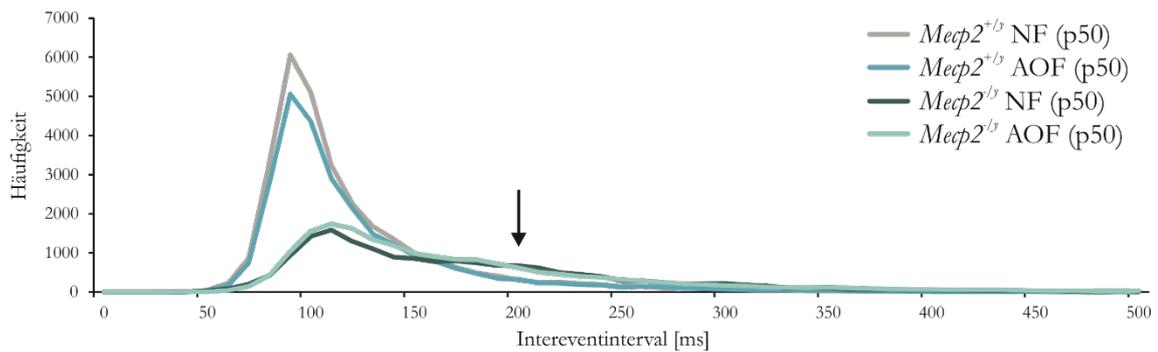


Abbildung 11: Die Verteilung der *intereventintervalle* der männlichen Tiere belegt eine deutlich unregelmäßigere Atmung in *Mecp2^{-/y}*-Mäusen (p50)

Die *intereventintervalle* der Wildtypen wiesen eindeutige Häufigkeiten bei 90 ms und somit eine regelmäßige Atmung in Form eines gleichmäßigen Abstandes zwischen den einzelnen Atemereignissen auf als die *Mecp2^{-/y}*-Mäuse, bei denen die *intereventintervalle* deutlich breiter gestreut und somit viel variabler waren. Die Fütterungsart (NF, AOF) führte innerhalb gleicher Genotypen zu keinen relevanten Unterschieden.

Der *irregularity score* unterschied sich zwischen den Wildtypen und hemizygoten Männchen signifikant, sowohl bei den normalgefütterten als auch bei den AO-gefütterten Versuchsgruppen (Abbildung 12). So wiesen die Wildtypen mit durchschnittlich $0,28 \pm 0,03$ (NF) sowie $0,28 \pm 0,04$ (AOF) einen niedrigeren *irregularity score* als die *Mecp2^{-/y}*-Mäuse mit $0,35 \pm 0,13$ (NF) und $0,34 \pm 0,11$ (AOF) auf. Das AO-Futter zeigte innerhalb gleicher Genotypen keinen erkennbaren Effekt.

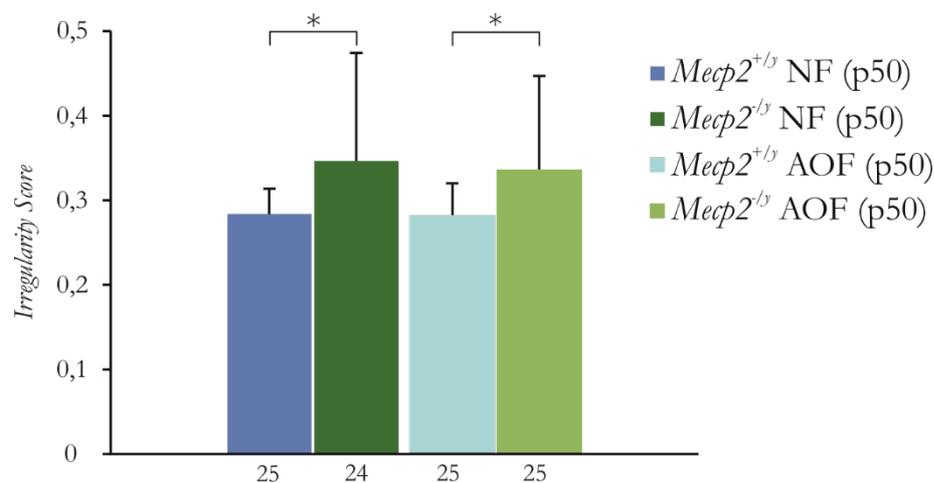


Abbildung 12: Der *irregularity score* ist in *Mecp2^{-/y}*-Mäusen (p50) signifikant höher

Die hemizygoten Tiere beider Fütterungsarten (NF, AOF) zeigten signifikant mehr Atmungsunregelmäßigkeiten als die entsprechend gefütterten Wildtypen.

3.1.2 Vergleich der weiblichen Wildtypen und heterozygoten Mäuse p50

Generell unterschieden sich auch die weiblichen Wildtypen und *Mecp2*^{+/-}-Mäuse im Alter von 50 Tagen hoch signifikant bezüglich ihrer Atemfrequenz (Abbildung 13). Die normalgefütterten Wildtypen wiesen 563,0 BPM ± 49,4 (n = 25), die AO-gefütterten Wildtypen 569,6 ± 47,1 BPM (n = 25) auf. Die *Mecp2*^{+/-}-Mäuse (NF) atmeten durchschnittlich mit nur 490,3 BPM ± 60,3 (n = 25), die *Mecp2*^{+/-}-Mäuse (AOF) mit nur 488,1 BPM ± 39,1 (n = 25). Das AO-Futter zeigte auch hier innerhalb gleicher Genotypen keine signifikanten Effekte.

Auch im Alter von ca. 200 Tagen ließen sich hoch signifikante Unterschiede zwischen den Atemfrequenzen der Wildtypen und den *Mecp2*^{+/-}-Mäusen feststellen (Abbildung 13). Während die *Mecp2*^{+/+}-Mäuse (NF, n = 25) 561,5 BPM ± 49,1 und die *Mecp2*^{+/+}-Mäuse (AOF, n = 25) 552,3 BPM ± 41,6 zeigten, verblieben die *Mecp2*^{+/-}-Mäuse (NF, n = 24) bei lediglich 440,9 BPM ± 84,3 und die *Mecp2*^{+/-}-Mäuse (AOF, n = 25) bei 449,5 BPM ± 64,8.

Beim Vergleich der BPM der 50 und 200 Tage alten Wildtypen unterschiedlicher Fütterungen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen (Abbildung 13). Bei den *Mecp2*^{+/-}-Mäusen hingegen konnten im Vergleich der beiden Altersgruppen (p50 und p200) sowohl bei den normalgefütterten als auch bei den AO-gefütterten Versuchsgruppen Signifikanzen in Richtung verminderter Atemfrequenzen bei den älteren *Mecp2*^{+/-}-Mäusen festgestellt werden, sodass hier während des Alterns von einer weiter zunehmenden Verschlechterung der Atmung auszugehen ist.

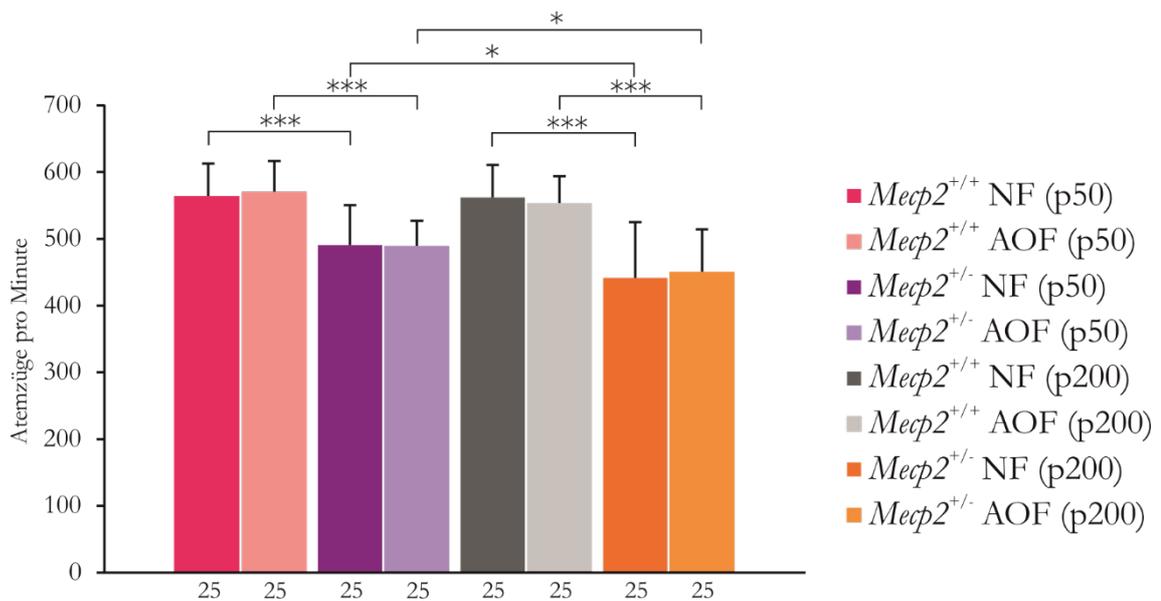


Abbildung 13: Verminderte Atemfrequenzen in weiblichen $Mecp2^{+/-}$ -Mäusen (p50, p200)

Die normal- und AO-gefütterten Wildtypen atmeten in beiden Altersgruppen (p50 und p200) hoch signifikant schneller als die gleichgefütterten und gleichaltrigen $Mecp2^{+/-}$ -Mäuse. Zudem zeigte sich bei den 200 Tage alten normal- und AO-gefütterten $Mecp2^{+/-}$ -Mäusen eine signifikant verringerte Atemfrequenz gegenüber den 50 Tage alten gleichgefütterten Tieren identischen Genotyps.

Bei der Häufigkeitsverteilung der einzelnen Atemfrequenzen fielen wie auch bei den männlichen Tieren in allen vier Versuchsgruppen zwei Frequenzspitzen bei 640 BPM und 700 BPM auf (Abbildung 14). Die Wildtypen zeigten bei 640 BPM Häufigkeiten von 1709 ($Mecp2^{+/+}$ NF) und 1802 ($Mecp2^{+/+}$ AOF). Bei den $Mecp2^{+/-}$ -Mäusen waren die Häufigkeiten mit 1157 (NF) und 1092 (AOF) geringer. Ähnliches war bei einer Atemfrequenz von 700 BPM zu beobachten. Grundsätzlich ließ sich bei den Histogrammen der Atemfrequenzen der $Mecp2^{+/-}$ -Mäuse eine Linksverschiebung in Richtung geringerer Frequenzen im Gegensatz zu den $Mecp2^{+/+}$ -Mäusen beobachten, so wie dies auch bei den männlichen $Mecp2^{+/-}$ -Mäusen der Fall war.

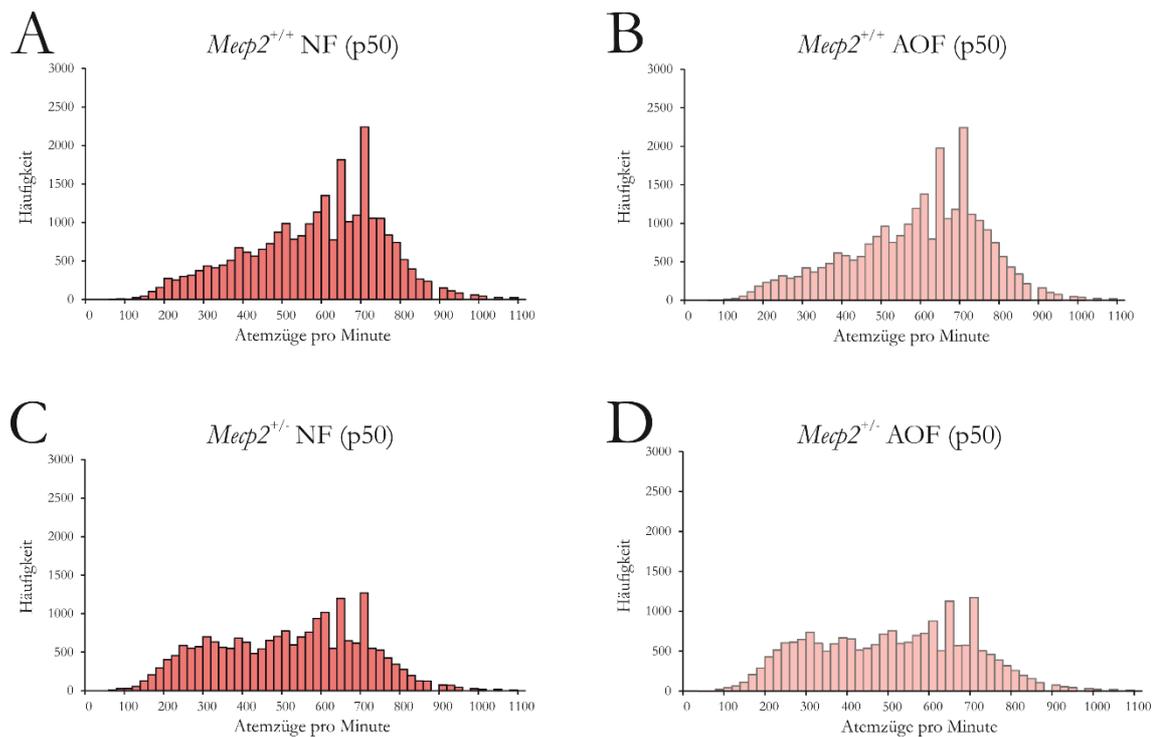


Abbildung 14: Eindeutige Linkverschiebung der spektralen Atemfrequenzen in weiblichen $Mecp2^{+/-}$ -Mäusen (p50)

A, B: Bei den Wildtypen beider Fütterungsarten (NF, AOF) traten vermehrt Frequenzen von 640 BPM und 700 BPM auf. **C, D:** Bei den heterozygoten Tieren beider Fütterungsarten zeigten sich deutliche Linkverschiebungen der Atemfrequenzen.

In der Häufigkeitsverteilung der BPM der 200 Tage alten weiblichen Tiere zeigten sich bei beiden Genotypen ($Mecp2^{+/+}$, $Mecp2^{+/-}$) beider Fütterungsarten (NF, AOF) ebenfalls Frequenzspitzen bei 640 BPM und 700 BPM, die bei den $Mecp2^{+/+}$ -Mäusen deutlich klarer als bei den $Mecp2^{+/-}$ -Mäusen ausgebildet waren (Abbildung 15). Zudem waren auch hier die Histogramme der $Mecp2^{+/-}$ -Mäuse in Richtung niedrigerer Atemfrequenzen linksverschoben.

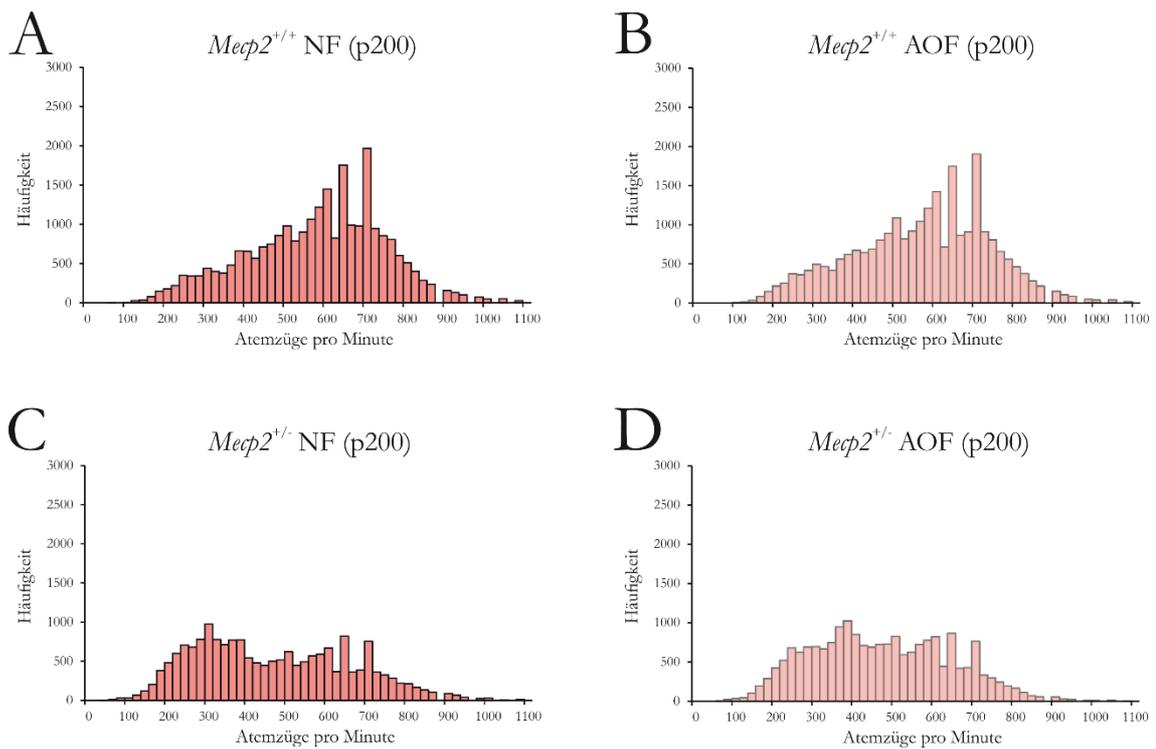


Abbildung 15: Progrediente Linksverschiebung der Atemfrequenzen in älteren weiblichen $Mecp2^{+/-}$ -Mäusen (p200)

A, B: Bei den älteren Wildtypen beider Fütterungsarten (NF, AOF) waren die Atemfrequenzen von 640 BPM und 700 BPM gehäuft zu beobachten. **C, D:** Bei den heterozygoten Tieren beider Fütterungsarten zeigten sich Linksverschiebungen und die bei den Wildtypen vorkommenden Atemfrequenzspitzen zeigten sich mit deutlich verringerten Häufigkeiten.

Aufgetragen in einem Histogramm zeigten die einzelnen *intereventintervalle* aller Versuchsgruppen auch bei den 50 Tage alten Weibchen einen generellen Unterschied zwischen den Wildtypen und den $Mecp2^{+/-}$ -Mäusen (Abbildung 16). Zwar wiesen alle vier Versuchsgruppen ein jeweiliges Maximum bei 90 ms auf, doch zeigten hier die $Mecp2^{+/+}$ -Mäuse eine Häufigkeit von 5440 (NF) und 5705 (AOF), die $Mecp2^{+/-}$ -Mäuse jedoch lediglich eine Häufigkeit von 3000 (NF) und 2708 (AOF). Zudem lag im Bereich von 160 ms bis 350 ms bei den $Mecp2^{+/-}$ -Mäusen eine breitere Verteilung der *intereventintervalle* als bei den Wildtypen vor (siehe Pfeilmarke in Abbildung 16).

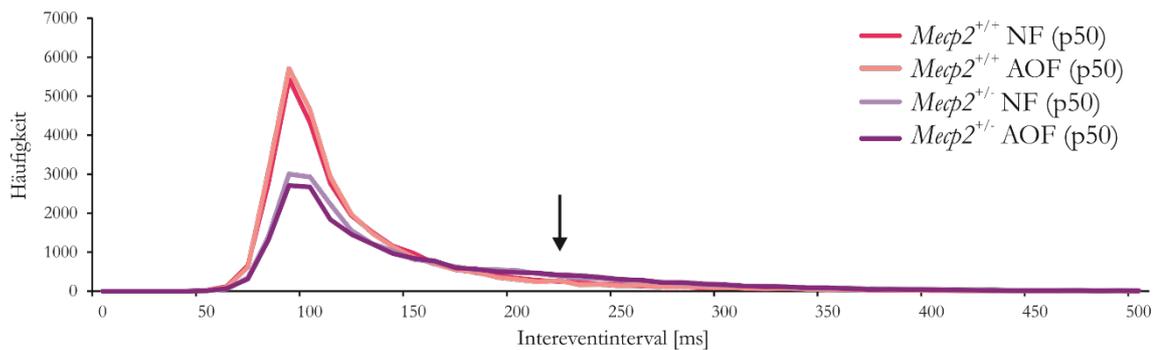


Abbildung 16: *Intereventintervalle* bestätigen eine unregelmäßigere Atmung in allen *Mecp2*^{+/-}-Mäusen (p50)

Die spektral zusammengesetzten *intereventintervalle* der Wildtypen wiesen einen stärker ausgebildeten Gipfel und somit eine regelmäßigere Atmung in Form eines gleichmäßigen Abstandes zwischen den einzelnen Atemereignissen auf als die heterozygoten Tiere. Das AO-Futter führte hier bei keinem der Genotypen zu deutlichen Effekten.

Auch bei den 200 Tage alten Weibchen fällt bei der spektralen Auftrennung der *intereventintervalle* ein genereller Unterschied zwischen den Wildtypen und den *Mecp2*^{+/-}-Mäusen auf (Abbildung 17). Die Wildtypen wiesen eine maximale Häufigkeit bei 90 ms mit 4752 (*Mecp2*^{+/+} NF) und 4529 (*Mecp2*^{+/+} AOF), die heterozygoten Weibchen bei 100 ms eine eindeutig geringere Häufigkeit von 1984 (*Mecp2*^{+/-} NF) und 2332 (*Mecp2*^{+/-} AOF) auf. Allerdings zeigten die AO-gefütterten *Mecp2*^{+/-}-Mäuse eine höhere Häufigkeit, bzw. regelmäßigere Atmung, als die normalgefütterten *Mecp2*^{+/-}-Mäuse. Zudem lag im Bereich von 170 ms bis 350 ms bei den *Mecp2*^{+/-}-Mäusen eine breitere Verteilung der *intereventintervalle* als bei den Wildtypen vor und die AO-gefütterten *Mecp2*^{+/-}-Mäuse zeigten höhere Häufigkeitswerte als die normalgefütterten *Mecp2*^{+/-}-Mäuse (siehe Pfeilmarke in Abbildung 17). Im Vergleich zu den 50 Tage alten *Mecp2*^{+/-}-Mäusen fiel v.a. im Bereich von 135 ms bis 170 ms die Verteilung der 200 Tage alten *Mecp2*^{+/-}-Mäuse breiter aus.

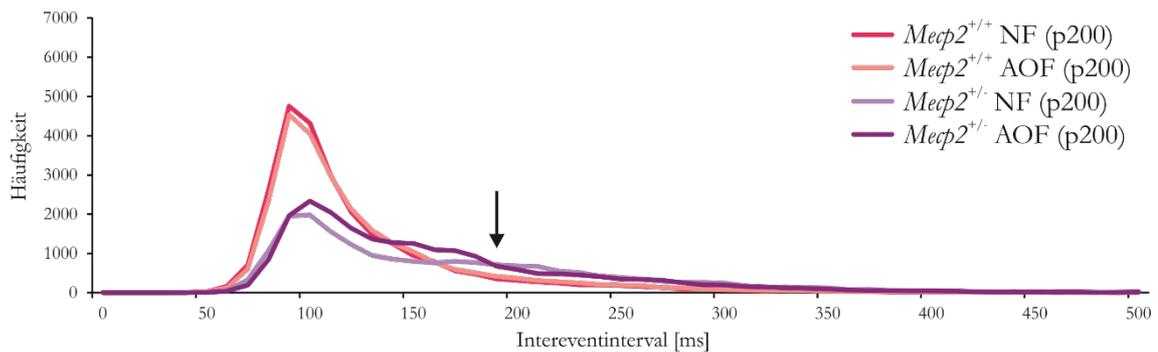


Abbildung 17: AO-Futter führt zu regelmäßigerer Atmung in älteren *Mecp2*^{+/-}-Mäusen (p200)

Die spektral zusammengesetzten *intereventintervalle* der Wildtypen wiesen einen stärker ausgeprägten Gipfel und somit eine regelmäßigerer Atmung in Form eines gleichmäßigen Abstandes zwischen den einzelnen Atemereignissen auf als die *Mecp2*^{+/-}-Mäuse. Ein Effekt des AO-Futters zeigte sich hier bei den *Mecp2*^{+/-}-Mäusen in einem langsameren Abfall der Kurve.

Beim Vergleich des *irregularity score* der 50 Tage alten Tiere zeigte sich zwischen den AO-gefütterten *Mecp2*^{+/+} und *Mecp2*^{+/-}-Mäusen ein sehr signifikanter Unterschied (Abbildung 18).

Bei den 200 Tage alten Mäusen konnten weder mit Normal-, noch mit AO-Fütterung Signifikanzen bezüglich des *irregularity score* zwischen den Wildtypen und heterozygoten Weibchen festgestellt werden (Abbildung 18). Die AO-gefütterten Wildtypen zeigten mit $0,28 \pm 0,04$ eine nahezu identische Variabilität der Atmung wie die *Mecp2*^{+/-}-Mäuse mit $0,27 \pm 0,09$. Ähnliches zeigte sich bei den normalgefütterten Versuchsgruppen.

Bei der Gegenüberstellung des *irregularity score* der Wildtypen im Alter von 50 und 200 Tagen konnten weder bei Normalfütterung, noch bei AO-Fütterung signifikante Unterschiede festgestellt werden (Abbildung 18). Bei den *Mecp2*^{+/-}-Mäusen hingegen nahm der *irregularity score* mit zunehmendem Lebensalter der Mäuse ab. Dies zeichnete sich bei den normalgefütterten *Mecp2*^{+/-}-Mäusen als Trend ab und stellte sich beim Vergleich der AO-gefütterten *Mecp2*^{+/-}-Mäuse aber sehr signifikant dar.

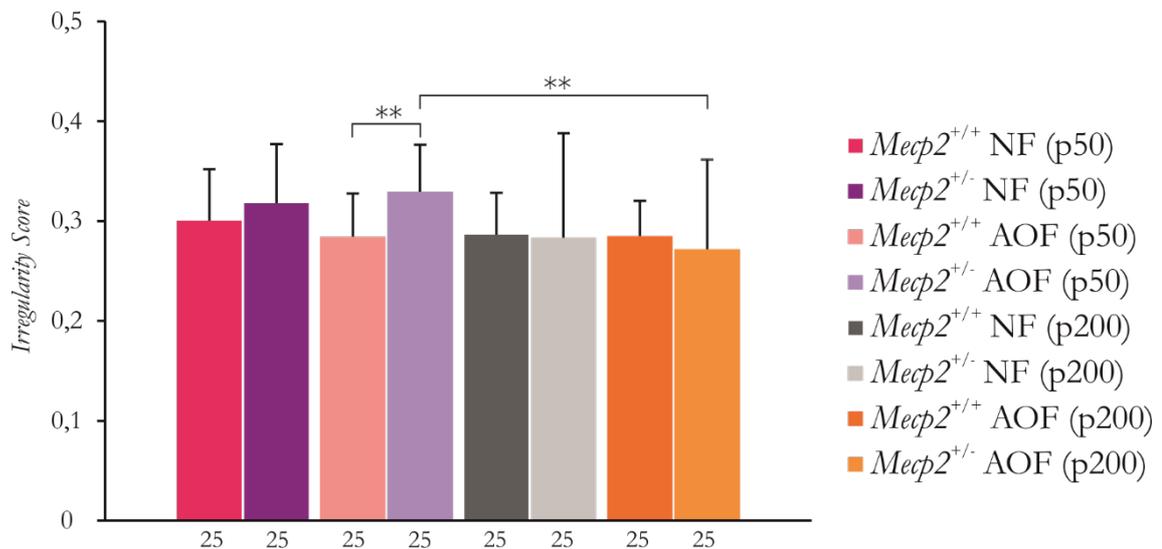


Abbildung 18: Erhöhter *irregularity score* in jungen weiblichen $Mecp2^{+/-}$ -Mäusen (p50)

Alle heterozygoten Tiere im Alter von 50 Tagen zeigten (bei AO-Fütterung sehr signifikant) einen erhöhten *irregularity score* als der gleichaltrige und gleichgefütterte Wildtyp. Im Alter von 200 Tagen fielen bei der Gegenüberstellung der Genotypen keine relevanten Unterschiede mehr auf, die heterozygoten Tiere wiesen einen ähnlich verringerten *irregularity score* wie die Wildtypen auf. Die AO-gefütterten $Mecp2^{+/-}$ -Mäuse zeigten im Alter von 200 Tagen einen deutlich verringerten *irregularity score* als die gleichgefütterten Tiere identischen Genotyps im Alter von 50 Tagen.

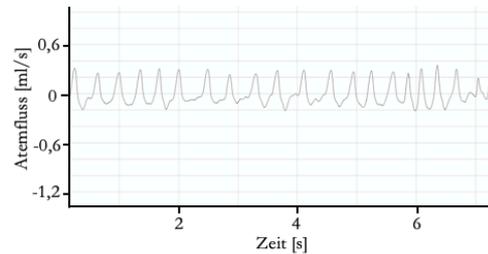
Es wurden sechs AO-gefütterte $Mecp2^{+/-}$ -Mäuse jeweils zu beiden Zeitpunkten (p50, p200) gemessen. Dabei konnten weder bezüglich der Atemfrequenzen, noch der Atmungsunregelmäßigkeiten deutliche Unterschiede festgestellt werden, zumal zum Vergleich keinerlei Daten gleicher zu beiden Zeitpunkten gemessener normalgefütterter $Mecp2^{+/-}$ -Mäuse vorlagen.

3.1.3 Auswirkung des explorativen Verhaltens auf das Atemmuster

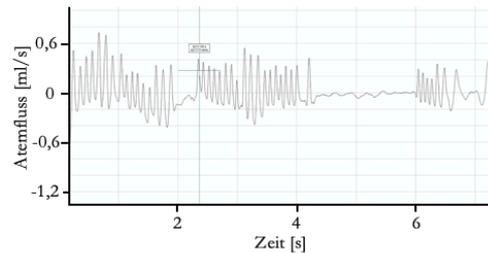
Beim Abgleich der Atemmuster mit der jeweiligen Videoaufnahme ergaben sich repetitive Sequenzen, die definierten Verhaltensweisen zugeordnet werden konnten (Abbildung 19). Auffällig waren hier die Körperpflege, die Ruheatmung, sowie das explorative Verhalten beim Erkunden des Bodengitters und des Kammerdeckels. Die Ruheatmung war durch eine gleichmäßige Atemfrequenz mit wenig Atemaussetzern geprägt. Betrieb das Tier hingegen Körperpflege, so erhöhte sich die Atemfrequenz bei weiterhin verminderter Anzahl an Atemaussetzern. Das explorative Verhalten in Form des Erkundens von Bodengitter und Deckel war geprägt durch Schnüffelphasen mit einer erhöhten

Atemfrequenz in Verbindung mit häufigen Atemaussetzern. Lange Atemaussetzer fielen besonders beim Inspizieren des Bodengitters auf.

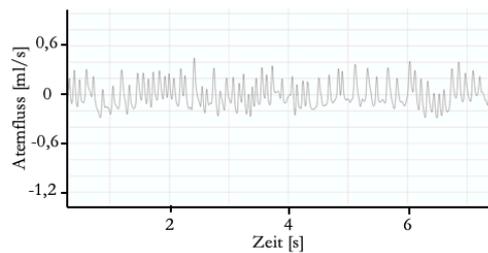
Ruheatmung



Erkundung Bodengitter



Körperpflege



Erkundung Kammerdeckel

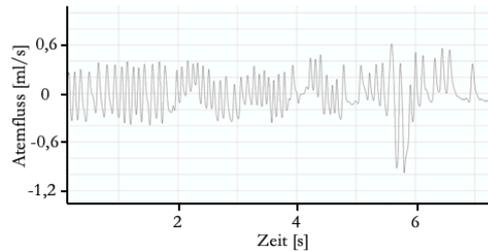


Abbildung 19: Spezifische Verhaltensweisen während der Ganzkörperplethysmographie zeigen repetitive Atemmuster

Die Aktivitäten einer *Mecp2*^{+/-}-Maus (p200) während der Ganzkörperplethysmographie mit den dazugehörigen Auszügen der plethysmographischen Aufzeichnungen wiesen eindeutige verhaltensspezifische Sequenzen nach.

3.2 Elektrophysiologische Analysen

In den anschließenden Kapiteln werden in allen Kategorien die 50 Tage alten männlichen und weiblichen *Mecp2*-Mäuse, jeweils unterschieden durch die Fütterungsart (NF, AOF),

verglichen. Gegenübergestellt werden sie in den Kategorien der basalen Synapsenfunktion, der synaptischen Kurzzeitplastizität und der Anoxievulnerabilität.

3.2.1 Überprüfung der basalen Synapsenfunktion

Die basale Synapsenfunktion wurde durch Messung der Reizantwort an den apikalen Dendriten der CA1-Neurone bei Reizung von 10 bis 150 μA im Abstand von je 10 μA der gebündelten Axone der CA3-Neurone ermittelt.

Die Gegenüberstellung der normalgefütterten männlichen Genotypen (*Mecp2^{+/y}* (NF, n = 26), *Mecp2^{-/y}* (NF, n = 25)) zeigte bei den *Mecp2^{-/y}*-Mäusen eine intakte basale Synapsenfunktion. Die AO-gefütterten *Mecp2^{+/y}*-Mäuse (n = 37) zeigten z.T. signifikant verminderte Reizantworten als die gleichgefütterten *Mecp2^{-/y}*-Mäuse (n = 23) (Abbildung 20). Ebenso ergaben sich signifikant differenzierte Reizantworten innerhalb der Genotypen beim Vergleich der unterschiedlichen Fütterungsarten. Das AO-Futter führte bei den *Mecp2^{+/y}*-Mäusen bei Reizen von 70 bis 130 μA signifikant, bei 30 bis 60 μA sehr signifikant und bei 10 bis 20 μA hoch signifikant zu einer verminderten Erregbarkeit (Abbildung 20).

Beim Vergleich der weiblichen Tiere stellten sich zwischen den normalgefütterten Genotypen (*Mecp2^{+/+}* (NF, n = 27), *Mecp2^{+/-}* (NF, n = 25)) keine signifikanten Unterschiede dar (Abbildung 21). Die AO-gefütterten *Mecp2^{+/-}*-Mäuse (n = 36) zeigten sich z.T. sehr signifikant erregbarer als die *Mecp2^{+/+}*-Mäuse (AOF, n = 31). Das AO-Futter dämpft jedoch die Erregbarkeit in weiblichen *Mecp2^{+/+}*-Mäusen. (Abbildung 21).

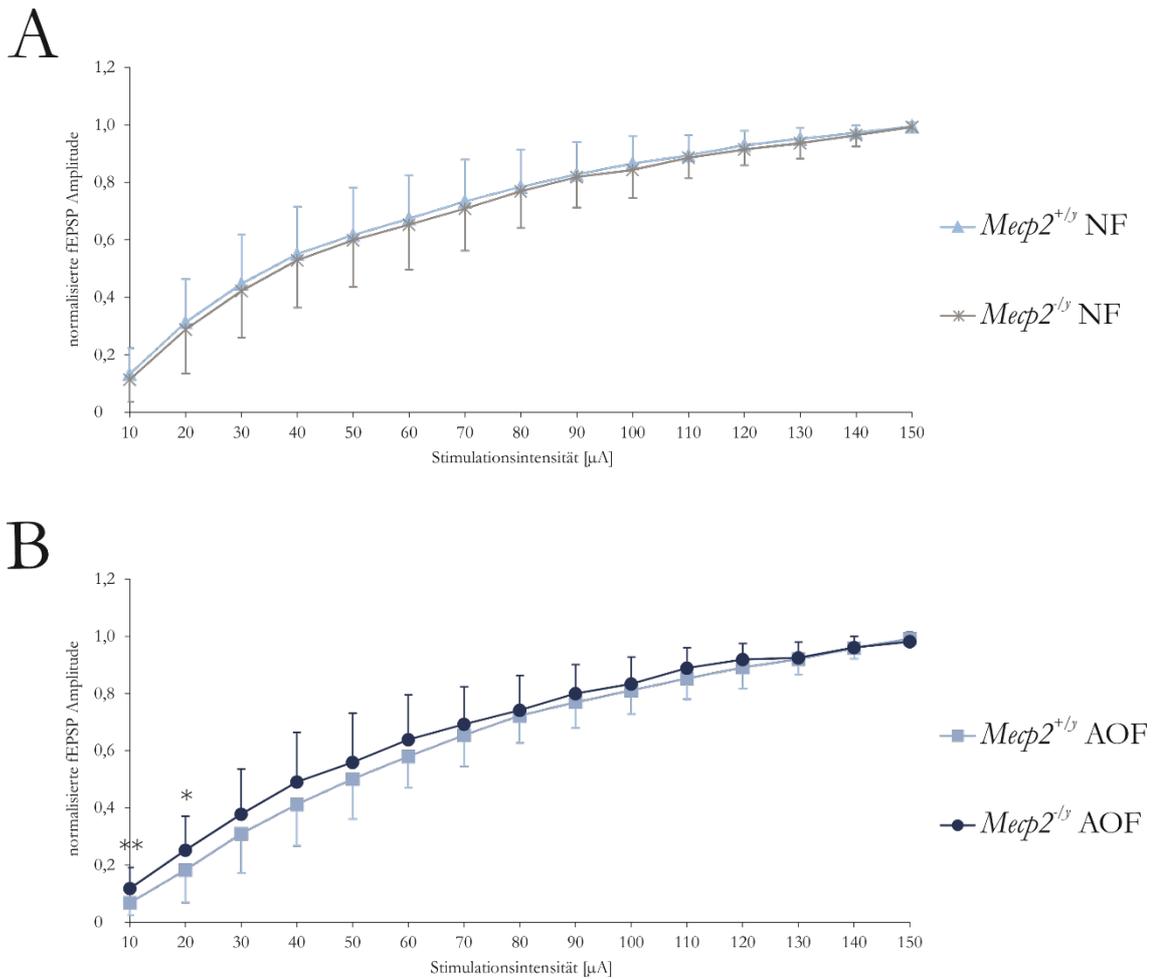


Abbildung 20: Der MeCP2-Mangel der hemizygoten Männchen lässt die basale synaptische Funktion intakt

Input-output-Kurven postsynaptischer Potenziale (fEPSPs) der männlichen Tiere, normalisiert auf die größte Reizantwort. **A:** Die normalgefütterten männlichen Tiere zeigen praktisch identische Erregbarkeiten in Wildtyp- und *Mecp2*^{-/y}-Mäusen. **B:** Die AO-gefütterten männlichen Wildtypen sind tendenziell geringer erregbarer als die gleichgefütterten *Mecp2*^{-/y}-Mäuse.

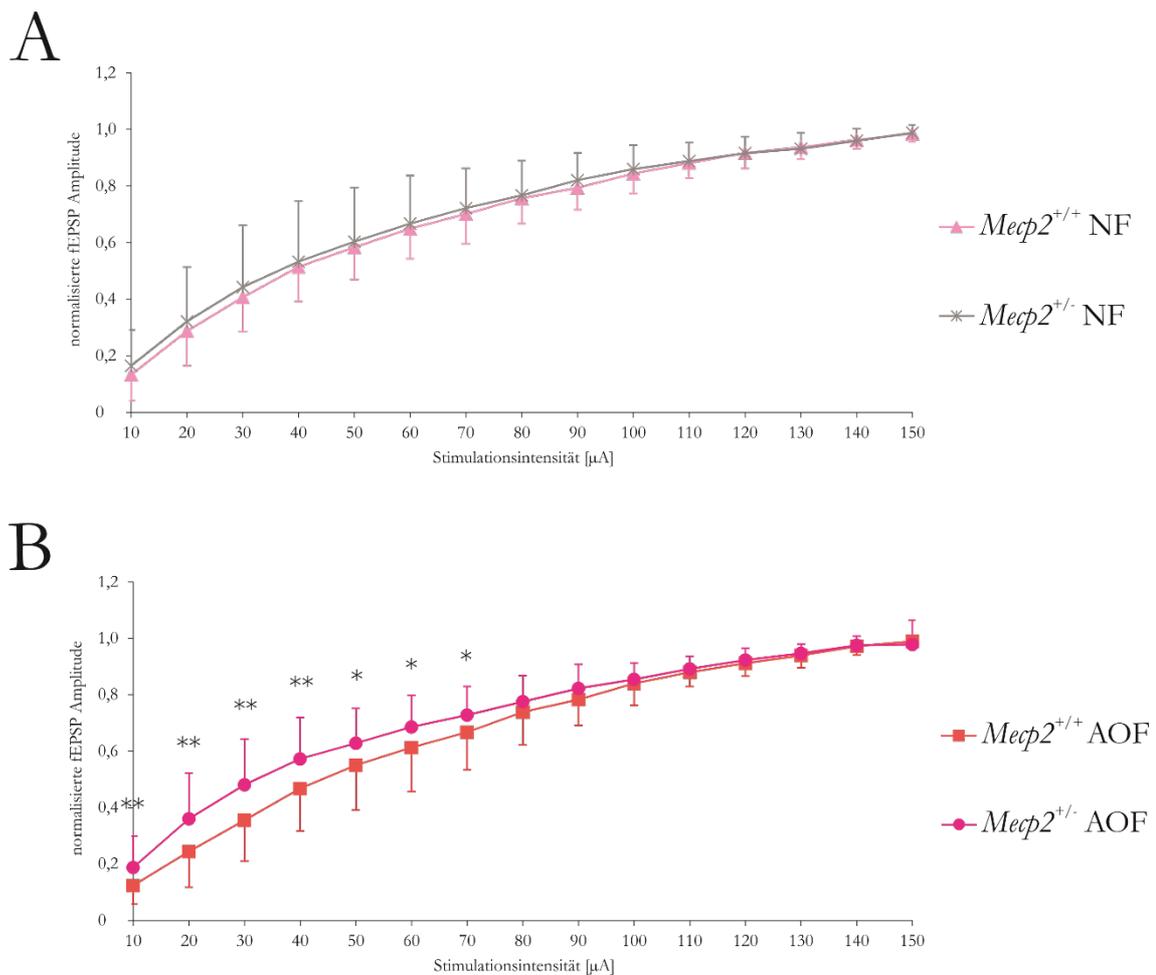


Abbildung 21: Das AO-Futter führt zu einer Hypererregbarkeit der weiblichen *Mecp2*^{+/-}-Mäuse

Input-output-Kurven postsynaptischer Potenziale (fEPSPs) der weiblichen Tiere, normalisiert auf die größte Reizantwort **A**: Die basale synaptische Funktion der normalgefütterten heterozygoten Weibchen blieb intakt. **B**: In AO-gefütterten *Mecp2*^{+/-}-Mäusen konnte eine moderate Hypererregbarkeit festgestellt werden.

Ferner wurden die mittleren Reizstärken ermittelt, bei denen die Dendriten der CA3-Neurone bei Reizung der gebündelten Axone der CA1-Neurone die halbmaximale Reizantwort aufwiesen (Abbildung 22, Abbildung 23). Dabei unterschieden sich weder die normal gefütterten, noch die AO-gefütterten männlichen Wildtypen signifikant von den gleichgefütterten *Mecp2*^{ly}-Mäusen. Das AO-Futter führte bei den männlichen Wildtypen zu einer signifikant verringerten Erregbarkeit gegenüber Normalfütterung (Abbildung 22). Dieser Effekt zeigte sich in abgeschwächter Form auch bei den weiblichen Wildtypen. Die weiblichen *Mecp2*^{+/-}-Mäuse zeigten sich in den AO-gefütterten Versuchsgruppen signifikant hypererregbarer als die gleichgefütterten Wildtypen (Abbildung 23).

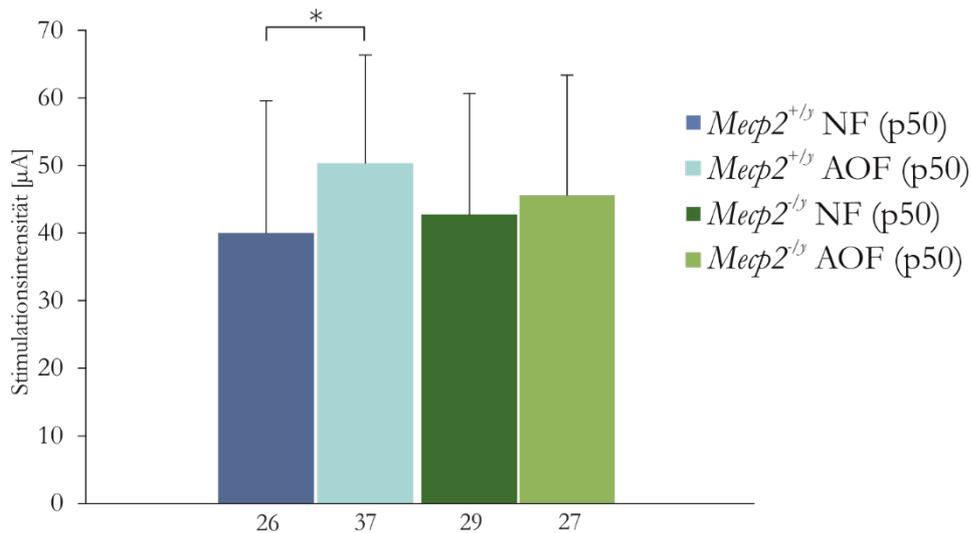


Abbildung 22: Verminderte Erregbarkeit in männlichen Wildtypen durch das AO-Futter

Die AO-gefütterten Tiere beider Genotypen wiesen erst bei einer höheren Stimulationsintensität ihre halbmaximale Reizantwort auf und waren somit weniger erregbar als die normalgefütterten Genotypen. Dieser Unterschied zeigte sich signifikant bei den Wildtypen.

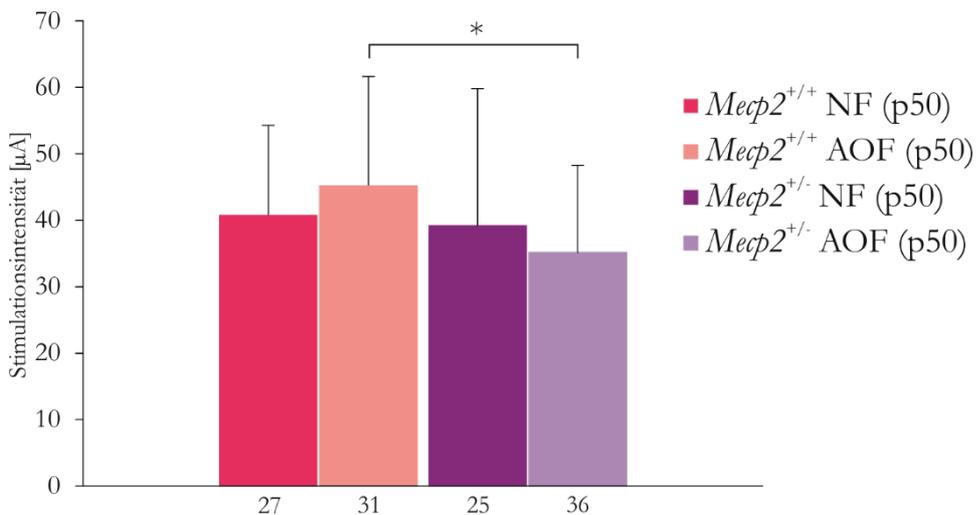


Abbildung 23: AO-Futter führt zu einer Hypererregbarkeit in weiblichen $Mecp2^{+/-}$ -Mäusen

Die AO-gefütterten $Mecp2^{+/-}$ -Mäuse wiesen ihre halbmaximale Reizantwort bei einer niedrigeren Stimulationsintensität auf und zeigten sich dadurch signifikant hypererregbarer als die gleichgefütterten Wildtypen. Dieser Effekt bleibt bei den normalgefütterten Versuchsgruppen aus.

Zusätzlich wurden die Werte der *i.o.-curve* auf den *fiber volley* normiert. Das AO-Futter führte hier bei allen Genotypen der männlichen und weiblichen Tiere zu einer deutlich verringerten Erregbarkeit gegenüber den normalgefütterten Versuchsgruppen (Abbildung 24, Abbildung 25).

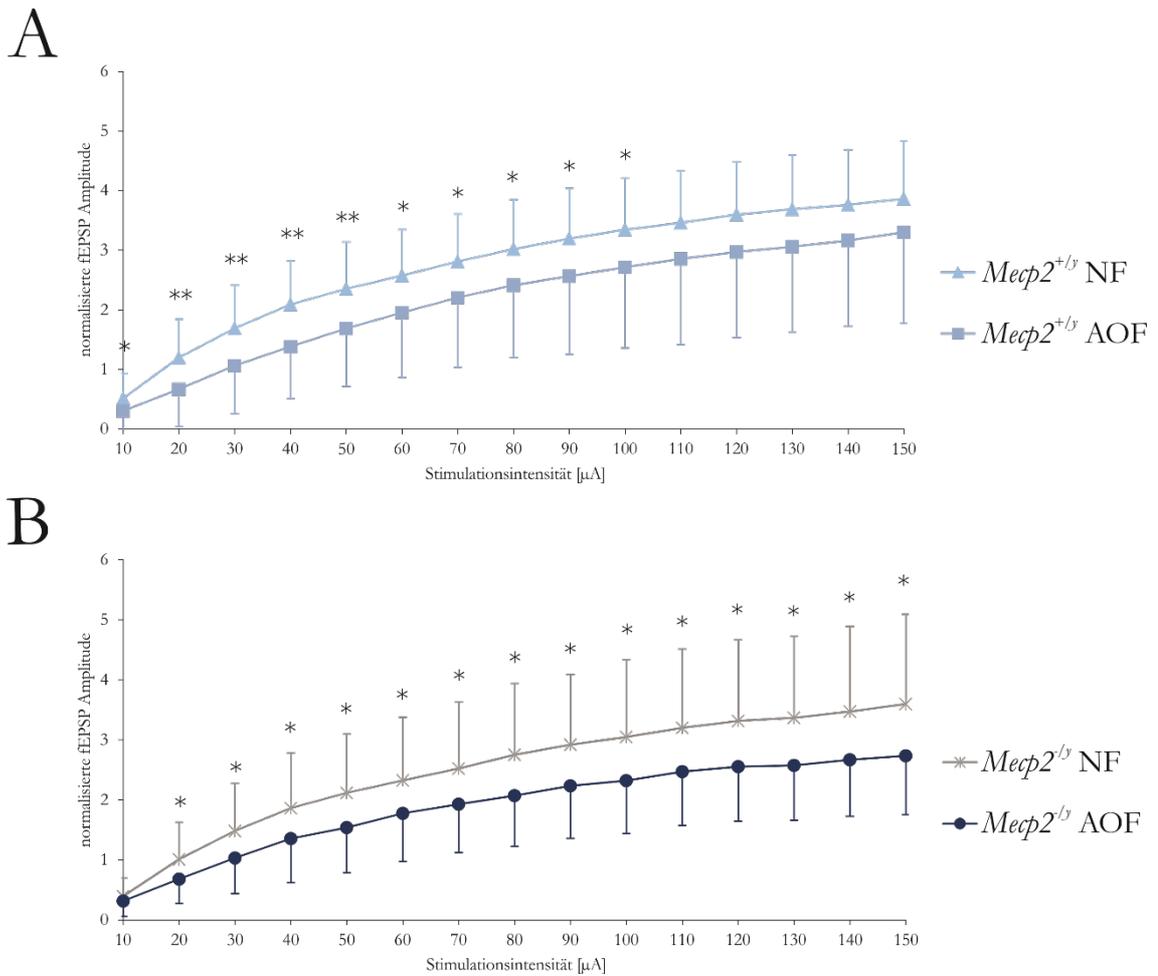


Abbildung 24: AO-Futter führt bei den *Input-output*-Kurven postsynaptischer Potenziale (fEPSPs), normalisiert auf den *fiber volley*, zu einer eindeutig verminderten Erregbarkeit bei den männlichen Tieren

A: Wildtypen. **B:** *Mecp2*^{-/y}-Mäuse.

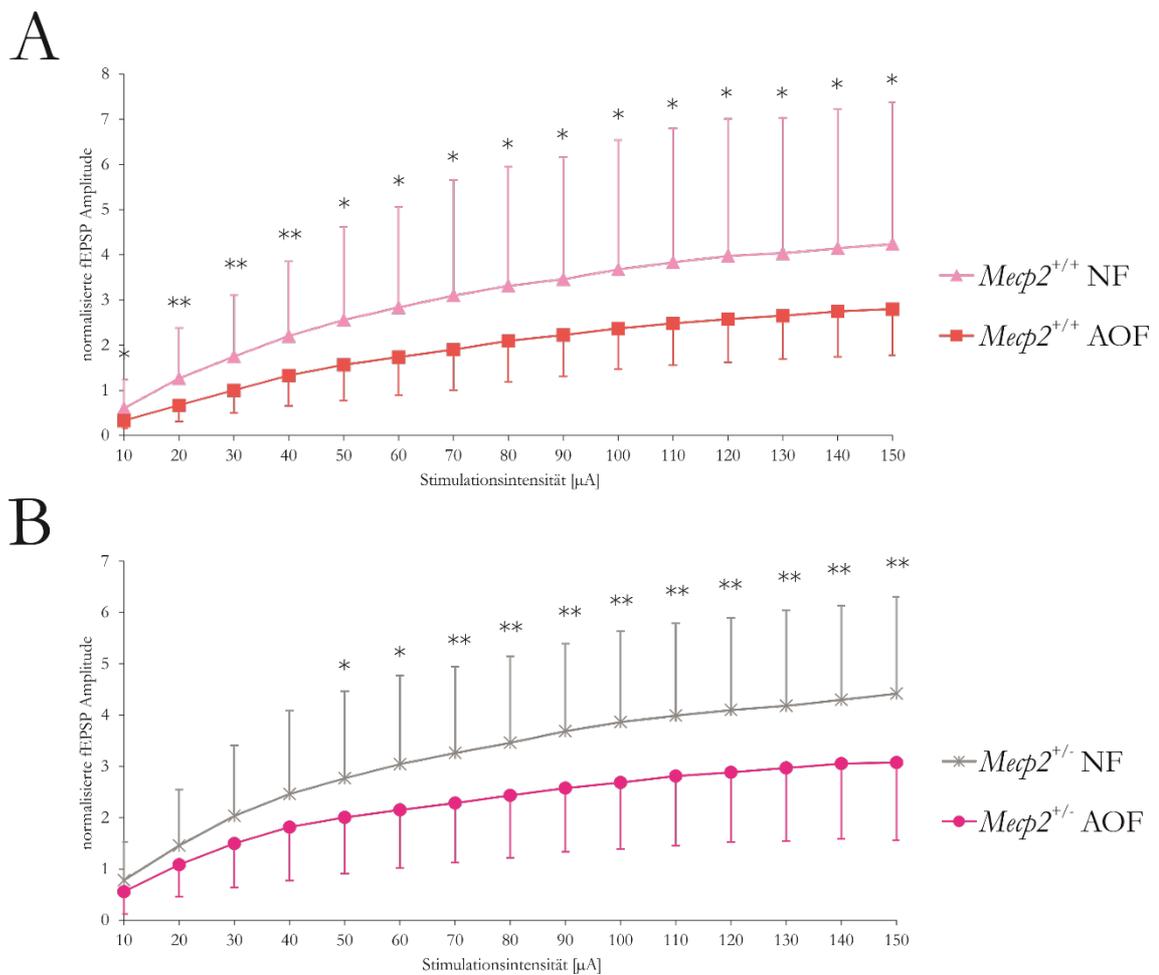


Abbildung 25: *Input-output*-Kurven postsynaptischer Potenziale (fEPSPs) der weiblichen Tiere, normalisiert auf den *fiber volley*, zeigen eine eindeutig verminderte Erregbarkeit durch die Substitution des AO-Futters

A: Wildtypen. **B:** *Mecp2*^{+/-}-Mäuse

3.2.2 Bewertung der synaptischen Kurzzeitplastizität

Das Ausmaß der synaptischen Kurzzeitplastizität wurde durch Doppelreize einer Stärke, die die halbmaximale Reizantwort im Gewebeschnitt auslöste, mit variiertem zeitlichem Abstand von 25 bis 200 ms beurteilt. In diesem Kapitel wird im Einzelnen das Verhältnis von der zweiten zur ersten Reizantwort begutachtet, jeweils als relative Werte, als Parameter zur Beurteilung der synaptischen Kurzzeitplastizität.

Die männlichen *Mecp2*^{+/y}-Mäuse beider Fütterungsarten zeigten im Gegensatz zu den normalgefütterten Wildtypen tendenziell eine verringerte, im Vergleich zu den AO-gefütterten Wildtypen eine tendenziell erhöhte synaptische Kurzzeitplastizität (Abbildung

26). Auch die weiblichen *Mecp2*^{+/-}-Mäuse wiesen eine verringerte synaptische Kurzzeitplastizität im Vergleich zu den gleichgefütterten Wildtypen auf (Abbildung 27).

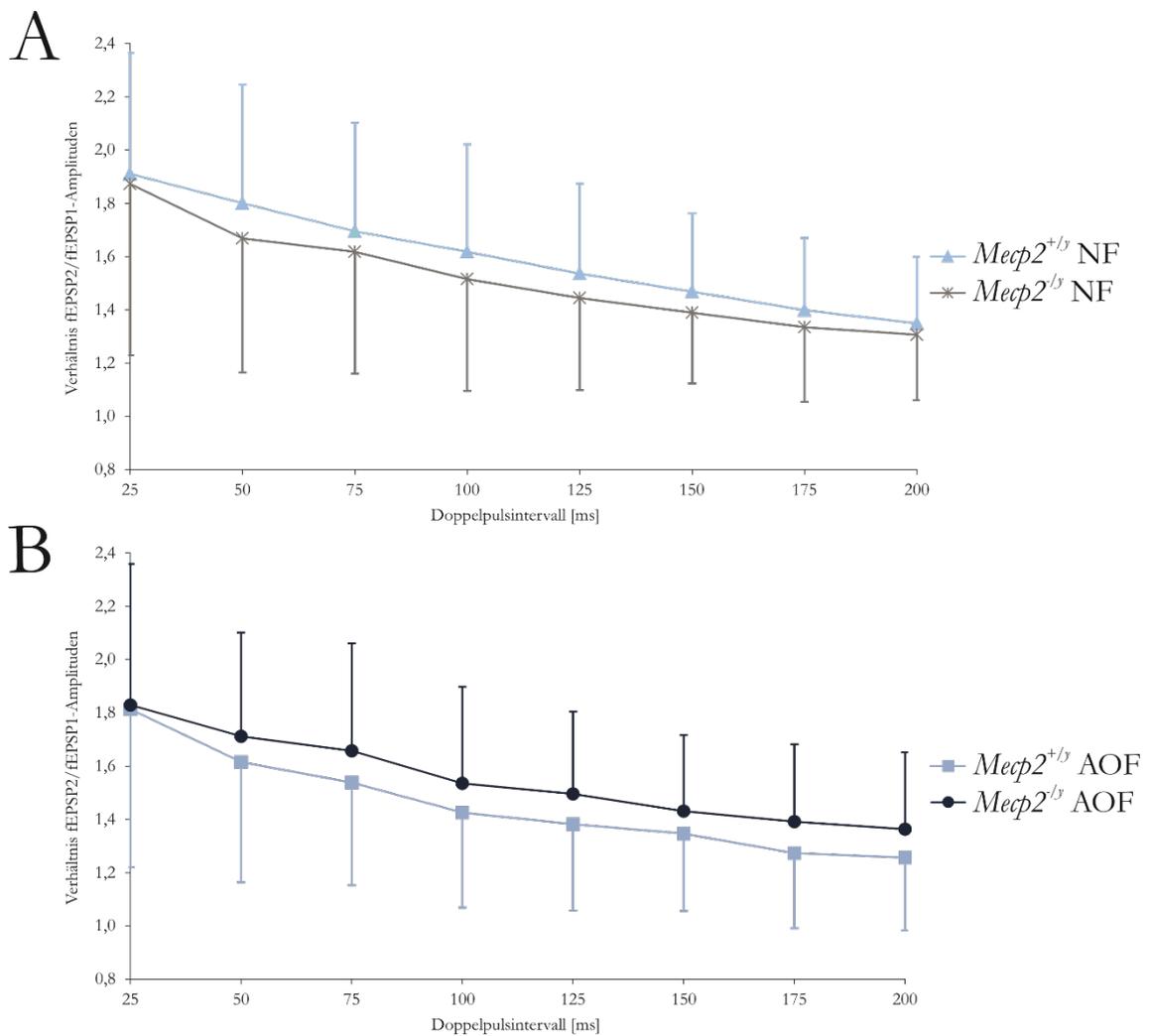


Abbildung 26: Tendenziell verminderte synaptische Kurzzeitplastizität in *Mecp2*^{ly}-Mäusen

Die *Mecp2*^{ly}-Mäuse beider Fütterungsarten zeigten im Gegensatz zu den normalgefütterten Wildtypen eine tendenziell verringerte, im Vergleich zu den AO-gefütterten Wildtypen eine tendenziell erhöhte synaptische Kurzzeitplastizität. **A:** Normalgefütterte männliche Versuchsgruppen. **B:** AO-gefütterte männliche Versuchsgruppen.

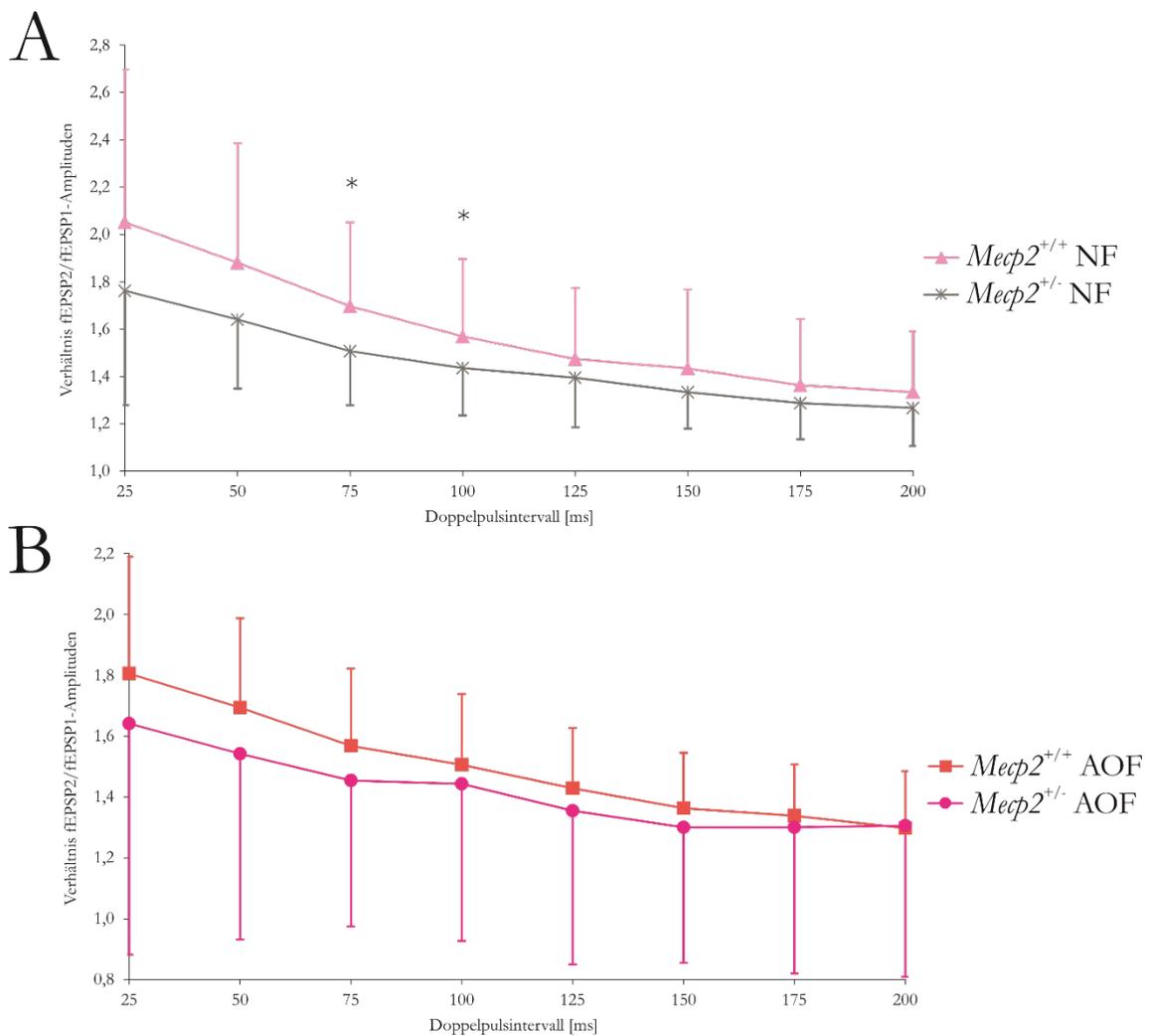


Abbildung 27: Verminderte synaptische Kurzzeitplastizität in *Mecp2*^{+/-}-Mäusen

Alle *Mecp2*^{+/-}-Mäuse wiesen eine verringerte synaptische Kurzzeitplastizität im Vergleich zu den gleichgefütterten Wildtypen auf. **A:** Normalgefütterte weibliche Versuchsgruppen. **B:** AO-gefütterte weibliche Versuchsgruppen.

3.2.3 Bewertung der Anoxievulnerabilität

3.2.3.1 Synaptisches Versagen und Regeneration während der HSD

Die Bewertung der Anoxievulnerabilität fand durch Auslösung einer HSD statt. Während der gesamten Messung wurde das Gewebe im Abstand von jeweils 20 Sekunden mit 100 μ A Reizen stimuliert und die entsprechenden fEPSPs gemessen.

Nach Einleitung der schweren Hypoxie, d.h. nach Umstellung der Versorgung des Gewebes auf das Stickstoff-Kohlenstoffdioxid-Gasgemisch (95% N₂, 5% CO₂), kam es in allen Versuchsgruppen zu einer ausgeprägten Unterdrückung der fEPSPs. Bei den

männlichen Tieren versagten die Synapsen in den *Mecp2^{+/-}*-Mäusen (NF, n = 21) am schnellsten und ausgeprägtesten, gefolgt von den *Mecp2^{+/-}*-Mäusen (AOF, n = 22), den *Mecp2^{-/-}*-Mäusen (AOF, n = 20) und schließlich den *Mecp2^{-/-}*-Mäusen (NF, n = 19) (Abbildung 28). So erfolgte eine 50%ige Unterdrückung der synaptischen Antworten in normalgefütterten *Mecp2^{+/-}*-Mäusen nach ca. 85 s, während das gleiche Ausmaß der Unterdrückung in gleichgefütterten *Mecp2^{-/-}* erst nach ca. 200 s Hypoxie erreicht wurde. Die fEPSPs der weiblichen Tiere wurden in den *Mecp2^{+/+}*-Mäusen (NF, n = 22) am schnellsten unterdrückt, nachfolgend von den *Mecp2^{+/-}*-Mäusen (AOF, n = 28), den *Mecp2^{+/-}*-Mäusen (AOF, n = 26) und letztlich den *Mecp2^{+/-}*-Mäusen (NF, n = 24) (Abbildung 29). Hier trat eine 50%ige Blockade nach ca. 120 s auf, wohingegen sie in den *Mecp2^{+/+}*-Mäusen bereits nach ca. 95 s erreicht wurde. Außerdem zeigten die männlichen Versuchsgruppen generell eine deutlich heterogenere Unterdrückung der fEPSPs als die weiblichen Versuchsgruppen.

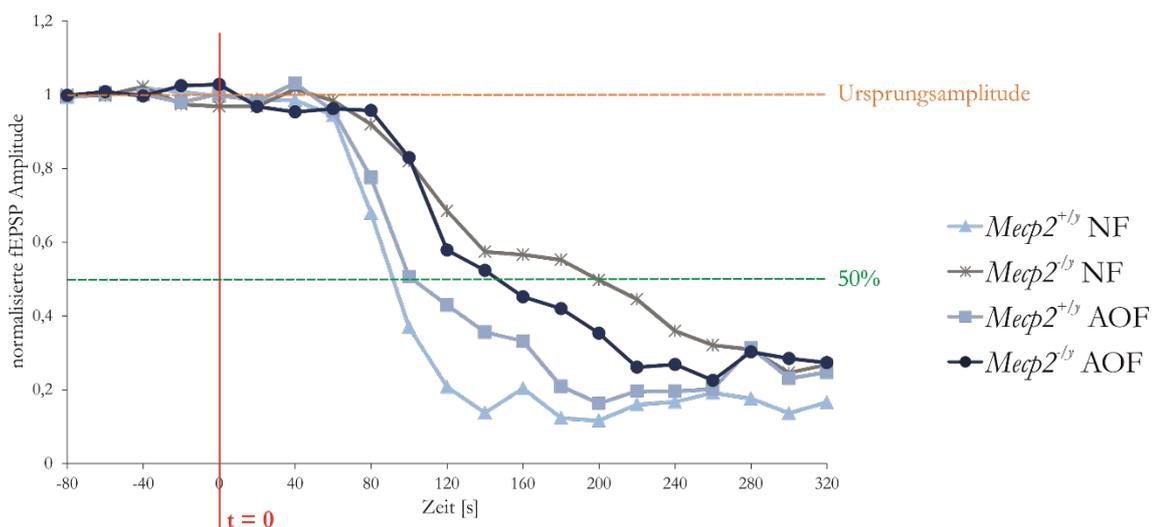


Abbildung 28: Nach Sauerstoffentzug zeigen die *Mecp2^{+/-}*-Mäuse ein langsames synaptisches Versagen

Die *Mecp2^{-/-}*-Mäuse wiesen ein deutlich langsames synaptisches Versagen nach Sauerstoffentzug als die Wildtypen auf. Besonders deutlich wird dies bei den normalgefütterten *Mecp2^{-/-}*-Männchen. Der Zeitpunkt der Umstellung auf das Stickstoff-Kohlenstoffdioxid-Gasgemisch wird durch „t = 0“ angegeben. Aufgetragen sind gemittelte fEPSPs, Fehlerbalken sind aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht gezeigt (dies gilt so auch für die Abbildungen 29 – 31).

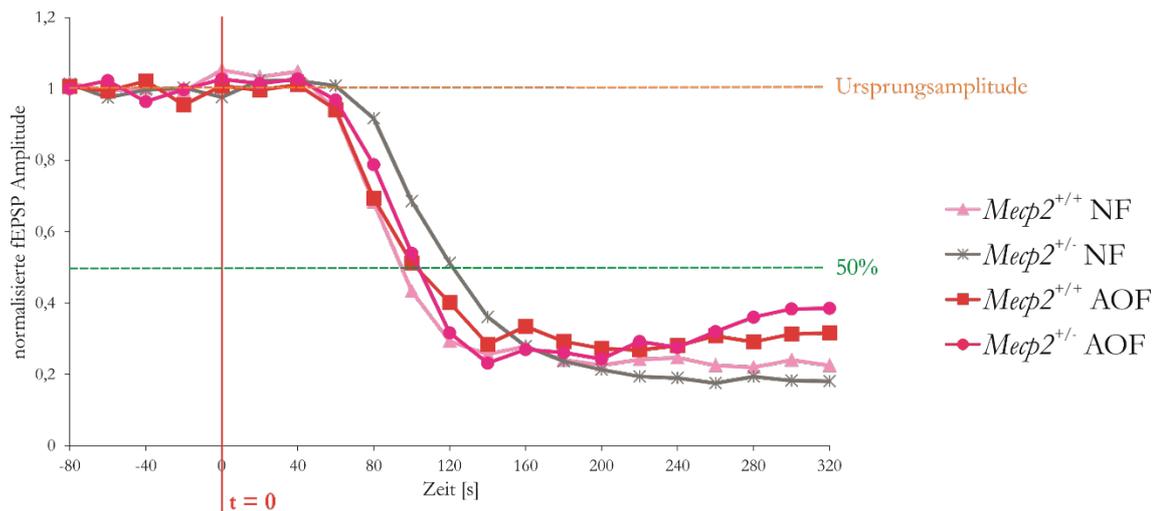


Abbildung 29: Normalgefütterte $Mecp2^{+/-}$ -Mäuse zeigen das langsamste synaptische Versagen nach Sauerstoffentzug

Das synaptische Versagen unterschied sich nur bei den normalgefütterten $Mecp2^{+/-}$ -Mäusen, das hier leicht verzögert im Vergleich zu den anderen Versuchsgruppen auftrat. Der Zeitpunkt der Umstellung auf das Stickstoff-Kohlenstoffdioxid-Gasgemisch wird durch „t = 0“ angegeben.

Nach Reoxygenierung des Gewebes erholten sich die fEPSPs aller Tiere allmählich, was das Zurückkehren der synaptischen Funktion anzeigt. Bei den männlichen Tieren präsentierten die $Mecp2^{+/y}$ -Mäuse (NF, n = 19) die schnellste Erholung, 50% bereits nach ca. 320 s, gefolgt von den $Mecp2^{+/y}$ -Mäusen (AOF, n = 20), den $Mecp2^{+/-y}$ -Mäusen (AOF, n = 22), und zuletzt den $Mecp2^{+/-y}$ -Mäusen (NF, n = 21), die 50% Erholung nach ca. 450 s zeigten (Abbildung 30). Bei den weiblichen Tieren zeigten die $Mecp2^{+/-}$ -Mäuse (AOF, n = 28) die schnellste Erholung, 50% nach ca. 260 s, darauf folgend die $Mecp2^{+/-}$ -Mäuse (NF, n = 24), die $Mecp2^{+/+}$ -Mäuse (NF, n = 22) und schließlich die $Mecp2^{+/+}$ -Mäuse (AOF, n = 26), die eine 50%ige Erholung nach ca. 390 s aufwiesen. (Abbildung 31).

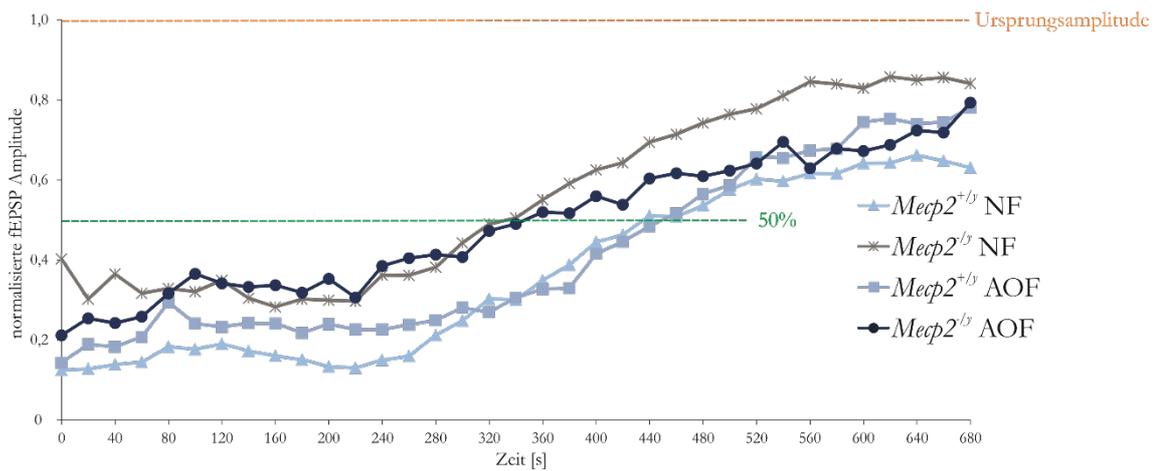


Abbildung 30: *Mecp2^{-/-}*-Mäuse zeigen die schnellste synaptische Regeneration nach der HSD und Reoxygenation

Die synaptische Regeneration nach Reoxygenation ist bei den *Mecp2^{-/-}*-Mäusen im Gegensatz zu den Wildtypen beschleunigt. Die Reoxygenierung erfolgte zum Zeitpunkt null (gilt so auch für Abbildung 31).

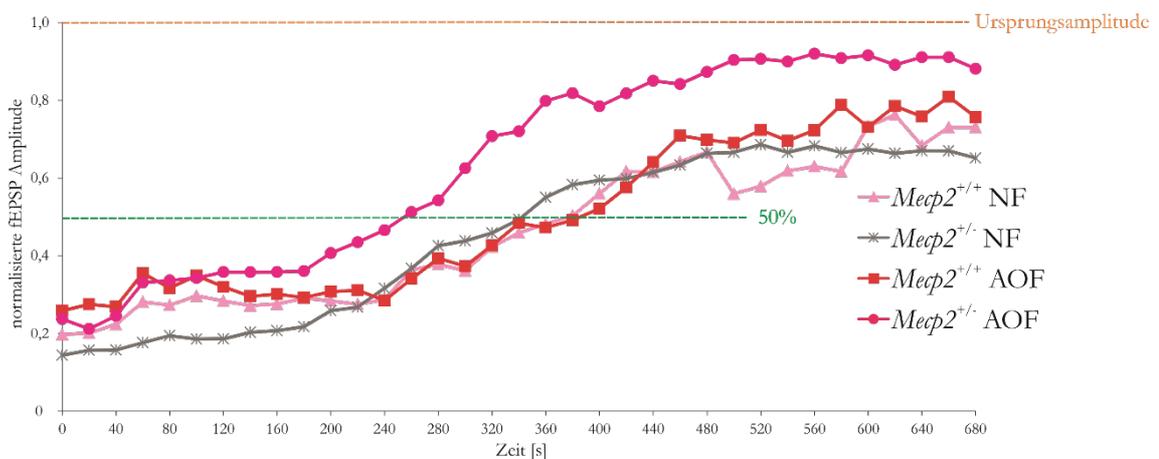


Abbildung 31: AO-gefütterte *Mecp2^{+/-}*-Mäuse zeigen die schnellste synaptische Regeneration nach der HSD und Reoxygenation

Die synaptische Regeneration nach Reoxygenation erfolgt bei AO-gefütterten *Mecp2^{+/-}*-Mäusen am schnellsten im Vergleich zu den anderen weiblichen Versuchsgruppen.

3.2.3.2 Anoxievulnerabilität

Die Zeitspanne, bis im Gewebe nach Umstellung auf die Versorgung mit dem Stickstoff-Kohlenstoffdioxid-Gasgemisch (95% N₂, 5% CO₂) eine HSD auftrat (Δt), war bei den normalgefütterten *Mecp2^{+/-}*-Mäusen deutlich niedriger als bei den gleichgefütterten *Mecp2^{-/-}*-

Mäusen (Abbildung 32). Bei den AO-gefütterten männlichen Versuchsgruppen wiesen die Wildtypen ebenfalls eine niedrigere Hypoxietoleranz als die *Mecp2^{+/y}*-Mäuse auf (Abbildung 32). Bezüglich der Art des Futters ließen sich weder bei den Wildtypen, noch bei den hemizygoten männlichen Tieren signifikante Unterschiede feststellen.

Auch bei den normalgefütterten weiblichen Tieren zeigten sich die *Mecp2^{+/-}*-Mäuse hypoxietoleranter als die Wildtypen (Abbildung 33). Das AO-Futter führte bei den *Mecp2^{+/-}*-Mäusen allerdings zu einer deutlich verringerten Hypoxietoleranz gegenüber den gleichgefütterten Wildtypen und den normalgefütterten *Mecp2^{+/-}*-Mäusen (Abbildung 33).

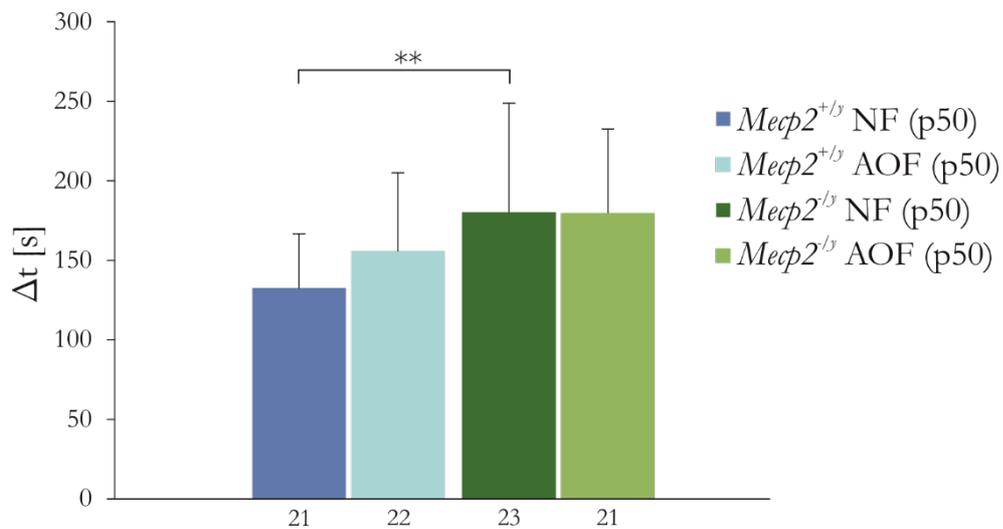


Abbildung 32: *Mecp2^{+/y}*-Mäuse zeigen sich hypoxietoleranter als die Wildtypen

Aufgetragen ist die Dauer, bis nach Sauerstoffentzug die HSD auftritt. Die *Mecp2^{+/y}*-Mäuse wiesen eine höhere Toleranz, bei Normalfütterung sehr signifikant, gegenüber Hypoxie als die gleichgefütterten Wildtypen auf.

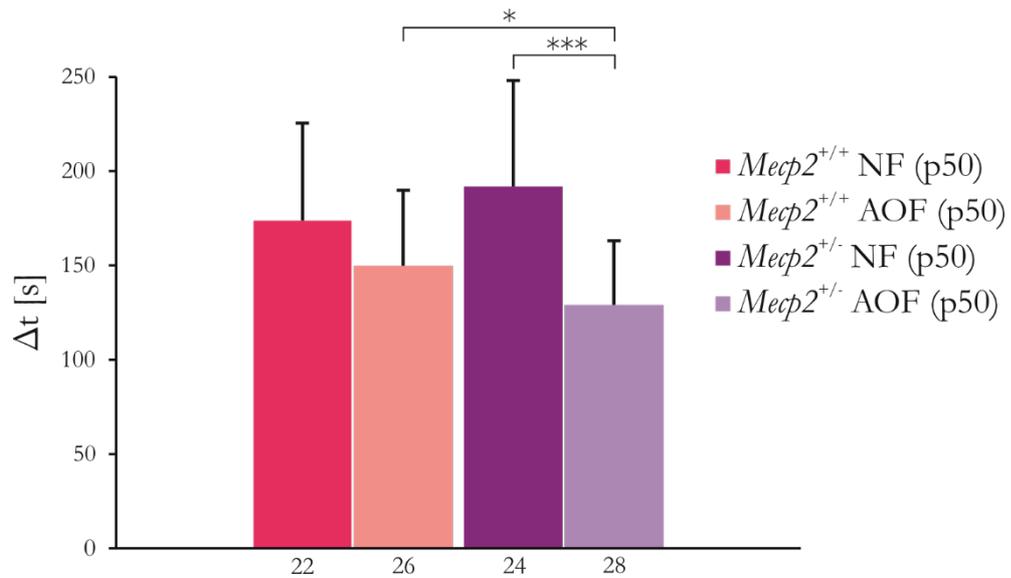


Abbildung 33: AO-Futter erniedrigt bei den *Mecp2*^{+/-}-Mäusen die Hypoxietoleranz

Zu sehen ist die Dauer, bis nach Sauerstoffentzug die HSD auftritt. Die *Mecp2*^{+/-}-Mäuse wiesen bei Normalfütterung eine höhere Toleranz und bei AO-Fütterung eine signifikant verringerte Toleranz gegenüber Hypoxie als die gleichgefütterten Wildtypen auf.

3.2.3.3 Dauer der HSD

Die mittlere Dauer, nach der sich die DC-Potential-Negativierung zur Hälfte erholte ($t_{1/2}$), war in den *Mecp2*^{+/-}-Mäusen beider Fütterungsarten (NF, AOF) kürzer als in den Wildtypen (Abbildung 34). Bei den weiblichen Tieren ließen sich weder innerhalb der Genotypen, noch innerhalb der unterschiedlichen Fütterungsarten signifikant differenzierte Regenerationszeiten des DC-Potentials erkennen. Allerdings zeigten auch hier die *Mecp2*^{+/-}-Mäuse eine tendenziell schnellere Regeneration als die Wildtypen (Abbildung 35).

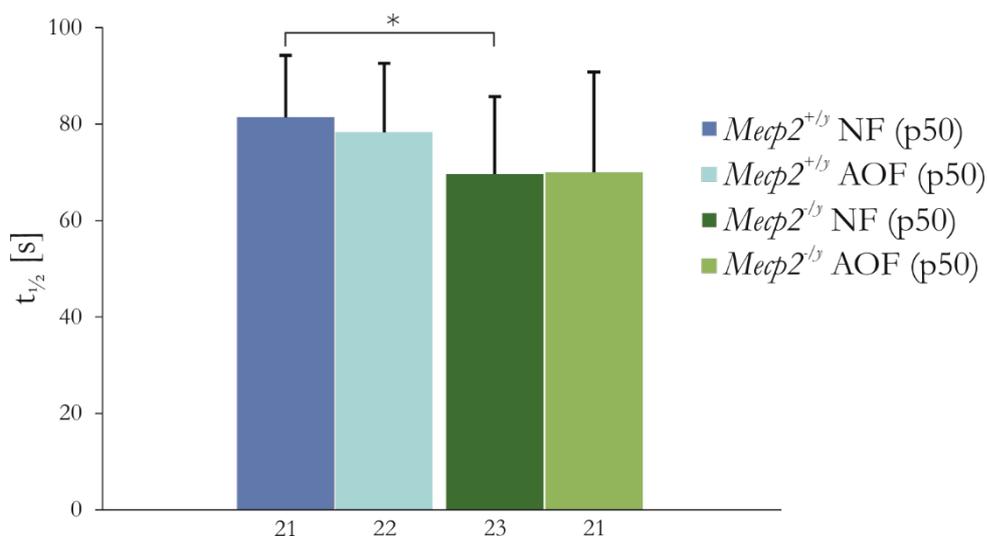


Abbildung 34: Männliche *Mecp2*^{/y}-Mäuse zeigen schnellere Regeneration des DC-Potentials nach der HSD als die Wildtypen

Die *Mecp2*^{/y}-Mäuse zeigten bei Normalfütterung eine kürzere Dauer der HSD als die gleichgefütterten Wildtypen.

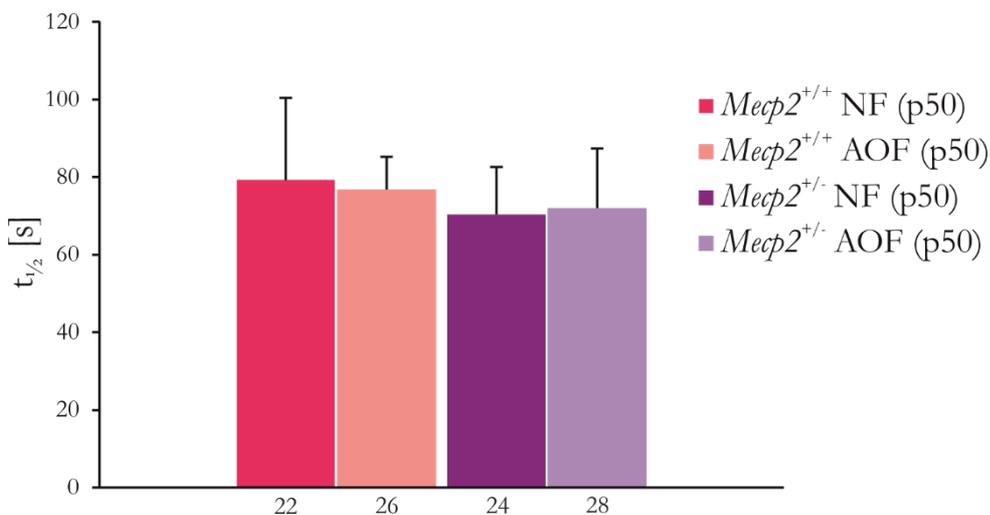


Abbildung 35: Tendenziell zügigere DC-Potential-Regeneration bei den weiblichen *Mecp2*^{+/-}-Mäusen gegenüber den Wildtypen

Die heterozygoten Tiere zeigten ein tendenziell schnelleres Abklingen des DC-Potentials nach der HSD als die gleichgefütterten Wildtypen.

3.2.3.4 Maximale Amplituden der DC-Potential-Negativierung während der HSD

Charakteristisch für das Auftreten einer HSD ist der rasche Abfall des extrazellulären DC-Potentials. Im Vergleich der maximalen, absoluten Amplituden der DC-Potential-

Negativierung (ΔV) zeigten die männlichen *Mecp2^{ly}*-Mäuse tendenziell etwas niedrigere Werte als die männlichen Wildtypen (Abbildung 36). Anders stellten sich die normalgefütterten weiblichen *Mecp2^{+/-}*-Mäuse dar, die deutlich erhöhte Amplituden gegenüber den gleichgefütterten Wildtypen aufwiesen (Abbildung 37). Das AO-Futter führte bei den weiblichen *Mecp2^{+/-}*-Mäusen zu einer Verringerung der Amplituden, ein ähnlicher Effekt blieb bei den männlichen Tieren aus.

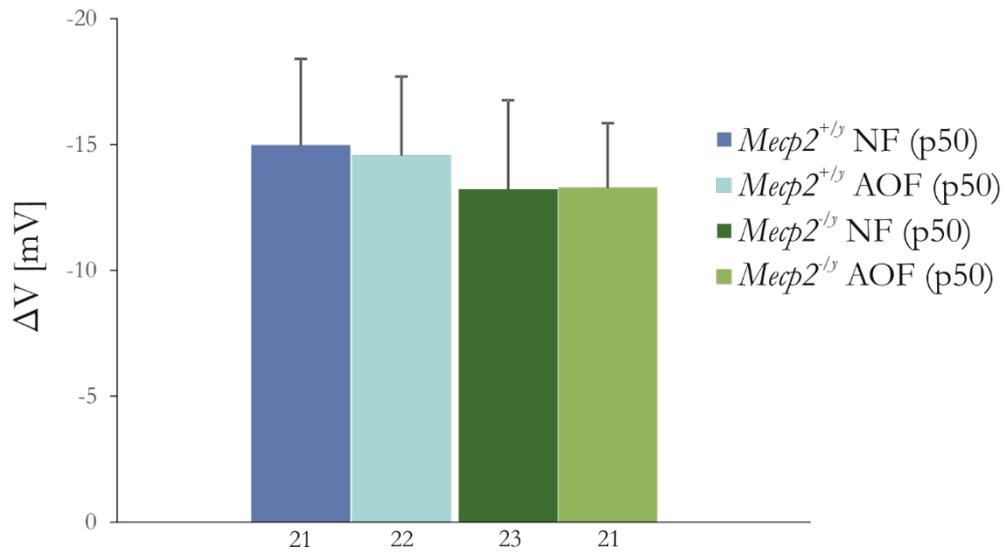


Abbildung 36: Männliche *Mecp2^{ly}*-Mäuse zeigen während der HSD tendenziell niedrigere maximale Amplituden (ΔV) als die Wildtypen

Die maximale DC-Potential-Negativierung war bei den männlichen *Mecp2^{ly}*-Mäusen im Vergleich zu den männlichen Wildtypen tendenziell verringert.

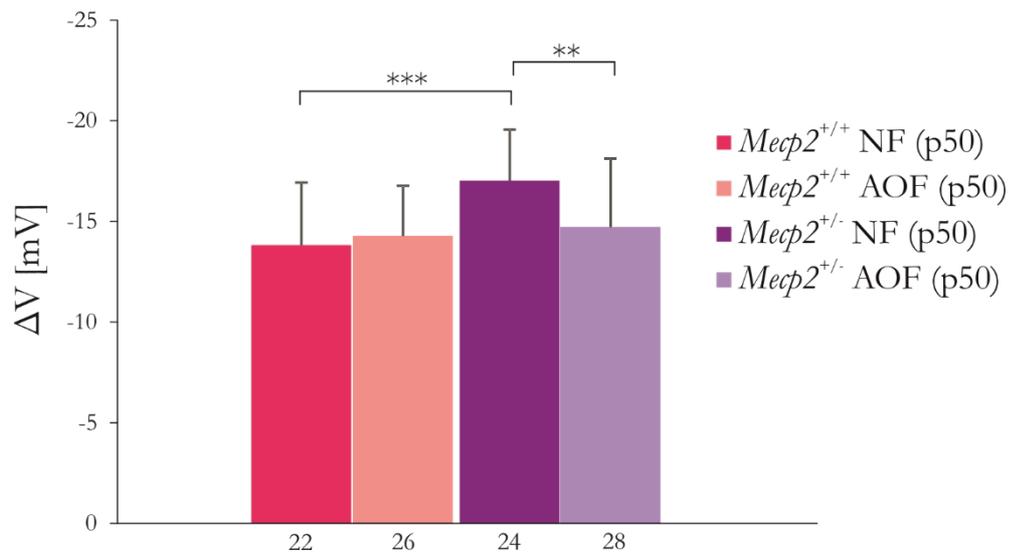


Abbildung 37: Das AOF mindert bei den weiblichen *Mecp2*^{+/-}-Mäusen die maximale Amplitude (ΔV) während der HSD

Die normalgefütterten *Mecp2*^{+/-}-Mäuse zeigten eine deutlich stärkere DC-Potential-Negativierung als die gleichgefütterten Wildtypen. Das AOF führte bei den weiblichen *Mecp2*^{+/-}-Mäusen zu einer weniger ausgeprägten Negativierung des DC-Potentials.

4 Diskussion

Im Folgenden werden die Ergebnisse dieser Arbeit diskutiert, der Übersicht halber aufgeteilt nach den plethysmographischen und elektrophysiologischen Messungen.

4.1 Plethysmographische Befunde

Das Ziel in diesem Teil der Arbeit war, einen möglichen therapeutischen Einfluss des AO-Futters auf die respiratorischen Dysfunktionen der männlichen und der weiblichen *Mecp2*-defizienten Mäuse zu untersuchen.

Die Atemfrequenzen waren in männlichen *Mecp2^{ly}*-Mäusen grundsätzlich vermindert (Abbildung 9). Allerdings stehen diese Frequenzen in Zusammenhang mit den während der Messung auftretenden häufigen Atemaussetzern, denn je mehr Atemaussetzer pro Sekunde auftreten, desto geringer fällt insgesamt die Atemfrequenz aus. In diese Überlegung passt auch der *irregularity score* der männlichen Tiere, da er sich bei den *Mecp2^{ly}*-Mäusen sowohl in der normal- als auch in der AO-gefütterten Versuchsgruppe höher darstellte als in den Wildtypmännchen (Abbildung 12). Auch die *intereventintervalle* dieser Versuchsgruppe wiesen eine höhere Variabilität als die Wildtypen auf und bestätigen das Vorkommen von Atmungsunregelmäßigkeiten (Abbildung 11). Ähnliches zeigte sich bei den weiblichen Tieren, da die jungen (p50) *Mecp2^{+/-}*-Mäuse eine signifikant niedrigere Atemfrequenz und einen höheren *irregularity score* als die gleichaltrigen weiblichen Wildtypen aufwiesen (Abbildung 13, Abbildung 18). Verminderte Atemfrequenzen konnten auch bei den älteren (p200) *Mecp2^{+/-}*-Mäusen festgestellt werden (Abbildung 13). Diese Ergebnisse entsprechen der Symptomatik des Rett-Syndroms im zweiten Stadium, der Regressionsphase, die u. a. durch das Auftreten respiratorischer Dysfunktion gekennzeichnet ist (Glaze et al. 1987; Bissonnette und Knopp 2006; Weese-Mayer et al. 2006; Stettner et al. 2008). Erweitert werden durch diese Befunde zudem bisherige Studien, die bei *Mecp2^{ly}*-Mäusen ebenfalls eine verringerte Atemfrequenz und ein erhöhtes Auftreten von Apnoen feststellten (Viemari et al. 2005; Stettner et al. 2007; Janc et al. 2016).

Interessant ist, dass sich bei den älteren (p200) *Mecp2^{+/-}*-Mäusen der *irregularity score* zwischen den Genotypen kaum noch unterschied (Abbildung 18). Bei der Gegenüberstellung der *Mecp2^{+/-}*-Mäuse beider Altersgruppen (p50, p200) lagen sowohl die Atemfrequenzen als auch der *irregularity score* der älteren Tiere teils signifikant unter denen der jungen Tiere (Abbildung 13, Abbildung 18). Daher lässt sich die Vermutung aufstellen, dass die Atmungsunregelmäßigkeiten im Laufe des Alters bei den *Mecp2^{+/-}*-Mäusen weniger

werden und somit eine offensichtliche Verbesserung des Atemverhaltens eintritt. Allerdings muss an dieser Stelle erwähnt werden, dass es sich bei den jungen und alten weiblichen Tieren bei diesen Messungen z.T. nicht um dieselben Tiere handelte. Da das *Mecp2*-Gen der zufälligen X-Chromosomenaktivierung unterliegt, kommt es bei den weiblichen heterozygoten Tieren zu dem Auftreten mosaikähnlicher Expressionsmuster des MeCP2 und in dessen Folge zur Entstehung heterogener Phänotypen (Young und Zoghbi 2004; Chahrour et al. 2008). So könnte noch angenommen werden, dass die weiblichen Phänotypen mit schwer ausgeprägten Symptomen vor Erreichen des 200. Lebensstages versterben und somit nur die älteren Tiere gemessen wurden, die einen Phänotyp mit einem geringen Schweregrad der Symptome aufwiesen. Um genauere Aussagen zur Entwicklung des respiratorischen Verhaltens mit zunehmendem Alter zu treffen, müssten die gleichen Tiere zu verschiedenen Zeitpunkten gemessen werden. Das war in dieser Arbeit nicht möglich, da die Tiere entweder vor Erreichen des 200. Lebensstages verstarben oder für andere *In-vitro*-Experimente verwendet wurden und es so in den beiden Altersgruppen nur zu geringen Überschneidungen kam, die einen adäquaten Vergleich nicht zuließen.

Die männlichen *Mecp2^{ly}*-Mäuse wären aufgrund der gleichartig ausgeprägten Phänotypen prinzipiell besser für entsprechende Altersvergleiche geeignet, scheiden jedoch aus, da sie aufgrund der Schwere der Symptome kein hohes Lebensalter erreichen. Es wurde bereits durch vorherige Untersuchungen gezeigt, dass *Mecp2^{ly}*-Mäuse innerhalb der ersten vier Wochen messbare respiratorische Dysfunktionen entwickelten, die auch bis zur achten Woche fortschritten, sie mündeten allerdings dann letztlich häufig im Atemstillstand (Viemari et al. 2005).

Lässt man die These des frühzeitigen Ablebens besonders schwer betroffener Phänotypen außer Acht, stellt sich also die Frage, ob die weiblichen *Mecp2^{+/-}*-Mäuse einen kompensatorischen Mechanismus entwickeln, der zu einer Verminderung der Atmungsunregelmäßigkeiten führt. Kompensationsprozesse wurden bei männlichen *Mecp2^{ly}*-Mäusen bereits im *Locus caeruleus* der *Formatio reticularis* im Rhombenzephalon, der bei der Signaltransduktion der *hypoglossalen* Motoneurone beteiligt ist und beim Rett-Syndrom beeinträchtigt ist, festgestellt (Jin et al. 2013; Oginsky et al. 2014). Die Neurone des *Locus caeruleus* werden durch Glutamat, GABA und Acetylcholin moduliert. Studien, die *Mecp2^{ly}*-Männchen post- und präsynaptisch Acetylcholingaben verabreichten, zeigten, dass obwohl die postsynaptischen Ströme der nikotinischen Acetylcholinrezeptoren (nAChR) bei den *Mecp2^{ly}*-Mäusen durch Veränderungen in der Expression einzelner nAChR-Untereinheiten, insbesondere der Einheiten $\alpha 5$, $\beta 3$ und $\alpha 7$, kleiner waren, es nur zu einer

mäßig reduzierten cholinergen Modulation der Neurone des *Locus caeruleus* kam, was auf eine mögliche Kompensation hinweist (Oginsky et al. 2014). Die *hypoglossalen* Motoneurone sind über die Innervation und damit Steuerung der Position der Zungenmuskulatur u. a. für die Durchgängigkeit der oberen Atemwege zuständig. Dysfunktionen dieser Neurone können z. B. zur Entwicklung von Schlafapnoen führen (Sauerland und Harper 1976; Brouillette und Thach 1979). Die Hemmung *hypoglossaler* Motoneurone wird über NE durch α_2 -Adrenorezeptoren moduliert (Funk et al. 1994). Bei Studien, die die *hypoglossalen* Motoneurone durch Aktivierung der α_1 -Adrenorezeptoren an der Prä- und Postsynapse modulierten, stellte sich heraus, dass bei den *Mecp2^{ly}*-Männchen eine Verstärkung der prä- und postsynaptischen Modulationen von *hypoglossalen* Motoneuronen vorhanden war. Dies könnte ein Kompensationsmechanismus für die Dysfunktionen des NE-Systems und der GABAergen Signaltransduktionen sein (Jin et al. 2013).

Bei der Ganzkörperplethysmographie hatten die Tiere die Möglichkeit, sich innerhalb der Messkammer frei zu bewegen. Durch das Filmen der Tiere und anschließendem Vergleich mit den Atmungsdaten konnten bestimmte Verhaltensmuster den jeweiligen Atemmustern zugeordnet werden. So wurde festgestellt, dass in der Aufzeichnung sichtbare Atemaussetzer auch z. B. beim Erkunden des Bodengitters und kurz andauernde Sequenzen außerordentlich hoher Atemfrequenzen bei der Körperpflege sowie der Erkundung des Deckels der Messkammer auftraten (Abbildung 19). Um diese Verhaltensmuster gruppenspezifisch nachzuweisen, wurden die Atemfrequenzen und *intereventintervalle* in Histogrammen dargestellt. Bei den entsprechenden Histogrammen der Atemfrequenzen fielen bei allen Wildtypen zwei Gipfel im Bereich hoher Atemfrequenzen auf. Diese Häufigkeitsspitzen waren bei den *Mecp2^{+/-}*-Mäusen (p50) leicht und bei den *Mecp2^{+/-}*-Mäusen (p200) stark im Vergleich zu den gleichaltrigen Wildtypen vermindert und fehlten bei den *Mecp2^{ly}*-Mäusen (p50) nahezu vollständig (Abbildung 11, Abbildung 14, Abbildung 15). Werden also die Ergebnisse aus den Videoanalysen, die Verbindung sehr hoher Atemfrequenzen mit explorativem Verhalten, auf die Histogramme bezogen, lässt sich die Vermutung aufstellen, dass diese Frequenzspitzen sehr hoher Atemfrequenzen die Ausübung explorativen Verhaltens darstellen könnten und daraus resultierend die *Mecp2^{ly}*-Mäuse (p50) während der Messungen im Gegensatz zu den Wildtypen kaum und auch die *Mecp2^{+/-}*-Mäuse (p50) sowie die *Mecp2^{+/-}*-Mäuse (p200) vermindertes exploratives Verhalten zeigten. Die erkrankten Tiere und auch bereits die jungen heterozygoten Weibchen scheinen nicht in dem gleichen Ausmaß wie die Wildtypen ihre Umgebung zu erkunden oder Körperpflege zu betreiben. Dies passt zur Symptomatik des Rett-Syndroms, in dem sich u. a. autismusähnliche Merkmale wie z. B. herabgesetzte Reaktionen im Sozialverhalten

sowie ein erhöhtes Bedürfnis nach Schlaf und Ruhe am Tag präsentieren (Nomura und Segawa 1990; Nomura 2005). Eine Verbesserung der autismusähnlichen Merkmale, wie sie teilweise im dritten und vierten Stadium der Krankheit bei Rett-Syndrom-Patientinnen beschrieben werden (Hagberg et al. 1983; Chahrour und Zoghbi 2007), konnte hier nicht festgestellt werden, da die älteren heterozygoten Tiere ein deutlich verringertes exploratives Verhalten als die jüngeren Tiere gleichen Genotyps aufwiesen.

4.2 Elektrophysiologische Befunde

Die elektrophysiologischen Analysen sollten einen möglichen therapeutischen Einfluss des AO-Futters auf die basale Synapsenfunktion, das Ausmaß der synaptischen Plastizität sowie auf die Anoxievulnerabilität des Hippokampus untersuchen.

Die MeCP2-Mangel scheint die basale hippocampale Synapsenfunktion weitestgehend intakt und ohne funktionelle Beeinträchtigungen zu lassen (Abbildung 20). Dies bestätigt vorangegangene Studien, die einen deutlichen Einfluss eines MeCP2-Mangels auf die basale Synapsenfunktion ausschließen (Fischer et al. 2009). Das AO-Futter dämpfte bei den weiblichen Wildtypen die Erregbarkeit (Abbildung 21) und erweitert vorangegangene Studien, die ähnliches bei der Inkubation hippocampaler Schnitte mit Trolox feststellten (Janc und Müller 2014).

Die Normierung der Reizantworten auf den *fiber volley* zeigte eine signifikant verminderte Erregbarkeit aller AO-gefütterten Versuchsgruppen im Vergleich zu den jeweiligen normalgefütterten Genotypen (Abbildung 24, Abbildung 25). Da ähnliche Ergebnisse bei der Normierung auf die maximale Amplitude ausblieben, spricht es für einen im Verhältnis zu den fEPSPs erhöhten *fiber volley*. Der *fiber volley* spiegelt das Aktionspotenzial in den CA3-Axonon wider, dessen Amplitude proportional zur Anzahl der stimulierten präsynaptischen Fasern ist. Somit könnte dies einen Effekt des AO-Futters auf die Anzahl, bzw. die Erregbarkeit der stimulierten präsynaptischen Fasern andeuten.

Der MeCP2-Mangel führte in dieser Arbeit zu einer teils signifikanten Verringerung der synaptischen Kurzzeitplastizität und stützt damit vorangegangene Studien mit ähnlichen Befunden (Moretti et al. 2006; Fischer et al. 2009). Diese Ergebnisse bestätigen einen Einfluss des MeCP2-Mangels auf präsynaptische Vorgänge, da die als *paired-pulse-facilitation* bezeichnete verstärkte postsynaptische Antwort ein Effekt auf Doppelpulse der Präsynapse ist (Kuhnt und Voronin 1994). Zudem untermauern sie damit frühere Untersuchungen (Asaka et al. 2006; Moretti et al. 2006). Der postsynaptische Einfluss wurde bereits durch Studien, die eine Beeinträchtigung der Langzeitpotenzierung des Hippokampus feststellten,

ebenfalls erwiesen (Guy et al. 2001; Malenka und Bear 2004; Asaka et al. 2006; Moretti et al. 2006; Janc und Müller 2014). Die orale Antioxidantiensubstitution scheint therapeutisch zu keiner offensichtlichen Verbesserung der synaptischen Kurzzeitplastizität zu führen, da insbesondere die AO-gefütterten *Mecp2^{+/-}*-Mäuse unter einer deutlichen Kurzzeitplastizitätsverringering litten. Da jedoch in unserer Arbeitsgruppe mit einer systemischen Verabreichung von Antioxidantien in Form einer intraperitonealen Trolox-Injektion die synaptische Kurzzeitplastizität in männlichen *Mecp2^{ly}*-Mäusen bereits verbessert wurde (Janc et al. 2016), bleibt zu klären, wieso die orale Applikation vom hier verwendeten Antioxidantiengemisch (α -Liponsäure, N-Acetyl-L-Cystein, Vitamin E) keine gleichwertigen Effekte vermittelt. Vermutungen wären neben der veränderten Zusammensetzung des Antioxidantiengemisches, dass die orale Applikation nicht die optimalen Wirkorte im Körper der Tiere erreicht oder deren Bioverfügbarkeit in den Bereichen zu gering ist, die für die Wiederherstellung der Redoxhomöostase notwendig wären. Da allerdings die intraperitoneale Injektion keine Option für die Anwendbarkeit am Menschen darstellt, gilt es über Alternativen nachzudenken, wie eine Applikation von Antioxidantien effektiv, aber auch als therapeutischer Ansatz am Menschen durchführbar wäre.

Weitere Probleme ergeben sich bei der genauen Dosierung der Antioxidantien. Die Redoxhomöostase ist ein sensibles System, das durch viele Faktoren beeinflusst wird. Gerät sie aus dem Gleichgewicht und kommt es infolgedessen zu erhöhten ROS-Konzentrationen, entsteht für den Organismus oxidativer Stress (Milton und Sweeney 2012; Sinha et al. 2013). Dazu kommt bei den Rett-Syndrom-Patientinnen die mosaikähnliche Expression des MeCP2 und infolgedessen die hohe Variation der Phänotypen, sodass der Zustand der Redoxhomöostase der einzelnen Patienten unter Umständen individuell geprüft werden müsste, um eine Über- oder Unterdosierung mit Antioxidantien zu vermeiden.

Einen anderen vielversprechenden Therapieansatz stellt der insulinähnliche Wachstumsfaktor 1 (*insulin-like growth factor 1* (IGF-1)) für die direkte Beeinflussung homöostatischer Mechanismen hippokampaler und neokortikaler Erregbarkeitsänderungen dar (Tropea et al. 2009). IGF-1 stimuliert nachweislich die Neurogenese und Synaptogenese im *Gyrus dentatus* des sich entwickelnden Hippokampus. Überexpression von IGF-1 führt beispielsweise zu einer deutlichen Zunahme der Gehirngröße und einem eindeutig erhöhten Myelin-Gehalt der Oligodendrozyten (Carson et al. 1993; O'Kusky et al. 2000). In männlichen *Mecp2^{ly}*-Mäusen wurden verminderte IGF-1-Konzentrationen gefunden und eine systemische Behandlung mit rekombinatem humanen IGF-1

verbesserten bei diesen Tieren die Lebensspanne, die Bewegungsaktivität, die Herzfrequenz, das Atmungsmuster und das Sozial- und Angstverhalten und führten zu einer stabilisierten kortikalen Plastizität (Tropea et al. 2009; Castro et al. 2014). Besonders erfolgsversprechend ist in diesem Zusammenhang eine kürzlich durchgeführte Studie an Rett-Syndrom-Patientinnen, die klinisch relevante Verbesserungen der Kernsymptome durch die Behandlung mit Trofinetid (Glycyl-L-2-methylprolyl-L-Glutaminsäure) im Vergleich zu einer placebosubstituierten Kontrollgruppe nachwies (Glaze et al. 2019). Trofinetid ist ein Analogon des aminoterminalen Tripeptids des IGF1 (Carlsson-Skwirut et al. 1986; Bickerdike et al. 2009).

Die AO-gefütterten *Mecp2^{+/-}*-Mäuse ausgenommen, zeigten alle erkrankten Tiere eine höhere Anoxietoleranz. Dies widerspricht vorangegangenen Studien, die eine deutlich erniedrigte Anoxietoleranz bei mangelndem MeCP2 in männlichen Mäusen feststellten (Fischer et al. 2009; Janc und Müller 2014). Als methodischer Unterschied dieser Arbeit ist jedoch die durchgehende Stimulation während der HSD zu nennen, die in den genannten Untersuchungen ausblieb. Die verminderte Anoxievulnerabilität der AO-gefütterten erkrankten weiblichen Tiere suggeriert zudem eine Verschlechterung der Hypoxietoleranz durch das Antioxidantienfutter. Entgegen der Erwartungen zeigten die männlichen *Mecp2^{ly}*-Mäuse und die normalgefütterten weiblichen *Mecp2^{+/-}*-Mäuse nach Beginn der Hypoxie ein deutlich langsames synaptisches Versagen als die Wildtypen. Auch die posthypoxische Regeneration wurde durch einen MeCP2-Mangel nicht beeinträchtigt, da die Dauer der HSD (DC-Potential-Negativierung) der erkrankten Tiere bei allen Genotypen kürzer als bei den Wildtypen war. Dies gibt allerdings keinen Hinweis auf eine Langzeitschädigung der Neurone, da es sich um akute Hippokampusschnitte handelt und eine Beobachtung über einen längeren Zeitraum entsprechende *In-vivo*-Modelle erfordern würden.

Bekannt ist, dass Bedingungen, die die neuronale Erregbarkeit erhöhen, den Beginn der HSD beschleunigen, wohingegen solche, die die Erregbarkeit reduzieren, diese verzögern (Aitken et al. 1991; Müller 2000). Im Umkehrschluss würde das in Bezug auf diese Ergebnisse bedeuten, dass die neuronale Erregbarkeit durch einen MeCP2-Mangel vermindert wäre. Allerdings wurden in früheren Untersuchungen eindeutige Hinweise auf Übererregbarkeit bei Patienten mit Rett-Syndrom bis hin zu epileptischen Anfällen gefunden (Glaze 2005). Mögliche Ursachen lieferten Studien, die zeigten, dass im Gehirn von Mäusen mit MeCP-Mangel eine verminderte Expression der GABA-Rezeptor- $\alpha 2$ -, $\alpha 4$ - und $\beta 3$ -Untereinheit vorlagen (Samaco et al. 2005; Medrihan et al. 2008). Zudem wurden verringerte basale inhibitorische rhythmische Aktivitäten in der hippokampalen CA3-

Region gefunden (Zhang et al. 2008). Eine mögliche Erklärung für die in dieser Arbeit festgestellte erhöhte Hypoxietoleranz der erkrankten Männchen könnte eine neuronale Präkonditionierung an eine niedrige Sauerstoffversorgung sein. Diese Vermutung wird gestützt von Studien, die in Hippokampusgeweben von adulten *Mecp2*^{fl/y}-Mäusen einen normalen zellulären ATP-Spiegel feststellten (Fischer et al. 2009), was auf eine mögliche kompensatorisch gesteigerte mitochondriale Atmung zur Sicherstellung der ATP-Versorgung hinweisen könnte (Müller und Can 2014). Gestärkt wird die Idee einer Kompensation durch Ergebnisse einer Genexpressionsanalyse isolierter Lymphozyten von Rett-Syndrom-Patientinnen, die eine Hochregulation einiger Gene, die für das zelluläre Redoxgleichgewicht verantwortlich sind, belegen (Pecorelli et al. 2013).

Das Auftreten einer HSD kann außerdem von der Gewebemorphologie und der Größe des Extrazellulärtraumes beeinflusst werden. Die Zellpackungsdichte war bei kortikalen Neuronen von Rett-Syndrom-Patientinnen erhöht und die neuronale Größe verringert (Bauman et al. 1995). Die dichte Packung von Neuronen erhöhen allerdings die Wechselwirkungen, zum Beispiel in Form von *gap junctions* zwischen den Zellen (Vigmond et al. 1997), und Netzwerke von Neuronen reagieren empfindlicher auf elektrische Felder als einzelne Neuronen (Francis et al. 2003). Diese genannten erhöhten Wechselwirkungen würden somit eher zu Hypererregbarkeiten führen, sodass sie keine Erklärungen für die verminderten Erregbarkeiten der erkrankten Tiere in dieser Arbeit darstellen. Eine andere Vermutung für die beschriebene verringerte Erregbarkeit bei den erkrankten Tieren könnten Anomalien im Sinne verringerter dendritischer Fortsätze in Pyramidenzellen des Kortex sein, die bei Rett-Syndrom-Patientinnen bereits beobachtet wurden (Belichenko et al. 1994).

Letztlich ist zu erwähnen, dass die untersuchten Tiere aufgrund einer Verlegung der Tierställe mehrfach umgezogen sind. Ein Effekt der veränderten Haltungsbedingungen ist auf die Ergebnisse dieser Arbeit nicht auszuschließen, da jeder Umzug mit einer neuen Raumaufteilung, anderen Tierpflegern sowie Käfigwechseln einhergeht. Dies kann für die Tiere Stress bedeuten, da sie z. B. jeden neuen Käfig erkunden und markieren müssen (Arras et al. 2007). Zudem wurde das Zuchtfutter umgestellt. Es wurde bereits mehrfach berichtet, dass Haltungsbedingungen einen wichtigen Einfluss auf die Verfassung von Mäusen und infolge dessen auf das Ergebnis von Studien haben (Chourbaji et al. 2005).

5 Zusammenfassung

Resultierend ist anzuführen, dass diese Arbeit in Bezug auf die respiratorischen Dysfunktionen bei einem MeCP2-Mangel bisherige Ergebnisse erweitert und auch ein frühes Auftreten der Symptomatik bei jungen Tieren bestätigt. Zwar führte das AO-Futter zu keiner grundsätzlichen Verbesserung der Atmungsstörungen in allen Versuchsgruppen, doch reduzierte es die Atmungsunregelmäßigkeiten bei den älteren weiblichen heterozygoten Tieren (p200) und hatte auf das Atmungsverhalten der Kontrollgruppe der Wildtypen keinen negativen Einfluss. So könnte die orale Antioxidantienverabreichung eine Möglichkeit werden, die Atmungsunregelmäßigkeiten bei den Rett-Syndrom-Patientinnen zu mindern und so die Gefahr der mit den Apnoen einhergehenden gefährlichen kardialen Folgen bis zum plötzlichen Herztod zu verringern. Die Analyse der Atmungsunregelmäßigkeiten zeigte zudem ein gruppenspezifisches exploratives Verhalten, das bei den erkrankten Tieren eindeutig vermindert war und bei den weiblichen Tieren mit dem Alter abnahm. Dieses Verhalten deutet auf ein frühes und mit dem Alter der erkrankten Tiere progredientes Vorkommen autismusähnlicher Merkmale hin. Kritisch hinterfragt werden muss der Vergleich der jungen und alten weiblichen Tiere, da die Möglichkeit besteht, dass in erster Linie nur die alten weiblichen Tiere überleben, die einen milderen Phänotyp mit weniger stark ausgeprägten Symptomen aufweisen. Um diesen Faktor auszuschließen, sollte bei einer erneuten Untersuchung darauf geachtet werden, dass jeweils die gleichen Tiere zu unterschiedlichen Zeitpunkten gemessen werden.

Das AO-Futter führte allein in weiblichen Wildtypen zu einer verminderten neuronalen Erregbarkeit. Ebenso verminderte diese Fütterungsart die synaptische Kurzzeitplastizität der Wildtypen beider Geschlechter, sodass ein therapeutischer Nutzen der oralen Antioxidantienapplikation auf die synaptischen Dysfunktionen der MeCP2-Mäuse eher auszuschließen ist. Da in früheren Studien mit einer systemischen Trolox-Behandlung in Form einer intraperitonealen Trolox-Injektion die synaptische Kurzzeitplastizität verbessert wurde (Janc et al. 2016), ist zu prüfen, wieso die orale Applikation des genutzten Antioxidantienmischungs keine gleichwertigen, vielversprechenden Effekte vermittelt und ob alternative Applikationsarten oder Zusammensetzungen antioxidativ wirkender Substanzen einen therapeutischen Ansatz darstellen können, Antioxidantien zur Linderung der Symptomatik beim Rett-Syndrom einzusetzen. Die aktuellen Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe, die eine verstärkte Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies, speziell des

H₂O₂ aus den Mitochondrien, bei *Mecp2^{ly}*- und *Mecp2^{+/-}*-Mäusen nachwies (Adebayo et al. 2020), untermauern die Vermutung des Zusammenhangs zwischen ROS-Bildung und der Rett-Syndrom-Pathogenese. Somit könnten die mitochondriale ROS-Produktion oder die zelluläre Redoxhomöostase konkrete therapeutische Angriffspunkte darstellen. Außerdem sollten weitere pharmakologische Substanzen, die Einfluss auf derartige homöostatische Mechanismen bei Rett-Syndrom-Patientinnen nehmen können, eingehend geprüft werden. Besonders vielversprechend scheint in diesem Zusammenhang Trofinetid zu sein.

Einige Untersuchungen dieser Arbeit, insbesondere die Atmungsstörungen, deuten auf das Bestehen eines Kompensationsmechanismus im Sinne einer neuronalen Präkonditionierung an geringe Sauerstoffniveaus bei einem MeCP2-Mangel hin. Arbeitsgruppen, die bereits spezielle Gene bestimmten, die bei Rett-Syndrom-Patientinnen hochreguliert sind und für die Redoxhomöostase von Relevanz sind (Pecorelli et al. 2013), liefern interessante Ansätze in diese Richtung und derartige Konzepte sollten ebenfalls weiterverfolgt werden.

6 Literaturverzeichnis

Adebayo OL, Dewenter I, Rinne L, Golubiani G, Solomon R, Müller M (2020): Intensified mitochondrial hydrogen peroxide release occurs in all brain regions, affects male as well as female Rett mice, and constitutes a life-long burden. *Arch Biochem Biophys* 696, 108666

Aitken PG, Jing J, Young J, Somjen GG (1991): Ion channel involvement in hypoxia-induced spreading depression in hippocampal slices. *Brain Res* 541, 7-11

Akselrod S, Gordon D, Ubel FA, Shannon DC, Berger AC, Cohen RJ (1981): Power spectrum analysis of heart rate fluctuation: a quantitative probe of beat-to-beat cardiovascular control. *Science* 213, 220-222

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

Amir RE, Van den Veyver IB, Schultz R, Malicki DM, Tran CQ, Dahle EJ, Philippi A, Timar L, Percy AK, Motil KJ et al. (2000): Influence of mutation type and X chromosome inactivation on Rett syndrome phenotypes. *Ann Neurol* 47, 670-679

Andersen JK (2004): Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? *Nat Med* 10, S18-S25

Andersen P, Bliss TV, Skrede KK (1971): Lamellar organization of hippocampal pathways. *Exp Brain Res* 13, 222-238

Andersen P, Bliss TV, Lomo T, Olsen LI, Skrede KK (1969): Lamellar organization of hippocampal excitatory pathways. *Acta Physiol Scand* 76, 4A-5A

Arras M, Rettich A, Cinelli P, Kasermann HP, Burki K (2007): Assessment of post-laparotomy pain in laboratory mice by telemetric recording of heart rate and heart rate variability. *BMC Vet Res* 3, 16

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

Bass R, Ruddock LW, Klappa P, Freedman RB (2004): A major fraction of endoplasmic reticulum-located glutathione is present as mixed disulfides with protein. *J Biol Chem* 279, 5257-5262

Bast A, Haenen GR (1988): Interplay between lipoic acid and glutathione in the protection against microsomal lipid peroxidation. *Biochim Biophys Acta* 963, 558-561

Bauman ML, Kemper TL, Arin DM (1995): Pervasive neuroanatomic abnormalities of the brain in three cases of Rett's syndrome. *Neurology* 45, 1581-1586

Belichenko PV, Oldfors A, Hagberg B, Dahlstrom A (1994): Rett syndrome: 3-D confocal microscopy of cortical pyramidal dendrites and afferents. *Neuroreport* 5, 1509-1513

Bickerdike MJ, Thomas GB, Batchelor DC, Sirimanne ES, Leong W, Lin H, Sieg F, Wen J, Brimble MA, Harris PW et al. (2009): NNZ-2566: a Gly-Pro-Glu analogue with neuroprotective efficacy in a rat model of acute focal stroke. *J Neurol Sci* 278, 85-90

Bissonnette JM, Knopp SJ (2006): Separate respiratory phenotypes in methyl-CpG-binding protein 2 (*Mecp2*) deficient mice. *Pediatr Res* 59, 513-518

Bliss TV, Lomo T (1973): Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol* 232, 331-356

Bliss TV, Collingridge GL (1993): A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361, 31-39

Bokoch GM, Knaus UG (2003): NADPH oxidases: not just for leukocytes anymore! *Trends Biochem Sci* 28, 502-508

Boveris A, Oshino N, Chance B (1972): The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochem J* 128, 617-630

Brouillette RT, Thach BT (1979): A neuromuscular mechanism maintaining extrathoracic airway patency. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol* 46, 772-779

Can K, Menzfeld C, Rinne L, Rehling P, Kügler S, Golubiani G, Dudek J, Müller M (2019): Neuronal redox-imbalance in Rett Syndrome affects mitochondria as well as cytosol, and is accompanied by intensified mitochondrial O₂ consumption and ROS release. *Front Physiol* 10, 479

Canals S, Makarova I, Largo C, Ibarz JM, Herreras O (2005): Longitudinal depolarization gradients along the somatodendritic axis of CA1 pyramidal cells: A novel feature of spreading depression. *Journal of Neurophysiology* 94, 943-951

Carlsson-Skwirut C, Jornvall H, Holmgren A, Andersson C, Bergman T, Lundquist G, Sjogren B, Sara VR (1986): Isolation and characterization of variant IGF-1 as well as IGF-2 from adult human brain. *FEBS Lett* 201, 46-50

Carson MJ, Behringer RR, Brinster RL, McMorris FA (1993): Insulin-like growth factor I increases brain growth and central nervous system myelination in transgenic mice. *Neuron* 10, 729-740

Castro J, Garcia RI, Kwok S, Banerjee A, Petravicz J, Woodson J, Mellios N, Tropea D, Sur M (2014): Functional recovery with recombinant human IGF1 treatment in a mouse model of Rett Syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, 9941-9946

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

Chance B (1948): The enzyme-substrate compounds of catalase and peroxides. *Nature* 161, 914-917

Chance B, Greenstein DS, Roughton FJ (1952): The mechanism of catalase action. I. Steady-state analysis. *Arch Biochem Biophys* 37, 301-321

Chang Q, Khare G, Dani V, Nelson S, Jaenisch R (2006): The disease progression of Mecp2 mutant mice is affected by the level of BDNF expression. *Neuron* 49, 341-348

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

Chen Q, Vazquez EJ, Moghaddas S, Hoppel CL, Lesnefsky EJ (2003): Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. *J Biol Chem* 278, 36027-36031

Chourbaji S, Zacher C, Sanchis-Segura C, Spanagel R, Gass P (2005): Social and structural housing conditions influence the development of a depressive-like phenotype in the learned helplessness paradigm in male mice. *Behav Brain Res* 164, 100-106

Coker SB, Melnyk AR (1991): Rett syndrome and mitochondrial enzyme deficiencies. *J Child Neurol* 6, 164-166

Collingridge GL, Lester RA (1989): Excitatory amino acid receptors in the vertebrate central nervous system. *Pharmacol Rev* 41, 143-210

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

De Filippis B, Valenti D, de Bari L, De Rasmio D, Musto M, Fabbri A, Ricceri L, Fiorentini C, Laviola G, Vacca RA (2015): Mitochondrial free radical overproduction due to respiratory chain impairment in the brain of a mouse model of Rett syndrome: protective effect of CNF1. *Free Radic Biol Med* 83, 167-177

Dietz RM, Weiss JH, Shuttleworth CW (2008): Zn^{2+} influx is critical for some forms of spreading depression in brain slices. *J Neurosci* 28, 8014-8024

Dotti MT, Manneschi L, Malandrini A, De Stefano N, Caznerale F, Federico A (1993): Mitochondrial dysfunction in Rett syndrome. An ultrastructural and biochemical study. *Brain Dev* 15, 103-106

Dreier JP, Korner K, Ebert N, Gorner A, Rubin I, Back T, Lindauer U, Wolf T, Villringer A, Einhaupl KM et al. (1998): Nitric oxide scavenging by hemoglobin or nitric oxide synthase inhibition by N-nitro-L-arginine induces cortical spreading ischemia when K^+ is increased in the subarachnoid space. *J Cereb Blood Flow Metab* 18, 978-990

Drorbaugh JE, Fenn WO (1955): A barometric method for measuring ventilation in newborn infants. *Pediatrics* 16, 81-87

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

El-Bacha RS, De-Lima-Filho JL, Guedes RC (1998): Dietary antioxidant deficiency facilitates cortical spreading depression induced by photoactivated riboflavin. *Nutr Neurosci* 1, 205-212

Erecinska M, Silver IA (1989): ATP and brain function. *J Cereb Blood Flow Metab* 9, 2-19

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

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

Fridovich I (1986): Biological effects of the superoxide radical. *Arch Biochem Biophys* 247, 1-11

Funk GD, Smith JC, Feldman JL (1994): Development of thyrotropin-releasing hormone and norepinephrine potentiation of inspiratory-related hypoglossal motoneuron discharge in neonatal and juvenile mice in vitro. *J Neurophysiol* 72, 2538-2541

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

Girard M, Couvert P, Carrie A, Tardieu M, Chelly J, Beldjord C, Bienvenu T (2001): Parental origin of de novo *MECP2* mutations in Rett syndrome. *Eur J Hum Genet* 9, 231-236

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

Glaze DG, Frost JD, Jr., Zoghbi HY, Percy AK (1987): Rett's syndrome: characterization of respiratory patterns and sleep. *Ann Neurol* 21, 377-382

Glaze DG, Neul JL, Kaufmann WE, Berry-Kravis E, Condon S, Stoms G, Oosterholt S, Della Pasqua O, Glass L, Jones NE et al. (2019): Double-blind, randomized, placebo-controlled study of trofinetide in pediatric Rett syndrome. *Neurology* 92, e1912-e1925

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

Gu H, Zou YR, Rajewsky K (1993): Independent control of immunoglobulin switch recombination at individual switch regions evidenced through Cre-loxP-mediated gene targeting. *Cell* 73, 1155-1164

Gu H, Marth JD, Orban PC, Mossmann H, Rajewsky K (1994): Deletion of a DNA polymerase beta gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting. *Science* 265, 103-106

Guideri F, Acampa M, Hayek G, Zappella M, Di Perri T (1999): Reduced heart rate variability in patients affected with Rett syndrome. A possible explanation for sudden death. *Neuropediatrics* 30, 146-148

Guideri F, Acampa M, DiPerri T, Zappella M, Hayek Y (2001): Progressive cardiac dysautonomia observed in patients affected by classic Rett syndrome and not in the preserved speech variant. *J Child Neurol* 16, 370-373

Guy J, Cheval H, Selfridge J, Bird A (2011): The role of MeCP2 in the brain. *Annu Rev Cell Dev Biol* 27, 631-652

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

Guyton AC, Harris JW (1951): Pressoreceptor-autonomic oscillation; a probable cause of vasomotor waves. *Am J Physiol* 165, 158-166

Guyton AC, Batson HM, Smith CM, Armstrong GG (1951): Method for studying competence of the body's blood pressure regulatory mechanisms and effect of pressoreceptor denervation. *Am J Physiol* 164, 360-368

Haas RH, Light M, Rice M, Barshop BA (1995): Oxidative metabolism in Rett syndrome: 1. Clinical studies. *Neuropediatrics* 26, 90-94

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, Berg M, Steffenburg U (2001): Three decades of sociomedical experiences from West Swedish Rett females 4-60 years of age. *Brain Dev* 23 Suppl 1, S28-31

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

Halliwell B (1997): Antioxidants: the basics--what they are and how to evaluate them. *Adv Pharmacol* 38, 3-20

Han X, Jackson MB (2006): Structural transitions in the synaptic SNARE complex during Ca^{2+} -triggered exocytosis. *J Cell Biol* 172, 281-293

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

Hansen AJ, Zeuthen T (1981): Extracellular ion concentrations during spreading depression and ischemia in the rat brain cortex. *Acta Physiol Scand* 113, 437-445

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

Harman D (1956): Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 11, 298-300

Hilaire G, Viemari JC, Coulon P, Simonneau M, Bevenot M (2004): Modulation of the respiratory rhythm generator by the pontine noradrenergic A5 and A6 groups in rodents. *Respir Physiol Neurobiol* 143, 187-197

Hossmann KA (2003): Die Glutathypothesese des Schlaganfalls. *Fortschr Neurol Psychiatr* 71 Suppl 1, S10-15

Hui E, Gaffaney JD, Wang Z, Johnson CP, Evans CS, Chapman ER (2011): Mechanism and function of synaptotagmin-mediated membrane apposition. *Nat Struct Mol Biol* 18, 813-821

Ide S, Itoh M, Goto Y (2005): Defect in normal developmental increase of the brain biogenic amine concentrations in the *mecp2*-null mouse. *Neurosci Lett* 386, 14-17

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, Hüser MA, Dietrich K, Kempkes B, Menzfeld C, Hülsmann S, Müller M (2016): Systemic radical scavenger treatment of a mouse model of Rett syndrome: merits and limitations of the vitamin E derivative trolox. *Front Cell Neurosci* 10, 266

Jian L, Archer HL, Ravine D, Kerr A, de Klerk N, Christodoulou J, Bailey ME, Laurvick C, Leonard H (2005): p.R270X *MECP2* mutation and mortality in Rett syndrome. *Eur J Hum Genet* 13, 1235-1238

Jin XT, Cui N, Zhong W, Jin X, Wu Z, Jiang C (2013): Pre- and postsynaptic modulations of hypoglossal motoneurons by alpha-adrenoceptor activation in wild-type and *MeCP2^{-/-}* mice. *Am J Physiol Cell Physiol* 305, C1080-1090

Jones PL, Veenstra GJ, Wade PA, Vermaak D, Kass SU, Landsberger N, Strouboulis J, Wolffe AP (1998): Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat Genet* 19, 187-191

Julu PO, Kerr AM, Hansen S, Apartopoulos F, Jamal GA (1997): Functional evidence of brain stem immaturity in Rett syndrome. *Eur Child Adolesc Psychiatry* 6 Suppl 1, 47-54

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

Jung BP, Jugloff DG, Zhang G, Logan R, Brown S, Eubanks JH (2003): The expression of methyl CpG binding factor MeCP2 correlates with cellular differentiation in the developing rat brain and in cultured cells. *J Neurobiol* 55, 86-96

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

Kishida KT, Klann E (2007): Sources and targets of reactive oxygen species in synaptic plasticity and memory. *Antioxid Redox Signal* 9, 233-244

Kishida KT, Hoeffler CA, Hu D, Pao M, Holland SM, Klann E (2006): Synaptic plasticity deficits and mild memory impairments in mouse models of chronic granulomatous disease. *Mol Cell Biol* 26, 5908-5920

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

Krishnakumar SS, Radoff DT, Kummel D, Giraudo CG, Li F, Khandan L, Baguley SW, Coleman J, Reinisch KM, Pincet F et al. (2011): A conformational switch in complexin is required for synaptotagmin to trigger synaptic fusion. *Nat Struct Mol Biol* 18, 934-940

Kuhnt U, Voronin LL (1994): Interaction between paired-pulse facilitation and long-term potentiation in area CA1 of guinea-pig hippocampal slices: application of quantal analysis. *Neuroscience* 62, 391-397

Kurz T, Terman A, Gustafsson B, Brunk UT (2008): Lysosomes and oxidative stress in aging and apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 1780, 1291-1303

Kushnareva Y, Murphy AN, Andreyev A (2002): Complex I-mediated reactive oxygen species generation: modulation by cytochrome c and NAD(P)⁺ oxidation-reduction state. *Biochem J* 368, 545-553

Lauritzen M (1994): Pathophysiology of the migraine aura. The spreading depression theory. *Brain* 117 (Pt 1), 199-210

Lauritzen M, Rice ME, Okada Y, Nicholson C (1988): Quisqualate, kainate and NMDA can initiate spreading depression in the turtle cerebellum. *Brain Res* 475, 317-327

Leao AA (1947): Further observations on the spreading depression of activity in the cerebral cortex. *J Neurophysiol* 10, 409-414

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

Lee GY, Han SN (2018): The role of vitamin E in immunity. *Nutrients* 10,

Lewis JD, Meehan RR, Henzel WJ, Maurer-Fogy I, Jeppesen P, Klein F, Bird A (1992): Purification, sequence, and cellular localization of a novel chromosomal protein that binds to methylated DNA. *Cell* 69, 905-914

Lin MT, Beal MF (2006): Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature* 443, 787-795

Liu Q, Berchner-Pfannschmidt U, Moller U, Brecht M, Wotzlaw C, Acker H, Jungermann K, Kietzmann T (2004): A Fenton reaction at the endoplasmic reticulum is involved in the redox control of hypoxia-inducible gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 4302-4307

Lundblad LK, Irvin CG, Adler A, Bates JH (2002): A reevaluation of the validity of unrestrained plethysmography in mice. *J Appl Physiol* (1985) 93, 1198-1207

Lynch MA (2004): Long-term potentiation and memory. *Physiol Rev* 84, 87-136

Malenka RC, Bear MF (2004): LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron* 44, 5-21

Marcus CL, Carroll JL, McColley SA, Loughlin GM, Curtis S, Pyzik P, Naidu S (1994): Polysomnographic characteristics of patients with Rett syndrome. *J Pediatr* 125, 218-224

Matsuishi T, Urabe F, Percy AK, Komori H, Yamashita Y, Schultz RS, Ohtani Y, Kuriya N, Kato H (1994): Abnormal carbohydrate metabolism in cerebrospinal fluid in Rett syndrome. *J Child Neurol* 9, 26-30

Mayer ML, Westbrook GL (1987): The physiology of excitatory amino acids in the vertebrate central nervous system. *Prog Neurobiol* 28, 197-276

McCord JM, Fridovich I (1988): Superoxide dismutase: the first twenty years (1968-1988). *Free Radic Biol Med* 5, 363-369

McLellan MA, Rosenthal NA, Pinto AR (2017): Cre-loxP-mediated recombination: general principles and experimental considerations. *Curr Protoc Mouse Biol* 7, 1-12

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

Meister A (1992): Biosynthesis and functions of glutathione, an essential biofactor. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* Spec No, 1-6

Mills GC (1957): Hemoglobin catabolism. I. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. *J Biol Chem* 229, 189-197

Milton VJ, Sweeney ST (2012): Oxidative stress in synapse development and function. *Dev Neurobiol* 72, 100-110

Mitchell P (1961): Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature* 191, 144-148

Moretti P, Levenson JM, Battaglia F, Atkinson R, Teague R, Antalffy B, Armstrong D, Arancio O, Sweatt JD, Zoghbi HY (2006): Learning and memory and synaptic plasticity are impaired in a mouse model of Rett syndrome. *J Neurosci* 26, 319-327

Mori A, Takahashi T, Miyashita Y, Kasai H (1994): Two distinct glutamatergic synaptic inputs to striatal medium spiny neurones of neonatal rats and paired-pulse depression. *J Physiol* 476, 217-228

Mruk DD, Silvestrini B, Mo MY, Cheng CY (2002): Antioxidant superoxide dismutase - a review: its function, regulation in the testis, and role in male fertility. *Contraception* 65, 305-311

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

Müller M: Responses of central neurons to hypoxia and the role of mitochondria as metabolic sensors. In: *Recent Res. Devel. Physiol. Research Signpost, Kerala, India, 2005*, 59-90

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

Müller M, Can K (2014): Aberrant redox homeostasis and mitochondrial dysfunction in Rett syndrome. *Biochem Soc Trans* 42, 959-964

Murphy AN, Fiskum G, Beal MF (1999): Mitochondria in neurodegeneration: bioenergetic function in cell life and death. *J Cereb Blood Flow Metab* 19, 231-245

Nagy A (2000): Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring. *Genesis* 26, 99-109

Nan X, Meehan RR, Bird A (1993): Dissection of the methyl-CpG binding domain from the chromosomal protein MeCP2. *Nucleic Acids Res* 21, 4886-4892

Nan X, Ng HH, Johnson CA, Laherty CD, Turner BM, Eisenman RN, Bird A (1998): Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* 393, 386-389

Nanduri J, Wang N, Yuan G, Khan SA, Souvannakitti D, Peng YJ, Kumar GK, Garcia JA, Prabhakar NR (2009): Intermittent hypoxia degrades HIF-2alpha via calpains resulting in oxidative stress: implications for recurrent apnea-induced morbidities. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 1199-1204

Nedergaard M, Hansen AJ (1988): Spreading depression is not associated with neuronal injury in the normal brain. *Brain Res* 449, 395-398

Nomura Y (2005): Early behavior characteristics and sleep disturbance in Rett syndrome. *Brain Dev* 27 Suppl 1, S35-S42

Nomura Y, Segawa M (1990): Clinical features of the early stage of the Rett syndrome. *Brain Dev* 12, 16-19

Nowak L, Bregestovski P, Ascher P, Herbet A, Prochiantz A (1984): Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature* 307, 462-465

O'Kusky JR, Ye P, D'Ercole AJ (2000): Insulin-like growth factor-I promotes neurogenesis and synaptogenesis in the hippocampal dentate gyrus during postnatal development. *J Neurosci* 20, 8435-8442

Oginsky MF, Cui N, Zhong W, Johnson CM, Jiang C (2014): Alterations in the cholinergic system of brain stem neurons in a mouse model of Rett syndrome. *Am J Physiol Cell Physiol* 307, C508-520

Packer L (1998): alpha-Lipoic acid: a metabolic antioxidant which regulates NF-kappa B signal transduction and protects against oxidative injury. *Drug Metab Rev* 30, 245-275

Pecorelli A, Leoni G, Cervellati F, Canali R, Signorini C, Leoncini S, Cortelazzo A, De Felice C, Ciccoli L, Hayek J et al. (2013): Genes related to mitochondrial functions, protein degradation, and chromatin folding are differentially expressed in lymphomonocytes of Rett syndrome patients. *Mediators Inflamm* 2013, 137629

Ramirez JM, Karlen-Amarante M, Wang JJ, Bush NE, Carroll MS, Weese-Mayer DE, Huff A (2020): The pathophysiology of Rett syndrome with a focus on breathing dysfunctions. *Physiology (Bethesda)* 35, 375-390

Raturi A, Mutus B (2007): Characterization of redox state and reductase activity of protein disulfide isomerase under different redox environments using a sensitive fluorescent assay. *Free Radic Biol Med* 43, 62-70

Rekling JC, Feldman JL (1998): PreBötzinger complex and pacemaker neurons: hypothesized site and kernel for respiratory rhythm generation. *Annu Rev Physiol* 60, 385-405

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

Richter F, Bauer R, Lehmenkühler A, Schaible HG (2008): Spreading depression in the brainstem of the adult rat: electrophysiological parameters and influences on regional brainstem blood flow. *J Cereb Blood Flow Metab* 28, 984-994

Roitbak AI, Bobrov AV (1975): Spreading depression resulting from cortical punctures. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 35, 761-768

Rushworth GF, Megson IL (2014): Existing and potential therapeutic uses for N-acetylcysteine: the need for conversion to intracellular glutathione for antioxidant benefits. *Pharmacol Ther* 141, 150-159

Samaco RC, Hogart A, LaSalle JM (2005): Epigenetic overlap in autism-spectrum neurodevelopmental disorders: *MECP2* deficiency causes reduced expression of UBE3A and GABRB3. *Hum Mol Genet* 14, 483-492

Sauer B, Henderson N (1988): Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 5166-5170

Sauerland EK, Harper RM (1976): The human tongue during sleep: electromyographic activity of the genioglossus muscle. *Exp Neurol* 51, 160-170

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

Schwartz PJ, Stone HL (1982): The role of the autonomic nervous system in sudden coronary death. *Ann N Y Acad Sci* 382, 162-180

Sekul EA, Moak JP, Schultz RJ, Glaze DG, Dunn JK, Percy AK (1994): Electrocardiographic findings in Rett syndrome: an explanation for sudden death? *J Pediatr* 125, 80-82

Shapiro M (2001): Plasticity, hippocampal place cells, and cognitive maps. *Arch Neurol* 58, 874-881

Sierra C, Vilaseca MA, Brandi N, Artuch R, Mira A, Nieto M, Pineda M (2001): Oxidative stress in Rett syndrome. *Brain Dev* 23 Suppl 1, S236-239

Sinha K, Das J, Pal PB, Sil PC (2013): Oxidative stress: the mitochondria-dependent and mitochondria-independent pathways of apoptosis. *Arch Toxicol* 87, 1157-1180

Smith JC, Ellenberger HH, Ballanyi K, Richter DW, Feldman JL (1991): Pre-Bötzinger complex: a brainstem region that may generate respiratory rhythm in mammals. *Science* 254, 726-729

Somjen GG (2001): Mechanisms of spreading depression and hypoxic spreading depression-like depolarization. *Physiol Rev* 81, 1065-1096

Somjen GG, Aitken PG, Czeh G, Jing J, Young JN (1993): Cellular physiology of hypoxia of the mammalian central nervous system. *Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis* 71, 51-65

Southall DP, Kerr AM, Tirosch E, Amos P, Lang MH, Stephenson JB (1988): Hyperventilation in the awake state: potentially treatable component of Rett syndrome. *Arch Dis Child* 63, 1039-1048

Steffenburg U, Hagberg G, Hagberg B (2001): Epilepsy in a representative series of Rett syndrome. *Acta Paediatr* 90, 34-39

Stern P, Behe P, Schoepfer R, Colquhoun D (1992): Single-channel conductances of NMDA receptors expressed from cloned cDNAs: comparison with native receptors. *Proc Biol Sci* 250, 271-277

Sternberg N, Hamilton D (1981): Bacteriophage P1 site-specific recombination. I. Recombination between loxP sites. *J Mol Biol* 150, 467-486

Stettner GM, Huppke P, Gärtner J, Richter DW, Dutschmann M (2008): Disturbances of breathing in Rett syndrome: Results from patients and animal models. *Adv Exp Biol Med* 605, 503-507

Stettner GM, Huppke P, Brendel C, Richter DW, Gärtner J, Dutschmann M (2007): Breathing dysfunctions associated with impaired control of postinspiratory activity in *Mecp2^{fl/y}* knockout mice. *J Physiol* 579, 863-876

Sumathi R, Baskaran G, Varalakshmi P (1996): Relationship between glutathione and DL alpha-lipoic acid against cadmium-induced hepatotoxicity. *Jpn J Med Sci Biol* 49, 39-48

Swanson LW, Wyss JM, Cowan WM (1978): An autoradiographic study of the organization of intrahippocampal association pathways in the rat. *J Comp Neurol* 181, 681-715

Tate P, Skarnes W, Bird A (1996): The methyl-CpG binding protein MeCP2 is essential for embryonic development in the mouse. *Nat Genet* 12, 205-208

Telgkamp P, Cao YQ, Basbaum AI, Ramirez JM (2002): Long-term deprivation of substance P in PPT-A mutant mice alters the anoxic response of the isolated respiratory network. *J Neurophysiol* 88, 206-213

Traber MG, Atkinson J (2007): Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free Radic Biol Med* 43, 4-15

Trappe R, Laccone F, Cobilanschi J, Meins M, Huppke P, Hanefeld F, Engel W (2001): *MECP2* mutations in sporadic cases of Rett syndrome are almost exclusively of paternal origin. *Am J Hum Genet* 68, 1093-1101

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

Turrens JF (1997): Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Biosci Rep* 17, 3-8

Van den Veyver IB, Zoghbi HY (2000): Methyl-CpG-binding protein 2 mutations in Rett syndrome. *Curr Opin Genet Dev* 10, 275-279

Viemari JC, Bevegut M, Burnet H, Coulon P, Pequignot JM, Tiveron MC, Hilaire G (2004): *Phox2a* gene, A6 neurons, and noradrenaline are essential for development of normal respiratory rhythm in mice. *J Neurosci* 24, 928-937

Viemari JC, Roux JC, Tryba AK, Saywell V, Burnet H, Pena F, Zanella S, Bevegut M, Barthelemy-Requin M, Herzing LB et al. (2005): *Mecp2* deficiency disrupts norepinephrine and respiratory systems in mice. *J Neurosci* 25, 11521-11530

Vigmond EJ, Perez Velazquez JL, Valiante TA, Bardakjian BL, Carlen PL (1997): Mechanisms of electrical coupling between pyramidal cells. *J Neurophysiol* 78, 3107-3116

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

Villemagne PM, Naidu S, Villemagne VL, Yaster M, Wagner HN, Jr., Harris JC, Moser HW, Johnston MV, Dannals RF, Wong DF (2002): Brain glucose metabolism in Rett Syndrome. *Pediatr Neurol* 27, 117-122

Wan M, Lee SS, Zhang X, Houwink-Manville I, Song HR, Amir RE, Budden S, Naidu S, Pereira JL, Lo IF et al. (1999): Rett syndrome and beyond: recurrent spontaneous and familial *MECP2* mutations at CpG hotspots. *Am J Hum Genet* 65, 1520-1529

Wang H, Chan SA, Ogier M, Hellard D, Wang Q, Smith C, Katz DM (2006): Dysregulation of brain-derived neurotrophic factor expression and neurosecretory function in *Mecp2* null mice. *J Neurosci* 26, 10911-10915

Wang X, Quinn PJ (1999): Vitamin E and its function in membranes. *Prog Lipid Res* 38, 309-336

Ward CS, Arvide EM, Huang TW, Yoo J, Noebels JL, Neul JL (2011): MeCP2 is critical within HoxB1-derived tissues of mice for normal lifespan. *J Neurosci* 31, 10359-10370

Watkins JC, Evans RH (1981): Excitatory amino acid transmitters. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 21, 165-204

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

Weese-Mayer DE, Lieske SP, Boothby CM, Kenny AS, Bennett HL, Silvestri JM, Ramirez JM (2006): Autonomic nervous system dysregulation: breathing and heart rate perturbation during wakefulness in young girls with Rett syndrome. *Pediatr Res* 60, 443-449

Young JL, Zoghbi HY (2004): X-chromosome inactivation patterns are unbalanced and affect the phenotypic outcome in a mouse model of Rett syndrome. *Am J Hum Genet* 74, 511-520

Zhang H, Limphong P, Pieper J, Liu Q, Rodesch CK, Christians E, Benjamin IJ (2012): Glutathione-dependent reductive stress triggers mitochondrial oxidation and cytotoxicity. *FASEB J* 26, 1442-1451

Zhang L, He J, Jugloff DG, Eubanks JH (2008): The *Mecp2*-null mouse hippocampus displays altered basal inhibitory rhythms and is prone to hyperexcitability. *Hippocampus* 18, 294-309

Zhang X, Su J, Rojas A, Jiang C (2010): Pontine norepinephrine defects in *Mecp2*-null mice involve deficient expression of dopamine beta-hydroxylase but not a loss of catecholaminergic neurons. *Biochem Biophys Res Commun* 394, 285-290

Zoghbi HY, Percy AK, Glaze DG, Butler IJ, Riccardi VM (1985): Reduction of biogenic amine levels in the Rett syndrome. *N Engl J Med* 313, 921-924

Zucker RS (1999): Calcium- and activity-dependent synaptic plasticity. *Curr Opin Neurobiol* 9, 305-313

Zucker RS, Regehr WG (2002): Short-term synaptic plasticity. *Annu Rev Physiol* 64, 355-405

Danksagung

Ich danke allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Müller im Institut für Neuro- und Sinnesphysiologie der Georg-August-Universität Göttingen für die umfangliche Unterstützung und Betreuung. Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Michael Müller und Belinda Kempkes, die mir bei allen Experimenten und sonstigen Fragen geduldig zur Seite standen und ohne die diese Doktorarbeit nicht möglich gewesen wäre.

Lebenslauf

Ich, Stefanie Auel, bin am 24.08.1994 in Stadthagen geboren. Von 2000 bis 2004 besuchte ich die Grundschule Niedernwöhren, anschließend das Ratsgymnasium Stadthagen, wo ich 2012 die allgemeine Hochschulreife erlangte. Nach zwei Semestern der Rechtswissenschaften (2012 – 2013) an der Leibniz Universität Hannover, begann ich im August 2013 eine Ausbildung zur Zahntechnikerin in der Dentallabor Schollmeier GmbH in Hannover. Diese schloss ich im Januar 2016 ab, arbeitete im Lehrbetrieb zwei Monate und begann im April 2016 das Studium der Zahnheilkunde an der Georg-August-Universität Göttingen, das ich am 11. Juni 2021 mit dem Bestehen der zahnärztlichen Prüfung erfolgreich beendete.