

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

Spreading Depression
induzierte Redoxveränderungen
in hippocampalen Neuronen
der Maus

INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von

Marc André Ackermann

aus

Düsseldorf

Göttingen 2021

Dekan: Prof. Dr. med. W. Brück

Betreuungsausschuss

Betreuer/in: Prof. Dr. rer. nat. M. Müller

Ko-Betreuer/in: Prof. Dr. med. C. Stadelmann-Nessler

Prüfungskommission

Referent/in: Prof. Dr. rer. nat. M. Müller

Ko-Referent/in:

Drittreferent/in:

Datum der mündlichen Prüfung:

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Spreading Depression induzierte Redoxveränderungen in hippokampalen Neuronen der Maus" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den

.....
(Unterschrift)

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis.....	V
1 Einleitung	1
1.1 Spreading Depression	1
1.2 Klinische Relevanz der Spreading Depression	4
1.3 Zelluläre Redoxbalancen	5
1.4 Reaktive Sauerstoff- und Stickstoffverbindungen.....	6
1.5 Antioxidantien.....	11
1.6 Optische Redoxsensoren und roGFP.....	14
1.7 Ziele der Arbeit.....	18
2 Material und Methoden	20
2.1 Verwendete Chemikalien und transgene Redoxindikator-Maus.....	20
2.2 Präparatorisches Vorgehen zur Generierung vitaler Hirnschnitte	22
2.3 Versuchsaufbau.....	23
2.4 Technische Grundlage der etablierten Messmethodik	27
2.5 Kalibrierung des roGFP-Reaktionsbereichs	28
2.6 Vitalerhaltung eines Gewebsschnittes während einer Messung.....	29
2.7 Auslösung einer vollständig ausgeprägten hypoxischen und normoxischen SD in einer Submersionskammer.....	30
2.8 Ablauf einer zeitlich korrelierten elektrophysiologischen und fluoreszenzmikroskopischen Messung	31
2.9 Modifikation der ACSF-Lösung mit Pharmaka	33
3 Ergebnisse.....	34
3.1 Etablierung der Submersionsmessung	34
3.2 Vorbereitende Maßnahmen und Auswertungsvorgehen	36
3.3 Zeitliche Korrelation der elektrophysiologischen und der fluoreszenzmikroskopischen Messungen/ Profil des Fluoreszenzsignals während einer SD	41
3.4 Analyse der elektrophysiologischen SD-Parameter und der induzierten Redoxveränderungen	44
3.5 Optische Charakteristika der Ausbreitung des fluoreszenzmikroskopischen Signals	51
3.6 Ausbreitungsgeschwindigkeit der SD korrelierten Redoxveränderungen.....	53

4	Diskussion.....	56
4.1	Etablierte Messmethodik als valides Instrument der Ermittlung SD induzierter Redoxveränderungen	57
4.2	Interpretation der Messergebnisse.....	62
4.2.1	Analyse des elektrophysiologischen SD-Profiles	62
4.2.2	roGFPc detektierte Redoxveränderungen.....	64
4.2.3	Propagationsgeschwindigkeit der Redoxalterationen	70
5	Zusammenfassung und Ausblick	73
6	Literaturverzeichnis	75

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Ionenströme hypoxische Spreading Depression.	3
Abbildung 2: Redoxsensitives grün fluoreszierendes Protein.	17
Abbildung 3: Generierung der Hirngewebsschnitte mittels eines Vibroslicers.	23
Abbildung 4: Arbeitsplatz des Messverfahrens.	24
Abbildung 5: Submersionskammer.	25
Abbildung 6: Schematische Darstellung der Fluoreszenzmikroskopie.	26
Abbildung 7: Schematische Darstellung der Submersionskammer.	29
Abbildung 8: Übersichtsaufnahme mit Makierung der Messareale.	32
Abbildung 9: Auswertungsparameter der extrazellulären DC-Potenzial Negativierung.	37
Abbildung 10: Kalibrierungsrahmen der roGFPc Fluoreszenzintensität.	38
Abbildung 11: Reine ratiometrische Anregung des roGFPc.	39
Abbildung 12: Fluoreszenzmikroskopische Messung mit Hirngewebe einer nicht transgenen Maus.	39
Abbildung 13: Korrelation der roGFPc-Ratio-Werte mit der DC-Potenzialänderung während einer normoxischen SD.	42
Abbildung 14: Korrelation der roGFPc-Ratio-Werte mit der DC-Potenzialänderung während einer HSD.	43
Abbildung 15: Korrelation der roGFPc-Ratio-Werte mit der DC-Potenzialänderung während einer FCCP induzierten SD.	44
Abbildung 16: Vergleich der Redoxveränderungen und der Amplitude ΔV der Kontrollgruppen normoxisch und hypoxisch induzierter SDs.	46
Abbildung 17: Darstellung der Redoxveränderungen und der Amplitude ΔV der Versuchsreihen hypoxischer SDs.	48
Abbildung 18: Darstellung der Redoxveränderungen und der Amplitude ΔV der Versuchsreihen normoxischer SDs.	50
Abbildung 19: Ausbreitung der Wellenfront intrazellulärer Redoxveränderungen assoziiert mit einer SD.	51
Abbildung 20: Ausbreitung SD assoziierter Redoxveränderung für Hypoxie, FCCP und Kalium induzierte SDs.	52
Abbildung 21: Vergleich der Ausbreitungsgeschwindigkeiten der Redoxveränderungen Hypoxie induzierter SDs.	54
Abbildung 22: Vergleich der Ausbreitungsgeschwindigkeiten der Redoxveränderungen normoxischer SDs.	55

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammensetzung der verwendeten Versuchslösungen.	20
Tabelle 2: Messparameter der DC-Potenzialableitungen Hypoxie induzierter SDs.	47
Tabelle 3: Messparameter der DC-Potenzialableitungen normoxischer SDs.	49

Abkürzungsverzeichnis

ACSF	<i>artificial cerebrospinal fluid</i> , artifizielle zerebrospinale Flüssigkeit
ADP	Adenosindiphosphat
AOI	<i>area of interest</i>
ATP	Adenosintriphosphat
Baseline	Redox-Ruhelevel
Ca ²⁺	Calcium
CCD-Kamera	<i>charge-coupled device</i> -Kamera
Cl ⁻	Chlorid
DC-Potenzial	<i>direct current</i> Potenzial
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
DPI	Diphenyleneiodonium
DTT	1,4-Dithio-DL-threitol
EPSP	exzitatorisches postsynaptisches Potenzial
ER	endoplasmatisches Retikulum
FCCP	Carbonylcyanidtrifluormethoxyphenylhydrazon
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GPX	Glutathionperoxidase
GSH/GSSG	Glutathion / Glutathiondisulfid
H ⁺	Proton
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HSD	<i>hypoxic SD</i>
K ⁺	Kalium
n	Anzahl der Experimente
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotidphosphat (reduziert)
NADPH-Oxidase	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotidphosphat-Oxidase
Na ⁺	Natrium
Na ⁺ /K ⁺ -ATPase	Natrium/Kalium-ATPase
Na ₂ SO ₃	Natriumsulfit
NO [•]	Stickstoffmonoxid
O ₂	Sauerstoff
NOX	NADPH Oxidase
O ₂ ⁻	Superoxid-Anion
OH [•]	Hydroxylradikal
ONOO ⁻	Peroxinitrit
PKβ1	Protein Kinase C Beta 1
RNS	reaktive Stickstoffspezies

roGFP1	<i>reduction / oxidation green fluorescent protein 1</i>
roGFPc	zytosolisches roGFP1
roGFPm	mitochondriales roGFP1
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RyR	Ryanodin Rezeptor
SD	<i>spreading depression</i>
SOD	Superoxiddismutase
TTX	Tetrodotoxin
wtGFP	Wildtypvariante des GFP

1 Einleitung

1.1 Spreading Depression

Zum Beginn dieser Dissertation sollen grundlegende Vorgänge und Thematiken beleuchtet werden, die essenziell für das Verständnis der Fragestellung dieser Arbeit sind. Hierzu wird mit der Definition der *spreading depression* (SD) und einer Erläuterung der dieser zugrundeliegenden neurophysiologischen Mechanismen gestartet. Mittlerweile wird in der Literatur neben der Bezeichnung SD ebenfalls der Ausdruck *spreading depolarization* verwendet (Dreier et al. 2006; Dreier 2011).

Unter dem von Aristides Leão 1944 erstmals beschriebenen neuronalen Phänomen SD versteht man eine massive Depolarisation der Neurone und Gliazellen des betroffenen Hirnareals, die sich langsam und wellenartig mit einer Geschwindigkeit von wenigen Millimetern pro Minute ausbreitet. Aufgrund der nahezu vollständigen Depolarisation der Neurone und der damit assoziierten starken Störung intra- und extrazellulärer ionaler Homöostase, sind elementare Funktionen des neuronalen Netzwerkes stark eingeschränkt oder in Gänze kollabiert (Leão 1944; Marshall 1959; Bures et al. 1974).

Eine SD verläuft immer nach dem Alles-oder-Nichts-Prinzip (Somjen 2001). Das Phänomen der SD konnte in fast allen Regionen der grauen Substanz des zentralen Nervensystems nachgewiesen werden. Allerdings ist zu bemerken, dass nicht alle Areale des Hirns gleichermaßen für die Entstehung einer SD prädestiniert sind. Beispielsweise sind die CA1 Region des Hippocampus oder Neocortex deutlich anfälliger für eine SD als der zerebrale Cortex oder *Bulbus olfactorius* (Fifkova et al. 1961; Amemori et al. 1987). Es wird zwischen einer normoxischen und einer Hypoxie induzierten SD unterschieden. Die normoxische SD kann durch hoch frequente elektrische Stimulation (tetanisch), mechanische Reize, alkalische pH-Werte, Hyperthermie, erhöhte Kaliumkonzentration, Glutamat und diverse Chemikalien ausgelöst werden (Marshall 1959; Bures et al. 1974; Roitbak und Bobrov 1975; Guedes und do Carmo 1980; Reid et al. 1988; Chebabo et al. 1995; El-Bacha et al. 1998; Balestrino et al. 1999). Neben den Auslösern der normoxischen SD, kann auch noch ein Sauerstoffentzug oder generalisierter ein plötzlicher Energiemangel zu einer SD führen. Hierbei handelt es sich dann um die oben genannte Hypoxie induzierte oder hypoxische SD (Mies et al. 1993; Buresh et al. 1999).

Während einer SD können über eine extrazelluläre Ableitung des *direct current* (DC)-Potenzials Spannungsveränderungen von -15 bis -30 mV, welche die enorme

Depolarisation der Neuronen und Gliazellen repräsentieren, gemessen werden. Auf neuronaler Ebene findet nach einer initialen Depolarisation eine Repolarisation statt, welcher dann unmittelbar eine finale starke Depolarisation folgt (Leão 1947; Leão 1951).

Nachfolgend soll im Detail auf die zellulären Ereignisse eingegangen werden, die, während einer SD, zu der charakteristischen massiven Depolarisation und der damit einhergehenden Zellschwellung führen. Hierzu soll das Augenmerk zuerst auf die Hypoxie induzierte SD gerichtet werden. Durch Sauerstoffentzug bzw. aufgrund einer Ischämie stellt sich auf zellulärer Ebene eine verminderte Funktion der Atmungskette innerhalb der Mitochondrien ein, welche sich direkt auf die ATP-Synthese (Adenosintriphosphat-Synthese) auswirkt. Ein Mangel an ATP führt zu einer deutlich eingeschränkten Funktionalität der Na^+/K^+ -ATPase, die das Ruhemembranpotenzial der Neurone aufrechterhält (Müller 2005). Infolgedessen öffnen die Neurone K_{ATP} - und K_{Ca} -Kanäle, die die Zellen zunächst hyperpolarisieren. Die erhöhte extrazelluläre Akkumulation von K^+ -Ionen (15 mM) führt zur erhöhten Erregbarkeit der Neurone und schlussendlich zur Depolarisation (Vyskocil et al. 1972; Müller und Somjen 2000).

Ab dem Kaliumausstrom in das Interstitium folgt sowohl bei der normoxischen als auch der hypoxischen SD eine weitestgehend gleiche Reaktionskaskade. Der enorme Verlust von K^+ -Ionen in den Extrazellulärbereich hat einen starken Einfluss von Na^+ -, Ca^{2+} -Ionen und Cl^- -Ionen zur Folge (Kraig und Nicholson 1978; Hansen und Zeuthen 1981; Nicholson und Kraig 1981; Somjen und Aitken 1984). Das Einströmen von Na^+ -Ionen stellt in der Entstehung der SD einen ausschlaggebenden Faktor für die massive Depolarisation der Neurone dar. Maßgeblich für den Natriumeinstrom sind Tetrodotoxin sensitive Na^+ -Kanäle und ionotrope Glutamat Rezeptoren (Abbildung 1). Im Falle einer hypoxischen SD führt der Einsatz von Glutamat Antagonisten und TTX zu einem verspäteten Eintreten der SD und in der Hälfte der Fälle entsteht keine SD (Müller und Somjen 2000). Während einer SD wird neben K^+ auch Glutamat von Neuronen und Gliazellen in den Extrazellulärraum freigegeben. Außerdem kann eine erhöhte Glutamat Konzentration ebenfalls eine SD provozieren (Van Harreveld 1959; Kimelberg et al. 1990).

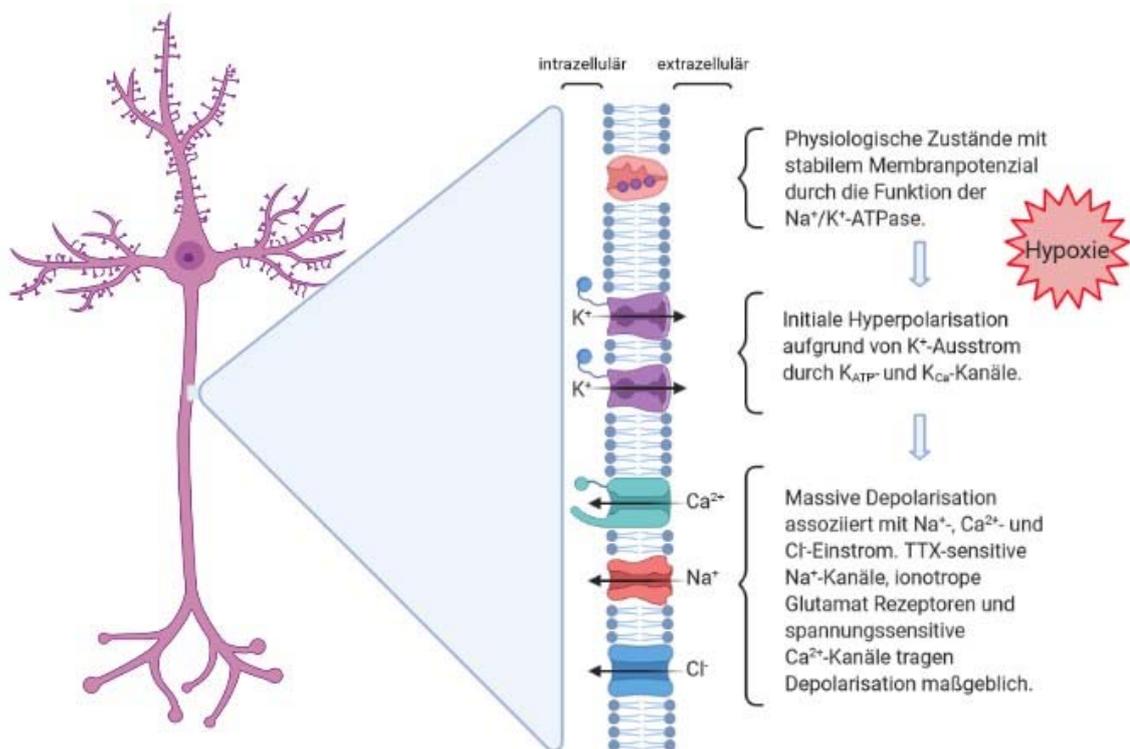


Abbildung 1: Ionenströme hypoxische Spreading Depression.

Die Darstellung präsentiert die Ionen und Ionenkanäle, die an der massiven Depolarisation assoziiert mit einer Hypoxie induzierten SD beteiligt sind (erstellt mit *BioRender.com*).

Zusätzlich zum Na⁺-Einfluss in die Neurone, ist auch der Einstrom von Ca²⁺-Ionen an der Entstehung einer SD beteiligt. Ca²⁺-Ionen sind in einer deutlich niedrigeren Konzentration als Na⁺-Ionen im Interstitium vorhanden. Allerdings bestätigt die Notwendigkeit einer Blockade aller SD assoziierten Ionen Einströme zur sicheren Unterbindung einer SD, dass nicht ausschließlich Na⁺ für die Entstehung der neuronalen Depolarisation verantwortlich ist (Müller und Somjen 2000). Eine steigende intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration allein ist jedoch nicht in der Lage die Generierung einer SD zu leisten (Young und Somjen 1992). Dies schließt nicht aus, dass der Ca²⁺-Einstrom in die Neurone eine zentrale Bedeutung hat. Es ist bekannt, dass multiple SD Episoden von Hirngewebe toleriert werden und die Vitalität der Neurone erhalten werden kann (Nedergaard und Hansen 1988). Allerdings kann eine SD bedingte anhaltende Depolarisation zu Schäden im Hirngewebe führen (Kawasaki et al. 1988). Sowohl Hypoxie induzierte als auch normoxische SDs können eine solche neuronale Degeneration herbeiführen. In diesem Prozess scheint intrazelluläres Ca²⁺ eine entscheidende Rolle zu spielen. Wird die intrazelluläre Ca²⁺ Anreicherung der Neurone während einer SD verhindert, regeneriert sich die Funktion der Neurone, auch wenn die Dauer der SD-Episode normal irreversible Schäden des Hirngewebes verursacht hätte. Da sich das kurzzeitige Auftreten von SDs auch in Präsenz von Calcium nicht negativ auf die

Zellvitalität auswirkt, ist davon auszugehen, dass eine länger anhaltende erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} Konzentration ursächlich für die neuronale Zellschädigung ist (Jing et al. 1991).

1.2 Klinische Relevanz der Spreading Depression

Dem Phänomen der SD wird eine hohe klinische Relevanz für neurologische Pathologien zugesprochen, denn die SD steht in einem engen Verhältnis zu einigen neurologischen Störungen und Krankheitsbildern. Die SD scheint eine Schlüsselrolle bei der Entwicklung kortikaler Läsionen im Zusammenhang mit neurologischen Pathophysiologien einzunehmen (Hartings et al. 2017).

Das Auftreten von SD ist eng mit pathophysiologischen Zuständen wie Migräne, *Commotio cerebri*, postiktaler Depression, hypoxischen bzw. ischämischen Zuständen im Hirngewebe und intrazerebralen oder subarachnoidalen Hirnblutungen assoziiert (Van Harrevelde und Stamm 1954; Lauritzen 1994; Somjen 2001; Woitzik et al. 2013; Dreier et al. 2017).

Die ersten Indizien für die SD als einen pathophysiologischen Mechanismus im Kontext eines neurologischen Krankheitsbildes lieferten Skotome oder Auren als Symptomatik der Migräne. Hier konnte eine Depolarisationswelle, die sich über den visuellen Kortex eines Menschen ausbreitete, beobachtet werden (Leão und Morison 1945; Milner 1958). Im Zusammenhang mit der Migräne spielt die SD-Generierung in entsprechenden Hirnarealen eine zentrale Rolle. Nicht nur Skotome oder auch die Migräneaura sind auf das Vorhandensein von SD-Episoden in Anteilen des Kortex zurückzuführen. Auch die Entstehung des eigentlichen migränetypischen Kopfschmerzes lässt sich mit SDs in Verbindung bringen. Im Kortex präsenste intrinsische Gehirnaktivitäten können SD-Wellen auslösen, welche wiederum für die Erzeugung der Kopfschmerzen verantwortlich sind. Nachgewiesener Weise können im Kortex entstandene SDs über eine spezielle Reaktionskaskade sowohl zur Aktivierung von *Trigeminus Nucleoli* als auch der *Trigeminus* Nervenenden um die Duralgefäße führen (Moskowitz et al. 1979; Bolay et al. 2002; Karatas et al. 2013).

Eine weitere zentrale klinische Relevanz kommt der SD in Verbindung mit Schlaganfällen zu. Laut der *World Health Organization* (WHO) sind zerebrovaskuläre Unfälle im Sinne eines Apoplex weltweit die zweithäufigste Todesursache und der dritthäufigste Grund für Behinderungen. Besonders dieser pathologische Zustand ist eng mit dem Phänomen der SD vergesellschaftet, denn durch Minderdurchblutung forcierte Hypoxie und Hyperglykämie haben eine SD zur Folge (Mies et al. 1993; Buresh et al. 1999). Außerdem sind Degenerationen des Hirngewebes als Konsequenz eines Schlaganfalles auf das Persistieren von SD-Episoden zurückzuführen (Somjen 2001). Auch im Zuge der

subarachnoidalen Hirnblutung können SDs auftreten. In 30 Prozent der Fälle folgen auf eine subarachnoidale Hirnblutung verzögerte zerebrale Ischämien, die den Hauptgrund neurologischer Schäden oder sogar des Versterbens dieser Patienten darstellen (Dorsch und King 1994). Die aus verzögerten zerebralen Ischämien entstehenden ischämischen neurologischen Defizite stehen in enger Verbindung zu multiplen SD-Wellen (Dreier et al. 2006).

Zwar liegt der Epilepsie selbst die SD nicht als neuronales Geschehen zugrunde, allerdings können auf epileptischen Anfälle SDs folgen, die dann zu der sogenannten postiktalen Depression führen bzw. Symptome der postiktalen Phase erzeugen (Van Harreveld und Stamm 1954).

Des Weiteren ist die SD ein zentraler Faktor für den Schweregrad der Konsequenzen traumatischer Hirnschädigungen. Primäre Verletzungen des Hirns bestehen hauptsächlich aus Kontusionen des Hirngewebes, intrazerebralen und subarachnoidalen Blutungen, extraparenchymalen Hämatomen und diffusen axonalen Verletzungen. Sekundäre Effekte, die durch diese Verletzungen forciert werden, sind Hypotonie, Hypoxie, Fieber und Hirnödeme, die zu hohem Hirndruck führen können (Saatman et al. 2008). All diese Faktoren erhöhen die Wahrscheinlichkeit des Zusammenbruchs der ionalen Homöostase in entsprechenden Hirnarealen und steigern damit die Anfälligkeit für das Auftreten von SD-Episoden.

1.3 Zelluläre Redoxbalancen

Ein intaktes Redoxsystem ist essentiell für die Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase (Kamata und Hirata 1999). Unter physiologischen Rahmenbedingungen stellt die Zelle durch ein ausgeglichenes Verhältnis von oxidativen und reduktiven Prozessen die intrazelluläre Redoxbalance sicher. Die Generierung eines solchen Gleichgewichtes wird über die Produktion und Elimination von reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffverbindungen möglich gemacht (Kamata und Hirata 1999). Keine Signalwege oder Stoffwechselprozesse wären ohne einen konstant ausgeglichenen Redoxstatus funktionsfähig (Dröge 2002).

Seit Beginn des 21. Jahrhunderts gibt es nun eine große Menge an evidenzbasierter Forschung, die zeigt, dass nicht nur eine zelluläre Adaptation an die negativen Effekte von freien Radikalen stattgefunden hat, sondern, dass evolutionär Mechanismen entstanden sind, die es Zellen ermöglicht zielgerichtet oxidative Auswirkungen der reaktiven Spezies zu ihrem Vorteil zu nutzen. Wichtige physiologische Funktionen die von freien Radikale oder deren Derivaten abhängen sind der Gefäßtonus, die Regulationen von Sauerstoffkonzentration, die Steigerung der Signaltransduktionsvorgänge von

verschiedenen Membranrezeptoren und sie stellen einen Indikator für oxidativen Stress dar, durch welchen die Redoxhomöostase auf zellulärer Ebene sichergestellt werden kann (Finkel 2011). Außerdem bekommt das Feld der Redoxregulation immer mehr Aufmerksamkeit von klinischer Forschung, denn oxidativer Stress bzw. ein Ungleichgewicht des Redoxstatus spielt eine signifikant wichtige Rolle in verschiedensten Krankheitsbildern und deren Pathogenese (Dröge 2002). Die sehr feine Balance zwischen vorteilhaften und degenerativen Aspekten der freien Radikale und deren Einfluss auf die Redoxbalance der Zellen, scheint ein wichtiger Aspekt der Gesundheit zu sein.

1.4 Reaktive Sauerstoff- und Stickstoffverbindungen

Wie im vorangegangenen Abschnitt beschrieben, wird der zelleigene Redoxstatus durch das Gleichgewicht zwischen oxidierenden und reduzierenden Stoffen in Waage gehalten (Kamata und Hirata 1999). In diesem Abschnitt soll nun detaillierter auf die oxidierenden Anteile der zellulären Redoxregulierung eingegangen werden. Sowohl physiologische Beteiligungen an Zellmechanismen als auch zellschädigende Prozesse sollen beleuchtet werden.

Es gibt zwei Gruppen von freien Radikalen im zellulären System. Es wird zwischen reaktiven Sauerstoff- und reaktiven Stickstoffverbindungen (ROS und RNS) unterschieden. Zu den ROS gehören das Superoxid (O_2^-), das Hydroxylradikal (OH^\cdot) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und zu den RNS zählen Stickstoffmonoxid (NO^\cdot) und Peroxinitrit ($ONOO^\cdot$) (Kamata und Hirata 1999).

Die Grundlage für die ROS-Entstehung ist Sauerstoff. Wird Sauerstoff reduziert, erhalten wir ROS. Das initiale Produkt, Superoxid, resultiert aus der Übertragung eines einzelnen Elektrons auf molekularen Sauerstoff. In Gegenwart von der Superoxiddismutase (SOD) kann dann aus dem Superoxid H_2O_2 und O_2 werden. H_2O_2 kann dann wiederum mit Übergangsmetallen in das sehr reaktive OH^\cdot umgewandelt werden (Dröge 2002).

Für die Entstehung von intrazellulären ROS und RNS sind sowohl exogene als auch endogene Faktoren ausschlaggebend. Exogene Faktoren sind Strahlung, wie z.B. UV-Strahlen, Gamma-Strahlen und Röntgenstrahlen, atmosphärische Verschmutzung und Chemikalien (Srinivasan et al. 2001; Trachootham et al. 2008).

Eine der großen endogenen ROS-Quellen stellen die Mitochondrien dar. Hierbei spielt der Prozess der Atmungskette eine entscheidende Rolle. Während des Prozesses der oxidativen Phosphorylierung werden ROS an der Elektronentransportkette der inneren Mitochondrienmembran generiert. Im Komplex eins und drei der Elektronentransportkette kann es zum Durchsickern von Elektronen kommen. Dies wiederum führt zur Reduktion von Sauerstoff mit dem Produkt Superoxid (O_2^-). Sowohl in der mitochondrialen Matrix

durch die Superoxiddismutase eins (SOD1) als auch im Intermembranraum durch die Superoxiddismutase zwei (SOD2), wird das besonders reaktive Superoxid in Wasserstoffperoxid umgewandelt (Jensen 1966; Loschen et al. 1974; Le Bras et al. 2005). Wasserstoffperoxid kann dann über die Fenton- oder Haber-Weiss-Reaktion zu einem Hydroxylradikal umgewandelt werden (Fenton 1894; Kehrer 2000).



Neben den Mitochondrien sind auch Zellorganellen wie Peroxisomen und Mikrosomen ROS-Produzenten. Allerdings bezieht sich dies vornehmlich auf H_2O_2 (Boveris et al. 1972). Eine weitere wichtige Untergruppe der endogenen ROS-Quellen stellen enzymatische Bestandteile der Zelle dar. Unter diesen sticht die zellmembrangebundene NADPH-Oxidase, als ein phagozytäres Enzym, hervor. Induziert durch eine bakterielle Infektion, wird die NADPH-Oxidase aktiviert und unterstützt durch die Produktion von O_2^- die Bekämpfung bakterieller Fremdeinwanderung in der Zelle (Babior 1999). Zusätzlich zu der NADPH-Oxidase sind auch Cytochrom c Oxidase und Xanthine Oxidase Vertreter der enzymatischen ROS-Produzenten (Antonini et al. 1970; Fridovich 1975).

Ähnlich wie bei der Entstehung von ROS findet auch die Generierung von Stickstoffmonoxid (NO) über einen enzymatischen Weg statt. Das Enzym Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS) bzw. die Isoenzyme mitochondriale NOS, neuronale NOS, endotheliale NOS und induzierte NOS katalysiert die Auftrennung von L-Arginin zu L-Citrullin und NO (Nathan und Xie 1994; Mayer und Hemmens 1997). Die Stickstoffmonoxid Moleküle, die durch verschiedene NOS Isoenzyme katalysiert entstanden sind, spielen auch intrazellulär verschiedene Rollen. So dienen RNS, entstanden durch nNOS, der Kommunikation zwischen Neuronen, wohingegen Radikale, die durch iNOS in Makrophagen und glatter Muskulatur produziert werden, zelleigenen Abwehrmechanismen zugutekommen. RNS generiert durch eNOS können eine Vasodilatation erzeugen, um die Aufrechterhaltung eines physiologischen Blutdruckes möglich zu machen (Nathan und Xie 1994). Ergänzend zu den zellulären Einflüssen von Stickstoffmonoxid, kann es noch in der mitochondrialen Atmungskette mit O_2^- zu Peroxinitrit ($ONOO^-$) reagieren (Radi et al. 2002).

Nun, da die Vertreter zellulärer ROS und RNS vorgestellt wurden und auch die Herkunft bzw. Entstehung geklärt wurde, sollen jetzt sowohl förderliche Aspekte für die zelluläre Funktion, sowie degenerative Effekte der reaktiven Spezies, präsentiert werden. Dies ist notwendig, um die ambivalenten Einflüsse von Radikalen auf die Zelle zu verdeutlichen.

Wenige zellbiologische Faktoren haben so einen schlechten Ruf wie ROS und RNS. Viele Jahre wurde angenommen, dass freie Radikale nur ein ungewolltes Nebenprodukt von der Existenz in einem aeroben System sind. Obwohl bekannt war, dass es auf zellulärer Ebene

Abwehrmechanismen für eine zu hohe Konzentration an ROS oder RNS gibt und auch bei dieser Thematik die Dosis maßgeblich für Schäden ist, ist der Glaube, dass reaktive Spezies vornehmlich negative Auswirkungen auf die Zelle haben, weit verbreitet. Allerdings gibt es heutzutage in ausreichender Form Evidenzen dafür, dass die Produktion von ROS und RNS innerhalb einer Zelle strikt reguliert ist und auch physiologische Funktionen übernimmt (Finkel 1998).

Ein sehr gutes Beispiel für die Teilnahme an zellaktivitätsregulierenden Mechanismen ist die Signaltransduktion. Hierbei können ROS als *Second Messenger* fungieren. Einige Studien konnten zeigen, dass die Liganden Stimulation von nicht-phagozytierenden Zellen in einem Anstieg von intrazellulären reaktiven Sauerstoffspezies resultiert. Dieses Phänomen wurde in einer Großzahl von Zelltypen beobachtet und wird durch verschiedenste Liganden, wie zum Beispiel Zytokine (Meier et al. 1989; Lo und Cruz 1995), Wachstumsfaktoren, die durch die Tyrosinkinase agieren (Krieger-Brauer und Kather 1992), und G-Protein gekoppelte Rezeptoren stimuliert (Griendling et al. 1994). Analysen in glatten Muskelzellen haben gezeigt, dass die Reizung durch Wachstumsfaktoren, in diesem Fall *Platelet-derived growth factor* (PDGF), innerhalb von Minuten zu einem rapiden Anstieg der ROS führen (Sundaresan et al. 1995). Vergleichbares konnte bei wachstumsfaktorenstimulierter Tyrosin Phosphorylierung nachgewiesen werden. Die Verbindung zwischen Liganden stimulierter H_2O_2 Produktion und Phosphorylierung wird durch die Beobachtung bestärkt, dass exogenes H_2O_2 wachstumsfaktorinduzierte Tyrosin Phosphorylierung imitieren kann (Finkel 1998). Zusätzlich konnte mit Hilfe des Peroxid auflösenden Enzyms Katalase, das den Anstieg von H_2O_2 verhindert, ebenfalls die Fähigkeit von PDGF eingeschränkt werden die Tyrosin Phosphorylierung zu forcieren (Sundaresan et al. 1995; Bae et al. 1997).

Neben der Second Messenger Rolle von ROS, haben auch Redoxveränderungen einen Einfluss auf die zelluläre Transkription. Es wird davon ausgegangen, dass ROS eine direkte regulierende Wirkung auf Transkriptionsfaktoren ausüben. Sprich es gibt nicht nur die *Second Messenger* Funktion im Kontext der Liganden Stimulation, sondern auch eine direkte Beeinflussung einzelner spezieller Signalwege über oxidativen Stress (Imbert et al. 1996; Finkel 1998). Beispielsweise kann H_2O_2 diverse Proteinkinasen C aktivieren. Dies geschieht unabhängig von Lipid-Cofaktoren über Tyrosin Phosphorylierung in Antwort auf H_2O_2 und unterscheidet sich daher von klassischen Liganden gesteuerten Signalwegen (Konishi et al. 1997). Des Weiteren verfügt eine bedeutende Zahl an Proteinen über redox-sensitive Cysteinreste, die es ermöglichen ihre Enzymaktivität über RNS und ROS zu modulieren (Finkel 2011).

Auch die Apoptose, eine spezielle Form des programmierten Zelltodes, die eine zentrale Rolle in der Entwicklung und Homöostase von multizellulären Organismen spielt (Wyllie et al. 1980), ist eng mit einem Anstieg an intrazellulären ROS assoziiert. Der Anstieg von ROS ist oft in apoptotischen Prozessen präsent, die von *apoptosis antigen 1* (APO1), Fas oder *cluster of differentiation 95* (CD95) Liganden getriggert werden (Banki et al. 1999; Esteve et al.

1999). Eine hohe Konzentration von ROS kann in verschiedenen Zelltypen die Apoptose einleiten und führt in diesem Prozess auch zum Zelltod (Slater et al. 1995). Neben dem ROS induzierten Zelltod konnte in diversen experimentellen Modellen auch ein Stickstoffmonoxid abhängige Apoptose beobachtet werden. Diese Art von Apoptose ist von einer Verminderung der Kardiolipin Konzentration, einer verminderten Aktivität der mitochondrialen Elektronentransportkette und einer Freisetzung von mitochondrialem Cytochrom C begleitet (Ushmorov et al. 1999; Umansky et al. 2000).

Kommt es nun zu dem Fall, dass die feine Balance zwischen der ROS/RNS Generierung und Elimination gestört ist, verändert sich auch das Gleichgewicht zwischen reduktiven und oxidativen Prozessen. Tritt eine Steigerung der ROS/RNS Produktion oder eine Verminderung der ROS/RNS Kompensationskapazität aufgrund von exogenen Stimuli oder endogenen Metaboliten ein, wird die zelluläre Redoxhomöostase nachhaltig gestört und es entsteht eine übermäßige Oxidation durch reaktive Verbindungen. Dieser sogenannte oxidative Stress übersteigt dann eine reversible oxidative Modifikation von Makromolekülen innerhalb der Zelle. Es finden folglich oxidative Prozesse statt, die Lipide, Proteine und auch die DNA konstant reaktiv attackieren und irreversibel schädigen (Valko et al. 2007).

Lipide sind von den drei genannten Makromolekülen die anfälligsten für oxidative Schädigung. Die Lipidperoxidation, also die oxidative Degradation von Lipiden, generiert Lipidradikale, welche weiter die anfälligen Lipidmoleküle in Form einer Kettenreaktion attackieren (Girotti 1998). Mehrfach ungesättigte Fettsäurereste von Phospholipiden werden von Radikalen entweder an einer internen Position oder nahe dem Ende des konjugierten Systems angegriffen (Valko et al. 2006). Wenn die Reaktion an einer internen Position stattfindet, kann das Peroxylradikal entweder zu einer Zyklisierung oder zu einer Metall katalysierten Reaktion führen, die ein Alkoxyradikal produzieren. Nach abgeschlossener Zyklisierung kann die Fettsäure zu einem Hydroperoxid werden oder sich einer weiteren Zyklisierung unterziehen, wodurch Aldehyde entstehen. Diese Aldehyde schließen unter anderem Malondialdehyd (MDA) und 4-hydroxy-2-nonenal (HNE) ein (Pinchuk et al. 1998). Die Produkte der oxidativen Modifikation der Lipide können dann weiter mit Proteinen und DNA reagieren. So reagiert das HNE meist mit Proteinen und führt zu einer deutlichen funktionalen Einschränkung, wohingegen MDA die Basen der DNA angreift und damit zu Genmutationen führen kann. Oxidative Schädigung von Lipiden kann einerseits über die Zerstörung einer intakten Phospholipid Doppelschicht, aber auch über das Reaktionsprodukt HNE zum Zelltod führen. HNE kann im speziellen c-Jun N-terminale Kinase (JNK) und Caspase-3 aktivieren und darüber die Apoptose einleiten (Awasthi et al. 2003).

Verglichen mit den Lipiden, könnte man bei der DNA davon ausgehen, dass die Doppelhelix Struktur und die verschiedenen Kondensationsmechanismen wie Histone oder andere Proteine eine deutliche geringere Exposition für oxidativen Stress sicherstellen.

Allerdings lässt sich über Oxidationsprodukte der DNA wie 8-OHdG feststellen, dass auch dieser Zellbestandteil unter verschiedensten Bedingungen oxidativ geschädigt werden kann (Haghdooost et al. 2005). In oxidativen Schädigungsprozessen der DNA spielt vor allem das Hydroxylradikal (OH^\cdot) eine zentrale Rolle. Diese reaktive Spezies kann nahezu alle Komponenten der DNA strukturell beeinträchtigen. Die nukleophilen Zentren N und O sowohl der Purin- und Pyrimidinbasen, als auch des Desoxyriboserückgrates der DNA bieten einen Angriffspunkt für elektrophile Moleküle (Dizdaroglu et al. 2002). Außerdem sind die Doppelbindungen der Basen Prädilektionsstellen für oxidativen Stress. Hier sind vornehmlich die C-5 und C-6 Atome der Pyrimidine und die C-4 und C-8 Atome der Purine Reaktionsmittelpunkt (Breen und Murphy 1995). Wenn, wie bereits angeführt, ein oxidativer Schaden am Desoxyriboserückgrat der DNA durch zum Beispiel OH^\cdot zustande kommt, führt das zu dem Verlust von Wasserstoffmolekülen und resultiert in Einzel- und Doppelstrangbrüchen des DNA-Gefüges (Breen und Murphy 1995). Zusätzlich zu ROS bewirken auch NO^\cdot und ONOO^\cdot Einzelstrangbrüche über die Reaktion mit DNA- Basen (Tsuzuki et al. 2007). Unter physiologischen Bedingungen steht die zelluläre DNA unter ständiger oxidativer Modulation (Beckman und Ames 1997). Moderate Umstrukturierung der DNA steigert die Integrität der DNA über Reparaturprozesse, arretiert oder induziert die Transkription und kann den Zellzyklus verlangsamen. Ab einem gewissen Punkt hingegen wird der Schaden, den die DNA nimmt, zu groß und Replikationsfehler, Instabilität des Genoms und sogar apoptotische Vorgänge treten auf. Letztere genannte Schädigungen der DNA sind eng mit der Karzinogenese und anderen Pathogenesen assoziiert (Marnett 2000; Cooke et al. 2003). Kommt es aufgrund von moderater Intensität der DNA-Schäden nicht zur Apoptose, provozieren diese ständigen Attacken auf die molekulare Konformation des Erbgutes Mutationen und spielen eine Rolle im Prozess der Evolution (David et al. 2007). Zuletzt soll noch erwähnt sein, dass innerhalb des zellulären Gefüges die mitochondriale DNA (mtDNA) die höchste Expositionierung für Schädigung durch freie Radikale hat, denn sie steht in der direktesten räumlichen Verbindung zur Elektronen-Transport-Kette und auch ihre Kapazitäten strukturelle Schädigungen wieder in Stand zu setzen, sind deutlich limitierter, als bei nuklearer DNA. Die Fähigkeit Nukleotide auszutauschen oder zu reparieren fehlt in Gänze und auch der Schutz durch Histone ist nicht gegeben (Inoue et al. 2003).

Zu guter Letzt sollen zur Komplettierung der essenziellen Makromoleküle, die maßgeblich durch ROS bzw. RNS geschädigt werden können, die Proteine aufgeführt werden. Die Oxidation von Proteinen kann abhängig vom Angriffspunkt und der Intensität der oxidativen Deprivation einen reversiblen oder auch irreversiblen Charakter haben. Das, durch ionisierende Strahlung oder die Fentonreaktion entstehende, OH^\cdot und ONOO^\cdot sind die maßgeblich an der oxidativen Degradation beteiligten reaktiven Spezies (Stadtman 1992). Diese freien Radikale führen zu Abstraktionen von Wasserstoffatomen aus der Polypeptidstruktur der Proteine und lassen Kohlenstoffradikale entstehen. Als Folge dessen werden unter aeroben Bedingungen aus diesen Kohlenstoffradikalen

Peroxyradikale gebildet (Stadtman 1992). Prinzipiell können alle Arten von Aminosäuren von ROS und RNS oxidiert werden. Allerdings sind spezielle Seitenketten von Lysin, Arginin, Histidin, Prolin und Threonin besonders anfällig für Metall katalysierte Oxidationen (Stadtman 2004; Valko et al. 2006).

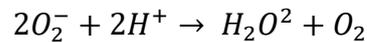
1.5 Antioxidantien

Wie vorrangigen Ausführungen entnommen werden kann, ist für die Funktionstüchtigkeit physiologischer zellulärer Prozesse und Mechanismen eine intakte Redoxhomöostase essenziell. Ein bereits ausführlich beschriebener Anteil dieses eingestellten Redoxgleichgewichts, wird über den Einfluss von reaktiven Spezies kreiert. Diese allein haben allerdings nur die Möglichkeit oxidative Reaktionen zu forcieren und machen die Existenz eines reduktiv agierenden Gegenspielers notwendig. Aus diesem Grund ist eine bestimmte Menge an enzymatischer und nicht-enzymatischer Schutzsysteme fester Bestandteil der Zelle. Hierdurch wird eine Regulation der ROS- und RNS-Produktion sichergestellt. Allgemein sind diese Zellanteile als Antioxidantien bekannt (Halliwell 1996; Kamata und Hirata 1999).

Die drei effizientesten enzymatischen Antioxidantien der Zelle sind Superoxiddismutase, Katalase und Glutathionperoxidase (Matés et al. 1999). Nicht-enzymatische Antioxidantien setzen sich aus Ascorbinsäure (Vitamin C), Tocopherol (Vitamin E) und Thiolantioxidantien. Thiolantioxidantien lassen sich weiter in Glutathion, Thioredoxin und Liponsäure unterteilen (McCall und Frei 1999). Wichtig anzumerken ist, dass nicht alle Antioxidantien im identischen Milieu funktionieren können. So gibt es Antioxidantien, die nur unter hydrophilen oder hydrophoben Umständen in Aktion treten, wohingegen andere amphiphil sind. Diese Unterscheidung ist wichtig, denn Sie determiniert, ob ein Stoff in der Zellmembran oder im Zytosol aktiv sein kann (Valko et al. 2006). Außerdem arbeiten bestimmte Antioxidantien in einer Art Netzwerk zusammen und können so zum Beispiel die reduktive Funktion eines anderen Antioxidans regenerieren (Sies et al. 2005).

Zuerst soll nun auf die enzymatischen Antioxidantien eingegangen werden. Das wohl bekannteste und effektivste enzymatische Antioxidans ist die Superoxiddismutase (SOD). 1969 wurden erstmals die antioxidativen Eigenschaften der SOD von McCord und Fridovich nachgewiesen (McCord und Fridovich 1969). In verschiedenen Zellkompartimenten existieren auch mehrere Isoformen der SOD. Die CuZnSOD findet sich im Zytoplasma, mitochondrialen Intermembranraum, Nukleolus und in Lysosomen, wohingegen MnSOD vornehmlich in Mitochondrien und der Extrazellulärmatrix aktiv ist (Faraci und Didion 2004). Isoformen der SOD unterscheiden sich hauptsächlich in der Ausstattung des aktiven Metallzentrums, der Auswahl an Aminosäuren und den Co-

Faktoren (Landis und Tower 2005). Die Hauptaufgabe von SOD ist die Elimination von Superoxiden. Besagtes Enzym katalysiert die Auflösung des hochgradig reaktiven Superoxids zu O_2 und zu der deutlich geringfügiger reaktiven Spezies H_2O_2 . H_2O_2 kann dann im Folgenden durch die Katalase oder Glutathionperoxidase entradikalisiert werden (Fridovich 1995).



Katalase ist ein tetrameres Enzym, das aus vier identischen tetrahedralen Untereinheiten besteht. Jede dieser Untereinheiten beinhaltet ein Ferriprotoporphyrin (Aebi 1984). Lokalisiert ist die Katalase in den Peroxisomen der Zelle und wandelt von dort aus H_2O_2 in Wasser und molekularen Sauerstoff um (Fridovich 1986).



Als drittes wichtiges Antioxidans ist die Glutathionperoxidase (GPX) zu erwähnen. Im menschlichen Körper finden sich vier verschiedene GPX. GPX1 wird ubiquitär exprimiert und ist neben der Katalase ein wesentlicher Akteur im Abbau von H_2O_2 . GPX2 ist epithelspezifisch und hauptsächlich im gastrointestinalen Trakt aufzufinden. Des Weiteren gibt es noch GPX3, die ein extrazelluläres glykosyliertes Enzym ist und im Blutplasma aufzufinden ist. Außerdem gibt es noch GPX4, die zytosolisch, mitochondrial und nuklear lokalisiert ist und Phospholipid Membranen vor oxidativem Stress schützt (Sheehan D et al. 2001). Alle Arten der GPX haben gemein, dass Sie die Reaktion von H_2O_2 zu Wasser unter Zuhilfenahme des Kofaktors Glutathion (GSH) katalysieren. Hierbei wird das Tripeptid GSH, genauer die Thiolgruppe (R-SH), reversibel oxidiert. Die Thiolgruppen zweier Reduktionsmittel GSH bilden nach der Oxidation eine Disulfidbrücke aus, sodass ein Glutathion-Dipeptid (GSSG) als Produkt neben Wasser entsteht (Mills 1957).



Mit Hilfe der Glutathionreduktase kann dann unter Verwendung von NADPH als Elektronendonator das GSSG zu 2 GSH reduziert werden.

Zusätzlich zu den enzymatischen Antioxidantien existieren noch nicht-enzymatische Moleküle, die ebenfalls freie Radikale neutralisieren können und somit auch eine Rolle in der Aufrechterhaltung der Redoxhomöostase der Zelle spielen. Bedeutende exogene Antioxidantien sind Ascorbinsäure (Vitamin C) und α -Tocopherol (Vitamin E). Diese

Antioxidantien werden exogen genannt, weil sie über die Nahrung aufgenommen werden müssen. Das Vitamin E ist ein fettlösliches Molekül und an Zellmembranen und Lipoproteinen gebunden (Burton und Traber 1990). Die hauptsächliche Funktion des α -Tocopherols, ist die Inhibierung von Lipidperoxidationen indem es die Peroxyradikale inaktiviert und die damit assoziierte Kettenreaktion unterbricht (Kagan et al. 1990). In diesem Prozess wird α -Tocopherol durch Oxidation zu einem Tocopherolradikal. Allerdings ist diese Reaktion reversibel, denn das Tocopherolradikal kann durch Ascorbat reduziert werden und dadurch seine antioxidativen Eigenschaften regenerieren (Kojo 2004).

Ascorbinsäure ist ein Antioxidans mit zwei ionisierbaren Hydroxyl-Gruppen. Dies verleiht der Ascorbinsäure eine leichte Oxidierbarkeit und lässt es als Redukton wirken (Valko et al. 2006). Das häufigste Reaktionsprodukt dieser Eigenschaft mit reaktiven Spezies ist das Semidehydroascorbat. Bei diesem Radikal handelt sich um ein sehr geringfügig reaktives Molekül, das einen guten Parameter für den oxidativen Stress in biologischen Systemen darstellt (Kojo 2004). Generell ist Vitamin C ein Antioxidans, das wasserlöslich ist. Es fungiert nicht nur als Elektronendonator und wirkt damit antioxidativ, sondern regeneriert auch andere Antioxidantien. Membran- oder lipoproteingebundenes Tocopherol wird zum Beispiel durch Ascorbinsäure reduziert. Zusätzlich interagiert Vitamin C auch mit enzymatischen Antioxidantien (Carr und Frei 1999; Kojo 2004).

Ferner existiert noch eine Gruppe von endogenen nicht-enzymatischen Antioxidantien, die den Thiol Antioxidantien zugeordnet wird. Zu den Thiol Antioxidantien zählen das Tripeptid Glutathion, Thioredoxin und Liponsäure (Valko et al. 2006). Das in hoher Konzentration vorhandene Glutathion, stellt intrazellulär den wichtigsten Anteil des Thiol Antioxidationssystems dar. Glutathion lässt sich im Zytosol, im Nukleolus und auch in Mitochondrien finden und ist, aufgrund seiner hohen Anreicherung in diesen Zellregionen, das maßgebliche lösliche Antioxidans (Masella et al. 2005). Die reduzierte Form von Glutathion ist GSH. Kommt es nun dazu, dass ein freies Radikal durch GSH reduziert wird, entsteht ein Glutathion Radikal, welches sich mit einem weiteren seiner Art zu einem nicht radikalischen oxidierten GSSG verbindet (Valko et al. 2006).

Eine zu hohe Akkumulation an GSSG intrazellulär kann Enzyme oxidativ schädigen. Das GSH/GSSG Ratio der Zelle stellt ein gutes Messparameter für den oxidativen Stress dar (Hwang et al. 1992). Im Zusammenhang mit oxidativem Stress hat Glutathion drei Hauptfunktionen. GSH kann Hydroxylradikale direkt und Wasserstoffperoxid und Lipidperoxid indirekt als Co-Faktor über die katalytische Funktion von GPX neutralisieren. Des Weiteren ist Glutathion für diverse andere enzymatische Antioxidantien ein Co-Faktor. Außerdem ist GSH fähig den antioxidativen Charakter von Vitamin C und E aus einer oxidierten Position heraus wiederherzustellen (Masella et al. 2005). Thioredoxin ist ein Disulfidmolekül, dass zwei redoxaktive Cysteine besitzt (Nakamura et al. 1997) Die zwei -SH Gruppen des Thioredoxins können reaktive Spezies oxidieren (Valko et al. 2006).

Auch die Liponsäure ist ein Disulfid, das allerdings amphiphil ist und daher nicht nur im Zytosol, sondern auch in zellulären Membranen integriert (Smith et al. 2004). Die Liponsäure ist ein sehr effektives Antioxidans, das mehrere Aufgaben in diesem Kontext erfüllt. Durch dieses Antioxidans können zum einen ROS unschädlich gemacht werden, aber auch endogene und exogene nicht-enzymatische Antioxidantien in ihre reduzierte Form zurückgeführt werden (Suzuki et al. 1993).

1.6 Optische Redoxsensoren und roGFP

In diesem Abschnitt der einleitenden Erläuterungen soll nun, passend zu den thematisierten Redoxsystemen und der damit einhergehenden Redoxhomöostase, auf Redoxsensoren eingegangen werden. Um evidenzbasierte und zuverlässige Aussagen über Zellvitalität und Funktionen im Zusammenhang mit Redoxveränderungen im zellulären Gefüge treffen zu können, sind präzise Redoxsensoren unabdinglich. Aus diesem Grund sollen nun diverse Methodiken vorgestellt werden.

Die konventionellen Methoden, um Redoxmessungen auf zellulärer Ebene durchzuführen, weisen einige sehr einschränkende Problematiken auf. Prinzipiell lassen sich herkömmliche Herangehensweisen in zwei Kategorien einteilen. Zum einen gibt es die Möglichkeit Redoxmessungen an lebenden Zellen mit fluoreszierenden Farbstoffen durchzuführen, und zum anderen können Redoxstatus mit Hilfe direkter Quantifizierung von nicht-enzymatischen Antioxidantien erhoben werden.

Die beiden Hauptvertreter der fluoreszierenden Farbstoffe sind Dichlorodihydrofluorescein und Dihydrorhodamin 123. Ersteres reichert sich zytosolisch an während Dihydrorhodamin 123 speziell mit Mitochondrien assoziiert ist (Dugan et al. 1995). Generell sind limitierende Faktoren von fluoreszierenden redoxdektektierender Farbstoffe, dass sie zumindest partiell unspezifisch sind, keine dynamischen Messungen erlauben, weil ihre Reaktionen irreversibel sind und sie keine zelluläre Kompartiments Spezifität erlauben (Royall und Ischiropoulos 1993). Zumal optische Messungen mit Farbstoffen darauf basieren, dass diese durch Oxidation ein optisches Fluoreszenzsignal generieren, können aufgrund der Irreversibilität dieser Oxidationsreaktion keine dynamischen Redoxprofile gemessen werden (Royall und Ischiropoulos 1993). Zusätzlich hierzu ist anzumerken, dass reduktive Prozesse gar nicht detektierbar sind. Des Weiteren sind besagte Farbstoffe nicht zwingend zuverlässig, denn Autooxidation oder phototoxische Störungen, können Ergebnisse signifikant verfälschen (Funke et al. 2011). Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass fluoreszierende Farbstoffe in begrenzter Weise als Marker für Redoxveränderungen in oxidativer Richtung dienen können, allerdings ungeeignet für

aussagekräftige quantitative, dynamische und Kompartiment begrenzte Erfassungen von Konzentrationen reaktiver Spezies oder Redoxstatus sind.

Auch die zweite Gruppe der herkömmlichen Vorgehensweisen der Redoxquantifizierung bringt einige limitierende Faktoren mit sich. Bei dieser Variante soll der Redoxstatus über die direkte Messung der Konzentrationen von NADPH, Glutathion, Thioredoxin oder Vitamin C mittels Assays oder Gel-Trennverfahren ermöglicht werden. Ein klarer Vorteil dieser Methode ist, dass eine sehr hohe Spezifität in der Feststellung der Konzentration von Redoxpaaren gegeben ist. Sprich es kann genau festgestellt werden in welcher Zahl die oxidierte oder reduzierte Form des entsprechenden Antioxidans vorliegt. Leider bringt dieser Vorteil auch indirekt einen der wesentlichen Nachteile dieser Messweise mit sich, denn für die Isolierung der Redoxpaare müssen die Zellen zerstört werden. Schlussfolgernd ist auch bei dieser Methodik keine repräsentative Aussage über quantitative, dynamische oder Kompartiment beschränkte Redoxstatusveränderungen möglich (Meyer und Dick 2010).

Wie schon in vorangegangenen Ausführungen erwähnt wurde, ist dem Gebiet der Redoxhomöostase und damit einhergehend der Effekt reaktiver Spezies auf physiologische, als auch pathophysiologische Prozesse in den letzten Jahren eine immer größer werdende Aufmerksamkeit zuteilgeworden. Verschiedenste Erkenntnisse haben einen Einblick in die Komplexität der Redoxbiochemie erlaubt und haben eine Methode notwendig gemacht, die es ermöglicht die Problematiken der herkömmlichen Redoxsensoren bzw. Messvorgehen zu lösen.

Mit der Isolierung des *green fluorescent protein* (GFPs) 1962 durch Shimomura und Kollegen aus der Qualle *Aequorea victoria*, wurde der Grundstein für einen neuen Redoxindikator geschaffen. Bei dem Wildtyp GFP (wtGFP) handelt es sich um ein 27 kDa großes zylindrisches Protein, das im Zentrum ein Chromophor enthält (Ormö et al. 1996). Das Chromophor ist der Anteil des Proteins, der fluoreszierende Eigenschaften aufweist. Trifft Licht in einer bestimmten Wellenlänge auf das Protein, kann dieses absorbiert werden. Die fluoreszierenden Anteile des Proteins werden kurzzeitig optisch angeregt und regenerieren dann ihre energetische Konfiguration. Dies in Konsequenz führt zu der Emission von Licht und erzeugt ein Fluoreszenzsignal.

Das GFP wurde oft als passiver Indikator für Genexpression oder der Lokalisation von Proteinen genutzt (Tsien 1998; Zimmer 2002). Allerdings kann durch die Modifikation der Primärstruktur des Proteins, genauer die Implementierung von redoxreaktiven Gruppen, aus dem GFP ein Redoxindikator konstruiert werden (Hanson et al. 2004). Dieses sogenannte *reduction, oxidation-sensitive GFP* (roGFP) wurde so konzipiert, dass durch Oxidation expositionierte Cysteine Disulfidbrücken bilden, die eine Konformationsänderung des Proteins induzieren und dadurch eine Änderung des Fluoreszenzsignals hervorrufen. Die Alteration des Fluoreszenzsignals ist nur möglich,

wenn die Brückenbildung der Cysteine nahe des Chromophors lokalisiert ist, denn nur dann resultiert die Konformationsänderung des Proteins auch in einer Modifikation des emittierten Lichts (Hanson et al. 2004). Hierzu wurde das molekulare Modell des GFP untersucht und die Aminosäuren Serin an Position 147 und Glutaminsäure an Position 204 für den Austausch durch Cystein ausgewählt (Ormö et al. 1996). Diese Cysteine enthalten freie Thiolgruppen (SH), die durch Oxidation bzw. in Präsenz von ROS oder RNS Disulfidbrücken (S-S) bilden. Wird dieser oxidative Stress wieder durch ein reduktiveres Milieu ausgeglichen lösen sich auch die Disulfidbrücken auf (Abbildung 2). Mit anderen Worten können über diesen sogenannten „Thiolschalter“ Informationen über die Redoxbalance auf zellulärer Ebene gewonnen werden und damit auch die Konzentration an freien Radikalen detektiert werden (Dooley et al. 2004; Hanson et al. 2004). Auf molekularer Ebene führt die Disulfidbrückenbildung dazu, dass sich das Chromophor in einer Konformation stabilisiert, die ihr Absorptionsmaximum bei 395 nm einpendelt. Treten nun reduzierende Umstände auf, lösen sich die Disulfidbrücken und das Chromophor absorbiert vornehmlich Wellenlängen von 470 nm. Diese speziellen Charakteristika können nun mithilfe einer ratiometrischen Messung genutzt werden. Während dieser speziellen Messmethodik wird der roGFP-Sensor alternierend mit den Wellenlängen seiner Absorptionsmaxima beleuchtet (F395/F470). Daraufhin gehend wird durch ein optisches Messverfahren festgestellt, welche der beiden Wellenlängen vornehmlich den roGFP-Indikator veranlassen Fluoreszenz zu emittieren. Aus dem Quotienten der beiden Fluoreszenzintensitäten kann dann das Verhältnis von reduzierten und oxidierten roGFP1 quantifiziert werden. Die Nutzung ratiometrischer Indikatoren eliminiert Messfehler, die durch Konzentrationsschwankungen des Indikators, Photobleichung oder spontane Zell Schwellungen entstehen können (Hanson et al. 2004).

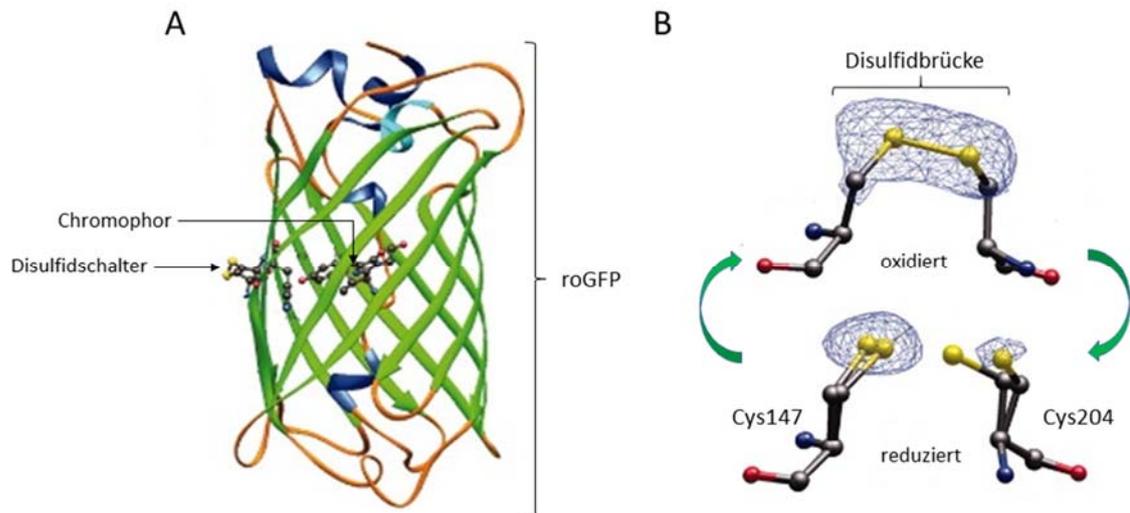


Abbildung 2: Redoxsensitives grün fluoreszierendes Protein.

(A) Das zylinderartige Gerüst des roGFP wird durch elf β -Faltblattstrukturen (grün) gebildet. Im Zentrum dieser Struktur befindet sich das Chromophor, welches in räumlicher Assoziation mit dem „Disulfidschalter“ steht. (B) Hier ist der „Disulfidschalter“ des roGFP vergrößert dargestellt. In oxidativem Milieu entsteht zwischen den Cysteinresten (Cys147, Cys204) eine Disulfidbrücke. Diese ist unter reduktiven Einflüssen reversibel. Abbildung modifiziert nach Hanson et al. 2004, *J. Biol. Chem.*, Band 279, Nr.13, S.13049 genehmigt durch die *American Society for Biochemistry and Molecular Biology*.

Ferner bietet die zelleigene Expression des roGFP, die durch die Integration der entsprechenden Gensequenz in das Genom der gewünschten Zellen ermöglicht wird, diverse weitere Vorteile. Auf dieser Grundlage ist eine zellspezifische und mit Promotoren und Signalpeptidsequenzen sogar zellkompartimentspezifische Analyse von Redoxveränderungen umsetzbar. Auch bei lokal begrenzten Messungen ist es also nicht mehr nötig die Zellen zu zerstören, sondern es kann mit vitalen Zellen gemessen werden (Hanson et al. 2004).

Zusammenfassend kann das roGFP als valides Mittel für die Bestimmung von Redoxveränderungen und in diesem Zuge der Detektierung von ROS eingestuft werden. Auf Grundlage der reversiblen Konformationsänderungen des Proteins durch Redoxveränderungen und der damit einhergehenden Änderung der fluoreszierenden Eigenschaften, sind dynamische Echtzeitmessungen der zellulären Redoxbalance möglich. Des Weiteren bietet der ratiometrische Charakter des roGFP die Basis für quantitative Messungen des Redoxstatus. Auch die zellspezifische bzw. zellkompartimentspezifische Erstellung von ROS-Profilen ist mit vitalem Gewebe realisierbar (Funke et al. 2011).

1.7 Ziele der Arbeit

Während einer SD kommt es zu einer massiven neuronalen und glialen Depolarisation, die sich langsam über die betroffenen Hirnregionen ausbreitet. In Folge der nahezu kompletten Depolarisation der Neurone und der massiven Störung der ionalen Homöostase, sind die Funktionen des neuronalen Netzwerkes der betroffenen Regionen stark gestört oder kollabieren in Gänze. Die Effekte einer SD auf die Hirnareale, in denen sie stattfindet, sind nicht immer reversibel. Sprich eine Erholung der Neurone nach einer SD-Episode ist nicht immer gegeben und es können pathophysiologische Konsequenzen entstehen. Nun stellt sich die Frage, warum SD assoziierte Schädigungen der Neurone auftreten und welche zellulären Ereignisse diesem Geschehen zugrunde liegen.

Vorangegangene Forschung hat gezeigt, dass eine SD eine massive Belastung für den zellulären Stoffwechsel bedeuten kann. Insbesondere bei der Hypoxie induzierten SD werden die Mitochondrien der Neurone extremem Stress ausgesetzt, da eine deutlich geringere oder fehlende Sauerstoff- und Glukose-Konzentration zu einer mangelhaften ATP-Produktion führt. Die Mitochondrien versuchen dies initial mit stark erhöhter Aktivität zu kompensieren. Zusätzlich hierzu ist bekannt, dass Belastungen des Zellstoffwechsels einen möglichen Grund für die Generierung freier Radikale darstellen können.

Im Kontext dieser Faktenlage ist zu klären, ob es eine eindeutige zeitliche und mechanistische Korrelation zwischen einer SD und Störungen der Redoxhomöostase auf neuronaler Ebene gibt. Wie in vorherigen Ausführungen erläutert, sind Redoxveränderungen auf zellulärer Ebene darauf zurückzuführen, dass das fein justierte Gleichgewicht von reaktiven Spezies und Antioxidantien gestört ist. Im Falle einer zu hohen Konzentration an freien Radikalen, die nicht mehr durch die reduzierenden Eigenschaften von Antioxidantien kompensiert werden kann, kommt es zu irreversiblen Schädigungen von Zellbestandteilen, die in letzter Konsequenz zum Zelltod führen. Dies wiederum könnte erklären, warum teilweise unter bestimmten Umständen Neurone ihre Funktionen nach einer SD nicht regenerieren können und ihre Vitalität verlieren.

Das Problem der selektiven Verwundbarkeit von Neuronen beschäftigt die Neurophysiologie und Pathophysiologie schon seit einigen Dekaden. So wurde zum Beispiel festgestellt, dass sich die neuronale Regeneration von normoxischen und hypoxischen SDs unterscheidet. Die Depolarisation der normoxischen SD ist selbstlimitierend und führt nicht zu irreversiblen Schäden der Neurone, wohingegen bei einer HSD die Regeneration der neuronalen Funktion und die Verhinderung von irreversiblen Schäden nur gegeben ist, wenn eine Reoxygenierung kurz nach dem Beginn der Depolarisation eingeleitet wird.

Aufbauend auf der bestehenden Faktenlage, ist es Ziel dieser Arbeit das Auftreten intrazelluläre Redoxveränderungen von Neuronen, während dem Eintreten einer SD, dynamisch, zellspezifisch und quantitativ zu charakterisieren. Außerdem sollen grundlegende subzelluläre Mechanismen entschlüsselt werden, welche als Hauptfaktoren der SD induzierten Generierung reaktiver Spezies eingeordnet werden können.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Chemikalien und transgene Redoxindikator-Maus

Alle Chemikalien und deren verwendete Konzentrationen in Lösungen werden im Folgenden aufgezählt.

Tabelle 1: Zusammensetzung der verwendeten Versuchslösungen.

Chemikalien	ACSF-Lösung	Hypoosmolare ACSF-Lösung mit 8 mM Kalium	Kalium Injektionslösung
NaCl	130 mM	110 mM	
KCl	3,5 mM	8 mM	3 M
NaH ₂ PO ₄	1,25 mM	1,25 mM	
NaHCO ₃	24 mM	24 mM	
MgSO ₄	1,2 mM	1,2 mM	
Dextrose	10 mM	10 mM	
CaCl ₂	1,2 mM	1,2 mM	

Grundlage für alle Lösungen war demineralisiertes Wasser. Für spezielle Messungen wurden die herkömmlichen oben aufgeführten Lösungen mit Pharmaka modifiziert. Hierbei handelte es sich um FCCP (0,5 μ M), DPI (20 μ M) und Allopurinol (200 μ M). Außerdem wurde für die Kalibrierung des roGFPc Antwortbereichs H₂O₂ und DTT verwendet.

Zuvor aufgeführte Chemikalien wurden von diesen Herstellern bezogen:

Natriumchlorid, Merck

Kaliumchlorid, Merck

Natriumdihydrogenphosphat, Merck

Natriumhydrogencarbonat, Sigma

Magnesiumsulfat, Merck

Dextrose, Merck

Calciumchlorid, Sigma (C3155)

FCCP (Carbonylcyanidtrifluormethoxyphenylhydrazon), Tocris (0453)

DPI (Diphenyleneiodonium), Tocris (0504)

Allopurinol, Sigma (A8003)

Wasserstoffperoxid, Sigma

Für die Sicherstellung eines gleichmäßigen pH-Wertes und einer Anreicherung mit Sauerstoff der ACSF-Lösung wurde ein Carbogen Gasgemisch (95% O₂ und 5% CO₂, AIR LIQUIDE Deutschland GmbH, Krefeld) genutzt. Die Hypoxie wurde durch die Umstellung auf ein stickstoffhaltiges Gasgemisch (95% Stickstoff und 5% C₂, AIR LIQUIDE Deutschland GmbH, Düsseldorf) erzeugt.

Zuvor wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Michael Müller in Kooperation mit dem Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin Göttingen ein transgenes Mausmodell mit stabiler Zuchtlinie, das zytosolisch das Redoxindikatorprotein roGFPc in den Nervenzellen exprimiert, etabliert. Die Integration des Transgens in das Genom der Maus erfolgte über eine prä nukleäre Mikroinjektion und die neurospezifische Expression des roGFPc wurde über den murinen *Thy1.2*-Promotor realisiert (Ittner und Götz 2007). Die so entstandenen C57BL/6N-Foundertiere wurden in der Zentralen Tierexperimentellen Einrichtung (ZTE) der Universitätsmedizin Göttingen mit C57BL/6J-Wildtypieren verpaart. Anhand dieser so begründeten Zuchtlinie wurden dann Phänotypisierung der transgenen Redoxindikator-Mäuse sowie die Kontrolle des neuronalen Verteilungsmusters und der roGFP-Sensorfunktionalität durchgeführt (Wagener et al. 2016). Nachkommen dieser Redoxindikatormäuse bildeten die Grundlage für die fluoreszenzmikroskopischen Messungen dieser Arbeit.

Außerdem wurde ein Teil der Mäuse für eine der Versuchsreihen mit einem speziellen Antioxidantien reichen Zuchtfutter der Firma ssniff Spezialdiäten GmbH ernährt. Dieses Zuchtfutter enthielt 0,25 g/kg α -Liponsäure, 2,5 g/kg N-Acetylcystein und 0,125 g/kg Vitamin E.

2.2 Präparatorisches Vorgehen zur Generierung vitaler Hirnschnitte

Alle Prozedere der Tierzucht und der Tötung der Tiere waren im Tierschutzbüro der Universität Göttingen registriert und vom niedersächsischen Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (LAVES) genehmigt. Außerdem wurde die Tötung der Versuchstiere ausschließlich durch Personen vorgenommen, die über eine entsprechende Autorisierung und den nötigen Sachkundenachweis verfügen. Zur Generierung vitaler Hirnschnitte der roGFPc-Mäuse war der erste Schritt die Dekapitierung der Maus. Hierzu wurde die Maus in einem Exsikkator in eine tiefe Ethernarkose (Diethylether, Sigma) versetzt und dann nach Kontrolle der Betäubung mit einer chirurgischen Schere enthauptet. Zuvor wurde sowohl das Präparationsbesteck als auch die artifizielle zerebrospinale Flüssigkeit (*artificial cerebrospinal fluid*, ACSF) bereitgelegt. Die ACSF-Lösung wurde zusätzlich zur Erhaltung eines konstanten pH-Wertes von 7,4 mit einem Carbogen-Gasgemisch (95% O₂, 5% CO₂) begast und stark heruntergekühlt. Auch die Auflagen und der Teflon Block für die weitergehende Präparation wurden in einem Gefrierfach heruntergekühlt.

Nun nach der Dekapitierung wurden die Kopfhaut und die Schädeldecke schnellstmöglich entlang der Scheitelregion aufgetrennt und mit Hilfe einer Pinzette zu den Seiten bewegt. Das freigelegte Hirn konnte nun mit kalter ACSF-Lösung übergossen werden und im Anschluss mit einem kleinen Spatel freipräpariert und aus dem Mouseschädel entfernt werden. Das Hirn wurde umgehend in die gekühlte ACSF-Lösung überführt. Dieses Vorgehen ist essenziell für die Vitalerhaltung der später entstehenden Gewebsschnitte, denn der Stoffwechsel der Neurone wird verlangsamt und ischämische Schäden im Hirngewebe können so verhindert werden. Außerdem darf das Hirngewebe unter keinen Umständen gestaucht werden und die Zeit von der Dekapitierung bis zur Überführung des Hirns in die eiskalte ACSF-Lösung sollte nicht mehr als 60 Sekunden dauern. Ansonsten muss mit irreversiblen Schäden des Hirngewebes gerechnet werden.

Nachdem das Hirn in der ACSF-Lösung runtergekühlt wurde, wurden mithilfe eines Skalpell frontale Anteile des Hirns und das Kleinhirn abgetrennt. Die Schnittfläche, an der das Kleinhirn abgetrennt wurde, dient als Auflagefläche, um das zurechtgeschnittene Mäusehirn auf einem Teflon Block festzukleben. Nach dem Ankleben des Hirns mit Sekundenkleber (Roti Coll1, Roth) wurde der Teflon Block in eine Schneidevorrichtung eingespannt und mit gekühlter ACSF-Lösung umspült. Das in ACSF gelagerte Hirn wurde dann mit einem Vibroslicer (752M Vibroslice, Campden Instruments) in 350 µm starke Gewebsschnitte zertrennt (Abbildung 3).

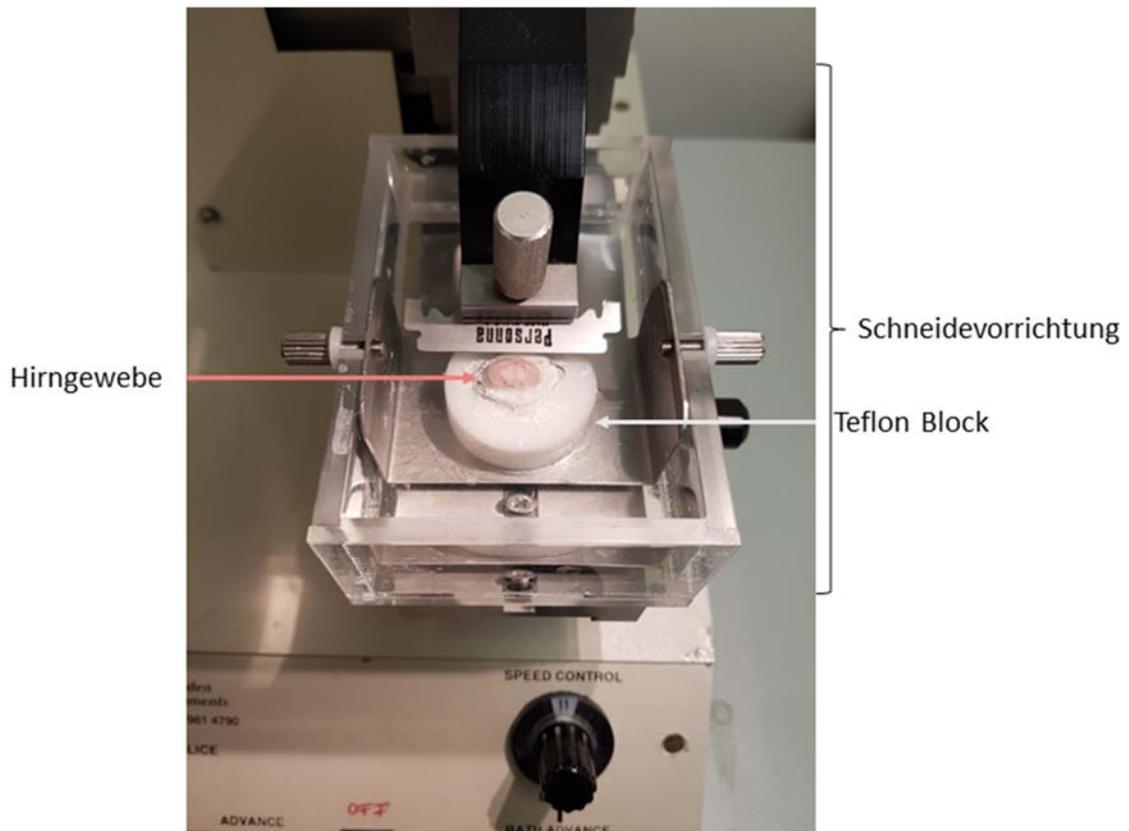


Abbildung 3: Generierung der Hirngewebsschnitte mittels eines Vibroslicers.

Das zurechtgeschnittene Mäusehirn wurde mit Hilfe von Sekundenkleber auf einem Teflon Block befestigt und mit carbogenbegaster ACSF-Lösung übergossen. Danach konnten in der Schneidevorrichtung des Vibroslicers 350 μm Gewebsschnitte generiert werden.

Interessant für die späteren Messungen waren nur Schnitte, die einen klar erkennbaren Anschnitt des Hippocampus aufwiesen. Diese Gewebsschnitte wurden dann an ihrer Hemisphären Mitte getrennt und in eine mit ACSF gefüllte und Carbogen begaste Präinkubationskammer bei Raumtemperatur eingelagert. Die Schnitte mussten mindestens 90 Minuten in der Präinkubationskammer verweilen, damit sich die intakten Neurone von der Traumatisierung des außenliegenden Gewebes erholen konnten.

2.3 Versuchsaufbau

Dieser Abschnitt des Kapitels soll die Bestandteile des Versuchsaufbaus zusammenfassen und damit die Grundlage für das Verständnis der etablierten Messmethodik bilden.

Zunächst sollen die Anteile des Versuchsaufbaus erläutert werden, die für die Versorgung der Hirngewebsschnitte mit ACSF-Lösung in einer bestimmten Temperatur notwendig waren. Die ACSF-Lösung wurde in Glasflaschen gefüllt und in einem Wasserbad (Thermo Scientific, SC100) aufgeheizt. Die carbogenbegaste und auf adäquate Temperatur (39 °C) vorgeheizte Lösung wurde dann über eine Mehrkanal-Rollenpumpe (Typ: 205S, Watson Marlow GmbH, Rommerskirchen) in die Messkammer gepumpt. Die Mehrkanal-Rollenpumpe stellte die Flussrate von ca. 7 ml/min sicher und ein zwischengeschalteter Windkessel reduzierte zu starke Druckschwankungen, Schwankungen des Flüssigkeitspegels und ungleichmäßigen Flüssigkeitseinstrom in die Messkammer. Der Windkessel wurde von der institutseigenen Werkstatt der Abteilung Neuro- und Sinnesphysiologie der Universität Göttingen hergestellt. Ferner gab es noch ein weiteres Heizelement, das zusätzlich zum Wasserbad die konstant gehaltene Temperatur der ACSF-Lösung mit dem Eintreten in die Messkammer realisierte. Die Heizfunktion dieses zwischengeschalteten Elements konnte über einen externen Temperaturregler (*Automatic temperature Controller* TC-324C, Warner Instruments) kontrolliert werden. Dieser Temperaturregler war mit einem Thermometer verbunden, das in die Messkammer eingelassen wurde. Somit war eine ständige Kontrolle der Temperatur möglich. Angekommen in der Messkammer konnte nun die Lösung mit einer Unterdruckpumpe (WiSA Modell 300) in eine Glasflasche abgesaugt werden und es entstand ein gleichmäßiger Durchfluss an frischer ACSF-Lösung in der Kammer (Abbildung 4).

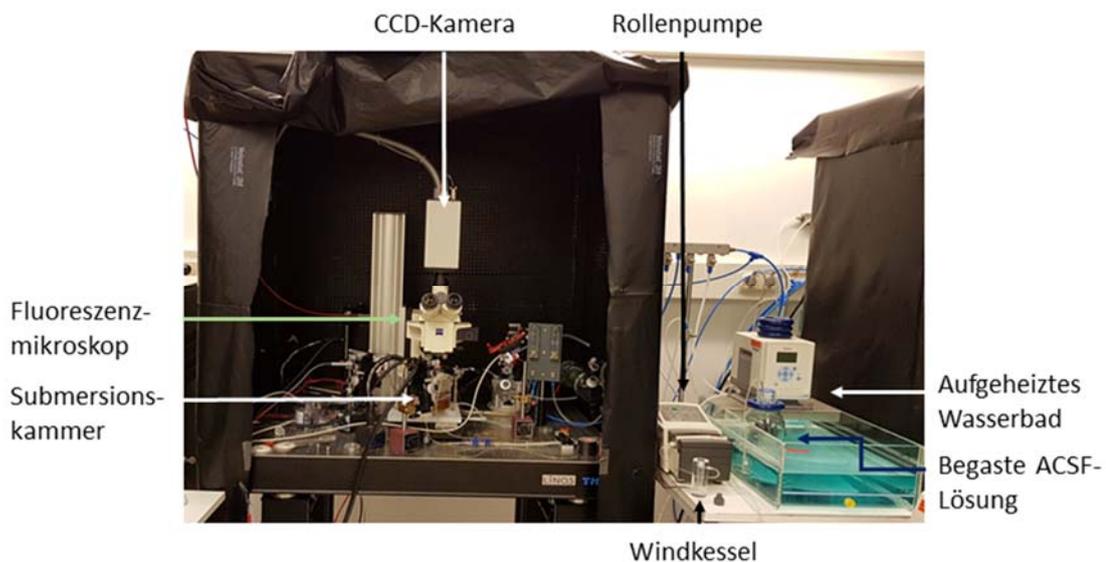


Abbildung 4: Arbeitsplatz des Messverfahrens.

Alle Bestandteile des Versuchsaufbaus waren als funktionelle Einheit zusammengestellt. CCD-Kamera, Fluoreszenzmikroskop und Submersionskammer wurden auf einem schwingungsgedämpften Tisch platziert.

Im Mittelpunkt des Versuchsaufbaus steht die Submersionskammer (Messkammer). In ihr konnten Gewebsschnitte auf einem Netz aus Nylon in einer submergierten Position fixiert werden. Die Fixierung der Gewebsschnitte wurde durch eine kleine Harfe sichergestellt (Abbildung 5).

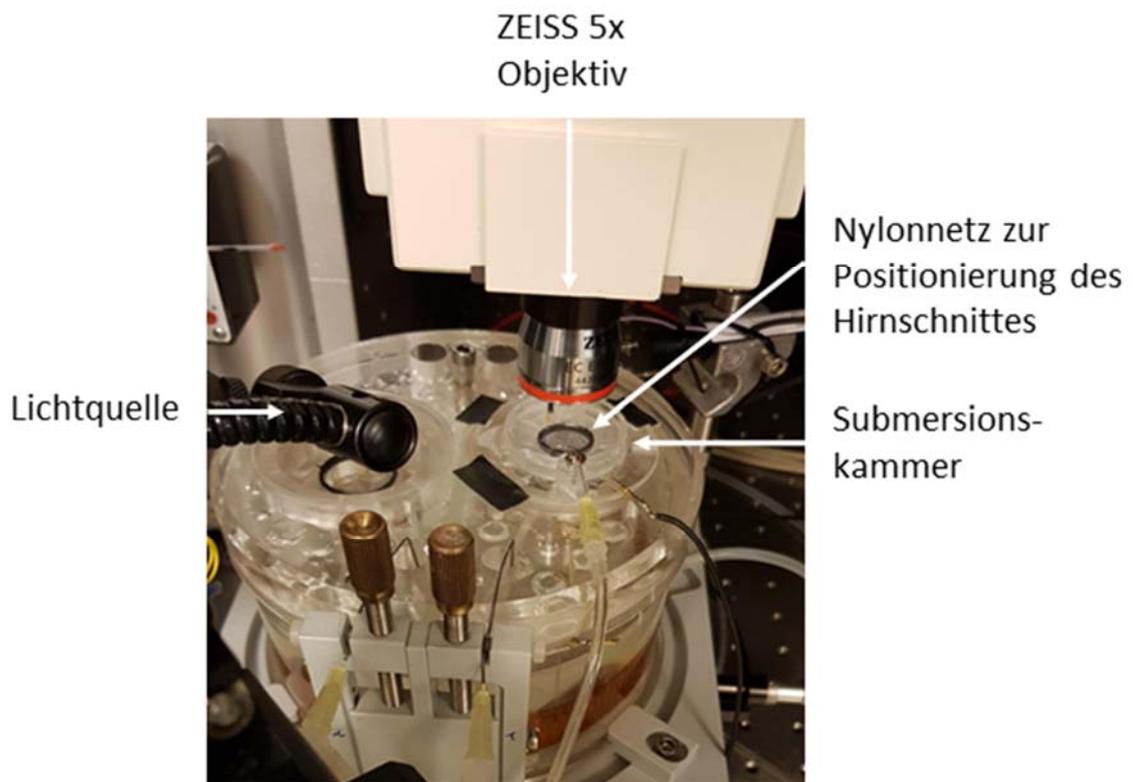


Abbildung 5: Submersionskammer.

Die Submersionskammer war permanent mit nachfließender carbogenbegaster ACSF-Lösung gefüllt. Für eine suffiziente Oxygenierung des Hirngewebes musste die Flussrate der ACSF-Lösung ca. 7 ml/min betragen. Innerhalb der Submersionskammer war ein Nylonnetz für die Lagerung des Gewebsschnittes integriert. Die Positionierung des Hirnpräparats auf dem Nylonnetz war ein entscheidender Faktor der Vitalerhaltung des Hirngewebes, da hierdurch ein uneingeschränkter Zugang zu frisch nachfließender ACSF-Lösung gewährleistet wurde.

Über der Submersionskammer befand sich ein Mikroskop (Axiotech mit ZEISS 10x Objektiv W.N Achroplan 420947-9900, Carl Zeiss Micro Imaging GmbH), das zur Platzierung der Messelektroden in den Hirngewebsschnitten genutzt wurde. In das Mikroskop war zusätzlich eine *charge-coupled device* (CCD) – Kamera (Imago QE, PCO Imaging, Kelheim, Deutschland) integriert. Zusammen mit einer externen Lichtquelle in Form einer polychromatischen Xenon-Hochdrucklampe (Polychrom V, Till Photonics) und einem dichroitischen Spiegel (DC495), wurde das Präparat mit Wellenlängen von 395

und 470 nm angeregt. Die Kamera war mit einem Computer verbunden und konnte mit Hilfe der Steuerungs- und Bilderfassungssoftware Till Vision (Till Photonics, Gräfelfing, Deutschland) die emittierten Fluoreszenzsignale aufzeichnen (Abbildung 6).

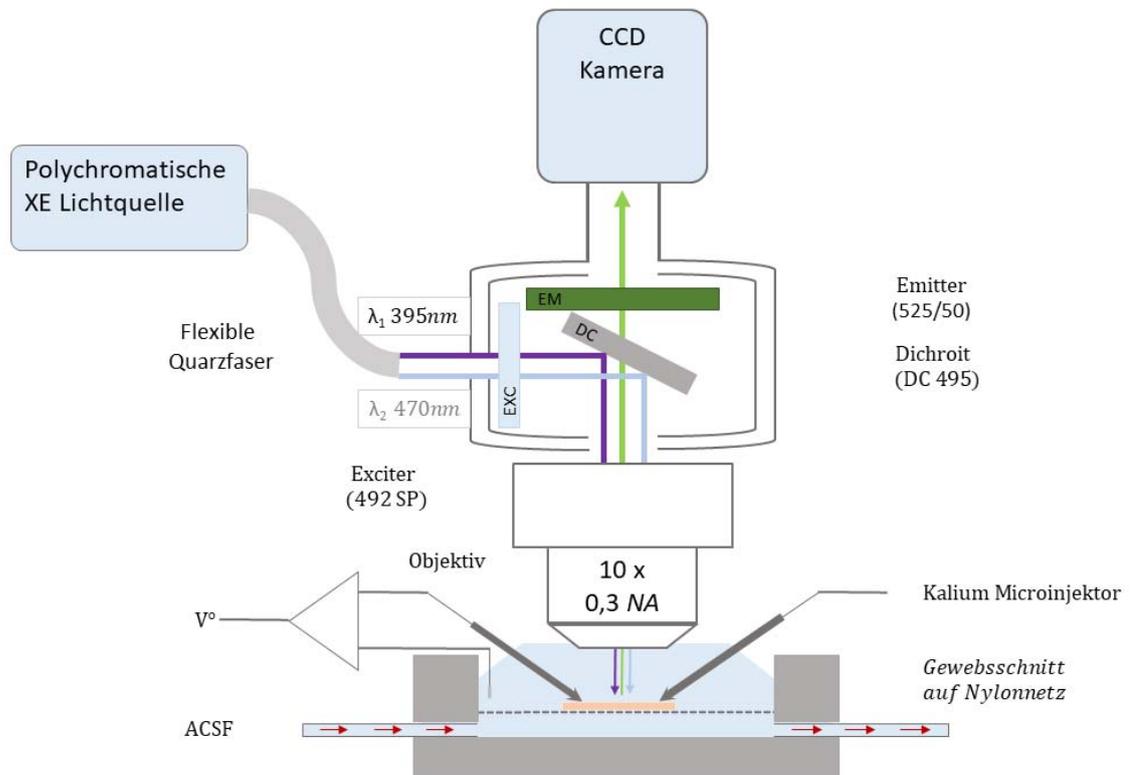


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Fluoreszenzmikroskopie.

Mit Hilfe der polychromatischen Xenon-Hochdrucklampe wurde das Hirngewebspräparat über den Dichroiten alternierend mit Licht der Wellenlängen 395 nm und 470 nm beleuchtet. Die emittierten Fluoreszenzsignale konnten, nachdem sie den 525/50 nm-Bandpass-Emissionsfilter durchquerten, von der CCD-Kamera aufgenommen werden. Aufnahmen der roGFPc-Fluoreszenz erforderte die Nutzung eines Submersionsobjektivs.

Für die Ableitung des extrazellulären DC-Potenzials (V_0) wurden Glasmikroelektroden verwendet. Diese Glasmikroelektroden wurden aus Glaskapillaren (GCL50TF-10, Clark Electromedical) durch einen Mikropipetten-Puller hergestellt. In die modifizierten Glaskapillaren, die mit ACSF-Lösung befüllt wurden, war ein Silberdraht eingeführt, der mit dem Messkopf eines selbstgebauten Verstärkers verbunden war. Der Verstärker wiederum war an einen Computer angeschlossen, der die elektrophysiologischen Signale aufzeichnete.

2.4 Technische Grundlage der etablierten Messmethodik

Die etablierte Messmethodik bestand aus zwei wichtigen Komponenten, die letztendlich für die zeitliche Korrelierung der SD und der assoziierten Redoxveränderungen ausschlaggebend waren.

Zum einen wurde eine elektrophysiologische Messung in Form einer extrazellulären Feldpotenzialableitung durchgeführt. Um die inneren vitalen Schichten der Hirngewebsschnitte für die Ableitung des DC-Potenzials erreichbar zu machen, wurde eine modifizierte Glaskapillare (GCL50TF-10, Clark Electromedical) genutzt. Diese mit ACSF-Lösung befüllte Glaselektrode machte die lokale Insertion einer Ableitelektrode in die hippocampale CA1 Region des *Stratum radiatum* möglich. Mithilfe einer weiteren Reizelektrode und einem Oszilloskop konnte nun vor der tatsächlichen elektrophysiologischen Messung durch elektrische Stimuli die uneingeschränkte Vitalität der Hirnschnitte überprüft werden. Im Falle einer Erregbarkeit, der Neurone und somit einer Bestätigung der Vitalität des Gewebsschnittes, konnte nun die tatsächliche Messung folgen. Das EDV-Programm PClamp 9.2 dokumentierte das DC-Potenzial, das von der Glaselektrode abgeleitet wurde, und ermöglichte eine permanente Beobachtung der elektrischen Signale. Dies war essenziell, um den genauen Zeitpunkt der eintretenden SD festzustellen.

Zellbiologische Grundlage der fluoreszenzmikroskopischen Messung bildete das roGFP. In dieser beschriebenen Versuchsreihe wurde der Subtyp roGFPc verwendet. Dieses spezielle fluoreszierende Protein wird im Zytosol der Neurone exprimiert und ist zusätzlich redoxsensitiv. Die Modifikation der Primärstruktur des Proteins führt dazu, dass das Protein vollständig ins Redoxsystem der Zelle integriert ist. So haben Veränderungen der Redoxhomöostase einen direkten Einfluss in Form einer Konformationsänderung des Proteins. Besagte Konformationsänderungen des Proteins beeinflussen ebenfalls die Konfiguration des proteineigenen Chromophors. Überwiegend oxidative Vorgänge im Zytosol manifestieren sich in einer vornehmlichen Absorption der Wellenlänge 395 nm. In einem eher reduzierendem zytosolischen Milieu pendelt sich das Absorptionsmaximum des Chromophors bei einer Wellenlänge von 470 nm ein (Hanson et al. 2004). Diese Eigenschaften machen das roGFPc zu einem dynamischen und quantitativen Redoxindikator. Die auf dieser Basis aufbauende fluoreszenzmikroskopische Messung erfolgt ratiometrisch, um Messungsfehler, die durch Konzentrationsschwankungen des Indikators, Photobleichung oder spontane Zell Schwellungen entstehen können, zu eliminieren (Hanson et al. 2004).

Während des eigentlichen Messvorganges erzeugte eine polychromatische Xenon-Hochdrucklampe (Polychrom V, Till Photonics) alternierend Licht mit einer Wellenlänge von 395 und 470 nm. Ein dichroitischer Spiegel (DC495) war der Lichtquelle zwischengeschaltet und reflektierte Licht bis zu einer Wellenlänge von 495 nm. Über

diesen wurde die Beleuchtung bis entsprechende Wellenlänge umgeleitet und auf den Gewebsschnitt geworfen. Der Fluorophor des roGFPc wurde durch die Belichtung angeregt und emittierte eine entsprechende Fluoreszenz. Die Fluoreszenz wurde dann mit einem 10x Wasserimmersionsobjektiv (Axiotech mit ZEISS 10 x Objektiv W.N Achroplan 420947-9900, 0,3 NA, Carl Zeiss Micro Imaging GmbH) erfasst, passierte aufgrund ihrer länger welligen Eigenschaften den Dichroiten, wurde von einem 525/50 nm-Bandpass-Emissionsfilter von irrelevanten Autofluoreszenzen getrennt und von einer *charge-coupled device* (CCD) – Kamera (Imago QE, PCO Imaging, Kelheim, Deutschland) aufgenommen. Die gesamte Steuerung und Quantifizierung der ratiometrischen Messung wurde von der Bilderfassungssoftware Till Vision® (Till Photonics, Gräfelfing, Deutschland) realisiert. Emittierte Fluoreszenzsignale, die durch die CCD-Kamera erfasst wurden, wurden durch Till Vision in einen Quotienten bzw. Fluoreszenzratio (F_{395}/F_{470}) umgerechnet. Des Weiteren ermöglichte das Programm Till Vision eine klar programmierte Beleuchtungszeit bei 395 und 470 nm von jeweils 12 ms, die in einem Zeitintervall von jeweils 10 s stattfand. Dieses Beleuchtungsprotokoll wurde gewählt, da es eine ausreichende Erfassung der Redoxstatusänderungen ermöglichte und der roGFPc-Sensor auf diese Weise nicht durch übermäßige Beleuchtung geschädigt wurde.

Durch eine vorangegangene Übersichtsaufnahme des einzusehenden Anteiles des Gewebsschnittes, wurde der Bereich, in welchem die entstandenen Fluoreszenzsignale analysiert werden sollten, eingegrenzt. Hierzu konnte ebenfalls unter Verwendung von Till Vision auf Gewebsebene ein bzw. mehrere Messareale (*area of interest*, AOI) markiert werden. In diesem Fall beschränkten sich die Messareale auf das *Stratum pyramidale* der CA1 Region des Hippokampus, weil dort eine hohe Zelldichte vorliegt, das roGFPc gut exprimiert wird und SDs verlässlich ausgelöst werden können. Nun konnte in Echtzeit die Aufzeichnung der emittierten Floreszenzen für die Anregung des roGFPc mit Wellenlängen von 395 nm und 470 nm und die Fluoreszenzintensität (F_{395}/F_{470}) graphisch mitverfolgt werden. Zusätzlich zu der graphischen Aufzeichnung der optischen Signale zeichnete das Programm ebenfalls die numerischen Werte auf, welche dann für folgende quantitative Auswertungen verwendet werden konnten.

2.5 Kalibrierung des roGFP-Reaktionsbereichs

Neben der zuvor beschriebenen dynamischen Messeigenschaft, die durch den Redoxindikator roGFPc gegeben ist, ist auch eine quantitative Analyse der intrazellulären Redoxveränderungen möglich. Hierzu wurde durch eine Kalibrierung des roGFP-Antwortbereichs ein Rahmen definiert, der den maximal oxidierten und reduzierten Reaktionsbereich des roGFPc darstellte. Damit die Maximalwerte der oxidierten als auch reduzierten Form des Indikatorproteins ratiometrisch festgestellt werden konnten, wurde

während der Kalibrierungsmessung das Oxidationsmittel Wasserstoffperoxid (H_2O_2 , 5 mM, 7 min) und das Reduktionsmittel 1,4-Dithio-DL-threitol (DTT, 10 mM, 7 min) in Sättigungsdosis der ACSF-Lösung beigefügt. Diese Maximalwerte bildeten die Grundlage für die Errechnung des relativen Oxidationsstatus des zytosolischen roGFP und des vorherrschenden Redoxpotenzials in mV. Dieser Ansatz ließ genaue Quantifizierungen des Oxidationsstatus des roGFPc zu und ermöglichte dadurch Rückschlüsse auf die Redoxbalance der Neurone innerhalb ausgewählter Hirnregionen.

2.6 Vitalerhaltung eines Gewebsschnittes während einer Messung

Um die Vitalerhaltung eines Hirnschnittes in einer Submersionskammer zu realisieren, mussten einige Faktoren beachtet werden.

Bevor eine Messung innerhalb der Submersionskammer gestartet werden konnte, mussten die generierten Hirngewebsschnitte nach der Präparation in einer Präinkubationskammer 90 Minuten ruhen, um sich von der mechanischen Traumatisierung des Schneidevorganges zu erholen. An den Schnittträgern befand sich devitales Hirngewebe und weiter zentralwärts blieben funktionsfähige Neurone erhalten.

Während des eigentlichen Messvorganges konnten die Gewebsschnitte mittels einer Harfe auf einem Nylonnetz in einer submergierten Position fixiert werden. Diese Lagerung der Hirnschnitte stellte sicher, dass das Gewebe von allen Seiten Kontakt zu ständig nachfließender frischer ACSF-Lösung hatte (Abbildung 7).

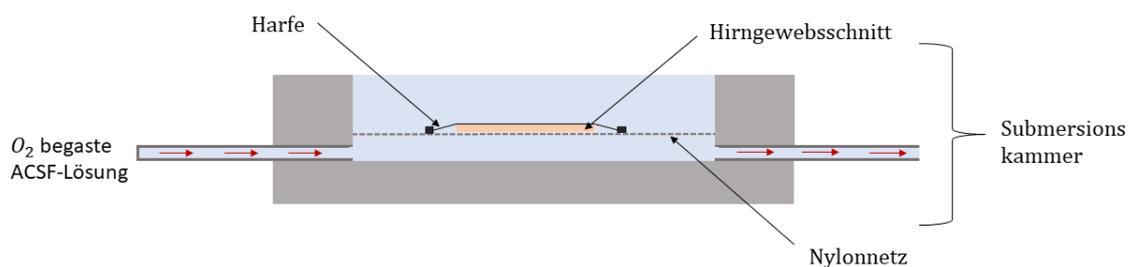


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Submersionskammer.

Das Hirngewebspräparat wurde mittels einer Harfe auf einem in die Submersionskammer integrierten Nylonnetz fixiert. Diese Lagerung stellte eine allseitige Umspülung mit ACSF-Lösung sicher und verhinderte ein Verrutschen des Gewebsschnittes während dem Messvorgang.

Da die Sauerstoffversorgung der Gewebsschnitte nur über die Carbogenbegasung der Lösung gegeben war, konnte so die Vitalität des Hirngewebes aufrechterhalten werden. Ein weiterer wichtiger Faktor für die Versorgung der zentral liegenden Neurone war die Stärke des präparierten Hirnmaterials. Hier wurde eine Schnittdicke von 350 μm gewählt, um die Diffusionswege der ACSF-Lösung möglichst kurz zu halten. Dies erhöhte ebenfalls die Wahrscheinlichkeit einer Vitalerhaltung der unter der Oberfläche liegenden Neurone (Shuttleworth et al. 2003; Hájos et al. 2009). Zusätzlich war es notwendig die Flussrate der ACSF-Lösung auf 7 ml/min zu erhöhen. Für eine adäquate Sauerstoffversorgung des Hirngewebes nur über die ACSF-Lösung, war auch eine erhöhte Flussrate maßgeblich. Wurden alle diese Parameter und Vorgehensweisen beachtet, waren Messprozedere bei einer Temperatur von 35-36°C durchführbar.

2.7 Auslösung einer vollständig ausgeprägten hypoxischen und normoxischen SD in einer Submersionskammer

Nicht nur die Vitalerhaltung der Gewebsschnitte, sondern auch die Auslösung von SDs in einer Submersionskammer bedurfte einer modifizierten Vorgehensweise. Zur Auslösung einer hypoxischen SD wurden sowohl die sauerstoffbegaste als auch stickstoffbegaste ACSF-Lösung modifiziert. Die ACSF-Lösungen wurden in einer leicht hypoosmolaren Form verwendet (NaCl Gehalt um 20 mM abgesenkt). Außerdem wurde der Kaliumgehalt der Lösungen auf 8 mM erhöht. Zusätzlich hierzu wurde der stickstoffbegasten ACSF-Lösung, die für die SD-Auslösung genutzt wurde, Natriumsulfit (2 mM) hinzugefügt. Dies verhinderte die Wiederaufnahme der sauerstofffreien ACSF-Lösung mit O_2 aus der Umgebungsluft.

Für die Auslösung der normoxischen SD wurde eine modifizierte Injektionskapillare genutzt, die eine 3M Kalium-Lösung enthielt. Diese konnte durch eine Haltevorrichtung gestützt in den Gewebsschnitt eingestochen werden. An dieser Gewebsstelle konnte nun mithilfe eines Mikroinjektors (PDES-02DX npi) 1,5 s mit 0,25 bar lokal eine 3 M K^+ -Lösung appliziert werden. Im Falle der Auslösung der normoxischen SD konnte die herkömmliche ACSF-Lösung verwendet werden.

Ein weiterer Faktor, der auch unabdinglich für die Entstehung einer vollständig ausgeprägten SD war, war eine leicht erhöhte Temperatur von 35-36°C. Für die Hypoxie induzierte SD wurden Temperaturen von 35-35,5°C und für die normoxische SD-Erzeugung 35,5-36°C eingestellt.

2.8 Ablauf einer zeitlich korrelierten elektrophysiologischen und fluoreszenzmikroskopischen Messung

Zu Beginn eines kompletten Messdurchlaufes wurde ein Hirnschnitt von seiner Präinkubationskammer mit einer Glaspipette in die Submersionskammer des Versuchsaufbaus übertragen. Der Hirnschnitt wurde auf einem Nylonnetz mit einer Harfe am gewünschten Ort fixiert. Die ständig nachfließende carbogenbegaste ACSF-Lösung stellte die O₂ und Glukose Versorgung des Hirngewebes sicher. Das über der Submersionskammer installierte Mikroskop ermöglichte die Platzierung der Ableitelektrode in der CA1 Region des Hippokampus. Außerdem wurde vor Beginn der eigentlichen Messung die Vitalität des Gewebsschnittes mit einer Reizelektrode überprüft. Konnten fEPSPs nachgewiesen werden, war der Schnitt vital und konnte für weitere Messvorgänge genutzt werden.

Nun war die Ableitung des DC-Potenzials durchführbar und konnte durch das EDV-Programm PClamp 9.2 visualisiert und aufgezeichnet werden. Dies ermöglichte die genaue Feststellung des Zeitpunktes der eintretenden SD.

Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurden von einem Wasserimmersionsobjektiv (Axiotech mit ZEISS 10 x Objektiv W.N Achroplan 420947-9900, 0,3 NA, Carl Zeiss Micro Imaging GmbH) bewerkstelligt, dass direkt über dem Gewebsschnitt in die ACSF-Lösung eingetaucht platziert werden musste. Wichtig war, dass im Vorfeld die Ableitelektrode in einem möglichst flachen Winkel in den Hirnschnitt eingebracht war, um nicht von dem Wasserimmersionsobjektiv tangiert zu werden. Dann konnte die Belichtung durch die Xenon-Hochdrucklampe (Polychrom V, Till Photonics) eingestellt und eine Übersichtsaufnahme des Gewebsschnittes angefertigt werden. In dieser Übersichtsaufnahme konnten anschließend die gewünschten Messareale (*area of interest*, AOI) markiert werden. Es wurden 4 Messareale im *Stratum pyramidale* der CA1 Region des Hippocampus zur Auswertung der dort entstehenden Fluoreszenzsignale gekennzeichnet (Abbildung 8).

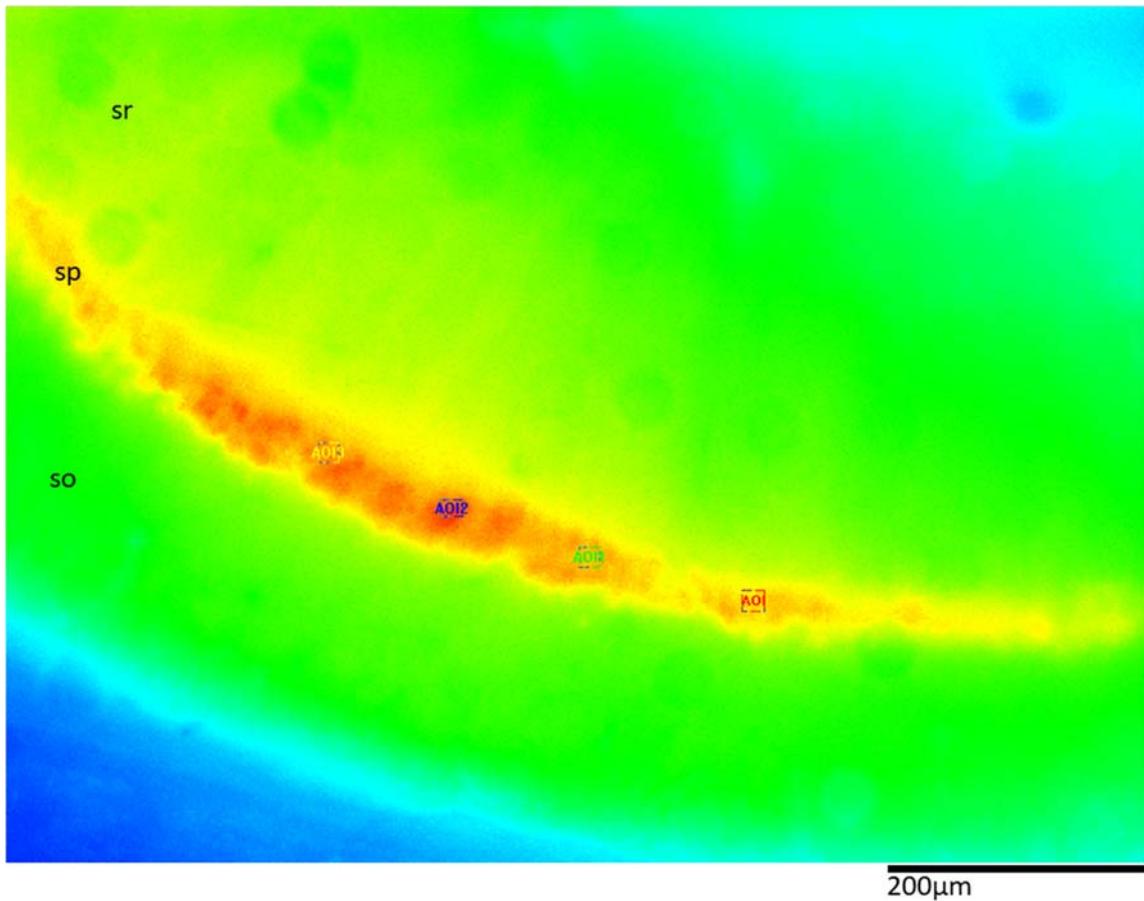


Abbildung 8: Übersichtsaufnahme mit Markierung der Messareale.

Die Übersichtsaufnahme zeigt die vier markierten AOI im *Stratum pyramidale* (*sp*), welche die relevanten Areale der Fluoreszenzaufnahmen während dem Messvorgang darstellen. Des Weiteren sind *Stratum oriens* (*so*) und das *Stratum radiatum* (*sr*) der CA1 Region des Hippokampus erkennbar.

Die Steuerung und Aufzeichnung der fluoreszenzmikroskopischen Messung erfolgte durch die Bilderfassungssoftware Till Vision (Till Photonics, Gräfelfing, Deutschland). Im Anschluss daran wurden elektrophysiologische und fluoreszenzmikroskopische Messung zeitgleich gestartet. Sprich es war möglich den Oxidationsstatus des roGFPc und damit den Redoxstatus der Neurone zeitgleich zum Eintreten einer SD zu aufzuzeichnen. Etwa 5 min wurden, ohne jegliche Beeinflussung des Normalzustands, beide Messungsparameter festgehalten. Danach wurde je nach Messreihe entweder die Einwaschung einer pharmazeutischen Konditionierung des Gewebes begonnen oder die SD, wie zuvor beschrieben, induziert.

2.9 Modifikation der ACSF-Lösung mit Pharmaka

Nachdem es letztendlich realisierbar war eine SD im Hippokampus durch den Redoxindikator roGFPc mit dem zelleigenen Redoxstatus der Neurone zeitlich zu korrelieren, sollte in einem nächsten Schritt eingegrenzt werden, welche Zellkompartimente oder Bestandteile maßgeblich an der Störung der Redoxhomöostase während einer SD beteiligt sind.

Im Zuge dessen wurden diverse Pharmaka zur Inhibition expliziter Enzyme oder Zellorganellen eingesetzt. Hauptsächlich wurde die Funktion von Mitochondrien, der Xanthinoxidase und der NADPH Oxidase blockiert. Hierzu wurden zur Entkopplung der Mitochondrien FCCP (0,5 μM), zur Blockade der Xanthinoxidase Allopurinol (200 μM) und zur Blockade der NADPH Oxidase DPI (20 μM) verwendet. Diese Zellanteile sind, wie zuvor beschrieben, nachgewiesene ROS und RNS Produzenten. Neben dem Einsatz von Pharmaka, gab es noch eine Messreihe mit calciumfreier ACSF-Lösung und Hirnmaterial von Mäusen, die Antioxidantien Futter erhielten.

3 Ergebnisse

Kernthematik der durchgeführten Messungen im Zuge dieser Dissertation waren SD induzierte Redoxveränderungen in hippokampalen Neuronen des Mäusehirns.

Wie im Einleitungsteil beschrieben, existiert auf zellulärer Ebene physiologisch eine Redoxhomöostase. Dieses Redoxgleichgewicht wird über die Produktion und Elimination reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffspezies kontrolliert und aufrechterhalten. Diverse Ereignisse können dazu führen, dass sich der intrazelluläre Redoxstatus verändert und zum Beispiel die Produktion freier Radikale überwiegt. Überwiegt der Anteil freier Radikale, können diese nicht mehr ausreichend von Antioxidantien abgeschirmt werden und die Zelle ist einem sogenannten oxidativen Stress ausgesetzt. Dies kann zur Schädigung einzelner Zellelemente führen und in letzter Instanz auch zur Degeneration der gesamten Zelle.

Gegenstand der Versuchsreihe war es aufzuklären, ob eine SD mit Redoxveränderungen auf zellulärer Ebene im Sinne von oxidativem oder ggf. auch reduzierendem Stress assoziiert ist. Dies wurde über eine zeitgleich ablaufende elektrophysiologische und fluoreszenzmikroskopische Messung realisiert. Im Falle einer eindeutigen Korrelation zwischen Redoxalterationen intrazellulär und dem Phänomen der SD, sollte in einem weiteren Schritt identifiziert werden, welche Zellbestandteile oder Kompartimente eine ausschlaggebende Rolle in diesem Geschehen spielen. Hierzu gab es diverse Versuchsprotokolle, wie die gezielte Inhibition einzelner bekannter ROS und RNS Produzenten und eine Messungsreihe in calciumfreier Lösung. Des Weiteren fanden Messungen mit Mäusen statt, die zuvor mit Antioxidantien Futter ernährt wurden.

Alles in Allem entstanden so mit der Kontrollmessung 6 Versuchsgruppen auf Grundlage derer korrelierte elektrophysiologische und fluoreszenzmikroskopische Parameter erhoben und nach entsprechender Aufbereitung ausgewertet werden konnten.

3.1 Etablierung der Submersionsmessung

Als Grundlage für die Realisierung der beschriebenen Korrelation einer elektrophysiologischen mit einer fluoreszenzmikroskopischen Messung wurde eine Versuchsmethodik etabliert, die in einer Submersionskammer stattfand. Dies war notwendig, weil das optische Messverfahren mit einem Wasserimmersionsobjektiv durchgeführt wurde und somit nur in flüssiger Phase ablaufen konnte. Deshalb musste das

Objektiv in die ACSF-Lösung eingetaucht werden. Allerdings stellte dies eine deutliche Erschwerung der Durchführbarkeit dar und erforderte einige Modifikationen und explizite Vorgehensweisen.

Zum einen war die Vitalerhaltung der Gewebsschnitte in einer Submersionskammer nicht ohne weiteres möglich. Hier stellte die Schlüsselproblematik die mangelnde oder zu langsame Versorgung des Hirnmaterials mit Sauerstoff und anderen essenziellen Bestandteilen der ACSF-Lösung dar. Im Gegensatz zu der herkömmlichen Interfacekammer, wurde die Sauerstoff- bzw. Nährstoffversorgung des vitalen Hirnmaterials in Gänze über carbogenbegaste ACSF-Lösung sichergestellt. Aus diesem Grund musste der Gewebsschnitt in der Submersionskammer auf einem Nylonnetz in untergetauchter Position mit Hilfe einer Harfe fixiert werde. Diese Lagerung sicherte die ständige Umspülung des Gewebes von allen Seiten mit ACSF-Lösung und erzeugte damit eine möglichst große Oberfläche für Diffusionswege von O₂ und Glukose. Außerdem wurde im Zuge der Präparation der akuten Hirnschnitte eine Schnittdicke von 350 µm angestrebt, um den Diffusionsweg der ACSF-Lösung zu den vitalen Gewebsanteilen möglichst kurz zu halten. Zusätzlich wurde die Flussrate der ACSF-Lösung auf 7 ml/min erhöht, damit sichergestellt werden konnte, dass die ACSF-Lösung, die den Gewebsschnitt umgab, eine ausreichende Sauerstoffanreicherung aufwies.

Zum anderen war die zuverlässige Auslösung einer vollständig ausgeprägten SD in einer Submersionskammer erschwert. Im Besonderen die Auslösung einer Hypoxie induzierten SD war in vollständig ausgeprägter Form nicht allein über den Sauerstoffentzug der ACSF-Lösung möglich. Es war nötig die Auslösungsschwelle der Neurone für die Entstehung einer herkömmlichen SD herabzusetzen und die Synchronschaltung des neuronalen Phänomens auf zellulärer Ebene sicherzustellen. Hierzu wurden zum einen die ACSF-Lösung und auch die zur SD-Auslösung verwendete stickstoffbegaste ACSF-Lösung modifiziert. Die ACSF-Lösung wurde in einer leicht hypoosmolaren Form verwendet. Zusätzlich zur Hypoosmolarität wurde die K⁺-Konzentration der Versuchslösung auf 8 mM erhöht (Tabelle 1). Eine Steigerung des Kaliumgehalts im Extrazellulärbereich erhöhte die SD-Anfälligkeit der Hirnschnitte. Zur Verhinderung der Wiederanreicherung der sauerstofflosen ACSF-Lösung im Zuge der SD-Auslösung mit O₂, wurde der stickstoffbegasten ACSF-Lösung Natriumsulfit (2 mM) hinzugefügt. Des Weiteren wirkte eine leichte Temperaturerhöhung auf 35- 35,5°C unterstützend. Mithilfe dieser Methodik war eine SD auch mit submergierten Hirnschnitten zuverlässig auslösbar.

Neben der zuvor beschriebenen Hypoxie induzierten SD, sollte ebenfalls eine normoxische SD in der Submersionskammer ausgelöst werden. Der Versuch über eine reine Erhöhung der Kammertemperatur führte in der untergetauchten Lagerung nicht zu einer vollständig ausgeprägten SD. Aus diesem Grund wurde eine lokale Kaliuminjektion in das Hirngewebe als alternativer normoxischer Stimulus für die SD-Generierung gewählt (Reid et al. 1988; Somjen 2001). Um eine lokale Applikation von Kalium in den Gewebsschnitt zu

realisieren, wurde zusätzlich zu der Ableitelektrode eine weitere modifizierte Glaskapillare in den Gewebsschnitt eingebracht. Als Einstichort wurde hierfür das *Stratum radiatum* der CA1 Region des Hippokampus gewählt. Die Glaskapillare war mit einer 3 M Kalium-Lösung befüllt und es konnte mit Hilfe eines Mikroinjektors (PDES-02DX npi) 1,5 s mit 0,25 bar eine bestimmte Menge Lösung in den Gewebsschnitt abgeben werden. Im Schnitt musste für eine synchronisierte normoxische SD die Temperatur um 0,5°C erhöht werden, sodass 35,5 - 36,0°C eingestellt wurde.

3.2 Vorbereitende Maßnahmen und Auswertungsvorgehen

Aus den Versuchsreihen des kombinierten Messverfahrens konnten elektrophysiologische und fluoreszenzmikroskopische Datensätze erhoben werden, welche durch entsprechende Aufbereitung und Auswertung eine Analyse der SDs und den damit einhergehenden intrazellulären zytosolischen Redoxveränderungen der Neurone ermöglichten. Außerdem konnten mit Hilfe der optischen Aufnahmen Propagationsgeschwindigkeiten der SD assoziierten Redoxalterationen errechnet werden. Im Folgenden werden nun die Auswertungsvorgehen erläutert.

Zur Auswertung der elektrophysiologischen Messungen wurde die Software PClamp 9.2® und Microsoft Excel® verwendet. Sowohl normoxische als auch hypoxische SDs unterlagen identischen Auswertungsparametern. Lediglich die Zeitspanne Δt vom Stimulus bis zur eigentlichen eintretenden SD konnte für die normoxische SD nicht ausgewertet werden, da in diesem Fall die SD unmittelbar nach K^+ -Injektion eintrat.

Im Falle der Hypoxie induzierten SD konnte die Zeit Δt , die vom Beginn der Hypoxie bis zum Auftreten der SD verstrich, ermittelt werden. Hierzu wurde die Zeitmarkierung genutzt, die während der Messung beim Einleiten der sauerstofffreien ACSF-Lösung gesetzt wurde. Der Wert Δt gibt Auskunft über die Prädisposition des Gewebes für die SD-Entstehung durch externe Reize bzw. Hypoxie. Des Weiteren wurde die Amplitude ΔV , die die Änderung des mit der SD assoziierten DC-Potenzials angibt, quantifiziert. Der Wert ΔV wurde ausgehend von der Baseline bis zum Peak der Negativierung des DC-Potenzials gemessen. ΔV gibt den Schweregrad und die Synchronisation der SD an. Denn je mehr Neurone und Gliazellen gleichzeitig depolarisieren, desto gravierender ist die Änderung des DC-Potenzials. Außerdem wurden die Werte $t_{1/2}$ und $t_{1/4}$ ermittelt. Diese Messwerte geben den Zeitabstand zwischen Eintritt der SD und der Regenerierung des DC-Potenzials bis zur Hälfte bzw. bis zum letzten Viertel der Amplitude ΔV an und sind somit das Maß für die Dauer der DC-Potenzial Negativierung. Hierdurch konnte eine Angabe über die Regenerationsfähigkeit des Hirngewebes nach einer normoxischen oder Hypoxie induzierten SD gemacht werden (Abbildung 9).

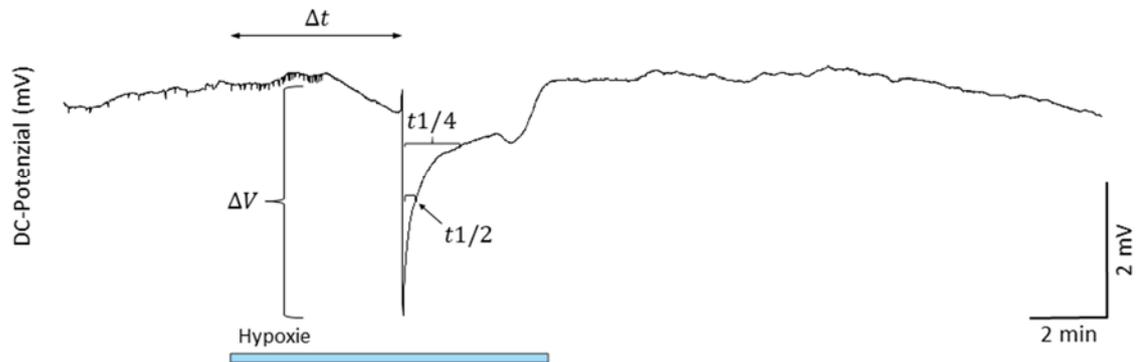


Abbildung 9: Auswertungsparameter der extrazellulären DC-Potenzial Negativierung.

Um die Charakteristika der SD assoziierten elektrophysiologischen Profile der Versuchsreihen zu vergleichen, wurden für alle HSDs die Parameter ΔV , Δt , $t_{1/2}$ und $t_{1/4}$ und für die normoxischen SDs die Parameter ΔV , $t_{1/2}$ und $t_{1/4}$ ausgewertet.

Um quantitative Messergebnisse für den Redoxsensor roGFPc zu erhalten, war es notwendig den Antwortbereich zu bestimmen, in welchem sich die roGFPc-Ratio Werte bewegen können. Die Begrenzungen dieses Bereiches stellen die Ratio Werte dar, die bei maximaler Oxidation und maximaler Reduktion der intrazellulär vorhandenen roGFPcs vorliegen.

Zur Erfassung der maximalen Oxidation des gesamten in der Zelle exprimierten roGFPcs, wurde der ACSF-Lösung das Oxidationsmittel H_2O_2 in Sättigungsdosis (5 mM, 7 min) hinzugefügt. Das entsprechende Gegenstück zur maximalen Oxidation des Sensorproteins stellte die Applikation des Reduktionsmittels DTT dar. Wurden die Gewebsschnitte einer Konzentration von 10 mM für sieben Minuten ausgesetzt, bewirkte dies eine komplette Reduktion des roGFPc Sensors (Abbildung 10).

Im Zusammenhang mit diesem Kalibrierungsvorgehen konnten drei Werte erhoben werden, die für die spätere Errechnung des relativen Oxidationswerts entscheidend waren. Hierbei handelt es sich um das Verhältnis der absoluten Fluoreszenzintensität bei Anregung mit 470 nm für Oxidation und Reduktion ($F_{470_{ox}}/F_{470_{red}}$), den durch DTT erzeugten Minimalwert des Fluoreszenzratios R_{red} und den H_2O_2 induzierten Maximalwert R_{ox} .

Für das *Stratum pyramidale* der CA1 Region des Hippocampus lag das Fluoreszenzintensitätsverhältnis ($F_{470_{ox}}/F_{470_{red}}$) mittelwertig bei $0,33 \pm 0,03$ ($n=6$). In der gleichen Region der Gewebsschnitte betrug der Minimalwert des Fluoreszenzratios R_{red} $0,97 \pm 0,01$ ($n=5$). Der Maximalwert R_{ox} für das Ratio der Fluoreszenzintensität ergab $4 \pm 0,4$ ($n=6$).

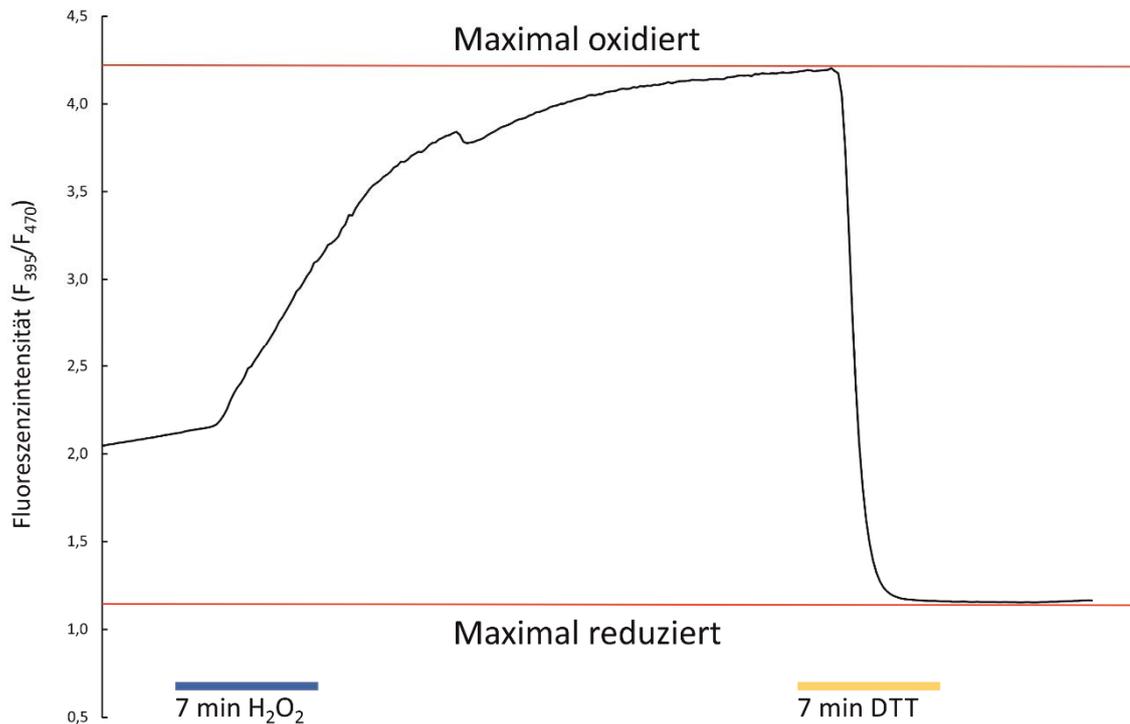


Abbildung 10: Kalibrierungsrahmen der roGFPc Fluoreszenzintensität.

Zur Erfassung der maximal möglichen Oxidation und Reduktion der zellulär exprimierten roGFPc-Sensoren, wurde als Oxidationsmittel H_2O_2 (5 mM, 7 min) und als Reduktionsmittel DTT (10 mM, 7 min) eingesetzt. Die Kalibrierung des roGFPc war die Grundlage für die spätere Quantifizierung des roGFPc Redoxpotenzials.

Zusätzlich zu der Kalibrierung des roGFPc-Sensors wurde eine mögliche Schädigung des Redoxsensors durch eine Dauerbeleuchtung der Gewebspräparate mit alternierendem Licht der Wellenlängen 395 nm und 470 nm ausgeschlossen. Eine entsprechende Expositionierung der Sensorproteine mit Licht entsprechender Wellenlängen hatte keinen signifikanten Einfluss auf das optische Signal zur Folge (Abbildung 11). Auf Grundlage dessen ist eine Schädigung des roGFPc durch die, in den Versuchsreihen angewendeten Belichtungszeiten, auszuschließen. Des Weiteren wurde eine optische Messung mit Hirngewebsschnitten einer nicht transgenen Maus durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass sich die Ratio-Werte nicht im Kalibrierungsrahmen des roGFPc-Sensors befinden und die erhobenen Daten kein charakteristisches Profil der SD assoziierten Redoxveränderungen generieren (Abbildung 12). Dies wiederum validiert die Indikatorfunktion des roGFPc.

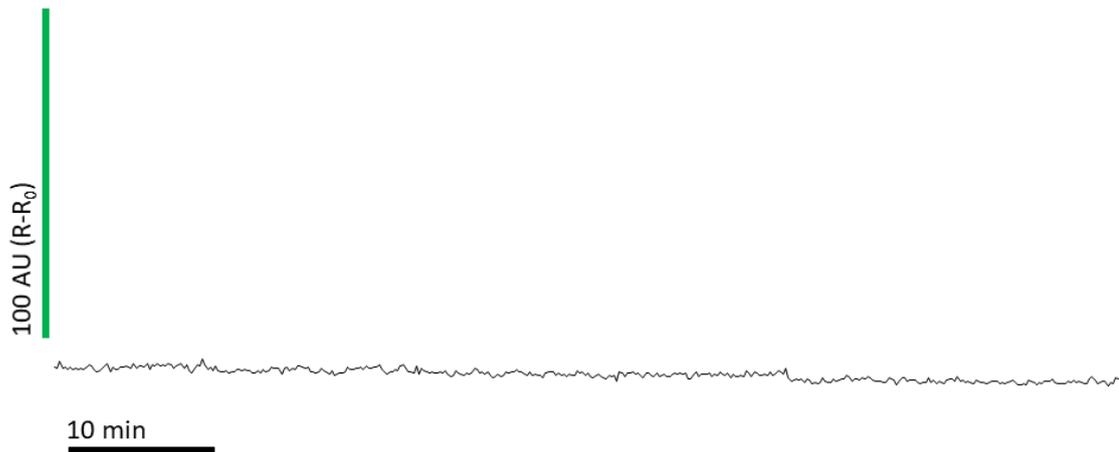


Abbildung 11: Reine ratiometrische Anregung des roGFPc.

Der roGFPc-Redoxsensor wurde über ca. 60 min alternierend mit Licht der Wellenlängen 395 nm und 470 nm beleuchtet, um auszuschließen, dass die in den Versuchsreihen verwendeten Belichtungszeiten einen Einfluss auf das Fluoreszenzverhalten des roGFPc haben. Es zeigten sich keine signifikanten Veränderungen der gemessenen Fluoreszenzintensitäten allein durch eine Exposition des Redoxindikators mit Licht dieser Wellenlängen.

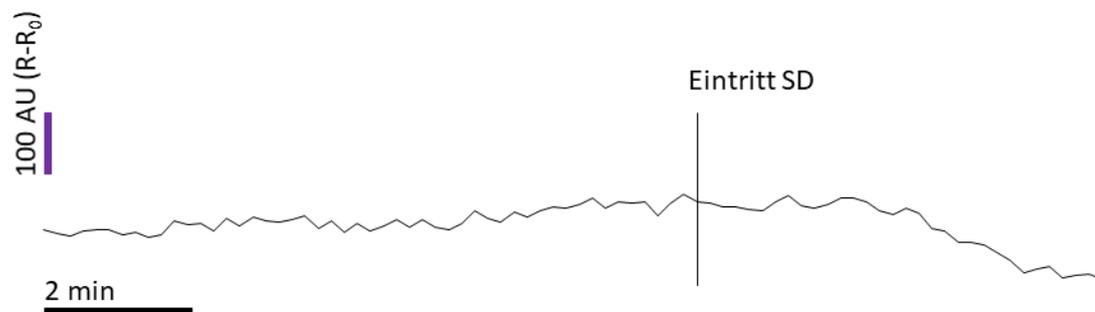


Abbildung 12: Fluoreszenzmikroskopische Messung mit Hirngewebe einer nicht transgenen Maus.

Wurden für die fluoreszenzmikroskopischen Messungen Hirngewebsschnitte einer nicht transgenen Maus verwendet, so kam es zu keinem charakteristischen Anstieg der Fluoreszenz Ratio-Werte während der SD.

Im Rahmen der Auswertung aufgezeichneter fluoreszenzmikroskopischer Signale, konnten mittels der Bilderfassungssoftware Till Vision® (Till Photonics, Gräfelfing, Deutschland) die von der CCD-Kamera aufgenommenen optischen Signale in die Fluoreszenzintensität

(F_{395}/F_{470}) umgerechnet werden und sowohl graphisch als auch numerisch dargestellt werden. Die darauf aufbauende quantitative und statistische Auswertung der erhobenen Daten erfolgte mit Hilfe von Microsoft Excel®.

Zuerst wurden die numerischen Rohdaten von Till Vision® in Microsoft Excel® überführt und für jede Messgruppe jeweils einmal nach Beginn der pharmakologischen Intervention und nach Eintreten der SD zeitlich ausgerichtet. Dies war nötig, um die Profile der Fluoreszenzintensitäten (F_{395}/F_{470}) exakt miteinander vergleichen zu können. Danach wurden diese formierten Daten normalisiert. Um nun aus den normalisierten und ausgerichteten Daten semiquantitative Aussagen über den Oxidationszustand des Zytosols der Neurone während einer Messung treffen zu können, sollte der relative Oxidationswert bzw. das Ausmaß der Oxidation (OxD_{roGFP1}) des Redoxindikators quantifiziert werden. Mit den zuvor bestimmten Kalibrierungswerten für die maximale Oxidation und Reduktion des roGFPc-Sensors und dem Verhältnis der absoluten Fluoreszenzintensität bei Anregung mit 470 nm Wellenlänge unter oxidierten und reduzierten Bedingungen ($F_{470_{ox}}/F_{470_{red}}$), konnte der relative Grad der Oxidation des roGFPc errechnet werden.

$$OxD_{roGFP1} = \frac{R - R_{red}}{\frac{F_{470_{ox}}}{F_{470_{red}}} (R_{ox} - R) + (R - R_{red})}$$

Dies war notwendig, denn für den roGFPc-Indikator kann von keinem linearen Verhältnis von Fluoreszenzratio zum Grad der Oxidation ausgegangen werden (Wagener et al. 2016). Nachdem für alle Messungen das Ausmaß der Oxidation (OxD_{roGFP1}) ermittelt wurde, ließ dies semiquantitative Auskünfte über den Oxidationsstatus der Neurone zu einem spezifischen Zeitpunkt zu.

Im Folgenden wurde durch die Nutzung der Nernst-Gleichung das absolute Redoxpotenzial errechnet und somit wurden valide Aussagen über den Redoxstatus realisierbar. Unter Einbeziehung der universellen Gaskonstante R : 8,3 J/mol/K, der Temperatur T in Kelvin (K) und der Faraday'sche Konstante, konnte so das Redoxpotenzial des roGFPm-Redoxpaares (E_{roGFP1}) aus dem Standardredoxpotenzial $E_{roGFP1}^0 = -291$ mV (Dooley et al. 2004) und dem aktuell vorherrschenden relativen roGFP1 Oxidationslevel quantifiziert werden.

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

Mit Hilfe dieser Vorgehensweise konnte das tatsächliche roGFPc Redoxpotenzial in mV zu jedem Zeitpunkt der Messung für die roGFPc exprimierenden Neurone des *Stratum*

pyramidale der CA1 Region des Hippocampus gemittelt für die jeweilige *area of interest* detektiert werden.

Grundlage für die Analyse der Ausbreitungsgeschwindigkeit SD assoziierter Redoxveränderungen bildete die Aufnahme­frequenz der Software Till Vision®. Alle zehn Sekunden wurden fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen des Gewebsschnittes gemacht. Diese Rohbilddaten konnten für die jeweilige Messung zusammengefasst und exportiert werden. Unter Verwendung der Automatisierungs- und Bildanalyse­software MetaMorph® konnten diese einzelnen Bildaufnahmen zu Filmsequenzen zusammengefügt werden. Auf der Grundlage dieser Filme, ließen sich im Folgenden die Ausbreitungsgeschwindigkeiten der Redoxalterationen, die mit einer SD assoziiert waren, in definierten Gewebsarealen auswerten. Hierzu wurden erst einmal unter Einbezug der Bildgröße und des Bins die Pixelgrößen des Bildmaterials errechnet. Für die Bildgebung der optischen Signale ergab sich eine Pixelgröße von 1,29 µm. Dann wurden eine Start- und eine End­koordinate für die Wellenfrontpropagation der SD korrelierten optischen Aufnahmen festgelegt. Mit diesen Koordinatenpunkten und der zuvor errechneten Pixelgröße, konnte so unter Gebrauch der Vektorrechnung der zurückgelegte Weg der Wellenfront für einen Zeitraum t ermittelt werden. Zur weiteren Verarbeitung der gewonnenen Daten wurde Microsoft Excel® genutzt.

3.3 Zeitliche Korrelation der elektrophysiologischen und der fluoreszenzmikroskopischen Messungen/ Profil des Fluoreszenzsignals während einer SD

Um eine Verbindung zwischen der Produktion von freien Radikalen und dem Phänomen der SD herstellen zu können, sollte die zuvor etablierte Messmethodik eine mögliche zeitliche Korrelation zwischen Veränderungen des Redoxstatus der Neurone und der massiven Depolarisation derselben überprüfen. Da die Aufnahme der fluoreszenzmikroskopischen Signale des roGFPcs und die extrazelluläre Feldpotenzialableitung zeitgleich abliefen, war es möglich einen zeitlichen Zusammenhang zwischen dem Auftreten der SD und vermehrtem oxidativen Stress innerhalb der Neurone der jeweiligen AOIs herzustellen.

Sowohl für die normoxische SD als auch für die hypoxisch und FCCP getriggerten SDs zeigten sich unmittelbar nach dem Auftreten der SD ein Anstieg der Fluoreszenzantwort im Sinne einer Oxidation des roGFPc-Sensors. Allerdings lassen sich charakteristische Unterschiede innerhalb der Profile der Fluoreszenzsignale für die jeweiligen SD-Erzeugungsvorgehensweisen feststellen.

Die normoxische SD zeigte einen drastischen Anstieg der roGFPC-Ratio-Werte ohne eine vorangehende Änderung der zuvor eingependelten *Baseline*. Außerdem ist diese Oxidation des roGFPC-Ratios reversibel und nähert sich wieder der ursprünglichen *Baseline* an. Die Erholung des optischen Signals findet im selben Zeitrahmen wie die Erholung der DC-Potenzials Ableitung statt (Abbildung 13).

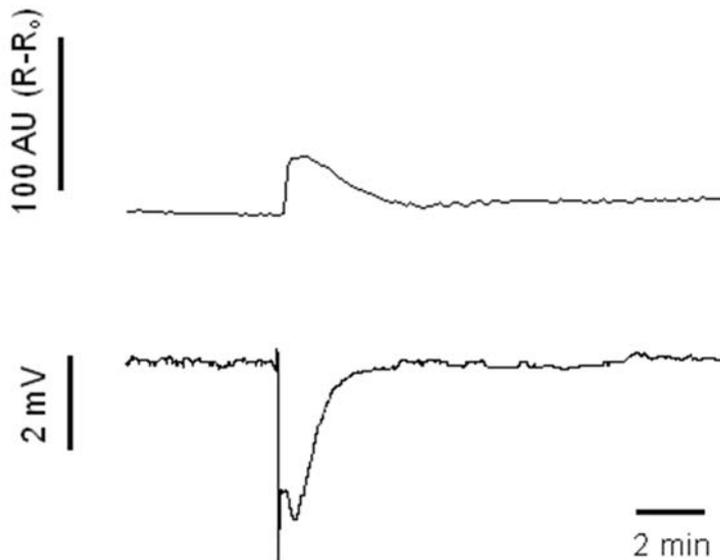


Abbildung 13: Korrelation der roGFPC-Ratio-Werte mit der DC-Potenzialänderung während einer normoxischen SD.

Kalium induzierte SDs zeigten eine unmittelbar auf die DC-Potenzialänderung der SD folgende Änderung des optischen Signals, die die Oxidation des roGFPCs anzeigt. Diese Änderung der Fluoreszenzantwort war für normoxische SDs, ähnlich wie das elektrophysiologische Signal, reversibel.

Im Gegensatz zu der normoxischen SD, weist das Fluoreszenzsignalprofil der hypoxischen SD eine leichte oxidative Verschiebung des optischen Signals kurz vor der eigentlichen SD auf. Darauf folgt der mit der SD assoziierte schlagartige Anstieg des roGFPC-Ratio-Wertes. Diese Veränderung der fluoreszenzmikroskopischen Messwerte ist im Falle der HSD nicht reversibel und driftet nach einem kurzen Erholungsplateau immer weiter in oxidierte Bereiche ab (Abbildung 14). Dies suggeriert eine erhebliche Einschränkung der Vitalität des Gewebes nach HSD Induktion unter den gewählten Versuchsbedingungen des submergierten Hirnschnittes.

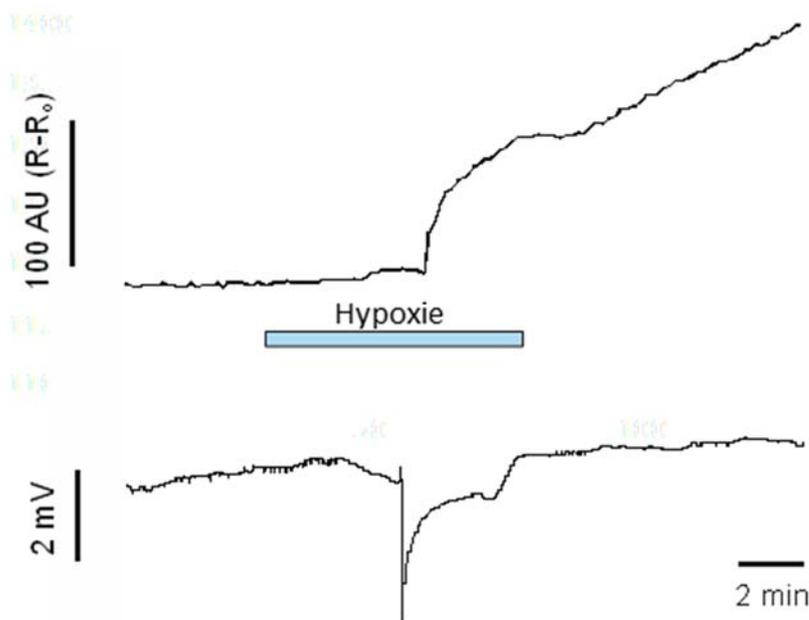


Abbildung 14: Korrelation der roGFPc-Ratio-Werte mit der DC-Potenzialänderung während einer HSD.

Hypoxische SDs wiesen eine initiale leichte oxidative Verschiebung des optischen Signals auf. Darauf folgte ein schlagartiger SD assoziierter Anstieg der Fluoreszenz Ratio-Werte, welcher nicht reversibel war und weiter in oxidierte Bereiche abdriftete.

Für das fluoreszenzmikroskopische Profil der FCCP induzierten SD lässt sich eine Parallele zur hypoxischen SD herstellen. In beiden Fällen sind die Redoxalterationen, dargestellt als Änderung des roGFPc-Ratio-Wertes, nicht reversibel. Auch bei der FCCP induzierten SD driftet das optische Signal nach seinem initialen drastischen Anstieg ab und kann die ursprünglichen Baseline-Werte nicht wieder erreichen. Allerdings lässt sich keine vorangehende leichte Positivierung des Fluoreszenzsignals unmittelbar vor der SD feststellen. Ganz im Gegenteil kommt es mit Beginn der FCCP Einwaschung in die ACSF-Lösung zu einer leichten Negativierung des gemessenen roGFPc-Ratio-Wertes was einer zunehmenden Reduktion des roGFPcs entspricht. Mit dem Eintreten der SD, folgt auch in diesem Fall der charakteristische mit einer SD assoziierte oxidative Anstieg des optischen Signals (Abbildung 15).

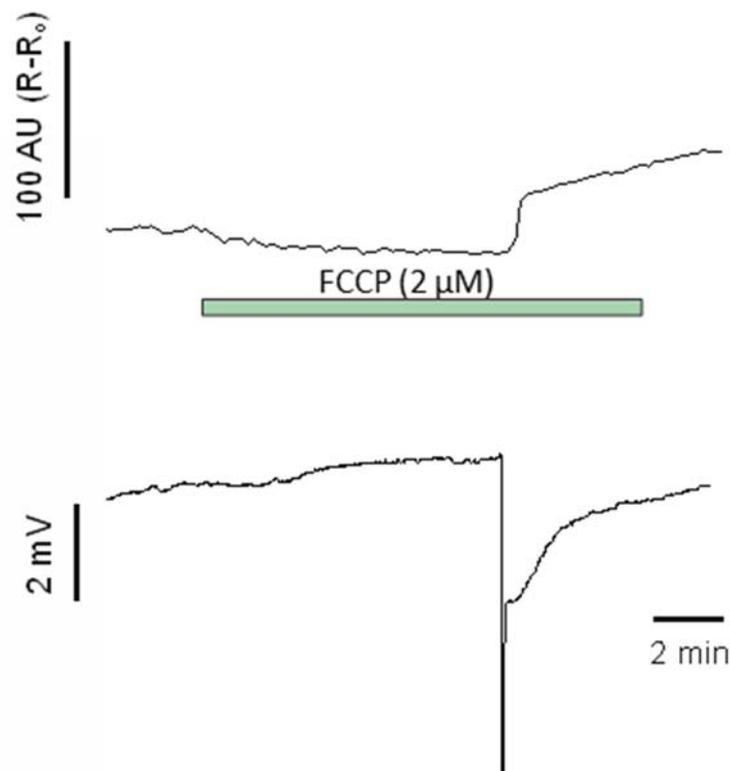


Abbildung 15: Korrelation der roGFPc-Ratio-Werte mit der DC-Potenzialänderung während einer FCCP induzierten SD.

Im Zusammenhang mit FCCP induzierten SDs ließ sich eine leichte Negativierung der roGFPc-Ratio-Werte unmittelbar nach dem Einwaschen des FCCPs feststellen. Auch in diesem Fall folgte auf das Eintreten der SD der charakteristische schlagartige Anstieg der Fluoreszenz Ratio-Werte, der wiederum irreversibel war.

3.4 Analyse der elektrophysiologischen SD-Parameter und der induzierten Redoxveränderungen

Nachdem ein eindeutiger Zusammenhang und eine zeitliche Korrelation zwischen dem elektrophysiologischen Signal der SD und den Änderungen des roGFPc-Indikator vermittelten optischen Signals identifiziert werden konnten, sollten in einem nächsten Schritt Zellanteile bzw. Zellkompartimente detektiert werden, die eine ausschlaggebende Rolle für die Entstehung von Redoximbalancen spielen. Da die redoxsensitiven Sensorproteine als Reaktion auf die SD vornehmlich Licht der Wellenlänge 395 nm absorbierten, deutete dies darauf hin, dass die intrazelluläre Redoxhomöostase der Neurone durch oxidierende Vorgänge gestört wurde. Auf dieser Grundlage konnten im Folgenden

bekannte Produzenten von freien Radikalen, die einen derartigen oxidativen Stress erwirken können, auf ihre Mitwirkung an der Verschiebung des Redoxgleichgewichtes überprüft werden. Hierzu wurden die Pharmaka FCCP, Allopurinol und DPI genutzt. Die Zugabe dieser Stoffe in die ACSF-Lösung entkoppelte die Mitochondrien und hemmte die Funktion der Xanthinoxidase und NADPH Oxidase. Des Weiteren wurde eine Messreihe in calciumfreier ACSF-Lösung und eine mit Antioxidantien gefütterten Mäusen durchgeführt. So wurden fünf Versuchsreihen für normoxisch und vier Versuchsreihen für hypoxisch induzierte SDs umgesetzt. Zusätzlich hierzu wurde eine Versuchsgruppe mit rein FCCP induzierten SDs durchgeführt. Mithilfe des zuvor beschriebenen Auswertungsverfahrens konnten daraufhin die maximalen Veränderungen der Redoxpotenziale der roGFpc exprimierenden Neurone auf Gewebsebene ermittelt werden. Außerdem wurden die SD charakterisierenden elektrophysiologischen Parameter für die Versuchsgruppen der normoxischen und hypoxischen SDs verglichen.

Bevor in diesem Abschnitt die genauen Unterschiede der DC-Potenzial-Profile und der Redoxpotenzialänderungen der einzelnen Messgruppen beleuchtet werden, sollen einmal die Kontrollgruppen in reiner ACSF-Lösung für hypoxisch und normoxisch generierte SDs gegenübergestellt werden.

Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen in reiner ACSF-Lösung zeigten, dass hypoxische SDs im Durchschnitt mit einer Redoxveränderung in Richtung Oxidation von $8,6 \pm 2,7$ mV ($n=14$) assoziiert sind. Im Vergleich dazu betrug die maximale oxidative Änderung des neuronalen Redoxpotenzials für normoxisch stimulierte SDs im Durchschnitt lediglich $5,0 \pm 2,3$ ($n=6$) mV. Die durchschnittliche Amplitude ΔV der Änderung des elektrophysiologischen DC-Signals während einer SD betrug $3,8 \pm 1,8$ mV für die Hypoxie induzierten SDs und war somit signifikant kleiner als für die durch Kaliuminjektion getriggerten SDs mit einer DC-Potenzial Amplitude ΔV von $5,1 \pm 2,1$ mV (Abbildung 16). Außerdem war die Dauer der DC-Potenzial Negativierung $t_{1/2}$ mit $80,4 \pm 68,7$ s für die normoxischen SDs ca. viermal so lang wie für die hypoxischen SDs. Ebenfalls war die Zeitspanne $t_{1/4}$ mit $189,3 \pm 215,3$ s für die normoxischen im Vergleich zu den hypoxischen SDs deutlich verlängert.

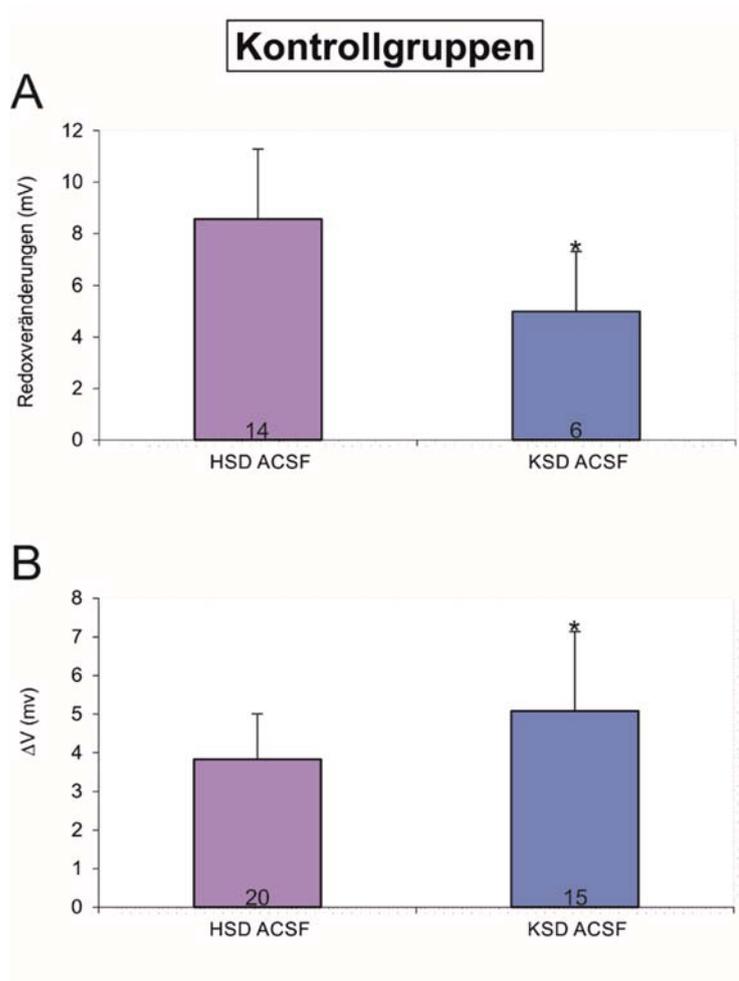


Abbildung 16: Vergleich der Redoxveränderungen und der Amplitude ΔV der Kontrollgruppen normoxisch und hypoxisch induzierter SDs.

(A) Die Redoxveränderungen der Kontrollgruppen assoziiert mit Hypoxie induzierten SDs waren signifikant stärker als die Redoxveränderungen der unter normoxischen Bedingungen durch K^+ -Injektion erzeugten SDs. (B) Allerdings war die Amplitude ΔV der Kontrollgruppen K^+ induzierter SDs signifikant größer als die der Kontrollgruppe hypoxischer SDs.

Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der Messreihe Hypoxie induzierter SDs ließen die Identifikation einiger wichtiger Faktoren für die Entstehung von Redoxveränderungen innerhalb der Neurone zu. Der Entzug von Calcium aus dem interstitiellen Raum führte zu einer signifikant geringeren Veränderung des Redoxpotenzials, während einer SD. Die Schwankung des Redoxpotenzials betrug nur ca. ein Viertel derer der Kontrollgruppe. Des Weiteren wies die FCCP ($2 \mu\text{M}$) induzierte SD eine eindeutige Inhibition der durchschnittlichen Redoxalterationen auf. Das Redoxpotenzial der Indikatorprotein exprimierenden Neurone stieg nur um ca. die Hälfte verglichen mit dem der Kontrollgruppe an. Ferner ließ sich ebenfalls für die Blockierung der Xanthinoxidase über Allopurinol ($200 \mu\text{M}$) ein geringeres Ausmaß an Redoxveränderungen im Zusammenhang mit dem Auftreten der SD aufzeichnen. Sowohl der Einfluss von Antioxidantien Futter als auch die Blockade der NADPH Oxidase durch

DPI (20 μM) zeigten keine signifikant geringere Veränderung des Redoxpotenzials. Allerdings lässt sich auch für diese Messgruppen ein klarer Trend für eine geringere oxidative Veränderung des Redoxstatus der Neurone im Zuge einer SD aussprechen (Abbildung 17A).

Im Kontext der extrazellulären Feldpotentialableitungen hypoxisch erzeugter SDs konnten einzelne Modifikationen der Messgruppen die Amplitude ΔV maßgeblich beeinflussen. Die Versuchsgruppe mit Calcium freier ACSF-Lösung zeigte eine deutlich geringere Veränderung der SD assoziierten Änderung des DC-Potenzials. Im Gegensatz dazu führte die Blockade der Xanthinoxidase Funktion über Allopurinol zu einer Vergrößerung der Amplitude ΔV im Zuge der SD. Sowohl die Entkopplung der Mitochondrien, die Blockade der NADPH Oxidase als auch die Fütterung der Versuchstiere mit Antioxidantien, beeinflussten die Veränderung der gemessenen elektrophysiologischen Signale während einer SD nicht signifikant (Abbildung 17B). Zusätzlich zu den Alterationen der im Zuge der SD entstehenden Amplituden ΔV , verlängerten sich die Zeitintervalle $t_{1/2}$ und $t_{1/4}$ für die Versuchsgruppe in Calcium freier ACSF-Lösung deutlich. Neben dieser Messgruppe, führte auch die Modifikation der ACSF-Lösung mit DPI zu einer Beeinflussung der Zeitspanne $t_{1/4}$. Allerdings verkürzte sich der Wert $t_{1/4}$ in diesem Fall. Lediglich im Zusammenhang mit der mitochondrialen Entkopplung durch FCCP und der dadurch induzierten SD variierte die Zeit Δt vom Beginn des Sauerstoffzuges bis zum Eintritt der SD signifikant. Im Falle dieser Messreihe dauerte es im Durchschnitt mehr als doppelt so lang bis die SD eintrat (Tabelle 2).

Tabelle 2: Messparameter der DC-Potenzialableitungen Hypoxie induzierter SDs.

Hypoxische SD	ΔV (mV)	Δt (s)	$t_{1/4}$ (s)	$t_{1/2}$ (s)
ACSF (n=20)	$3,8 \pm 1,2$	$212,2 \pm 41,8$	$19,4 \pm 15,4$	$81,8 \pm 59,2$
CaCl-frei (n=6)	$2,7 \pm 1,2$	$227,1 \pm 42,2$	$114,8 \pm 60$	$181,7 \pm 58,1$
FCCP (2 μM) (n=8)	$4,7 \pm 1$	$456,5 \pm 167,7$	$27,7 \pm 31,1$	$116,4 \pm 170,1$
DPI (20 μM) (n=6)	$3,2 \pm 1$	$231,6 \pm 31,5$	$8 \pm 0,8$	$27,6 \pm 18,1$
Allopurinol (200 μM) (n=8)	$5,8 \pm 1,9$	$240,3 \pm 34$	$11,9 \pm 8,8$	$113,1 \pm 100,5$
Antioxidantienfutter (n=10)	$4,5 \pm 1,7$	$196,2 \pm 63,9$	$33,2 \pm 35,6$	$126,6 \pm 80$

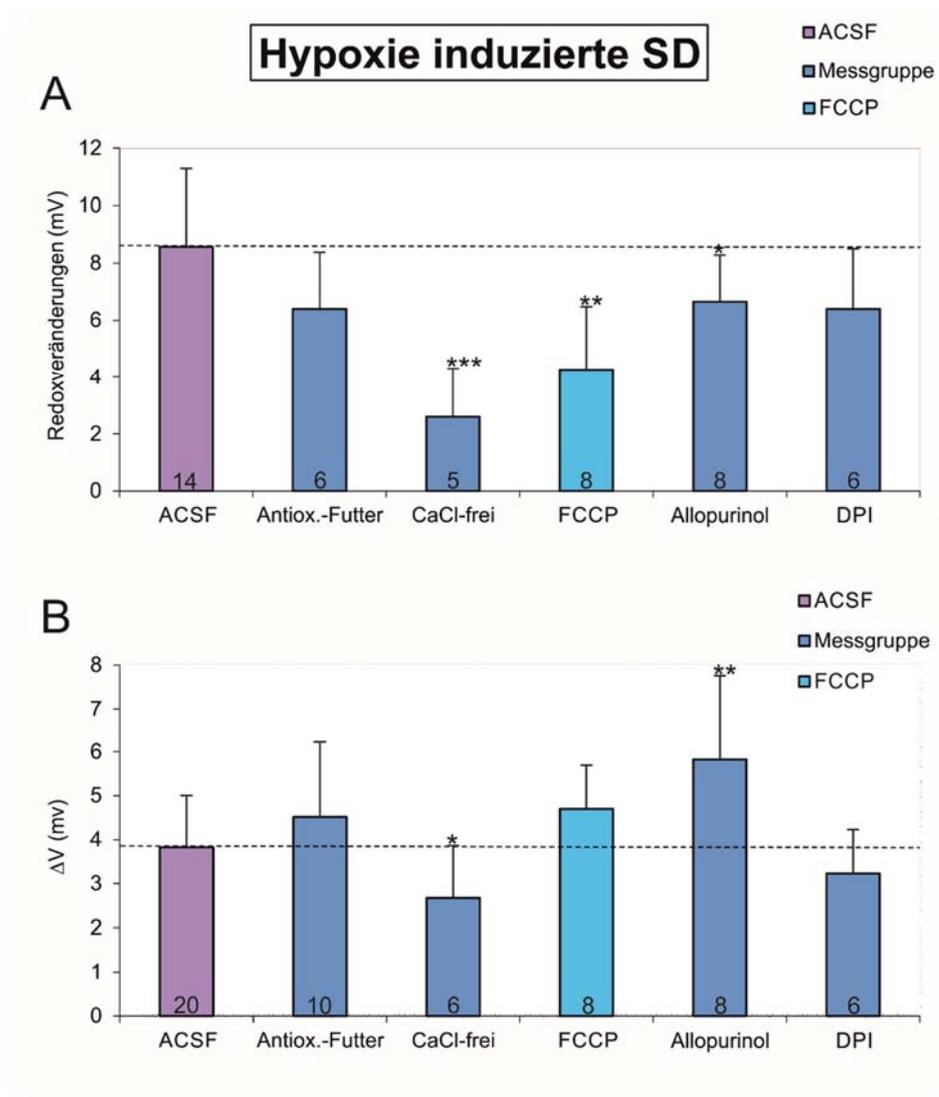


Abbildung 17: Darstellung der Redoxveränderungen und der Amplitude ΔV der Versuchsreihen hypoxischer SDs.

(A) Die durchschnittlichen Redoxpotenzialänderungen Hypoxie induzierter SDs waren für Versuchsgruppen in CaCl freier Lösung und mit Allopurinol (200 μM) gegenüber den Messungen in ACSF signifikant verringert. Ebenfalls wies die Versuchsgruppe der FCCP (2 μM) induzierten SDs signifikant geringere Alterationen des Redoxpotenzials auf. (B) Die Amplitude ΔV der hypoxischen SDs war im Zusammenhang mit extrazellulärem Ca^{2+} Entzug signifikant kleiner als in ACSF (siehe gestrichelte Linie). Des Weiteren zeigte der Einsatz von Allopurinol (200 μM) durchschnittlich signifikant größere Amplituden ΔV .

Im Zuge der Fluoreszenzaufnahmen Kalium induzierter SDs zeigten sich für die verschiedenen Versuchsgruppen ebenfalls Unterschiede im Ausmaß der entstehenden oxidativen Redoxalterationen, die in Kombination mit einer SD auftraten. Die Auslösung einer SD in Calcium freier ACSF-Lösung verglichen mit der in klassischer ACSF-Lösung, hatte lediglich einen Anstieg des Redoxpotenzials von einem Drittel zur Folge. Ebenfalls konnte nach der Entkopplung der Mitochondrien mittels FCCP (0,5 μM) eine trendmäßige Reduzierung der oxidativen Redoxveränderung ausgemacht werden. Die Versuchsreihen

mit Antioxidantien gefütterten Mäusen oder Beeinflussung durch Allopurinol oder DPI zeigten keine signifikanten Verringerungen des Redoxpotenzial Anstiegs. Aber auch hier lässt sich aufgrund der Ergebnislage von einem tendenziellen Einfluss der Xanthin- und NADPH Oxidase auf die Redoxhomöostase der Neurone während einer SD ausgehen (Abbildung 18A).

Auch die elektrophysiologischen Messungen zeigten Unterschiede der SD-Profile für bestimmte Messgruppen der Kalium induzierten SDs. Der Entzug von Calcium aus dem Interstitium hatte eine signifikant kleinere Amplitude ΔV zur Folge. Auch die Versuchsgruppe mit Antioxidantien gefütterten Mäusen zeigten trendmäßig kleinere Amplituden ΔV in der elektrophysiologischen Manifestierung der SD. Die Messungen mit FCCP wiesen die gravierendsten Unterschiede in der Amplitude der ΔV auf. Hier waren die SD assoziierten Negativierungen des DC-Potenzials im Vergleich mit der Kontrollgruppe ebenfalls signifikant kleiner. Nach Blockade der Xanthinoxidase und NADPH Oxidase durch die Einwaschung von Allopurinol oder DPI ließen sich keine signifikanten Veränderungen des DC-Potenzials feststellen (Abbildung 18B, Tabelle 3).

Tabelle 3: Messparameter der DC-Potenzialableitungen normoxischer SDs.

K⁺ induzierte SD	ΔV (mV)	$t_{1/4}$ (s)	$t_{1/2}$ (s)
ACSF (n=15)	5,1 ± 2,1	80,4 ± 68,7	189,3 ± 215,3
CaCl-frei (n=5)	3,2 ± 1,7	83,8 ± 53,6	123,9 ± 83
FCCP (0,5 μM) (n=5)	1,4 ± 0,2	108,6 ± 41,7	162,3 ± 71
DPI (20 μM) (n=4)	6,1 ± 2,2	78,4 ± 61,1	326,9 ± 187,3
Allopurinol (200 μM) (n=9)	5,3 ± 3	101,1 ± 148,7	171,4 ± 157,7
Antioxidantienfutter (n=7)	3,2 ± 2	57,8 ± 43,9	98,3 ± 54,2

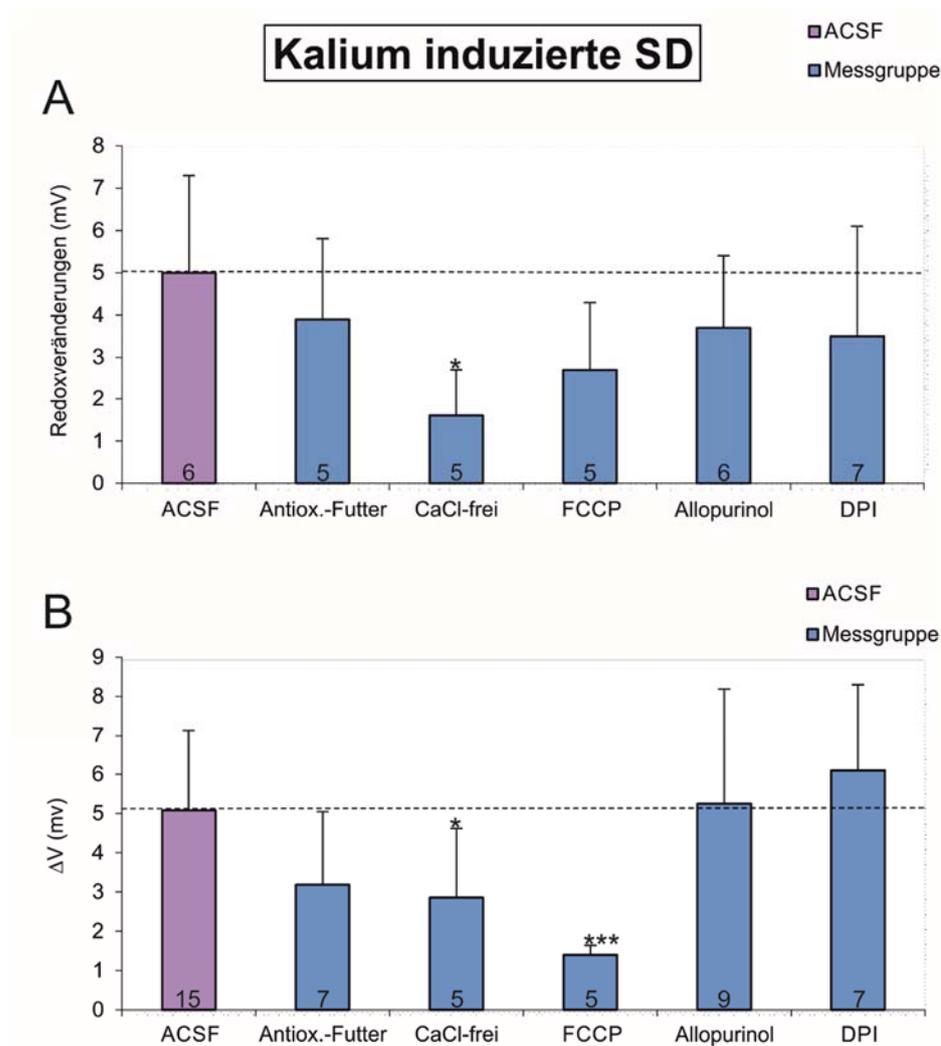


Abbildung 18: Darstellung der Redoxveränderungen und der Amplitude ΔV der Versuchsreihen normoxischer SDs.

(A) Für die Kalium induzierten SDs zeigte lediglich die Versuchsgruppe in CaCl freier Lösung signifikant geringere Veränderungen des Redoxpotenzials. (B) Sowohl ein Ca^{2+} Entzug als auch eine pharmakologische Intervention mit FCCP ($2 \mu\text{M}$) führten zu signifikant verringerten Amplituden ΔV während einer normoxischen SD.

Zusammenfassend lässt sich schlussfolgern, dass der Calciumeinstrom aus dem Extrazellulärraum in die Neurone, während einer hypoxischen und normoxischen SD, einen Schlüsselfaktor für die Veränderung der intrazellulären Redoxverhältnisse darstellt. Basierend auf der pharmakologischen Modifikation der ACSF-Lösung, lassen sich sowohl mitochondriale als auch extramitochondriale Faktoren identifizieren, die an der oxidativen Änderung des Redoxpotenzials im Kontext der SD beteiligt sind.

3.5 Optische Charakteristika der Ausbreitung des fluoreszenzmikroskopischen Signals

Die wellenartige Ausbreitung der elektrophysiologischen Signale einer SD ließ sich auch im Zuge der fluoreszenzmikroskopischen Messungen intrazellulärer Redoxveränderungen beobachten. Sowohl im *Stratum oriens*, *pyramidale*, als auch im *Stratum radiatum* des Hippokampus zeigte sich eine charakteristische optische Wellenfront, die durch die oxidative Verschiebung der Redoxhomöostase entstand und sich über das gesamte vitale Hirngewebe dieser Areale ausbreitete (Abbildung 19).

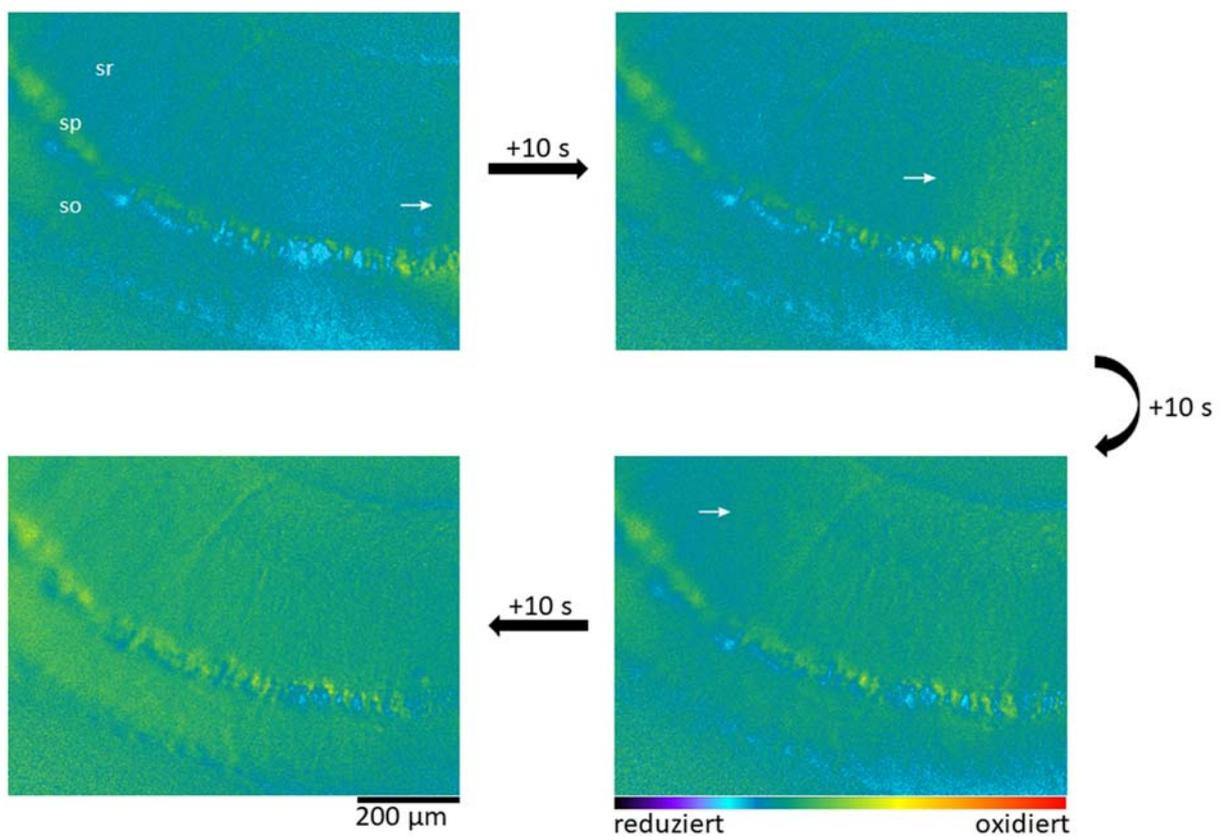


Abbildung 19: Ausbreitung der Wellenfront intrazellulärer Redoxveränderungen assoziiert mit einer SD.

Mit Hilfe der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen ließ sich, während einer SD, eine charakteristische wellenartige Ausbreitung der intrazellulären oxidativen Redoxalterationen im *Stratum oriens* (*so*), *pyramidale* (*sp*) und auch im *Stratum radiatum* (*sr*) des Hippokampus feststellen.

Für alle Versuchsgruppen konnte eine komplette Ausbreitung der oxidativen Fluoreszenzänderung im Zuge einer SD erfasst werden (Abbildung 20).

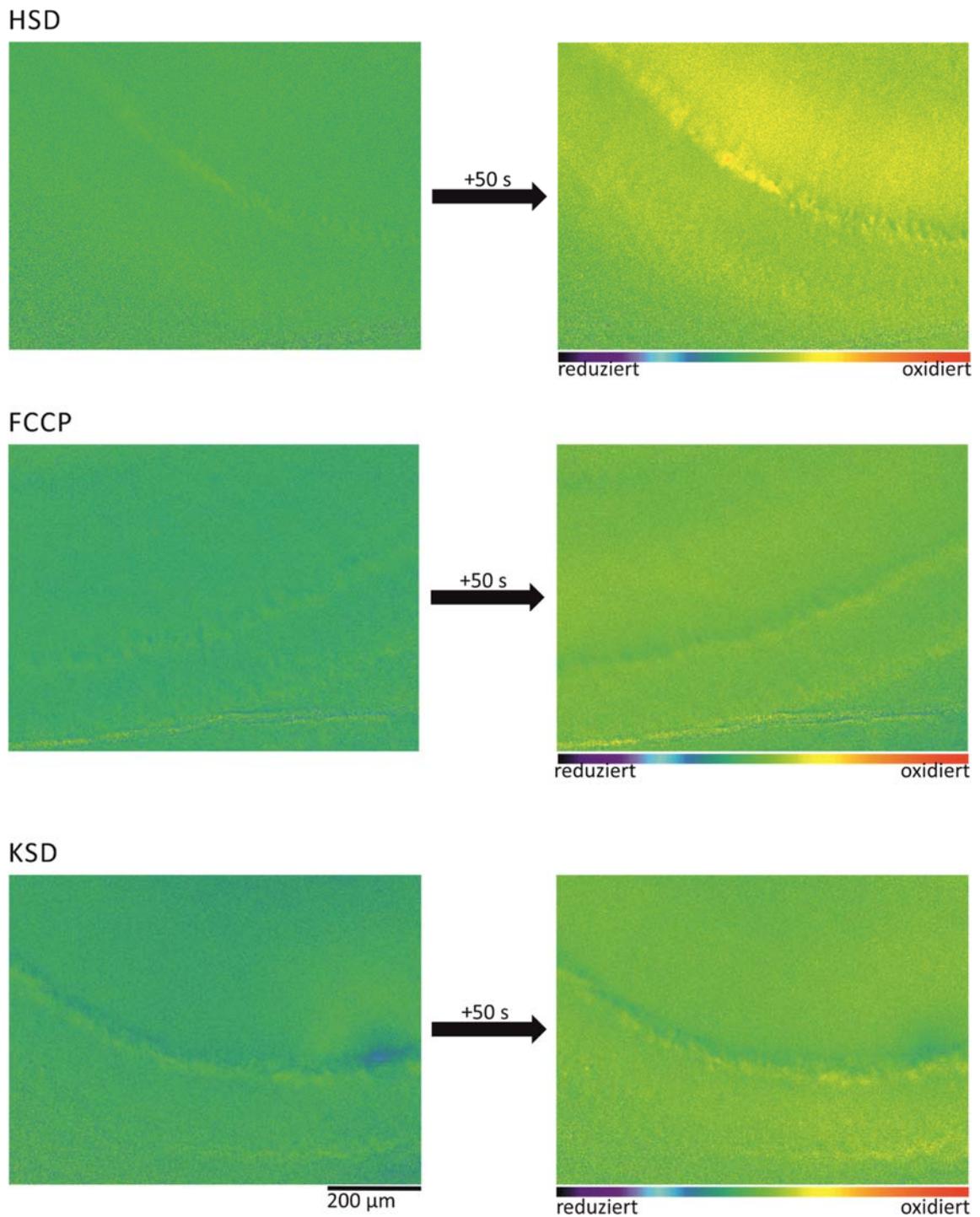


Abbildung 20: Ausbreitung SD assoziierter Redoxveränderung für Hypoxie, FCCP und Kalium induzierte SDs.

Alle Arten der SD-Auslösung zeigten innerhalb von 50 s eine komplette Ausbreitung der veränderten Fluoreszenz über alle sichtbaren Hirnschnittareale.

3.6 Ausbreitungsgeschwindigkeit der SD korrelierten Redoxveränderungen

Erweiternd zu den durchschnittlichen Änderungen des Redoxpotenzials der Neurone während einer SD, wurden die durchschnittlichen Ausbreitungsgeschwindigkeiten der Redoxveränderungen innerhalb der CA1 Region des Hippocampus quantifiziert. Identisch zu den zuvor erhobenen Messparametern wurden auch im Zuge dieser Auswertung normoxische, hypoxische und FCCP induzierte SDs berücksichtigt. Außerdem wurden auch hier die modifizierten Messgruppen mit den Kontrollgruppen in reiner ACSF-Lösung verglichen, um mögliche Verursacher einer erhöhten Ausbreitungsgeschwindigkeit der entstehenden oxidativen Redoxveränderungen zu detektieren.

Für die Messreihe der HSDs wiesen die Gruppen mit Allopurinol und mit Calcium freier ACSF-Lösung signifikant veränderte Ausbreitungsgeschwindigkeiten der Redoxveränderungen auf. Ebenfalls waren die Ausbreitungsgeschwindigkeiten der Redoxveränderungen für FCCP induzierte SDs signifikant beeinflusst. Wurde die Xanthinoxidase blockiert, so erhöhte sich die durchschnittliche Ausbreitungsgeschwindigkeit der Wellenfront um 0,18 mm/min. Im Falle der Entkopplung der Mitochondrien verlangsamte sich die Propagation der Redoxalterationen innerhalb der CA1 Region des Hippokampus deutlich. Hier wurde lediglich eine Propagationsgeschwindigkeit von $2,0 \pm 0,3$ mm/min gemessen. Ebenfalls zeigte der Entzug von Calcium aus dem Extrazellulärbereich eine Verlangsamung der Ausbreitungsgeschwindigkeit der Redoxveränderungen. Die Ausbreitungsgeschwindigkeit der optischen Signal Änderung betrug $1,7 \pm 0,3$ mm/min. Für die Messreihe der mit Antioxidantien gefütterten Mäuse, wurde lediglich eine leichte trendmäßige Erhöhung der Ausbreitungsgeschwindigkeit der fluoreszenzmikroskopisch aufgenommenen Wellenfront ermittelt. Nach Inhibition der NADPH Oxidase wurde keine signifikante Veränderung der Wellenfrontpropagation ersichtlich (Abbildung 21).

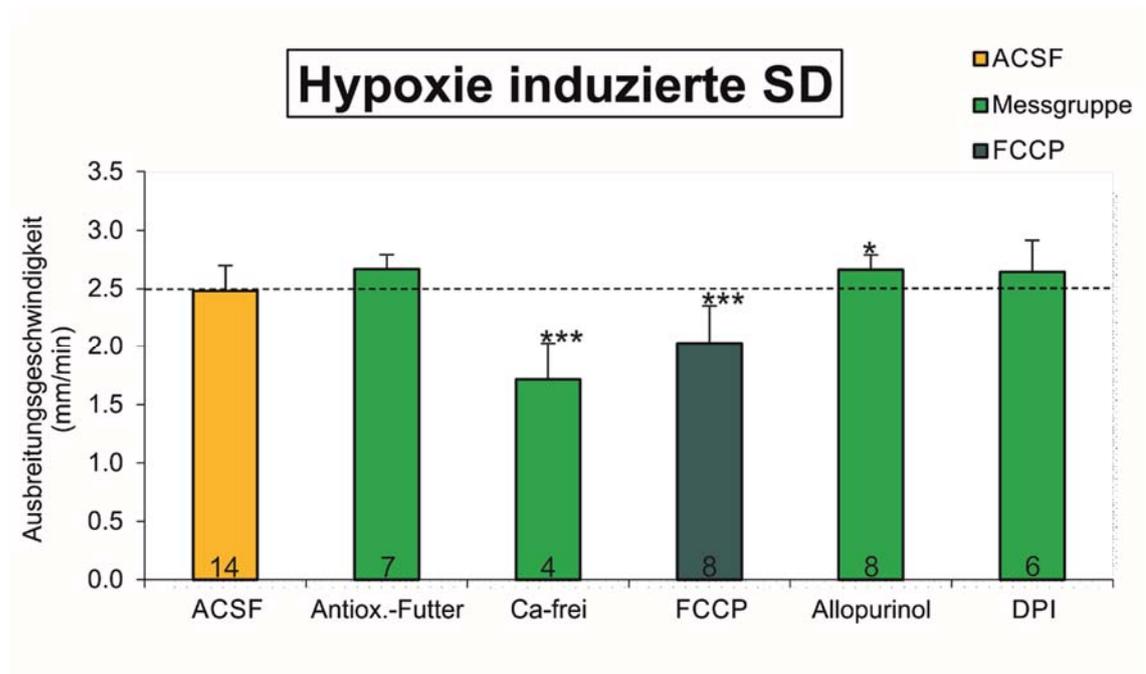


Abbildung 21: Vergleich der Ausbreitungsgeschwindigkeiten der Redoxveränderungen Hypoxie induzierter SDs.

Die Propagationsgeschwindigkeit der Redoxveränderungen assoziiert mit Hypoxie induzierten SDs war für die Versuchsgruppe mit Allopurinol (200 μM) signifikant höher. Im Gegensatz hierzu zeigten die Versuchsreihen in CaCl freier Lösung und mit FCCP (2 μM) signifikant geringere Ausbreitungsgeschwindigkeiten der Redoxalterationen.

Auch für die Kalium induzierten SDs ließen sich signifikante Änderungen der Ausbreitungsgeschwindigkeit der Redoxgleichgewichtsänderungen ausmachen. Sowohl Calcium als auch die Funktion der Mitochondrien spielten eine Rolle in der Ausbreitung der Redoxalterationen, die mit der normoxischen SD korreliert sind. Die FCCP induzierte Entkopplung der Mitochondrien senkte die Ausbreitungsgeschwindigkeit der Redoxveränderungen innerhalb des Hirngewebes. Im Vergleich zu der Kontrollgruppe in reiner ACSF-Lösung, betrug die Propagationsgeschwindigkeit durchschnittlich nur etwa zwei Drittel. Ferner wurde auch in Calcium freier ACSF-Lösung eine verlangsamte Ausbreitung der Redoxveränderungen ermittelt. In diesem Fall betrug die durchschnittliche Ausbreitungsgeschwindigkeit der KSD assoziierten Wellenfront $2,0 \pm 0,2$ mm/min. Die Versuchsgruppen, die mit DPI und Allopurinol modifiziert wurden, und die Antioxidantien gefütterten Mäuse, wiesen bei Auslösung der normoxischen SD keine signifikant veränderten Ausbreitungsgeschwindigkeiten der Redoxänderungen auf (Abbildung 22).

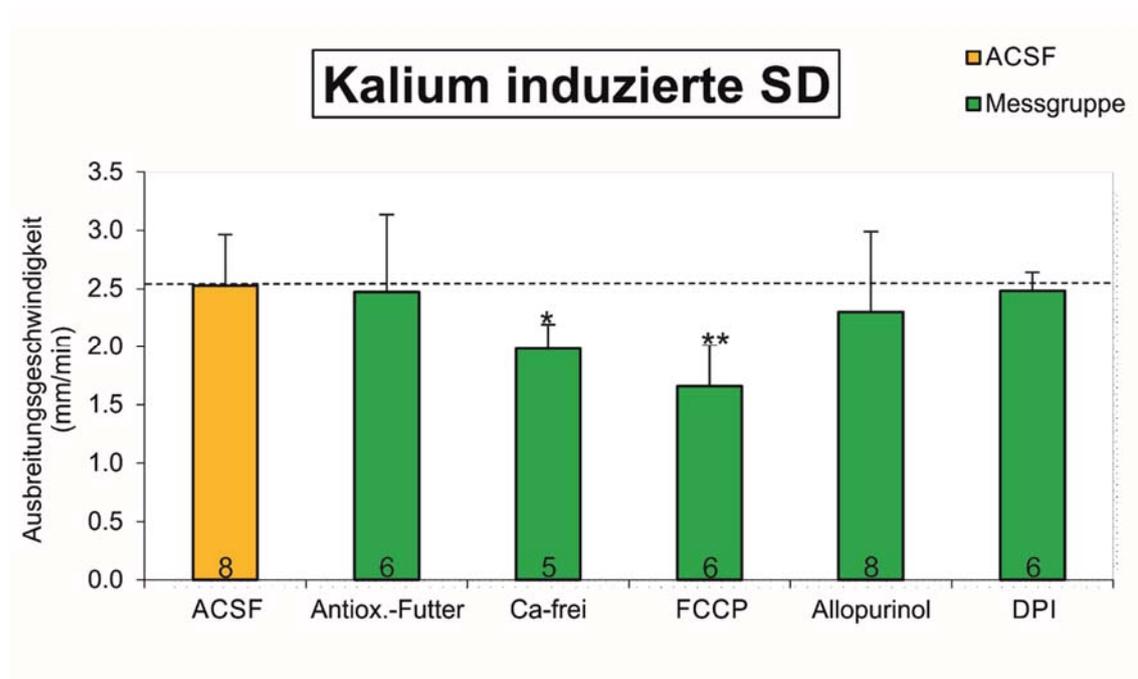


Abbildung 22: Vergleich der Ausbreitungsgeschwindigkeiten der Redoxveränderungen normoxischer SDs.

Die Messung der Ausbreitungsgeschwindigkeiten der Redoxpotenzialänderungen im Zusammenhang mit Kalium induzierten SDs wiesen für die Versuchsgruppen mit FCCP (0,5 μ M) und CaCl freier Lösungen signifikant geringere Geschwindigkeiten auf.

4 Diskussion

Einleitend für die abschließende Interpretation der dargestellten Ergebnisse, sollen die grundlegenden Themenbereiche dieser Dissertation erneut dargelegt werden. Auf dieser Grundlage soll dann die Fragestellung aufgegriffen werden.

Kernthematik dieser Arbeit ist die SD. Charakterisiert wird dieses neuronale Phänomen durch eine enorme Depolarisation der Neurone und Gliazellen des betroffenen Hirnareals. Bedingt durch diese massive nahezu vollständige Depolarisation der Neurone, kommt es zu einer gravierenden Beeinträchtigung intra- und extrazellulärer ionaler Homöostase. Als Konsequenz dessen, sind elementare Funktionen des neuronalen Netzwerks stark eingeschränkt oder in Gänze kollabiert (Leão 1944; Marshall 1959; Bures et al. 1974). Die entstandenen Effekte sind für entsprechende Hirnareale nicht immer reversibel. Neurone können sich teilweise nicht von SD Episoden erholen und verlieren in Konsequenz ihre Vitalität (Kawasaki et al. 1988). Gegenstand dieser Arbeit ist die Klärung der Frage, warum SD induzierte Schädigungen der Neurone auftreten, welche zellulären Ereignisse diesem Geschehen zugrunde liegen und ob dies mit ROS Bildung einhergeht.

Insbesondere die hypoxische aber auch die normoxische SD erzeugen eine eindeutige Belastung des Zellstoffwechsels (Müller 2005). Zum Beispiel hat der Mangel an Sauerstoff und die daraus resultierende verminderte Fähigkeit der Mitochondrien ATP über die Atmungskette herzustellen, einen enormen Stress für die Mitochondrien zur Folge. Diese funktionelle Einschränkung versuchen die Mitochondrien initial durch erhöhte Aktivität zu kompensieren. Vorangegangene Forschung hat gezeigt, dass die Belastung des Zellstoffwechsels in einer erhöhten Produktion an freien Radikalen im Sinne von ROS oder RNS innerhalb der Zelle resultiert (Sohal und Allen 1985). Dieses erhöhte Vorkommen an freien Radikalen würde die Redoxhomöostase aus ihrem Gleichgewicht bringen. Sprich die feine Balance zwischen der ROS/RNS Generierung und Elimination ist gestört und könnte eine oxidative Schädigung einzelner Zellbestandteile der Neurone hervorrufen. In letzter Konsequenz kann diese übermäßige Schädigung von Zellanteilen durch reaktive Spezies zum Zelltod führen (Valko et al. 2007).

Auf der Grundlage dieses Wissens sollte im Zuge dieser Dissertation die Frage geklärt werden, ob eine zeitliche und mechanistische Korrelation zwischen dem Auftreten einer SD und der Entstehung einer unphysiologischen Menge an freien Radikalen existiert. Dies wiederum könnte erklären, warum unter bestimmten Umständen Neurone ihre Funktionen nach einer SD nicht regenerieren können und ihre Vitalität verlieren.

Nachdem SD induzierte Redoxveränderungen in hippokampalen Neuronen der Maus festgestellt werden konnten, galt es nun die maßgeblichen Produzenten der reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies zu identifizieren.

4.1 Etablierte Messmethodik als valides Instrument der Ermittlung SD induzierter Redoxveränderungen

Bevor auf die eigentlichen Messergebnisse eingegangen wird, soll zuerst die Validität der etablierten Messmethodik evaluiert werden.

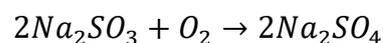
Teil dieser Forschungsreihe war es eine Messmethodik zu etablieren, die es ermöglicht parallel den elektrophysiologischen Status des Hirngewebes und die Redoxbalance, der dort vorhandenen Neurone, zu überprüfen.

Wie im Ergebnisteil beschrieben, ließen sich diese zeitlich korrelierten Messungen nur in einer Submersionskammer realisieren. Dies war unumgänglich, denn das optische Messverfahren zur Visualisierung des intrazellulären Redoxstatus konnte nur in flüssiger Phase ablaufen. Sprich das Objektiv der Kamera musste in die ACSF-Lösung eingetaucht werden. Um trotz der ebenfalls untergetauchten Position des Gewebsschnittes die Durchführbarkeit des Messvorhabens zu gewährleisten, waren einige Modifikationen und Anpassungen notwendig.

Eine der wichtigen Herausforderungen des Messverfahrens war die Vitalerhaltung des Hirnmaterials. Im Gegensatz zu der regulär genutzten Interfacekammer, wurde die Sauerstoffversorgung des Gewebsschnittes nur über die ACSF-Lösung realisiert. Also musste eine möglichst große Oberfläche des Hirngewebes mit ACSF-Lösung in Kontakt kommen, damit die Fläche für Sauerstoffdiffusion in das Gewebe maximal war. Hierzu musste eine Lagerungsart genutzt werden, die den Gewebsschnitt in der korrekten Position fixierte, das Hirngewebe nicht beschädigte aber trotzdem eine ausreichende Umspülung mit ACSF-Lösung sicherstellte. Aus diesem Grund wurde entschieden, den Gewebsschnitt in der Submersionskammer auf einem Nylonnetz in untergetauchter Position mit Hilfe einer Harfe zu fixieren. Durch diese Art der Lagerung wurden zusätzlich weder die elektrophysiologische Feldpotenzialableitung noch die fluoreszenzmikroskopische Messung eingeschränkt. Des Weiteren wurde im Zuge der Präparation der Hirnschnitte eine Schnittstärke von 350 μm gewählt, um den Diffusionsweg der ACSF-Lösung zu den zentral liegenden intakten Neuronen möglichst kurz zu halten. Eine ausreichende Konzentration von Sauerstoff in der ACSF-Lösung, die den Gewebsschnitt umgab, wurde zudem durch eine erhöhte Flussrate von 7 ml/min abgesichert.

Nachdem die Vitalität der Gewebsschnitte während einer Messung gewährleistet werden konnte, stellte die eigentliche Auslösung der SD die nächste Herausforderung dar.

Im speziellen die zuverlässige Auslösung einer Hypoxie induzierten SD war nicht allein über den Sauerstoffentzug der ACSF-Lösung zu realisieren. Ausschließlich eine stickstoffbegaste Lösung, anstatt der ursprünglichen carbogenbegasten ACSF-Lösung einzuspülen, führte lediglich zu einer auf neuronaler Ebene schlecht synchronisierten und schleichenden Streudepolarisation im entsprechenden Hirnareal. Die Gründe für das Ausbleiben einer klassischen SD waren zum einen, dass der Auswaschungsprozess der Sauerstoffmoleküle nicht rapide genug ablief und zum anderen, dass sich die sauerstofffreie ACSF-Lösung durch umgebende Raumluft und das nicht komplett luftdichte Schlauchsystem der Messinstallation erneut mit O₂ anreichern konnte. Es war also nötig die Auslösungsschwelle der Neurone für die Entstehung einer herkömmlichen SD herabzusetzen und die Synchronschaltung des neuronalen Phänomens auf zellulärer Ebene sicherzustellen. Hierzu wurden die ACSF-Lösung und auch die zur SD-Auslösung verwendete stickstoffbegaste ACSF-Lösung modifiziert. Die ACSF-Lösung wurde in einer leicht hypoosmolaren Form genutzt. Diese Konditionierung des extrazellulären Milieus führte dazu, dass sowohl synaptische Übertragung als auch EPSPs (exzitatorische postsynaptische Potenziale) gesteigert wurden (Huang et al. 1997; Borgdorff et al. 2000). Außerdem fand eine Osmose bedingte Zellschwellung statt, die das Interstitium verkleinerte und die Zell-Zell-Kommunikation erhöhte. Zusätzlich zur Hypoosmolarität wurde die K⁺-Konzentration der Lösung auf 8 mM erhöht. Eine Steigerung des Kaliumgehalts im Extrazellulärbereich erhöhte die SD-Anfälligkeit der Hirnschnitte. Zur Verhinderung der Wiederanreicherung der sauerstofflosen ACSF-Lösung im Zuge der SD-Auslösung mit O₂, wurde der stickstoffbegasten ACSF-Lösung 2 mM Natriumsulfit hinzugefügt. Natriumsulfit bindet Sauerstoff und verhindert dadurch die Aufnahme in die Zellen. Mithilfe dieser Methodik war eine zuverlässige Auslösung der SD auch in der Submersionskammer sichergestellt.



Sowohl die Konditionierung des interstitiellen Raumes durch eine hypoosmolare ACSF-Lösung als auch die Erhöhung des Kaliumgehalts, wurden so gewählt, dass die physiologische Funktionalität und die Antwort auf externe Reize der Neurone unbeeinflusst blieben. Lediglich die Hemmschwelle der SD-Entstehung wurde gerade soweit herabgesenkt, dass eine zuverlässige SD-Auslösung auch mit in ACSF submergierten Hirngewebspräparaten möglich war.

Neben der hypoxischen SD soll ebenfalls die Auslösung von SDs unter normoxischen Bedingungen beleuchtet werden. Über eine Hyperthermie war es nicht möglich klassische

synchronisierte SD-Profile zuverlässig auszulösen. Die Erhöhung der Temperatur über den Heizregler geschah nicht rapide genug, sodass lediglich schlecht synchronisierte schleichende SDs auftraten. Aufgrund dieser Problematik wurde eine andere Methode zur Generierung einer normoxischen SD gewählt, bei der die SD assoziierte Reaktionskaskade ausgenutzt wurde. Während einer Hypoxie getriggerten SD, kommt es im Zuge der mangelnden Produktion an ATP durch den Sauerstoffentzug zu einer stark eingeschränkten Funktionalität der Na^+/K^+ -ATPase. Das Ruhemembranpotenzial innerhalb der Neurone kann nicht mehr adäquat aufrechterhalten werden. Als Folge der gestörten Aufrechterhaltung des Ruhemembranpotenzials öffnen die Neurone K_{ATP} - und K_{Ca} -Kanäle, die zu einer Hyperpolarisation führen. Eine gesteigerte Konzentration an K^+ -Ionen in interstitiellen Raum bedingt eine erhöhte Erregbarkeit der Neurone (Vyskocil et al. 1972; Müller und Somjen 2000). Als Antwort auf den deutlichen Verlust von K^+ -Ionen in den Extrazellulärbereich, der letztlich aufgrund der extrazellulären K^+ -Akkumulation dann doch zu einer neuronalen Depolarisation führt, entsteht ein massiver Einstrom von Na^+ -, Ca^{2+} -Ionen und Cl^- -Ionen in die Neurone (Kraig und Nicholson 1978; Hansen und Zeuthen 1981). Es kommt so zu einer massiven Depolarisation im Sinne einer SD. Für die Induktion der normoxischen SD wurde daher eine schlagartige Erhöhung der extrazellulären Kalium Konzentration genutzt. Mithilfe einer modifizierten Glaskapillare, die in das Hirngewebe eingestochen wurde, konnte eine lokale Kaliuminjektion durchgeführt werden, die die Akkumulation von K^+ -Ionen im Interstitium simulierte. Folge des Ganzen war die Entstehung einer SD ausgehend vom Ort der Kaliuminjektion.

Sowohl für die Hypoxie induzierte als auch für die Kalium induzierte SD musste die Temperatur der ACSF-Lösung, in welcher der Gewebsschnitt gelagert wurde, leicht erhöht werden. Für die hypoxische Auslösung der SD wurden Temperaturen von 35,0-35,5°C und für die normoxische SD wurden Temperaturen von 35,5-36,0°C genutzt. Diese leicht erhöhte Temperatur führte bei einer äquivalenten Vitalität des Hirngewebes zu einer gesteigerten Erregbarkeit der Neurone und somit auch zu gesteigerten Antworten auf exogene Stimuli. Dies unterstützte zusätzlich die Entstehung vollständig ausgeprägter SDs.

All diese Modifikationen des Messungsablaufs ermöglichten eine zuverlässige SD-Auslösung, die durch die elektrophysiologische Feldpotenzialableitung aufgezeichnet werden konnte. Die exakte Feststellung des zeitlichen Eintretens der SD, d.h. der rapiden Negativierung des DC-Potenzials, bildete die Grundlage für die Messung der SD assoziierten Redoxveränderungen innerhalb der hippocampalen Neurone.

Die Untersuchung der intrazellulären Redoxverhältnisse bedurfte eines entsprechenden aussagekräftigen Redoxindikators. Für die dynamische Erfassung der Redoxbedingungen der Neurone, während dem Ablauf einer SD, musste dieser Redoxindikator gewisse Eigenschaften aufweisen. Für die in dieser Arbeit relevanten Messverfahren war es essenziell, dass der Detektor von Redoxalterationen dynamische Echtzeitmessungen der zellulären Redoxbalance zuließ. Hierdurch konnten der exakte Zeitverlauf sowie eine

eventuelle Reversibilität der Redoxschwankungen dargestellt werden. Außerdem war es wichtig, dass der Redoxindikator quantitative Aussagen über die Störung der Redoxhomöostase zuließ, um in einem nächsten Schritt den Schweregrad des Einflusses einzelner bekannter Radikalproduzenten evaluieren zu können. Außerdem war es notwendig, dass die Ermittlung der Redoxverhältnisse an vitalen Gewebsschnitten durchgeführt werden konnte und zellspezifisch war. Andernfalls wären die Auslösung von SDs und die parallel ablaufende explizite Kontrolle von Redoxstatus der Neurone nicht möglich gewesen.

Herkömmliche Detektoren des zellulären Redoxstatus wie die fluoreszierenden Farbstoffe Dichlorodihydrofluorescein und Dihydrorhodamin 123 bringen einige einschränkende Eigenschaften mit sich. Ein wichtiger limitierender Faktor der redoxdetektierenden Farbstoffe ist ihre Unspezifität. Zum Beispiel reichert sich Dichlorodihydrofluorescein in allen Zellen zytosolisch an und beschränkt sich dadurch nicht nur auf Neurone (LeBel et al. 1992). Zusätzlich hierzu lassen diese Indikatorfarbstoffe keine dynamischen Messungen zu. Die fluoreszierenden Farbstoffe generieren nur aufgrund oxidativer Prozesse optische Fluoreszenzsignale. Diese Reaktion ist irreversibel und schließt somit dynamische Redoxprofilmessungen aus. Außerdem sind reduktive Veränderungen des Redoxstatus generell nicht detektierbar (Royall und Ischiropoulos 1993). Im Falle der Darstellung SD induzierter Redoxalterationen wäre eine reversible Entwicklung oxidativer Veränderungen des Intrazellulärbereichs nicht feststellbar. Des Weiteren wurden zuvor genannte Indikatorfarbstoffe deutlich durch Autooxidation oder phototoxische Störungen beeinflusst und sind somit nur bedingt zuverlässig (Funke et al. 2011).

Ein weiteres herkömmliches Vorgehen der Redoxquantifizierung ist die direkte Konzentrationsmessung von NADPH, Glutathion, Thioredoxin oder Vitamin C mittels Assays oder Gel-Trennverfahren. Dieses Verfahren ermöglicht zwar eine sehr genaue und spezifische Analyse der Konzentration von reduziertem oder oxidiertem Antioxidans, allerdings müssen die Zellen für die Isolierung der Redoxpaare zerstört werden (Meyer und Dick 2010). In diesem Fall wäre nur eine Momentaufnahme der einzelnen Konzentrationen von Antioxidantien realisierbar gewesen. Auch wären im Zuge dieses Vorgehens keine dynamischen Redoxantworten messbar gewesen. Außerdem ist auch die spezifische Beurteilung der Neurone nicht möglich.

Einen innovativen Lösungsansatz für die Umsetzung dynamischer fluoreszenzmikroskopischer Messungen an vitalem Hirnmaterial bot das redoxsensitive fluoreszierende Protein roGFPc. Konzeptionelle Grundlage des Proteindesigns sind expositionierte Cysteine, die unter Einwirkung oxidativer Prozesse Disulfidbrücken bilden. Dieses Phänomen induziert eine Konformationsänderung der Proteinstruktur und damit auch eine Konformationsänderung des proteineigenen Chromophors. Daraus resultiert eine Alteration des Fluoreszenzsignals bei Anregung mit Licht der Wellenlängen innerhalb der Absorptionsmaxima (Hanson et al. 2004). Kommt es im Zuge einer intrazellulär

erhöhten Produktion von ROS bzw. RNS zu einer Oxidation der Cysteine, bilden ihre freien Thiolgruppen Disulfidbrücken. Wird dieser oxidative Stress durch reduktive Prozesse kompensiert, lösen sich auch die Disulfidbrücken wieder auf. Besonderer Vorteil des durch Cysteine kreierte sogenannten „Thiolschalters“ ist, dass er dynamische Auskünfte über den Redoxstatus von entsprechenden Zellen liefern kann (Dooley et al. 2004; Hanson et al. 2004). Diese können dann über das Fluoreszenzsignal aufgenommen werden. Die genannte spezielle Eigenschaft des Redoxindikators roGFPc bot für die angestrebten Messungen dieser Dissertation essenzielle Vorteile. Über die Integration der roGFPc Gensequenz in das Genom der gezüchteten Versuchstiere konnte ein Redoxindikator implementiert werden, der nur im Zytoplasma der Neurone exprimiert wird (Wagner et al. 2016). Dies ermöglichte zellspezifische fluoreszenzmikroskopische Messungen an vitalen Gewebsschnitten. Zusätzlich hierzu erlaubte die dynamische Reaktion des Indikatorproteins auf Redoxbalanceänderungen in Echtzeit Redoxveränderungen der Neurone während einer SD zu detektieren. Eine weitere Besonderheit des roGFPc Indikators sind die Absorptionsmaxima des Proteins selbst. Ist die Redoxbalance hin zu vermehrter Oxidation verschoben stabilisiert sich das Chromophor in einer Konformation, die ihr Absorptionsmaximum bei 395 nm findet. Treten jedoch vermehrt reduzierende Umstände auf, absorbiert das Chromophor vornehmlich Wellenlängen von 470 nm (Hanson et al. 2004). Diese Gegebenheit konnte für eine ratiometrische Messung der optischen Signale genutzt werden. Maßgeblicher Vorteil des ganzen war, dass Messfehler, die durch Konzentrationsschwankungen des Indikators, Photobleichung oder spontane Zell Schwellungen entstehen können, vermieden werden konnten (Hanson et al. 2004). Des Weiteren konnten durch Kalibrierung des roGFPc der Antwortbereich für maximale Oxidation und Reduktion exakt bestimmt werden. Dies ließ letztendlich quantitative Aussagen über das Redoxpotenzial der Neurone in mV zu.

Kontrollmessungen mit nicht transgenen Mäusen und Messungen mit Standard Beleuchtung bestätigten, dass das roGFPc als Redoxindikator mit zuvor erläuterten fluoreszenzmikroskopischem Messverfahren den Redoxstatus der Zelle zuverlässig wiedergab.

Zusammenfassend lässt sich die etablierte Messmethodik als funktionstüchtiges Mittel zur Detektion SD induzierter Redoxveränderungen in hippocampalen Neuronen der Maus beurteilen. Sowohl die Vitalerhaltung des Hirngewebes als auch die Auslösung der hypoxischen und normoxischen SD konnten reproduzierbar in einer Submersionskammer durchgeführt werden. Zuvor erläuterte Optimierungen der Messmethodik, um die Vitalerhaltung der Gewebsschnitte und die SD-Induktion zu gewährleisten, beeinflussten das physiologische Reaktionsverhalten des Hirngewebes auf externe Reize nicht. Die elektrophysiologische Feldpotenzialableitung übernahm den konkreten zeitlichen Nachweis des Eintretens der SD. Parallel hierzu erstellte die fluoreszenzmikroskopische Messung ein zeitlich korreliertes Profil der Redoxveränderungen innerhalb der Neurone während des

Auftretens der SD. Das roGFPc spielte hierbei die Rolle des Redoxindikators. Durch die Eigenschaften dieses redoxsensitiven fluoreszierenden Proteins war die dynamische, quantitative und zellspezifische Erfassung der Redoxveränderungen intrazellulär möglich.

4.2 Interpretation der Messergebnisse

4.2.1 Analyse des elektrophysiologischen SD-Profiles

Ein essenzieller Schritt für die Korrelation der SD mit roGFPc detektierten intrazellulären Störungen der Redoxhomöostase, war die zeitgleiche elektrophysiologische Feldpotenzialableitung. Mithilfe dieser Messung konnte der exakte Eintritt der SD identifiziert werden. Außerdem konnte in einem weiteren Auswertungsverfahren zusätzlich das charakteristische Profil der SD, welches sich in der DC-Potenzial Ableitung manifestierte, analysiert werden. Hierbei spielten die Werte ΔV , Δt , $t_{1/2}$ und $t_{1/4}$ eine Rolle. Über diese Werte können sowohl Aussagen zu dem Schweregrad und zu der Synchronisation der SD als auch zu der Regenerationsfähigkeit des Hirngewebes nach der starken Depolarisation und der Prädisposition für die SD-Entstehung durch externe Reize getroffen werden. Unter Nutzung der ausgewerteten Ergebnisse für diese Messparameter sollen im Folgenden die einzelnen Kontrollgruppen miteinander verglichen werden und mögliche Gründe für Unterschiede herausgearbeitet werden.

Für den Schweregrad und die Synchronisation der SD scheint, wie durch die Amplitude ΔV angezeigt, die zuverlässige Auslösung der SD eine wichtige Rolle zu spielen. Die Amplitude ΔV der Änderung des elektrophysiologischen Signals assoziiert mit einer SD ist für die Hypoxie induzierte SD signifikant kleiner als für die normoxische SD. Durch die K^+ induzierte SD scheinen folglich mehr Neurone und Gliazellen zeitgleich zu depolarisieren. Des Weiteren sind die Werte $t_{1/2}$ und $t_{1/4}$ der normoxischen SD deutlich größer als die der hypoxischen SD. Diese Messwerte geben den Zeitabstand zwischen dem Eintreten der SD und der Regeneration der DC-Potenzial Ableitung bis zur Hälfte bzw. bis zum letzten Viertel der Amplitude ΔV an. Schlussfolgernd kann sich also das Hirngewebe nach einer Hypoxie induzierten SD besser bzw. schneller von der negativen DC-Potenzial Änderung erholen. Diese signifikanten Unterschiede zwischen der elektrophysiologischen Manifestation der normoxischen und hypoxischen SD, die durch die zuvor genannten Messparameter evaluiert wurden, liefern Indizien dafür, dass der Teil des schlagartigen Ausstroms von Kalium Ionen in den interstitiellen Raum der Reaktionskaskaden einer SD, einen ausschlaggebenden Faktor für den Schweregrad und die Synchronisation einer SD darstellt. Des Weiteren scheint die plötzliche Erhöhung der Kaliumkonzentration im

Interstitium die Stärke der darauffolgenden ionalen Umverteilung der SD zu beeinflussen. Resultierend hieraus ist die Regenerationsfähigkeit des Hirngewebes nach einer SD ebenfalls maßgeblich von der Störung der ionalen Homöostase zwischen Intra- und Extrazellulärraum abhängig.

Wirft man einen Blick auf die Versuchsgruppen der hypoxisch induzierten SDs, fällt auf, dass die Amplituden ΔV in der Messreihe mit Calcium freier ACSF-Lösung verglichen mit der Kontrollgruppe signifikant kleiner sind. Die Zeiten $t_{1/2}$ und $t_{1/4}$ sind für Calcium freie Bedingungen deutlich verlängert. Außerdem lässt sich auch eine trendmäßige Verringerung der Amplituden ΔV im Zuge der Kalium induzierten SD für die Messreihe der Calcium freien ACSF-Lösung feststellen. Dies lässt darauf schließen, dass der Schweregrad einer SD durch den Entzug von Calcium aus dem interstitiellen Raum sowohl für hypoxische als auch normoxische SDs verringert wird. Auf der anderen Seite scheint die Regenerationsfähigkeit der Neurone nach einer SD in Calcium freier ACSF-Lösung abzunehmen. Bei einer Gegenüberstellung der elektrophysiologischen Messergebnisse mit den Ergebnissen der Fluoreszenzmikroskopie, fällt auf, dass nicht nur die Änderung des elektrophysiologischen Signals durch Calciumentzug beeinflusst wird, sondern auch die Entstehung von reaktiven Spezies während der SD. Die Konzentration an freien Radikalen, die während einer SD entstehen, ist in Calcium freier ACSF-Lösung geringer. Auf Grundlage dieser Fakten kann davon ausgegangen werden, dass die Produktion von ROS und RNS induziert durch die SD ebenfalls einen Einfluss auf den Schweregrad der SD nimmt. Ein möglicher Grund für die verlängerte Regenerationszeit der Neurone nach einer hypoxischen SD ohne Calcium im Interstitium, kann die physiologische Signalfunktion von Calcium darstellen. Calcium spielt eine wichtige Rolle für die Rate der mitochondrialen Energiegewinnung in Form von ATP. So führt die Aufnahme von Calcium in die Mitochondrien zu einer erhöhten ATP Produktion (Hansford 1994; Hajnoczky et al. 1995). Kommt es nun im Zuge einer SD zu einer massiven Umverteilung von Ionenkonzentrationen zwischen Intra- und Extrazellulärraum, so müssen während der Regeneration die $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPasen}$ verstärkt arbeiten, um die ionale Homöostase und ein Ruhemembranpotenzial wiederherzustellen. Resultat ist ein erhöhter ATP Bedarf. Allerdings liegt durch die Calcium freie ACSF-Lösung ein Calciummangel vor, der dazu führt, dass die mitochondriale ATP Produktion gegebenenfalls nicht im üblichen Ausmaß durch den Einstrom von Calcium in die Mitochondrien gesteigert werden kann.

Wurden durch die Zugabe von FCCP die Mitochondrien entkoppelt, so zeigte sich für normoxisch provozierte SDs eine signifikant kleinere Amplitude ΔV . Eine eingeschränkt bzw. mangelnde Funktion der Mitochondrien bedeutete für Kalium induzierte SDs einen verringerten Schweregrad der SD. Neben der Messreihe mit Calcium freier ACSF-Lösung kam es auch im Zuge der mitochondrialen Entkopplung zu einer verringerten Bildung von reaktiven Spezies assoziiert mit einer normoxischen SD. Dieser Fakt deutet erneut darauf hin, dass die Generierung reaktiver Spezies einen Einfluss auf den Schweregrad der SD hat. Des Weiteren ließ sich für die Versuchsreihe der FCCP induzierten SDs eine mehr als

doppelt so lange Zeit Δt identifizieren. Die Entkopplung der Mitochondrien scheint die Prädisposition des Gewebes für die SD-Entstehung signifikant zu verringern. Auch hier kann angenommen werden, dass die mangelnde Produktion von ROS durch die Mitochondrien in den Neuronen die Prädisposition des Gewebes SD-Wellen auszubilden herabsetzt. Außerdem könnte möglicherweise die Entkopplung der Mitochondrien die Vitalität des Hirngewebes negativ beeinflussen und damit auch die Entstehung einer SD behindern.

Pharmakologische Interventionen mit DPI und Allopurinol hatten nur einen signifikanten Einfluss auf Hypoxie induzierte SDs. So war die Amplitude ΔV der DC-Potenzial Negativierung während einer SD durch die Blockade der Xanthinoxidase verglichen mit der Kontrollgruppe signifikant größer. Dies deutet darauf hin, dass die Synchronisation und dadurch der Schweregrad der SD eine Steigerung erfuhr. Außerdem konnte durch den Einsatz von DPI und der damit einhergehenden Blockade der NADPH Oxidase eine signifikante Verkürzung der Zeit $t_{1/4}$ beobachtet werden. Dies wiederum spricht für eine verbesserte Regeneration des Hirngewebes nach der SD.

Für die Antioxidantien gefütterten Mäuse zeigte sich im Falle der normoxischen SD eine trendmäßig kleinere Amplitude ΔV . Dies spricht dafür, dass eine höhere intrazelluläre Konzentration von Antioxidantien den Schweregrad der SD senkt.

4.2.2 roGFPc detektierte Redoxveränderungen

Ziel dieser Arbeit war es eine zeitliche Korrelation zwischen dem Phänomen SD und der Entstehung zellulärer Redoxveränderungen im Sinne einer oxidativen Verschiebung der neuronalen Redoxbalance nachzuweisen. Für alle Auslösungsformen der SD, von denen in dieser Arbeit Gebrauch gemacht wurden, ließ sich unmittelbar auf die SD folgende Alteration des fluoreszenzmikroskopischen Signals feststellen. Die roGFPc-Ratio-Werte stiegen an und wiesen damit auf eine erhöhte Anzahl von roGFPc hin, deren Absorptionsmaxima durch die oxidationsinduzierte Konformationsänderungen bei 395 nm angesiedelt waren (Hanson et al. 2004). Diese vermehrt auftretenden oxidativen Vorgänge innerhalb der Neurone sind auf eine erhöhte Generierung von ROS und RNS zurückzuführen (Dooley et al. 2004). Das Auftreten der SD ist somit der Grund dafür, dass die feine Balance zwischen reduzierenden Anteilen der Zelle wie die Antioxidantien und die oxidierenden im Sinne von reaktiven Spezies aus dem Gleichgewicht gerät. Die vermehrte Produktion von freien Radikalen kann intrazellulär nicht mehr durch zelleigene Antioxidantien kompensiert werden und das zytosolische Milieu der Neurone erfährt eine deutliche oxidative Verschiebung.

Sowohl die Hypoxie als auch Kalium und FCCP induzierten SDs hatten eine Gemeinsamkeit in ihrem Redoxprofil. Alle SD basierten elektrischen Signale zeigten eine unmittelbar folgende schlagartige Änderung des roGFPc erzeugten fluoreszenzmikroskopischen Signals im Sinne einer oxidativen Verschiebung.

Alleinstellungsmerkmal des Redoxprofils der K^+ induzierten SDs war die Reversibilität der oxidativen Verschiebung. In enger zeitlicher Korrelation zu der Ableitung des DC-Potenzials zeigte die ratiometrische Messung eine eindeutige Änderung des Redoxpotenzials an, die sich aber parallel zur Erholung des elektrischen Signals reversibel zur Baseline zurückentwickeln konnte. Als analytische Schlussfolgerung kann daher angenommen werden, dass sich die im Zuge der SD einstellende vermehrte Produktion von ROS und RNS während der Erholungsphase der Neurone auch wieder verringert und sich langsam auf ein Grundniveau im Sinne der Baseline zurückentwickelt. Die normoxische SD stellt aufgrund des schnellen Verschwindens des Triggerfaktors Kalium nur eine temporäre Belastung des Hirngewebes dar und ist im Gegensatz zur HSD selbstlimitierend (Lipton 1999; Somjen 2001). Äquivalent zu diesen Fakten verhält sich offenbar auch die Produktion freier Radikale.

Vergleichbar mit der normoxischen SD entsteht im Zusammenhang mit einer Hypoxie, ebenfalls SD korreliert, eine plötzliche massive Änderung des optischen Signals. Allerdings entsteht bereits unmittelbar vor Eintritt der HSD eine leichte oxidative Verschiebung des fluoreszenzmikroskopischen Signals. Mit anderen Worten kommt es schon vor der eigentlichen SD zu einer leichten Erhöhung der Konzentration reaktiver Spezies. Zur Erklärung dieses Phänomens ist die Betrachtung der neuronalen Reaktion auf eine beginnende Hypoxie aufschlussreich. Mit dem Eintreten eines hypoxischen Zustandes, bevor die eigentliche für SD typische massive Depolarisation der Neurone erfolgt, findet auf zellulärer Ebene ein anfangs langsamer und vergleichsweise geringer Ausstrom von Kalium Ionen in den interstitiellen Raum statt (Hansen 1978; Hansen und Zeuthen 1981). Diese initiale ionale Verschiebung stört das Ruhemembranpotenzial und führt zu einer erhöhten Aktivität der $Na^+-K^+-ATPase$. Der Versuch der $Na^+-K^+-ATPase$ das Ruhemembranpotenzial aufrecht zu erhalten, hat einen erhöhten ATP-Verbrauch zur Folge und steigert damit die Aktivität der Mitochondrien. Da noch kein anoxischer Zustand eingetreten ist, ist die Funktion der Mitochondrien trotz der Hypoxie noch nicht vollständig kollabiert. Somit ist die erhöhte metabolische Arbeitslast für die Mitochondrien umsetzbar und resultiert in einer vermehrten Entstehung freier Radikale in Form von ROS (Sohal und Allen 1985). Über den Prozess der Atmungskette entstandene ROS werden in das Zytosol der Neurone abgegeben. Intrazellulär kann ROS als Regulator für die Freisetzung von Calcium fungieren (Gordeeva et al. 2003). Hierbei spielt das endoplasmatische Retikulum (ER) eine zentrale Rolle. Das ER stellt einen der Hauptspeicher für Calcium innerhalb des Zellgefüges dar (Meldolesi und Pozzan 1998). Kommt es zu einer vermehrten Anreicherung von ROS im Zytosol, kann dies die Freisetzung von Calcium aus dem ER über den Inositol-1,4,5,-trisphosphat Rezeptor

(IP3R) und den Ryanodin Rezeptor (RyR) triggern (Dykens 1994; Koulen und Thrower 2001). Zum Beispiel setzt eine erhöhte H_2O_2 Konzentration in hippocampalen Neuronen Ca^{2+} aus dem ER frei (Gerich et al. 2009). Als Konsequenz steigt die intrazelluläre Calciumkonzentration, die eine Anreicherung der Mitochondrien mit Calcium begünstigt. Ein erhöhter Calciumspiegel könnte so innerhalb der Mitochondrien wiederum, über die Aktivitätssteigerung der Mitochondrien, eine erhöhte Produktion von ROS induzieren (Hajnoczky et al. 1995; Gordeeva et al. 2003). Diese initialen Reaktionen der Neurone erklären, warum unmittelbar vor der SD schon ein leichter Anstieg der ROS Produktion eintritt, der sich in einer dezenten Oxidation des Redoxstatus der Neurone manifestiert. Zusätzlich hierzu ist die Alteration des fluoreszenzmikroskopischen Signals für die Hypoxie induzierte SD nicht reversibel. Nach dem SD assoziierten Anstieg des optischen Messwertes, kann sich dieser nicht wieder zur Baseline zurückentwickeln, sondern driftet weiter in oxidierte Bereiche ab. Dieses an Vitalitätsverlust gekoppelte Phänomen läuft innerhalb des Kalibrierungsrahmens des roGFPc Antwortbereichs ab. Die Drift des optischen Signals korreliert in diesem Fall offenbar mit der zunehmenden Devitalisierung des Hirngewebes aufgrund mangelnder bzw. zu langsamer Reoxygenierung des Hirnschnittes. Kernproblematik stellt hierbei der Fakt dar, dass das zugesetzte Na_2SO_3 nicht oder nur über viele Minuten wieder aus dem Hirngewebe ausgewaschen werden kann. Im Kontrast zur herkömmlichen Interfacekammer, in welcher der Hirngewebsschnitt zur Hälfte in flüssiger ACSF-Lösung und zur anderen Hälfte mit Kontakt zur Raumluft gelagert ist, ist die HSD ausgelöst in der Submersionskammer nicht reversibel (Tanaka et al. 1997; Somjen 2001). Im Falle der durchgeführten Versuchsreihe ist die Reoxygenierung des Gewebes zusätzlich durch den Einfluss von sauerstoffbindendem Natriumsulfit erschwert. Kommt es, wie im Falle dieser Messreihe mit Hypoxie induzierten SDs, nicht zu einer suffizienten und raschen Reoxygenierung des Gewebes, steigt auch die Produktion der reaktiven Spezies weiter an und der Redoxstatus der Neurone entfernt sich weiter von dem Wert seiner ursprünglichen Redoxbalance.

Ähnlich wie für die HSD, zeigen die Messwerte der fluoreszenzmikroskopischen Signale für die FCCP induzierte SD eine drastische Störung der Redoxbalance. Auch für diese Messreihe ist die SD terminal und nicht reversibel. Es kann angenommen werden, dass nach der SD das FCCP nicht schnell genug aus dem Hirngewebe mit Hilfe von herkömmlicher ACSF-Lösung ausgewaschen werden kann und die Neurone durch die nachhaltige Entkopplung der Mitochondrien aufgrund von massivem ATP Mangel ihre Vitalität verlieren und somit Funktionseinbußen und Zellschäden unvermeidbar sind. Dies manifestiert sich auch in diesem Fall in einem abdriftenden optischen Signal in oxidierte Bereiche. Ebenfalls hat die Einwaschung von FCCP selbst bereits einen Einfluss auf den Redoxstatus der Neurone. Die ratiometrischen Messwerte zeigen eine leichte Reduzierung des Redoxstatus unmittelbar nach der Behandlung des Hirngewebes mit FCCP an. Dies weist darauf hin, dass im Zuge der FCCP Zugabe die Produktion von freien Radikalen abnimmt. Zurückzuführen ist dies auf die durch Addition des Protonophors FCCP

induzierte Entkopplung der Mitochondrien, welche eine Aufhebung des mitochondrialen Membranpotenzials bewirkt. Daraufhin erleben die Mitochondrien eine massive Steigerung der in Verbindung mit der Atmungskette stehenden Prozesse, die allerdings nicht zu einer vermehrten Produktion von ROS führt. Grund hierfür ist die Abhängigkeit der ROS-Generierung von einem intakten mitochondrialen Membranpotenzial (Abramov et al. 2007). Weiterhin können durch die Entkopplung der Mitochondrien und dem damit einhergehenden Zusammenbruch des Membranpotenzials die Komplexe der Atmungskette keinen ausreichenden Protonengradienten aufbauen, der es der ATP-Synthase erlaubt ADP zu ATP zu phosphorylieren. Die oben beschriebene Reduktion zeigt somit den permanenten physiologischen Anteil, den die mitochondriale ROS-Produktion an der Redoxbalance des intakten Hirngewebes hat.

Nun sollen detailliert die SD induzierten Redoxveränderungen in mV für die jeweiligen Versuchsgruppen beleuchtet werden, um maßgebliche Teilnehmer bzw. wichtigen Faktoren der Produktion freier Radikale während einer SD zu identifizieren. Vergleicht man die Kontrollgruppen der hypoxischen und normoxischen SDs fällt auf, dass die durchschnittlichen Änderungen des Redoxpotenzials für die Hypoxie induzierte SD signifikant größer sind. Vergleicht man die beiden SD-Generierungsmethoden ist ersichtlich, dass die Hypoxie einen deutlich massiveren Stress auf die Zellfunktion und Prozesse ausübt. Insbesondere der Zellmetabolismus wird durch den plötzlichen Sauerstoffentzug enorm beeinträchtigt (Kass und Lipton 1982; Lipton und Whittingham 1982; Whittingham et al. 1984). Dementsprechend stehen die Mitochondrien unter extremem Stress und versuchen mangelndes Sauerstoffangebot zunächst mit hoher Aktivität zu kompensieren. Im Kontrast zur hypoxischen SD, stört die Kaliuminjektion der normoxischen SD in erster Linie die ionale Homöostase und erzeugt infolgedessen eine SD. Insgesamt hat dies ein deutlich moderateres Stresslevel für die Neurone zur Folge. Vorangegangene Forschung hat gezeigt, dass die Belastung des Zellstoffwechsels in einer erhöhten Produktion an freien Radikalen im Sinne von ROS oder RNS innerhalb der Zelle resultiert (Sohal und Allen 1985). Schlussfolgernd kann davon ausgegangen werden, dass das Wegfallen der massiven Beeinflussung des Zellstoffwechsels der Grund für die geringere Produktion von reaktiven Spezies im Falle der normoxischen SD ist. Dies wird ebenfalls durch die Auswertung der jeweiligen Redoxalterationen der einzelnen Versuchsgruppen unterstrichen. Hier ist eindeutig ersichtlich, dass die Mitochondrien einen signifikanten Einfluss auf die Radikalbildung im Zuge einer hypoxischen SD haben. Wurden die Mitochondrien unter Einfluss von FCCP entkoppelt, so änderte sich das Redoxpotenzial während der SD verglichen mit dem der Kontrollgruppe nur ca. um die Hälfte.

Insbesondere die selektive Vulnerabilität von Neuronen durch Hypoxie induzierte SDs beschäftigt die Wissenschaft schon seit Dekaden und bis dato konnte der Grund für dieses Geschehen noch nicht vollends entschlüsselt werden (Suzuki et al. 1985; Schmidt-Kastner und Freund 1991). Allerdings gibt es Anhaltspunkte, die Hinweise auf die Hauptfaktoren

der SD bzw. HSD induzierten Degenerierung von Neuronen geben. Es ist nicht die Depolarisation oder die reine Hypoxie, die für die Zellschädigung verantwortlich sind. Wird zum Beispiel das Calcium aus dem Extrazellulärbereich vor dem Eintreten des Sauerstoffentzuges entzogen oder der Einstrom von Calcium während einer HSD verhindert, können Neurone auch nach einer normalerweise schädigenden Hypoxie Periode ihre Funktion wiederherstellen und es entstehen keine irreversiblen Schäden (Kass und Lipton 1982; Balestrino und Somjen 1986). Allerdings ist anzumerken, dass niedrige Calciumkonzentrationen im Interstitium das Auftreten einer SD im Zuge einer Hypoxie nicht verhindern. Außerdem ist es nicht das Calcium an sich, das den Neuronen Schaden zufügt. Denn eine HSD, auf die unmittelbar eine Reoxygenierung folgt, ist trotz des massiven Calciumeinstroms in die Zelle reversibel. Die erhöhte Calcium Konzentration muss für eine bestimmte kritische Zeitspanne in den Neuronen verweilen, um Zellschäden zur Folge zu haben. In diesem Fall katalysiert das Calcium Reaktionen, die zu Zellschäden führen (Siesjö 1986; Deshpande et al. 1987; Morley et al. 1994).

Im Hinblick auf diese Faktenlage zeigt die Messungsreihe der Hypoxie induzierten SDs in Calcium freier ACSF-Lösung einen interessanten Einfluss auf SD induzierte Redoxveränderungen. Die oxidative Verschiebung des Redoxpotenzials ist bei einem Entzug des Calciums aus dem interstitiellen Raum nur ca. ein Viertel so groß wie bei der Kontrollgruppe. Dies bedeutet, dass während einer hypoxischen SD eine deutlich geringere Oxidation des roGFPc stattfindet. Sprich es entsteht eine deutlich niedrigere Konzentration an freien Radikalen, wenn Calcium nicht massiv in die Zelle einfließt und dort persistiert. Der durch vorangegangene Forschung untermauerte evidente Fakt, dass während einer HSD der Calciumeinstrom eine signifikante Rolle für die Vitalität der Neurone spielt, scheint ebenfalls im Zusammenhang mit der Produktion reaktiver Spezies zu stehen. Nun stellt sich die Frage auf welche Art und Weise Calcium die intrazelluläre Generierung freier Radikale beeinflussen kann. Die wohl bekannteste Funktion von Calcium im Zusammenhang mit Neuronen ist die Aktivierung der Exozytose in der Präsynapse, die maßgeblich für die synaptische Übertragung ist. Hier sorgt Calcium durch die Bindung an das Protein Synaptotagmin für eine Unterstützung bei der Verschmelzung der Vesikel- und Zellmembran. Allerdings ist Calcium auch ein wichtiger *second messenger* für eine Vielfalt an anderen Zellfunktionen (Berridge 2012). So kontrolliert zum Beispiel die Calciumaufnahme in die Mitochondrien die Rate der ATP Gewinnung und damit auch die ROS Generierung der Atmungskette (Hansford 1994; Hajnoczky et al. 1995). Des Weiteren kann Calcium auch die NADPH-Oxidase Aktivität beeinflussen. Die Funktion der NADPH-Oxidase Familien Mitglieder kann entweder direkt über die Bindung von Calcium an eine entsprechende Domäne oder indirekt über eine Phosphorylierung durch PKC β 1 (Protein Kinase C Beta 1), die Calcium stimuliert ist, moduliert werden. So ist zum Beispiel die ROS Produktion der NOX5 abhängig von der Bindung Calciums an eine N-terminale Domäne des Proteins. Ein weiteres Beispiel ist die NOX1. Sie kann Calcium abhängig durch PKC β 1 phosphoryliert werden (Banfi et al. 2004; Streeter et al. 2014).

Nicht nur besteht eine Regulation der Mitochondrien oder NADPH-Oxidase induzierten ROS Produktion über Calcium, sondern es existiert vielmehr ein bidirektionales Verhältnis zwischen Calcium und ROS. In diesem reguliert ROS die Freisetzung von Calcium und damit dessen intrazelluläre Signalfunktionen und Calcium wiederum fungiert als Aktivator der ROS Generierung (Gordeeva et al. 2003). Dieses Gleichgewicht und Zusammenspiel zwischen ROS und Calcium spielt eine wichtige Rolle in der Zellphysiologie und Aufrechterhaltung der Zellvitalität. Die SD scheint diese fein austarierte Interaktion von Calcium und ROS massiv zu stören. Im Zuge der SD entsteht zwischen Intrazellulärraum und Interstitium eine massive Verschiebung der ionalen Homöostase, während der unter anderem große Mengen Calcium in die Zelle einströmen (Kraig und Nicholson 1978; Hansen und Zeuthen 1981; Nicholson und Kraig 1981; Somjen und Aitken 1984). Eine persistierende hohe intrazelluläre Calciumkonzentration kann somit eine erhöhte Generierung von reaktiven Spezies forcieren. Zu klären bleibt jedoch, welche mitochondrialen und extramitochondrialen Faktoren im Detail in diese Reaktion involviert sind. Nachgewiesener Weise kann solch eine Überproduktion von freien Radikalen die intrazelluläre Redoxhomöostase massiv stören und zu bleibenden Schäden von Zellbestandteilen und in letzter Instanz auch zum Zelltod führen (Valko et al. 2007). Tatsächlich scheint also im Zuge einer HSD nicht der Calciumeinstrom an sich für die Degeneration von Neuronen verantwortlich zu sein, sondern vielmehr die Katalysation der Entstehung freier Radikale. Je länger dieses stark oxidative Milieu aufrechterhalten wird desto gravierender sind die Folgen für die Neurone.

Neben der HSD hat auch eine normoxische SD einen hohen Calciumeinstrom in die Zelle zur Folge, allerdings resultiert dies nicht in bleibenden Schäden für die Neurone (Nedergaard und Hansen 1988; Herreras und Somjen 1993). In diesem Fall ist Zeit der Schlüsselfaktor. Eine normoxische SD ist selbstlimitierend und damit ist die Verweildauer des Calciums intrazellulär vermutlich nicht lang genug, um indirekt irreversible Zellschäden zu verursachen. Zusätzlich hierzu wird eine Erholung des Gewebes durch einen intakten Zellstoffwechsel und somit auch eine intakte ATP Produktion begünstigt. Allerdings ist auch eine persistierende normoxische SD nicht reversibel und mündet gleichermaßen in einem Vitalitätsverlust der Neurone (Kawasaki et al. 1988). Auch im Kontext der normoxischen SD-Messreihe zeigt die Verwendung einer Ca^{2+} freien ACSF-Lösung eine signifikant geringere Änderung des Redoxpotenzials. Verglichen mit der Kontrollgruppe in herkömmlicher ACSF-Lösung, ist die ROS bzw. RNS Produktion assoziiert mit der SD deutlich niedriger. Aufgrund der selbstlimitierenden Eigenschaften der normoxischen SD ist ebenfalls die Entstehung freier Radikale reversibel und endet nicht in einem Vitalitätsverlust der Neurone.

Zusätzlich zu dem starken Einfluss von Calcium auf die SD induzierte Radikalbildung, sind auch im Zuge der HSD sowohl mitochondriale als auch extramitochondriale Faktoren an der Generierung reaktiver Spezies beteiligt. Wie zuvor beschrieben sind neben Calciumeinstrom hauptsächlich die Mitochondrien an der Produktion von ROS und RNS

während einer SD verantwortlich. Für die Versuchsreihe der FCCP induzierten SDs fielen die Änderungen des Redoxpotenzials und somit die Radikalbildung induziert durch eine SD signifikant kleiner aus. Auch für SDs, die durch Kalium Injektion provoziert wurden, ließ sich unter Einfluss von FCCP ein Trend hin zu einer geringeren Radikalbildung ausmachen. Außerdem scheinen auch bekannte extramitochondriale Radikalbildner wie die Xanthinoxidase eine Rolle für die SD assoziierte Entstehung freier radikale zu spielen. So war zum Beispiel die Alteration des Redoxpotenzials beim Auftreten einer hypoxischen SD unter Einfluss von Allopurinol geringer als die der Kontrollgruppe. Für die Messreihe der Hypoxie induzierten SDs konnte ebenfalls eine trendmäßig geringere Änderung des Redoxpotenzials im Zuge der DPI Behandlung identifiziert werden. Somit scheint auch die NADPH Oxidase Anteil an der SD induzierten Radikalbildung zu haben. Über diese zelleigenen Faktoren, die maßgeblich zur Störung der intrazellulären Redoxhomöostase während einer SD beitragen, hinaus konnte auch eine Fütterung der Versuchstiere mit Antioxidantien Einfluss auf den Schweregrad der SD assoziierten Redoxalterationen nehmen. Im Zuge der hypoxischen Messreihe waren die Redoxpotenzial Änderungen im Zusammenhang mit einer SD der Tiere, die mit Antioxidantien gefüttert wurden, trendmäßig kleiner als die der Kontrollgruppe. Intrazellulär bilden die Antioxidantien unter physiologischen Umständen den Gegenspieler der reaktiven Spezies. Forciert durch freie Radikale ablaufende oxidative Reaktionen können durch Antioxidantien abgeschwächt werden. Das antioxidative Schutzsystem der Zelle zur Aufrechterhaltung des Redoxgleichgewichts setzt sich aus enzymatischen und nicht enzymatischen Bestandteilen zusammen (Halliwell 1996). Hauptvertreter der nicht-enzymatischen Antioxidantien sind Ascorbinsäure (Vitamin C) und α -Tocopherol (Vitamin E). Bei diesen Vertretern handelt es sich um exogene Antioxidantien, weil Sie nicht körpereigen sind und zum Beispiel über die Nahrung zugeführt werden müssen. Im Falle der Fütterung der Versuchstiere mit Antioxidantien Futter konnte also der antioxidative Schutz der Neurone effektiv erhöht werden. Dies führte zu einer leicht verbesserten Neutralisierung der im Zuge der SD gebildeten ROS.

Die im Diskussionsteil dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse, wurden bereits in Form eines Tagungsbeitrags erstmalig publiziert (Ackermann et al. 2019).

4.2.3 Propagationsgeschwindigkeit der Redoxalterationen

Aufgrund des Zeitintervalls von 10 Sekunden, das für die Aufnahmen innerhalb der fluoreszenzmikroskopischen Messung gewählt wurde, war unter anderem die Charakterisierung des Redoxprofils der Neurone während einer SD möglich. Allerdings bildeten die Bildaufnahmen der Fluoreszenzmikroskopie nicht nur einzelne eng eingegrenzte Regionen des Hippocampus ab, sondern einen ausreichend großen Anteil der

CA1 Region, sodass die Wellenfrontpropagation der Redoxänderungen visualisiert werden konnte. Die aufgezeichneten Rohbilddaten wurden mit Hilfe einer Bildbearbeitungssoftware zu Filmsequenzen zusammengefügt. Auf Grundlage dieser Filme ließen sich die Ausbreitungsgeschwindigkeiten der Redoxalterationen assoziiert mit SD errechnen. Noch schnellere Bildraten wären ebenfalls möglich gewesen, hätten aber deutlich das Risiko der Photobleichung oder der Phototoxizität erhöht.

Im Folgenden soll die Ausbreitungsgeschwindigkeit der Redoxveränderungen für die verschiedenen Versuchsgruppen interpretiert werden und in einen Gesamtkontext mit den anderen Messergebnissen und Erkenntnissen aus vorangegangener Forschung eingebettet werden.

Vorangegangene Messungen intrinsischer optischer Signale, welche mit der neuronalen Depolarisation während einer SD assoziiert sind, ermöglichten eine Visualisierung der wellenartigen Ausbreitung von SDs in Hirngewebspräparaten (Müller und Somjen 1999; Fischer et al. 2009). Mit Hilfe der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen konnten nun für alle Versuchsgruppen die charakteristischen wellenartigen Ausbreitungen der Depolarisation der Neurone auch für die intrazellulären Redoxveränderungen, die mit SDs assoziiert sind, gezeigt werden. Die Ausbreitungsgeschwindigkeit der Wellenfront beträgt für die hypoxische SD $2,5 \pm 0,2$ mm/min und für die Kalium induzierte SD $2,5 \pm 0,4$ mm/min. Für die Ausbreitungsgeschwindigkeit von Redoxalterationen scheint es somit keinen signifikanten Unterschied zu machen, ob es sich bei der Auslösung der Redoxhomöostasestörung um eine normoxische oder eine hypoxische SD handelt. Allerdings konnten einzelne Modifikationen der ACSF-Lösung die Propagationsgeschwindigkeit der Redoxveränderungen maßgeblich beeinflussen.

Nicht nur das Ausmaß der oxidativen Verschiebung des Redoxpotenzials im Zusammenhang mit einer SD wird durch Calciumentzug im Extrazellulärbereich signifikant verringert. Eine Versuchsdurchführung in Calcium freier ACSF-Lösung hatte auch eine deutliche Verlangsamung der Propagationsgeschwindigkeit der Änderungen des optischen Signals zur Folge. Insbesondere im Falle der Hypoxie induzierten SD, aber auch im Zusammenhang mit der normoxischen SD, scheint Calcium einen deutlichen Einfluss auf die Ausbreitungsgeschwindigkeit der Wellenfront zu haben. Es lässt sich schlussfolgern, dass die extrazelluläre Calcium-Konzentration nicht nur einen Schlüsselfaktor für die Menge an freien Radikalen darstellt, die induziert durch die SD gebildet werden, sondern auch die Affektion umliegender Gewebsareale mit den Störungen des intrazellulären Redoxequilibriums beschleunigt.

Neben dem Calcium Entzug aus dem Extrazellulärraum, hat eine Entkopplung der Mitochondrien durch FCCP ebenfalls einen signifikanten Einfluss auf die Propagationsgeschwindigkeit der SD assoziierten Redoxveränderungen zur Folge. Sowohl für die FCCP als auch für Kalium induzierte SDs ist die Ausbreitungsgeschwindigkeit der intrazellulären oxidativen Redoxalterationen unter dem Einfluss von FCCP signifikant

verlangsamt. Die Versuchsreihen in Calcium freier ACSF-Lösung und mit FCCP identifizierten den Einstrom von Calcium und die Funktion der Mitochondrien ebenfalls als wichtige Faktoren für die SD assoziierte ROS Generierung. Die Analyse der Propagationsgeschwindigkeiten SD induzierter Redoxveränderungen lässt also zusätzlich darauf schließen, dass die intrazelluläre Radikalproduktion im Zusammenhang mit SDs die Ausbreitung der SD-Folgen im Sinne von Redoxhomöostasestörungen beschleunigt.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Zentrales Thema dieser Arbeit war die SD und die mit diesem Phänomen assoziierten intrazellulären Redoxveränderungen in Neuronen. Des Weiteren wurde eine mögliche Klärung der Frage, warum die Effekte einer SD auf die Hirnareale, in denen sie stattfindet, nicht immer reversibel sind, angestrebt. Eine Erholung der Neurone im Sinne einer Regenerierung ihrer Funktionalität kann ausbleiben und in pathophysiologischen Konsequenzen resultieren. Dieser Fakt lässt der SD eine hohe klinische Relevanz für neurologische Pathologien zukommen. So steht ihr Auftreten eng mit pathophysiologischen Zuständen wie Migräne, Commotio cerebri, hypoxischen bzw. ischämischen Zuständen in Hirngewebe, postiktaler Depression und auch intrazerebralen oder subarachnoidalen Hirnblutungen in Verbindung.

Insbesondere der bei Hypoxie induzierten SDs eintretende starke Sauerstoff- und Glukosemangel in Kombination mit der massiven Störung der ionalen Hämotase, haben eine enorme Belastung des Zellstoffwechsels zur Folge. Vorangegangene Forschung hat einige Evidenz dafür geliefert, dass eine solche Belastung des Zellstoffwechsels einen möglichen Grund für die Generierung reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffspezies darstellen kann. Eine vermehrte Produktion von ROS und RNS kann das fein austarierte Redoxequilibrium der Neurone stören und somit das Gleichgewicht von reduktiven und oxidativen Prozessen aufheben. Als Konsequenz finden übergewichtet oxidative Prozesse statt. In aller Regel ist das Resultat dieses Ungleichgewichts sogenannter oxidativer Stress, der reversible oxidative Modifikationen von Makromolekülen übersteigt. Es laufen oxidative Prozesse ab, die Lipide, Proteine und auch DNA konstant reaktiv attackieren und schädigen. Diese reaktiven Schädigungen von Zellbestandteilen können in letzter Instanz zur zellulären Degeneration führen.

In diesem Kontext stellte sich die Frage, ob eine zeitliche und mechanistische Korrelation zwischen einer SD und der Störung der Redoxhomöostase auf neuronaler Ebene existiert. Außerdem sollten maßgebliche ROS und RNS Produzenten, die für die Störung des Redoxgleichgewichtes verantwortlich sind, identifiziert werden.

Grundlage für die Detektierung SD induzierter Redoxveränderungen bot die Kombination elektrophysiologischer Feldpotenzialableitungen mit fluoreszenzmikroskopischen Messungen zur Analyse der zellulären Redoxpotenzialänderungen. Ermöglicht wurde dies durch das transgene Redoxindikator-Mausmodell der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Michael Müller. Diese Mäuse exprimieren in exzitatorischen Projektionsneuronen den genetisch codierten Redoxsensor roGFPc. Mit Hilfe des roGFPc-Sensors konnten in Echtzeit ablaufende quantitative und zellspezifische Analysen des Redoxstatus der Neurone im

Stratum pyramidale der CA1 Region des Hippokampus durchgeführt werden. Die parallel geschalteten Messverfahren realisierten eine zuverlässige Aufzeichnung und anschließende Quantifizierung des Redoxstatus der Neurone während dem Auftreten einer normoxischen oder auch hypoxischen SD. Zur Identifizierung wesentlicher Akteure der ROS Generierung kamen ausgewählte Pharmaka und Modifikationen der ACSF-Lösung zum Einsatz. Diese sollten bekannte Radikalproduzenten inhibieren und damit aufdecken.

Die negative DC-Potenzialänderung der SD war sowohl für normoxische als auch für hypoxische SDs von einer deutlichen Oxidation des roGFPc begleitet und weist damit auf eine erhöhte Freisetzung von ROS während jeder Art von SD hin. Allerdings ist die SD korrelierte Störung des Redoxgleichgewichtes bzw. die Radikalbildung für HSDs signifikant stärker als für normoxische SDs. Eine mögliche Erklärung hierfür kann die fehlende massive Störung des Zellstoffwechsels während einer normoxischen SD-Auslösung sein. Untermauert wird dieser Fakt durch geringere Produktion reaktiver Spezies im Falle der mitochondrialen Entkopplung. Für die K^+ induzierten SDs zeigte sich eine schlagartige oxidative Verschiebung des Redoxstatus der Neurone ohne vorangehende Änderung des Ruhezustandes. Des Weiteren war die Störung des Redoxgleichgewichtes reversibel. Dies lässt sich mit dem selbstlimitierenden Charakter des Kaliumstimulus erklären. Im Falle der Hypoxie induzierten SD war bereits eine initiale allmählich zunehmende Oxidation des roGFPc vor dem eigentlichen Eintritt der HSD zu beobachten. Sowohl für die Hypoxie als auch für die FCCP stimulierten SDs waren die oxidativen Verschiebungen des Redoxgleichgewichtes irreversibel. Das optische Signal driftete innerhalb des Kalibrierungsrahmens weiter in oxidative Bereiche ab. Zurückzuführen war dies auf das zu langsame Auswaschen von FCCP und Natriumsulfit aus dem Hirngewebe. Wurde das extrazelluläre Ca^{2+} entfernt, verringerte sich die SD assoziierte Oxidation von roGFPc maßgeblich. Ferner konnten die Versuchsreihen mit mitochondrialer Entkopplung die Mitochondrien als einen der Hauptakteure der SD induzierten ROS Generierung identifizieren. Allerdings konnten weder mitochondriale Entkopplung noch die pharmakologische Inhibition der NADPH-Oxidase oder Xanthin-Oxidase allein die Oxidation des roGFPc-Sensors in Gänze aufheben. Schlussfolgernd kann eine Schlüsselrolle der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, für die SD assoziiert forcierte ROS Produktion, angenommen werden. Dies wiederum könnte erklären, warum eine persistierende hohe intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration mit einer höheren Wahrscheinlichkeit für die Degeneration von Neuronen während einer SD assoziiert ist. Außerdem kann grundsätzlich von einer Involvierung mitochondrialer und auch extramitochondrialer ROS-Quellen ausgegangen werden.

Zusammenfassend bildet die im Kontext dieser Arbeit etablierte Messmethodik auf der technischen Basis der transgenen Redoxindikatormaus eine innovative Grundlage zur Entschlüsselung der subzellulären Mechanismen SD assoziierter ROS Generierung. Dies wird das Verständnis physiologischer und pathophysiologischer Konsequenzen, die aus SD-Episoden jeglicher Genese resultieren, verbessern.

6 Literaturverzeichnis

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

Ackermann M, Dietrich K, Müller M (2019): Quantitative imaging of spreading-depression associated ROS production. 13th Göttingen Meeting of the German Neuroscience Society T11-2A

Amemori T, Gorelova NA, Bures J (1987): Spreading depression in the olfactory bulb of rats: reliable initiation and boundaries of propagation. *Neuroscience* 22, 29-36

Antonini E, Brunori M, Greenwood C, Malmström BG (1970): Catalytic mechanism of cytochrome oxidase. *Nature* 228, 936-937

Awasthi YC, Sharma R, Cheng JZ, Yang Y, Sharma A, Singhal SS, Awasthi S (2003): Role of 4-hydroxynonenal in stress-mediated apoptosis signaling. *Mol Aspects Med* 24, 219-230

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

Bae YS, Kang SW, Seo MS, Baines IC, Tekle E, Chock PB, Rhee SG (1997): Epidermal growth factor (EGF)-induced generation of hydrogen peroxide. Role in EGF receptor-mediated tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* 272, 217-221

Balestrino M, Somjen GG (1986): Chlorpromazine protects brain tissue in hypoxia by delaying spreading depression-mediated calcium influx. *Brain Res* 385, 219-226

Balestrino M, Young J, Aitken P (1999): Block of Na⁺-K⁺ATPase with ouabain induces spreading depression-like depolarization in hippocampal slices. *Brain Res* 838, 37-44

Banfi B, Tirone F, Durussel I, Knisz J, Moskwa P, Molnar GZ, Krause KH, Cox JA (2004): Mechanism of Ca²⁺ activation of the NADPH oxidase 5 (NOX5). *J Biol Chem* 279, 18583-18591

Banki K, Hutter E, Gonchoroff NJ, Perl A (1999): Elevation of mitochondrial transmembrane potential and reactive oxygen intermediate levels are early events and occur independently from activation of caspases in Fas signaling. *J Immunol* 162, 1466-1479

- Beckman KB, Ames BN (1997): Oxidative decay of DNA. *J Biol Chem* 272, 19633-19636
- Berridge MJ (2012): Calcium signalling remodelling and disease. *Biochem Soc Trans* 40, 297-309
- Bolay H, Reuter U, Dunn AK, Huang Z, Boas DA, Moskowitz MA (2002): Intrinsic brain activity triggers trigeminal meningeal afferents in a migraine model. *Nat Med* 8, 136-142
- Borgdorff AJ, Somjen GG, Wadman WJ (2000): Two mechanisms that raise free intracellular calcium in rat hippocampal neurons during hypoosmotic and low NaCl treatment. *J Neurophysiol* 83, 81-89
- Boveris A, Oshino N, Chance B (1972): The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochem J* 128, 617-630
- Breen AP, Murphy JA (1995): Reactions of oxyl radicals with DNA. *Free Radic Biol Med* 18, 1033-1077
- Bures J, Buresová O, Krivánek J: The mechanism and applications of Leão's spreading depression of electroencephalographic activity; Academia, Prague 1974, 410
- Buresh Y, Koroleva VI, Korolev OS, Maresh V (1999): Changes in the constant potential in brain structures in rats during focal ischemia and systemic hypoxia. *Neurosci Behav Physiol* 29, 569-579
- Burton GW, Traber MG (1990): Vitamin E: antioxidant activity, biokinetics, and bioavailability. *Annu Rev Nutr* 10, 357-382
- Carr A, Frei B (1999): Does vitamin C act as a pro-oxidant under physiological conditions? *FASEB J* 13, 1007-1024
- 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
- Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J (2003): Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J* 17, 1195-1214
- David SS, O'Shea VL, Kundu S (2007): Base-excision repair of oxidative DNA damage. *Nature* 447, 941-950

Deshpande JK, Siesjö BK, Wieloch T (1987): Calcium accumulation and neuronal damage in the rat hippocampus following cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 7, 89-95

Dizdaroglu M, Jaruga P, Birincioglu M, Rodriguez H (2002): Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. *Free Radic Biol Med* 32, 1102-1115

Dooley CT, Dore TM, Hanson GT, Jackson WC, Remington SJ, Tsien RY (2004): Imaging dynamic redox changes in mammalian cells with green fluorescent protein indicators. *J Biol Chem* 279, 22284-22293

Dorsch NW, King MT (1994): A review of cerebral vasospasm in aneurysmal subarachnoid haemorrhage Part I: Incidence and effects. *J Clin Neurosci* 1, 19-26

Dreier JP (2011): The role of spreading depression, spreading depolarization and spreading ischemia in neurological disease. *Nat Med* 17, 439-447

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

Dreier JP, Fabricius M, Ayata C, Sakowitz OW, Shuttleworth CW, Dohmen C, Graf R, Vajkoczy P, Helbok R, Suzuki M et al. (2017): Recording, analysis, and interpretation of spreading depolarizations in neurointensive care: Review and recommendations of the COSBID research group. *J Cereb Blood Flow Metab* 37, 1595-1625

Dröge W (2002): Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82, 47-95

Dugan LL, Sensi SL, Canzoniero LM, Handran SD, Rothman SM, Lin TS, Goldberg MP, Choi DW (1995): Mitochondrial production of reactive oxygen species in cortical neurons following exposure to N-methyl-D-aspartate. *J Neurosci* 15, 6377-6388

Dykens JA (1994): Isolated cerebral and cerebellar mitochondria produce free radicals when exposed to elevated Ca^{2+} and Na^{+} : implications for neurodegeneration. *J Neurochem* 63, 584-591

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

Esteve JM, Mompo J, Garcia de la Asuncion J, Sastre J, Asensi M, Boix J, Vina JR, Vina J, Pallardo FV (1999): Oxidative damage to mitochondrial DNA and glutathione oxidation in apoptosis: studies in vivo and in vitro. *FASEB J* 13, 1055-1064

Faraci FM, Didion SP (2004): Vascular protection: superoxide dismutase isoforms in the vessel wall. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24, 1367-1373

Fenton HJH (1894): LXXIII.—Oxidation of tartaric acid in presence of iron. *J. Chem. Soc., Trans.* 65, 899-910

Fifkova E, Bures J, Koshtoyants OK, Krivanek J, Weiss T (1961): Leao's spreading depression in the cerebellum of rat. *Experientia* 17, 572-573

Finkel T (1998): Oxygen radicals and signaling. *Curr Opin Cell Biol* 10, 248-253

Finkel T (2011): Signal transduction by reactive oxygen species. *J Cell Biol* 194, 7-15

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

Fridovich I (1975): Superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem* 44, 147-159

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

Fridovich I (1995): Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem* 64, 97-112

Funke F, Gerich FJ, Müller M (2011): Dynamic, semi-quantitative imaging of intracellular ROS levels and redox status in rat hippocampal neurons. *Neuroimage* 54, 2590-2602

Gerich FJ, Funke F, Hildebrandt B, Faßhauer M, Müller M (2009): H₂O₂-mediated modulation of cytosolic signaling and organelle function in rat hippocampus. *Pflügers Arch* 458, 937-952

Girotti AW (1998): Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *J Lipid Res* 39, 1529-1542

Gordeeva AV, Zvyagilskaya RA, Labas YA (2003): Cross-talk between reactive oxygen species and calcium in living cells. *Biochemistry (Mosc)* 68, 1077-1080

Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, Alexander RW (1994): Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 74, 1141-1148

Guedes RC, do Carmo RJ (1980): Influence of ionic disturbances produced by gastric washing on cortical spreading depression. *Exp Brain Res* 39, 341-349

Haghdoust S, Czene S, Näslund I, Skog S, Harms-Ringdahl M (2005): Extracellular 8-oxo-dG as a sensitive parameter for oxidative stress in vivo and in vitro. *Free Radic Res* 39, 153-162

Hajnoczky G, Robb-Gaspers LD, Seitz MB, Thomas AP (1995): Decoding of cytosolic calcium oscillations in the mitochondria. *Cell* 82, 415-424

Hájos N, Ellender TJ, Zemankovics R, Mann EO, Exley R, Cragg SJ, Freund TF, Paulsen O (2009): Maintaining network activity in submerged hippocampal slices: importance of oxygen supply. *Eur J Neurosci* 29, 319-327

Halliwell B (1996): Antioxidants in human health and disease. *Annu Rev Nutr* 16, 33-50

Hansen AJ (1978): The extracellular potassium concentration in brain cortex following ischemia in hypo- and hyperglycemic rats. *Acta Physiol Scand* 102, 324-329

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

Hansford RG (1994): Physiological role of mitochondrial Ca^{2+} transport. *J Bioenerg Biomembr* 26, 495-508

Hanson GT, Aggeler R, Oglesbee D, Cannon M, Capaldi RA, Tsien RY, Remington SJ (2004): Investigating mitochondrial redox potential with redox-sensitive green fluorescent protein indicators. *J Biol Chem* 279, 13044-13053

Hartings JA, Shuttleworth CW, Kirov SA, Ayata C, Hinzman JM, Foreman B, Andrew RD, Boutelle MG, Brennan KC, Carlson AP et al. (2017): The continuum of spreading depolarizations in acute cortical lesion development: Examining Leão's legacy. *J Cereb Blood Flow Metab* 37, 1571-1594

Herreras O, Somjen GG (1993): Analysis of potential shifts associated with recurrent spreading depression and prolonged unstable spreading depression induced by microdialysis of elevated K^+ in hippocampus of anesthetized rats. *Brain Res* 610, 283-294

Huang R, Bossut DF, Somjen GG (1997): Enhancement of whole cell synaptic currents by low osmolarity and by low [NaCl] in rat hippocampal slices. *J Neurophysiol* 77, 2349-2359

Hwang C, Sinskey AJ, Lodish HF (1992): Oxidized redox state of glutathione in the endoplasmic reticulum. *Science* 257, 1496-1502

Imbert V, Rupec RA, Livolsi A, Pahl HL, Traenckner EB, Mueller-Dieckmann C, Farahifar D, Rossi B, Auberger P, Baeuerle PA et al. (1996): Tyrosine phosphorylation of I kappa B-alpha activates NF-kappa B without proteolytic degradation of I kappa B-alpha. *Cell* 86, 787-798

Inoue M, Sato EF, Nishikawa M, Park AM, Kira Y, Imada I, Utsumi K (2003): Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life. *Curr Med Chem* 10, 2495-2505

Ittner LM, Götz J (2007): Pronuclear injection for the production of transgenic mice. *Nat Protoc* 2, 1206-1215

Jensen PK (1966): Antimycin-insensitive oxidation of succinate and reduced nicotinamide-adenine dinucleotide in electron-transport particles. II. Steroid effects. *Biochim Biophys Acta* 122, 167-174

Jing J, Aitken PG, Somjen GG (1991): Lasting neuron depression induced by high potassium and its prevention by low calcium and NMDA receptor blockade. *Brain Res* 557, 177-183

Kagan V, Serbinova E, Packer L (1990): Antioxidant effects of ubiquinones in microsomes and mitochondria are mediated by tocopherol recycling. *Biochem Biophys Res Commun* 169, 851-857

Kamata H, Hirata H (1999): Redox regulation of cellular signalling. *Cell Signal* 11, 1-14

Karatas H, Erdener SE, Gursoy-Ozdemir Y, Lule S, Eren-Koçak E, Sen ZD, Dalkara T (2013): Spreading depression triggers headache by activating neuronal Panx1 channels. *Science* 339, 1092-1095

Kass IS, Lipton P (1982): Mechanisms involved in irreversible anoxic damage to the in vitro rat hippocampal slice. *J Physiol* 332, 459-472

Kawasaki K, Czéh G, Somjen GG (1988): Prolonged exposure to high potassium concentration results in irreversible loss of synaptic transmission in hippocampal tissue slices. *Brain Res* 457, 322-329

Kehrer JP (2000): The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology* 149, 43-50

Kimelberg HK, Goderie SK, Higman S, Pang S, Waniewski RA (1990): Swelling-induced release of glutamate, aspartate, and taurine from astrocyte cultures. *J Neurosci* 10, 1583-1591

Kojo S (2004): Vitamin C: basic metabolism and its function as an index of oxidative stress. *Curr Med Chem* 11, 1041-1064

Konishi H, Tanaka M, Takemura Y, Matsuzaki H, Ono Y, Kikkawa U, Nishizuka Y (1997): Activation of protein kinase C by tyrosine phosphorylation in response to H₂O₂. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 11233-11237

Koulen P, Thrower EC (2001): Pharmacological modulation of intracellular Ca²⁺ channels at the single-channel level. *Mol Neurobiol* 24, 65-86

Kraig RP, Nicholson C (1978): Extracellular ionic variations during spreading depression. *Neuroscience* 3, 1045-1059

Krieger-Brauer HI, Kather H (1992): Human fat cells possess a plasma membrane-bound H₂O₂-generating system that is activated by insulin via a mechanism bypassing the receptor kinase. *J Clin Invest* 89, 1006-1013

Landis GN, Tower J (2005): Superoxide dismutase evolution and life span regulation. *Mech Ageing Dev* 126, 365-379

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

Le Bras M, Clément MV, Pervaiz S, Brenner C (2005): Reactive oxygen species and the mitochondrial signaling pathway of cell death. *Histol Histopathol* 20, 205-219

Leão AA (1951): The slow voltage variation of cortical spreading depression of activity. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 3, 315-321

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

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

Leão AAP, Morison RS (1945): Propagation of spreading cortical depression. *J. Neurophysiol.* 8, 33-45

LeBel CP, Ischiropoulos H, Bondy SC (1992): Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem Res Toxicol* 5, 227-231

Lipton P (1999): Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol Rev* 79, 1431-1568

Lipton P, Whittingham TS (1982): Reduced ATP concentration as a basis for synaptic transmission failure during hypoxia in the in vitro guinea-pig hippocampus. *J Physiol* 325, 51-65

Lo YY, Cruz TF (1995): Involvement of reactive oxygen species in cytokine and growth factor induction of c-fos expression in chondrocytes. *J Biol Chem* 270, 11727-11730

Loschen G, Azzi A, Richter C, Flohé L (1974): Superoxide radicals as precursors of mitochondrial hydrogen peroxide. *FEBS Lett* 42, 68-72

Marnett LJ (2000): Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis* 21, 361-370

Marshall WH (1959): Spreading cortical depression of Leao. *Physiol Rev* 39, 239-279

Masella R, Di Benedetto R, Vari R, Filesi C, Giovannini C (2005): Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J Nutr Biochem* 16, 577-586

Matés JM, Pérez-Gómez C, Núñez de Castro I (1999): Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem* 32, 595-603

Mayer B, Hemmens B (1997): Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells. *Trends Biochem Sci* 22, 477-481

McCall MR, Frei B (1999): Can antioxidant vitamins materially reduce oxidative damage in humans? *Free Radic Biol Med* 26, 1034-1053

- McCord JM, Fridovich I (1969): Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemoglobin (hemocuprein). *J Biol Chem* 244, 6049-6055
- Meier B, Radeke HH, Selle S, Younes M, Sies H, Resch K, Habermehl GG (1989): Human fibroblasts release reactive oxygen species in response to interleukin-1 or tumour necrosis factor- α . *Biochem J* 263, 539-545
- Meldolesi J, Pozzan T (1998): The endoplasmic reticulum Ca^{2+} store: a view from the lumen. *Trends Biochem Sci* 23, 10-14
- Meyer AJ, Dick TP (2010): Fluorescent protein-based redox probes. *Antioxid Redox Signal* 13, 621-650
- Mies G, Iijima T, Hossmann KA (1993): Correlation between peri-infarct DC shifts and ischaemic neuronal damage in rat. *Neuroreport* 4, 709-711
- Mills GC (1957): Hemoglobin catabolism. I. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. *J Biol Chem* 229, 189-197
- Milner PM (1958): Note on a possible correspondence between the scotomas of migraine and spreading depression of Leao. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 10, 705
- Morley P, Hogan MJ, Hakim AM (1994): Calcium-mediated mechanisms of ischemic injury and protection. *Brain Pathol* 4, 37-47
- Moskowitz MA, Reinhard JF, Jr., Romero J, Melamed E, Pettibone DJ (1979): Neurotransmitters and the fifth cranial nerve: is there a relation to the headache phase of migraine? *Lancet* 2, 883-885
- Müller M, Somjen GG (1999): Intrinsic optical signals in rat hippocampal slices during hypoxia-induced spreading depression-like depolarization. *J Neurophysiol* 82, 1818-1831
- Müller M, Somjen GG (2000): Na^+ dependence and the role of glutamate receptors and Na^+ channels in ion fluxes during hypoxia of rat hippocampal slices. *J Neurophysiol* 84, 1869-1880
- 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
- Nakamura H, Nakamura K, Yodoi J (1997): Redox regulation of cellular activation. *Annu Rev Immunol* 15, 351-369

Nathan C, Xie QW (1994): Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell* 78, 915-918

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

Nicholson C, Kraig RP (1981): The behavior of extracellular ions during spreading depression. Elsevier/North-Holland Biomedical Press 217-238

Ormö M, Cubitt AB, Kallio K, Gross LA, Tsien RY, Remington SJ (1996): Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Science* 273, 1392-1395

Pinchuk I, Schnitzer E, Lichtenberg D (1998): Kinetic analysis of copper-induced peroxidation of LDL. *Biochim Biophys Acta* 1389, 155-172

Radi R, Cassina A, Hodara R, Quijano C, Castro L (2002): Peroxynitrite reactions and formation in mitochondria. *Free Radic Biol Med* 33, 1451-1464

Reid KH, Marrannes R, Wauquier A (1988): Spreading depression and central nervous system pharmacology. *J Pharmacol Methods* 19, 1-21

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

Royall JA, Ischiropoulos H (1993): Evaluation of 2',7'-dichlorofluorescein and dihydrorhodamine 123 as fluorescent probes for intracellular H₂O₂ in cultured endothelial cells. *Arch Biochem Biophys* 302, 348-355

Saatman KE, Duhaime AC, Bullock R, Maas AI, Valadka A, Manley GT, Workshop Scientific T, Advisory Panel M (2008): Classification of traumatic brain injury for targeted therapies. *J Neurotrauma* 25, 719-738

Schmidt-Kastner R, Freund TF (1991): Selective vulnerability of the hippocampus in brain ischemia. *Neuroscience* 40, 599-636

Sheehan D, Meade G, Foley VM, CA D (2001): Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem J* 360, 1-16

Shuttleworth CW, Brennan AM, Connor JA (2003): NAD(P)H fluorescence imaging of postsynaptic neuronal activation in murine hippocampal slices. *J Neurosci* 23, 3196-3208

Sies H, Stahl W, Sevanian A (2005): Nutritional, dietary and postprandial oxidative stress. *J Nutr* 135, 969-972

Siesjö BK (1986): Calcium and ischemic brain damage. *Eur Neurol* 25 Suppl 1, 45-56

Slater AF, Stefan C, Nobel I, van den Dobbelen DJ, Orrenius S (1995): Signalling mechanisms and oxidative stress in apoptosis. *Toxicol Lett* 82-83, 149-153

Smith AR, Shenvi SV, Widlansky M, Suh JH, Hagen TM (2004): Lipoic acid as a potential therapy for chronic diseases associated with oxidative stress. *Curr Med Chem* 11, 1135-1146

Sohal RS, Allen RG (1985): Relationship between metabolic rate, free radicals, differentiation and aging: a unified theory. *Basic Life Sci* 35, 75-104

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

Somjen GG, Aitken PG (1984): The ionic and metabolic responses associated with neuronal depression of Leão's type in cerebral cortex and in hippocampal formation. *An Acad Bras Cienc* 56, 495-504

Srinivasan A, Lehmler HJ, Robertson LW, Ludewig G (2001): Production of DNA strand breaks in vitro and reactive oxygen species in vitro and in HL-60 cells by PCB metabolites. *Toxicol Sci* 60, 92-102

Stadtman ER (1992): Protein oxidation and aging. *Science* 257, 1220-1224

Stadtman ER (2004): Role of oxidant species in aging. *Curr Med Chem* 11, 1105-1112

Streeter J, Schickling BM, Jiang S, Stanic B, Thiel WH, Gakhar L, Houtman JC, Miller FJ, Jr. (2014): Phosphorylation of Nox1 regulates association with NoxA1 activation domain. *Circ Res* 115, 911-918

Sundaresan M, Yu ZX, Ferrans VJ, Irani K, Finkel T (1995): Requirement for generation of H₂O₂ for platelet-derived growth factor signal transduction. *Science* 270, 296-299

Suzuki R, Yamaguchi T, Inaba Y, Wagner HG (1985): Microphysiology of selectively vulnerable neurons. *Prog Brain Res* 63, 59-68

Suzuki YJ, Tsuchiya M, Packer L (1993): Antioxidant activities of dihydrolipoic acid and its structural homologues. *Free Radic Res Commun* 18, 115-122

Tanaka E, Yamamoto S, Kudo Y, Mihara S, Higashi H (1997): Mechanisms underlying the rapid depolarization produced by deprivation of oxygen and glucose in rat hippocampal CA1 neurons in vitro. *J Neurophysiol* 78, 891-902

Trachootham D, Lu W, Ogasawara MA, Nilsa RD, Huang P (2008): Redox regulation of cell survival. *Antioxid Redox Signal* 10, 1343-1374

Tsien RY (1998): The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem* 67, 509-544

Tsuzuki T, Nakatsu Y, Nakabeppu Y (2007): Significance of error-avoiding mechanisms for oxidative DNA damage in carcinogenesis. *Cancer Sci* 98, 465-470

Umansky V, Rocha M, Breitzkreutz R, Hehner S, Bucur M, Erbe N, Droge W, Ushmorov A (2000): Glutathione is a factor of resistance of Jurkat leukemia cells to nitric oxide-mediated apoptosis. *J Cell Biochem* 78, 578-587

Ushmorov A, Ratter F, Lehmann V, Dröge W, Schirmacher V, Umansky V (1999): Nitric-oxide-induced apoptosis in human leukemic lines requires mitochondrial lipid degradation and cytochrome C release. *Blood* 93, 2342-2352

Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M (2006): Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 160, 1-40

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J (2007): Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 39, 44-84

Van Harreveld A (1959): Compounds in brain extracts causing spreading depression of cerebral cortical activity and contraction of crustacean muscle. *J Neurochem* 3, 300-315

Van Harreveld A, Stamm JS (1954): Consequences of cortical convulsive activity in rabbit. *J Neurophysiol* 17, 505-520

Vyskocil F, Kritiz N, Bures J (1972): Potassium-selective microelectrodes used for measuring the extracellular brain potassium during spreading depression and anoxic depolarization in rats. *Brain Res* 39, 255-259

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

Whittingham TS, Lust WD, Passonneau JV (1984): An in vitro model of ischemia: metabolic and electrical alterations in the hippocampal slice. *J Neurosci* 4, 793-802

Woitzik J, Hecht N, Pinczolits A, Sandow N, Major S, Winkler MK, Weber-Carstens S, Dohmen C, Graf R, Strong AJ et al. (2013): Propagation of cortical spreading depolarization in the human cortex after malignant stroke. *Neurology* 80, 1095-1102

Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR (1980): Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 68, 251-306

Young JN, Somjen GG (1992): Suppression of presynaptic calcium currents by hypoxia in hippocampal tissue slices. *Brain Res* 573, 70-76

Zimmer M (2002): Green fluorescent protein (GFP): applications, structure, and related photophysical behavior. *Chem Rev* 102, 759-781

Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. rer. nat. M. Müller und den Mitarbeitern seiner Arbeitsgruppe im Institut für Neuro- und Sinnesphysiologie der Georg-August-Universität Göttingen für die angenehme und produktive Zusammenarbeit bedanken.

Insbesondere möchte ich Herrn Prof. Dr. rer. nat. M. Müller für das interessante Thema meiner Dissertation danken, durch welches ich die Möglichkeit hatte sehr bereichernde Einblicke in die experimentelle Durchführung wissenschaftlicher Arbeiten zu erlangen. Seine einzigartige fachliche Expertise und seine motivierende Unterstützung boten mir eine großartige Grundlage diese Arbeit zu realisieren. Vielen Dank für den Vertrauensvorschuss und das geduldige Korrigieren meiner Dissertation!

Mein besonderer Dank gilt außerdem Belinda Kempkes, die mich mit viel Geduld in die Arbeitsschritte meiner Laborarbeiten einwies und mir immer mit guten Ratschlägen zur Seite stand.

Ebenso danke ich meinem Vater Rudolf Berthold Ackermann für das kompetente und ausdauernde Korrekturlesen meiner Dissertation.

Lebenslauf

Am 29. September 1996 wurde ich, Marc André Ackermann, als erster Sohn von Beate Ackermann, geb. Witteler, und Rudolf Berthold Ackermann in Düsseldorf geboren.

Von 2002 bis 2006 besuchte ich die Grundschule in Düsseldorf und wechselte im Anschluss auf das Erasmus Gymnasium in Grevenbroich. Im Juli 2014 beendete ich meine schulische Laufbahn mit der Allgemeinen Hochschulreife.

Zum Sommersemester 2015 immatrikulierte ich mich an der Georg-August-Universität Göttingen im Studiengang Zahnmedizin und bestand im September 2017 meine zahnärztliche Vorprüfung. Im Dezember 2020 schloss ich dann das Zahnmedizinstudium mit Erlangung der zahnärztlichen Approbation ab.

Im Wintersemester 2017/2018 nahm ich die Arbeit an der Dissertation im Institut für Neuro- und Sinnesphysiologie der Georg-August-Universität Göttingen unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. rer. nat. Michael Müller auf. Die Ergebnisse, die im Rahmen dieser wissenschaftlichen Arbeit entstanden, wurden bereits im März 2019 auf der Göttinger Tagung der Neurowissenschaftlichen Gesellschaft vorgestellt.

Tagungsbeiträge

Ackermann MA, Dietrich K, Müller M (2019). Quantitative imaging of spreading-depression associated ROS production. 13th Göttingen Meeting of the German Neuroscience Society, T11-2A