

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

# **Evaluation des Antwortverhaltens des genetisch kodierten optischen Redox- Indikators HyPer**

INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von

Jonathan Weller

aus

Gießen

Göttingen 2019

Dekan: Prof. Dr. Wolfgang Brück

Referent Prof. Dr. Michael Müller

Ko-Referent: Prof. Dr. Stefan Jakobs

Drittreferent: .....

Datum der mündlichen Prüfung: 25.06.2020

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Evaluation des Antwortverhaltens des genetisch kodierten optischen Redox-Indikators HyPer" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den .....

(Unterschrift)

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>I</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>III</b>
<b>Formelverzeichnis</b> .....	<b>IV</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>IV</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>V</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Reaktive Sauerstoff-Spezies .....	3
1.2 Reaktive Stickstoff-Spezies .....	4
1.3 Antioxidantien.....	5
1.4 Die mitochondriale Atmungskette .....	6
1.5 ROS-Generierung innerhalb der Atmungskette.....	8
1.5.1 Kleine synthetische molekulare Farbstoffe ( <i>synthetic small-molecule dyes</i> ).....	10
1.5.2 Genetisch kodierte ROS/Redox-Indikatoren.....	12
<b>2 Material und Methoden</b> .....	<b>16</b>
2.1 Präparation und Herstellung der Zellkultur .....	16
2.2 Transfektion .....	17
2.3 Optische Messungen.....	18
2.4 Lösungen und Kulturmedien .....	20
2.5 Pharmaka und Modulanzien.....	23
2.6 Statistik.....	24
<b>3 Ergebnisse</b> .....	<b>25</b>
3.1 HyPer-Cyto.....	26
3.1.1 Sensibilität von HyPer .....	27
3.1.2 Stabilität von HyPer bei langer H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Applikation .....	29
3.1.3 Mehrfachapplikation von H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	30
3.1.4 Applikation von hohen H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Konzentrationen .....	32
3.1.5 Spezifität von HyPer .....	33
3.1.6 Kalibrierung des Antwortbereiches.....	38
3.1.7 Stabilität von HyPer gegenüber Schwankungen des pH-Werts und der Halidkonzentration .....	39
3.2 HyPer-Mito.....	42
3.2.1 HyPer-Mito-Sensibilität .....	42
3.2.2 Mehrfachapplikation von H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> HyPer-Mito.....	43
<b>4 Diskussion</b> .....	<b>45</b>

---

5	<b>Zusammenfassung</b> .....	51
6	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	52
	<b>Danksagung</b> .....	57

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Mitochondrium und Atmungskette.....	7
Abbildung 2: Inhibitoren der Atmungskette.....	9
Abbildung 3: Darstellung von FRET und RL 5.....	14
Abbildung 4: Schematische Darstellung des Lichtganges im Versuchsaufbau.....	19
Abbildung 5: Licht- und Fluoreszenzmikroskopie der Hippocampus-Zellen.....	25
Abbildung 6: Reversible Antwort von HyPer auf H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	26
Abbildung 7: Dosisabhängige Antwort von HyPer.....	27
Abbildung 8: Dosis-Antwort-Verhalten auf H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -induzierte Anstiege in der Fluoreszenzratio.....	28
Abbildung 9: Hill-Diagramm der H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -bedingten Ratioanstiege.....	29
Abbildung 10: Langzeitgabe von H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	30
Abbildung 11: Mehrfachgabe von H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	31
Abbildung 12: Abnahme der Amplitude in Prozent bei mehrmaliger Applikation gleicher Konzentration.....	32
Abbildung 13: Applikation von 5 mM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> für drei Minuten.....	33
Abbildung 14: tBHP-Applikation für fünf Minuten.....	34
Abbildung 15: Applikation von DEDTC für fünf Minuten.....	35
Abbildung 16: Applikation von 1 mM CN <sup>-</sup> für drei Minuten.....	36
Abbildung 17: Sauerstoffentzug für zehn Minuten.....	37
Abbildung 18: Applikation von 1 mM Glutamat für drei Minuten.....	38
Abbildung 19: Applikation von 10 mM DTT für zehn Minuten.....	39
Abbildung 20: Einfluss einer deutlich veränderten Chloridkonzentration auf das HyPer-Fluoreszenzverhältnis.....	40
Abbildung 21: Biphaseische Antwort von 30 mM Propionat.....	41
Abbildung 22: Fluoreszenzmikroskopisches Bild einer HyPer-Mito-transfizierten Zelle.....	42
Abbildung 23: Antwort-Vergleich von HyPer-Mito zu HyPer-Cyto in der Intensität auf gleiche oxidative Reize.....	43
Abbildung 24: Reaktion von HyPer-Mito auf eine Mehrfachgabe von H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	44
Abbildung 25: Abnahme der Antwort bei Mehrfachapplikation von H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	44

## Formelverzeichnis

Formel 1: Reaktion der NADPH-Oxidase.....	2
Formel 2: Reaktion der Xanthinoxidase .....	3
Formel 3: Reaktion der Stickstoffmonoxid-Synthase.....	4
Formel 4: Glutathionreduktase und Glutathionperoxidase.....	33

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Reaktive Oxygen-Spezies .....	3
Tabelle 2: Entstehung verschiedener ROS.....	4
Tabelle 3: Reaktive Stickstoff-Spezies .....	4
Tabelle 4: Reaktion von Superoxiddismutase, Katalase und Glutathionperoxidase.....	5
Tabelle 5: Reaktion von Glutathionreduktase und Thioredoxinreduktase .....	5
Tabelle 6: Verwendete Lösungen und Kulturmedien.....	21
Tabelle 7: Verwendete Lösungen und Feinchemikalien.....	22
Tabelle 8: Verwendete Pharmaka und Modulanzien .....	23

## Abkürzungsverzeichnis

Ca <sup>2</sup>	Kalzium
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
CCD	<i>charge-coupled-device</i>
CMV	Cytomegalievirus
CN-	Cyanid
CpYFP	<i>circularly permuted yellow fluorescent protein</i>
DCF	2'-7'-Dichlorofluorescein
DCFH	2'-7'-Dichlorodihydrofluorescein
DEDTC	Diethyldithiocarbaminsäure
DHE	Dihydroethidium
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
DNAse	<i>desoxyribonuklease</i>
DTT	1,4-dithio-DL-threitol
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
FCCP	Carbonylcyanid-m-chlorphenylhydrazon
FCS	<i>fetal calf serum</i>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HBBS	<i>Hank's- balanced salt solution</i>
KCl	Kaliumchlorid
MgSO <sub>4</sub>	Magnesiumsulfat
mRNA	<i>messenger RNA</i>
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Natriumdihydrogenphosphat
NaHCO <sub>3</sub>	Natriumhydrogencarbonat
NaOH	Natriumhydroxid
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RNS	<i>reaktive nitrogen species</i>
ROI	<i>region of interest</i>
ROS	<i>reaktive oxygen species</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i>
tBHP	<i>propionate tert-butyl hydroperoxide</i>
UV	Ultraviolettstrahlung
YFP	<i>yellow fluorescent protein</i>



# 1 Einleitung

Prokaryotische und eukaryotische Zellen benötigen Energie, um die verschiedensten Zellprozesse ausführen zu können. Das Aufspalten von energiereichen Verbindungen, die Synthese von Proteinen, das Aufrechterhalten von Membranpotentialen bis hin zur Muskelkontraktion, all diese Prozesse benötigen große Mengen an Energie. Adenosintriphosphat (ATP) ist der universelle Energielieferant in unserem Körper. Durch die Hydrolyse von ATP zu ADP sowie von ADP zu AMP wird Energie frei, die von den Zellen zur Verrichtung von chemischer-, osmotischer- und physikalischer Arbeit genutzt wird.

Michael J. Bueno und Fred W. Kolkhorst von der Abteilung für Biologie, Bewegungs- und Ernährungswissenschaften der Universität San Diego Kalifornien berechneten zur Veranschaulichung für ihre Studierenden den ATP Umsatz von Khalid Khannouchi, dem Sieger des Chicago Marathon. Er beendete diesen in einer Zeit von 2 Stunden und 5 Minuten und setzte ca. 60 kg ATP während des Rennens um. Des Weiteren berechneten sie, dass ein durchschnittlicher Student ungefähr dieselbe Menge ATP am Tag umsetze (Bueno und Kolkhorst 2001).

Die größte Menge von ATP wird in den Mitochondrien produziert. Sie enthalten die wichtigsten Stoffwechselwege wie die Beta-Oxidation, Citratzyklus und die Atmungskette.

Energieriche Verbindungen werden mit Hilfe von Sauerstoff zu  $\text{CO}_2$  und  $\text{H}_2\text{O}$  oxidiert. Die dabei freiwerdende Energie wird für die ATP-Synthese verwendet. Aus einem Molekül Glukose können nach vollständiger Oxidation unter aeroben Bedingungen ca. 29,85 ATP generiert werden (Rich 2003). Im Gegensatz dazu werden unter Ausschluss von Sauerstoff (anaerobe Bedingungen) und somit dem Ausschluss der mitochondrialen Stoffwechselwege nur 2,8-3,2 ATP pro Glukosemolekül generiert (Muir et al. 1985).

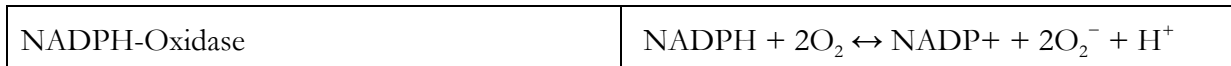
Mitochondrien bieten nicht nur Vorteile für den Organismus. Der Atmungskette, die in den Mitochondrien angesiedelt ist, entweichen stetig Sauerstoffradikale, auch reaktive Oxygen-Spezies (ROS) genannt. Eine Akkumulation von ROS wirkt als Zellgift und könnte zu oxidativen Schäden an Proteinen, DNA und Lipiden der Zellmembran führen. Die Organismen besitzen eine ganze Reihe von Schutzmechanismen (Antioxidantien) gegenüber ROS. Werden jedoch deren Kapazitäten überstiegen, kommt es zur Akkumulation von ROS. Dies kann bis zum Zelluntergang führen. Ein vermehrtes Vorkommen von ROS innerhalb der Zelle bezeichnet man als oxidativen Stress. Das Gleichgewicht zwischen ROS-Produktion und Abwehrmechanismen bezeichnet man als Redox-Homöostase.

ROS spielen in der Pathologie vieler bedeutender Krankheiten eine Rolle wie zum Beispiel in der Pathophysiologie von zerebraler Ischämie, Morbus Parkinson, Morbus Alzheimer, Rett-Syndrom, Atherosklerose und zahlreichen anderen Krankheiten (Valko et al. 2007; Chan 2001; Schulz und

Beal 1994; Behl und Moosmann 2002; Großer et al. 2012) sowie in physiologischen Zellvorgängen.

Phagozytierende Immunzellen machen sich z. B. das Hyperoxid-Anion ( $\cdot\text{O}_2^-$ ) zu Nutze, um Viren und Bakterien zu bekämpfen (Finkel 1998).  $\text{O}_2^-$  wird von NADPH-Oxidasen generiert. Ein Defekt dieser NADPH-Oxidasen führt zu einer erblich bedingten septischen Granulomatose (Immuninsuffizienz) (Morel 2007).

Formel 1: Reaktion der NADPH-Oxidase



In der Zellkommunikation spielen ROS auch eine bedeutende Rolle z. B. als sekundäre Botenstoffe, diese können beispielsweise Signale von der Zelloberfläche an den Zellkern weiterleiten und so z. B. die Translation von Proteinen einleiten.

Wachstumsfaktoren wie PDGF (*platelet-derived growth factor*) und EGF (*epidermal growth factor*) nutzen ROS als sekundären Botenstoff (Finkel 2011). Der Anstieg von ROS bewirkt dabei eine Verschiebung der Redox-Homöostase zu einem oxidierenden Niveau. Das hat zur Folge, dass Sulfhydrylgruppen (SH-Gruppen) der Aminosäure Cystein oxidiert werden. Dies beeinflusst die Quartärstruktur verschiedener Proteine und Enzyme und somit ihre Funktion und Aktivität (Finkel 2011).

Aus den oben genannten Gründen ist das Interesse, ROS besser zu verstehen, erheblich. Insbesondere die spezifische Bedeutung einzelner ROS, wie z. B.  $\text{H}_2\text{O}_2$  und ihre genaue Bedeutung für Zellpathologien und Physiologien gilt es zu untersuchen.

Für die Fluoreszenzmikroskopie (siehe 2.3) wurden verschiedene optische Sensoren entwickelt, mit denen ROS-Level *live* und *in vivo* in Zellkulturen gemessen werden können. Einer dieser Sensoren ist das fluoreszierende Protein HyPer. Laut dem Entwickler Vsevolod Belousov reagiert es ausschließlich mit  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Dies verspricht eine genauere Einsicht in die verschiedenen Prozesse von ROS (Belousov et al. 2006).

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung, ob HyPer für *live-in-vivo*-Messungen an primären Hippocampus-Kulturen von Mäusen geeignet ist. Zum einen wurde getestet, ob HyPer tatsächlich für  $\text{H}_2\text{O}_2$  spezifisch ist oder ob der Sensor auch mit anderen ROS reagiert. Weiterhin habe ich untersucht, ob Veränderungen des zellulären pH-Werts oder der Halidkonzentration HyPer beeinflussen. Außerdem wurde getestet, wie der Sensor auf längere Applikationen von  $\text{H}_2\text{O}_2$  reagiert und wie er sich bei Versuchen mit hohen  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentrationen verhält. Diese Versuche dienen dazu, das Antwortverhalten von HyPer in verschiedenen Experimenten zu untersuchen und zu beurteilen.

## 1.1 Reaktive Sauerstoff-Spezies

Als Radikale bezeichnet man Stoffe, die in ihrer äußersten Elektronenhülle (Valenzelektronen) ein ungepaartes Elektron besitzen. Radikale sind reaktionsfreudig und neigen dazu mit umliegenden Stoffen zu reagieren. Sie entziehen ihrem Reaktionspartner ein Elektron, um ihr ungepaartes Elektron zu paaren. In Zellen kann es so zu deutlichen Beeinträchtigungen kommen, da der Entzug eines Elektrons die Struktur der betroffenen Verbindung verändern kann und somit auch seine Funktion. Schäden können z. B. an Proteinen, DNA und Zellmembran entstehen (Kovacic et al. 2005; Valko et al. 2004).

Sauerstoff ist ein Bi-Radikal mit zwei ungepaarten Elektronen in der äußeren Hülle (Turrens 2003). Molekularer Sauerstoff liegt als Di-Sauerstoff (Dioxygen) vor. Die beiden Sauerstoffatome sind durch eine stabile Doppelbindung miteinander verbunden. Weiterhin kann Sauerstoff aufgrund seiner chemischen Eigenschaften nur mit einem Elektron gleichzeitig reagieren (Murphy 2009). Aus diesen Gründen zeigt Sauerstoff, obwohl es als Bi-Radikal vorliegt, nicht die typischen aggressiv reaktiven Eigenschaften eines Radikals (Turrens 2003).

Wird Sauerstoff durch ein Elektron reduziert, entsteht Superoxid ( $O_2^-$ ), welches deutlich reaktiver als Sauerstoff ist. Aus  $O_2^-$  können über enzymatische Reaktionen oder durch spontane Dismutation andere Radikale wie Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) und das Hydroxyl-Radikal ( $HO\cdot$ ) entstehen (Turrens 2003). Die verschiedenen Sauerstoffradikale werden als reaktive Oxygen-Spezies (ROS) bezeichnet. Der größte ROS-Produzent in der menschlichen Zelle ist die Atmungskette der Mitochondrien (Cadenas und Sies 1998). Ihr entweichen stetig Elektronen, welche Sauerstoff zu Superoxid reduzieren (siehe 1.4). Weitere ROS-Quellen sind die Enzyme Xanthinoxidase und NADPH-Oxidase (siehe Formel 1) (Valko et al. 2007; Turrens 2003). Beide Enzyme produzieren Superoxid als Nebenprodukt ihrer enzymatischen Reaktion.

Formel 2: Reaktion der Xanthinoxidase

$\text{Hypoxanthin} + O_2 + H_2O \rightarrow$	$\text{Xanthin} + O_2^- + 2H$
$\text{Xanthin} + O_2 + H_2O \rightarrow$	$\text{Harnsäure} + O_2^- + 2H$

Tabelle 1: Reaktive Oxygen-Spezies

Superoxid	$O_2^-$
Wasserstoffperoxid	$H_2O_2$
Hydroxyl-Radikal	$HO\cdot$

Tabelle 2: Entstehung verschiedener ROS

Reaktion	Ergebnis	Beschreibung
$O_2 + e^- \rightarrow$	$\cdot O_2^-$	Superoxid entsteht an Komplex I und III
$2 \cdot O_2^- + 2H^+ \rightarrow$	$H_2O_2$	Reaktion der SOD (Superoxiddismutase)
$H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow$	$\cdot OH + OH^- + Fe^{3+}$	Fenton Reaktion
$NO + \cdot O_2^- \rightarrow$	$ONOO^-$	Peroxinitrit, ein RNS (Reaktive nitrogen Spezies)

## 1.2 Reaktive Stickstoff-Spezies

Bei reaktiven Stickstoffspezies handelt es sich um Stickstoffverbindungen mit Radikalcharakter. Stickstoffmonoxid und Peroxinitrit sind die wesentlichen *reactive nitrogen species* (RNS).

Tabelle 3: Reaktive Stickstoff-Spezies

Stickstoffmonoxid	$NO\cdot$
Peroxinitrit	$ONOO^-$

Stickstoffmonoxid besitzt ein ungepaartes Elektron in der äußeren Elektronenschale und ist somit ein Radikal (Valko et al. 2007). Es entsteht größtenteils durch die Reaktion der Stickstoffmonoxid-Synthase.

Formel 3: Reaktion der Stickstoffmonoxid-Synthase

Stickstoffmonoxid-Synthase	$Arginin + 2 O_2 + 1,5 NADPH \rightarrow$ $Citrullin + 2 H_2O + 1,5 NADP + NO$
----------------------------	---

Das deutlich reaktivere Peroxinitrit entsteht bei der Reaktion von NO mit  $\cdot O_2^-$  (siehe Tabelle 2) (Valko et al. 2007).

Stickstoffmonoxid spielt in zahlreichen physiologischen Vorgängen eine Rolle z. B. bei der Blutdruckregulation, bei Immunabwehrmechanismen und in der Relaxation glatter Muskelzellen (Bergendi et al. 1999). Ähnlich der ROS kann es bei Dysregulation der RNS zu nitrosativen Schäden an Proteinen, DNA und Zellmembran kommen (nitrosativer Stress) (Klatt und Lamas 2000).

### 1.3 Antioxidantien

Der ständigen ROS-Produktion der Mitochondrien stehen im Wesentlichen drei Gruppen von Radikalfängern gegenüber. Zum einen Enzyme, die ROS direkt in nicht schädliche Stoffe umwandeln, wie zum Beispiel Superoxiddismutase, Katalase und Glutathionperoxidase (siehe Tabelle 4).

Tabelle 4: Reaktion von Superoxiddismutase, Katalase und Glutathionperoxidase

Superoxiddismutase	$2\text{O}^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}^2$
Katalase	$2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$
Glutathionperoxidase	$2\text{GSH} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{GS-SG} + 2\text{H}_2\text{O}$

Zum anderen Antioxidantien, die durch ihr niedriges Redox-Potential ROS abfangen, bevor diese mit Zellstrukturen interagieren, wie zum Beispiel Glutathion, Peroxiredoxin und Thioredoxin. Glutathion ist von besonderer Bedeutung, da es in großen Mengen im Cytosol, Zellkern und Mitochondrium vorhanden ist (Valko et al. 2007). Das Verhältnis von GSH zu GSSG kann zur Beurteilung des Redoxstatus der Zelle herangezogen werden und ist somit auch ein Indikator für oxidativen Stress (Nogueira et al. 2004).

Die dritte Gruppe von Radikalfängern bilden Enzyme, die verbrauchte Antioxidantien reduzieren, sodass diese erneut zur Verfügung stehen. Dazu gehören die Thioredoxinreduktase und die Glutathionreduktase (siehe Tabelle 5).

Tabelle 5: Reaktion von Glutathionreduktase und Thioredoxinreduktase

Glutathionreduktase	$\text{GS-SG} + \text{NADPH}/\text{H}^+ \rightarrow 2\text{GSH} + \text{NADP}^+$
Thioredoxinreduktase	$\text{NADPH} + \text{H}^+ + \text{Trx-S}_2 \rightarrow \text{NADP}^+ + \text{Trx-(SH)}_2$

## 1.4 Die mitochondriale Atmungskette

ATP ist der Energielieferant jeder Zelle. Es wird für eine Vielzahl von Prozessen benötigt und spielt eine entscheidende Rolle in jedem lebenden Organismus. Besonders Neuronen benötigen eine große Menge ATP, denn Grundlage der neuronalen Funktion ist die kontinuierliche Aufrechterhaltung des Membranpotentials. Dieser Prozess wird unter anderem von der Natrium/Kalium-ATPase gewährleistet. Nach einigen Aktionspotentialen sorgt diese für die Aufrechterhaltung des Membranpotentials, sodass die Zelle erregbar bleibt. Eine ständige und ausreichende Versorgung mit ATP ist somit Grundlage für die Aktivität jedes Neurons.

Energiereiche Verbindungen, vor allem Lipide und Kohlehydrate, werden während der  $\beta$ -Oxidation und Glykolyse zu Acetyl-CoA abgebaut, welches dem Citratzyklus im Mitochondrium zugeführt wird. In diesem entsteht aus Acetyl-CoA NADH/H<sup>+</sup>, FADH<sub>2</sub>, GTP, ATP und CO<sub>2</sub> (Lodish et al. 2000). Die Elektronen der Reduktionsäquivalente NADH/H<sup>+</sup> und FADH<sub>2</sub> werden in der Atmungskette in mehreren Schritten auf Sauerstoff übertragen. Dieser wird anschließend mit Wasserstoff aus der Mitochondrien-Matrix zu Wasser reduziert ( $\frac{1}{2} \text{O} + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}$ ) (Lodish et al. 2000). Die Summenformel dieser Reaktion entspricht der Knallgasreaktion, einer stark exothermen Reaktion. Da diese Reaktion jedoch in der Atmungskette auf drei Schritte aufgeteilt wird, wird die Energie sukzessive frei und es kommt zu keinen Zellschäden. Die kontrolliert freiwerdende Energie wird zum Aufbau eines Protonengradienten genutzt, welcher die ATP-Synthase antreibt.

Die Atmungskette besteht aus insgesamt vier Komplexen (siehe Abbildung 2), die sich in der Innenmembran der Mitochondrien befinden (Barrientos et al. 2009). An Komplex I und II geben die Reduktionsäquivalente ihre Elektronen an die Atmungskette ab. Von dort werden die Elektronen mittels Ubichinon (Coenzym Q) zu Komplex III transportiert. Cytochrom C transportiert von dort die Elektronen einzeln zum Komplex IV. Dort wird Sauerstoff gebunden und mittels vier Elektronen zu Wasser reduziert (Alberts et al. 2002). Komplex I, III und IV dienen als Protonenpumpen, die während des Elektronentransports Protonen von der Matrix in den Intermembranraum schleusen (Alberts et al. 2002). Da die Innenmembran der Mitochondrien für geladene Teilchen undurchlässig ist, können die Protonen nicht ohne einen Kanal oder einen Transporter ihrem osmotischen Gefälle folgen. Dieses Gefälle bildet das mitochondriale Membranpotential. Der Protonengradient ist die treibende Kraft für die ATP-Synthetase (F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>ATPase), welche die Bildung von ATP aus ADP und anorganischem Phosphat (P<sub>i</sub>) katalysiert (Alberts et al. 2002). Die F<sub>0</sub>-Einheit ist ein Protonenkanal, durch diesen fließen die Protonen aus dem Intermembranraum entsprechend ihres Gefälles in die Matrix zurück. Der Protonenfluss treibt die rotierende F<sub>1</sub>-Einheit an, welche die ATP-Bildung katalysiert. Dieser gesamte Prozess wird oxidative Phosphorylierung genannt.

Abb. 1a

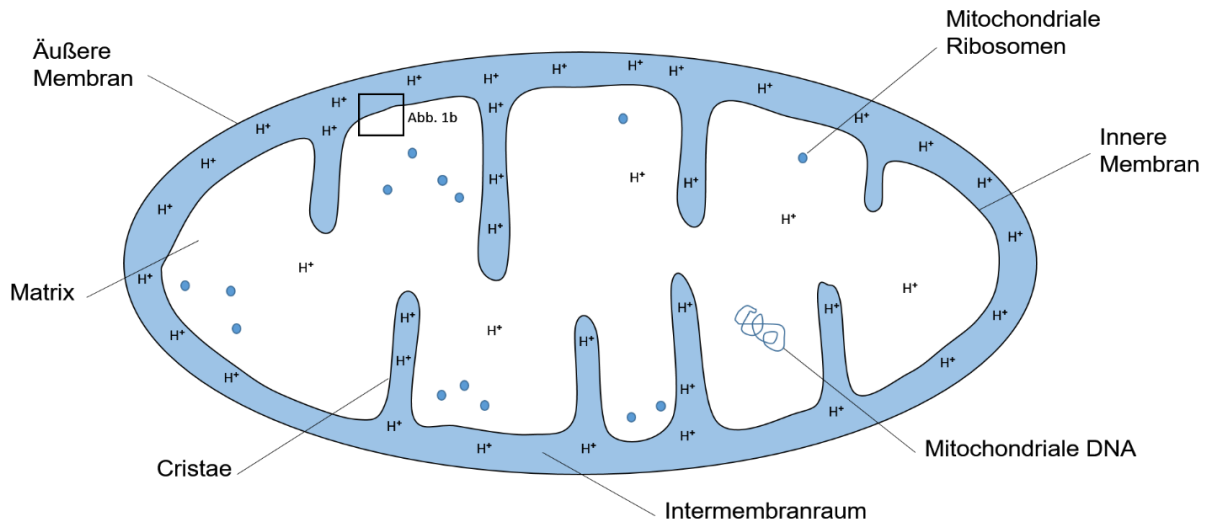
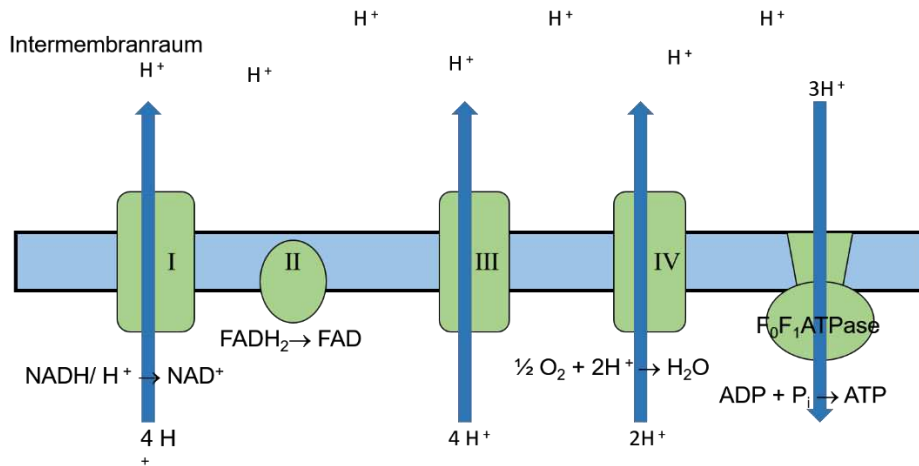


Abb. 1b



Mitochondrien-Matrix

Komplex I = NADH- Dehydrogenase  
 Komplex II = Succinat- Dehydrogenase  
 Komplex III = Cytochrom-c-Reduktase  
 Komplex IV = Cytochromoxidase

### Abbildung 1: Mitochondrium und Atmungskette

Die Atmungskette ist in der inneren Membran des Mitochondriums verankert (1a). Dort geben die Reduktionsäquivalente  $\text{NADH}/\text{H}^+$  und  $\text{FADH}_2$  ihre Elektronen an Komplex I und II ab. Diese durchlaufen die Atmungskette (1b) und reduzieren an Komplex IV Sauerstoff zu Wasser. Komplexe I, III und IV pumpen Protonen in den Intermembranraum. Diese Protonendifferenz zwischen Matrix und Intermembranraum bildet das Membranpotential des Mitochondriums, welches die  $\text{F}_0\text{F}_1\text{ATPase}$  antreibt. In Blau ist die innere Membran des Mitochondriums dargestellt, in Grün die verschiedenen Komplexe der Atmungskette. Die blauen Pfeile zeigen die Flussrichtungen der Protonen an.

## 1.5 ROS-Generierung innerhalb der Atmungskette

ROS entstehen vorwiegend an Komplex I und III der Atmungskette (Finkel 2011; Turrens 2003). An diesen besteht die Möglichkeit, dass die Elektronen einzeln von Flavoproteinen und Eisen-Schwefel-Komplexen der Atmungskette auf Sauerstoffe übertragen werden, welche dadurch zu Superoxid reduziert werden (Turrens 2003). Das kurzlebige Superoxid bildet den Ursprung aller ROS, es wird durch enzymatische Umwandlung oder spontane Dismutation zu den anderen Formen von ROS (siehe Tabelle 2). Aufgrund ihrer Stabilität verfügen stabilere ROS-Verbindungen wie z. B.  $\text{H}_2\text{O}_2$  über eine größere Reichweite als das instabile Superoxid. Infolgedessen können stabile ROS-Verbindungen auch außerhalb des Mitochondriums Zellschäden verursachen.

Unter physiologischen Bedingungen entsteht im menschlichen Gehirn die größte Menge ROS an Komplex I der Atmungskette (Murphy 2009; Turrens 2003). Ein möglicher Zustand, in dem Komplex I vermehrt ROS produziert, herrscht vor, wenn der Bedarf an ATP in der Zelle so niedrig ist, dass das Angebot von  $\text{NADH}/\text{H}^+$  und  $\text{FADH}_2$  bei weitem den Bedarf überschreitet. In diesem Fall ist der überwiegende Teil an Ubichinon reduziert und es kann keine weiteren Elektronen aufnehmen. Dies führt zu einer Elektronenakkumulation, die dann auf die FMN-Einheit (Flavinmononukleotid) des Komplex I zurückfließen (Murphy 2009). Hier werden sie unter anderem auf Sauerstoff übertragen und es entsteht Superoxid, welches zu ROS und RNS umgewandelt werden kann.

Ein weiterer Entstehungsort für ROS ist Komplex III der Atmungskette. Ubichinon überträgt zwei Elektronen in Einzelschritten auf Cytochrom C, da dieses nur ein Elektron binden und transportieren kann. Die Übertragung beider Elektronen gelingt durch den Q-Zyklus. Während des Q-Zyklus kann es aufgrund von Autooxidation zur ROS Entstehung kommen (Murphy 2009; Turrens 2003).

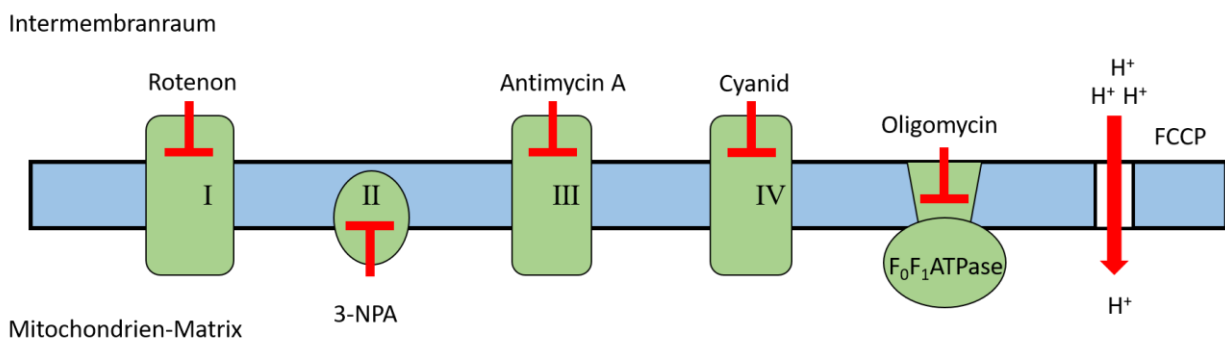
Bestimmte Substanzen können selektiv die Funktion der einzelnen Komplexe der Atmungskette so beeinflussen, dass der Elektronenfluss im jeweiligen Komplex inhibiert wird und sich die Elektronen in den vorgeschalteten Komplexen aufstauen (Abbildung 2). Dies hat zur Folge, dass alle Komplexe vor der Blockade vollständig reduziert und alle Komplexe hinter der Blockade vollständig oxidiert sind (Turrens 2003). Den Komplexen vor der Blockade entweichen vermehrt Elektronen, die  $\text{O}_2$  reduzieren, sodass vermehrt ROS entsteht.

Das Insektizid Rotenon und die 3-Nitropropionsäure (3-NPA), welche von einigen Pilzen gebildet wird, blockieren an Komplex I und II den Elektronentransfer auf Ubichinon. Antimycin A blockiert die  $\text{Q}_i$ -Seite im Q-Zyklus und behindert so den Elektronenfluss am Komplex III. Cyanid behindert im Komplex IV die Elektronenübertragung auf Sauerstoff und Oligomycin blockiert die  $\text{F}_0$ -Einheit der ATPase, sodass die ATP-Produktion zum Erliegen kommt. Der künstliche Entkoppler FCCP (Carbonylcyanid-m-chlorphenylhydrazon) bildet in diesem Zusammenhang eine Ausnahme, da er keinen Komplex direkt blockiert. FCCP ist ein Ionophor, der einen Rückfluss der Protonen zur Mitochondrien-Matrix ermöglicht.



Dadurch bricht das mitochondriale Membranpotential zusammen und somit die Triebkraft der ATPase. Der Organismus muss unter diesen Bedingungen maximal Reduktionsäquivalente in die Atmungskette einführen und vermehrt Respiration betreiben, um ATP zu generieren (Shabalina und Nedergaard 2011). Folge der vermehrten Arbeit der Atmungskette ist ein verstärktes Entweichen von ROS.

Die Ausführungen über die verschiedenen Medikamente sollen die Entstehung von ROS veranschaulichen. Oxidative Schäden an den jeweiligen Angriffspunkten der Medikamente können ähnliche Effekte wie die Medikamente selbst zur Folge haben und so die ROS-Entstehung begünstigen und verstärken (Murphy 2009). Von den genannten pharmakologisch wirksamen Stoffen wurde in dieser Arbeit nur Cyanid verwendet.



**Abbildung 2: Inhibitoren der Atmungskette**

Rotenon und 3-NPA blockieren die Elektronenübertragung in Komplex I und II. Antimycin A und Cyanid blockieren den Elektronenfluss in Komplex III und IV. Durch die Wirkung von Oligomycin kommt die  $F_0F_1$ ATPase zum Erliegen. FCCP führt zu einem Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotential. Die Blockade der einzelnen Komplexe führt zu einem Elektronenaufstau in den vorgeschalteten Komplexen, dieser führt zu einer vermehrten Entstehung von ROS.

Für die Fluoreszenzmikroskopie (siehe 2.3) wurden verschiedene Fluoreszenzindikatoren entwickelt, die mit ROS reagieren und diese somit sichtbar und messbar machen. Die Anforderungen an einen solchen Sensor sind vielfältig. Er sollte spezifisch für eine bestimmte Form von ROS sein z. B.  $H_2O_2$  oder  $HO\cdot$ . Dies ermöglicht die Bedeutung spezifischer ROS in der Zelle genauer zu untersuchen. Der Fluoreszenzindikator sollte bei geringen Konzentrationen schnell reagieren und nach Interaktion schnell wieder in den Ausgangszustand zurückkehren, folglich eine schnelle und reversible Kinetik besitzen. Dies ermöglicht dynamische Messungen und Beobachtungen, auch von kurzen Ereignissen. Das Signal des Fluoreszenzindikators sollte sich deutlich von dem Hintergrundsignal und dem Hintergrundrauschen hervorheben, sodass es nicht zu Signalartefakten kommt. Außerdem sollte er resistent gegenüber Photobleichung sein. Weiterhin sollte der Sensor nicht selbst zur Radikalentstehung beitragen, dies würde das Signal verfälschen. Er sollte leicht in die zu untersuchende Zelle einzuschleusen sein und nicht mit physiologischen Vorgängen interagieren oder diese stören (Bioorthogonalität).

Mit einem zytotoxischen Indikator können nur erschwert Aussagen zu physiologischen Vorgängen getroffen werden. Weiterhin sollte der Sensor gezielt in Zellkompartimente einbringbar sein z. B. in das endoplasmatische Retikulum oder Mitochondrium, um auch in diesen Kompartimenten gezielt ROS messen zu können.

Fluoreszenzindikatoren werden hauptsächlich in zwei unterschiedliche Gruppen eingeteilt: *synthetic small-molecule dyes* (kleine synthetische molekulare Farbstoffe) und *genetically-encoded fluorescent probes* (genetisch kodierte Fluoreszenzsensoren). Im Folgenden werden einige der am häufigsten verwendeten Vertreter der jeweiligen Gruppen vorgestellt.

### 1.5.1 Kleine synthetische molekulare Farbstoffe (*synthetic small-molecule dyes*)

#### 1.5.1.1 2'-7'-Dichlorodihydrofluorescein (DCFH)

DCFH überwindet als membrangängiges Diacetat (DCFH-DA) die Zellmembran. In der Zelle werden die Esterreste von DCFH durch die zelleigenen Esterase hydrolysiert und der Farbstoff akkumuliert in der Zelle. Erst durch die Übertragung von zwei Elektronen, welche beispielsweise von  $H_2O_2$  bereitgestellt werden, fluoresziert DCFH. Fluoreszierendes DCF (2'-7'-Dichlorofluorescein) kann mittels Fluoreszenzmikroskopie oder Durchflusszytometrie detektiert werden. Es wird bei einer Wellenlänge von 485 nm angeregt und hat sein Emissionsmaximum bei 527 nm (Aranda et al. 2013).

DCFH ist nicht selektiv für eine bestimmte ROS-Verbindung. Die Oxidation von DCFH kann auch durch Cytochrom C und die Häm-Peroxidase katalysiert werden. Dies kann zu einem Signal sogar in der Abwesenheit von ROS führen. Zusätzlich kann die Übertragung von nur einem Elektron dazu führen, dass DCFH selbst zu einem Radikal wird und somit zur ROS-Bildung beiträgt. Außerdem ist dieser Farbstoff sehr lichtsensitiv und kann durch Photoanregung ausbleichen oder es kommt zur Photooxidation. Diese Oxidation von DCHF ist irreversibel. Das durch Oxidation entstandene DCF ist auch membrangängig und kann folglich aus der zu untersuchenden Zelle diffundieren (Wang et al. 2013). Diese Eigenschaften machen die Interpretation von erlangten Ergebnissen schwierig.

#### 1.5.1.2 Dihydroethidium (DHE)

Dihydroethidium (DHE) wird von Superoxid zu 2-Hydroxyethidium ( $2-OH-E^+$ ) irreversibel oxidiert. DHE wird bei einer Wellenlänge von 350 nm angeregt und hat ein Emissionsmaximum bei 518 nm. Das Spektrum verschiebt sich nach Reaktion mit Superoxid.  $2-OH-E^+$  wird am effektivsten bei 400 nm angeregt und hat sein Emissionsmaximum bei 605 nm.

Diese Verschiebung im Erregungs- und Emissionsspektrum ermöglicht die Messung von Superoxid. MitoSOX ist ein DHE-Derivat, das sich speziell in Mitochondrien anreichert. Es unterscheidet sich von DHE durch eine positiv geladene Triphenylphosphoniumgruppe ( $\text{TTP}^+$ ). MitoSOX reagiert wie DHE mit Superoxid und lagert sich an die mitochondriale DNA (mtDNA) an (Wang et al. 2013). Oxidiertes DHE neigt wie auch MitoSOX zur Bindung an Nukleinsäuren und akkumuliert somit im Zellkern. Dies erschwert die Interpretation, da der Ort der Fluoreszenz nicht dem Ort der Oxidation des Farbstoffes entspricht.

Wenn DHE von anderen ROS durch zwei Elektronen oxidiert wird entsteht ein Ethidiumkation, welches ein überlappendes Fluoreszenzspektrum mit  $2\text{-OH-E}^+$  hat. Dies erschwert die Messung von DHE, das von Superoxid oxidiert wurde. Eine Anregung von  $2\text{-OH-E}^+$  ohne gleichzeitig das Ethidiumkation anzuregen ist möglich, jedoch technisch herausfordernd (Dikalov und Harrison 2014). Ein weiterer Kritikpunkt ist, dass sowohl DHE als auch MitoSOX zur Photobleichung und zur Selbstoxidation neigen. Des Weiteren stört MitoSOX bei erhöhter Konzentration den Mitochondrien-Stoffwechsel (Wang et al. 2013).

### 1.5.1.3 Boronsäure-basierende Farbstoffe

Auf Boronsäure basierende Fluoreszenzfarbstoffe sind mit einem Boronat substituiert. Dies schützt den Farbstoff vor unspezifischen Reaktionen und auch die Zelle vor ungewollten Interaktionen mit dem Fluorophor. Das Boronat wirkt als Quencher und unterdrückt die Fluoreszenz des Farbstoffs.  $\text{H}_2\text{O}_2$  trennt spezifisch das Boronat durch einen nukleophilen Angriff vom Fluorophor und führt somit zur Aufhebung des Quenching-Effekts. Beispiele für diese Art von Indikator sind Peroxy Yellow 1-Methy-Ester (PY1-ME) und Peroxyfluor 6-Acetoxy-methyl-Ester (PF6-AM). Diese Indikatoren gelangen ähnlich wie DCFH als Ester in die Zelle. MitoPY1 ist ein spezifischer Farbstoff für Mitochondrien. Durch die Addition einer positiv geladenen Triphenylphosphoniumgruppe ( $\text{TTP}^+$ ) lässt sich der Farbstoff ähnlich wie MitoSOX in der Mitochondrienmatrix anreichern.  $\text{H}_2\text{O}_2$  spezifische Sensoren reagieren irreversibel. Somit sind keine dynamischen Messungen möglich. Außerdem reagieren die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -spezifischen Indikatoren auch mit Peroxinitrit, welches vermehrt bei oxidativem Stress vorliegt (Dikalov und Harrison 2014). Das Prinzip dieses Indikators ist vielversprechend und es gibt zahlreiche weiter- und neu entwickelte Varianten wie z. B. Peroxy-Caged Luciferin (PCL). Dabei handelt es sich um einen  $\text{H}_2\text{O}_2$ -chemoselektive Biolumineszenz-Sensor der Echtzeitmessungen in Tiermodellen ermöglicht. Er besteht aus einem mit Boronat substituierten Glühwürmchen-Luciferin. Durch Reaktion mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  wird das Luciferin vom Boronat getrennt, welches daraufhin bioluminesziert (Van de Bittner et al. 2010). PCL ist in der Lage  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration nur bis zu  $2,5 \mu\text{M}$  zu detektieren (Van de Bittner et al. 2010). Da die Probe keiner Anregung bedarf, treten Probleme wie z.B. Photobleichung, Photooxidation und Hintergrundfluoreszenz nicht auf.

## 1.5.2 Genetisch kodierte ROS/Redox-Indikatoren

Genetisch kodierte Sensoren gelangen nicht als bereits funktionsfähige Marker in die Zelle, sondern erst als DNA-Sequenz, z. B. in Form eines Plasmids. Dieser wird von der Zelle transkribiert, sodass in der Zelle selbst erst der Sensor entsteht (siehe 2.2). Durch das Hinzufügen einer spezifischen Zielsequenz in die DNA, kann der Sensor in einzelnen Kompartimenten der Zelle angereichert werden z. B. im Mitochondrium, im Zellkern oder im endoplasmatischen Retikulum (Wang et al. 2013). Das Besondere dieser Gruppe von Sensoren ist ihre reversible ROS-Interaktion. Sie werden vom zelleigenen Antioxidationsystem nach ROS-Oxidation wieder in ihren reduzierten Zustand versetzt. Dies ermöglicht sowohl eine dynamische Messung der ROS-Freisetzung als auch dessen Regulation. Ein weiterer Vorteil genetisch kodierter Sensoren ist ihre geringe Toxizität. In der Regel kommt es erst durch Überexpression zu Störungen des Zellmetabolismus. Die hier vorgestellten Sensoren basieren auf speziellen Modifikationen des grün fluoreszierenden Proteins (GFP). Dieser Fluorophor wurde in der Qualle *Aequorea victoria* entdeckt und findet mittlerweile vielfache Anwendungen in der Wissenschaft.

### 1.5.2.1 YFP (*yellow fluorescent protein*) (gelb fluoreszierendes Protein)

Durch gezielte Mutationen des grün fluoreszierenden Proteins konnten verschiedene Fluorophore mit unterschiedlichen Anregungs- und Emissionseigenschaften entwickelt werden. Einer dieser Mutationen ist YFP, bei dem an Position 203 ein Threonin durch ein Tyrosin ersetzt wurde (Østergaard et al. 2001). Dies hatte die namensgebende Rotverschiebung im Emissionsspektrum zur Folge. Diesem YFP wurden nun zwei redoxreaktive Cystein-Gruppen hinzugefügt, diese bilden durch Oxidation Disulfidbrücken aus (Østergaard et al. 2001). Eine Strukturveränderung in unmittelbarer Nähe des Chromophorenzentrums des YFP führt zu einer Verdopplung der Fluoreszenzamplitude bei gleich bleibendem Anregungs- und Emissionsspektrum (Østergaard et al. 2001). Durch Veränderungen der Fluoreszenzamplitude können Aussagen über den Redoxstatus der Zelle getroffen werden. YFP wird durch Transfektion (siehe 2.2) in die zu untersuchende Zelle integriert und dort exprimiert. Die Oxidation des modifizierten Fluorophors ist reversibel, da dieser durch die Thioredoxinreduktase und Glutathionperoxidase reduziert werden kann. Die Verwendung von YFP hat jedoch auch einen Nachteil, da bereits geringe Verschiebungen des pH-Werts einen Einfluss auf die Fluoreszenzamplitude haben und somit die Interpretation der Ergebnisse deutlich erschwert wird (Østergaard et al. 2001).

### 1.5.2.2 cpYFP (*circularly permuted yellow fluorescent protein*) (zirkulär permutiertes YFP)

Das cpYFP ist ein zirkulär permutiertes YFP, es entsteht durch die Zusammenführung des C- und N-Terminus des Sensors. CpYFP ist spezifisch für Superoxid, seine Oxidation ist reversibel, und es kann gezielt in einzelne Zellkompartimente eingebracht werden. Durch die Interaktion mit einem Superoxid reagiert cpYFP mit einer deutlichen Signalverstärkung (Wang et al. 2013). CpYFP scheint ähnlich wie YFP pH-sensitiv zu sein und auch die beschriebene Superoxid-Spezifität ist unklar (Schwarzländer et al. 2011; Schwarzländer et al. 2012).

### 1.5.2.3 roGFP (*reduction-oxidation-sensitive green fluorescent protein*) (reduktions- und oxidations sensitives grün fluoreszierendes Protein)

RoGFP Indikatoren leiten sich von dem nativen grün fluoreszierenden Protein (GFP) ab. Die Aminosäuren an Position 147 und 204 des GFP wurden durch Cystein ersetzt, wodurch es redoxsensitiv wird. Diese exponiert liegenden Cysteine befinden sich nahe dem Chromophorenzentrum des roGFP und bilden bei Oxidation Disulfidbrücken aus. Dies führt zur Konformationsänderung des Proteins und beeinflusst dessen Chromophoreigenschaften, ähnlich dem veränderten YFP. Reduziertes roGFP hat zwei Anregungsmaxima bei 390 nm und 470 nm. Durch Oxidation kommt es zu einer Verstärkung des Anregungsmaximums bei 390 nm und einer proportionalen Senkung des Maximums bei 470 nm (Hanson et al. 2004). Somit werden die Anregungsmaxima excitations-ratiometrisch (siehe 2.3) im Vergleich zueinander bei Oxidation und Reduktion ( $F_{390\text{ nm}}/F_{470\text{ nm}}$ ) gemessen. Derartige Messungen haben einige Vorteile gegenüber Messungen, bei denen ausschließlich die Fluoreszenzintensität nur einer Wellenlänge gemessen wird (siehe 2.3). RoGFP ist ein Redoxindikator und misst ROS nicht direkt. Es spiegelt das Verhältnis von oxidiertem und reduziertem Glutathion innerhalb der Zelle wieder und ermöglicht so Rückschlüsse auf das ROS-Niveau der Zelle (Meyer und Dick 2010). RoGFP reagiert reversibel und zeigt keine signifikante Beeinflussung durch pH-Wert-Änderungen im Vergleich zu z. B. YFP (Funke et al. 2011). Außerdem ist roGFP für längere Versuche geeignet, da z. B. Photobleichung durch die excitations-ratiometrischen Eigenschaften keine Bedeutung hat.

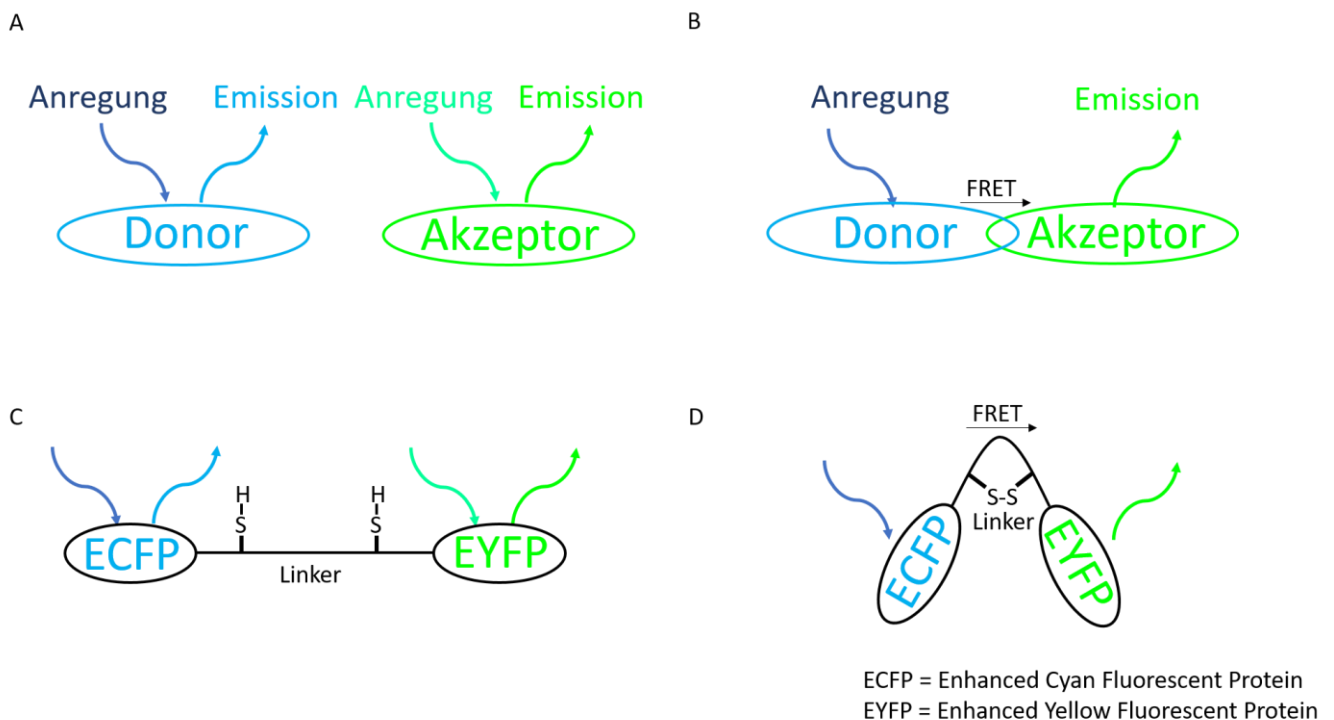
### 1.5.2.4 Förster-Resonanzenergietransfer (FRET)-basierende Redox-Marker

Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) ist eine Form des Energietransfers von einem Farbstoff zu einem anderen.

Ein optisch angeregtes Fluorophor, auch Donor genannt, überträgt seine Energie mittels Dipolkopplung auf ein anderes Fluorophor (Akzeptor), ohne dabei Strahlung abzugeben. Der Akzeptor wird durch die übertragene Energie in einen angeregten Zustand versetzt und emittiert ein Photon, wenn er in seinem Grundzustand zurückfällt. Die Energieübertragung ist umso effektiver, je näher die beiden Moleküle einander anliegen. Der Abstand muss geringer als 10 nm sein, damit FRET effektiv stattfindet (Kolossoff et al. 2008). Für FRET muss das Emissionsspektrum des Donors im Anregungsspektrum des Akzeptors liegen. Das bedeutet, dass der Wellenlängenbereich, in dem der Donor Licht emittiert dem Wellenlängenbereich entspricht, in dem der Akzeptor angeregt wird. Wenn FRET stattfindet hat das Signal die Wellenlänge des Akzeptors, obwohl im Idealfall nur der Donor angeregt wurde.

## 1.5.2.5 Cyan-RL5-Yellow

Der FRET-Sensor besteht aus zwei Fluorophoren, die durch einen redoxsensitiven Linker (RL) miteinander verbunden sind. In diesem Fall dient das *enhanced cyan fluorescent protein* (ECFP) als Donor, das *enhanced yellow fluorescent protein* (EYFP) als Akzeptor. Der Linker besteht aus  $\alpha$ -Helixstrukturen, denen vier benachbarte Cysteine hinzugefügt wurden. Durch Oxidation kommt es zwischen den Cysteinen zu Disulfidbrückenbildung. Die Konformation des Linkers verändert sich so, dass sich der Abstand zwischen den Fluorophoren verkürzt und FRET stattfinden kann (siehe Abbildung 3) (Kolossoff et al. 2008). ECFP kann gezielt angeregt werden. Im reduzierten Zustand entspricht die Emission dem Emissionsspektrum von ECFP. Durch FRET entspricht die Emission bei Oxidation dem Emissionsspektrum von EYFP. Die Signale können zueinander in ein Verhältnis gesetzt werden und ermöglichen ratiometrische Messungen. Ein Nachteil von RL5 ist, dass es nicht für eine bestimmte ROS-Verbindung spezifisch ist. Die Schwefelreste der Cysteine können von verschiedenen ROS oxidiert werden. Der Sensor reagiert reversibel mit ROS und liefert semiquantitative Ergebnisse. Oxidierte Thiole der Cysteine werden von Thioredoxinreduktase und Glutathionperoxidase reduziert und können erneut mit ROS reagieren (Wang et al. 2013).



**Abbildung 3: Darstellung von FRET und RL 5**

A) Donor und Akzeptor sind für FRET zu weit entfernt. Bei Anregung emittieren beide Fluorophore. B) Donor und Akzeptor liegen nah genug beieinander. FRET findet statt. Nur der Akzeptor emittiert Licht. C) Im reduzierten Zustand hält der Linker Donor und Akzeptor auseinander. FRET findet nicht statt D) Der oxidierte Linker führt Donor und Akzeptor zusammen. FRET findet statt.

### 1.5.2.6 HyPer

Der Sensor HyPer besteht aus einem cpYFP (siehe 1.3.2.2), welches in eine OxyR-Domäne eingefügt wurde. Die OxyR-Domäne entstammt dem Bakterium *Escherichia coli*. Diese Domäne detektiert  $H_2O_2$  und dient dem Bakterium als Transkriptionsfaktor. Bei oxidativem Stress initiiert die OxyR-Domäne die vermehrte Transkription und Translationen von Enzymen wie z. B. der Glutathionreduktase, um die Redoxhomöostase des Bakteriums aufrecht zu erhalten. In der OxyR-Domäne bilden sich bei Oxidation Disulfidbrücken, die die Domänen Konformation ändern und diese in eine aktive Form versetzen (Zheng et al. 1998). Die OxyR-Domäne fungiert in dem Redoxsensor HyPer als ROS-Rezeptor. Ein Vorteil von HyPer ist, dass es zwei Anregungsmaxima hat (420 nm und 500 nm), sein Emissionsmaximum liegt bei 516 nm. Interagiert die OxyR-Domäne mit  $H_2O_2$ , so kommt es zu einer Konformationsänderung wie oben beschrieben. Diese beeinflusst die Fluorophor-Eigenschaften von HyPer. Die Lichtabsorptionseffizienz bei 500 nm steigt in gleichem Maße wie sie bei 420 nm sinkt. Das Emissionsmaximum bleibt unverändert. Diese Eigenschaft ermöglicht ratiometrische Messungen mit HyPer. Des Weiteren ist HyPer  $H_2O_2$  spezifisch und der Sensor lässt sich mittels entsprechender DNA-Zielsequenzen in verschiedenen Zellkompartimenten anreichern, z. B. in den Mitochondrien (HyPer-Mito) (Belousov et al. 2006).

Diese Eigenschaften machen HyPer zu einem vielversprechenden Sensor, den ich in dieser Arbeit auf seine Eignung zur  $H_2O_2$ -Messung in primären Hippocampus-Kulturen der Maus untersucht habe.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Präparation und Herstellung der Zellkultur

Für die Herstellung der Hippocampus-Kulturen wurde Gewebe sowohl aus männlichen als auch aus weiblichen drei bis fünf Tage alten NMRI (*Naval Medical Research Institute*) Mäusen isoliert. Die Organentnahme geschah unter der Einhaltung von nationalen sowie internationalen Tierschutzvorschriften und ist unter dem Eintrag T13.08 „Anoxie-Antwort komplexer neuronaler Netzwerke“ dem Tierschutzbeauftragten/ Tierschutzbüro der Universitätsmedizin Göttingen angezeigt.

Eine Stunde vor der Präparation wurden Deckgläser (Ø13 mm, Heinz Herenz Hamburg, Deutschland) mit 60 µl einer Matrigelplattierungsmediumlösung (Verhältnis 1:50) benetzt. Diese Oberflächenbeschichtung erleichtert es den Neuronen und Gliazellen anzuwachsen.

Alle Lösungen, die für die Präparation verwendet wurden, waren in Eis gekühlt, um den Sauerstoffbedarf des Gewebes zu senken und somit Zellschäden vorzubeugen.

Die Mäuse wurden dekapitiert, anschließend wurden die Kopfhaut und die Schädeldecke entfernt. Mit einem feinen Spatel wurde nun das Gehirn aus dem Schädel gelöst und in eine sterile Petrischale, die mit HBSS (*Hank's-balanced salt solution*) + 20 % FCS (*fetal calf serum*) (siehe 2.5) gefüllt war, überführt. Alle nun folgenden Präparationsschritte wurden unter einer Sterilbank durchgeführt. Mit Hilfe einer Stereolupe wurden die Hemisphären voneinander getrennt. Die Hippocampi wurden frei präpariert, von Bindegewebe befreit und in der Frontalebene in jeweils ca. acht Scheiben geschnitten. Diese wurden mit Hilfe einer Pasteurpipette in ein auf Eis liegendes 15 ml Reaktionsgefäß überführt. Um das Kontaminationsrisiko zu senken, wurden zu den Gewebeschnitten 10 ml HBBS mit 20 % FCS gegeben und wieder entnommen. Dieser Schritt wurde dreimal wiederholt. Anschließend wurden die Gewebeschnitte dreimal nur mit HBBS versetzt. Als nächstes wurden die Schnitte in einer Digestionslösung (2 ml Digestionslösung bestehend aus 10 mg Trypsin und 40 µl DNase (siehe 2.4)) für zehn Minuten bei 37 °C, 95 % O<sub>2</sub> und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Das enthaltene Trypsin spaltet die Proteine der Extrazellulärmatrix, sodass die Zellen aus ihrem Bindegewebsverband herausgelöst werden können. Diese enzymatische Reaktion wird mit HBBS + 20 % FCS gestoppt und die Schnitte nach dem oben erwähnten Schema erneut gewaschen. Um die Zellen zu vereinzeln, wurden die Schnitte in eine Dissoziationspufferlösung gegeben (2 ml Dissoziationslösung und 40 µl DNase (siehe 2.4)). Anschließend wurden die Zellen mit einer Pasteurpipette und dann mit einer feuerpolierten Pasteurpipette mehrfach aufgesogen bis keine Zellverbände mehr zu erkennen waren. Die entstandene Zellsuspension wurde bei 4 °C und 1500 rpm (*revolutions per minute*) für zehn Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in 1 ml Plattierungsmedium resuspendiert. 50 µl der Zellsuspension wurden auf die vorbereiteten



Deckgläschen ausplattiert. In geschlossenen Vier-Kammer-Kulturplatten (Nunc, Deutschland) wurden jeweils vier dieser Deckgläschen für eine Stunde inkubiert (37 °C, 95 % O<sub>2</sub> und 5 % CO<sub>2</sub>).

Dann wurden die Kulturkammern mit 600 µl Plattierungsmedium (siehe 2.4) aufgefüllt. Einen Tag nach der Präparation wurde das Plattierungsmedium durch Wachstumsmedium (siehe 2.4) ersetzt. Das Wachstumsmedium wurde dann alle zwei Tage zur Hälfte erneuert. Pro Präparation entstanden vier Kulturplatten, mit denen innerhalb einer Woche die Messungen durchgeführt wurden.

## 2.2 Transfektion

Transfektion bezeichnet das Einschleusen von fremder DNA oder RNA in eine Zelle. Die DNA/RNA kann über verschiedene Vektoren in die Zelle eingeschleust werden, wie z. B. mittels Lipofektion, Retroviren, Mikroinjektionen und Elektroporation (Felgner et al. 1987).

In dieser Arbeit wurden die zuvor gewonnenen Zellen mittels Lipofektion transfiziert. Bei dieser Methode fusionieren mit DNA beladene Lipidvesikel mit der Zellplasmamembran. Die kationisch geladenen Lipidvesikel nehmen die anionische DNA auf.

Diese Lipid-DNA-Komplexe werden dann zu den Zellen gegeben. Sie fusionieren und geben so die aufgenommene DNA in das Zellsoma ab. Nach der promotorgesteuerten Transkription der eingebrachten DNA wird die mRNA von den Ribosomen abgelesen und es entsteht das gewünschte Protein, in diesem Fall HyPer.

In dieser Arbeit wurde die Transkription mittels CMV (Cytomegalievirus)-Promotor gesteuert und beschleunigt. Die Zielstrukturen der Transfektion waren das Cytosol (HyPer-Cyto) und die Mitochondrien (HyPer-Mito). Die HyPer-Cyto und HyPer-Mito enthaltenden Plasmide wurden vom kommerziellen Anbieter Evrogen bezogen.

Die Transfektion wurde folgendermaßen durchgeführt. Alle Hersteller der hier genannten Medien sind im Kapitel 2.4 aufgeführt.

Es wurden zwei Ansätze vorbereitet, für insgesamt vier Kulturplatten. Der erste Ansatz enthielt 9,6 µl Lipofektamin 2000 (0,5 µl pro Kammer zuzüglich 10 % der Gesamtmenge) und 1,72 ml Opti MEM (98 µl pro Kammer zuzüglich 10 % der Gesamtmenge). Der zweite Ansatz enthielt 10,5 µl Plasmid-DNA-HyPer (0,6 µl pro Kammer zuzüglich 10 % der Gesamtmenge) und 1,72 ml Opti MEM. Die Ansätze wurden jeweils zehn Minuten bei Raumtemperatur (ca. 20 °C) inkubiert. Im nächsten Schritt wurden die beiden Ansätze gemischt und weitere 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert sodass sich Lipid-DNA Komplexe bilden konnten. Das Plattierungsmedium in den Kulturplatten-Kammern wurde entnommen, die Transfektionslösungen in die nun leere Kammer gegeben und für 60 Minuten inkubiert. Anschließend wurde die Transfektionslösung aus den Kammern entnommen, die Zellen mit 200

µl Plattierungsmedium gewaschen und mit 800 µl Wachstumsmedium aufgefüllt. Nach 48-72 Stunden konnten die gewünschten optischen Messungen durchgeführt werden.

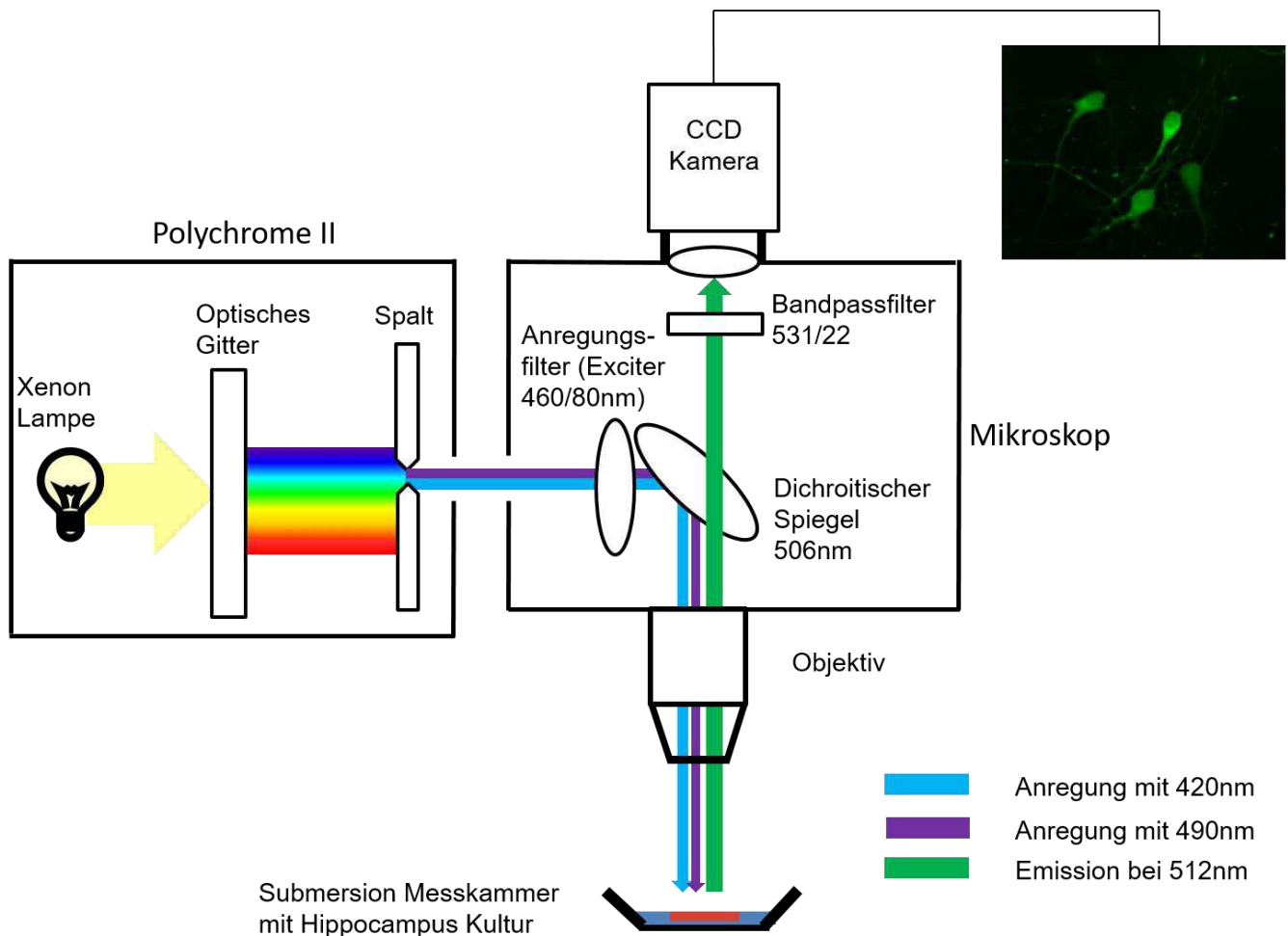
## 2.3 Optische Messungen

Die Fluoreszenzmikroskopie ist eine abgewandelte Form der Lichtmikroskopie. Als Fluoreszenz bezeichnet man die spontane Emission von Licht nach optischer Anregung. Die Elektronen eines Fluorophores werden durch Photonen von energiereichem Licht auf ein höheres Energieniveau gehoben. Bei dem Rückfall auf ihr normales Energieniveau emittieren die Elektronen Licht. Dieses Licht hat stets eine längere Wellenlänge und ist somit energieärmer als das anregende Licht.

In dieser Arbeit wurden folgende Komponenten für die Fluoreszenzmikroskopie verwendet. Eine polychromatische Xeon-Lichtquelle (Polychrome II, Till Photonics) und eine CCD-Kamera (Sensicam qe, PCO), die an einem aufrechtstehenden Mikroskop (Axioskop I, Zeiss) angeschlossen war. *TILLvisION*<sup>®</sup> (Version 4.0.1; Till Photonics) diente als Steuerungs- und Bearbeitungssoftware. Während des Versuchs wurden die Zellen in einer Submersionskammer konstant mit 31-33°C warmer frischer ACSF (*artificial cerebrospinal fluid*) (siehe 2.4) umspült (ca. 3-4 ml/min). Als Objektiv diente ein 60 x 0,9 NA Wasserimmersionsobjektiv (Olympus).

Vor der Messung wurde die ACSF für 30 Minuten in einem 40 °C warmen Wasserbad (Haake) erwärmt und mit einem Carbogen-Gasgemisch (95 % O<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub>) begast. Mit einer Rollenpumpe (Watson Marlow 205S) wurde die ACSF mit 30 rpm (3-4 ml/min) in die Messkammer geleitet und mit einer Unterdruckpumpe aus dieser entnommen. Ein Windkessel war der Messkammer vorgeschaltet, um mögliche Flussschwankungen und Luftblasen abzufangen. So konnte ein konstanter ACSF-Spiegel in der Messkammer erreicht werden.

Auf dem Deckglas gewachsene Zellkulturen wurden in der Mitte der Messkammer platziert und mit einem Platinbügel beschwert. Die Zellkultur wurde fokussiert und unter optischer Anregung wurde eine fluoreszierende Zelle ausgewählt. In dieser Zelle wurde mit *TILLvisION* eine *region of interest* (ROI) gewählt. Mit der ROI wird der Bereich festgelegt, in dem die Veränderungen in der Emission von HyPer gemessen werden. Es ist wichtig, bei der Festlegung der ROI ausreichend Abstand zum Rand der Zelle zu lassen, sollten diese ihre Position ändern. Außerdem wurde die ROI in einen Bereich der Zelle gesetzt, in dem HyPer eine ausreichende und homogene Konzentration zeigte. Der Versuchsaufbau war umgeben von lichtundurchlässigen Folien, um Lichtartefakte durch die Raumbelichtung zu vermeiden.



**Abbildung 4: Schematische Darstellung des Lichtganges im Versuchsaufbau**

Das polychromatische Licht wurde mittels eines beweglichen optischen Gitters in der Beleuchtungseinheit in seine Wellenlängen zerlegt und auf einen Austrittsspalt projiziert, sodass nur Licht der gewünschten Wellenlänge durch den Spalt trat. Das Licht wurde mittels einer optischen Faser zum Mikroskop weitergeleitet. Dort trifft es auf einen Anregungsfilter (460/80 nm) dieser filtert die Ultraviolettstrahlung heraus. Dies ist wichtig, da UV Licht die Zellen in kurzer Zeit abtötet. Nach dem Anregungsfilter fällt das Licht auf einen dichroitischen Spiegel (506 nm). Dieser trennt das Licht bei 506 nm auf, das heißt Licht kleiner 506 nm wird im rechten Winkel reflektiert und mittels Objektiv auf die Zellen fokussiert. Licht mit einer Wellenlänge größer als 506 nm aus der Fluoreszenzanregung in den Zellen wird nicht gespiegelt, sodass die emittierte Fluoreszenz zur CCD-Kamera gelangt.

Die Fluoreszenzemission von HyPer hat eine Wellenlänge von 516 nm (Belousov et al. 2006). Um diese möglichst selektiv zu messen, wurde ein Bandpassfilter (531/22) vor die CCD-Kamera geschaltet. Die Anregungsmaxima von HyPer wurden abwechselnd bei einer Wellenlänge von 420 nm und 490 nm angeregt. HyPer ist excitations-ratiometrisch, bei Oxidation verhält sich die Emission der Anregungsmaxima gegenläufig. Die Emission bei der Anregung von 420 nm sinkt und steigt bei 490 nm. Das emittierte Licht hat eine Wellenlänge von jeweils 516 nm. Das Steuerungsprogramm *TILLvisION* berechnete aus beiden Signalen für die ROI einen Quotienten  $F_{490}/F_{420}$ . Die Bilder wurden mit einer Frequenz von 0,1 Hz aufgenommen.

Die Zellen wurden für 150-250 ms belichtet. Um den Kontrast zu verstärken und das Hintergrundrauschen zu reduzieren, wurde ein  $2 \times 2$  *Binning* (Pixel-Zusammenführung) verwendet. Die Auswertung der Fluoreszenzintensivität und des mittleren Pixel Grauwertes in der ROI erfolgte mittels *TILLvisION*. *TILLvisION* ermöglicht die Beobachtung der Emissionsänderungen in Echtzeit und die Kontrolle der korrekten Position der Zelle nach jeder Aufnahme.

## 2.4 Lösungen und Kulturmedien

Das für die optischen Messungen als Versuchslösung verwendete ACSF besteht aus folgenden Komponenten (in mM): 130 NaCl, 3,5 KCl, 1,25 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 24 NaHCO<sub>3</sub>, 1,2 CaCl<sub>2</sub>, 1,2 MgSO<sub>4</sub> und 10 Dextrose. Für einen stabilen pH-Wert (7,4) und um die Zellen mit ausreichend Sauerstoff zu versorgen, wurde die ACSF konstant mit 95 % O<sub>2</sub> und 5 % CO<sub>2</sub> begast. Außerdem wurde die ACSF in ein 40 °C warmes Wasserbad gestellt, sodass es in der Messkammer eine Temperatur von 31-33 °C hatte. Bei Messungen mit einem ~ 50 % niedrigeren Chloridgehalt wurde der entsprechende Teil durch Natriummethylsulfat ersetzt, welches die Zellmembran nicht durchdringt. Bei Messungen mit 30 mM Propionat wurde der Natriumchloridgehalt entsprechend abgesenkt, um die Osmolarität der ACSF nicht zu verändern.

Sofern nicht anders erwähnt wurden die folgenden Lösungen nach dem Ansetzen sterilfiltriert und bei 4 °C gelagert.

Tabelle 6: Verwendete Lösungen und Kulturmedien

Lösung (100ml)	Zusammensetzung
Kulturmedium	MEM 100 ml, Glukose 0,5 g, NaHCO <sub>3</sub> 0,02 g, Transferrin 0,01 g
Plattierungsmedium	Medium 90 ml, FCS ( <i>fetal calf serum</i> ) (10 %) 9 ml, L-Glutamin
Wachstumsmedium	Medium 95 ml, FCS (10 %) 5 ml, L-Glutamine 0,25 ml, B-27 Supplement 2 ml, Cytosine Arabinoide 50 µl, Penicillin/Streptomycin (10kU/20kU) 1 ml
<i>Hank's balanced salts solutoion</i> (HBSS)	9,5 Hanks Pulver in 1 l destilliertem Wasser lösen, NaHCO <sub>3</sub> 350 mg/l, HEPES 238 mg/l pH mit NaOH auf 7,3-7,4 eingestellt
HBSS mit 20 % FCS ( <i>fetal calf serum</i> )	HBBS 80 ml + 20 ml FCS
Dissoziationslösung	100 ml HBBS, MgSO <sub>4</sub> 0,166 g
Digestionslösung	NaCl 0,8 g, KCl 0,037 g, Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,099 g, HEPES 0,6 g. pH mit NaOH auf 7,3-7,4 eingestellt

Alle Lösungen und Substanzen zur Herstellung der Kulturmedien mit Hersteller:

Tabelle 7: Verwendete Lösungen und Feinchemikalien

<b>Substanz:</b>	<b>Hersteller</b>
B-27 Supplement	Invitrogen
CaCl <sub>2</sub>	Sigma Aldrich
Cytosine Arabinoide	Sigma Aldrich
Dextrose	Merck
DNase	Sigma Aldrich
FCS	Biochrom
Glukose	Sigma Aldrich
Hanks	Sigma Aldrich
HEPES	Sigma
Insulin	Sigma Aldrich
KCl	Roth
L-Glutamine	Invitrogen
Lipofectamine 2000	Invitrogen
MgSO <sub>4</sub>	Merck
MEM	Invitrogen
Matrigel	BD Biosciences
NaCl	Roth
NaHCO <sub>3</sub>	Roth
NaOH	Roth
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Roth
OptiMEM	Invitrogen
Penicillin/Streptomycin	Biochrom
Trypsin	Sigma Aldrich
Transferrin	Calbiochem

## 2.5 Pharmaka und Modulanzen

Um die ROS-Entstehung und das pH-Niveau der Zelle zu beeinflussen wurden verschiedene Pharmaka und Modulanzen verwendet.

Diethyldithiocarbamat (DEDTC), 1,4-dithio-DL-threitol (DTT), Propionat tert-Butyl hydroperoxide (tBHP; 70 % Stammlösung) und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 % Stammlösung) wurden für jede Messung neu angesetzt und in ihren finalen Konzentrationen direkt in die ACSF geben. Glutamat und Cyanid wurden als 1 M Stammlösungen in H<sub>2</sub>O angesetzt, aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Wirkung, Applikation und Lösungsart werden im Folgendem tabellarisch aufgeführt.

Tabelle 8: Verwendete Pharmaka und Modulanzen

Reagenz	Wirkung	Konzentration Aufbewahrung	Konzentration bei Gabe	Hersteller
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	ROS	30 % Stammlösung	10 µM, 20 µM, 50 µM, 100 µM, 200 µM, 500 µM, 1 mM, 2 mM, 5 mM	Sigma-Aldrich
DTT	Reduziert SH- Gruppen	Pulver	10 mM	Sigma-Aldrich
Glutamat	Erregender Neurotransmitter erhöht Ca <sup>2+</sup> - Freisetzung/Einstrom	1 M Aliquots	1 mM	Sigma-Aldrich
tBHP	Starkes Oxidationsmittel, verursacht Zellwandschäden durch Lipidperoxidation	70 % Stammlösung	20 µM	Sigma-Aldrich
CN-	Hemmt Cytochrom-C- Oxidase	1 M Aliquots	1mM	Sigma-Aldrich
DEDTC	Hemmt Superoxiddismutase, Superoxid akkumuliert	Pulver	50 µM	Sigma-Aldrich

## 2.6 Statistik

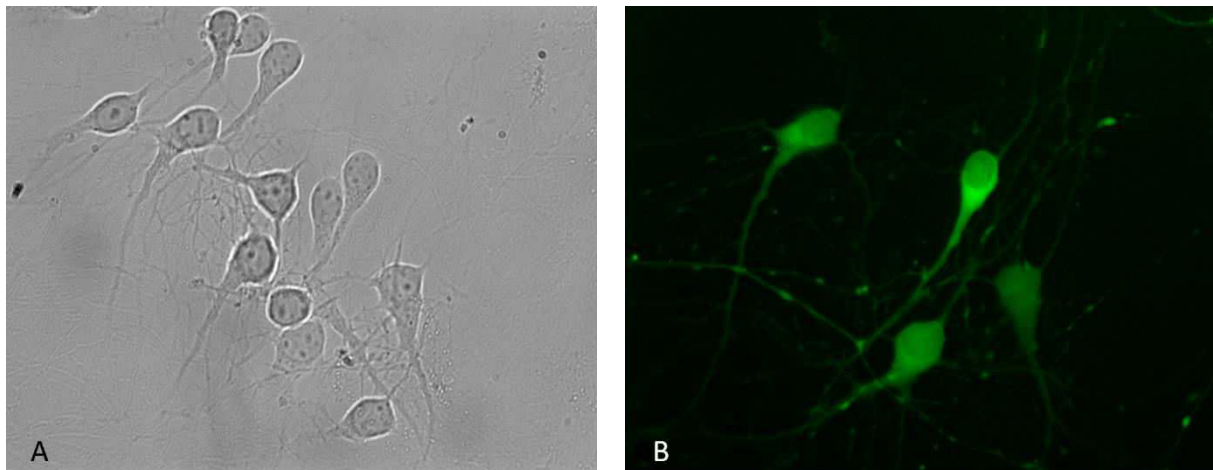
Alle Zahlenwerte werden als Mittelwert mit Standardabweichung angegeben. Die Anzahl der durchgeführten Experimente wird mit (n) angegeben und entspricht der Anzahl untersuchter Zellen. Die beobachteten Veränderungen wurden mittels des ungepaarten zweiseitigen Student t-Test analysiert mit einem Signifikanzniveau von  $p= 5 \%$ . In Diagrammen werden Änderungen der statistischen Signifikanz mit Sternsymbolen gekennzeichnet.



### 3 Ergebnisse

Die Experimente wurden an dissoziierten Hippocampuszellen durchgeführt (siehe 2.1 und 2.3). Diese wurden ungefähr 24 Stunden nach der Präparation mit HyPer-Cyto oder HyPer-Mito transfiziert. HyPer-Cyto reichert sich im Cytosol und HyPer-Mito in den Mitochondrien der Zelle an. Nach der Transfektion wurden die Experimente mit Zellen innerhalb von zwei bis fünf Tagen durchgeführt. Der Hauptfokus lag auf HyPer-Cyto, da ROS für die im Cytosol liegenden Signalwege und Transmitter von großer Bedeutung ist (Finkel 1998).

HyPer zeigt zwei Emissionsmaxima, bei 420 nm und bei 490 nm. Durch Oxidation steigt die Emission bei 490 nm wohingegen sie bei 420 nm sinkt. Um diese Eigenschaft von HyPer zu nutzen, wurde die Fluoreszenz-Ratio aus den CCD-Kamera Bildern bei 490 nm und bei 420 nm  $F_{490}/F_{420}$  gebildet.



**Abbildung 5: Licht- und Fluoreszenzmikroskopie der Hippocampus-Zellen**

Bild A zeigt einen Hippocampus-Zellenverband durch das Lichtmikroskop. Im Bild B sind die gleichen Zellen durch das Fluoreszenzmikroskop zu sehen. Von ihnen ist nur ein Teil mit HyPer transfiziert. In Bild B ist gut die geringere HyPer-Dichte im Bereich des Zellkerns zu sehen. Die Dimensionen beider Bilder betragen jeweils 148 x 111  $\mu\text{m}$ .

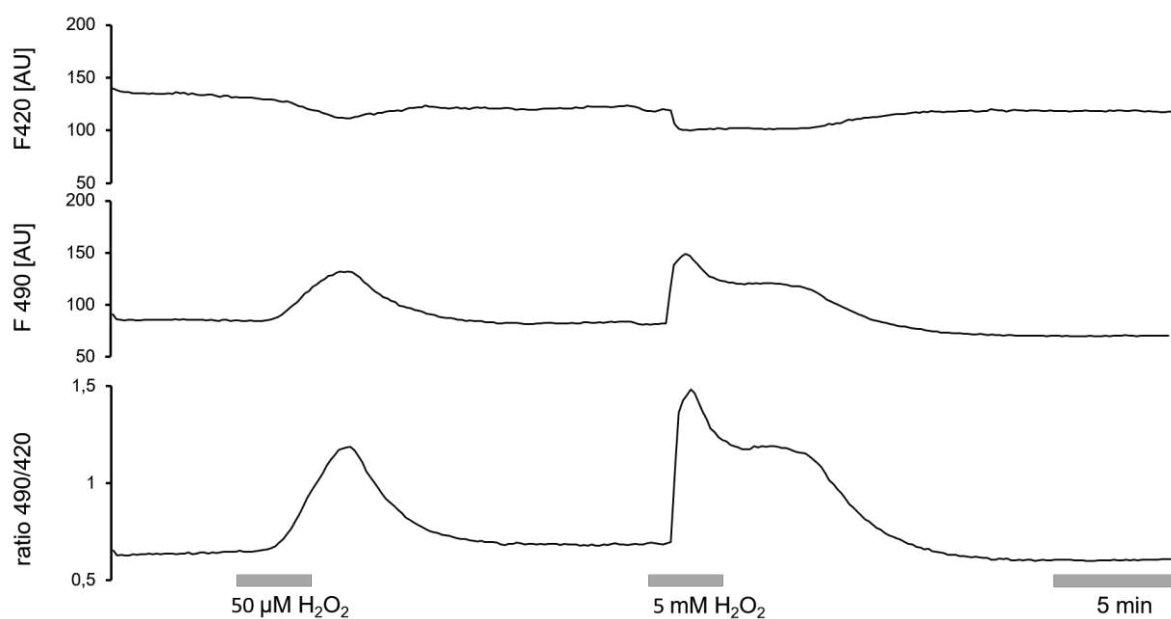
Im Folgenden werden die durchgeführten Experimente und ihre Ergebnisse dargelegt. Diese dienen dazu die Stabilität, die Spezifität und die Sensitivität des Redox-Sensors zu testen, um somit seine Eignung und Zuverlässigkeit zu prüfen.

### 3.1 HyPer-Cyto

Die Zellen zeigten zwei Tage nach der Transfektion eine ausreichende HyPer-Cyto-Expression, sodass die optischen Experimente durchgeführt werden konnten. Der Sensor verteilte sich homogen in den Zellen, jedoch zeigten die CCD-Kamerabilder eine etwas geringere Fluoreszenz im Bereich des Zellkerns (Abbildung. 5). Die Zellen erschienen vor den Messungen gesund, sie zeigten keine Zeichen, die auf einen baldigen Zelluntergang hinweisen wie z. B. Granulaeinschlüsse oder Schwellung. Die Applikationen verschiedener Testsubstanzen und Redox-Modulanzien wurden erst gestartet, nachdem die Zelle über mehrere Minuten eine stabile Baseline zeigte und ausreichend Zeit hatte möglichen Stress durch z. B. Erschütterungen beim Transport und Überführung in die Messkammer zu überwinden.

Das durchschnittliche Fluoreszenzverhältnis (Baseline-Ratio) ( $F_{490}/F_{420}$ ) von HyPer lag bei  $0,65 \pm 11$  ( $n= 123$ ). Sämtliche drogeninduzierten Veränderungen beziehen sich auf den Wert der Baseline.

Bei der Applikation von  $50 \mu\text{M}$  und  $5 \text{ mM}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  für drei Minuten zeigte HyPer eine dosisabhängige Ratiospitze von 82 % und 116 % (Abbildung 6). Nach Beendigung der Gabe und dem Auswaschen von  $\text{H}_2\text{O}_2$  erreichte die Ratio innerhalb weniger Minuten wieder das Baseline-Niveau. Dies zeigte, dass die Oxidation von HyPer vollständig reversibel ist.



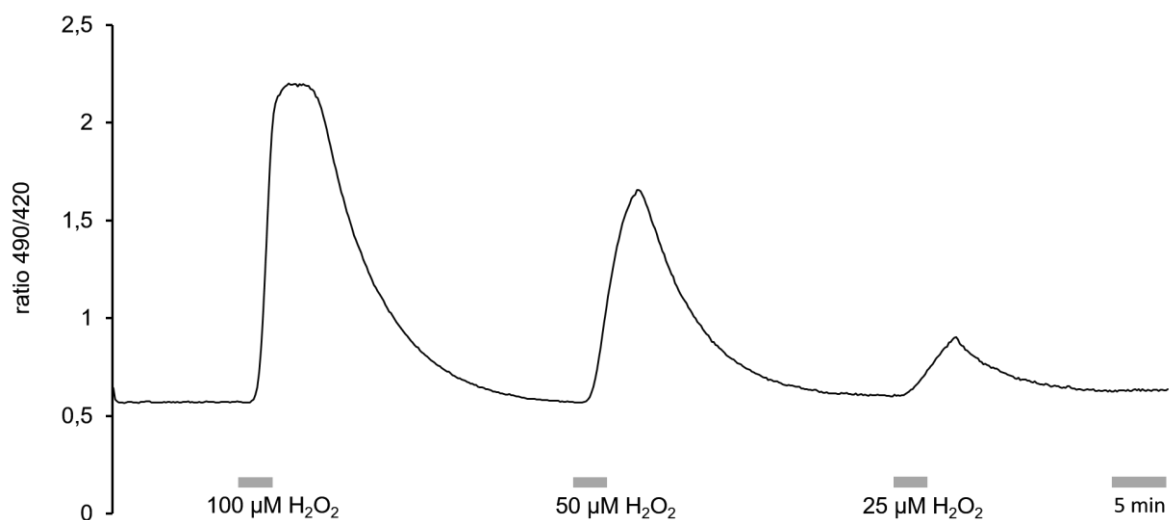
**Abbildung 6: Reversible Antwort von HyPer auf  $\text{H}_2\text{O}_2$**

Die Abbildung zeigt den Zeitverlauf der Spuren  $F_{490}$ ,  $F_{420}$  und  $F_{490}/F_{420}$  und ihre Reaktionen auf die Oxidation durch  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Die Emission bei der Anregung mit einer Wellenlänge von 420 nm sinkt und steigt bei 490 nm. Die untere Spur zeigt die Ratio  $F_{490}/F_{420}$ , die eine entsprechend größere Signaldynamik aufweist.

### 3.1.1 Sensibilität von HyPer

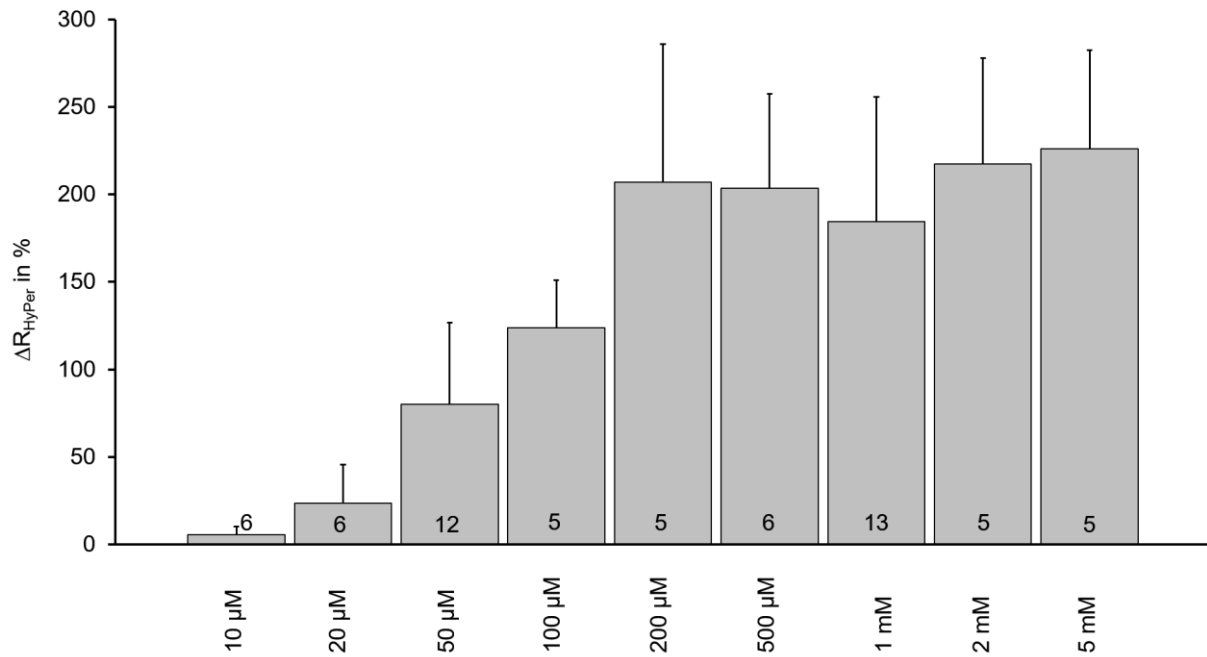
Um den Antwortbereich des Sensors zu definieren, in welchem er semi-quantitativ  $\text{H}_2\text{O}_2$  anzeigt, wurden zunächst die Sensitivität und das Dosis-Antwort-Verhalten ermittelt. Dazu wurden unterschiedliche  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentrationen getestet. Bei einer geringen Konzentration von  $10 \mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  konnte noch zuverlässig ein Anstieg des Fluoreszenzverhältnisses um  $5,6 \% \pm 4,5 \%$  ( $n=6$ ) beobachtet werden (Abbildung 8).

Zur Ermittlung der Konzentration, bei der HyPer weitestgehend oxidiert ist, wurde  $\text{H}_2\text{O}_2$  in höheren Konzentrationen appliziert. Es zeigte sich eine Oxidationssättigung von HyPer bei Konzentrationen größer gleich  $200 \mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ . Die Ratio stieg bei maximaler Sättigung auf  $226 \pm 56,3 \%$  ( $n=5$ ). Mit Hilfe des Hill-Koeffizienten wurde die Konzentration errechnet, bei der HyPer zur Hälfte oxidiert ist (EC 50) (Abbildung 9). Diese liegt bei  $103,9 \mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ . Demnach reagiert HyPer schon auf Konzentration von nur  $10 \mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ . Seine maximale Sättigung ist ab einer  $\text{H}_2\text{O}_2$  Zugabe von  $200 \mu\text{M}$  erreicht.



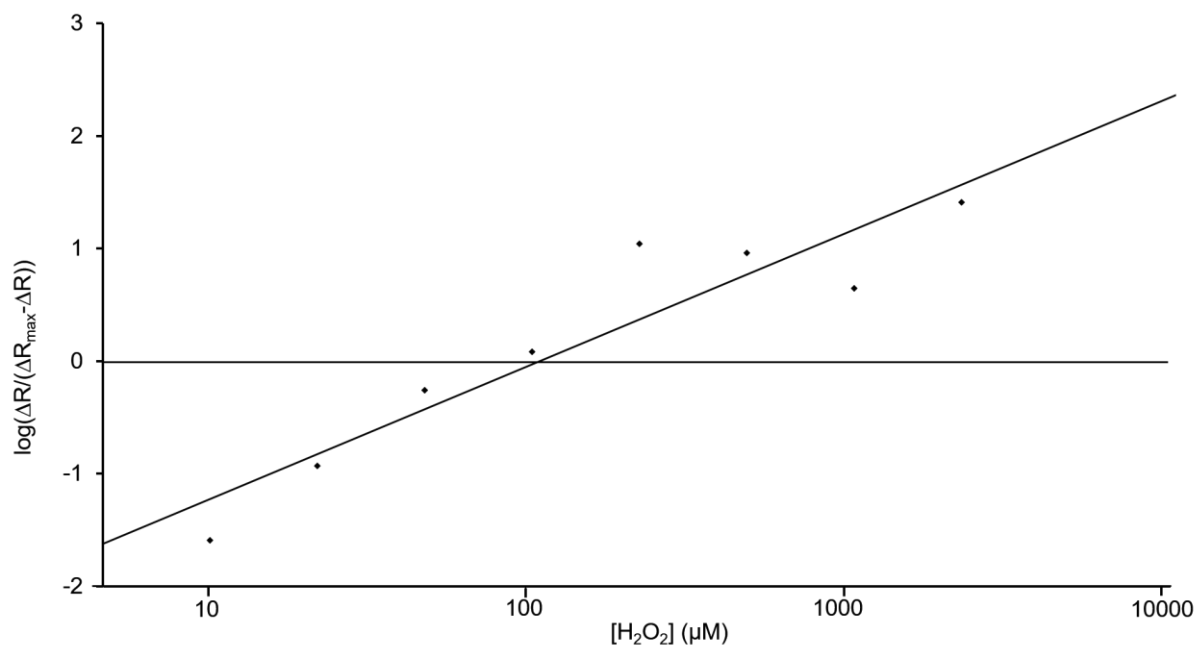
**Abbildung 7: Dosisabhängige Antwort von HyPer**

Die Beispielspur zeigt die Antwort von HyPer auf unterschiedliche  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentrationen. Die Antworten sind dosisabhängig und reversibel. Auf der x-Achse sind die jeweiligen Konzentrationen und die Dauer der Gabe aufgeführt.



**Abbildung 8: Dosis-Antwort-Verhalten auf  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induzierte Anstiege in der Fluoreszenzratio.**

Dargestellt ist die durchschnittliche Antwort bezogen auf die jeweils gegebene Konzentration. HyPer reagiert ab einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  und ist ab einer Konzentration von 200  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  vollständig oxidiert. Die Zahlen innerhalb der Balken zeigen die Versuchsanzahl.

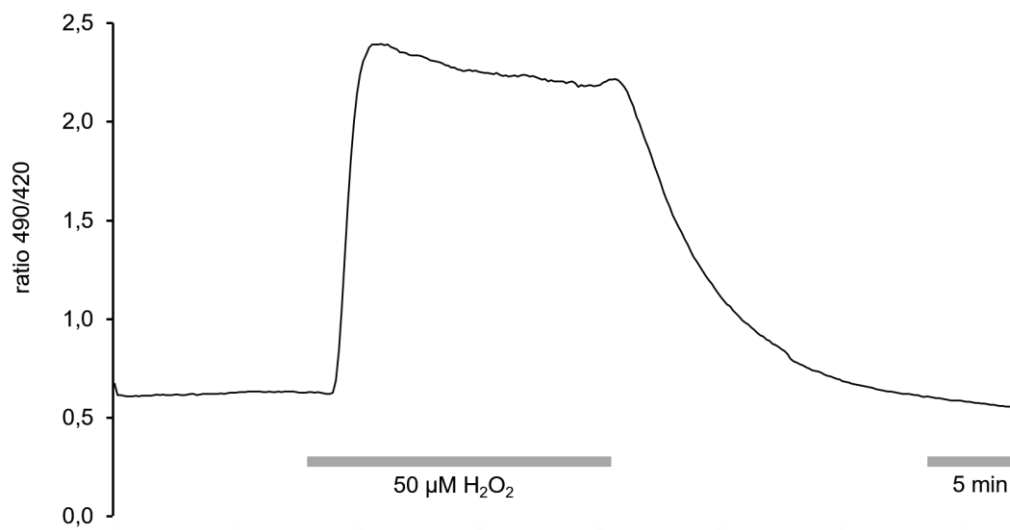


**Abbildung 9: Hill-Diagramm der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-bedingten Ratioanstiege**

Im Hill-Diagramm zeigt der Schnittpunkt mit der Abszisse die EC<sub>50</sub>, sie entspricht der halb-maximalen Antwort und liegt für HyPer bei 103,9  $\mu M$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

### 3.1.2 Stabilität von HyPer bei langer H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Applikation

Zur Prüfung des Antwortverhaltens und der Stabilität von HyPer bei langer und intensiver Oxidation wurden unterschiedliche H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentrationen für 15 Minuten appliziert. Bei einer Konzentration von 50  $\mu M$  und 1 mM zeigte sich eine höhere Ratio als bei der dreiminütigen Zugabe  $163,6 \pm 89,5 \%$  (n= 4) und  $289,8 \pm 39,1 \%$  (n= 4) (Abbildung 9). Trotz der stark verlängerten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Exposition erholte sich die Ratio nach Beendigung der Applikation und Auswaschung wieder auf Baseline-Niveau. Dies bestätigt die volle Reversibilität und Stabilität des Sensors auch bei langfristiger und intensiver Oxidation.

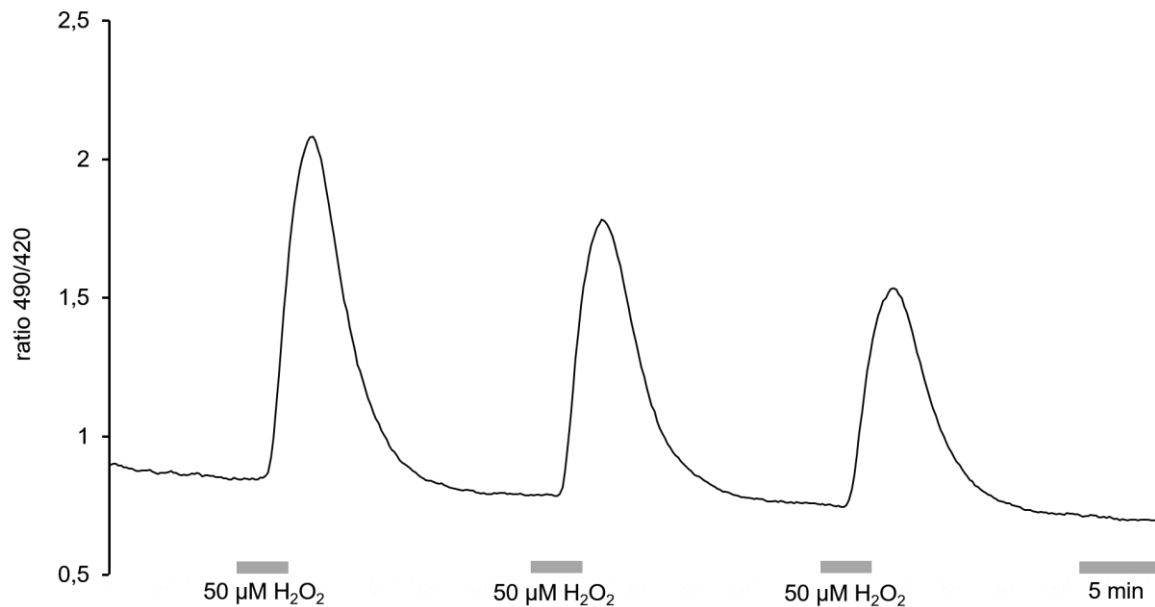


**Abbildung 10: Langzeitgabe von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

Durch die Gabe von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> über 15 Minuten in den Konzentrationen von 50 µM und 1 mM wurde das Antwortverhalten des Sensors auf langanhaltende Oxidation evaluiert. Im Vergleich zu den dreiminütigen Applikationen bei gleicher Konzentration fielen die Anstiege der Ratio größer aus. Nach Beendigung der Applikation erreichte die Ratio wieder das Niveau der Baseline.

### 3.1.3 Mehrfachapplikation von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

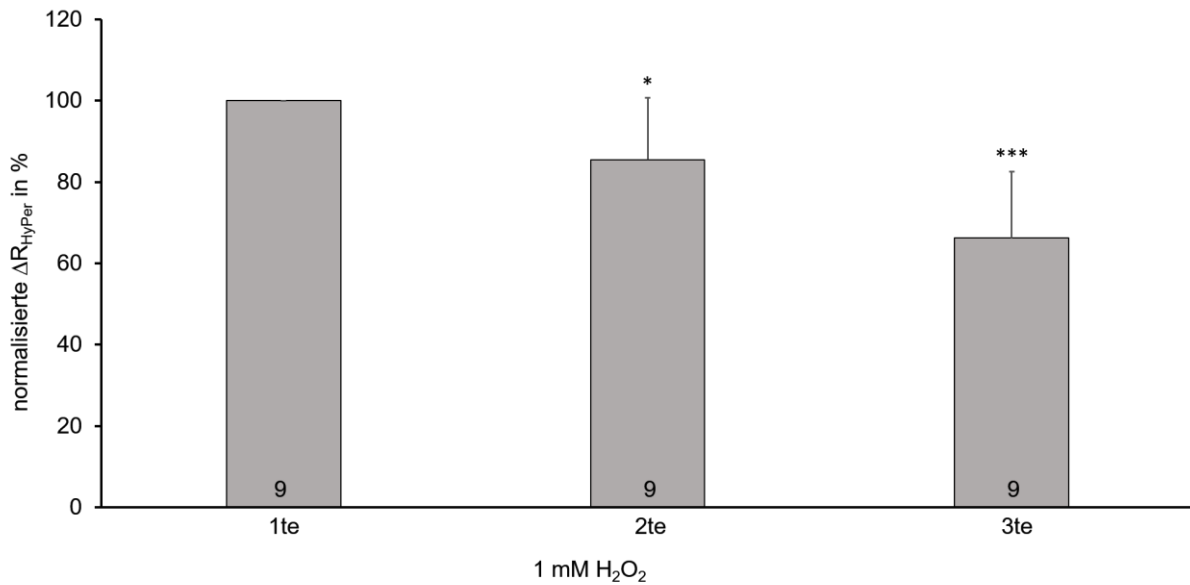
Nachdem HyPer sich als stabil und reversibel bei einzelnen Applikationen gezeigt hatte, wurde die Antwort auf wiederholte dreiminütige H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Gaben geprüft. Dazu wurde dreimal hintereinander die gleiche Konzentration, mit ausreichendem zeitlichen Abstand zwischen den Applikationen, gegeben, sodass die Ratio wieder das Baseline-Niveau erreichen konnte. Es zeigte sich eine reduzierte Antwort im Vergleich zur jeweils vorangegangenen Applikation. Die zweite und dritte Gabe zeigte bei 50 µM nur 77 % und 63 % der Amplitude der ersten Gabe (n= 8) (Abbildung 11).



**Abbildung 11: Mehrfachgabe von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

Bei Mehrfachgaben von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nahm die Amplitude mit jeder weiteren Applikation ab. Die Antwort betrug bei der zweiten und dritten Applikation im Durchschnitt nur 77 % und 63 % der Fluoreszenzratio der ersten Applikation.

Die Zugabe von 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zeigte eine ähnliche Abnahme der zweiten und dritten Amplitude 85 % und 66 % (n= 9) (Abbildung 12). Die Ratio erholte sich auch wie in vorherigen Experimenten auf Baseline-Niveau und zeigte keine auffällige Verschiebung im Vergleich zur Baseline vor den Mehrfachgaben. Allerdings schien sich eine nachlassende Sensitivität anzudeuten, da die Amplituden sukzessive kleiner wurden.



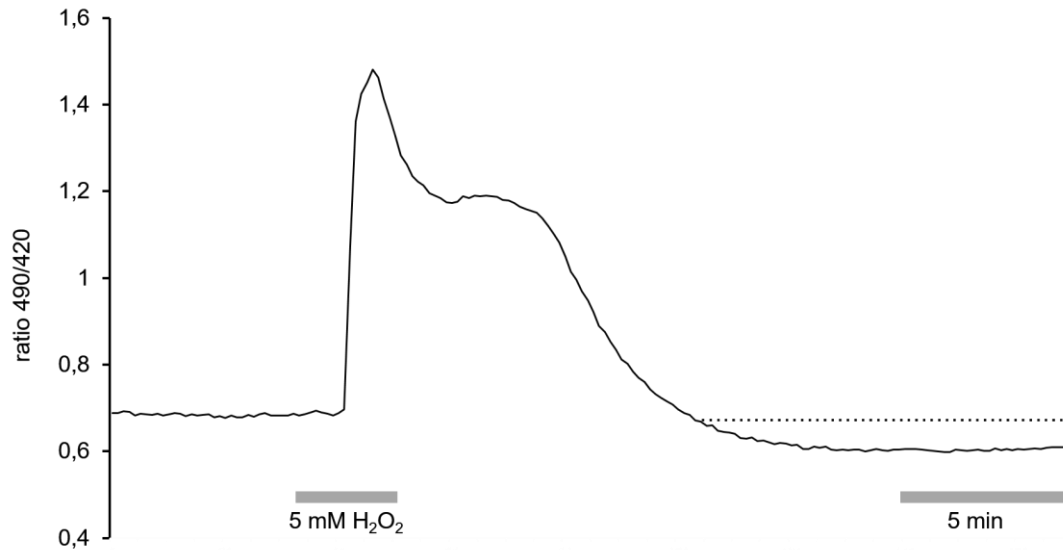
**Abbildung 12: Abnahme der Amplitude in Prozent bei mehrmaliger Applikation gleicher Konzentration.**

Die mehrmalige Applikation von 1mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  führte wie auch bei Experimenten mit 50  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  zu einer sukzessiven Abnahme der Fluoreszenzratio (\*  $p \leq 0.05$ , \*\*\*  $p \leq 0.0001$ ).

### 3.1.4 Applikation von hohen $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentrationen

Die Zugabe hoher  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration ( $\geq 2$  mM) bewirkten bei HyPer eine deutliche Veränderung der Ratio im Vergleich zu geringeren Dosen. Direkt zu Beginn der Gabe stiegen die Ratio steil an, sanken daraufhin jedoch wieder partiell ab, obwohl  $\text{H}_2\text{O}_2$  noch präsent war (Abbildung 12). Nach Beendigung der Gabe und dem Auswaschen unterschritten die Ratio vermehrt das Niveau der Baseline. Diese Absenkung betrug bei 5 mM  $32,7 \pm 22,9$  % ( $n= 4$  von 5) und bei 1 mM  $13,9 \pm 6,3$  % ( $n= 11$  von 13). Dies suggeriert, dass HyPer nicht nur durch die hohen  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Dosen beeinflusst wird, sondern vermutlich auch durch die Reaktion der Zelle auf den hohen oxidativen Stress.





**Abbildung 13: Applikation von 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> für drei Minuten**

Die Ratio steigt steil an, gefolgt von einer partiellen Erholung noch während H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> präsent war. Nach Beendigung der Applikation zeigte sich gehäuft eine Absenkung der Ratio unter Baseline-Niveau.

### 3.1.5 Spezifität von HyPer

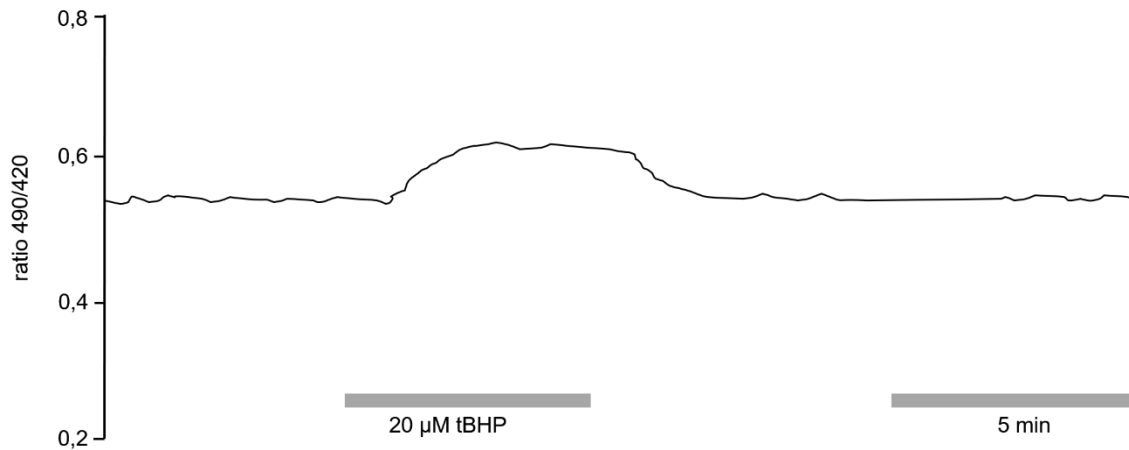
HyPer wird als H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> spezifisch beschrieben (Belousov et al. 2006). Trotzdem wurde auch die Reaktion auf andere oxidative Reize getestet. Dazu wurden Modulanzen verwendet, die die ROS-Entstehung fördern oder Einfluss auf die zellendogenen Radikalfänger nehmen.

TBHP (*Propionate tert-butyl hydroperoxide*) induziert als Oxidationsmittel oxidativen Stress, indem es den Glutathionpool der Zelle verringert und den Verbrauch von Glutathion fördert. Es hemmt die Glutathionreduktase und induziert die Glutathionperoxidase (Kim et al. 1998). Die Glutathionreduktase reduziert durch ROS oxidiertes Glutathiondisulfid (GSSG) wieder zu Glutathion (GSH). Die Glutathionperoxidase reduziert mittels Glutathion H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu 2 H<sub>2</sub>O. TBHP verschiebt somit die Redox-Homöostase in Richtung oxidatives Milieu und erhöht so den oxidativen Stress der Zelle.

Formel 4: Glutathionreduktase und Glutathionperoxidase

Glutathionreduktase	$\text{GS-SG} + \text{NADPH}/\text{H}^+ \rightarrow 2 \text{GSH} + \text{NADP}^+$
Glutathionperoxidase	$2 \text{GSH} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{GS-SG} + 2 \text{H}_2\text{O}$

Die Applikation von 20  $\mu\text{M}$  tBHP zeigte eine reversible Erhöhung der Ratio  $33,5 \pm 23,2\%$  ( $n=5$ ) (Abbildung 14). Im Vergleich zur Wirkung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  zeigte sich jedoch eine deutlich langsamere Kinetik der HyPer-Oxidation.



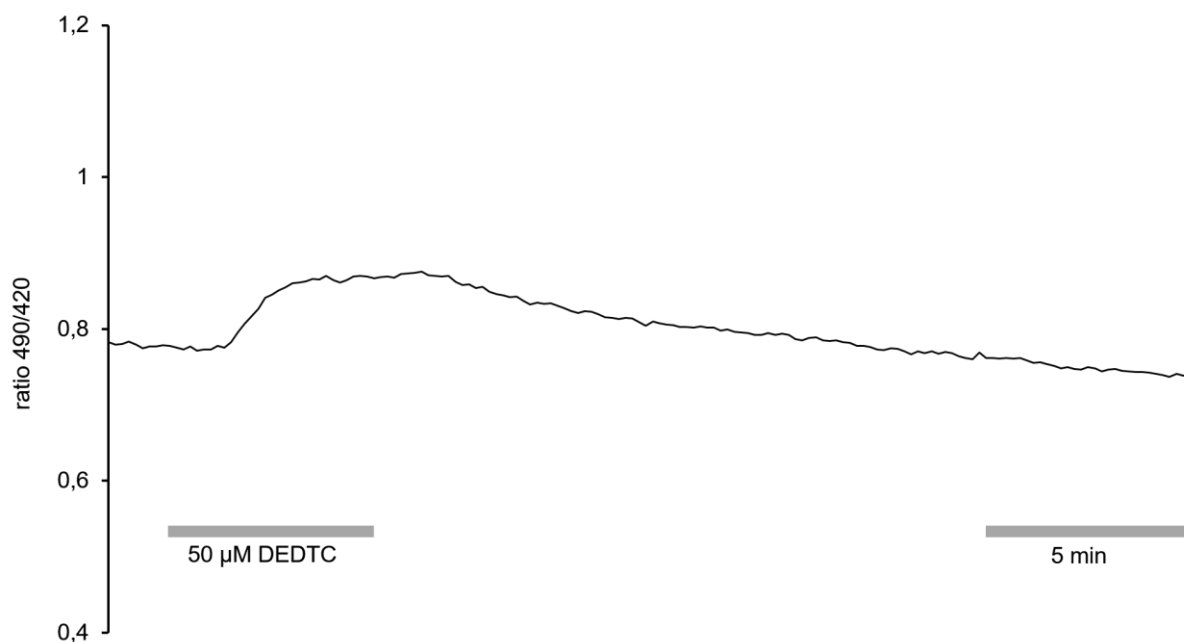
**Abbildung 14: tBHP-Applikation für fünf Minuten**

Kurz nach Beginn der Applikation erhöht tBHP das Fluoreszenzratio merklich, jedoch im Vergleich zu  $\text{H}_2\text{O}_2$  stellen sich Anstieg und Erholung flacher dar. Nach Beendigung der Applikation erreicht die Ratio wieder das Niveau der Baseline.

DEDTC ist ein Inhibitor der Superoxiddismutase (SOD), diese setzt  $O^{\cdot -}$  zu  $H_2O_2$  um. Dies hat zur Folge, dass ROS in Form von Superoxid in der Zelle ansteigt, da der Abbau deutlich verlangsamt ist (Khazaei et al. 2009).

Superoxiddismutase	$2O^{\cdot -} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O^2$
--------------------	--

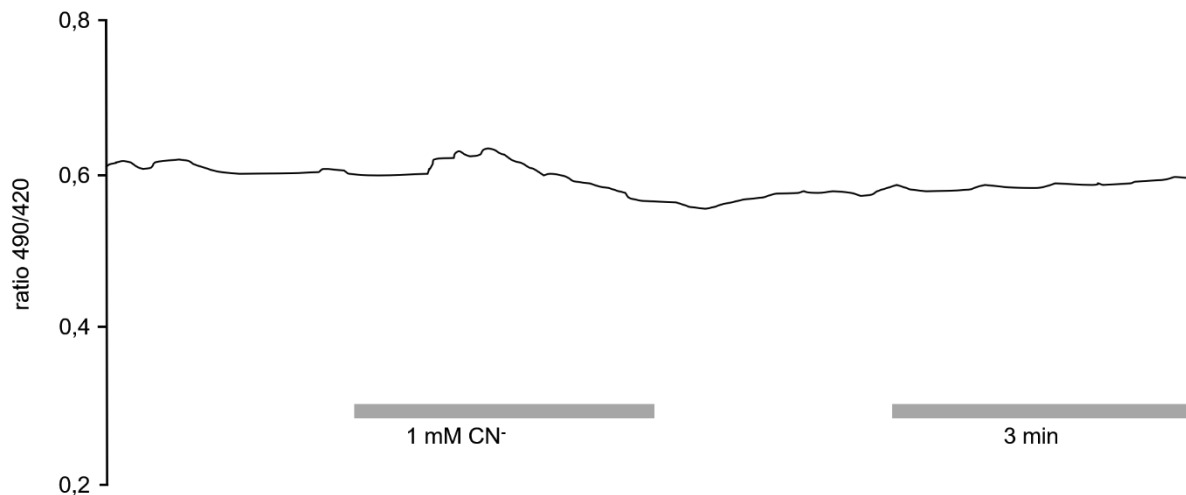
Wie erwartet, führten  $50 \mu M$  DEDTC zu einer Erhöhung der Ratio um  $33,1 \pm 23,1 \%$  ( $n=12$ ) (Abbildung 15). Dies suggeriert, dass HyPer auch auf einen Anstieg von Superoxid reagiert.



**Abbildung 15: Applikation von DEDTC für fünf Minuten**

Die Applikation von  $50 \mu M$  DEDTC für fünf Minuten zu den mit HyPer transfizierten Zellen führt zu einem Anstieg der Ratio. Nach Beendigung der Gabe sinkt die Ratio sukzessive auf das Baseline-Niveau. Die Hemmung der SOD durch DEDTC führt zu einer Erhöhung der Ratio. Dies suggeriert, dass HyPer auch auf das akkumulierende Superoxid reagiert.

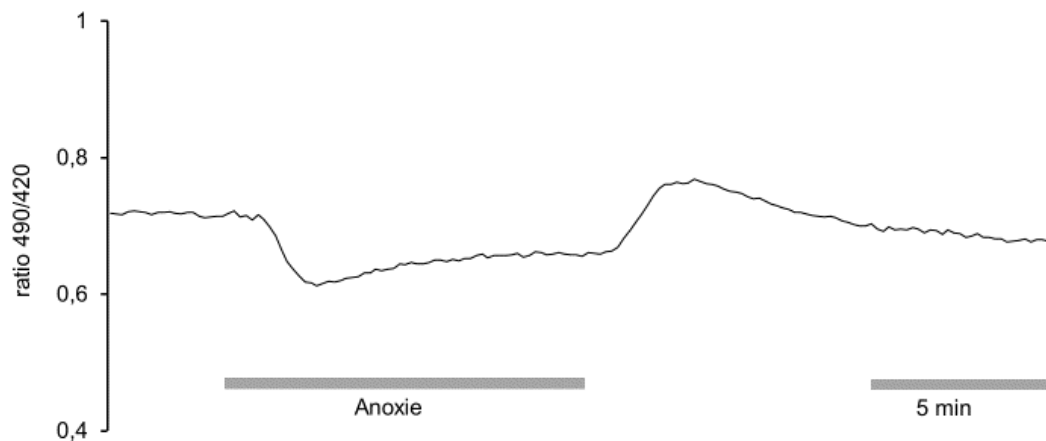
Cyanid ist ein Komplex-IV-Inhibitor der mitochondrialen Atmungskette. Es blockiert die Übertragung der Elektronen auf Sauerstoff. Dadurch kommen die oxidative Phosphorylierung und der Elektronenfluss in der Atmungskette zum Erliegen. Der unterbrochene Elektronenfluss hat zur Folge, dass vermehrt Elektronen der Atmungskette entweichen und vermehrt ROS entstehen (siehe 1.5). Die Applikation von 1 mM  $\text{CN}^-$  in einer Zeitspanne von drei bis fünf Minuten führte zu einem Anstieg Ratio von  $16,3 \pm 13,1 \%$  ( $n=8$ ) (Abbildung 16).



**Abbildung 16: Applikation von 1 mM  $\text{CN}^-$  für drei Minuten**

Die Applikation von 1mM Cyanid, zu den mit HyPer transfizierten Zellen, führt zu einem Anstieg der Ratio. Nach Beendigung der Gabe kehrt die Ratio auf das Ausgangsniveau zurück. Die Blockade der mitochondrialen Atmungskette führt zu einer Erhöhung der HyPer-Ratio, bedingt durch die vermehrte ROS-Produktion der Mitochondrien.

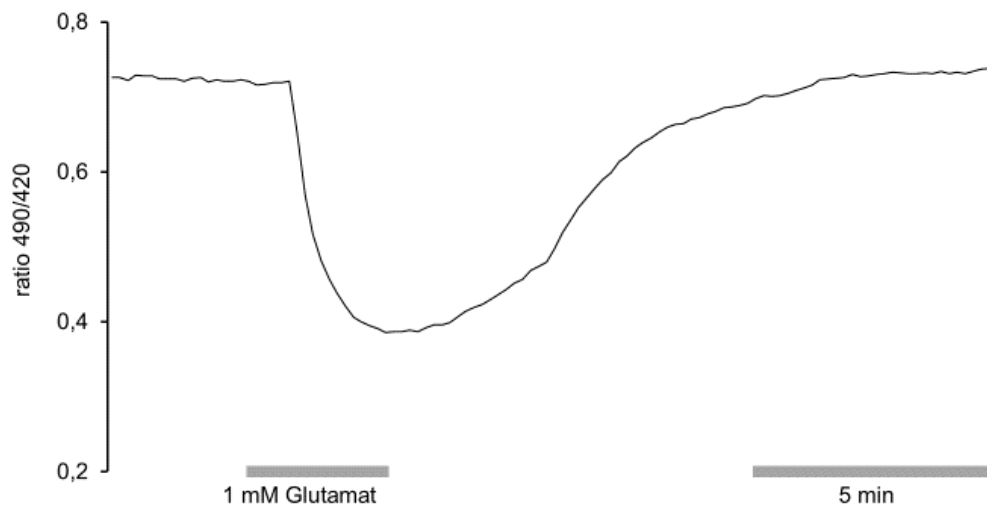
Um die Wirkung von Cyanid mit dem Zustand der Anoxie zu Vergleichen, wurde die Atmungskette durch den Entzug von Sauerstoff blockiert. Die umspülende ACSF-Lösung wurde statt mit  $\text{O}_2$  mit 95 %  $\text{N}_2$  und 5 %  $\text{CO}_2$  begast und ihr wurde der Sauerstofffänger Natriumsulfid (1 mM) zugesetzt. Der Entzug von  $\text{O}_2$  unterbricht die oxidative Phosphorylierung und die sauerstoffabhängigen katabolen Stoffwechselwege, sodass der Zelle nur die anaerobe Glykolyse zur ATP-Gewinnung bleibt (Gerich et al. 2006). Bei einer derartigen Anoxie zeigt Ratio eine mehrphasige Reaktion. Zu Beginn des Sauerstoffentzugs sank die Ratio um  $18,7 \pm 6,0 \%$  ab und verweilte auf diesem Niveau. Nach zehn Minuten wurden die umspülende ACSF-Lösung reoxygeniert. Die Ratio stieg gemessen am zeitweiligen Plateau in der Anoxie um  $23,1 \pm 10,7 \%$  ( $n=8$ ) (Abbildung 17) an und überschoss dabei die vorherige Baseline.



**Abbildung 17: Sauerstoffentzug für zehn Minuten**

Dargestellt ist die biphasische Verschiebung der Ratio in Folge des Sauerstoffentzuges. Zu Beginn der Applikation sinkt die Ratio kurzzeitig ab. Noch während der Gabe kommt es zu einer langsamen Erholung der Ratio. Nach Beendigung der Applikation zeigt sich ein kurzzeitiger Anstieg über das Baseline-Niveau. Die ACSF-Lösung wurde mit 95 % N<sub>2</sub> und 5 % CO<sub>2</sub> begast und der Sauerstofffänger Natriumsulfid (1 mM) zugesetzt, auf diese Weise wurde der Lösung der Sauerstoff entzogen. Die Zelle wurde für 10 Minuten mit dieser ACSF-Lösung umspült.

Weiterhin wurde getestet wie sich HyPer verhält, wenn die Zellen mit dem starken Neurostimulator Glutamat gereizt werden. Die Applikation von 1 mM Glutamat für drei Minuten führte zu einer deutlichen und schnellen Absenkung der Ratio  $35,8 \pm 17,8$  % (n= 6) (Abbildung 13). Auch geringere Konzentrationen führten zu einer Absenkung, wenn auch nicht so deutlich wie bei 1 mM Glutamat. 50  $\mu$ M Glutamat führten zu einer Absenkung von  $22,2 \pm 6,1$  % (n= 6) (Abbildung 18).



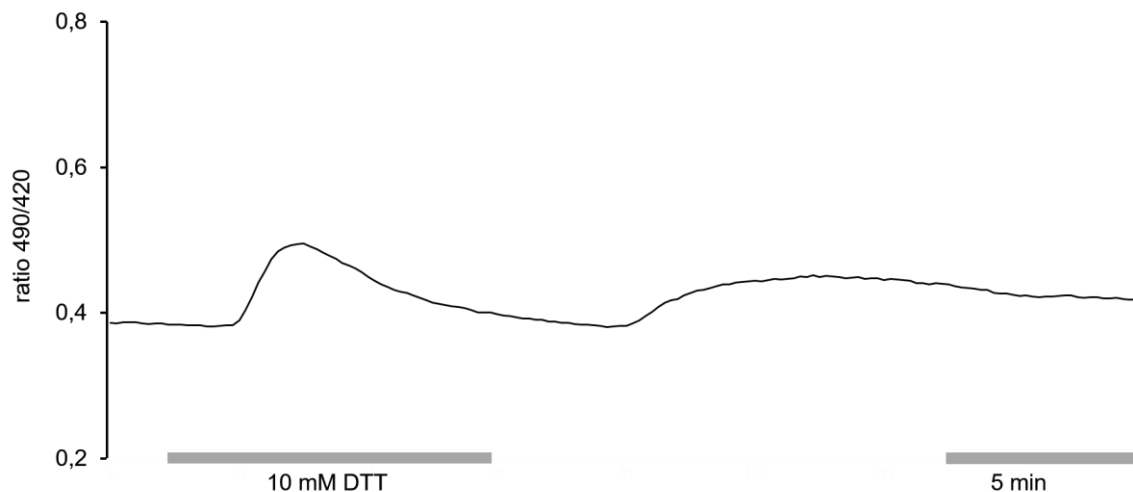
**Abbildung 18: Applikation von 1 mM Glutamat für drei Minuten**

Die Applikation von 1mM Glutamat für 3 Minuten verursachte noch während der Gabe einen deutlichen Abfall der Ratio. Dies suggeriert, dass Glutamat die Redox-Balance der Zelle zum reduzierenden Milieu verschiebt. Nach Beendigung der Gabe erreichte die Ratio erneut das Ausgangsniveau.

### 3.1.6 Kalibrierung des Antwortbereiches

Excitations-ratiometrische Sensoren ermöglichen es quantitative Messungen durchzuführen. Dazu muss jedoch zunächst der Antwortbereich bei maximaler Oxidation und Reduktion bestimmt werden. Sobald diese Maxima bekannt sind, können alle Ergebnisse auch quantitativ analysiert werden. Die maximale Oxidation zeigt bei einer Behandlung mit 5 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  für drei Minuten einen Anstieg in der Ratio auf  $226 \pm 56,3 \%$  ( $n=5$ ) (Abbildung 8). Um festzulegen welche Antwort HyPer bei maximaler Reduktion zeigt, wurden die mit HyPer transfizierten Zellen mit 10 mM DTT für zehn Minuten umspült. DTT ist ein starkes Reduktionsmittel und sollte HyPer vollständig reduzieren und zu einem Absenken der Ratio führen. Allerdings konnte keine Absenkung der Ratio beobachtet werden. Stattdessen zeigten neun von zehn Zellen einen kleinen Anstieg um  $14,6 \pm 21,7 \%$  ( $n=9$ ) (Abbildung. 19). Acht dieser neun Hippocampuszellen zeigten eine leichte sekundäre Absenkung um  $4,7 \pm 3 \%$  ( $n=8$ ).

Das Ausbleiben einer eindeutigen DTT vermittelten Absenkung der Ratio suggeriert, dass HyPer-Cyto sich möglicherweise auf Baseline-Niveau bereits in einem vollständig reduzierten Zustand befindet, sodass es von DTT nicht merklich reduziert werden kann.



**Abbildung 19: Applikation von 10 mM DTT für zehn Minuten**

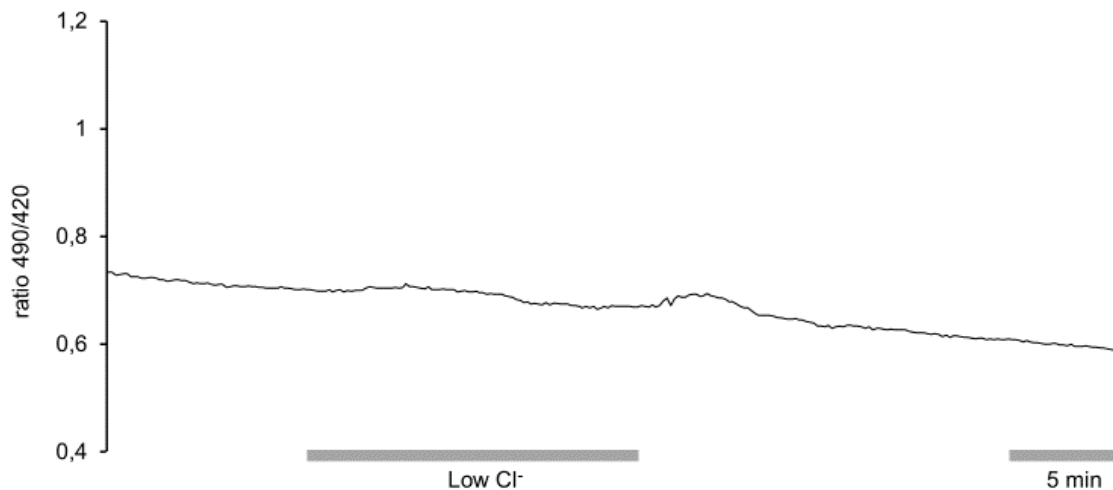
Das Fluoreszenzverhältnis steigt während der DTT-Applikation an und zeigt einen sekundären Anstieg nach dem Auswaschen. Erwartet wurde eine Absenkung der Ratio durch DTT. Das Ausbleiben dieser Absenkung suggeriert, dass sich HyPer-Cyto bereits in einem vollständig reduzierten Zustand befindet.

### 3.1.7 Stabilität von HyPer gegenüber Schwankungen des pH-Werts und der Halidkonzentration

HyPer basiert auf einem zirkulär permutierten, gelb fluoreszierenden Protein (cpYFP), welches eine Modifikation des gelb fluoreszierenden Proteins darstellt (siehe 1.5.2.1). Es ist bekannt, dass YFP und seine Varianten auf Schwankungen des pH-Werts und der Halogenkonzentration reagieren (Schwarzländer et al. 2011; Schwarzländer et al. 2012; Wachter et al. 2000). Aus diesem Grund wurde untersucht, ob und in welchem Umfang HyPer auf Veränderungen dieser beiden Parameter reagiert.

Das Verhalten von HyPer auf Veränderungen der Halogenkonzentration wurde getestet, indem 50 % des extrazellulären Chlorids durch Methylsulfat-Anionen ersetzt wurden. Methylsulfat kann aufgrund seiner Größe und seiner Polarität die Zellmembran nicht passiv überwinden. Dies hat zur Folge, dass intrazellulär die Chloridkonzentration absinkt (Hayama et al. 1995). Die Zellen wurden für 15 Minuten mit ACSF-Lösung, von der 50 % des Chloridgehaltes durch Methylsulfat-Anionen substituiert waren, umspült. Während dieser Gabe zeigte die Ratio von HyPer insgesamt kaum eine Veränderung. Sechs von acht Zellen antworteten mit einem geringen Anstieg von nur  $2,2 \pm 2,2$  % ( $n=6$ ). Gegen Ende der Applikation zeigten die Zellen eine geringe Absenkung der Ratio unter das Niveau der Baseline  $4,1 \pm 4,5$  % ( $n=8$ ). Nach dem Stoppen der Applikation und der Wiederherstellung des normalen Chloridgehaltes zeigten sechs von acht Zellen erneut einen geringen Anstieg der Ratio  $3,9 \pm 2,8$  % ( $n=6$ ) (Abbildung 20).

Im Vergleich zu den Signalamplituden bei Oxidation sind diese Veränderungen auch bei starker Veränderung der Chloridkonzentration nur minimal.

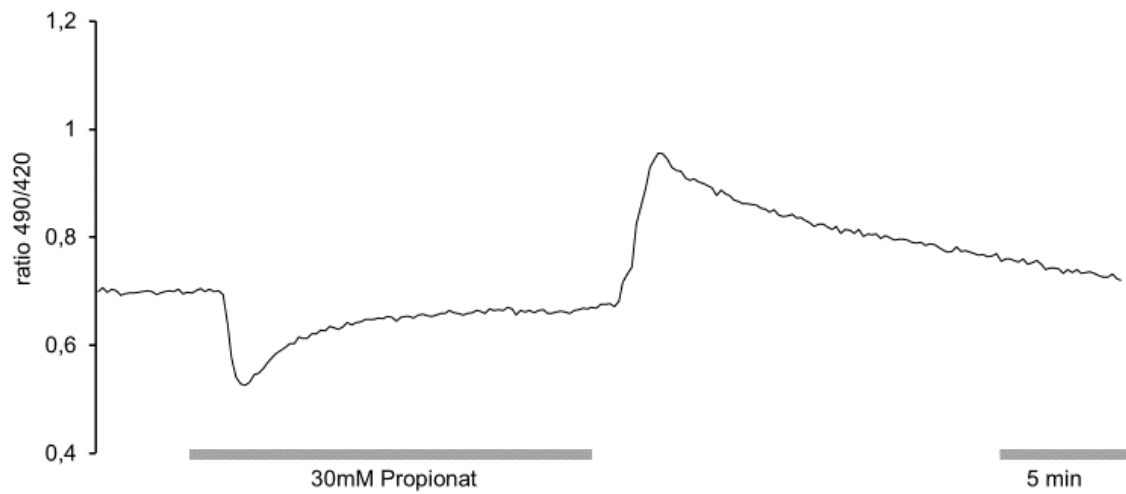


### Abbildung 20: Einfluss einer deutlich veränderten Chloridkonzentration auf das HyPer-Fluoreszenzverhältnis

Die Verschiebung der intrazellulären Chloridkonzentration zeigte kaum Einfluss auf die HyPer-Fluoreszenz. Diese Abbildung zeigt den beschriebenen Anstieg der Ratio nach Beendigung der Applikation.

Von besonderem Interesse war zudem die Sensibilität von HyPer gegenüber pH-Wert-Veränderungen. Es wurde eine biphasische pH-Wert-Verschiebung des Cytosols durch die Applikation von Propionat induziert (Schlue und Thomas 1985). Propionat azidifiziert das Cytosol um ca. 0,2 pH-Einheiten, gefolgt von einer ähnlich starken Alkalisierung nach dem Auswaschen. Die Gabe von 30 mM Propionat für 15 Minuten führte bei HyPer zu einer biphasischen Antwort. Zu Beginn der Applikation zeigte die Ratio zunächst eine deutliche Senkung um  $23,5 \pm 4,5 \%$  ( $n=8$ ). Die Ratio erholte sich nach dem Erreichen des Minimums noch währenden der Gabe auf das ursprüngliche Baseline-Niveau. Nach Beendigung der Propionat-Applikation stieg die Ratio dann um  $50,5 \pm 20,2 \%$  ( $n=8$ ) (Abbildung 21) an. Dies zeigte, dass HyPer unmittelbar auf Veränderungen des pH-Werts reagiert.



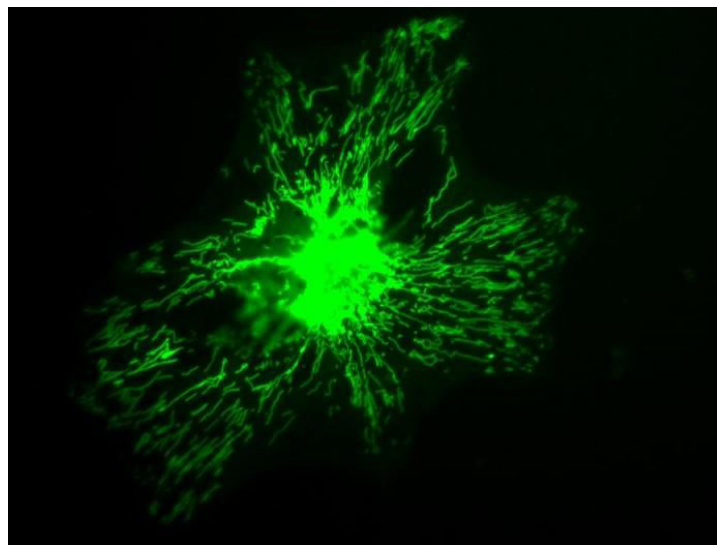


**Abbildung 21: Biphasische Antwort von 30 mM Propionat**

Die Ratio verändert sich nahezu zeitgleich zu den Propionat-induzierten pH-Wert-Veränderungen. Zu Beginn der Applikation sinkt die Ratio rasch ab und erholt sich während der Gabe wieder auf Baseline-Niveau. Nach Beendigung der Gabe steigt die Ratio an und erholt sich dann allmählich auf das Ausgangsniveau. Propionat wurde für 15 Minuten appliziert.

## 3.2 HyPer-Mito

Der Sensor akkumuliert nach Transfektion und Translation in der Matrix der Mitochondrien. Circa zwei Tage nach Transfektion mit HyPer-Mito waren in den Zellen zahlreiche markierte Mitochondrien erkennbar. Diese Visualisierung ermöglicht es die Mitochondrien in Bezug auf Anzahl, Verteilung, Motilität und Form zu beurteilen. Unterschiede zwischen einzelnen Zellen können in die Auswertungen einbezogen werden. Dies ist besonders interessant, wenn z. B. Wildtypmäuse und Knockoutmäuse oder unterschiedliche Gewebe miteinander verglichen werden. Ein weiterer Vorteil bestand darin, dass pro Zelle mehrere *regions of interest* gemessen werden können.



**Abbildung 22: Fluoreszenzmikroskopisches Bild einer HyPer-Mito-transfizierten Zelle**

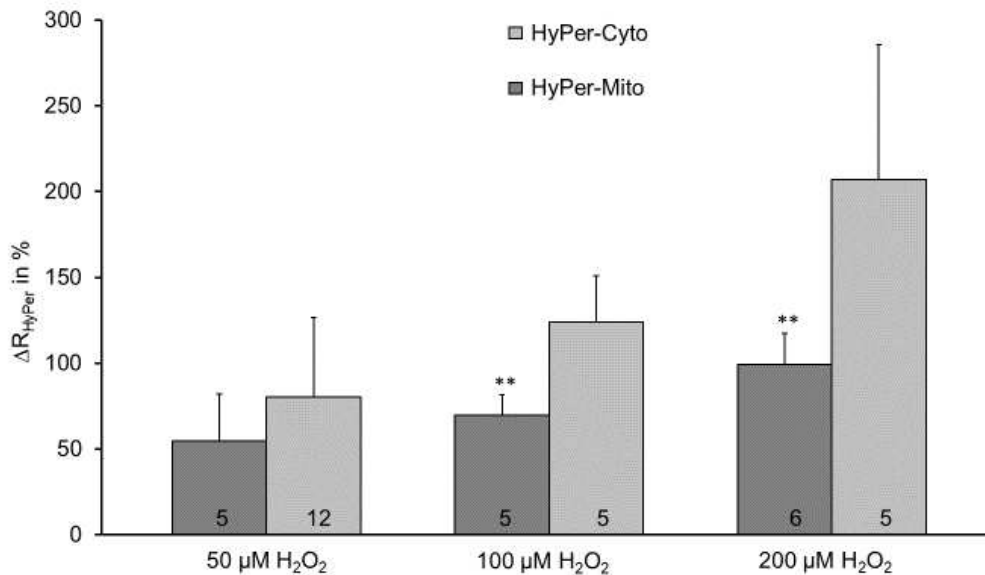
Die Auswertung des Fluoreszenzsignals erfolgte wie auch bei HyPer-Cyto ratiometrisch ( $F_{490}/F_{420}$ ). Mitochondrien zeigten im Vergleich zum Cytosol erhöhte Baseline-Werte von  $1,05 \pm 0,19$  ( $n=25$ ) gegenüber  $0,65 \pm 11$ . Dies spricht dafür, dass in Mitochondrien die Redox-Homöostase mehr im oxidativen Milieu liegt. Der dargestellte Bildbereich entspricht  $148 \times 111 \mu\text{m}$ .

### 3.2.1 HyPer-Mito-Sensibilität

HyPer-Mito zeigte wie auch HyPer-Cyto deutliche Signalveränderungen der Ratio als Reaktion auf unterschiedliche  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentrationen. Die Applikation von 50, 100 und 200  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  für jeweils drei Minuten führten zu einer Erhöhung von  $54,8 \pm 27,1 \%$  ( $n=5$ )  $69,8 \pm 11,9 \%$  ( $n=5$ ) und  $99,4 \pm 18 \%$  ( $n=6$ ) (Abbildung 22).

Verglichen mit den Reaktionen von HyPer-Cyto bei gleichen Konzentrationen, fielen die Anstiege bei Hyper-Mito geringer aus. Ein Grund dafür könnte sein, dass  $\text{H}_2\text{O}_2$  bis zum Erreichen der Mitochondrien teilweise zerfiel oder von Radikalfängern im Cytosol partiell abgefangen wurde.

Außerdem können Mitochondrien, im Vergleich zum Cytosol, effektiver oxidativen Stress abpuffern. Dies könnte erklären, wieso die Anstiege der Ratio für HyPer-Mito, im Vergleich zu HyPer-Cyto geringer ausfallen.

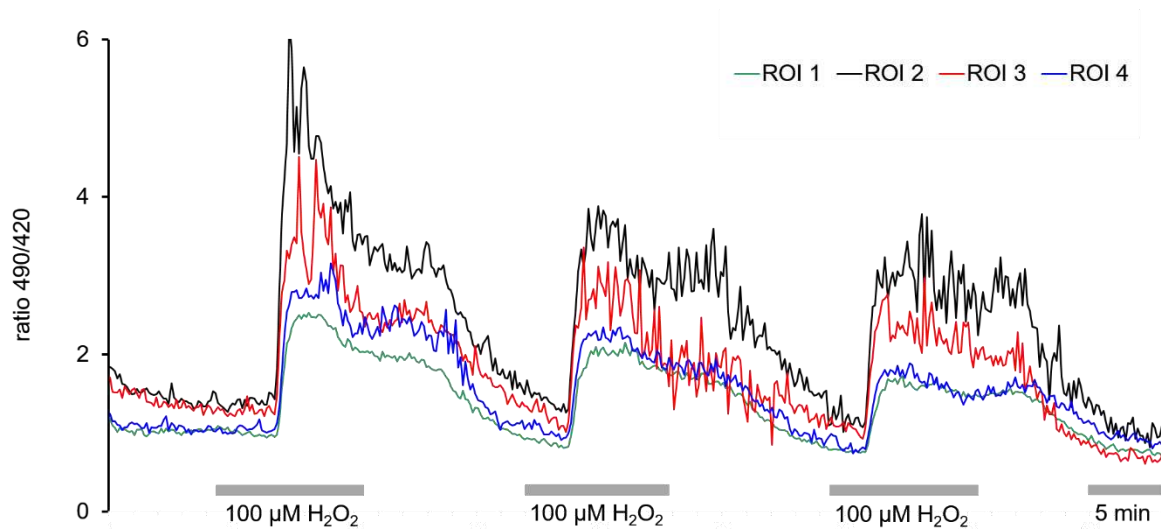


**Abbildung 23: Antwort-Vergleich von HyPer-Mito zu HyPer-Cyto in der Intensität auf gleiche oxidative Reize**

Die Abbildung fasst die unterschiedlichen Amplituden der Antworten auf gleiche oxidative Reize von HyPer -Mito und HyPer-Cyto zusammen. Im Schnitt fiel die Antwort von HyPer-Cyto höher aus.  $**p \geq 0,01$ .

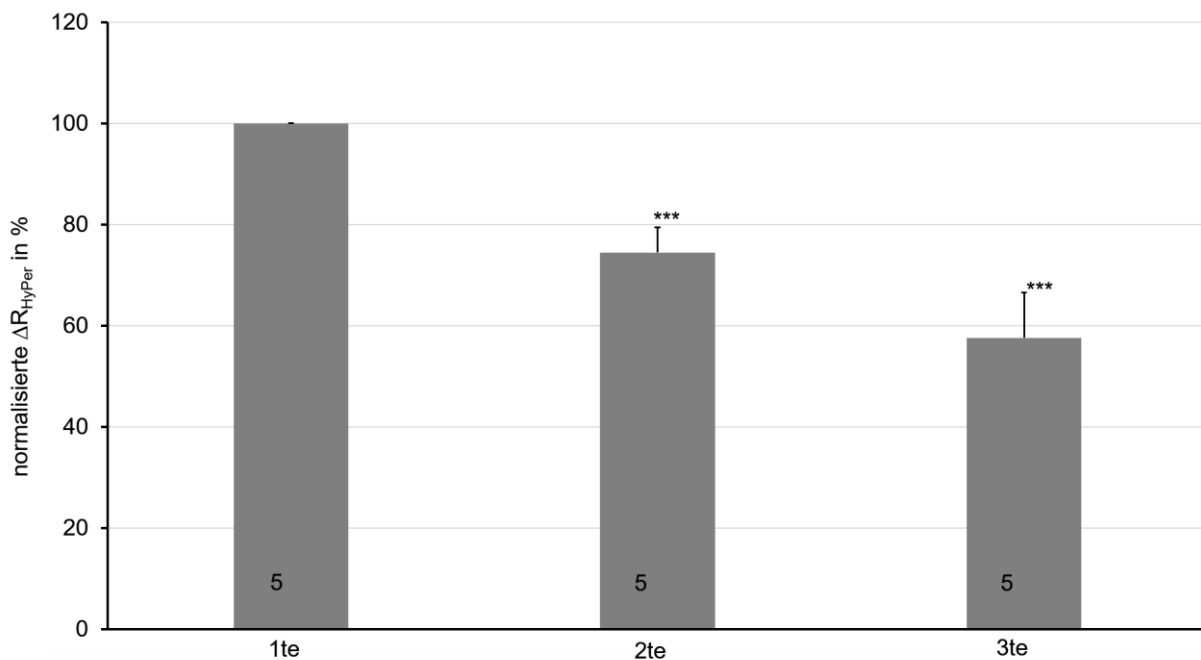
### 3.2.2 Mehrfachapplikation von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> HyPer-Mito

Wie auch bei HyPer-Cyto zeigte sich bei HyPer-Mito eine Abnahme der Antworten bei mehrmaligen Applikationen gleicher H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentrationen. Während der Gaben von 100 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> für drei Minuten zeigte die zweite und dritte Antwort durchschnittlich nur noch 74 % und 58 % der Amplitude der Erstgabe (n= 5) (App. 23)



**Abbildung 24: Reaktion von HyPer-Mito auf eine Mehrfachgabe von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

Die Abbildung zeigt die Ratio einer dreimaligen Applikation von 100 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> für jeweils drei Minuten. Es wurden insgesamt vier *regions of interest* gewählt. Deutlich zu sehen ist die Abnahme der Antwort bei Gabe zwei und drei im Vergleich zur Erstgabe.



**Abbildung 25: Abnahme der Antwort bei Mehrfachapplikation von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

Abnahme der Antwort bei der zweiten und dritten Applikation im Vergleich (normiert) zur ersten Gabe. Appliziert wurde 100 µM für jeweils drei Minuten. \*\*\* $p \geq 0.001$ .

## 4 Diskussion

Es gibt eine Vielzahl an Fluoreszenzsensoren mit deren Hilfe ROS auf Zellebene gemessen werden kann. In dieser Arbeit wurde der  $\text{H}_2\text{O}_2$  spezifische Sensor HyPer in primären Zellkulturen vom Hippocampus der Maus untersucht. HyPer fand bereits in zahlreichen Zellreihen Anwendung: HeLa-Zellen (Cervixkarzinomzellen der Patientin Henrietta Lacks), HEK 293 Zellen (*Human Embryonic Kidney*), HThy-ori Zellen (*human thyroid epithelial*) und  $\beta$ -Zellen des Pankreas von Ratten (Belousov et al. 2006; Malinouski et al. 2011; Weyemi et al. 2012; Roma et al. 2012). Weiterhin wurde HyPer in Zebrafischlarven exprimiert, um die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Produktion während des Heilungsprozesses frischer Wunden zu visualisieren (Niethammer et al. 2009).

In neuronalem Gewebe fand HyPer jedoch bisher kaum Anwendung. Aufgrund dessen wurden die Experimente zur Charakterisierung von HyPer an primären Hippocampuskulturen durchgeführt. Der Hippocampus eignet sich besonders für diese Experimente, da es sich um ein etabliertes Untersuchungsmodell handelt, welches empfindlich auf ROS reagiert (Wilde et al. 1997). Die Arbeitsgruppe um Herrn Prof. Dr. Müller hat bereits Versuche mit anderen Fluoreszenzsensoren an Hippocampuskulturen von Ratten durchgeführt, unter anderem mit roGFP (siehe 1.6.2) (Funke et al. 2011). Somit waren bereits Erfahrungen mit diesem Zellkulturmodell und Ergebnisse anderer ROS-Sensoren zum Vergleich vorhanden.

Bei HyPer handelt es sich um einen ratiometrischen Sensor mit zwei Anregungsmaxima, die sich bei Oxidation gegenläufig verhalten. Somit ist er zahlreichen anderen Sensoren überlegen. Insbesondere nicht-ratiometrische Sensoren, bei denen die Fluoreszenzintensität ausschließlich bei einer Wellenlänge gemessen werden kann. Dank seiner excitations-ratiometrischen Eigenschaften ist HyPer kaum anfällig für eventuell auftretende Veränderungen in der Zelldichte und nahezu resistent gegenüber Photobleichung durch die anregende Lichtquelle. Weiterhin zeigt HyPer ein stabiles Signal mit einer ausreichenden Spannbreite, welches sich deutlich vom Hintergrundrauschen abhebt (Belousov et al. 2006)

In primären Hippocampuskulturen zeigte HyPer eine homogene Verteilung im Cytosol mit Ausnahme des Zellkerns. Dort reicherte sich HyPer nur in geringerer Konzentration an.

Die Sensitivität von HyPer für  $\text{H}_2\text{O}_2$  war ausreichend, bereits eine Konzentration von  $10 \mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  konnte deutliche Antworten hervorrufen. Ähnliche Ergebnisse wurden bereits für *E. coli* (*Escherichia coli*) und Cos 7 (Nierenzellen der grünen Meerkatze) beschrieben (Belousov et al. 2006; Mehmeti et al. 2012). In den Experimenten zeigte HyPer-Cyto eine halbmaximale Oxidation ( $\text{EC}_{50}$ ) bei  $100 \mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  und eine maximale Oxidation bei Konzentrationen größer  $200 \mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ . Zu beachten ist, dass es sich dabei um die Konzentration handelt, mit der die gemessene Zelle umspült wurde. Die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration im Cytosol selbst kann sieben- bis zehnfach niedriger sein, da bis zum Erreichen des Cytosols ein Teil des  $\text{H}_2\text{O}_2$  durch das zelleigene Antioxidationssystem abgefangen wird oder natürlich zerfällt (Meyer und Dick 2010).

Somit liegt die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration bei der HyPer halbmaximal oxidiert ist eher bei 10-14  $\mu\text{M}$ . Für *in vitro* Messungen, die in einer Küvette durchgeführt wurden, wird die minimale messbare Konzentration und die EC 50 für isoliertes HyPer mit 25 nM und 250 nM angegeben (Belousov et al. 2006). Diese Versuche fanden jedoch in der Abwesenheit von Antioxidantien oder anderen möglichen Störfaktoren statt.

In den hier durchgeführten Experimenten antwortete HyPer reversibel auf unterschiedliche oxidative Reize. Gerade nach der Applikation von  $\text{H}_2\text{O}_2$  erreichte die Ratio in der Regel rasch wieder das Niveau der Baseline. Bei der Applikation von DEDTC und tBHP dauerte diese Erholung im Vergleich zu  $\text{H}_2\text{O}_2$  länger. Da diese Modulanzien jedoch auch nach Beendigung der Applikation noch für eine gewisse Zeit nachwirken, verzögert sich somit die Erholung der Ratio (Kim et al. 1998; Khazaei et al. 2009). HyPer reagiert reversibel, da der Sensor durch das zelluläre Milieu wieder in seinen reduzierten Zustand versetzt wird. Eine besondere Rolle in dieser Reduktion von HyPer spielt das Enzym Glutaredoxin, welches mittels reduziertem Glutathion die Oxy-R Domäne reduziert (Zheng et al. 1998). Dieser Vorgang konnte bereits in dem Bakterium *E. coli* gezeigt werden (Meyer und Dick 2010).

Bei der mehrmaligen Applikation von  $\text{H}_2\text{O}_2$  zeigte sich bei HyPer-Cyto und bei HyPer-Mito eine Abnahme in der Amplitude der ratiometrischen Antworten. So fiel die zweite und dritte Applikation im Vergleich zur vorangegangenen Applikation geringer aus. Dieser Effekt zeigte sich auch bei niedrigen Dosen (50  $\mu\text{M}$ ), sodass nicht davon auszugehen ist, dass oxidative Schäden an HyPer oder in der Zelle ursächlich sind. Bei Experimenten, bei denen mehr als nur ein Oxidationsmittel oder Pharmakon gegeben wird, ist dieser „Abnutzungseffekt“ daher zu beachten und in die Auswertung miteinzubeziehen.

Eine mögliche Erklärung für dieses Sensorverhalten könnte die Hyperoxidation von Peroxiredoxin darstellen. Die Hyperoxidation von Peroxiredoxin kann abhängig von der Isoform des Enzyms bereits bei sehr niedrigen  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentrationen auftreten. Gerade das cytosolische Peroxiredoxin neigt im Vergleich zum mitochondrialen Peroxiredoxin zur hyperoxidierten Form (Peskin et al. 2013). Hyperoxidiertes Peroxiredoxin gilt als Regulator der lokalen Signalfunktion von  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Wood et al. 2003; Peskin et al. 2013; Woo et al. 2003). Es ist denkbar, dass über diesen Signalweg die zellulären Kapazitäten zum Abbau von  $\text{H}_2\text{O}_2$  beeinflusst werden und dies zur stetigen Abnahme der Antworten bei Mehrfachapplikationen führt.

Bei den Versuchen HyPer mittels 10 mM DTT vollkommen zu reduzieren und somit das niedrigste Redox-Niveau zu bestimmen zeigte sich, dass HyPer in den Hippocampuszellen nicht weiter unter seinen Baseline-Wert reduziert werden konnte. In HEK 293 Zellen hingegen konnte es mit 1 mM DTT noch deutlich reduziert werden (Malinouski et al. 2011). HyPer scheint sich daher in den Zellen der primären Kulturen des Hippocampus der Maus bereits in einem maximal reduzierten Zustand zu befinden. Statt der erwarteten weiteren Absenkung der Ratio zeigten sich stark unterschiedliche multiphasische Antworten. Daher konnten die Ergebnisse von HyPer nicht semiquantitativ ausgewertet werden, da ein Ratio Wert für die maximale Reduktion nicht sicher ermittelt werden konnte.

Das mittlere Redoxpotential des redoxsensiblen Dithiol-Disulfidpaares der Oxy-R-Domäne wird mit -185 mV angegeben (Zheng et al. 1998). An diesem Punkt sind 50 % der Oxy-R-Domänen reduziert und 50 % oxidiert. In diesem Zustand kann HyPer in gleichem Maße auf Oxidation und Reduktion reagieren. Je niedriger das mittlere Redoxpotential des umgebenden Zellmilieus ist, desto größer ist der Anteil an reduzierten Oxy-R-Domänen und desto größer ist auch das Reaktionsvermögen auf oxidative Reize. Gleichzeitig ist aber das Reaktionsvermögen auf reduzierende Reize im gleichen Maße niedriger. Dies scheint im Cytosol der Hippocampuskulturen der Fall zu sein, weshalb eine weitere maßgebliche Reduktion mittels DTT nicht gelang. Veröffentlichte mittlere Redoxpotentiale für das endoplasmatische Retikulum, das Cytosol und die Mitochondrien liegen bei -240 mV, -320 mV und -360 mV (Hanson et al. 2004; Meyer und Dick 2010). Damit scheint HyPer sich eher für weniger reduzierende Zellmilieus zu eignen. Jedoch zeigte sich HyPer, welches das Lumen des endoplasmatischen Retikulums als Zielsequenz hatte, zu einem großen Teil bereits oxidiert (Enyedi et al. 2010; Malinouski et al. 2011; Mehmeti et al. 2012). Dies stellt die Einsetzbarkeit des Sensors auch in stark oxidierender Zellmilieus in Frage.

Fluoreszenzindikatoren bei denen YFP und cpYFP als Chromophore dienen sind besonders anfällig für nicht oxidative Ratioverschiebungen durch Veränderungen der Halidkonzentration und des pH-Werts (Schwarzländer et al. 2011; Meyer und Dick 2010; Roma et al. 2012; Wachter et al. 2000). Da auch bei dem Redoxsensor HyPer cpYFP als Chromophore dient wurde getestet, ob HyPer auf physiologisch relevante Veränderungen der Chloridkonzentration oder Veränderungen des pH-Werts reagiert. Der Sensor zeigte kaum eine Reaktion auf eine Verschiebung der Chloridkonzentration, wohingegen er deutlich auf pH-Wert-Veränderungen reagierte. Die Ratio zeigte eine vermeintliche Reduktion bei Azidifizierung und eine vermeintliche Oxidation bei Alkalisierung. Ähnlich verhielt sich HyPer bei *in vitro* durchgeführten pH-Titrationen (Belousov et al. 2006). Somit muss auch in einer pH-gepufferten Umgebung wie dem Cytosol mit einer Beeinflussung von HyPer durch pH-Wert-Veränderungen gerechnet werden. Es empfiehlt sich daher mittels pH-sensitiver Sensoren wie z. B. SypHer, der redox-insensitiven Variante von HyPer, den pH-Wert während der Experimente zu beobachten, um eine mögliche Beeinflussung in die Interpretation der Ergebnisse einzubeziehen (Matlashov et al. 2015; Weller et al. 2014).

Von der Arbeitsgruppe um Herrn Prof. Dr. Müller durchgeführte Experimente mit SypHer, zeigten bei Konzentrationen von 5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eine leichte, kurze Alkalisierung gefolgt von einer länger andauernden Azidifizierung (Weller et al. 2014). Diese Erkenntnisse könnten die vermeintliche Teilerholung der Ratio bei größeren H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentrationen erklären (siehe 3.1.4). Bei niedrigen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentrationen (50 µM) konnte eine vorübergehende Elevation der SypHer-Ration beobachtet werden, welche als leichte Alkalisierung zu deuten ist (Weller et al. 2014). Somit könnte die HyPer-Ratio während Azidifikation potenziell unterschritten und bei Alkalisierung potenziell überschritten worden sein. Dies zeigt, dass die Möglichkeit pH-Wert bedingter Messartefakte auch bei niedrigen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentrationen beachtet werden sollte.

Basierend auf *in vitro* durchgeführten Experimenten mit verschiedenen Oxidantien wird HyPer als  $\text{H}_2\text{O}_2$ -spezifisch und nicht sensitiv gegenüber Superoxid, Peroxinitrit, Stickstoffmonoxid und oxidiertem Glutathion beschrieben (Belousov et al. 2006). Die Funktion von HyPer basiert jedoch auf der Reduktion und Oxidation der Thiole der Cysteine innerhalb der Oxy-R Domäne. Befindet sich die Oxy-R Domäne in einem oxidierten Zustand wird sie mittels reduziertem Glutathion erneut reduziert (Meyer und Dick 2010; Åslund et al. 1999; Zheng et al. 1998; Belousov et al. 2006). HyPer ist somit eher als ein Sensor zu verstehen, der das zelluläre Verhältnis zwischen Oxidation durch  $\text{H}_2\text{O}_2$  und Reduktion von Glutathion widerspiegelt (Meyer und Dick 2010). Es ist deshalb wichtig zu beachten in welcher Konzentration oxidiertes und reduziertes Glutathion vorliegt, da dieses einen Einfluss auf die Oxy-R Domäne und somit auf das Antwortverhalten von HyPer hat (Meyer und Dick 2010).

In den Zellkulturen des Hippocampus reagierte HyPer prompt mit den Oxidantien  $\text{H}_2\text{O}_2$  und tBHP und zeigte kurz nach Applikation einen deutlichen Anstieg im Fluoreszenzratio. Weiterhin zeigte HyPer eine ausreichende Sensitivität, um Veränderungen der endogenen ROS-Produktionen, bedingt durch die Blockade der Superoxiddismutase oder der Atmungskette, zu messen. Die pharmakologische Blockade der Atmungskette hat einen Anstieg von Superoxid zur Folge (Prabhakaran et al. 2002). Die Blockade der Superoxiddismutase verhindert den weiteren Abbau von Superoxid, sodass es akkumuliert (Khazaei et al. 2009). In beiden Versuchen kommt es somit zu einer Erhöhung des zellulären Superoxids. Es ist jedoch zu beachten, dass Superoxid auch spontan zu  $\text{H}_2\text{O}_2$  dismutieren kann. Aus diesem Grund kann keine eindeutige Aussage darüber getroffen werden, ob HyPer eventuell doch das Superoxid detektierte oder ob es mit dem sekundär entstandenen  $\text{H}_2\text{O}_2$  reagierte. Möglicherweise ist auch beides der Fall. In Experimenten der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Müller mit SypHer zeigte sich, dass sowohl tBHP als auch DEDTC Einfluss auf den pH-Wert haben (Weller et al. 2014). Deshalb ist davon auszugehen, dass ein Teil der Ratio gegebenenfalls durch die Verschiebung des pH-Werts bedingt ist. Die pH-Wert-Veränderung ist aber nicht ausgeprägt genug, um als alleinige Ursache für die Ratio-Erhöhung in Frage zu kommen. Somit bleibt es fraglich, ob die Erhöhung der Ratio hauptsächlich durch sekundär entstandenes  $\text{H}_2\text{O}_2$  zustande gekommen ist oder ob doch eine Sensibilität gegenüber Superoxid mitverantwortlich ist.



Der Entzug von Sauerstoff verursachte einen initialen Abfall der Ratio gefolgt von einem Anstieg über Baseline-Niveau bei Reoxygenierung. Ein nahezu identischer Kurvenverlauf zeigte sich bei den Versuchen mit Propionat, weshalb ähnliche pH-Wert-Veränderung zumindest teilweise als Ursache für die HyPer-Antwort wahrscheinlich sind. Unter Sauerstoffentzug und dem Erliegen der oxidativen Phosphorylierung könnte die einsetzende Laktatproduktion zu einer Azidifizierung des Cytosols führen gefolgt von einer Gegenregulation der Zelle. Mit der Reoxygenierung und der Abnahme der Laktatproduktion kommt es zum Überhang der Gegenregulation mit einer kurzzeitigen Alkalisierung des Cytosols. Die vermuteten pH-Wert-Veränderungen konnten in den Versuchen mit SypHer außerhalb dieser Arbeit bestätigt werden (Weller et al. 2014). Somit besteht die beobachtete Anoxie nur zum Teil aus den tatsächlichen Redox-Vorgängen, die bei Sauerstoffentzug auftreten. Während der Anoxie kommt es in den Zellen initial zu einer Verschiebung der Redoxhomöostase zum reduzierenden Milieu hin, da die stetige ROS-Produktion der Atmungskette wegfällt (Chan 2001; Boveris und Chance 1973). Bei Reoxygenierung kommt es zur verstärkten Oxidation (Chan 2001; Du et al. 1998).

In den Experimenten, in denen das Antwortverhalten von Hyper auf die Applikation von Glutamat bestimmt werden sollte, zeigte sich HyPer als ungeeignet. Durch Glutamat kommt es zu einer Erhöhung der ROS-Produktion in Neuronen (Reynolds und Hastings 1995; Lafon-Cazal et al. 1993). Zeitgleich verursacht Glutamat jedoch auch eine Azidifikation des zellulären pH-Werts um ca. 0.2-0.4 pH-Einheiten (Reynolds und Hastings 1995; Wang et al. 1994; Irwin et al. 1994). Eine vermehrte ROS-Produktion war im HyPer-Fluoreszenz-Ratio nicht zu beobachten, da die Azidifikation durch Glutamat im Einfluss auf den Sensor überwog. Somit konnten auch hier auf Grund der pH-Wert-Sensibilität des Sensors keine zuverlässigen Aussagen zu den Glutamat-induzierten Redox-Veränderungen getroffen werden

HyPer ist als Sensor den häufig verwendeten *synthetic small-molecule dyes* (kleine synthetische molekulare Farbstoffe) deutlich überlegen. Im Vergleich zu diesen zeigt HyPer eine größere Signaldynamik und seine Oxidation ist reversibel. Weiterhin neigt HyPer nicht zur Selbstoxidation, ist anregungsstabil und verweilt suffizient in den transfizierten Zellen. Aufgrund seiner zwei Anregungsmaxima, welche bei Oxidation gegenläufig reagieren, verhält sich der Sensor excitations-ratiometrisch. Dies ermöglicht eine bessere Vergleichbarkeit zwischen unterschiedlichen Zellen und verschiedenen Experimenten. Außerdem können Ergebnisse semiquantitativ analysiert werden, sofern es gelingt die Maximalwerte für Reduktion und Oxidation zu ermitteln. Ein weiterer Vorteil von HyPer ist seine schnelle Antwortkinetik, die es ermöglicht auch kurze Ereignisse in der Zelle zu beobachten.

Innerhalb der genetisch kodierten Fluoreszenzindikatoren gehört HyPer jedoch nicht zu den Besten seiner Klasse. Der Redoxsensor roGFP (siehe 1.5.2.3) zum Beispiel zeigt unter gleichen Bedingungen stabilere und verlässlichere Antworten (Funke et al. 2011). Er reagiert zuverlässig sowohl auf oxidative als auch auf reduktive Reize und ist bedeutend resistenter gegenüber pH-Wert-Verschiebungen (Meyer und Dick 2010). Weiterhin zeigt roGFP keine Abnahme der Antworten durch mehrmalige Oxidation (Funke et al. 2011).

Allerdings ist zu bedenken, dass roGFP keine  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Spezifität aufweist, sondern vielmehr ein genereller Redoxsensor ist, der primär den Thiol-Redoxstatus misst.

Mittlerweile gibt es auch eine  $\text{H}_2\text{O}_2$  sensitive Variante des roGFP Sensors namens RoGFP-Orp1 (Guo et al. 2014). Dabei handelt es sich um ein roGFP, dem eine  $\text{H}_2\text{O}_2$ -sensitive Hefe-Peroxidase Orp1 hinzugefügt wurde (Guo et al. 2014). Mit diesem Sensor wurde bereits erfolgreich in *Drosophila*  $\text{H}_2\text{O}_2$  gemessen (Barata und Dick 2013).

Auch vom HyPer-Sensor wurden weitere Optimierungen berichtet. Weiterentwickelte Varianten von HyPer, HyPer 2 und HyPer 3 zeigen im Vergleich eine schnellere Antwortkinetik und ein stärkeres Antwortsignal. Sie sind aber ebenso sensibel für pH-Wert-Veränderungen, da auch bei ihnen cpYFP (siehe 1.5.2.1) als Chromophor dient (Bilan et al. 2013).

Schlussfolgernd ist HyPer als fortschrittlicher Redox-Senor zu bewerten, der jedoch nicht die beste Wahl zur Analyse von Redox-Homöostase und Redox-Signalwegen unter physiologischen und pathologischen Bedingungen darstellt. Zwar ist er aufgrund seiner ratiometrischen Eigenschaften den synthetischen Farbstoffen klar überlegen, seine Einsetzbarkeit wird aber deutlich durch seine pH-Sensibilität und die mangelnde Reaktion auf reduzierende Reize eingeschränkt. Deshalb sollte zunächst genauestens getestet werden, ob HyPer sich für die jeweiligen Versuchsbedingungen eignet. Um Fehlinterpretationen zu vermeiden, empfiehlt es sich parallele Versuche mittels des pH-Sensors SypHer zu überwachen. Nur so können pH-Wert bedingte Artefakte zuverlässig von tatsächlichen Redox-Ereignissen unterschieden werden.

## 5 Zusammenfassung

Sauerstoffradikale, auch reaktive Oxygen-Spezies (ROS) genannt, spielen sowohl in der Entstehung neurologischer Erkrankungen als auch in der Zellkommunikation eine bedeutende Rolle. Daher besteht ein enormes Interesse daran, Redox-Prozesse auf subzellulärer Ebene besser zu verstehen. In dieser Arbeit wurde der genetisch kodierte optische  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Sensor HyPer in primären Hippocampuskulturen von Mäusen in Bezug auf sein Antwortverhalten untersucht. Zwei Tage nachdem die Sensor-DNA mittels Lipofektion in die Zellen eingebracht wurde, wiesen Neurone und Gliazellen eine ausreichende HyPer-Expressionsdichte auf. Der Sensor reagierte auf  $\text{H}_2\text{O}_2$  Applikationen reversibel und konzentrationsabhängig. Damit ist er den klassischen synthetischen oxidationssensitiven Farbstoffen eindeutig überlegen. Mehrmalige Applikationen gleicher  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentrationen führten jedoch zu einer stetigen Abnahme der Sensorantwort. Dies war sowohl bei millimolaren als auch bei mikromolaren Konzentrationen der Fall. Hinzu kommt, dass HyPer bei der einmaligen Applikation von  $\text{H}_2\text{O}_2$  in millimolarer Konzentration noch in Anwesenheit des Oxidationsmittels eine Abnahme des Fluoreszenzratio zeigt. Obwohl HyPer als  $\text{H}_2\text{O}_2$  spezifisch beschrieben wird, reagierte es offenbar auch auf andere Oxidationsmittel sowie auf eine Erhöhung der endogenen Superoxidproduktion. Propionat induzierte pH-Wert-Veränderungen des Cytosols hatten ebenfalls einen merklichen Effekt auf die Fluoreszenzratio. So zeigte HyPer eine scheinbare Reduktion bei Azifikation und eine scheinbare Oxidation bei Alkalisierung. Dieser pH-Wert bedingte Effekt auf den Sensor konnte mittlerweile bei nachfolgenden Untersuchungen mittels des pH-Sensors SypHer eindeutig bewiesen werden. Anoxie und Reoxygenierung führten zu biphasischen Ratio-Verschiebungen im Sinne einer Reduktion gefolgt von einer Oxidation. Anoxie bedingte pH-Wert-Verschiebungen erhöhten die ratiometrischen Antworten. Deutliche Veränderung der Chloridkonzentration hatten kaum einen Effekt auf den Sensor. In den Mitochondrien exprimiertes HyPer reagierte in gleicher Art und Weise auf  $\text{H}_2\text{O}_2$  Applikationen. Im Durchschnitt fielen die mitochondrialen Antworten allerdings geringer aus. Dies ist durch längere Diffusionswege, eine weitere Membranbarriere sowie gegebenenfalls auch durch eine stabilere Redoxhomöostase der Mitochondrien-Matrix zu erklären. Schlussfolgernd sind die mit HyPer erlangten Ergebnisse aufgrund seiner pH-Sensibilität, der mangelnden Reaktion auf Reduktionsmittel und der Adaption auf mehrfache Applikation von Oxidationsmittel mit Bedacht zu interpretieren. Zur Vermeidung von Fehlinterpretationen ist es essenziell, die durchgeführten Versuche mit einem pH-Sensor wie z. B. SypHer zu überwachen.

## 6 Literaturverzeichnis

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P: Molecular biology of the cell. 4. Auflage; Garland Science, New York. 2002

Aranda A, Sequedo L, Tolosa L, Quintas G, Burello E, Castell JV, Gombau L (2013): Dichlorodihydro-fluorescein diacetate (DCFH-DA) assay: a quantitative method for oxidative stress assessment of nanoparticle-treated cells. *Toxicol In Vitro* 27, 954–963

Åslund F, Zheng M, Beckwith J, Storz G (1999): Regulation of the OxyR transcription factor by hydrogen peroxide and the cellular thiol-disulfide status. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 6161–6165

Barata AG, Dick TP (2013): In vivo imaging of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in *Drosophila*. *Meth Enzymol* 526, 61–82

Barrientos A, Fontanesi F, Diaz F (2009): Evaluation of the mitochondrial respiratory chain and oxidative phosphorylation system using polarography and spectrophotometric enzyme assays. *Curr Protoc Hum Genet* 63,19.3.1-19.3.14

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

Belousov VV, Fradkov AF, Lukyanov KA, Staroverov DB, Shakhbazov KS, Terskikh AV, Lukyanov S (2006): Genetically encoded fluorescent indicator for intracellular hydrogen peroxide. *Nat Methods* 3, 281–286

Bergendi L, Benes L, Durackova Z, Ferencik M (1999): Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life Sci* 65, 1865–1874

Bilan DS, Pase L, Joosen L, Gorokhovatsky AY, Ermakova YG, Gadella TW, Grabher C, Schultz C, Lukyanov S, Belousov VV (2013): HyPer-3: A genetically encoded H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> probe with improved performance for ratiometric and fluorescence lifetime imaging. *ACS Chem Biol* 8, 535–542

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

Buono MJ, Kolkhorst FW (2001): Estimating ATP resynthesis during a marathon run: a method to introduce metabolism. *Adv Physiol Educ* 25, 70–71

Cadenas E, Sies H (1998): The lag phase. *Free Radic Res* 28, 601–609

Chan PH (2001): Reactive oxygen radicals in signaling and damage in the ischemic brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 21, 2–14

- Dikalov SI, Harrison DG (2014): Methods for detection of mitochondrial and cellular reactive oxygen species. *Antioxid Redox Signal* 20, 372–382
- Du G, Mouithys-Mickalad A, Sluse FE (1998): Generation of superoxide anion by mitochondria and impairment of their functions during anoxia and reoxygenation in vitro. *Free Radic Biol Med* 25, 1066–1074
- Enyedi B, Varnai P, Geiszt M (2010): Redox state of the endoplasmic reticulum is controlled by Ero1L-alpha and intraluminal calcium. *Antioxid Redox Signal* 13, 721–729
- Felgner PL, Gadek TR, Holm M, Roman R, Chan HW, Wenz M, Northrop JP, Ringold GM, Danielsen M (1987): Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 7413–7417
- 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
- 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, Hepp S, Probst I, Müller M (2006): Mitochondrial inhibition prior to oxygen-withdrawal facilitates the occurrence of hypoxia-induced spreading depression in rat hippocampal slices. *J Neurophysiol* 96, 492–504
- Großer E, Hirt U, Janc OA, Menzfeld C, Fischer M, Kempkes B, Vogelgesang S, Manzke TU, Opitz L, Salinas-Riester G et al. (2012): Oxidative burden and mitochondrial dysfunction in a mouse model of Rett syndrome. *Neurobiol Dis* 48, 102–114
- Guo H, Aleyasin H, Dickinson BC, Haskew-Layton RE, Ratan RR (2014): Recent advances in hydrogen peroxide imaging for biological applications. *Cell Biosci* 4, 64
- 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
- Hayama N, Wang W, Schneider EG (1995): Osmolality-induced changes in aldosterone secretion involve a chloride-dependent process. *Am J Physiol* 268, R8-13
- Irwin RP, Lin SZ, Long RT, Paul SM (1994): N-methyl-D-aspartate induces a rapid, reversible, and calcium-dependent intracellular acidosis in cultured fetal rat hippocampal neurons. *J Neurosci* 14, 1352–1357
- Khazaei M, Moien-Afshari F, Elmi S, Mirdamadi A, Laher I (2009): The effects of diethyldithiocarbamate, a SOD inhibitor, on endothelial function in sedentary and exercised db/db mice. *Pathophysiology* 16, 15–18
- Kim JA, Kang YS, Kim YO, Lee SH, Lee YS (1998): Role of Ca<sup>2+</sup> influx in the tert-butyl hydroperoxide-induced apoptosis of HepG2 human hepatoblastoma cells. *Exp Mol Med* 30, 137–144

- Klatt P, Lamas S (2000): Regulation of protein function by S-glutathiolation in response to oxidative and nitrosative stress. *Eur J Biochem* 267, 4928–4944
- Kolossov VL, Spring BQ, Sokolowski A, Conour JE, Clegg RM, Kenis PJ, Gaskins HR (2008): Engineering redox-sensitive linkers for genetically encoded FRET-based biosensors. *Exp Biol Med* 233, 238–248
- Kovacic P, Pozos RS, Somanathan R, Shangari N, O'Brien PJ (2005): Mechanism of mitochondrial uncouplers, inhibitors, and toxins: focus on electron transfer, free radicals, and structure-activity relationships. *Curr Med Chem* 12, 2601–2623
- Lafon-Cazal M, Pietri S, Culcasi M, Bockaert J (1993): NMDA-dependent superoxide production and neurotoxicity. *Nature* 364, 535–537
- Lodish H, Berk A, Zipursky S L, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J: *Molecular cell biology*. 4 Auflage; Freeman, New York 2000
- Malinouski M, Zhou Y, Belousov VV, Hatfield DL, Gladyshev VN (2011): Hydrogen peroxide probes directed to different cellular compartments. *PLoS ONE* 6, e14564
- Matlashov ME, Bogdanova YA, Ermakova GV, Mishina NM, Ermakova YG, Nikitin ES, Balaban PM, Okabe S, Lukyanov S, Enikolopov G et al. (2015): Fluorescent ratiometric pH indicator SypHer2: Applications in neuroscience and regenerative biology. *Biochim Biophys Acta* 1850, 2318–2328
- Mehmeti I, Lortz S, Lenzen S (2012): The H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-sensitive HyPer protein targeted to the endoplasmic reticulum as a mirror of the oxidizing thiol-disulfide milieu. *Free Radi Biol Med* 53, 1451–1458
- Meyer AJ, Dick TP (2010): Fluorescent protein-based redox probes. *Antioxid Redox Sign* 13, 621–650
- Morel F (2007): [Molecular aspects of chronic granulomatous disease. "the NADPH oxidase complex"]. *Bull Acad Natl Med* 191, -390; discussion 390-392
- Muir M, Williams L, Ferenci T (1985): Influence of transport energization on the growth yield of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 163, 1237–1242
- Murphy MP (2009): How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J* 417, 1–13
- Niethammer P, Grabher C, Look AT, Mitchison TJ (2009): A tissue-scale gradient of hydrogen peroxide mediates rapid wound detection in zebrafish. *Nature* 459, 996–999
- Nogueira CW, Zeni G, Rocha JBT (2004): Organoselenium and organotellurium compounds: toxicology and pharmacology. *Chem Rev* 104, 6255–6285
- Østergaard H, Henriksen A, Hansen FG, Winther JR (2001): Shedding light on disulfide bond formation: engineering a redox switch in green fluorescent protein. *Embo J* 20, 5853–5862

- Peskin AV, Dickerhof N, Poynton RA, Paton LN, Pace PE, Hampton MB, Winterbourn CC (2013): Hyperoxidation of peroxiredoxins 2 and 3: rate constants for the reactions of the sulfenic acid of the peroxidatic cysteine. *J Biol Chem* 288, 14170–14177
- Prabhakaran K, Li L, Borowitz JL, Isom GE (2002): Cyanide induces different modes of death in cortical and mesencephalon cells. *J Pharmacol Exp Ther* 303, 510–519
- Reynolds IJ, Hastings TG (1995): Glutamate induces the production of reactive oxygen species in cultured forebrain neurons following NMDA receptor activation. *J Neurosci* 15, 3318–3327
- Rich PR (2003): The molecular machinery of Keilin's respiratory chain. *Biochem Soc Trans* 31, 1095–1105
- Roma LP, Duprez J, Takahashi HK, Gilon P, Wiederkehr A, Jonas JC (2012): Dynamic measurements of mitochondrial hydrogen peroxide concentration and glutathione redox state in rat pancreatic beta-cells using ratiometric fluorescent proteins: confounding effects of pH with HyPer but not roGFP1. *Biochem J* 441, 971–978
- Schlue WR, Thomas RC (1985): A dual mechanism for intracellular pH regulation by leech neurones. *J Physiol* 364, 327–338
- Schulz JB, Beal MF (1994): Mitochondrial dysfunction in movement disorders. *Curr Opin Neurol* 7, 333–339
- Schwarzländer M, Logan DC, Fricker MD, Sweetlove LJ (2011): The circularly permuted yellow fluorescent protein cpYFP that has been used as a superoxide probe is highly responsive to pH but not superoxide in mitochondria: implications for the existence of superoxide 'flashes'. *Biochem J* 437, 381–387
- Schwarzländer M, Murphy MP, Duchon MR, Logan DC, Fricker MD, Halestrap AP, Muller FL, Rizzuto R, Dick TP, Meyer AJ et al. (2012): Mitochondrial 'flashes': a radical concept rephined. *Trends Cell Biol* 22, 503–508
- Shabalina IG, Nedergaard J (2011): Mitochondrial ('mild') uncoupling and ROS production: physiologically relevant or not? *Biochem Soc Trans* 39, 1305–1309
- Turrens JF (2003): Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol* 552, 335–344
- Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes CJ, Telser J (2004): Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol Cell Biochem* 266, 37–56
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J (2007): Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 39, 44–84
- Van de Bittner, Genevieve C, Dubikovskaya EA, Bertozzi CR, Chang CJ (2010): In vivo imaging of hydrogen peroxide production in a murine tumor model with a chemoselective bioluminescent reporter. *Proc Natl Acad Sci USA* 107, 21316–21321

- Wachter RM, Yarbrough D, Kallio K, Remington SJ (2000): Crystallographic and energetic analysis of binding of selected anions to the yellow variants of green fluorescent protein. *J Mol Biol* 301, 157–171
- Wang GJ, Randall RD, Thayer SA (1994): Glutamate-induced intracellular acidification of cultured hippocampal neurons demonstrates altered energy metabolism resulting from  $\text{Ca}^{2+}$  loads. *J Neurophysiol* 72, 2563–2569
- Wang X, Fang H, Huang Z, Shang W, Hou T, Cheng A, Cheng H (2013): Imaging ROS signaling in cells and animals. *J Mol Med (Berl)* 91, 917–927
- Weller J, Kizina KM, Can K, Bao G, Muller M (2014): Response properties of the genetically encoded optical  $\text{H}_2\text{O}_2$  sensor HyPer. *Free Radic Biol Med* 76, 227–241
- Weyemi U, Lagente-Chevallier O, Boufrajech M, Prenois F, Courtin F, Caillou B, Talbot M, Dardalhon M, Al Ghuzlan A, Bidart JM et al. (2012): ROS-generating NADPH oxidase NOX4 is a critical mediator in oncogenic H-Ras-induced DNA damage and subsequent senescence. *Oncogene* 31, 1117–1129
- Wilde GJ, Pringle AK, Wright P, Iannotti F (1997): Differential vulnerability of the CA1 and CA3 subfields of the hippocampus to superoxide and hydroxyl radicals in vitro. *J Neurochem* 69, 883–886
- Woo HA, Chae HZ, Hwang SC, Yang K-S, Kang SW, Kim K, Rhee SG (2003): Reversing the inactivation of peroxiredoxins caused by cysteine sulfinic acid formation. *Science* 300, 653–656
- Wood ZA, Poole LB, Karplus PA (2003): Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signaling. *Science* 300, 650–653
- Zheng M, Åslund F, Storz G (1998): Activation of the OxyR transcription factor by reversible disulfide bond formation. *Science* 279, 1718–1721



## Danksagung

Einen besonderen Dank möchte ich an meinen Doktorvater Prof. Dr. rer. nat. Michael Müller richten, der mir diese Promotion ermöglicht und großes Vertrauen in mich und meine Arbeit gesetzt hat. Ich bin ihm außerordentlich dankbar für die nicht nur wissenschaftliche, sondern auch persönliche Unterstützung für die Dauer dieser Arbeit.

Bedanken möchte ich mich auch bei Belinda Kempkes, die mich mit der Weitergabe ihrer technischen Kenntnisse im Labor unterstützt hat und mir mit ihren Ratschlägen zur Seite stand.

Herzlich möchte ich mich auch bei meiner Familie für die fortwährende Unterstützung während der Erstellung meiner Doktorarbeit bedanken.