

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

# **Modulation der synaptischen Plastizität im Rett-Syndrom durch Antioxidantien-Fütterung**

INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von

**Victoria Brand**

aus

Heilbad Heiligenstadt

Göttingen 2021

Dekan: Prof. Dr. med. W. Brück

### **Betreuungsausschuss**

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

Ko-Betreuer/in: Prof. Dr. rer. nat. T. Bayer

### **Prüfungskommission**

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

Ko-Referent/in: Prof. Dr. rer. nat. T. Bayer

Drittreferent/in: Prof. Dr. med. R. Dressel

Datum der mündlichen Prüfung: 19.10.2021

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Modulation der synaptischen Plastizität im Rett-Syndrom durch Antioxidantien-Fütterung" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den .....

.....  
(Unterschrift)

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>II</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>III</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>IV</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Das klassische Rett-Syndrom .....	1
1.2 Genetischer Hintergrund .....	3
1.2.1 <i>MECP2</i> -Mutationen im klassischen Rett-Syndrom .....	3
1.2.2 Das MeCP2-Protein – Expression und Funktion.....	4
1.3 Neuronale Veränderungen und synaptische Dysfunktion im Rett-Syndrom.....	6
1.4 Gesteigerte ROS-Produktion und Redox-Imbalance im Rett-Syndrom .....	7
1.4.1 Mitochondriale Dysfunktion .....	7
1.4.2 Reaktive Sauerstoffspezies und oxidativer Stress .....	8
1.4.3 Reduktion von oxidativem Stress als therapeutisches Ziel.....	9
1.5 Ziel dieser Arbeit .....	10
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>12</b>
2.1 Mausmodell des Rett-Syndroms .....	12
2.2 Antioxidantien-Fütterung.....	14
2.3 Präparation von akuten Hirnschnitten.....	14
2.4 Blutparameter: Hämatokrit und Blutglukosespiegel .....	16
2.5 Elektrophysiologische Messungen.....	17
2.6 Statistik .....	20
<b>3 Ergebnisse.....</b>	<b>21</b>
3.1 Allgemeiner Phänotyp .....	21
3.2 Synaptische Funktion und Plastizität .....	24
3.2.1 Relevante Messparameter der fEPSPs .....	24
3.2.2 Modulation der Posttetanischen Potenzierung und der Langzeitpotenzierung .....	26
<b>4 Diskussion.....</b>	<b>31</b>
4.1 Veränderungen des allgemeinen Phänotyps.....	31
4.2 Modulation der synaptischen Funktion und Plastizität.....	32
4.3 Fazit zur Antioxidantien-Fütterung.....	35
<b>5 Zusammenfassung.....</b>	<b>37</b>
<b>6 Literaturverzeichnis .....</b>	<b>39</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Stadien des Krankheitsverlaufs. ....	2
Abbildung 2: Transkriptionsregulation des BDNF-Gens durch MeCP2.....	5
Abbildung 3: Vergleich Körpergröße Wildtyp- und <i>Meep2</i> -knockout-Maus. ....	13
Abbildung 4: Anfertigung coronaler corticohippocampaler Hirnschnitte. ....	15
Abbildung 5: <i>Hemislices</i> in der Aufbewahrungskammer.....	16
Abbildung 6: Interfacekammer.....	18
Abbildung 7: Hippocampus mit Elektroden.....	19
Abbildung 8: Vergleich von Gewicht, Größe, BMI und Blutparametern.....	23
Abbildung 9: Relevante Messparameter der fEPSPs. ....	25
Abbildung 10: Beispielregistrierungen im Vergleich. ....	28
Abbildung 11: Verbesserte PTP- und LTP-Amplituden nach Antioxidantien-Fütterung. ....	29
Abbildung 12: Verbesserte PTP- und LTP-Anstiege nach Antioxidantien-Fütterung. ....	30

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Vergleich der phänotypischen Parameter.....	22
Tabelle 2: Vergleich der normierten fEPSP-Amplituden.....	26
Tabelle 3: Vergleich der normierten fEPSP-Anstiege .....	27

## Abkürzungsverzeichnis

ACSF	<i>artificial cerebrospinal fluid</i>
AO-Futter	Antioxidantien-Futter
ATP	Adenosintriphosphat
BDNF	<i>brain derived neurotrophic factor</i> , vom Gehirn stammender neurotropher Faktor
BMI	<i>body mass index</i> , Körpermasseindex
CA	<i>Cornu ammonis</i>
DNA	Desoxiribonukleinsäure
fEPSP	<i>field excitatory postsynaptic potential</i> , exzitatorisches postsynaptisches Feldpotential
GABA	$\gamma$ -Aminobuttersäure
HIF	Hypoxie-induzierter Faktor
IP <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5-trisphosphat
LTP	<i>long-term potentiation</i> , Langzeitpotenzierung
MBD	methyl-CpG-bindenden Domäne
MeCP2	<i>methyl-CpG-binding-protein 2</i> (exprimiertes Protein)
MECP2	<i>methyl-CpG-binding-protein 2</i> (codierendes Gen des Menschen)
Mecp2	<i>methyl-CpG-binding-protein 2</i> (codierendes Gen der Maus)
Mecp2 <sup>-/-</sup>	Mecp2 <sup>-/-</sup> -knockout
NMDA	N-methyl-D-aspartat
PTP	<i>post-tetanic potentiation</i> , Posttetanische Potenzierung
RNS	reaktive Nitrogenspezies
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RTT	Rettsyndrom
RyR	Ryanodin-Rezeptoren
SOD	Superoxid-Dismutase
WT	Wildtyp

# 1 Einleitung

## 1.1 Das klassische Rett-Syndrom

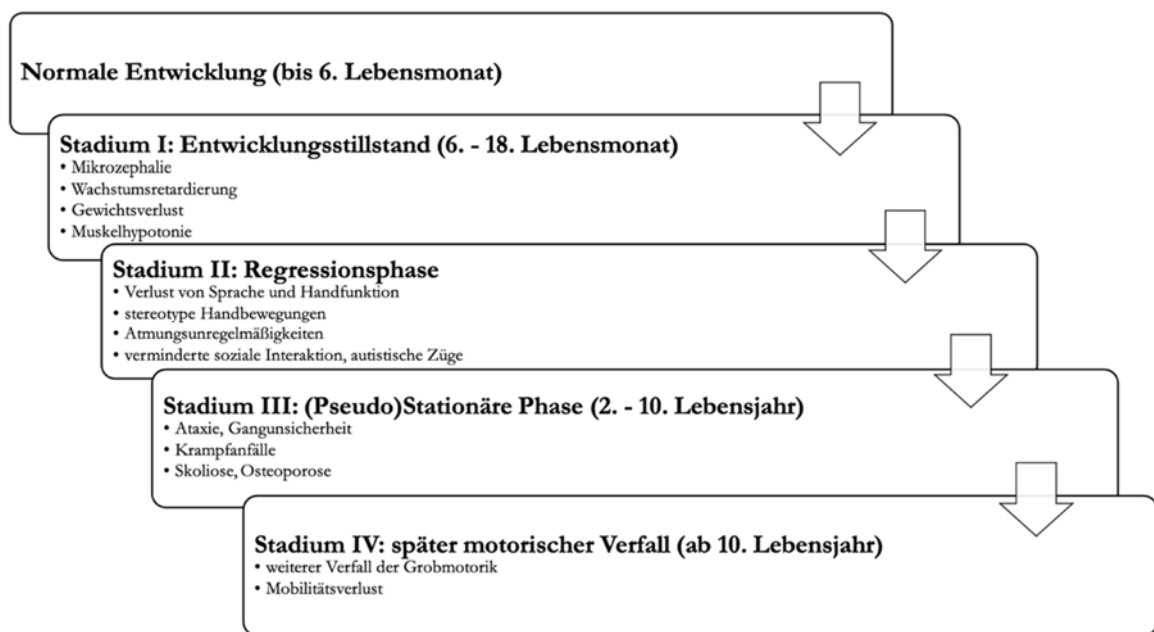
Das Rett-Syndrom wurde erstmals 1966 vom österreichischen Neuropädiater Andreas Rett beschrieben. Es handelt sich hierbei um eine progressive neurologische Entwicklungsstörung, die mit einer Inzidenz von 1:10.000 bis 1:15.000 aller weiblichen Lebendgeburten fast ausschließlich Mädchen betrifft (Rett 1966; Hagberg 1985; Burd et al. 1991; Leonard et al. 1997).

Die Diagnose des Rett-Syndroms basiert auf einer Reihe klinischer Kriterien (Hagberg et al. 1985), die mit der Zeit immer weiter überarbeitet und verfeinert wurden, um die Diagnostizierbarkeit der Krankheit zu verbessern (Hagberg et al. 2002; Neul et al. 2010). Das klassische Rett-Syndrom ist charakterisiert durch eine normale prä- und perinatale Periode sowie einer normalen psychomotorischen Entwicklung in den ersten sechs Lebensmonaten, bevor es zum Entwicklungsstillstand und einer Phase der Regression kommt. Bei Geburt ist der Kopfumfang meist normal, jedoch wird eine Verlangsamung des postnatalen Kopfwachstums auffällig. Charakteristisch sind zudem der Verlust zielgerichteter Handmotorik und stereotype Handbewegungen. Zu den Hauptkriterien zählen weiterhin sozialer Rückzug, kommunikative Dysfunktion, Sprachverlust und kognitive Einschränkungen sowie eine beeinträchtigte bzw. sich verschlechternde Fortbewegung. Weitere Kriterien, die die Diagnose unterstützen, sind unter anderem Atmungsunregelmäßigkeiten während Wachphasen, ein gestörter Schlaf-Wach-Rhythmus, Skoliose bzw. Kyphose, Wachstumsretardierung und abnormer Muskeltonus. Neben dieser klassischen Form des Rett-Syndroms sind inzwischen eine Reihe von Varianten beschrieben, die einen mehr oder weniger ausgeprägten Phänotyp aufweisen (Hagberg und Skjeldal 1994; Hagberg et al. 2002; Weaving et al. 2005; Neul et al. 2010).

Der Krankheitsverlauf des klassischen Rett-Syndroms lässt sich nach einem Stufen-Modell in vier Stadien einteilen (Abbildung 1) (Hagberg und Witt-Engerström 1986; Chahrour und Zoghbi 2007). Zwischen dem 6. und 18. Lebensmonat kommt es nach einer Phase der normalen Entwicklung, in der das Kind schon Fähigkeiten wie Laufen oder Sprechen einiger Wörter erlernen kann, im Stadium I der Erkrankung zum Entwicklungsstillstand. Ein verlangsamtes Kopfwachstum, welches meist bis zum zweiten Lebensjahr hin zur Mikrozephalie führt, ist ein erstes Anzeichen für einen neurologischen Anteil am Krankheitsverlauf. Auch das generelle Körperwachstum nimmt ab, gefolgt von Gewichtsverlust und Muskelhypotonie. Darauf folgt das Stadium II, das auch als Regressionsphase bezeichnet wird. In diesem Stadium verliert das erkrankte Kind bereits erlernte Fähigkeiten, wie das Sprechen und den funktionellen Gebrauch der Hände. Anstelle



dessen entwickelt es für das Rett-Syndrom charakteristische, stereotype Handbewegungen, wie Wring- oder Waschbewegungen (*hand washing movements*). Atmungsunregelmäßigkeiten mit Phasen der Hyperventilation aber auch Apnoe können im Wachzustand auftreten. Zudem werden verminderte soziale Interaktion und andere autistische Züge beobachtet. Nach dieser schnellen Regressionsphase folgt zwischen dem zweiten und zehnten Lebensjahr das Stadium III, die (Pseudo-)Stationäre Phase. Autistische Züge vermindern sich und treten in den Hintergrund. Symptome wie stereotype Handbewegungen bleiben jedoch erhalten und können sich noch verstärken. Zusätzlich werden Ataxie und Gangunsicherheiten deutlich und erste Krampfanfälle treten auf. Die Patienten verlieren immer mehr an Gewicht und leiden oftmals an Skoliose und Osteoporose. Stadium IV ist schließlich gekennzeichnet durch weiteren Verfall der Grobmotorik etwa ab dem zehnten Lebensjahr. Skoliose und Muskeldystonie verschlechtern sich und die Mobilität geht verloren, weshalb die rigiden Patienten häufig an den Rollstuhl gebunden sind. Jedoch werden Krämpfe meist seltener beobachtet und auch die soziale Kontaktfreudigkeit verbessert sich immer weiter (Chahrour und Zoghbi 2007).



**Abbildung 1: Stadien des Krankheitsverlaufs.** Mit voranschreitendem Krankheitsverlauf nehmen die Symptome, die vor allem neurologischer Art sind, immer weiter zu, und es kommt zum Verlust verschiedenster kognitiver Funktionen, wie Sprache, Lokomotion und funktionellem Gebrauch der Hände (modifiziert nach Chahrour und Zoghbi (2007)).

Über die Lebenserwartung von Patienten mit Rett-Syndrom ist noch nicht viel bekannt, da die Erkrankung erst vor etwas mehr als 50 Jahren zum ersten Mal beschrieben wurde. Eine Kohortenstudie gibt als Überlebenswahrscheinlichkeit 77,6 % für 20 Jahre, 71,5 % für 25 Jahre und 59,8 % für 37 Jahre an (Anderson et al. 2014).

Zum jetzigen Zeitpunkt gibt es noch keine kurative Therapie für das Rett-Syndrom. Verfügbare Therapieansätze sind lediglich symptomatisch und supportiv. Sie können zum

Beispiel spezielle Ernährungsprogramme, Kommunikationstraining, Physiotherapie, Orthesen oder auch operative Eingriffe beinhalten und sollten auch die betroffenen Familien unterstützen. Dies wird meist ergänzt durch eine medikamentöse Therapie mit zum Beispiel Antikonvulsiva zur Einstellung der Krämpfe oder Melatonin zur Verbesserung des Schlafes (McArthur und Budden 1998; Weaving et al. 2005).

## 1.2 Genetischer Hintergrund

### 1.2.1 *MECP2*-Mutationen im klassischen Rett-Syndrom

In über 95 % der Fälle liegt dem klassischen Rett-Syndrom eine Mutation im *MECP2*-Gen zugrunde. Dieses Gen befindet sich in Position 28 auf dem langen Arm des X-Chromosoms (Xq28) und codiert für das Protein *methyl-CpG-binding-protein 2* (MeCP2) (Amir et al. 1999).

Viele verschiedene Arten der Mutation in diesem Gen sind bekannt, jedoch machen acht *missens*- und *nonsense*-Mutationen ungefähr zwei Drittel der beim Rett-Syndrom bekannten Mutationen aus. *Missense*-Mutationen (eine falsche Aminosäure wird eingebaut) bedingen dabei meist einen milderen Phänotyp als *nonsense*-Mutationen (ein Stopp-Codon wird eingebaut und die Proteinsynthese verfrüht abgebrochen) (Cheadle et al. 2000). Doch verursachen auch Duplikationen, die nicht zu einem Verlust, sondern Zugewinn an Genfunktion führen, ähnliche neurologische Symptome (Chahrour und Zoghbi 2007).

Das Rett-Syndrom tritt in 99 % der Fälle sporadisch auf (Chahrour und Zoghbi 2007). Meist handelt es sich dabei um *De-novo*-Mutationen in der väterlichen Keimbahn (Trappe et al. 2001). Die Väter vererben dann das mutierte X-Chromosom an ihre Töchter, was einer der Gründe ist, warum fast ausschließlich Mädchen von der Krankheit betroffen sind.

Unter den erkrankten Patientinnen herrscht eine große phänotypische Variabilität. Eine Ursache dafür wird in der Inaktivierung eines X-Chromosoms in jeder Zelle der Frau gesehen. Die Entscheidung, welches X-Chromosom dabei inaktiviert wird, ist zufällig, sodass statistisch davon ausgegangen wird, dass in der Hälfte aller Zellen das mütterliche und in der anderen Hälfte das väterliche X-Chromosom aktiv ist. In einer Frau mit *MECP2*-Mutation auf einem X-Chromosom würden demnach theoretisch 50 % der Zellen das erkrankte *MECP2*-Allel des Vaters exprimieren und 50 % das gesunde *MECP2*-Allel der Mutter. Beim Rett-Syndrom kann es jedoch mitunter zu einem verschobenen Inaktivierungsmuster kommen, bei dem in der Mehrheit der Zellen das mutierte Allel inaktiviert ist. Dies kann so zu einer milderen Ausprägung des Phänotyps des Rett-Syndroms führen und vereinzelt sogar zu asymptomatischen Mutationsträgerinnen, die die Mutation an ihre Nachkommen vererben und in Folge die Erkrankung familiär gehäuft auftritt (Wan et al. 1999; Chahrour und Zoghbi 2007).

Obwohl das Rett-Syndrom fast ausschließlich Mädchen betrifft, wurden auch männliche Patienten identifiziert, die die klinischen Kriterien für das klassische Rett-Syndrom aufweisen

(Christen und Hanefeld 1995; Jan et al. 1999). Tatsächlich sind *MECP2*-Mutationen Ursache für eine ganze Reihe von neurologischen Störungen beim männlichen Geschlecht, von leichter mentaler Retardierung bis hin zu schwerer neonataler Enzephalopathie (Villard 2007). Bei männlichen Patienten mit Klinefelter-Syndrom (47, XXY) oder genetischem Mosaik können *MECP2*-Mutationen auch das Krankheitsbild des klassischen Rett-Syndroms hervorrufen (Chahrour und Zoghbi 2007).

### 1.2.2 Das MeCP2-Protein – Expression und Funktion

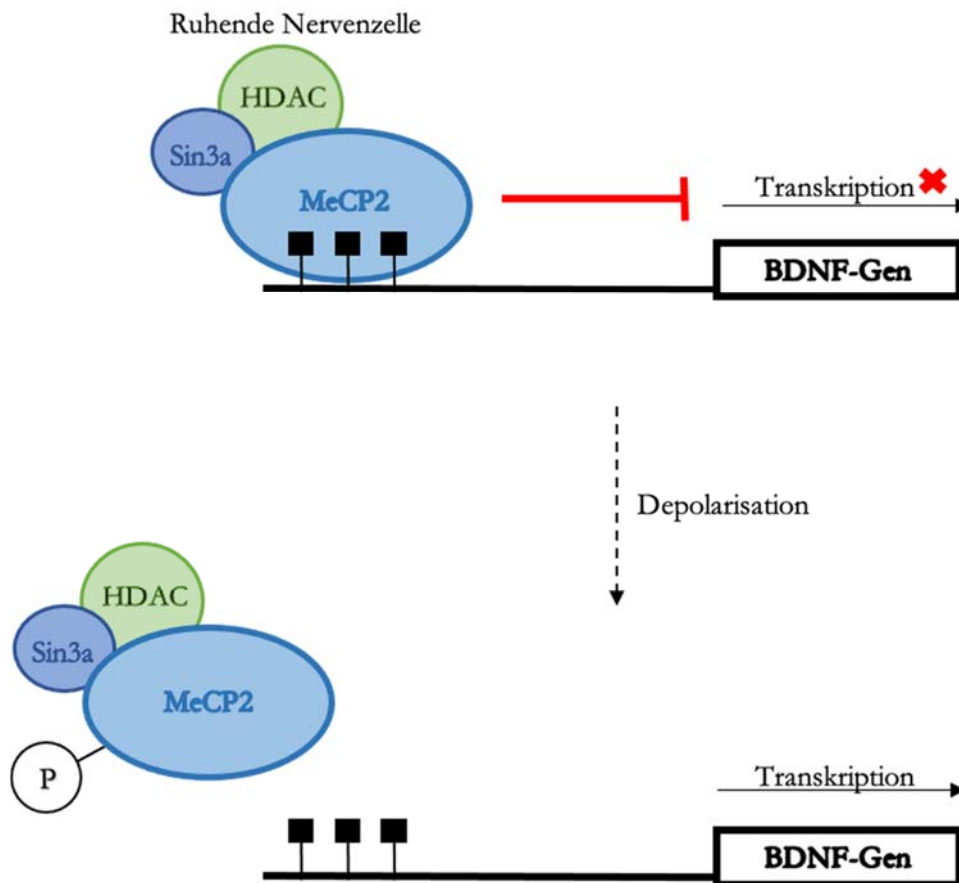
Das *MECP2*-Gen besteht aus vier verschiedenen Exons und codiert für das Protein *methyl-CpG-binding-protein 2* (MeCP2). Dieses Genprodukt wird abhängig von alternativem Splicing in zwei unterschiedlichen Isoformen gebildet, die sich aber nur in ihren N-Termini unterscheiden. MeCP2B ist dabei die im Gehirn dominierende Isoform, wohingegen MeCP2A eher in anderen Zellen wie Fibroblasten oder Lymphoblasten vermehrt zu finden ist (Mnatzakanian et al. 2004). Das MeCP2-Protein wird in vielen verschiedenen Zelltypen exprimiert, doch vor allem im Gehirn in sich entwickelnden postmitotischen Neuronen. Die Protein-Level innerhalb der Zellen steigen dabei mit fortschreitender Entwicklung der Neurone an (Shahbazian et al. 2002).

Als Hauptfunktion des MeCP2-Proteins wird die Regulation der Genexpression angenommen. Dazu bindet das im Zellkern lokalisierte Protein mit seiner methyl-CpG-bindenden Domäne (MBD) an methylierte CpG-Dinucleotide der DNA (Nan et al. 1993) und interagiert noch mit einer Vielzahl anderer Proteine, wie zum Beispiel dem Co-Repressor Sin3A und der Histon-Deacetylase (Jones et al. 1998; Nan et al. 1998). Es wird angenommen, dass das MeCP2-Protein sowohl die Funktion eines Gen-Repressors als auch -Aktivators übernehmen kann (Chahrour et al. 2008). Daneben werden dem Protein noch einige weitere Funktionen zugeschrieben.

Ist die Funktion von MeCP2 durch eine Mutation im *MECP2*-Gen beeinträchtigt, so wie es beim Rett-Syndrom der Fall ist, sind in der Folge eine Vielzahl anderer Gene und deren Genprodukte betroffen, deren Expression physiologisch von MeCP2 reguliert wird. Die Auswirkungen auf zelluläre Funktionen sind dabei abhängig vom Zelltyp und Entwicklungsstatus der Zelle. So tragen viele verschiedene veränderte Signalwege und zelluläre Systeme, die noch lange nicht alle erforscht und verstanden sind, zur Pathogenese des Rett-Syndroms bei (Leonard et al. 2017).

In einer immunochemischen Studie wurde herausgefunden, dass das MeCP2-Protein in Neuronen im Kern aber auch in postsynaptischen Kompartimenten zu finden ist. Deshalb wird vermutet, dass MeCP2 unter anderem Transkriptionsregulation und synaptische Aktivität verbindet (Aber et al. 2003). Ein möglicher Angriffspunkt könnte dabei der BDNF (*brain derived neurotrophic factor*) sein, der wichtig für neuronale Entwicklung und Plastizität ist. Die Transkription von BDNF wird in ruhenden Zellen durch Bindung von MeCP2 an den Promotor des BDNF-Gens, herabgesetzt. Depolarisiert die Membran der Nervenzelle bei

neuronaler Aktivität, strömt Calcium in die Zelle ein und es kommt zur calcium-abhängigen Phosphorylierung und Lösen von MeCP2 vom Promotor des Gens, das nun wieder transkribiert wird (Abbildung 2). Es wird angenommen, dass eine Dysregulation dieses Prozesses zur Pathogenese des Rett-Syndroms beiträgt (Chen et al. 2003; Li und Pozzo-Miller 2014).



**Abbildung 2: Transkriptionsregulation des BDNF-Gens durch MeCP2.** In der ruhenden Nervenzelle wird die Transkription des BDNF-Gens durch Bindung von MeCP2 an den Promotor herabgesetzt. Neuronale Depolarisation führt zur MeCP2-Phosphorylierung und Lösen vom Promotor, wodurch das Gen wieder transkribiert und BDNF exprimiert werden kann. *brain derived neurotrophic factor* (BDNF), *methyl-CpG-binding-protein 2* (MeCP2), *Histon-Deacetylase* (HDAC), *paired amphipathic helix protein Sin3a* (Sin3a) (modifiziert nach Weaving et al. (2005), mit freundlicher Genehmigung des bmj-Verlags).

### 1.3 Neuronale Veränderungen und synaptische Dysfunktion im Rett-Syndrom

Das MeCP2-Protein wird in verschiedensten Geweben des ganzen Körpers exprimiert, doch scheint die Expression im Gehirn besonders wichtig. Tatsächlich führt gezielte Deletion des *Mecp2*-Gens ausschließlich in Neuronen einer Maus zum gleichen voll ausgeprägten neurologischen Phänotyp, wie der globale Verlust des Gens in allen Zellen (Chen et al. 2001; Guy et al. 2001), was zur Vermutung führt, dass das Krankheitsbild des Rett-Syndroms hauptsächlich neuronalen Ursprungs ist.

Bei Patienten mit Rett-Syndrom fällt phänotypisch als erstes Anzeichen einer neurologischen Beteiligung das verlangsamte Kopfwachstum auf (Chahrouh und Zoghbi 2007). Untersuchungen an Hirngewebe von Kindern mit Rett-Syndrom zeigten vereinfachte neuronale Verzweigungsmuster im Frontal- und Temporallappen, Motor-Kortex und Subiculum (Armstrong et al. 1995) sowie Bereiche mit einer reduzierten Dichte und teilweise sogar Verlust von dendritischen Dornfortsätzen (*Spines*) (Belichenko et al. 1994). Bei diesen Dornfortsätzen handelt es sich um neuronale Vorwölbungen, die typischerweise den postsynaptischen Teil exzitatorischer Synapsen bilden. Ihre Anzahl und Form variiert in Abhängigkeit der synaptischen Aktivität und kann Einfluss auf die synaptische Funktion und Plastizität nehmen (Nimchinsky et al. 2002).

Der Begriff synaptische Plastizität beschreibt die aktivitätsabhängige Veränderung der synaptischen Übertragung, wobei sich synaptische Strukturen funktionell und/oder morphologisch verändern. Bei einer Zunahme der Effizienz synaptischer Übertragung spricht man von synaptischer Potenzierung (Zucker 1989). Posttetanische Potenzierung (*post-tetanic potentiation*, PTP) und Langzeitpotenzierung (*long-term potentiation*, LTP) stellen in diesem Zusammenhang essenzielle Formen der synaptischen Plastizität dar.

PTP tritt nach tetanischer Stimulation längerer Dauer oder hoher Frequenz auf. Es handelt sich hierbei um eine Form der präsynaptischen Plastizität und entsteht vermutlich durch einen Anstieg des präsynaptischen Calciums und der calciumabhängigen Transmitterfreisetzung in den synaptischen Spalt. Im Vergleich zu anderen Formen der Kurzzeitplastizität wie der Faszilitierung, bei der die Steigerung der synaptischen Antworten nur für einen Zeitraum von einigen hundert Millisekunden zu beobachten ist, hält sie bei der PTP für mehrere Sekunden bis wenige Minuten nach Tetanus an (Zucker 1989; Zucker und Regehr 2002). Eine Zunahme der Reizantworten über mehrere Stunden wird als LTP bezeichnet. Es wird angenommen, dass dieser Mechanismus einigen Formen von Lernen und Gedächtnis zugrunde liegt. Bei der Induktion von LTP im Hippocampus spielt unter anderem die Aktivierung des NMDA(N-methyl-D-aspartat)-Rezeptors eine entscheidende Rolle, wobei durch Calciumeinstrom in die postsynaptische Zelle verschiedenste prä- und postsynaptische Mechanismen in Gang gesetzt werden, die im Verlauf zur anhaltenden Verstärkung der Synapse führen (Bliss und Collingridge 1993; Lynch 2004).

Veränderungen in synaptischer Plastizität und Stärke synaptischer Übertragung könnten eine mögliche Ursache für die kognitiven und funktionellen Beeinträchtigungen, wie sie beim Rett-Syndrom auftreten, sein und einige elektrophysiologische Studien an Mausmodellen des Rett-Syndroms konnten in diesem Zusammenhang bereits eine Beeinträchtigung der synaptischen Plastizität nachweisen. So konnte an hippocampalen Schnitten von *Mecp2<sup>ly</sup>*-Mäusen eine altersabhängige Verringerung der LTP festgestellt werden (Asaka et al. 2006). Auch Hirnschnitte von *Mecp2<sup>308/Y</sup>*-Mäusen, die ein verkürztes MeCP2-Protein exprimieren, zeigten sowohl im Hippocampus als auch im Cortex eine reduzierte LTP (Moretti et al. 2006). Einige Studien konnten zudem auch eine beeinträchtigte Kurzzeitplastizität im Hippocampus von Mausmodellen des Rett-Syndroms nachweisen (Asaka et al. 2006; Moretti et al. 2006; Fischer et al. 2009; Janc und Müller 2014). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass Dysfunktion des MeCP2-Proteins mit für die veränderte synaptische Plastizität verantwortlich ist, und es wurde auch bereits nachgewiesen, dass MeCP2 von entscheidender Bedeutung für die synaptische Homöostase ist (Blackman et al. 2012).

## 1.4 Gesteigerte ROS-Produktion und Redox-Imbalance im Rett-Syndrom

### 1.4.1 Mitochondriale Dysfunktion

Die in den Mitochondrien ablaufende oxidative Phosphorylierung stellt den überwiegenden Teil des Energieträgers Adenosintriphosphat (ATP) bereit, vor allem durch die Verstoffwechslung von Glukose (Mitchell 1966; Erecinska und Silver 1989). Neurone beziehen ihre Energie fast ausschließlich aus der oxidativen Phosphorylierung und sind so besonders auf die ATP-Bereitstellung durch die Mitochondrien angewiesen. Deshalb reagieren sie auch sehr sensibel auf mitochondriale Dysregulation. Störungen der Mitochondrienfunktion sind daher mit einer ganzen Reihe von neurodegenerativen Erkrankungen assoziiert, unter anderem Formen von Morbus Parkinson, Alzheimer-Krankheit oder Amyotrophe-Lateral-Sklerose (Duchen 2012).

Auch bei Patienten mit Rett-Syndrom konnten morphologische und funktionelle Veränderungen der Mitochondrien festgestellt werden und es wird vermutet, dass diese eine entscheidende Rolle bei der Pathogenese der Erkrankung spielen (Müller und Can 2014; Shulyakova et al. 2017; Can et al. 2019). Elektronenmikroskopische Untersuchungen von Muskel- und Frontallappenbiopsien einiger Patienten konnten eine veränderte mitochondriale Morphologie in Form von geschwollenen Mitochondrien mit unregelmäßigen Christae, Vakuolisierungen und granulären Einschlüssen nachweisen (Eeg-Olofsson et al. 1988; Dotti et al. 1993; Cornford et al. 1994). Einige biochemische Analysen von Muskelbiopsien zeigten zudem eine verminderte Aktivität der NADH-Cytochrom-c-Oxidase, der Succinat-Cytochrom-c-Reduktase und der Cytochrom-c-Oxidase, auch in morphologisch unauffälligen Mitochondrien (Coker und Melnyk 1991; Dotti et al. 1993). Da

Analysen an *Post-mortem*-Material des Frontalkortexes eine nach unten regulierte Untereinheit der Cytochrom-c-Oxidase (CO1) nachwies, ist anzunehmen, dass auch die Mitochondrien des Gehirns von diesen funktionellen Einschränkungen betroffen sind (Gibson et al. 2010).

Verringerte Aktivität der Atmungskettenenzyme konnte auch für Mausmodelle des Rett-Syndroms, sowohl im Skelettmuskel als auch im Gehirn, bestätigt werden (Kriaucionis et al. 2006; Gold et al. 2014; De Filippis et al. 2015; Valenti et al. 2017). Des Weiteren wurde eine bis zu 30 % gesteigerte mitochondriale Atmungsrate nachgewiesen, und als Ursache dafür ein Protonenleck über die innere Mitochondrienmembran vermutet, welches zur kompensatorischen Steigerung der Atmung führt (Kriaucionis et al. 2006). In ergänzenden Untersuchungen der Arbeitsgruppe Müller zeigten hippocampale Mitochondrien männlicher *Mecp2*-knockout Mäuse (*Mecp2<sup>fl/y</sup>*) ein weniger negatives Membranpotential und eine erhöhte FAD/NADH-Rate, was ebenfalls auf eine gesteigerte mitochondriale Atmung und Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) hinweist. Dies wurde auch schon bei sehr jungen Mäusen beobachtet, was zur Vermutung führt, dass sich die mitochondrialen Veränderungen schon in präsymptomatischen Krankheitsstadien manifestieren (Großer et al. 2012; Müller und Can 2014; Can et al. 2019).

#### 1.4.2 Reaktive Sauerstoffspezies und oxidativer Stress

Die in den Mitochondrien ablaufende Zellatmung ist eine Hauptquelle für die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS). Ein kleiner Teil der Elektronen entweicht während ihres Transportes über die Komplexe der Atmungskette und durch ihre direkte Übertragung auf molekularen Sauerstoff werden Superoxide gebildet (Boveris und Chance 1973; Votyakova und Reynolds 2001; Brand 2010). Diese enthalten das Dioxid-Anion ( $O_2^-$ ), sind hoch reaktiv und können so zelluläre Strukturen zum Teil irreversibel schädigen (Halliwell 1992).

Die zelluläre Redox-Balance setzt ein Gleichgewicht verschiedenster zell-endogener Komponenten voraus. An der Aufrechterhaltung dieses Gleichgewichtes sind eine Reihe unterschiedlicher Enzyme beteiligt, wie zum Beispiel die Superoxid-Dismutase (SOD) und die Katalase, welche die reaktiven Superoxide abbauen (May 1901; McCord und Fridovich 1969). Ein weiterer wichtiger Bestandteil des zellulären Redoxsystems ist das Tripeptid Glutathion, welches Superoxide durch Reduktion unschädlich macht. Die Enzyme Glutathion-Peroxidase, -Reduktase und -Transferase sorgen hierbei für stabile Glutathion-Level in der Zelle (Mills 1957). Daneben gibt es noch eine Reihe anderer nicht-enzymatischer Moleküle, die ROS neutralisieren, wie zum Beispiel Vitamin E (Brigelius-Flohé und Traber 1999). Ein stabiles Redox-Gleichgewicht ist wichtig für die Funktion einer Vielzahl von Redox-sensitiven Proteinen, darunter verschiedene Ionenkanäle und Neurotransmitter-Rezeptoren (Paget und Buttner 2003; Weerapana et al. 2010). Als Beispiele hierfür sind unter anderem spannungsabhängige Natrium- und Kaliumkanäle sowie NMDA(N-methyl-D-aspartat)- und  $GABA_A$ ( $\gamma$ -Aminobuttersäure)-Rezeptoren zu nennen. Schon kleine

Verschiebungen der zellulären Redox-Balance können somit zu pathologischen Veränderungen in der Funktion neuronaler Netzwerke führen (Müller und Can 2014).

Bei der Pathogenese des Rett-Syndroms spielen Veränderungen der Redox-Balance und oxidativer Stress vermutlich eine entscheidende Rolle (De Felice et al. 2012; Großer et al. 2012; Müller 2019). Hinweise darauf gaben Blutproben von Patienten mit Rett-Syndrom, die einen gesenkten Vitamin E-Serumspiegel, reduzierte Aktivität der SOD und durch Peroxidation geschädigte Membranlipide in den Erythrozyten zeigten (Formichi et al. 1998; Sierra et al. 2001). Anzeichen für Schädigung von Myelin und Membranen konnten dabei schon in frühen Krankheitsstadien nachgewiesen werden und nehmen mit dem Verlauf der Krankheit immer mehr zu (De Felice et al. 2011). Auch das Gehirn leidet beim Rett-Syndrom unter einer gestörten Redox-Balance. Zeichen für erhöhten oxidativen Stress und dadurch verursachte Gewebsschädigungen, konnten im Gehirn von Mausmodellen des Rett-Syndroms gefunden werden, schon bevor die ersten Symptome auftraten (Großer et al. 2012; De Felice et al. 2014; Bebensee et al. 2017). Bei Reexpression von MeCP2 verbesserten sich sowohl das oxidative Stresslevel als auch der Phänotyp der Mäuse (De Felice et al. 2014).

Die genauen Ursachen für Redox-Ungleichgewicht und oxidativen Stress beim Rett-Syndrom sind noch nicht geklärt, doch stellen vermutlich die bereits beschriebenen mitochondrialen Veränderungen einen entscheidenden Faktor dar. Als Hauptquelle für die Entstehung von ROS konnte in diesem Zusammenhang in isolierten Mitochondrien weiblicher heterozygoter *Mecp2*<sup>308</sup>-Mäuse eine gesteigerte Produktion von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Wasserstoffperoxid) nachgewiesen werden (De Filippis et al. 2015; Valenti et al. 2017). Auch die Arbeitsgruppe Müller konnte bei männlichen *Mecp2*-knockout-Mäusen eine vermehrte Freisetzung von Superoxiden in isolierten hippocampalen Mitochondrien und einen erhöhten mitochondrialen Sauerstoffverbrauch in Hippocampus und Cortex feststellen (Can et al. 2019). Der gesteigerten ROS-Produktion steht eine verminderte Aktivität verschiedener zellulärer Antioxidantien gegenüber, die ROS physiologischer Weise unschädlich machen würden. Untersuchungen an Fibroblasten von Patienten mit Rett-Syndrom zeigten niedrigere Gluthation-Level (Signorini et al. 2014) und verringerte Aktivität der SOD, Gluthation-Reduktase und -Peroxidase sowie der Thioredoxin-Reduktase (Cervellati et al. 2015). Wahrscheinlich verschlechtern auch die sich im Verlauf der Erkrankung manifestierenden Symptome, wie Atmungsunregelmäßigkeiten und Phasen systemischer Hypoxie, die Bedingungen für die bereits geschädigten Mitochondrien und die Redox-Imbalance noch weiter (Müller und Can 2014).

### 1.4.3 Reduktion von oxidativem Stress als therapeutisches Ziel

Wie bereits beschrieben tragen eine gesteigerte ROS-Produktion und ein Ungleichgewicht in der zellulären Redox-Balance zum Krankheitsverlauf im Rett-Syndrom bei und stellen aus diesem Grund potenzielle Angriffspunkte möglicher Therapieansätze dar. Behandlungen mit freien Radikalfängern und/ oder Antioxidantien, um die zelluläre Redox-Balance zu



stabilisieren, erweisen sich hierbei als vielversprechend und wurden schon in einigen Versuchen getestet.

So konnte Fütterung mit dem Antioxidans Curcumin in weiblichen heterozygoten *Mecp2*<sup>+/-</sup>-Mäusen der gesteigerten ROS-Produktion in den Mesenterialgefäßen entgegenwirken und die normale Gefäßfunktion wiederherstellen (Panighini et al. 2013). Auch das bakterielle Protein CNF1 (*cytotoxic necrotizing factor 1*) verhinderte in isolierten Mitochondrien des Gehirns von weiblichen heterozygoten *Mecp2*<sup>308</sup>-Mäusen die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Überproduktion und reaktivierte die normale mitochondriale Atmung (De Filippis et al. 2015). Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass der Radikalfänger Trolox, ein wasserlösliches Vitamin E-Derivat, sowohl *in vitro* als auch *in vivo* die zelluläre Redox-Balance, Lipid-Peroxidation, synaptische Plastizität, Hypoxie-Toleranz, Blutglukose-Spiegel und auch exploratives Verhalten in *Mecp2*<sup>ly</sup>-Mäusen verbessert (Janc und Müller 2014; Janc et al. 2016).

Auch in Studien an Patienten mit Rett-Syndrom zeigte die Behandlung mit Antioxidantien einige positive Wirkungen. Eine Diät reich an mehrfach ungesättigten  $\omega$ -3-Fettsäuren in frühen Krankheitsstadien konnte bei Patienten die Schwere einiger Krankheitssymptome wie Atmungsunregelmäßigkeiten und motorische Dysfunktion abmildern und Level verschiedener oxidativer Stressmarker senken (De Felice et al. 2012). Eine klinische Phase-2-Studie testete daraufhin die Auswirkungen von EPI-743 ( *$\alpha$ -trocotrienol quinone*) auf Mitochondrien und oxidativen Stress beim Rett-Syndrom. Dieses Therapeutikum sorgt für eine gesteigerte Produktion von reduziertem Gluthation und Verbesserung des Redox-Status und wurde bereits für andere durch vermehrten oxidativen Stress gekennzeichnete Erkrankungen getestet. In dieser Studie konnte bei den mit EPI-743 behandelten Patienten mit Rett-Syndrom ein signifikant gesteigertes Kopfwachstum im Vergleich zur Placebo-Gruppe beobachtet werden und bei den Patienten mit dem besten Kopfwachstum auch einer Verbesserung der Oxygenierung, Handfunktion und krankheitsrelevanter Biomarker (Enns und Cohen 2017).

Bis jetzt gibt es noch keine Daten über die Langzeitwirkungen einer auf Antioxidantien basierenden Therapie. Ebenfalls müssen die genauen Details, welche Symptome am meisten davon profitieren und in welchem Ausmaß eventuell der gesamte Krankheitsverlauf und die Lebensqualität der Patienten verbessert werden kann, noch eindeutig erforscht werden (Müller 2019).

## 1.5 Ziel dieser Arbeit

In unserer Arbeitsgruppe wird derzeit die Wirkung einer systemischen Verabreichung von Antioxidantien in Form eines Antioxidantien-Futters auf das Rett-Syndrom getestet. In diesem Zusammenhang war es Ziel dieser Arbeit, den Einfluss des Antioxidantien-Futters besonders auf die synaptische Funktion und Plastizität im Rett-Syndrom zu untersuchen. *Mecp2*-knockout-Mäuse (*Mecp2*<sup>ly</sup>), bei denen das *Mecp2*-Gen weitestgehend fehlt, dienen dabei als Tiermodell für das Rett-Syndrom (Guy et al. 2001). Vier unterschiedliche

Versuchsgruppen wurden getestet: männliche *Mecp2*-knockout-Mäuse (*Mecp2*<sup>-/-</sup>) und Wildtyp-Mäuse (WT) je auf Normalfutter sowie männliche *Mecp2*-knockout-Mäuse und Wildtyp-Mäuse je auf Antioxidantien-Futter. Um das Ausmaß der synaptischen Plastizität zu beurteilen, dienten die PTP (Posttetanische Potenzierung) und die LTP (Langzeitpotenzierung) als essentielle Formen der synaptischen Plastizität. Zwischen den Versuchsgruppen wurde dabei die Fähigkeit zur Ausbildung und Aufrechterhaltung stabiler Plastizitätsmuster verglichen. Vor dem Hintergrund, dass in anderen Studien bereits eine reduzierte LTP an Tiermodellen des Rett-Syndroms gezeigt wurde (Asaka et al. 2006; Moretti et al. 2006; Janc und Müller 2014), sollte untersucht werden, ob sich ein solches Ergebnis für diese Arbeit reproduzieren lässt und welchen Einfluss in diesem Zusammenhang die Behandlung mit Antioxidantien-Futter sowohl auf die PTP/LTP von *Mecp2*-knockout- als auch Wildtyp-Mäusen hat. Das Ausmaß der Plastizität wurde dazu in akuten corticohippocampalen Hirnschnitten mittels extrazellulärer Feldpotential-Ableitungen gemessen. Die Induktion erfolgte mittels hochfrequenter Stimulationsmuster und die modulierten neuronalen Reizantworten wurden für die darauffolgende Stunde elektrophysiologisch aufgezeichnet und eingehend analysiert. Des Weiteren sollte der allgemeine Phänotyp der Tiere anhand von Körpergewicht, Körpergröße und Blutparametern beurteilt und zwischen den Versuchsgruppen verglichen werden.

## 2 Material und Methoden

Alle Versuche wurden vom Tierschutzbüro der Universitätsmedizin Göttingen sowie dem Niedersächsischen Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (LAVES) genehmigt und sind unter den Aktenzeichen G16/2177 und G17/2544 geführt.

Die Präparation und Handhabung der Tiere wurden ausschließlich von entsprechend zertifizierten Mitarbeitern des Labors durchgeführt. Die maximale Nutzbarkeit des Gewebes und damit eine Reduktion der erforderlichen Mäuse konnte durch die Zusammenarbeit mehrerer Doktoranden an verschiedenen Versuchsprojekten mit entsprechender Aufteilung des Hirngewebes gewährleistet werden.

Alle für die Versuche verwendeten Chemikalien wurden von der Firma Sigma Aldrich Chemie GmbH bezogen, soweit nicht anders erwähnt.

### 2.1 Mausmodell des Rett-Syndroms

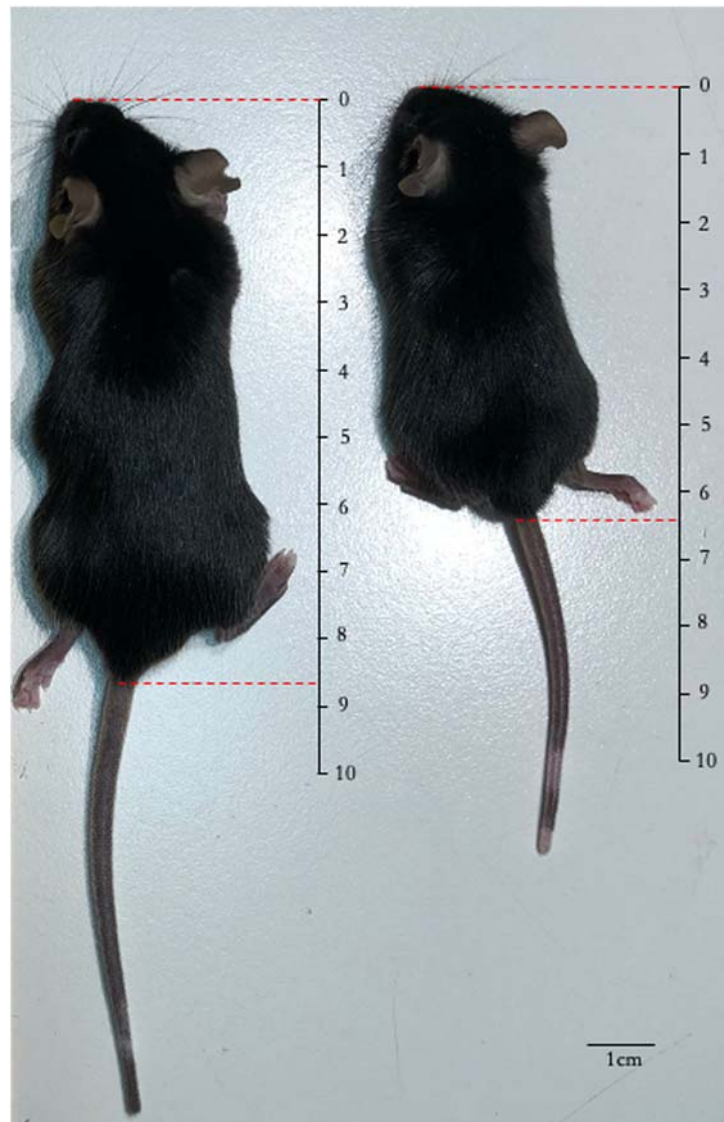
Inzwischen wurden schon einige verschiedene Mausmodelle für das Rett-Syndrom generiert. Der Phänotyp der Tiere prägt sich dabei je nach Mutation und genetischem Hintergrund unterschiedlich stark aus (Chen et al. 2001; Guy et al. 2001; Shahbazian et al. 2002; Calfa et al. 2011; Wegener et al. 2014).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden *Mecp2*-knockout-Mäuse der Zuchtlinie B6.129P2(C)-*Mecp2*<sup>tm1-1<sup>Bird</sup></sup> als Mausmodell für das Rett-Syndrom verwendet. In diesen Mäusen fehlt das *Mecp2*-Gen weitestgehend durch Deletion der Exons drei und vier mittels *Cre-loxP*-Technologie (Guy et al. 2001). Durch Verpaarung von heterozygoten Weibchen, bezogen von Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME, oder selbst nachgezüchtet, mit Wildtyp-Männchen (C57BL/6J) konnten heterozygote Weibchen, hemizygoten Männchen sowie Wildtypen beider Geschlechter generiert werden.

Alle Versuche dieser Arbeit wurden ausschließlich an adulten hemizygoten Männchen (*Mecp2*<sup>0/0</sup>) und den entsprechenden Wildtypen (WT) um den postnatalen Tag 50 ± 8 durchgeführt. Zu diesem Zeitpunkt zeigen die Knockout-Tiere typische Symptome des Rett-Syndroms wie *hindlimb clasp*ing, Atmungsunregelmäßigkeiten, geringeres Körpergewicht, eingeschränkte Mobilität sowie verzögertes Gehirnwachstum und in Hippocampus, Kortex und Kleinhirn eine verringerte neuronale Zellgröße (Abbildung 3) (Chen et al. 2001; Guy et al. 2001). Die Arbeitsgruppe Müller konnte außerdem Veränderungen in den Mitochondrien und der zellulären Redox-Balance nachweisen (Großer et al. 2012; Can et al. 2019). Die erkrankten männlichen Tiere sterben meist verfrüht im Alter von sechs bis zwölf Wochen (Guy et al. 2001). Heterozygote Weibchen (*Mecp2*<sup>+/0</sup>) entwickeln durch die X-Chromosomen-Inaktivierung einen milderen und variableren Phänotyp, der auch erst zu einem späteren Zeitpunkt nach mehreren Monaten zur Ausprägung kommt (Chen et al. 2001; Guy et al. 2001).

Die Tiere wurden im Tierstall der Zentralen Tierexperimentellen Einrichtung (ZTE) der Universitätsmedizin Göttingen in einem zwölfstündigen Tag-Nacht-Rhythmus in einzeln belüfteten Käfigen gehalten mit freiem Zugang zu sowohl Futter als auch Wasser.

Die Genotypisierung der Tiere wurde durch die technische Assistentin der Arbeitsgruppe anhand von Schwanz-Biopsien und Polymerase-Kettenreaktion (PCR) durchgeführt.



**Abbildung 3: Vergleich Körpergröße Wildtyp- und *Mecp2*-knockout-Maus.** Dargestellt ist eine hemizygot, männliche *Mecp2*-knockout-Maus (rechts) um den 50. postnatalen Tag und eine entsprechende männliche Wildtyp-Maus (links). Die *Mecp2*-knockout-Mäuse zeigen in diesem Alter typische Symptome des Rett-Syndroms, wie ein geringeres Körpergewicht und eine reduzierte Körperlänge.

## 2.2 Antioxidantien-Fütterung

Das Antioxidantien-Futter (AO-Futter) dient der systemischen Verabreichung der drei unterschiedlichen Antioxidantien Vitamin E, N-Acetylcystein und  $\alpha$ -Liponsäure. Diese wirken synergistisch und sollen sich, da sie zusammen und nicht als Einzelsubstanz verabreicht werden, gegenseitig in ihrer Wirksamkeit verstärken.

Vitamin E ist ein fettlösliches Antioxidans, welches Hydroperoxyl-Radikale abfängt und die Kettenreaktion der Lipid-Peroxidation unterbricht (Brigelius-Flohé und Traber 1999; Traber und Stevens 2011). N-Acetylcystein, eine Vorstufe von Gluthation, unterstützt die endogene Gluthation-Synthese und wirkt ebenfalls effektiv als freier Radikalfänger (Wang et al. 2006). Auch  $\alpha$ -Liponsäure fängt ROS sowie RNS (reaktive Nitrogenspezies) ab und stimuliert die endogene Synthese von Gluthation (Petersen Shay et al. 2008). Des Weiteren unterstützt sie die Regeneration von Vitamin C und E (Arivazhagan und Panneerselvam 2000).

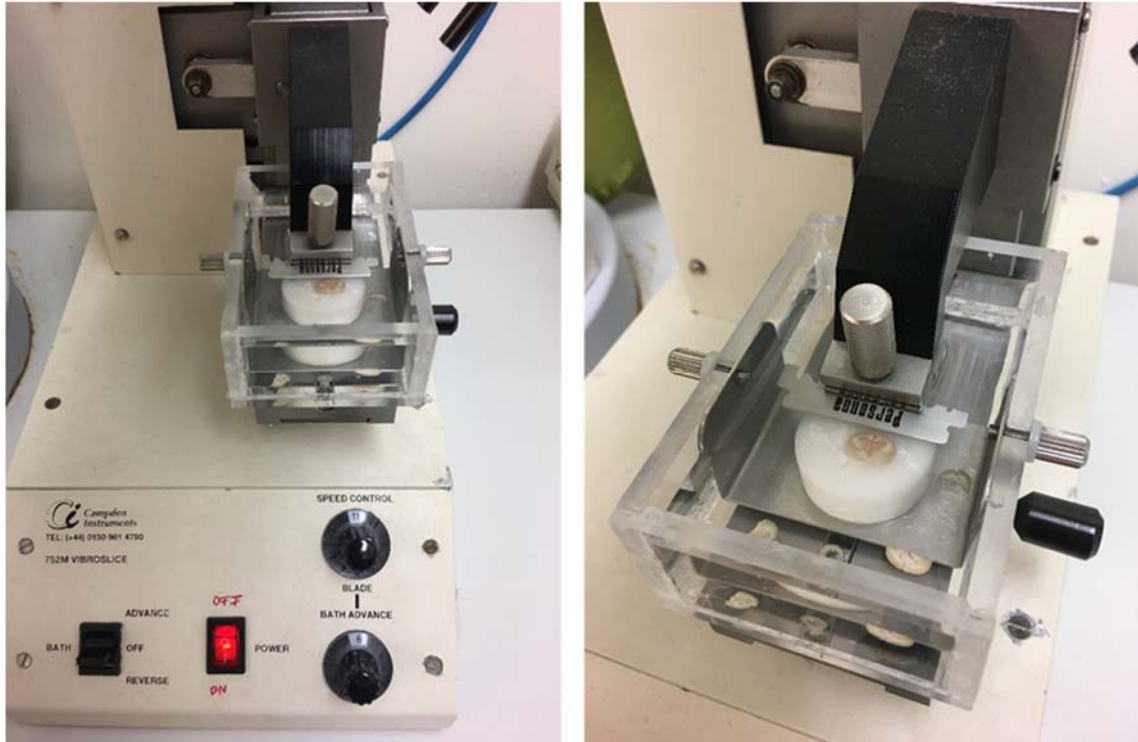
Das AO-Futter ist so zusammengesetzt, dass die angestrebte Menge, die eine Maus pro Kilogramm Körpergewicht pro Tag (mg/kg/d) mit dem Futter zu sich nimmt, für Vitamin E und N-Acetylcystein 40 mg/kg/d sowie für  $\alpha$ -Liponsäure 400 mg/kg/d beträgt. Die Wirksamkeit einer ähnlichen Kombination dieser drei Antioxidantien wurde bereits an einem Mausmodell der X-Adrenoleukodystrophie getestet und dabei eine Reduktion von oxidativem Stress und Proteinschädigung sowie axonaler Degeneration und Bewegungsstörungen beobachtet (López-Erauskin et al. 2011).

Verfügbare Würfe wurden alternierend nach Absetzen vom Muttertier (ungefähr 20 Tage nach der Geburt) ausschließlich entweder mit Normalfutter oder AO-Futter ernährt. Sowohl das AO-Futter als auch das Normalfutter wurden von der ssniff-Spezialdiäten GmbH, Soest, bezogen. Zur besseren Unterscheidung für Tierpfleger und Laborpersonal ist das AO-Futter im Vergleich zum Normalfutter rot eingefärbt, was sich allerdings laut Herstellerangaben nicht auf das Fressverhalten der Tiere auswirkt.

## 2.3 Präparation von akuten Hirschnitten

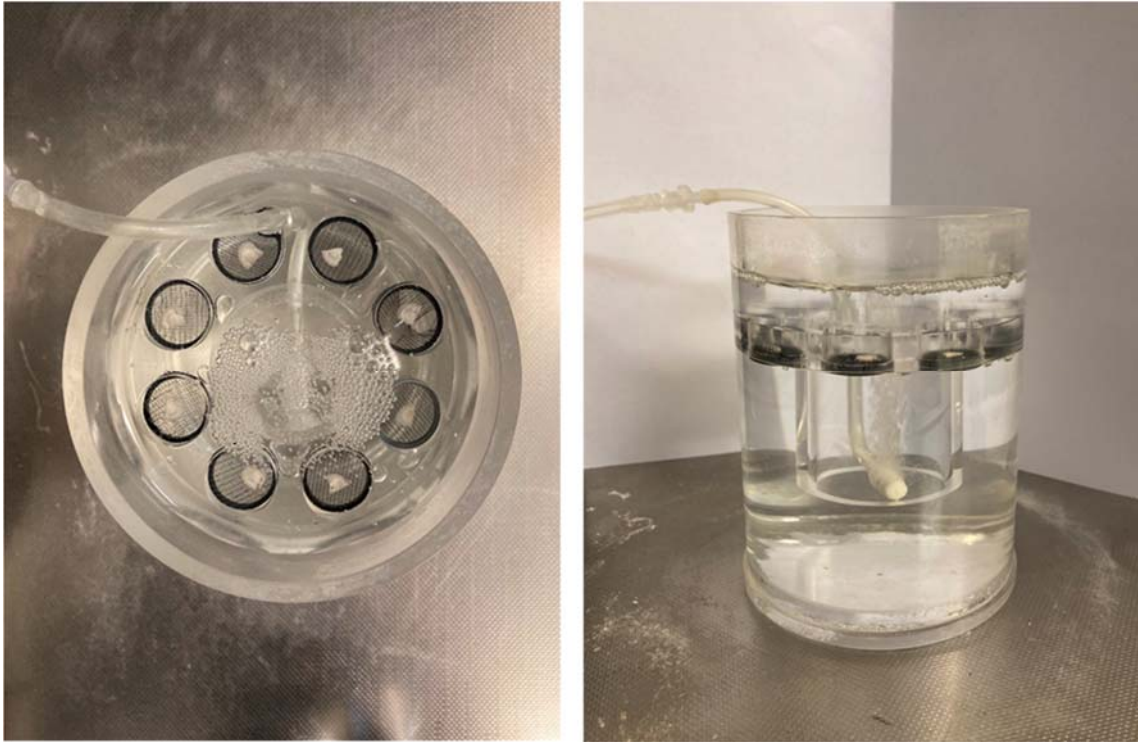
Vor der Präparation wurde die für den Versuch ausgewählte Maus gewogen und ihre Körperlänge von Nasenspitze bis Schwanzansatz bestimmt. Nach der Betäubung mit Diethylether wurde das Tier mit einer chirurgischen Schere dekapitiert. Anschließend wurde das Gehirn schnell, aber vorsichtig aus dem Schädel präpariert und in eisgekühlter ACSF (*artificial cerebrospinal fluid*) für ein bis zwei Minuten heruntergekühlt. Die Zusammensetzung der ACSF basiert auf der des Liquors und beinhaltet (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 Glukose. Eine konstante Begasung mit Carbogen (95 % O<sub>2</sub> und 5 % CO<sub>2</sub>) sorgte für die Adjustierung des pH-Wertes auf 7,4 und sicherte eine ausreichende Oxygenierung des isolierten Hirngewebes. Mit dem Skalpell wurden Kleinhirn und Hirnstamm sowie Frontalhirn abgetrennt und von anderen Doktoranden für weitere Versuche genutzt. Aus dem verbliebenen Hirngewebe wurden mit

Hilfe des Vibroslicers (Campden Instruments, 725M Vibroslice) coronale corticohippocampale Hirnschnitte (*Slices*) mit einer Schichtdicke von 400  $\mu\text{m}$  angefertigt (Abbildung 4).



**Abbildung 4: Anfertigung coronaler corticohippocampaler Hirnschnitte.** Nach Präparation des Gehirns wurden mithilfe des Vibroslicers Hirnschnitte mit einer Schichtdicke von je 400  $\mu\text{m}$  angefertigt. Dazu wurde das Gehirn nach dem Abtrennen von Kleinhirn, Hirnstamm und Frontalhirn auf einen Teflonblock geklebt und in eine Wanne mit gekühltem ACSF gesetzt.

Die Hemisphären der akuten Hirnschnitte wurden anschließend mit dem Skalpell voneinander getrennt und die *Hemislices* zügig in eine mit ACSF gefüllte und permanent mit Carbogen begaste Aufbewahrungskammer (Submersionskammer) übertragen (Abbildung 5). Dort ruhten die Schnitte für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur, um sich von der Präparation zu erholen, bevor mit den Experimenten begonnen wurde.



**Abbildung 5: *Hemislices* in der Aufbewahrungskammer.** Die Aufbewahrungskammer wurde mit ACSF gefüllt und permanent mit Carbogen begast, um die optimale Versorgung des Hirngewebes zu gewährleisten. Hier ruhten die Hirnschnitte für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur, um sich nach der Präparation zu regenerieren. Diese Vorgehensweise war essentiell, um später im Versuch stabile LTP generieren zu können.

## 2.4 Blutparameter: Hämatokrit und Blutglukosespiegel

Die Bestimmung der Blutparameter Hämatokrit und Blutglukosespiegel erfolgte anhand von Blutproben, die direkt nach der Dekapitation aus dem Nacken der betreffenden Maus gewonnen wurden. Der Hämatokrit beschreibt den Anteil zellulärer Bestandteile am Gesamtvolumen des Blutes. Nach fünfminütiger Zentrifugation der Blutproben in standardisierten Mikro-Hämatokrit-Kapillaren (BRAND GmbH + Co. KG) bei 12 000 Umdrehungen pro Minute (MIKRO220, Hettich Zentrifugen) konnte der Anteil des Zellvolumens abgelesen werden. Der Blutglukosespiegel jeder Maus wurde mithilfe eines Blutglukosemessgerätes (Contour<sup>®</sup>XT, Bayer) bestimmt.

## 2.5 Elektrophysiologische Messungen

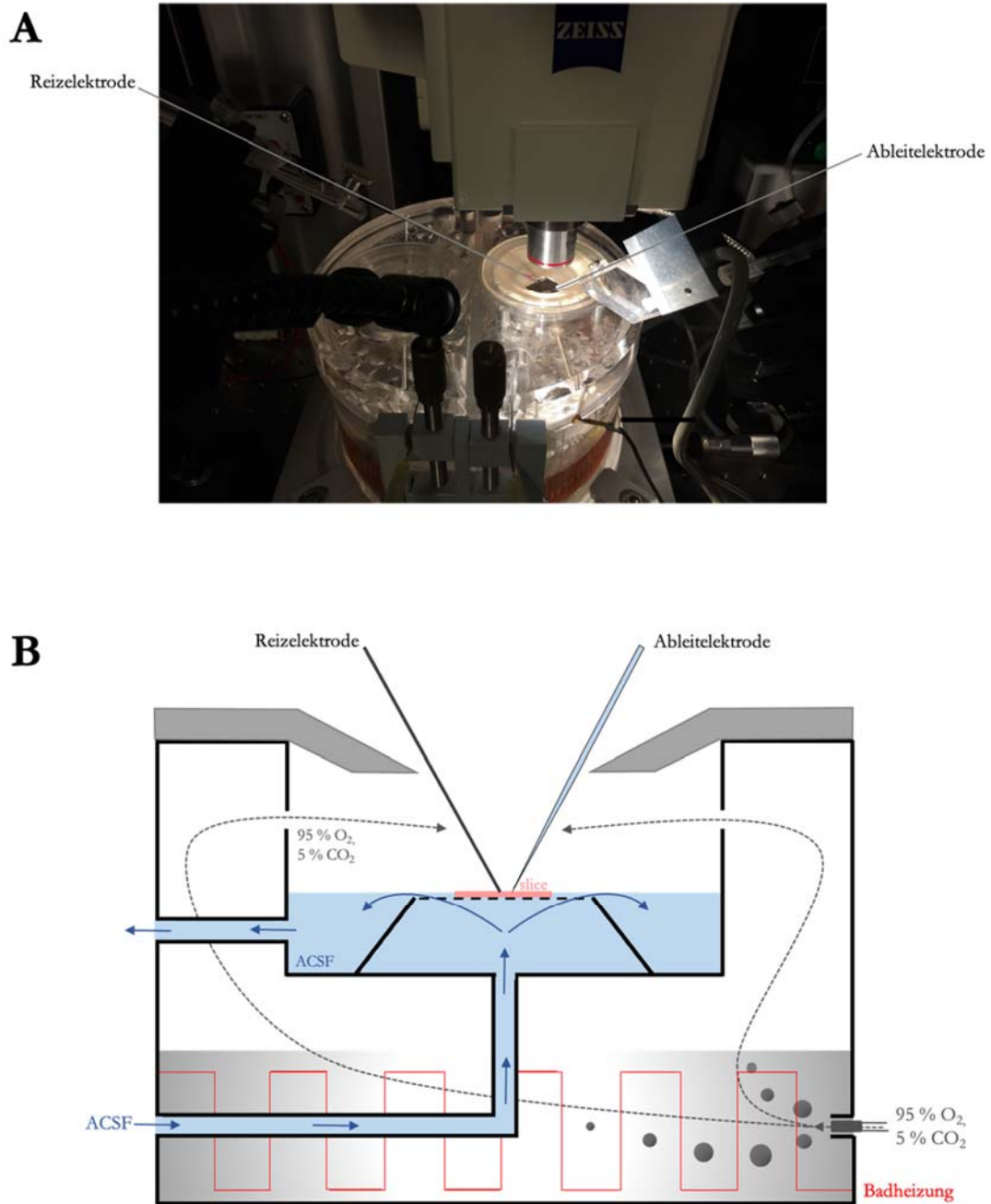
Die elektrophysiologischen Messungen wurden in einer Oslo-Style Interfacekammer durchgeführt (Abbildung 6). Dabei wurden die Hirnschnitte permanent mit oxygeniertem und vorgewärmten ACSF mit einer Flussrate von 4 ml/min umspült und mit Carbogen mit einer Flussrate von 400 ml/min begast, um ihre Vitalität zu erhalten und stabile Reizantworten über den gesamten Messzeitraum zu erhalten. Die Höhe des Flüssigkeitsspiegels wurde dabei so justiert, dass die Oberfläche des Hirnschnittes genau an der Grenzfläche zwischen wässriger und gasförmiger Phase lag. Um das Entweichen des Carbogens sowie das Austrocknen des Hirnschnittes zu verhindern, wurde die Kammer bis auf eine kleine Öffnung (ca. 2 cm<sup>2</sup>) zum Positionieren der Elektroden abgedeckt.

Zur extrazellulären Ableitung der evozierten Potentiale wurden die Schaffer-Kollateralen mit einer Reizelektrode aus rostfreiem Stahl (Mikrodraht, 50 µm Durchmesser, A-M Systems) orthodrom stimuliert und die unipolaren Reize dabei mit einer Reizdauer von 0,1 ms gesetzt (S88 Stimulator mit PSIU6 Reiz-Isolationseinheiten, Grass Instruments). Durchgeführt wurde eine Stromreizung mit Intensitäten von 10-150 µA. Für die Plastizitätsexperimente wurde die Reizintensität so gewählt, dass halb-maximale postsynaptische Reizantworten zu erhalten waren. Die exzitatorischen postsynaptischen Feldpotentiale (*field excitatory postsynaptic potentials*, fEPSPs) wurden extrazellulär im *stratum radiatum* der *Cornu ammonis(CA)1*-Region unter Verwendung eines lokal konstruierten Verstärkers als DC-Potentiale (Hepp et al. 2005) aufgezeichnet. Die Ableitelektroden wurden mithilfe eines horizontalen Elektrodenziehgerätes (Model P-97, Sutter Instruments) aus dünnwandigem Borosilikatglas (GC150TF-10, Harvard Apparatus) gezogen und durch Zurückbrechen der Elektrodenspitze auf einen Widerstand von ca. 5 MΩ getrimmt. Nach der Befüllung der Elektrode mit ACSF wurde ein chlorierter Silberdraht eingeführt. Die Daten wurden mit Axon Instruments Digitizer 1322A und PClamp 9.2 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) mit einer Abtastrate von 20 kHz digitalisiert und mit der Software Clampfit 9.2 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) analysiert.

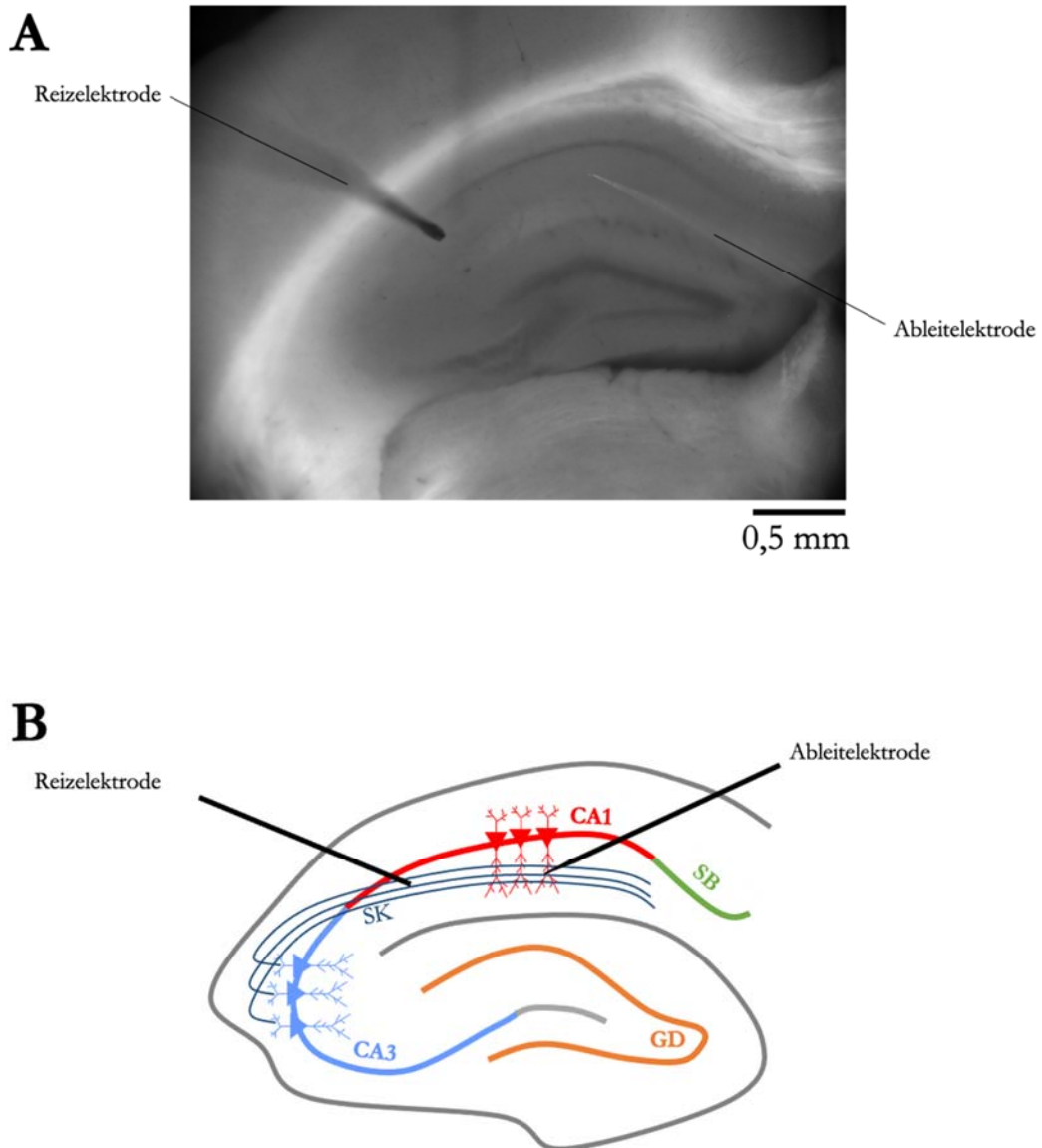
Die Induktion stabiler LTP erfolgte mittels Hochfrequenzstimulation in Form von drei Pulssalven (Tetanus, je 100 Hz für eine Sekunde). Der Abstand zwischen den Tetani betrug dabei je fünf Minuten. Die evozierten Feldpotentiale wurden jeweils 10 Minuten vor (*Baseline*) und 50 Minuten nach LTP-Induktion sowie zwischen den drei Tetani beobachtet. Dafür wurde alle 15 Sekunden gereizt und das entsprechende fEPSP aufgezeichnet. Jeweils vier aufeinanderfolgende fEPSPs wurden gemittelt, sodass pro Minute eine Messspur ausgewertet wurde. Diese Reizprotokolle wurden bereits in früheren Arbeiten der Arbeitsgruppe etabliert (Janc und Müller 2014; Janc et al. 2016).

Die Temperatur in der Interfacekammer wurde während der gesamten Messung konstant auf 31-32 °C gesetzt, um die Auslösung einer hypoxischen *Spreading Depression* während der Hochfrequenzstimulation zu vermeiden.





**Abbildung 6: Interfacekammer.** **A** Fotografische Abbildung der Interfacekammer, in der die elektrophysiologischen Messungen durchgeführt wurden. **B** Schemazeichnung der Oslo-Style Interfacekammer. Der Hirnschnitt wurde permanent mit Carbogen (400 ml/min, 95 % O<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub>) begast und mit ACSF (4 ml/min) umspült und lag dabei auf einem Netz an der Grenzfläche zwischen wässriger und gasförmiger Phase. Das Entweichen des Carbogens sowie das Austrocknen des akuten Hirnschnittes wurden durch einen Deckel auf der Kammer verhindert, der jedoch eine kleine Öffnung (ca. 2 cm<sup>2</sup>) zum Positionieren der Elektroden aufwies. Während des Versuchs wurde die Temperatur mithilfe der Badheizung konstant auf 31-32 °C gehalten.



**Abbildung 7: Hippocampus mit Elektroden.** **A** Fotografische Abbildung des Hippocampus mit gesetzter Reiz- und Ableitelektrode bei Blick durch das Mikroskop auf einen akuten Hirnschnitt. **B** Schemazeichnung des Hippocampus mit Reiz- und Ableitelektrode. Elektrisch gereizt wurden die Schaffer-Kollaterale, die von der CA3- in die CA1-Region projizieren. Die Ableitung exzitatorischer postsynaptischer Feldpotentiale (fEPSPs) erfolgte extrazellulär an den Dendriten der Pyramidenneurone im *stratum radiatum* der CA1-Region. *Cornu ammonis* (CA), *Gyrus dentatus* (GD), *Subiculum* (SB), Schaffer-Kollaterale (SK).

## 2.6 Statistik

Die elektrophysiologischen Messungen wurden jeweils an mehreren Hirnschnitten pro Gehirn durchgeführt. Um die Unabhängigkeit der Beobachtungen zu gewährleisten, wurden jedoch mindestens 12 Mäuse pro Versuchsgruppe getestet. Alle Zahlenwerte sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben. Die Anzahl der Experimente (n) bezieht sich bei den Parametern zur Beurteilung des Phänotyps jeweils auf die Anzahl der getesteten Mäuse bzw. bei den elektrophysiologischen Experimenten auf die Anzahl der gemessenen Hirnschnitte. Die beobachteten Unterschiede wurden mithilfe eines *One-way*-ANOVAs auf ihre Signifikanz mit einem Signifikanzlevel von  $p = 0,05$  getestet. Je nach Vorliegen von Normalverteilung kamen der Dunn's-Test oder der Holm-Sidak-Test als *Post-hoc*-Test zur Anwendung. Signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen mit dem gleichen Genotyp sind in den Diagrammen mit Sternchen (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ) und zwischen WT- und *Mecp2<sup>fl/y</sup>*-Mäusen mit Rautenzeichen (#  $p < 0,05$ ; ##  $p < 0,01$ ; ###  $p < 0,001$ ; ####  $p < 0,0001$ ) gekennzeichnet, die entsprechenden p-Werte sind im Text vermerkt.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Allgemeiner Phänotyp

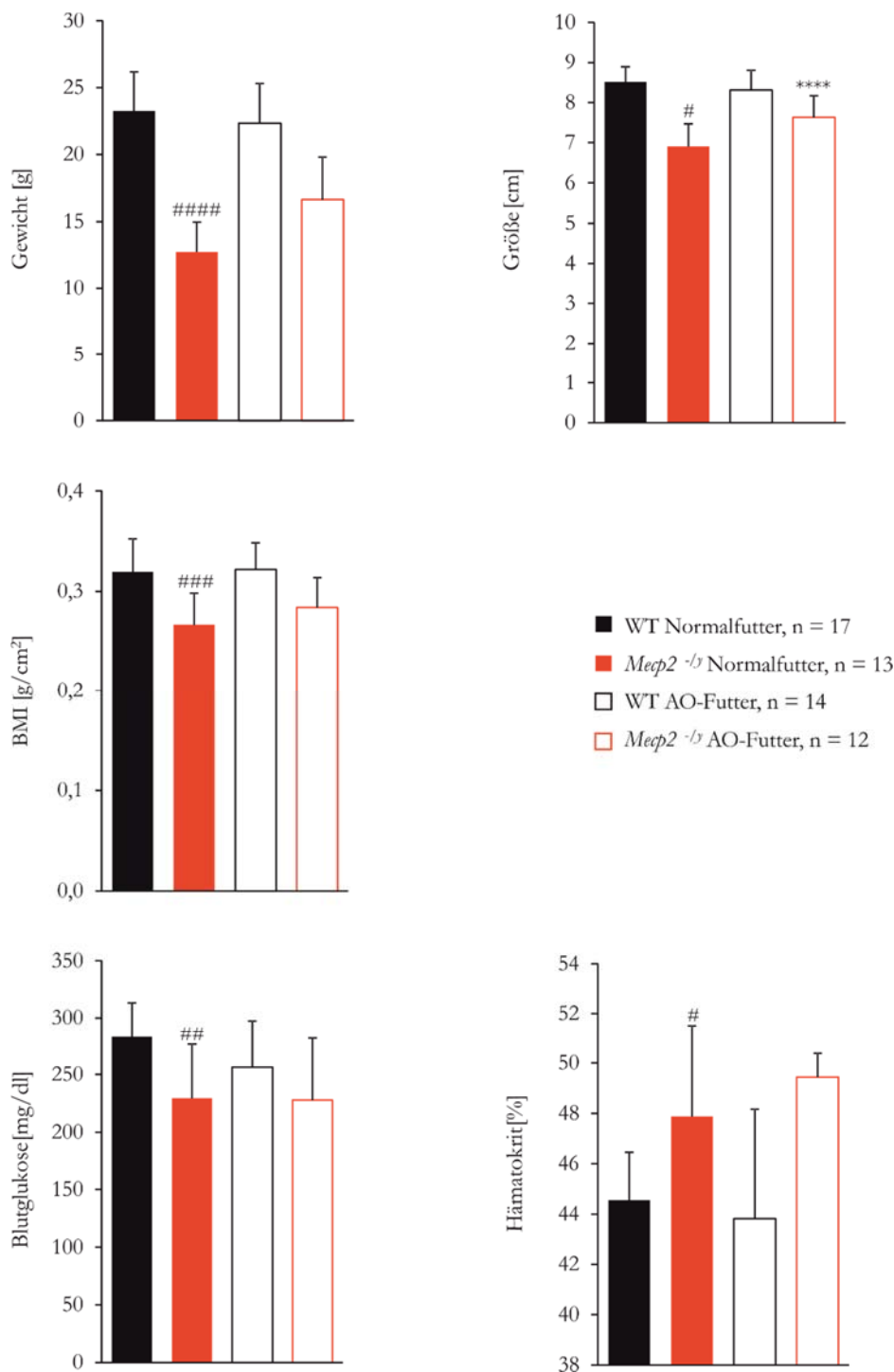
Der allgemeine Phänotyp der Versuchstiere wurde in dieser Arbeit anhand von Körpergewicht, Körpergröße und Blutparametern beurteilt und zwischen den Versuchsgruppen verglichen (Abbildung 8, Tabelle 1). Dafür wurde die für den Versuch ausgewählte Maus vor der Präparation gewogen und ihre Körperlänge von Nasenspitze bis Schwanzansatz bestimmt. Aus diesen Daten wurde zusätzlich der *body mass index* (BMI) des Tieres berechnet. Die Bestimmung der Blutparameter Hämatokrit und Blutglukosespiegel erfolgte anhand von Blutproben, die direkt nach der Dekapitation aus dem Nacken der betreffenden Maus gewonnen wurden.

Alle untersuchten phänotypischen Parameter wiesen signifikante Unterschiede zwischen WT- und *Mecp2<sup>ly</sup>*-Mäusen auf. Sowohl die Körpergröße ( $p < 0,05$ ) als auch das Körpergewicht ( $p < 0,0001$ ) waren bei den *Mecp2<sup>ly</sup>*-Mäusen im Vergleich zu den WT-Mäusen signifikant verringert. Auch der aus diesen Parametern berechnete BMI war bei den *Mecp2<sup>ly</sup>*-Mäusen ( $0,27 \pm 0,03 \text{ g/cm}^2$ ) verglichen mit den WT-Mäusen ( $0,32 \pm 0,03 \text{ g/cm}^2$ ) signifikant reduziert ( $p < 0,001$ ). Ebenso wurden signifikant verringerte Blutglukosespiegel bei *Mecp2<sup>ly</sup>*-Mäusen ( $229,9 \pm 46,6 \text{ mg/dl}$ ) im Vergleich zum entsprechenden WT ( $283,2 \pm 29,9 \text{ g/dl}$ ) gemessen ( $p < 0,01$ ). Im Gegensatz dazu wies der Hämatokrit eine signifikante Erhöhung bei den *Mecp2<sup>ly</sup>*-Mäusen ( $47,9 \pm 3,6 \%$ ) im Vergleich zu den WT-Mäusen ( $44,5 \pm 1,9 \%$ ) auf ( $p < 0,05$ ).

Die mit Antioxidantien gefütterten *Mecp2<sup>ly</sup>*-Mäuse zeigten im Vergleich zum WT zwar immer noch veränderte phänotypische Parameter, dennoch konnte bei einigen Parametern im Vergleich zu normal gefütterten *Mecp2<sup>ly</sup>*-Mäusen eine Verbesserung erzielt werden. So konnte durch die Antioxidantien-Fütterung der *Mecp2<sup>ly</sup>*-Mäuse eine signifikante Erhöhung der Körpergröße (AO-Futter  $7,6 \pm 0,5 \text{ cm}$ ; Normalfutter  $6,9 \pm 0,6 \text{ cm}$ ;  $p < 0,0001$ ) erreicht werden, ebenso wie ein erhöhtes Körpergewicht (AO-Futter  $16,7 \pm 3,1 \text{ g}$ ; Normalfutter  $12,7 \pm 2,2 \text{ g}$ ) und ein tendenziell verbesserter BMI. In Bezug auf die gemessenen Blutglukosespiegel konnte kein Effekt der Antioxidantien beobachtet werden und widererwartend wiesen die mit Antioxidantien gefütterten *Mecp2<sup>ly</sup>*-Mäuse den höchsten Hämatokriten unter allen Versuchsgruppen auf. In WT-Mäusen erzielte die Antioxidantien-Fütterung keinen deutlichen Effekt auf die Körperparameter.

Tabelle 1: Vergleich der phänotypischen Parameter

	<b>WT Normalfutter (n = 17)</b>	<b><i>Mecp2</i><sup>-/-y</sup> Normalfutter (n = 13)</b>	<b>WT AO-Futter (n = 14)</b>	<b><i>Mecp2</i><sup>-/-y</sup> AO-Futter (n = 12)</b>
<b>Gewicht [g]</b>	23,2 ± 2,9	12,7 ± 2,2	22,3 ± 3,0	16,7 ± 3,1
<b>Größe [cm]</b>	8,5 ± 0,4	6,9 ± 0,6	8,3 ± 0,5	7,6 ± 0,5
<b>BMI [g/cm<sup>2</sup>]</b>	0,32 ± 0,03	0,27 ± 0,03	0,32 ± 0,03	0,28 ± 0,03
<b>Blutglukose [mg/dl]</b>	283,2 ± 29,9	229,9 ± 46,6	256,6 ± 40,8	228,1 ± 54,0
<b>Hämatokrit [%]</b>	44,5 ± 1,9	47,9 ± 3,6	43,8 ± 4,3	49,4 ± 1,0



**Abbildung 8: Vergleich von Gewicht, Größe, BMI und Blutparametern.** Alle untersuchten phänotypischen Parameter wiesen signifikante Unterschiede zwischen WT- und *Mecp2*<sup>-/-</sup>-Mäusen auf. Dargestellt sind jeweils Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung. Durch die Antioxidantien-Fütterung der *Mecp2*<sup>-/-</sup>-Mäuse konnte eine signifikante Erhöhung der Körpergröße erreicht werden, ebenso wie ein erhöhtes Körpergewicht und ein tendenziell verbesserter BMI. In Bezug auf die gemessenen Blutglukosespiegel konnte jedoch kein Effekt der Antioxidantien beobachtet werden. Die mit Antioxidantien gefütterten *Mecp2*<sup>-/-</sup>-Mäuse wiesen den höchsten Hämatokriten unter allen Versuchsgruppen auf. Auf die Körperparameter der WT-Mäuse zeigte die Antioxidantien-Fütterung keinen signifikanten Effekt. Signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen mit dem gleichen Genotyp sind mit Sternchen (\*\*\*\*  $p < 0,0001$ ) und zwischen WT- und *Mecp2*<sup>-/-</sup>-Mäusen mit Rautenzeichen (#  $p < 0,05$ ; ##  $p < 0,01$ ; ###  $p < 0,001$ ; #####  $p < 0,0001$ ) gekennzeichnet.

## 3.2 Synaptische Funktion und Plastizität

Vor dem Hintergrund, dass vorrangig elektrophysiologische Studien an Mausmodellen des Rett-Syndroms bereits Veränderungen in synaptischer Plastizität und Stärke synaptischer Übertragung nachwies (Asaka et al. 2006, Moretti et al. 2006, Fischer et al. 2009, Janc und Müller 2014), wurde in dieser Arbeit der Einfluss der Antioxidantien-Fütterung auf die synaptische Funktion und Plastizität beim Rett-Syndrom untersucht. In diesem Rahmen wurde die Fähigkeit zur Ausbildung und Aufrechterhaltung stabiler Plastizitätsmuster zwischen den Versuchsgruppen verglichen. Um das Ausmaß der synaptischen Plastizität zu beurteilen, dienten die PTP (Posttetanische Potenzierung) und die LTP (Langzeitpotenzierung) als essenzielle Formen der synaptischen Plastizität, die an akuten corticohippocampalen Hirnschnitten in einer Oslo-Style Interfacekammer mittels extrazellulärer Feldpotential-Ableitungen gemessen wurden. Die Induktion von PTP und LTP erfolgte mittels hochfrequenter Stimulationsmuster (drei Pulssalven, je 100 Hz für eine Sekunde). Die modulierten neuronalen Reizantworten wurden für die darauffolgende Stunde elektrophysiologisch aufgezeichnet und eingehend analysiert.

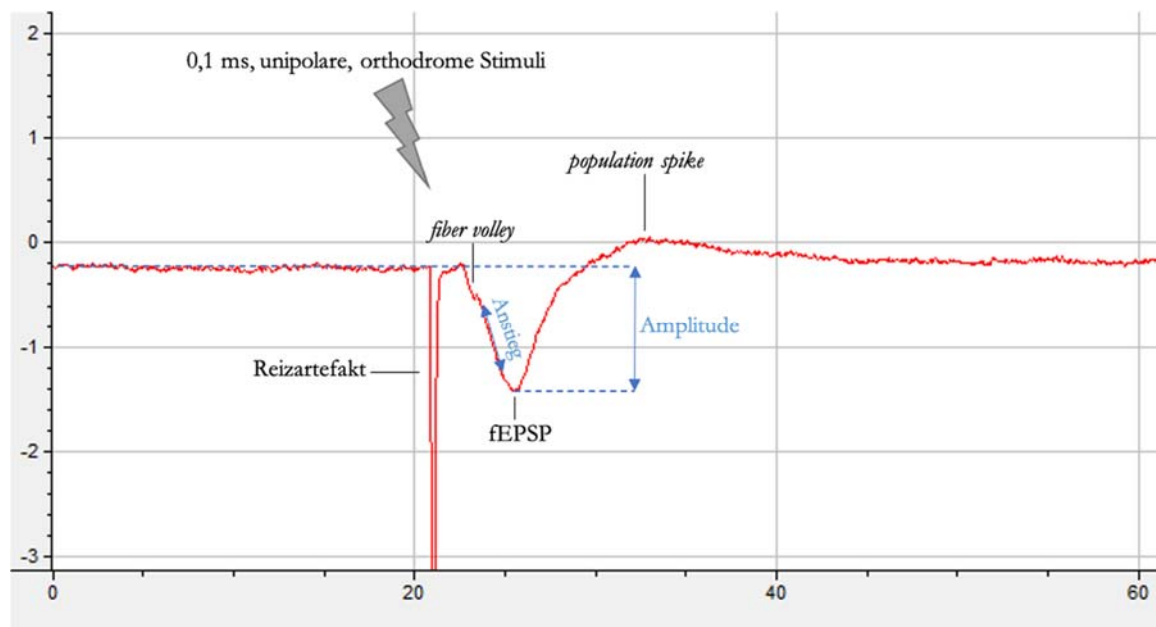
Die Dauer der elektrophysiologischen Messungen umfasste pro Hirnschnitt 70 Minuten sowie zusätzlich jeweils die Vorbereitungszeit für das Aufwärmen des Hirnschnittes in der Interfacekammer und das korrekte Positionieren der Elektroden. Um das Gewebe maximal zu nutzen, wurden an einem Versuchstag bis zu drei Hirnschnitte von derselben Maus hintereinander gemessen, sodass der letzte Hirnschnitt bereits mindestens fünf Stunden nach Präparation aufbewahrt wurde. Während dieser Zeit konnte gegebenenfalls eine Abnahme der Vitalität der einzelnen Hirnschnitte nicht komplett ausgeschlossen werden. Bei einigen Experimenten wurden so zum Teil ausgeprägte Hypererregbarkeiten beobachtet, die auf eine abnehmende Vitalität der Hirnschnitte hindeuten. Alle Hirnschnitte, die eine solche ausgeprägte Hypererregbarkeit mit Potenzierung von mehr als zwei Standardabweichungen über dem Mittelwert zeigten, wurden aus diesem Grund nicht in die Auswertung einbezogen.

### 3.2.1 Relevante Messparameter der fEPSPs

Die Analyse der Daten erfolgte mit der Software Clampfit 9.2 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Das extrazellulär abgeleitete exzitatorische postsynaptische Feldpotential (*field excitatory postsynaptic potential*, fEPSP) stellt die Depolarisation in den Dendriten der CA1-Pyramidenneurone als Maß für deren synaptische Aktivierung dar. Um das Ausmaß der synaptischen Plastizität zu beurteilen, wurden jeweils die maximale Amplitude und der initiale Anstieg der aufgezeichneten fEPSPs über den gesamten Verlauf der Messung ausgewertet (Abbildung 9). Durch Normierung der Messwerte auf die *Baseline* (vor LTP-Induktion) wurden Hirnschnitt-spezifische Unterschiede in zum Beispiel Elektrodenposition und Vitalität herausgemittelt, die jeweils die absolute Größe der synaptischen Antwort beeinflussen.

Neben dem eigentlichen fEPSP kann zusätzlich noch der *fiber volley* betrachtet werden, der das präsynaptische Aktionspotential repräsentiert. Das Ausmaß des *fiber volleys* korreliert dabei mit der Anzahl der durch die gewählte Reizintensität angesprochenen Axone, die Aktionspotentiale feuern. Diese Größe ist somit für jeden Hirnschnitt spezifisch, über den gesamten Messzeitraum konstant und kann somit auch zur Normierung der gemessenen fEPSPs dienen.

Der *population spike* ist Manifestation des Aktionspotentials in den Somata der CA1-Pyramidenneuronen. Er ist nicht in allen Messungen sichtbar, kann aber bei Auftreten in einzelnen Fällen die Amplitude des fEPSPs begrenzen. Aus diesem Grund und wegen der geringeren Anfälligkeit für Kontamination durch zum Beispiel Inhibition durch GABAerge Neurone, wird neben der Amplitude auch der initiale Anstieg des fEPSPs als weiterer Messparameter herangezogen.



**Abbildung 9: Relevante Messparameter der fEPSPs.** Auf der x-Achse des Diagrammes ist die Zeit in Millisekunden und auf der y-Achse die Potentialänderung in Millivolt aufgetragen. Abgebildet ist ein aufgezeichnetes fEPSP, welches die Depolarisation in den Dendriten der CA1-Pyramidenneurone darstellt. Ausgewertet wurden jeweils die maximale Amplitude und der initiale Anstieg. Neben dem eigentlichen fEPSP sind das Reizartefakt, der *fiber volley* (präsynaptisches Aktionspotential) und der *population spike* (Aktionspotential in den Somata der CA1-Pyramidenneurone) zu sehen.



### 3.2.2 Modulation der Posttetanischen Potenzierung und der Langzeitpotenzierung

Die Posttetanische Potenzierung (PTP) ist eine Form der präsynaptischen Plastizität. Sie tritt nach tetanischer Stimulation längerer Dauer oder hoher Frequenz auf und hält für mehrere Sekunden bis wenige Minuten nach Tetanus an (Zucker 1989; Zucker und Regehr 2002). In dieser Arbeit wurden für die Beurteilung der PTP die normierten Messwerte nach dem dritten Tetanus (100 Hz für eine Sekunde) betrachtet. Bei WT-Mäusen war eine Steigerung der PTP-Amplitude auf  $170,3 \pm 46,8$  % zu beobachten (Abbildung 11, Tabelle 2). Im Vergleich dazu war das Ausmaß der PTP in den *Mecp2<sup>-/-</sup>*-Mäusen signifikant reduziert ( $p < 0,05$ ). Die Fütterung der *Mecp2<sup>-/-</sup>*-Mäuse mit Antioxidantien konnte eine eindeutige Verbesserung der PTP erzielen (Normalfutter  $139,7 \pm 37,1$  %; AO-Futter  $183,7 \pm 74,2$  %;  $p < 0,05$ ). Die Antioxidantien konnten so die verminderte PTP in den *Mecp2<sup>-/-</sup>*-Mäusen wiederherstellen und auf Werte sogar über das Niveau der WT-Mäuse hinaus verbessern.

Eine Zunahme der Reizantworten über mehrere Stunden, der verschiedenste prä- und postsynaptische Mechanismen zugrunde liegen und die im Verlauf zur anhaltenden Verstärkung der Synapse führt, wird als Langzeitpotenzierung (LTP) bezeichnet (Bliss und Collingridge 1993; Lynch 2004). Zur Beurteilung der LTP wurde in dieser Arbeit jeweils der Mittelwert der normierten Messwerte zwischen der 50. bis 60. Minute nach LTP-Induktion betrachtet. Im Vergleich der Versuchsgruppen zeigten sich die Veränderungen der LTP entsprechend der PTP (Abbildung 11, Tabelle 2). Bei WT-Mäusen war weiterhin eine anhaltende Steigerung der LTP-Amplitude auf  $166,2 \pm 32,3$  % zu beobachten. Im Vergleich dazu war das Ausmaß der LTP in den *Mecp2<sup>-/-</sup>*-Mäusen tendenziell reduziert. Die mit Antioxidantien gefütterten *Mecp2<sup>-/-</sup>*-Mäuse zeigten eine tendenziell ausgeprägtere LTP als die mit Normalfutter gefütterten *Mecp2<sup>-/-</sup>*-Mäuse (Normalfutter  $155,2 \pm 34,3$  %; AO-Futter  $179,9 \pm 61,1$  %). Somit konnten die Antioxidantien auch die verminderte LTP in den *Mecp2<sup>-/-</sup>*-Mäusen wiederherstellen, ebenfalls über das Niveau der WT-Mäuse hinaus. Die durch das Rett-Syndrom bedingten Defizite sowohl in der PTP als auch in der LTP konnten also erfolgreich therapiert und somit die Wirksamkeit der Antioxidantien-Fütterung eindeutig nachgewiesen werden.

Sowohl die PTP als auch die LTP in den mit Antioxidantien gefütterten WT-Mäusen zeigten eine Tendenz zu geringfügig verringerten Werten im Vergleich zu den mit Normalfutter gefütterten WT-Mäusen.

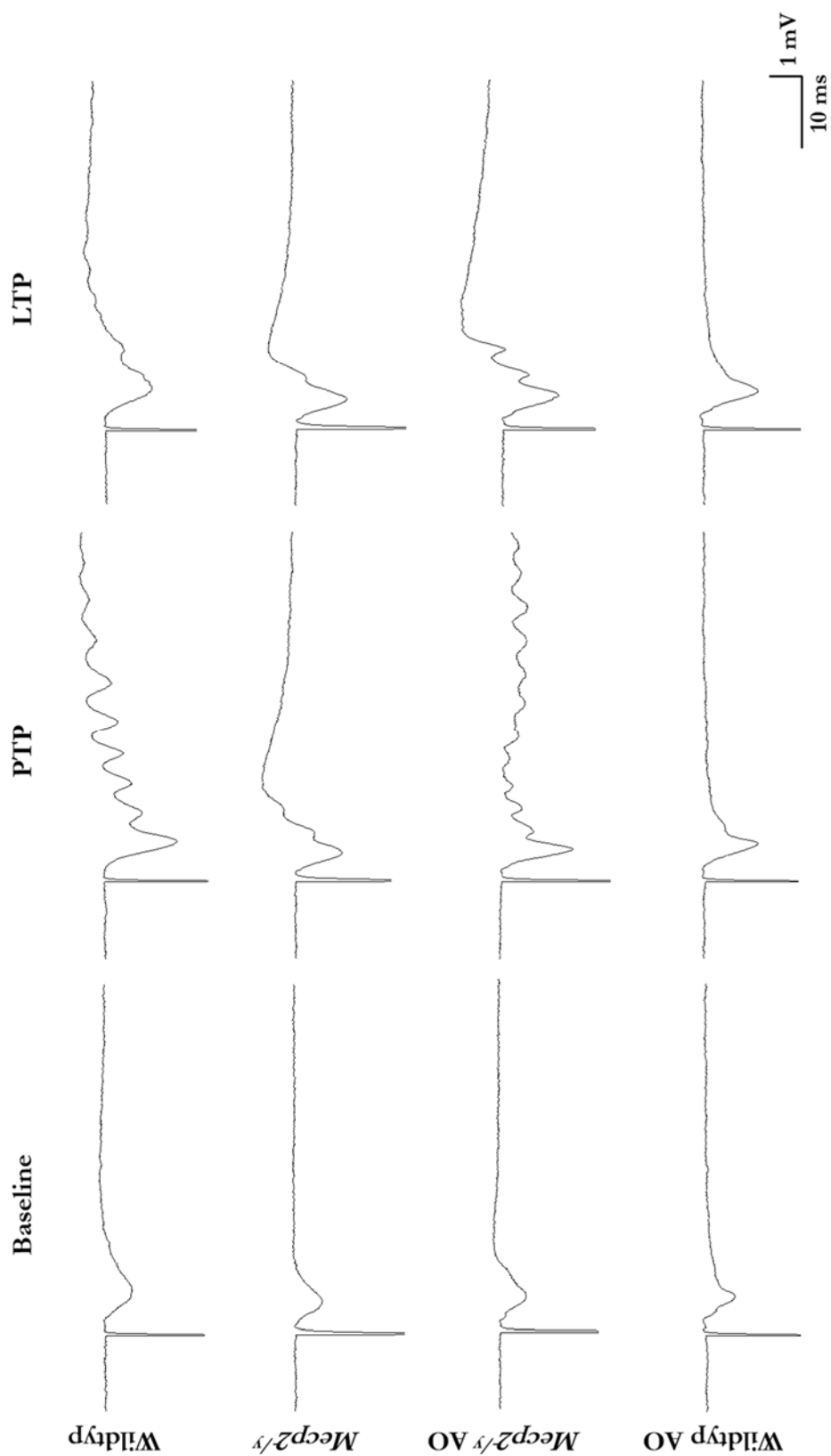
**Tabelle 2: Vergleich der normierten fEPSP-Amplituden**

	<b>WT Normalfutter (n = 35)</b>	<b><i>Mecp2<sup>-/-</sup></i> Normalfutter (n = 36)</b>	<b>WT AO-Futter (n = 33)</b>	<b><i>Mecp2<sup>-/-</sup></i> AO-Futter (n = 34)</b>
<b>PTP [%]</b>	170,3 ± 46,8	139,7 ± 37,1	155,0 ± 46,9	183,7 ± 74,2
<b>LTP [%]</b>	166,2 ± 32,3	155,2 ± 34,3	155,8 ± 33,4	179,9 ± 61,1

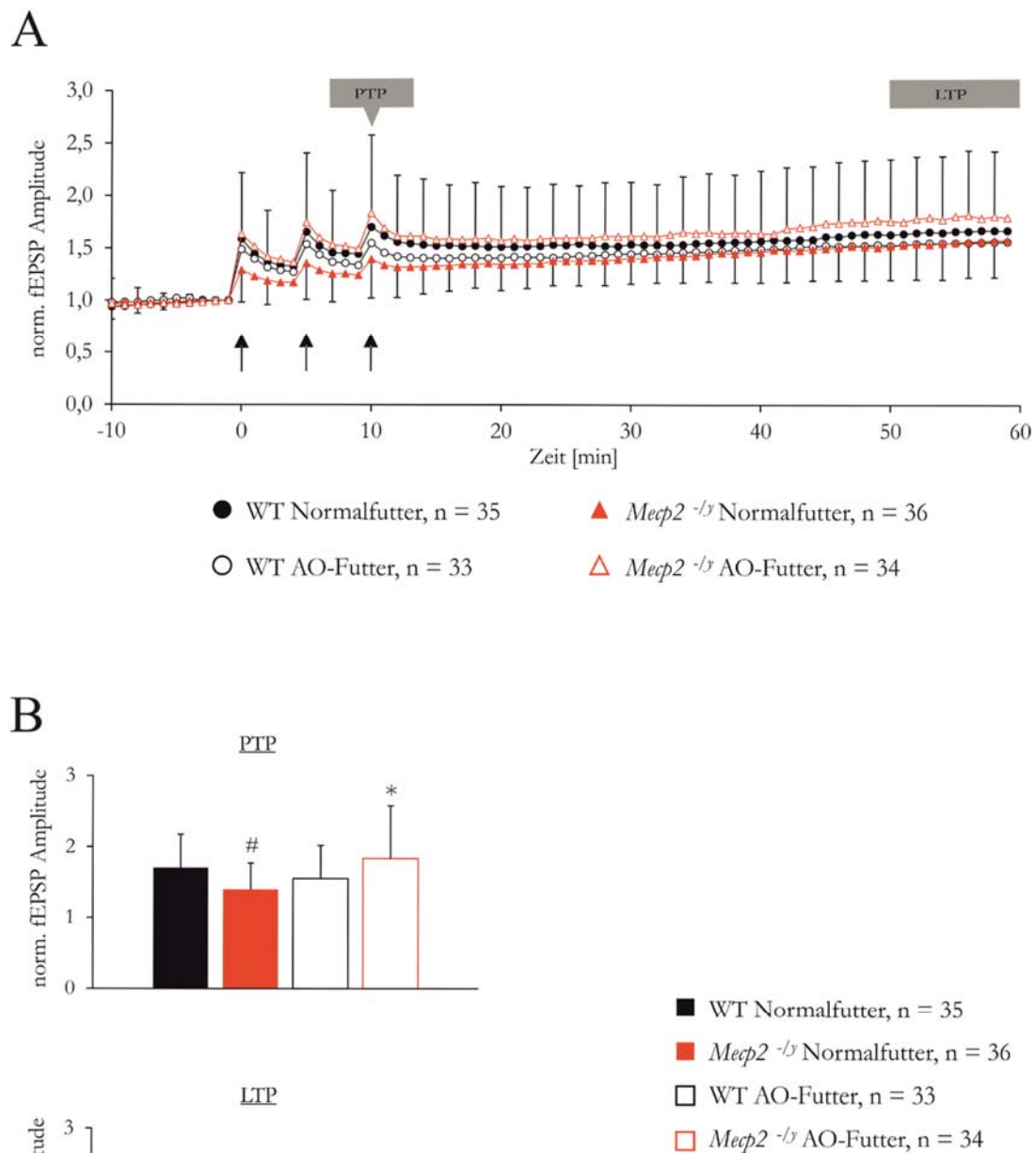
Vergleichbare Ergebnisse zeigten sich auch bei der Auswertung des initialen Anstieges der evozierten Potentiale (Abbildung 12, Tabelle 3). Sowohl das Ausmaß der PTP als tendenziell auch das Ausmaß der LTP waren in den *Mecp2<sup>-/-</sup>*-Mäusen im Vergleich zum WT geringer ausgeprägt. Die Fütterung der *Mecp2<sup>-/-</sup>*-Mäuse mit Antioxidantien führte auch hier zu einer signifikanten Verbesserung der PTP (Normalfutter 167,0 ± 60,5 %; AO-Futter 267,1 ± 214,6 %;  $p < 0,05$ ) und auch einer tendenziell erhöhten LTP (Normalfutter 168,4 ± 45,6 %; AO-Futter 213,9 ± 102,4 %). Somit konnten auch in diesem Aspekt die Antioxidantien sowohl die PTP als auch die LTP in den *Mecp2<sup>-/-</sup>*-Mäusen wiederherstellen und die mit dem Rett-Syndrom assoziierten Defekte in der synaptischen Plastizität ausgleichen, was noch einmal ihre vielversprechende therapeutische Wirkung bestätigt.

**Tabelle 3: Vergleich der normierten fEPSP-Anstiege**

	<b>WT Normalfutter (n = 35)</b>	<b><i>Mecp2<sup>-/-</sup></i> Normalfutter (n = 36)</b>	<b>WT AO-Futter (n = 33)</b>	<b><i>Mecp2<sup>-/-</sup></i> AO-Futter (n = 34)</b>
<b>PTP [%]</b>	205,2 ± 70,5	167,0 ± 60,5	185,8 ± 93,2	267,1 ± 214,6
<b>LTP [%]</b>	174,4 ± 39,6	168,4 ± 45,6	165,1 ± 43,9	213,9 ± 102,4

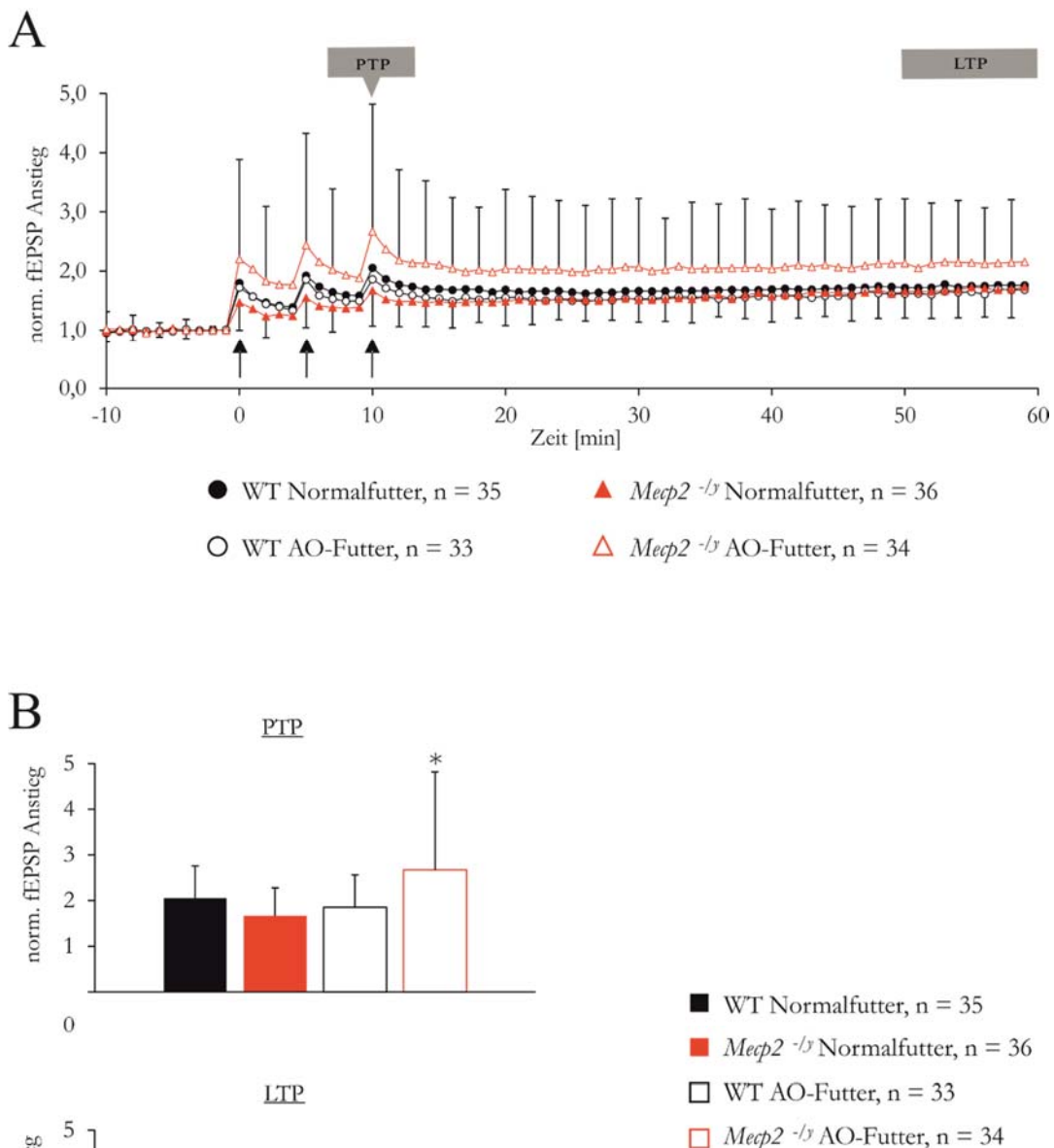


**Abbildung 10: Beispielregistrierungen im Vergleich.** Die Abbildung zeigt je ein Beispiel einer aufgezeichneten Messspur aus den verschiedenen Versuchsgruppen jeweils zum Zeitpunkt der *Baseline* (vor LTP-Induktion), der PTP (nach dem dritten Tetanus) und der LTP (50-60 Minuten nach LTP-Induktion). Sowohl das Ausmaß der PTP als auch der LTP waren in den *Mecp2<sup>-/-</sup>*-Mäusen weniger stark ausgeprägt im Vergleich zu den anderen Versuchsgruppen. Die mit Antioxidantien gefütterten *Mecp2<sup>-/-</sup>*-Mäuse zeigten dem WT entsprechende oder sogar deutlich ausgeprägtere PTP und LTP.



**Abbildung 11: Verbesserte PTP- und LTP-Amplituden nach Antioxidantien-Fütterung.**

**A** Die Induktion stabiler hippocampaler LTP erfolgte mittels Hochfrequenzstimulation in Form von drei Pulssalven (je 100 Hz für eine Sekunde, siehe Pfeile). Die evozierten Feldpotentiale wurden jeweils 10 Minuten vor (*Baseline*) und 50 Minuten nach LTP-Induktion sowie zwischen den drei Tetani analysiert. Zur besseren Übersichtlichkeit ist die Standardabweichung nur für jeden zweiten bis dritten Datenpunkt und nur für die *Mecp2*<sup>-/-</sup>-Mäuse aufgetragen. **B** Im Vergleich zum WT waren sowohl das Ausmaß der PTP als tendenziell auch das Ausmaß der LTP in den *Mecp2*<sup>-/-</sup>-Mäusen reduziert. Die Fütterung der *Mecp2*<sup>-/-</sup>-Mäuse mit Antioxidantien konnte eine signifikante Erhöhung der PTP und ebenfalls eine tendenziell verbesserte LTP erzielen. Signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen mit dem gleichen Genotyp sind mit Sternchen (\*  $p < 0,05$ ) und zwischen WT- und *Mecp2*<sup>-/-</sup>-Mäusen mit Rautenzeichen (#  $p < 0,05$ ) gekennzeichnet.



**Abbildung 12: Verbesserte PTP- und LTP-Anstiege nach Antioxidantien-Fütterung.**

**A** Im Vergleich zur vorherigen Abbildung sind nun die initialen Anstiege der evozierten Potentiale normiert auf die *Baseline* aufgetragen. Die Pfeile markieren die Induktion stabiler LTP mittels dreier Pulssalven (je 100 Hz für eine Sekunde). Zur besseren Übersichtlichkeit ist auch hier die Standardabweichung nur für jeden zweiten bis dritten Datenpunkt und nur für die *Mecp2*<sup>-/-</sup>-Mäuse aufgetragen. **B** Sowohl das Ausmaß der PTP als tendenziell auch das Ausmaß der LTP waren in den *Mecp2*<sup>-/-</sup>-Mäusen im Vergleich zum WT in Bezug auf den initialen Anstieg der fEPSPs geringer ausgeprägt. Die Fütterung der *Mecp2*<sup>-/-</sup>-Mäuse mit Antioxidantien führte auch hier zu einer signifikanten Verbesserung der PTP und auch einer tendenziell erhöhten LTP. Signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen mit dem gleichen Genotyp sind mit Sternchen (\*  $p < 0,05$ ) gekennzeichnet.

## 4 Diskussion

Unsere Arbeitsgruppe konnte bereits positive Effekte des Radikalfängers Trolox, einem wasserlöslichen Vitamin E-Derivat, unter anderem auf die zelluläre Redox-Balance, synaptische Plastizität, Hypoxie-Toleranz und Blutglukose-Spiegel in *Mecp2<sup>ly</sup>*-Mäusen nachweisen (Janc und Müller 2014, Janc et al. 2016). Durch die systemische Medikamentenapplikation mittels intraperitonealer Injektion (alle 48 Stunden) waren die Tiere jedoch vermehrt Stressreaktionen ausgesetzt, die möglicherweise die Ergebnisse beeinflussen. Um dies zu verhindern, wird nun die Wirkung eines Antioxidantien-Futters getestet. Da die Tiere das Futter selbstständig aufnehmen, ist bei dieser Applikationsform nur ein Minimum an Handhabung der Tiere erforderlich. In dieser Arbeit wurden speziell die Auswirkungen des Antioxidantien-Futters auf die synaptische Funktion und Plastizität sowie den allgemeinen Phänotyp der *Mecp2<sup>ly</sup>*-Mäuse untersucht.

### 4.1 Veränderungen des allgemeinen Phänotyps

Der allgemeine Phänotyp, der anhand von Körpergewicht, Körpergröße und Blutparametern beurteilt wurde, wies in allen Parametern signifikante Unterschiede zwischen den WT- und *Mecp2<sup>ly</sup>*-Mäusen auf. Dies entspricht den Ergebnissen früherer Arbeiten, die ebenfalls eine Verringerung des Körpergewichts, des BMIs und des Blutglukosespiegels sowie einen erhöhten Hämatokriten der *Mecp2<sup>ly</sup>*-Mäuse zeigten (Chen et al. 2001; Guy et al. 2001; Janc et al. 2016) und verkörpert so wesentliche Charakteristika des Rett-Syndroms an den adulten männlichen hemizygoten *Mecp2<sup>ly</sup>*-knockout-Mäusen.

Die Antioxidantien-Fütterung der *Mecp2<sup>ly</sup>*-Mäuse konnte eine signifikante Erhöhung der Körpergröße erzielen, ebenso wie ein erhöhtes Körpergewicht. Im Gegensatz zur *In-vivo*-Behandlung mit Trolox zeigte sich auch hier ein tendenziell erhöhter BMI (Janc et al. 2016), was die Wirksamkeit dieses therapeutischen Konzepts eindeutig bestätigt.

Verschiedene Studien konnten bereits nachweisen, dass der Funktionsverlust von MeCP2 beim Rett-Syndrom unter anderem zu einer Störung des Insulin-Signalweges mit erhöhten Insulinspiegeln und Insulinintoleranz führt, aus der in der Folge auch ein gestörter Glukose-Metabolismus resultiert (Pitcher et al. 2013; Krishnan et al. 2015). Auch in dieser Arbeit ergaben Messungen des Blutglukosespiegels bei den *Mecp2<sup>ly</sup>*-Mäusen verringerte Werte im Vergleich zum WT. Da gerade Neurone besonders auf die durch den Glukosemetabolismus gewonnene Energie angewiesen sind, könnte dies eine mögliche Ursache für die beeinträchtigte Funktion neuronaler Netzwerke beim Rett-Syndrom darstellen. Ein eindeutiger Effekt des AO-Futters auf den Blutglukosespiegel der *Mecp2<sup>ly</sup>*-Mäuse konnte jedoch nicht beobachtet werden. Dazu muss jedoch beachtet werden, dass dieser Parameter in Abhängigkeit von der Nahrungsaufnahme der Tiere vor dem Experiment starken Schwankungen unterliegt. Eine Nahrungsrestriktion in einer bestimmten Zeit vor dem Versuch könnte solche Schwankungen zwar vermeiden, würde aber gleichzeitig einen

zusätzlichen Stressfaktor bedeuten, der negativen Einfluss auf die nachfolgenden elektrophysiologischen Messungen nehmen könnte. Eine möglicherweise bessere Alternative könnte in zukünftigen Studien die regelmäßige Messung des Langzeitblutzuckerspiegels (HbA1c) darstellen.

Der erhöhte Hämatokrit der *Mecp2<sup>ly</sup>*-Mäuse im Vergleich zum WT wurde ebenfalls bereits in anderen Arbeiten nachgewiesen und kann als systemische Anpassung an immer wiederkehrende Hypoxie-Phasen, verursacht durch Atmungsunregelmäßigkeiten mit reduzierter Atemfrequenz und Apnoe, interpretiert werden (Fischer et al. 2009; Janc et al. 2016). Die zuvor erprobte Behandlung mit Trolox erzielte in diesem Zusammenhang weder eine Verbesserung des Atemrhythmus noch eine Verringerung des Hämatokriten (Janc et al. 2016). In dieser Arbeit wiesen die mit Antioxidantien gefütterten *Mecp2<sup>ly</sup>*-Mäuse widererwartend sogar den höchsten Hämatokriten unter allen Versuchsgruppen auf. Dies könnte unter anderem mit der Redox-abhängigen Funktion des Hypoxie-induzierten Faktors (HIF) im Zusammenhang stehen. Dieser aktiviert als Transkriptionsfaktor verschiedenste Signalwege, die zur Anpassung an Hypoxie notwendig sind. Dazu zählt die Aktivierung des EPO-Gens, welches für die Synthese der Erythrozyten wichtig ist (Semenza et al. 1991). Eine Erhöhung der HIF-1 $\alpha$ -Untereinheit in Hirnen von Mausmodellen des Rett-Syndroms wurde wie bereits die Erhöhung des Hämatokriten als Reaktion auf systemische Hypoxie in unseren vorherigen Arbeiten beschrieben (Fischer et al. 2009). Es ist bekannt, dass die Aktivierung von HIF entscheidend von der Redox-sensitiven HIF-1 $\alpha$ -Untereinheit abhängig ist, wobei eine verstärkte Bindung von HIF-1 an die DNA bei Reduktion beobachtet werden konnte (Huang et al. 1996). Ein durch die Antioxidantien verändertes Redox-Gleichgewicht könnte hier ursächlich für eine Dysregulation von HIF-1 $\alpha$  und der durch Hypoxie induzierten Signalwege sein. So könnte eine Überpufferung durch die Antioxidantien zu vermehrt reduzierten Bedingungen und so unter anderem zum erhöhten Hämatokrit-Wert führen.

## 4.2 Modulation der synaptischen Funktion und Plastizität

Beim Rett-Syndrom treten verschiedenste kognitive und funktionelle Beeinträchtigungen auf, denen ursächlich eine Veränderung in synaptischer Plastizität und Stärke synaptischer Übertragung zugrunde liegen könnte. Solche Veränderungen, unter anderem in Form reduzierter Kurz- und Langzeitplastizität, wurden bereits in vorangegangenen elektrophysiologischen Studien an Mausmodellen des Rett-Syndroms nachgewiesen (Asaka et al. 2006; Moretti et al. 2006; Fischer et al. 2009; Janc und Müller 2014). Diesen Erkenntnissen entsprechen auch die Ergebnisse dieser Arbeit. Die synaptische Plastizität in Form der PTP war bei *Mecp2<sup>ly</sup>*-Mäusen im Vergleich zu den WT-Mäusen signifikant reduziert, etwas weniger deutlich zeigte sich dieser Unterschied auch in der LTP. Die mögliche Ursache, warum in dieser Arbeit im Vergleich zu den vorherigen Studien unserer Arbeitsgruppe (Janc und Müller 2014) nicht alle Ergebnisse das Signifikanzniveau erreichten, könnte in der inzwischen veränderten Haltungsweise der Versuchstiere und dadurch

verursachten Stress, beispielsweise durch längere Transportwege der Tiere, liegen. Demnach konnte die Fütterung der *Mecp2<sup>fl/y</sup>*-Mäuse mit Antioxidantien eine signifikante Erhöhung der PTP und ebenfalls eine tendenzielle Verbesserung der LTP erzielen.

Die synaptische Funktion und Plastizität kann an verschiedensten Regulationspunkten durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS), darunter beispielsweise das Sauerstoffradikal Superoxid ( $O_2^{\bullet}$ ) und Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ), und Veränderungen des Redox-Gleichgewichts beeinflusst werden. Die Induktion von LTP an den Synapsen der Schaffer-Kollateralen/*CA1*-Dentriden des Hippocampus ist vor allem abhängig von der Aktivierung von NMDA-Rezeptoren (Bliss und Collingridge 1993; Lynch 2004). Deren Aktivität kann sowohl durch Oxidation und Reduktion moduliert werden, wobei ROS durch Cystein-Oxidation den Rezeptor inhibieren (Aizenman et al. 1989; Choi und Lipton 2000). Unsere Arbeitsgruppe konnte im Hippocampus der *Mecp2<sup>fl/y</sup>*-Mäuse erhöhte oxidative Bedingungen und eine verstärkte Freisetzung von ROS nachweisen (Can et al. 2019), welche möglicherweise in der Folge zur Dysregulation der NMDA-Rezeptor-Funktion und zur verringerten synaptischen Plastizität beitragen. Ein weiterer Faktor könnte auch eine veränderte Expression des NMDA-Rezeptors sein. So zeigten verschiedene Studien eine Verringerung der GluN1- und GluN2A-Rezeptor-Untereinheiten im Gehirn von *Mecp2*-knockout-Mäusen (Asaka et al. 2006; Maliszewska-Cyna et al. 2010).

Bei der synaptischen Plastizität spielen  $Ca^{2+}$ -vermittelte Signalwege eine entscheidende Rolle. Dabei kann  $Ca^{2+}$  von extrazellulär, beispielsweise durch die oben erwähnten NMDA-Glutamat-Rezeptoren vermittelt, in die Zelle einströmen oder aus intrazellulären Speichern wie dem Endoplasmatischen Retikulum freigesetzt werden (Cavazzini et al. 2005). Die  $Ca^{2+}$ -Freisetzung aus dem Endoplasmatischen Retikulum, die sowohl durch die Aktivierung von Inositol-1,4,5-trisphosphat( $IP_3$ )-gesteuerten Rezeptoren oder Ryanodin-Rezeptoren (RyR) vermittelt werden kann (Berridge 1998), beeinflusst die synaptische Plastizität, darunter LTP (Rose und Konnerth 2001). Sowohl die RyR-Kanäle als auch die  $IP_3$ -Rezeptoren können durch ROS moduliert werden (Hidalgo 2005; Huddleston et al. 2008; Gerich et al. 2009). Eine Dysregulation der RyR-Funktion durch erhöhte ROS-Konzentrationen und oxidativen Stress wird auch bereits mit neurodegenerativen Erkrankungen wie der Alzheimer-Krankheit in Verbindung gebracht (Kelliher et al. 1999; Paula-Lima et al. 2014). Es ist möglich, dass solche Veränderungen auch beim Rett-Syndrom zur veränderten synaptischen Plastizität beitragen.

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) können in hohen Konzentrationen irreversible Gewebsschäden verursachen (Halliwell 1992). Doch es kommt auch unter physiologischen Bedingungen, wie unter anderem bei Aktivierung des NMDA-Rezeptors während der LTP-Induktion, zur Produktion von ROS, welche dann als *second messenger* weitere Signalkaskaden in Gang setzen und die Aktivität verschiedenster Proteine beeinflussen. So aktivieren Superoxide unter anderem die Proteinkinase C und verschiedene Tyrosinkinasen, die notwendig für LTP-Induktion und -Expression sind. Es wird vermutet, dass die ROS auf



diese Weise sogar förderlich oder gar notwendig für die LTP-Expression sind (Bindokas et al. 1996; Kanterewicz et al. 1998; Klann et al. 1998; Klann und Thiels 1999). In diesem Zusammenhang konnte auch gezeigt werden, dass sowohl die Gabe von Superoxid-Fängern als auch die Überexpression des Enzyms Superoxid-Dismutase (SOD) zu einer Verschlechterung der hippocampalen LTP führt (Klann et al. 1998; Thiels et al. 2000).

Es lässt sich also vermuten, dass die ungestörte Funktion und ausgeprägte Plastizität der Synapsen auf ein stabiles Redox-Gleichgewicht angewiesen sind. In diesem Zusammenhang lässt sich offenbar auch die beobachtete Tendenz zur geringfügigen verminderten synaptischen Plastizität des mit Antioxidantien gefütterten WT erklären. Eine zu hohe Antioxidantien-Konzentration kann das Redox-Gleichgewicht in eine gegensätzliche Richtung verschieben und somit die synaptische Funktion negativ beeinflussen. Ähnlich Ergebnisse zeigten auch die früheren *In-vitro*-Experimente mit verschiedenen Dosierungen von Trolox (Janc und Müller 2014).

Die eindeutigen Veränderungen in synaptischer Funktion und Plastizität im Rett-Syndrom sind allerdings vermutlich nicht nur durch ein verändertes Redox-Gleichgewicht bedingt, sondern werden noch durch eine Vielzahl anderer Faktoren beeinflusst. Als ein Beispiel dafür kann der *brain derived neurotrophic factor* (BDNF) genannt werden, dessen Gen-Transkription wie bereits erwähnt durch MeCP2 reguliert wird (Chen et al. 2003; Li und Pozzo-Miller 2014). Verschiedene Studien wiesen in diesem Zusammenhang reduzierte BDNF-Level im Hirngewebe von Mausmodellen des Rett-Syndroms nach und es wird angenommen, dass eine Dysregulation der BDNF-Funktion zur Beeinträchtigung der synaptischen Funktion und Plastizität sowie neuronalen Entwicklung beim Rett-Syndrom beiträgt (Chang et al. 2006; Li et al. 2012; Li und Pozzo-Miller 2014). Allerdings wird die Expression von BDNF im Gehirn von Patienten mit Rett-Syndrom kontrovers diskutiert. Aktuelle Arbeiten zu diesem Thema zeigten zwar eine verringerte Expression der BDNF-mRNA in *Post-mortem*-Hirngewebe von Patientinnen mit Rett-Syndrom, jedoch ließen sich keine Unterschiede in der BDNF-Protein-Konzentration des Gehirns der an Rett-Syndrom Erkrankten im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe nachweisen (Pejhan et al. 2020). Tatsächlich zeigte sich der Phänotyp nach einer Deletion des BDNF-Gens vergleichbar mit dem der *Mecp2<sup>fl/y</sup>*-Mäuse unter anderem in verringertem Hirngewicht und reduzierter neuronaler Zellgröße (Chang et al. 2006). Es wurde nachgewiesen, dass BDNF über die Aktivierung seines TrkB-FL-Rezeptors auch die Ausprägung von LTP an den hippocampalen *CA1*-Synapsen steigert (Figurov et al. 1996; Gottschalk et al. 1998). Verschiedenste Therapieansätze, die über die Verstärkung der BDNF-Signalwege die Symptome des Rett-Syndroms lindern sollen, sind somit ebenfalls Gegenstand aktueller Forschung (Li und Pozzo-Miller 2014; Miranda-Lourenco et al. 2020).

Interessant wäre, in folgenden Arbeiten die synaptische Funktion und Plastizität und den Einfluss von Antioxidantien nicht nur im Hippocampus, sondern auch in anderen Hirnregionen, wie dem motorischen Kortex oder dem Kleinhirn, zu untersuchen. Andere

Studien konnten in diesem Zusammenhang bereits eine reduzierte LTP im motorischen und sensorischen Kortex von unbehandelten *Mecp2<sup>308/Y</sup>*-Mäusen, die ein verkürztes MeCP2-Protein exprimieren, nachweisen (Moretti et al. 2006).

### 4.3 Fazit zur Antioxidantien-Fütterung

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Antioxidantien-Fütterung sowohl den allgemeinen Phänotyp als auch die synaptische Funktion und Plastizität der *Mecp2<sup>ly</sup>*-Mäuse verbessert und bestätigt so deren therapeutische Wirksamkeit. Die Antioxidantien könnten somit als möglicher Therapieansatz für die kognitiven Symptome des Rett-Syndroms in Betracht gezogen werden. Allerdings muss beachtet werden, dass die adulten männlichen hemizygoten *Mecp2<sup>ly</sup>*-Mäuse symptomatisch stark betroffen sind. Deshalb sollten die Effekte in folgenden Arbeiten auch an heterozygoten Weibchen, die einen wesentlich mildereren und variableren Phänotyp ausprägen, getestet werden.

Das Symptomspektrum des Rett-Syndroms ist, wie in der Einleitung bereits geschildert, sehr vielfältig und komplex. Deshalb ist es wichtig, in umfassenden vorklinischen Studien die Auswirkungen des AO-Futters auch auf andere Parameter zu testen. In diesem Rahmen konnten in zeitgleich laufenden Arbeiten unserer Arbeitsgruppe bereits weitere bisher noch nicht publizierte positive Effekte der Antioxidantien-Fütterung beobachtet werden. Dazu zählen die Zunahme des Hirngewichts in weiblichen *Mecp2<sup>+/y</sup>*-Mäusen sowie die Zunahme der corticalen Schichtdicke und der neuronalen Zellgröße bei den *Mecp2<sup>ly</sup>*-Mäusen. Die Überlebenskurve dieser Tiere wird steiler, da die symptomfreie Überlebenszeit zunimmt. Des Weiteren werden zurzeit die Auswirkungen des AO-Futters auf die Atmung und in weiteren elektrophysiologischen Experimenten auch auf die Kurzzeitplastizität und Krampfanfälligkeit der *Mecp2<sup>ly</sup>*-Mäuse untersucht. Auch Untersuchungen der ROS-Produktion und des Redox-Status der mit Antioxidantien gefütterten Tiere könnten genauere Erkenntnisse über die Wirkungsweise des AO-Futters liefern.

Außerdem könnten zukünftig verschiedene Antioxidantien-Konzentrationen insbesondere auch mit Blick auf deren Auswirkungen auf die WT-Tiere getestet werden. Im Gegensatz zu einer Medikamenteninjektion ist die genaue Dosis-Kontrolle der mit dem Futter verabreichten Antioxidantien allerdings limitiert, da sie durch das unterschiedliche Fressverhalten des einzelnen Tieres individuell beeinflusst wird.

Die Fütterung der Tiere mit dem Antioxidantien-Futter ist auch erst nach dem Absetzen der Jungtiere von der Mutter ungefähr 20 Tage nach der Geburt möglich. Somit können die Antioxidantien auch erst frühestens zu diesem Zeitpunkt in den Krankheitsverlauf eingreifen. Eine Möglichkeit einer früheren Therapie könnte die Fütterung der Muttertiere sein, sodass die Jungtiere die Antioxidantien schon früher durch die Muttermilch aufnehmen. Doch auch hier kann die genaue Antioxidantien-Konzentration, die jedes Tier aufnimmt, nicht kontrolliert werden.

Einige Studien an Rett-Patienten konnten bereits positive Wirkungen einer Behandlung mit Antioxidantien aufzeigen. So konnte eine Diät reich an mehrfach ungesättigten  $\omega$ -3-Fettsäuren in frühen Krankheitsstadien bei Patienten die Schwere einiger Krankheitssymptome wie Atmungsunregelmäßigkeiten und motorische Dysfunktion abmildern und Level verschiedener oxidativer Stressmarker senken (De Felice et al. 2012). Auch für das Therapeutikum EPI-743 ( *$\alpha$ -trocotrienol quinone*) konnte unter anderem ein signifikant gesteigertes Kopfwachstum im Vergleich zur Placebo-Gruppe beobachtet werden (Enns und Cohen 2017).

Die Anwendbarkeit der in dieser Studie getesteten Antioxidantien am Patienten könnte im Rahmen einer oralen Applikation unproblematisch erfolgen. Denkbar wäre die Behandlung in Ergänzung zu anderen Therapieansätzen, um eine Verbesserung einzelner Symptome wie beispielsweise eine Stabilisierung der neuronalen Funktion und Steigerung kognitiver Fähigkeiten zu erzielen. Der Einsatz von Antioxidantien zur Symptomverbesserung könnte so im Rahmen einer personalisierten Behandlung für jeden Patienten in individuellen Therapiekonzepten erwogen werden.

## 5 Zusammenfassung

Beim Rett-Syndrom handelt es sich um eine seltene progressive neurologische Entwicklungsstörung, die fast ausschließlich Mädchen betrifft. Das klassische Rett-Syndrom ist charakterisiert durch eine normale prä- und perinatale Entwicklung in den ersten sechs Lebensmonaten. Danach kommt es zum Entwicklungsstillstand und stadienhafter Manifestation von vor allem neurologischen Symptomen. Dazu zählt unter anderem der Verlust verschiedenster kognitiver Funktionen, wie Sprache, Lokomotion und funktionellem Gebrauch der Hände. In über 95 % der Fälle liegt dem klassischen Rett-Syndrom eine Mutation im X-chromosomalen *MECP2*-Gen zugrunde. Das *MECP2*-Gen codiert für das Protein *methyl-CpG-binding-protein 2* (MeCP2), als dessen Hauptfunktion die Regulation der Genexpression angenommen wird.

Bei der Pathogenese des Rett-Syndroms spielen unter anderem mitochondriale Veränderungen, ein Ungleichgewicht in der zellulären Redox-Balance und oxidativer Stress eine entscheidende Rolle und stellen aus diesem Grund potentielle Angriffspunkte möglicher Therapieansätze dar. In diesem Zusammenhang wurden in unserer Arbeitsgruppe bereits positive Effekte des mittels intraperitonealer Injektion applizierten Radikalfängers Trolox, einem wasserlöslichen Vitamin E-Derivat, in *Mecp2<sup>fl/y</sup>*-Mäusen nachgewiesen. Um die Handhabung der Tiere zu minimieren, wird nun die Wirkung einer oralen Verabreichung von Antioxidantien in Form eines Antioxidantien-Futters auf das Rett-Syndrom getestet. In dieser Arbeit wurden dabei speziell die Auswirkungen des Antioxidantien-Futters auf die synaptische Funktion und Plastizität sowie den allgemeinen Phänotyp der *Mecp2*-knockout-Mäuse (*Mecp2<sup>fl/y</sup>*), bei denen das *Mecp2*-Gen weitestgehend fehlt und die als Tiermodell für das Rett-Syndrom dienen, untersucht.

Der allgemeine Phänotyp der Tiere, der anhand von Körpergewicht, Körpergröße und Blutparametern beurteilt wurde, wies in allen Parametern signifikante Unterschiede zwischen Wildtyp- und *Mecp2<sup>fl/y</sup>*-Mäusen auf. So waren bei den *Mecp2<sup>fl/y</sup>*-Mäusen Körpergröße und -gewicht sowie BMI und Blutglukosespiegel signifikant verringert, der Hämatokrit jedoch vermutlich aufgrund systemischer Anpassung an immer wiederkehrende Atemaussetzer und Hypoxie-Phasen signifikant erhöht. Durch die Fütterung mit Antioxidantien konnte hier bei den *Mecp2<sup>fl/y</sup>*-Mäusen eine signifikante Erhöhung der Körpergröße erreicht werden, ebenso wie ein erhöhtes Körpergewicht und ein tendenziell verbesserter BMI. Beim Blutglukosespiegel konnte kein Effekt der Antioxidantien beobachtet werden, der Hämatokrit zeigte widererwartend eine weitere Erhöhung.

Zwischen den Versuchsgruppen wurde die Fähigkeit zur Ausbildung und Aufrechterhaltung stabiler Plastizitätsmuster verglichen. Um das Ausmaß der synaptischen Plastizität zu beurteilen, dienten die Posttetanische Potenzierung und die Langzeitpotenzierung als essentielle Formen der synaptischen Plastizität. Diese wurden in akuten corticohippocampalen Hirnschnitten in einer Oslo-Style Interfacekammer mittels extrazellulärer Feldpotential-Ableitungen gemessen. Die Induktion erfolgte durch

hochfrequente Stimulationsmuster (drei Pulssalven, je 100 Hz für eine Sekunde). Die modulierten neuronalen Reizantworten wurden für die darauffolgende Stunde elektrophysiologisch aufgezeichnet und eingehend analysiert. Die synaptische Plastizität in Form der Posttetanischen Potenzierung war bei *Mecp2<sup>ly</sup>*-Mäusen im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen signifikant reduziert, etwas weniger deutlich zeigte sich dieser Unterschied auch in der Langzeitpotenzierung. Die Fütterung der *Mecp2<sup>ly</sup>*-Mäuse mit Antioxidantien konnte jedoch eine signifikante Erhöhung der Posttetanischen Potenzierung und ebenfalls eine tendenzielle Verbesserung der Langzeitpotenzierung erzielen. Somit konnten die Antioxidantien erfolgreich beide Formen der synaptischen Plastizität in den *Mecp2<sup>ly</sup>*-Mäusen auf das Niveau der Wildtyp-Mäuse oder sogar darüber hinaus wiederherstellen und somit die durch das Rett-Syndrom bedingten Defekte beseitigen. Die mit Antioxidantien gefütterten Wildtypen zeigten eine Tendenz zur geringfügigen verminderten synaptischen Plastizität.

Diese Ergebnisse bestätigen eindeutig die Wirksamkeit dieses therapeutischen Konzepts. So könnten die Antioxidantien als symptomverbessernder Therapieansatz unter anderem für die kognitiven Symptome des Rett-Syndroms in Betracht gezogen werden. In weiteren Studien sollte dazu die Wirksamkeit des Therapeutikums auch an heterozygoten Weibchen, die einen wesentlich milderen und variableren Phänotyp ausprägen, getestet werden. Da das Symptomspektrum des Rett-Syndroms sehr vielfältig und komplex ist, müssen in umfassenden vorklinischen Studien die Auswirkungen des Antioxidantien-Futters auch auf andere Parameter getestet werden. Auch ein früherer Einsatz im Krankheitsverlauf sowie verschiedene Antioxidantien-Konzentrationen, insbesondere auch mit Blick auf deren Auswirkungen auf die Wildtyp-Tiere, könnten weitere Erkenntnisse über die Wirksamkeit liefern. Die genaue Dosis-Kontrolle der mit dem Futter verabreichten Antioxidantien ist dabei durch das individuelle Fressverhalten des einzelnen Tieres allerdings limitiert.

Die Anwendung einer Antioxidantien-Therapie am Patienten wäre im Rahmen von individualisierten Behandlungskonzepten in Ergänzung zu anderen Therapieansätzen denkbar, um eine Verbesserung einzelner Symptome wie beispielsweise eine Stabilisierung der neuronalen Funktion und Steigerung kognitiver Fähigkeiten zu erzielen.

## 6 Literaturverzeichnis

Aber KM, Nori P, MacDonald SM, Bibat G, Jarrar MH, Kaufmann WE (2003): Methyl-CpG-binding protein 2 is localized in the postsynaptic compartment: an immunochemical study of subcellular fractions. *Neuroscience* 116, 77-80

Aizenman E, Lipton SA, Loring RH (1989): Selective modulation of NMDA responses by reduction and oxidation. *Neuron* 2, 1257-1263

Amir RE, Van den Veyver IB, Wan M, Tran CQ, Francke U, Zoghbi HY (1999): Rett syndrome is caused by mutations in X-linked *MECP2*, encoding methyl-CpG-binding protein 2. *Nat Genet* 23, 185-188

Anderson A, Wong K, Jacoby P, Downs J, Leonard H (2014): Twenty years of surveillance in Rett syndrome: what does this tell us? *Orphanet J Rare Dis* 9, 87

Arivazhagan P, Panneerselvam C (2000): Effect of DL-alpha-lipoic acid on neural antioxidants in aged rats. *Pharmacol Res* 42, 219-222

Armstrong D, Dunn JK, Antalffy B, Trivedi R (1995): Selective dendritic alterations in the cortex of Rett syndrome. *J Neuropathol Exp Neurol* 54, 195-201

Asaka Y, Jugloff DG, Zhang L, Eubanks JH, Fitzsimonds RM (2006): Hippocampal synaptic plasticity is impaired in the *Mecp2*-null mouse model of Rett syndrome. *Neurobiol Dis* 21, 217-227

Bebensee DF, Can K, Müller M (2017): Increased mitochondrial mass and cytosolic redox imbalance in hippocampal astrocytes of a mouse model of Rett syndrome: subcellular changes revealed by ratiometric imaging of JC-1 and roGFP1 fluorescence. *Oxid Med Cell Longev* 2017, 3064016

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

Berridge MJ (1998): Neuronal calcium signaling. *Neuron* 21, 13-26

Bindokas VP, Jordan J, Lee CC, Miller RJ (1996): Superoxide production in rat hippocampal neurons: selective imaging with hydroethidine. *J Neurosci* 16, 1324-1336

Blackman MP, Djukic B, Nelson SB, Turrigiano GG (2012): A critical and cell-autonomous role for MeCP2 in synaptic scaling up. *J Neurosci* 32, 13529-13536

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

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

Brand MD (2010): The sites and topology of mitochondrial superoxide production. *Exp Gerontol* 45, 466-472

Brigelius-Flohé R, Traber MG (1999): Vitamin E: function and metabolism. *Faseb J* 13, 1145-1155

Burd L, Randall T, Martsolf JT, Kerbeshian J (1991): Rett syndrome symptomatology of institutionalized adults with mental retardation: comparison of males and females. *Am J Ment Retard* 95, 596-601

Calfa G, Percy AK, Pozzo-Miller L (2011): Experimental models of Rett syndrome based on *Mecp2* dysfunction. *Exp Biol Med* 236, 3-19

Can K, Menzfeld C, Rinne L, Rehling P, Kügler S, Golubiani G, Dudek J, Müller M (2019): Neuronal redox-imbalance in Rett syndrome affects mitochondria as well as cytosol, and is accompanied by intensified mitochondrial O<sub>2</sub> consumption and ROS release. *Front Physiol* 10, 479

Cavazzini M, Bliss T, Emptage N (2005): Ca<sup>2+</sup> and synaptic plasticity. *Cell Calcium* 38, 355-367

Cervellati C, Sticozzi C, Romani A, Belmonte G, De Rasmio D, Signorile A, Cervellati F, Milanese C, Mastroberardino PG, Pecorelli A et al. (2015): Impaired enzymatic defensive activity, mitochondrial dysfunction and proteasome activation are involved in RTT cell oxidative damage. *Biochim Biophys Acta* 1852, 2066-2074

Chahrour M, Zoghbi HY (2007): The story of Rett syndrome: from clinic to neurobiology. *Neuron* 56, 422-437

Chahrour M, Jung SY, Shaw C, Zhou X, Wong ST, Qin J, Zoghbi HY (2008): MeCP2, a key contributor to neurological disease, activates and represses transcription. *Science* 320, 1224-1229

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

Cheadle JP, Gill H, Fleming N, Maynard J, Kerr A, Leonard H, Krawczak M, Cooper DN, Lynch S, Thomas N et al. (2000): Long-read sequence analysis of the *MECP2* gene in Rett syndrome patients: correlation of disease severity with mutation type and location. *Hum Mol Genet* 9, 1119-1129

Chen RZ, Akbarian S, Tudor M, Jaenisch R (2001): Deficiency of methyl-CpG binding protein-2 in CNS neurons results in a Rett-like phenotype in mice. *Nat Genet* 27, 327-331

Chen WG, Chang Q, Lin Y, Meissner A, West AE, Griffith EC, Jaenisch R, Greenberg ME (2003): Derepression of BDNF transcription involves calcium-dependent phosphorylation of MeCP2. *Science* 302, 885-889

Choi YB, Lipton SA (2000): Redox modulation of the NMDA receptor. *Cell Mol Life Sci* 57, 1535-1541

Christen HJ, Hanefeld F (1995): Male Rett variant. *Neuropediatrics* 26, 81-82

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

Cornford ME, Philippart M, Jacobs B, Scheibel AB, Vinters HV (1994): Neuropathology of Rett syndrome: case report with neuronal and mitochondrial abnormalities in the brain. *J Child Neurol* 9, 424-431

De Felice C, Signorini C, Leoncini S, Pecorelli A, Durand T, Valacchi G, Ciccoli L, Hayek J (2012): The role of oxidative stress in Rett syndrome: an overview. *Ann N Y Acad Sci* 1259, 121-135

De Felice C, Signorini C, Durand T, Oger C, Guy A, Bultel-Poncé V, Galano JM, Ciccoli L, Leoncini S, D'Esposito M et al. (2011): F2-dihomo-isoprostanes as potential early biomarkers of lipid oxidative damage in Rett syndrome. *J Lipid Res* 52, 2287-2297

De Felice C, Signorini C, Durand T, Ciccoli L, Leoncini S, D'Esposito M, Filosa S, Oger C, Guy A, Bultel-Ponce V et al. (2012): Partial rescue of Rett syndrome by  $\omega$ -3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs) oil. *Genes Nutr* 7, 447-458

De Felice C, Della Ragione F, Signorini C, Leoncini S, Pecorelli A, Ciccoli L, Scalabri F, Marracino F, Madonna M, Belmonte G et al. (2014): Oxidative brain damage in Mecp2-mutant murine models of Rett syndrome. *Neurobiol Dis* 68, 66-77

De Filippis B, Valenti D, de Bari L, De Rasmio D, Musto M, Fabbri A, Ricceri L, Fiorentini C, Laviola G, Vacca RA (2015): Mitochondrial free radical overproduction due to respiratory



chain impairment in the brain of a mouse model of Rett syndrome: protective effect of CNF1. *Free Radic Biol Med* 83, 167-177

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

Duchen MR (2012): Mitochondria, calcium-dependent neuronal death and neurodegenerative disease. *Pflugers Arch* 464, 111-121

Eeg-Olofsson O, al-Zuhair AG, Teebi AS, al-Essa MM (1988): Abnormal mitochondria in the Rett syndrome. *Brain Dev* 10, 260-262

Enns GM, Cohen BH (2017): Clinical trials in mitochondrial disease: an update on EPI-743 and RP103. *J Inborn Errors Metab Screen* 5, 1-7

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

Figurov A, Pozzo-Miller LD, Olafsson P, Wang T, Lu B (1996): Regulation of synaptic responses to high-frequency stimulation and LTP by neurotrophins in the hippocampus. *Nature* 381, 706-709

Fischer M, Reuter J, Gerich FJ, Hildebrandt B, Hägele S, Katschinski D, Müller M (2009): Enhanced hypoxia susceptibility in hippocampal slices from a mouse model of Rett syndrome. *J Neurophysiol* 101, 1016-1032

Formichi P, Battisti C, Dotti MT, Hayek G, Zappella M, Federico A (1998): Vitamin E serum levels in Rett syndrome. *J Neurol Sci* 156, 227-230

Gerich FJ, Funke F, Hildebrandt B, Faßhauer M, Müller M (2009): H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-mediated modulation of cytosolic signaling and organelle function in rat hippocampus. *Pflügers Arch* 458, 937-952

Gibson JH, Slobedman B, K NH, Williamson SL, Minchenko D, El-Osta A, Stern JL, Christodoulou J (2010): Downstream targets of methyl CpG binding protein 2 and their abnormal expression in the frontal cortex of the human Rett syndrome brain. *BMC Neurosci* 11, 53

Gold WA, Williamson SL, Kaur S, Hargreaves IP, Land JM, Pelka GJ, Tam PP, Christodoulou J (2014): Mitochondrial dysfunction in the skeletal muscle of a mouse model of Rett syndrome (RTT): implications for the disease phenotype. *Mitochondrion* 15, 10-17

Gottschalk W, Pozzo-Miller LD, Figurov A, Lu B (1998): Presynaptic modulation of synaptic transmission and plasticity by brain-derived neurotrophic factor in the developing hippocampus. *J Neurosci* 18, 6830-6839

Großer E, Hirt U, Janc OA, Menzfeld C, Fischer M, Kempkes B, Vogelgesang S, Manzke TU, Opitz L, Salinas-Riester G et al. (2012): Oxidative burden and mitochondrial dysfunction in a mouse model of Rett syndrome. *Neurobiol Dis* 48, 102-114

Guy J, Hendrich B, Holmes M, Martin JE, Bird A (2001): A mouse *Mecp2*-null mutation causes neurological symptoms that mimic Rett syndrome. *Nat Genet* 27, 322-326

Hagberg B (1985): Rett's syndrome: prevalence and impact on progressive severe mental retardation in girls. *Acta Paediatr Scand* 74, 405-408

Hagberg B, Witt-Engerström I (1986): Rett syndrome: a suggested staging system for describing impairment profile with increasing age towards adolescence. *Am J Med Genet Suppl* 1, 47-59

Hagberg B, Hanefeld F, Percy A, Skjeldal O (2002): An update on clinically applicable diagnostic criteria in Rett syndrome. Comments to Rett Syndrome Clinical Criteria Consensus Panel Satellite to European Paediatric Neurology Society Meeting, Baden Baden, Germany, 11 September 2001. *Eur J Paediatr Neurol* 6, 293-297

Hagberg B, Goutieres F, Hanefeld F, Rett A, Wilson J (1985): Rett syndrome: criteria for inclusion and exclusion. *Brain Dev* 7, 372-373

Hagberg BA, Skjeldal OH (1994): Rett variants: a suggested model for inclusion criteria. *Pediatr Neurol* 11, 5-11

Halliwell B (1992): Reactive oxygen species and the central nervous system. *J Neurochem* 59, 1609-1623

Hepp S, Gerich FJ, Müller M (2005): Sulfhydryl oxidation reduces hippocampal susceptibility to hypoxia-induced spreading depression by activating BK-channels. *J Neurophysiol* 94, 1091-1103

Hidalgo C (2005): Cross talk between  $Ca^{2+}$  and redox signalling cascades in muscle and neurons through the combined activation of ryanodine receptors/ $Ca^{2+}$  release channels. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 360, 2237-2246

Huang LE, Arany Z, Livingston DM, Bunn HF (1996): Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its alpha subunit. *J Biol Chem* 271, 32253-32259

Huddleston AT, Tang W, Takeshima H, Hamilton SL, Klann E (2008): Superoxide-induced potentiation in the hippocampus requires activation of ryanodine receptor type 3 and ERK. *J Neurophysiol* 99, 1565-1571

Jan MM, Dooley JM, Gordon KE (1999): Male Rett syndrome variant: application of diagnostic criteria. *Pediatr Neurol* 20, 238-240

Janc OA, Müller M (2014): The free radical scavenger Trolox dampens neuronal hyperexcitability, reinstates synaptic plasticity, and improves hypoxia tolerance in a mouse model of Rett syndrome. *Front Cell Neurosci* 8, 56

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

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

Kanterewicz BI, Knapp LT, Klann E (1998): Stimulation of p42 and p44 mitogen-activated protein kinases by reactive oxygen species and nitric oxide in hippocampus. *J Neurochem* 70, 1009-1016

Kelliher M, Fastbom J, Cowburn RF, Bonkale W, Ohm TG, Ravid R, Sorrentino V, O'Neill C (1999): Alterations in the ryanodine receptor calcium release channel correlate with Alzheimer's disease neurofibrillary and beta-amyloid pathologies. *Neuroscience* 92, 499-513

Klann E, Thiels E (1999): Modulation of protein kinases and protein phosphatases by reactive oxygen species: implications for hippocampal synaptic plasticity. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 23, 359-376

Klann E, Roberson ED, Knapp LT, Sweatt JD (1998): A role for superoxide in protein kinase C activation and induction of long-term potentiation. *J Biol Chem* 273, 4516-4522

Kriaucionis S, Paterson A, Curtis J, Guy J, Macleod N, Bird A (2006): Gene expression analysis exposes mitochondrial abnormalities in a mouse model of Rett syndrome. *Mol Cell Biol* 26, 5033-5042

Krishnan N, Krishnan K, Connors CR, Choy MS, Page R, Peti W, Van Aelst L, Shea SD, Tonks NK (2015): PIP1B inhibition suggests a therapeutic strategy for Rett syndrome. *J Clin Invest* 125, 3163-3177

Leonard H, Bower C, English D (1997): The prevalence and incidence of Rett syndrome in Australia. *Eur Child Adolesc Psychiatry* 6 Suppl 1, 8-10

Leonard H, Cobb S, Downs J (2017): Clinical and biological progress over 50 years in Rett syndrome. *Nat Rev Neurol* 13, 37-51

Li W, Pozzo-Miller L (2014): BDNF deregulation in Rett syndrome. *Neuropharmacology* 76 Pt C, 737-746

Li W, Calfa G, Larimore J, Pozzo-Miller L (2012): Activity-dependent BDNF release and TRPC signaling is impaired in hippocampal neurons of *Mecp2* mutant mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 17087-17092

López-Erauskin J, Fourcade S, Galino J, Ruiz M, Schlüter A, Naudi A, Jove M, Portero-Otin M, Pamplona R, Ferrer I et al. (2011): Antioxidants halt axonal degeneration in a mouse model of X-adrenoleukodystrophy. *Ann Neurol* 70, 84-92

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

Maliszewska-Cyna E, Bawa D, Eubanks JH (2010): Diminished prevalence but preserved synaptic distribution of N-methyl-D-aspartate receptor subunits in the methyl CpG binding protein 2(MeCP2)-null mouse brain. *Neuroscience* 168, 624-632

May DW (1901): Catalase, a New Enzym of General Occurrence. *Science* 14, 815-816

McArthur AJ, Budden SS (1998): Sleep dysfunction in Rett syndrome: a trial of exogenous melatonin treatment. *Dev Med Child Neurol* 40, 186-192

McCord JM, Fridovich I (1969): Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *J Biol Chem* 244, 6049-6055

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

Miranda-Lourenco C, Duarte ST, Palminha C, Gaspar C, Rodrigues TM, Magalhaes-Cardoso T, Rei N, Colino-Oliveira M, Gomes R, Ferreira S et al. (2020): Impairment of adenosinergic system in Rett syndrome: Novel therapeutic target to boost BDNF signalling. *Neurobiol Dis* 145, 105043

Mitchell P (1966): Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. *Biol Rev Camb Philos Soc* 41, 445-502

- Mnatzakanian GN, Lohi H, Munteanu I, Alfred SE, Yamada T, MacLeod PJ, Jones JR, Scherer SW, Schanen NC, Friez MJ et al. (2004): A previously unidentified *MECP2* open reading frame defines a new protein isoform relevant to Rett syndrome. *Nat Genet* 36, 339-341
- Moretti P, Levenson JM, Battaglia F, Atkinson R, Teague R, Antalffy B, Armstrong D, Arancio O, Sweatt JD, Zoghbi HY (2006): Learning and memory and synaptic plasticity are impaired in a mouse model of Rett syndrome. *J Neurosci* 26, 319-327
- Müller M (2019): Disturbed redox homeostasis and oxidative stress: Potential players in the developmental regression in Rett syndrome. *Neurosci Biobehav Rev* 98, 154-163
- Müller M, Can K (2014): Aberrant redox homeostasis and mitochondrial dysfunction in Rett syndrome. *Biochem Soc Trans* 42, 959-964
- Nan X, Meehan RR, Bird A (1993): Dissection of the methyl-CpG binding domain from the chromosomal protein MeCP2. *Nucleic Acids Res* 21, 4886-4892
- Nan X, Ng HH, Johnson CA, Laherty CD, Turner BM, Eisenman RN, Bird A (1998): Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* 393, 386-389
- Neul JL, Kaufmann WE, Glaze DG, Christodoulou J, Clarke AJ, Bahi-Buisson N, Leonard H, Bailey ME, Schanen NC, Zappella M et al. (2010): Rett syndrome: revised diagnostic criteria and nomenclature. *Ann Neurol* 68, 944-950
- Nimchinsky EA, Sabatini BL, Svoboda K (2002): Structure and function of dendritic spines. *Annu Rev Physiol* 64, 313-353
- Paget MS, Buttner MJ (2003): Thiol-based regulatory switches. *Annu Rev Genet* 37, 91-121
- Panighini A, Duranti E, Santini F, Maffei M, Pizzorusso T, Funel N, Taddei S, Bernardini N, Ippolito C, Virdis A et al. (2013): Vascular dysfunction in a mouse model of Rett syndrome and effects of curcumin treatment. *PLoS ONE* 8, e64863
- Paula-Lima AC, Adasme T, Hidalgo C (2014): Contribution of Ca<sup>2+</sup> release channels to hippocampal synaptic plasticity and spatial memory: potential redox modulation. *Antioxid Redox Signal* 21, 892-914
- Pejhan S, Siu VM, Ang LC, Del Bigio MR, Rastegar M (2020): Differential brain region-specific expression of MeCP2 and BDNF in Rett syndrome patients: a distinct grey-white matter variation. *Neuropathol Appl Neurobiol* 46, 735-750

- Petersen Shay K, Moreau RF, Smith EJ, Hagen TM (2008): Is alpha-lipoic acid a scavenger of reactive oxygen species in vivo? Evidence for its initiation of stress signaling pathways that promote endogenous antioxidant capacity. *IUBMB Life* 60, 362-367
- Pitcher MR, Ward CS, Arvide EM, Chapleau CA, Pozzo-Miller L, Hoeflich A, Sivaramakrishnan M, Saenger S, Metzger F, Neul JL (2013): Insulinotropic treatments exacerbate metabolic syndrome in mice lacking MeCP2 function. *Hum Mol Genet* 22, 2626-2633
- Rett A (1966): Über ein eigenartiges hirnatrophisches Syndrom bei Hyperammonämie im Kindesalter. *Wien Med Wochenschr* 116, 723-726
- Rose CR, Konnerth A (2001): Stores not just for storage. intracellular calcium release and synaptic plasticity. *Neuron* 31, 519-522
- Semenza GL, Neufeldt MK, Chi SM, Antonarakis SE (1991): Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 5680-5684
- Shahbazian M, Young J, Yuva-Paylor L, Spencer C, Antalffy B, Noebels J, Armstrong D, Paylor R, Zoghbi H (2002): Mice with truncated MeCP2 recapitulate many Rett syndrome features and display hyperacetylation of histone H3. *Neuron* 35, 243-254
- Shahbazian MD, Antalffy B, Armstrong DL, Zoghbi HY (2002): Insight into Rett syndrome: MeCP2 levels display tissue- and cell-specific differences and correlate with neuronal maturation. *Hum Mol Genet* 11, 115-124
- Shulyakova N, Andrezza AC, Mills LR, Eubanks JH (2017): Mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of Rett syndrome: Implications for mitochondria-targeted therapies. *Front Cell Neurosci* 11, 58
- Sierra C, Vilaseca MA, Brandi N, Artuch R, Mira A, Nieto M, Pineda M (2001): Oxidative stress in Rett syndrome. *Brain Dev* 23 Suppl 1, S236-239
- Signorini C, Leoncini S, De Felice C, Pecorelli A, Meloni I, Ariani F, Mari F, Amabile S, Paccagnini E, Gentile M et al. (2014): Redox imbalance and morphological changes in skin fibroblasts in typical Rett syndrome. *Oxid Med Cell Longev* 2014, 195935
- Thiels E, Urban NN, Gonzalez-Burgos GR, Kanterewicz BI, Barrionuevo G, Chu CT, Oury TD, Klann E (2000): Impairment of long-term potentiation and associative memory in mice that overexpress extracellular superoxide dismutase. *J Neurosci* 20, 7631-7639

- Traber MG, Stevens JF (2011): Vitamins C and E: beneficial effects from a mechanistic perspective. *Free Radic Biol Med* 51, 1000-1013
- Trappe R, Laccone F, Cobilanschi J, Meins M, Huppke P, Hanefeld F, Engel W (2001): MECP2 mutations in sporadic cases of Rett syndrome are almost exclusively of paternal origin. *Am J Hum Genet* 68, 1093-1101
- Valenti D, de Bari L, Vigli D, Lacivita E, Leopoldo M, Laviola G, Vacca RA, De Filippis B (2017): Stimulation of the brain serotonin receptor 7 rescues mitochondrial dysfunction in female mice from two models of Rett syndrome. *Neuropharmacology* 121, 79-88
- Villard L (2007): *MECP2* mutations in males. *J Med Genet* 44, 417-423
- Votyakova TV, Reynolds IJ (2001):  $\Delta\Psi_m$ -Dependent and -independent production of reactive oxygen species by rat brain mitochondria. *J Neurochem* 79, 266-277
- Wan M, Lee SS, Zhang X, Houwink-Manville I, Song HR, Amir RE, Budden S, Naidu S, Pereira JL, Lo IF et al. (1999): Rett syndrome and beyond: recurrent spontaneous and familial *MECP2* mutations at CpG hotspots. *Am J Hum Genet* 65, 1520-1529
- Wang AL, Wang JP, Wang H, Chen YH, Zhao L, Wang LS, Wei W, Xu DX (2006): A dual effect of N-acetylcysteine on acute ethanol-induced liver damage in mice. *Hepato Res* 34, 199-206
- Weaving LS, Ellaway CJ, Gecz J, Christodoulou J (2005): Rett syndrome: clinical review and genetic update. *J Med Genet* 42, 1-7
- Weerapana E, Wang C, Simon GM, Richter F, Khare S, Dillon MB, Bachovchin DA, Mowen K, Baker D, Cravatt BF (2010): Quantitative reactivity profiling predicts functional cysteines in proteomes. *Nature* 468, 790-795
- Wegener E, Brendel C, Fischer A, Hülsmann S, Gärtner J, Huppke P (2014): Characterization of the MeCP2<sup>R168X</sup> knockin mouse model for Rett syndrome. *PLoS ONE* 9, e115444
- Zucker RS (1989): Short-term synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci* 12, 13-31
- Zucker RS, Regehr WG (2002): Short-term synaptic plasticity. *Annu Rev Physiol* 64, 355-405

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. rer. nat. M. Müller im Institut für Neuro- und Sinnesphysiologie der Universität Göttingen bedanken, die mir im Rahmen dieser Arbeit durch die große Unterstützung und Hilfsbereitschaft bei Labor- und Computerarbeiten sowie durch das gute zwischenmenschliche Miteinander einen besonderen Zugang zur Wissenschaft gewährten.

Mein besonderer Dank gilt hierbei meinem Doktorvater Prof. Dr. Michael Müller, der mich vom ersten Tag an mit Rat und Tat unterstützte. Danke für die Überlassung des interessanten Themas, die Möglichkeit der experimentellen Durchführung meiner Arbeit und vor allem für die großartige Betreuung. Nur durch seine vielfältige theoretische und praktische Unterstützung wurde diese Arbeit erst ermöglicht. Danke für das entgegengebrachte Vertrauen sowie die stetige Hilfsbereitschaft und Expertise.

Weiterhin gebührt ein herzlicher Dank Belinda Kempkes, die mir jederzeit mit Geduld und Selbstverständlichkeit verlässlich zur Seite stand. Danke für die Hilfsbereitschaft, das Verständnis und die wundervolle freundliche Zusammenarbeit.

Lieben Dank auch an Pascal, meine Familie und Freunde, die mich jederzeit unterstützen und allzeit seelischen und moralischen Beistand leisten.