

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

**Charakterisierung eines transgenen Mausmodells mit
spezifischer zytosolischer Expression des optischen
Redox-Indikators roGFP1 in Neuronen**

INAUGURAL – DISSERTATION

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

vorgelegt von

Benedikt Kolbrink

aus

Bückeberg

Göttingen 2015

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer

I. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. M. Müller

II. Berichterstatter/in: Prof. Dr. med. J. Staiger

III. Berichterstatter/in: Prof. Dr. med. M. Oppermann

Tag der mündlichen Prüfung: 22.09.2015

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	5
1.1 Die zelluläre Redoxbalance.....	5
1.2 Reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies und ihre Wirkung	7
1.3 Optische Redox-Indikatoren und ihre Eigenschaften	12
1.4 Generierung transgener Redox-Indikator-Mäuse	16
1.5 Ziele der Arbeit	17
2 Material und Methoden	19
2.1 Bewertung von Motorik, Wachstum und Verhalten.....	19
2.1.1 Rota-Rod®.....	19
2.1.2 Open-Field.....	20
2.1.3 Gewicht und Größe.....	22
2.2 Herstellung der Hirnschnitte und Blutanalysen.....	22
2.2.1 Präparation der akuten Hirnschnitte	22
2.2.2 Herstellung der fixierten Hirnschnitte und Immunhistochemie	23
2.2.3 Blutanalysen	24
2.3 Optische Verfahren zur Analyse des Expressionsmusters und funktionellen Antwortverhaltens	24
2.3.1 Ratiometrische Messungen an akuten Hirnschnitten.....	25
2.3.2 Fluoreszenzmikroskopie der fixierten Hirnschnitte.....	28
2.3.3 Zwei-Photonen-Laser-Scanning-Mikroskopie	29
2.4 Chemikalien und Zusammensetzung der Lösungen	32
2.5 Statistik.....	34
3 Ergebnisse.....	36
3.1 Bewertung des Allgemeinzustandes der Mäuse.....	36
3.2 Motorische Koordination und Umweltexploration	40
3.3 Charakterisierung des roGFP1-Expressionsmusters	44
3.4 Prüfung der Redox-Sensitivität des exprimierten roGFP1	56
3.4.1 Kalibrierung des roGFP1-Antwortbereichs	56
3.4.2 Bestimmung der relativen Baseline-Oxidation	62
3.4.3 Veränderung der endogenen ROS-Produktion durch Anoxie	64
4 Diskussion	65
5 Zusammenfassung und Ausblick	76

6 Anhang.....	78
6.1 Abkürzungsverzeichnis.....	78
6.2 Tabellenverzeichnis	80
6.3 Abbildungsverzeichnis	80
7 Literaturverzeichnis.....	82

1 Einleitung

1.1 Die zelluläre Redoxbalance

Oxidations- und Reduktionsprozesse finden als Grundlage des Lebens in jeder Zelle statt. Dabei stehen Oxidation und Reduktion in einem Gleichgewicht, dessen Aufrechterhaltung in engen Grenzen eine fundamentale Voraussetzung für die fehlerfreie Funktion des zellulären Stoffwechsels bildet. In der Aufrechterhaltung dieses Gleichgewichts spielen oxidierende und reduzierende Einflüsse eine Rolle, die von der gesunden Zelle fein reguliert werden müssen, damit sie auf Dauer überleben und ihrer Aufgabe in einem größeren Organismus nachkommen kann.

Zunächst soll festgehalten werden, dass der Begriff „zelluläre Redoxbalance“ eine grobe Verallgemeinerung der tatsächlichen Zustände ist, die den Anschein erweckt, es gebe etwas wie einen globalen Redoxstatus, der in allen Zellen herrscht. Tatsächlich ist es aber so, dass es eine nahezu unüberblickbare Anzahl von Redox-Puffermolekülen gibt, die alle auch bei ähnlichen Redoxpotentialen verschiedener Redox-Paare in stark unterschiedlichen Verhältnissen von reduzierten zu oxidierten Molekülen vorliegen können. Zudem herrschen in unterschiedlichen Zellkompartimenten auch teilweise stark variierende Redox-Milieus. Der Übersichtlichkeit halber soll hier aber trotzdem der Begriff „zelluläre Redox-Balance“ verwendet werden, um eine allgemeine Einführung in dieses hochkomplexe Thema zu geben.

Um diese „Redox-Balance“ aufrechtzuerhalten, produziert die Zelle eine ganze Batterie von reduzierenden Enzymen und niedermolekularen Verbindungen, die als Redox-Puffer die schädigenden Einflüsse oxidierender Substanzen abzufangen vermögen.

Zu den nicht-enzymatischen Antioxidantien der Zelle gehören als wichtigste Vertreter das Glutathion, Ascorbat, daneben die Flavonoide, Alkaloide und Derivate des Vitamin E, die vor allem Lipide vor Oxidation schützen sollen (Apel und Hirt 2004). Das Glutathion (GSH) ist ein Tripeptid aus den Aminosäuren Glutaminsäure, Cystein und Glycin, wobei die Glutaminsäure im Glutathion mit dem Cystein über

die γ -Carboxylgruppe verknüpft ist und man daher auch von einem atypischen Tripeptid spricht. Oxidierende Substanzen können durch zwei Moleküle Glutathion unschädlich gemacht werden, indem die Thiol-Gruppen der Cysteinreste der Moleküle zu einer Disulfidbrücke oxidiert werden und dabei das zu entgiftende Oxidanz reduzieren. In dieser Reaktion, die im Fall der Entgiftung von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) durch das Enzym Glutathion-Peroxidase katalysiert wird, entsteht aus den beiden Molekülen GSH ein durch eine Disulfidbrücke verbundenes Molekül Glutathion-Disulfid (GSSG). Aus diesem werden im Anschluss durch die Glutathion-Reduktase unter Oxidation eines Moleküls NADPH wieder zwei Moleküle GSH regeneriert. Auch die anderen nicht-enzymatischen Antioxidantien funktionieren nach einem ähnlichen Prinzip: Sie werden bei der Entgiftung oxidativer Substanzen selbst oxidiert und anschließend unter Energieverbrauch regeneriert oder ausgeschieden und neu synthetisiert. Eine weitere wichtige Funktion des Glutathions ist neben seiner Aufgabe als Oxidantienfänger die Reduktion von Disulfidbrücken in Proteinen, die zufällig oder gezielt in bestimmten zellulären Signalwegen oxidiert wurden, um so die Funktionsfähigkeit der Proteine wieder herzustellen (Finkel 2011).

Neben diesen kleinen antioxidativen Molekülen gibt es eine Vielzahl von Enzymen, die an der Aufrechterhaltung des zellulären Redox-Gleichgewichts beteiligt sind. Dazu gehören die Thioredoxine, Glutaredoxine, die Superoxiddismutase, Katalase und einige weitere. Thioredoxine sind kleine Proteine, die als Oxidoreduktasen antioxidative Funktion vor allem für Disulfidbrücken in Proteinen haben. Die Thiol-Gruppen der Thioredoxine werden dabei zu Disulfidbrücken oxidiert und können durch Thioredoxinreduktasen unter Verbrauch von NADPH wieder reduziert werden. Glutaredoxine sind ebenfalls kleine Proteine, die als Oxidoreduktasen wirken und dabei Glutathion als Kofaktor verwenden (Björnberg et al. 2006).

Das Enzym Superoxiddismutase, das in nahezu allen Geweben intra- und auch extrazellulär in verschiedenen Isotypen, die sich im Aufbau des Proteins und den reaktiven Ionen in ihren aktiven Zentren unterscheiden, zu finden ist, spielt eine wichtige Rolle in der Überführung der sehr reaktiven, aber kurzlebigen Superoxid-Anionen ($\bullet\text{O}_2^-$) in das weniger reaktive, aber diffundible und langlebigere Wasserstoffperoxid (H_2O_2). Dieses Wasserstoffperoxid wird dann im Anschluss durch das Enzym Katalase in Sauerstoff (O_2) und Wasser (H_2O) umgewandelt und

unschädlich gemacht. Ebenso können diese reaktiven Sauerstoffspezies aber auch durch die „kleinen“ Antioxidantien wie Glutathion und Ascorbat entgiftet werden (Milton und Sweeney 2011).

1.2 Reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies und ihre Wirkung

Der oxidative Einfluss auf das zelluläre Redox-Gleichgewicht erfolgt durch sogenannte reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species, ROS*) und Stickstoffspezies (*reactive nitrogen species, RNS*), die entweder durch die Ernährung und Auseinandersetzung mit der Umwelt (exogen) in den Organismus gelangen oder im Organismus selbst (endogen) entstehen können.

Unter physiologischen Bedingungen entstehen durch den aeroben Metabolismus von Zellen ständig ROS, das heißt, es entstehen auf der Basis von molekularem Sauerstoff (O_2), der selbst noch relativ reaktionsträge ist, Verbindungen, die in der Lage sind, Proteine, Lipide und Desoxyribonukleinsäuren (*desoxyribonucleic acid, DNA*) zu oxidieren und damit erheblichen Schaden in den Zellen zu verursachen. Bei der Entstehung dieser endogenen ROS wird zuerst ein Elektron auf ein Sauerstoffmolekül (O_2) übertragen, sodass daraus ein reaktives Superoxid-Anion ($\bullet O_2^-$) entsteht (Abb. 1). Diese Reaktion geschieht zum größten Teil in den Mitochondrien an Komplex I und Komplex III der Atmungskette (Murphy 2009), allerdings ist auch eine Entstehung von ROS in den Peroxisomen, an den Cytochrom-P450-Oxidasen des endoplasmatischen Retikulums und an membranständigen und freien Oxidasen beschrieben, obwohl diese wohl nur einen geringeren Teil ausmacht (Rahman et al. 2012).

Das Superoxid-Anion ist sehr instabil und reagiert mit 2 Protonen (H^+) zu Wasserstoffperoxid, das nur ein vergleichsweise schwaches Oxidanz darstellt. Allerdings kann dieses Wasserstoffperoxid mit einem weiteren Superoxid-Anion in Gegenwart von Übergangsmetallen, die in Form von Kupfer- und Eisenionen in den Proteinen, an denen auch die reaktiven Sauerstoffspezies entstehen, reichlich vorhanden sind, zu Hydroxid-Anionen (OH^-) und Hydroxyl-Radikalen ($\bullet OH$)

reagieren, diese Reaktion wird auch als Fenton-Reaktion bezeichnet (Babior 1984, Milton und Sweeney 2011). Das Hydroxyl-Radikal stellt das stärkste bekannte biogene Oxidanz dar, seine Entstehung soll aber durch die hohe Aktivität der Superoxiddismutase, die den größten Teil der entstehenden Superoxid-Anionen abfängt, bevor sie zu Hydroxyl-Radikalen reagieren können, verhindert werden (Rahman et al. 2012).

Neben den ROS können durch die Reaktion von Stickstoffmonoxid ($\text{NO}\cdot$), das in vielen Geweben von konstitutiv exprimierten oder induzierbaren NO-Synthasen aus der Aminosäure Arginin gebildet wird, mit molekularem Sauerstoff oder Superoxid-Anionen auch RNS entstehen. Das reaktivste dabei entstehende Produkt ist das Peroxynitrit-Anion (ONOO^-), dem eine starke zellschädigende Wirkung zugeschrieben wird (van der Vliet et al. 1997).

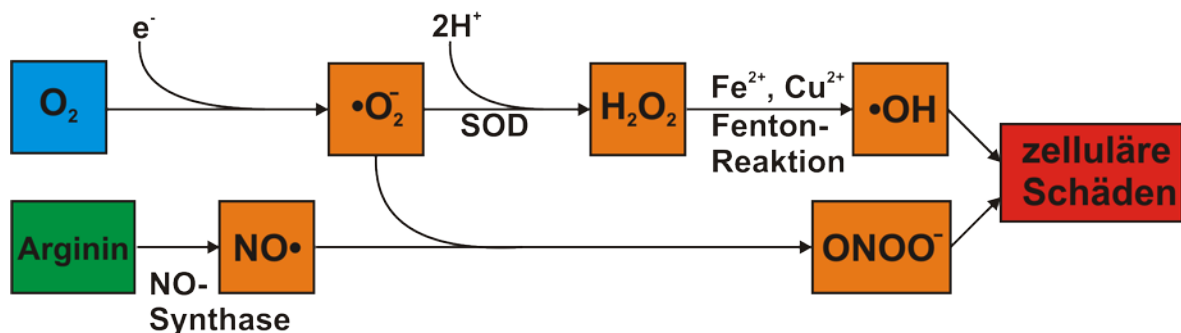


Abb. 1: Schema zur Entstehung der wichtigsten ROS und RNS

Wird auf elementarem Sauerstoff ein Elektron durch die Atmungskette oder extramitochondriale Oxidoreduktasen übertragen, entsteht das Superoxid-Anion, das dann weiter über Wasserstoffperoxid zum Hydroxyl-Radikal oder mit dem aus der Aminosäure Arginin durch die Stickstoffmonoxid-Synthase produzierten Stickstoffmonoxid zu Peroxynitrit reagieren kann. Das Hydroxyl-Radikal und das Peroxynitrit-Anion sind potente Verursacher oxidativer Schädigungen von Proteinen, Lipiden und der DNA der Zelle.

Diese hochreaktiven Verbindungen erzeugen durch Reaktionen miteinander und mit anderen Verbindungen eine Vielzahl reaktiver Moleküle. Die nachfolgende Tabelle stellt eine Auswahl der bekannten reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies dar:

Summenformel	Name
$\bullet\text{O}_2^-$	Superoxid-Anion
H_2O_2	Wasserstoffperoxid
$\bullet\text{OH}$	Hydroxyl-Radikal
ROOH	Hydroperoxyl-Rest
HClO	Hypochlorige Säure
$\text{NO}\bullet$	Stickstoffmonoxid
ONOO^-	Peroxynitrit-Anion
NO_2	Stickstoffdioxid
HNO_2	Salpetrige Säure

Tabelle 1: Auswahl einiger reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffspezies

Die ROS/RNS sind in der Lage, erhebliche Schäden zu verursachen, wenn sie in zu hoher Konzentration anfallen oder nicht von den antioxidativen Schutzmechanismen der Zelle aufgehalten werden. Das Ausmaß der verursachten zellulären Schädigung kann vielfältig sein.

Proteine können vor allem bei der Reaktion mit Hydroxyl-Radikalen fragmentiert und damit zerstört werden. Außerdem kann die Proteinstruktur und -funktion durch die Oxidation von Aminosäureseitenketten verändert werden, indem sich beispielsweise Disulfidbrücken zwischen Cysteinresten oder Dityrosin-Verbindungen zwischen Tyrosinresten ausbilden oder andere Seitenketten oxidativ verändert oder durch Peroxynitrit nitriert werden (Berlett und Stadtman 1997).

ROS können auch zur Zersetzung von Lipiden führen, indem sie mit den Methylengruppen von ein- oder mehrfach ungesättigten Fettsäuren reagieren, dieser Prozess wird als Lipidperoxidation bezeichnet. Bei diesen Reaktionen entstehen zunächst Lipidperoxyradikale, die dann über Lipidperoxide zu einer mannigfaltigen Sammlung von Epoxiden, Hydroperoxiden und am Ende zu Verbindungen wie beispielsweise Malondialdehyd reagieren, für das auch eine Genotoxizität beschrieben wurde (Marnett 1999).

Auch DNA wird durch ROS/RNS geschädigt. Wasserstoffperoxid und andere oxidierende Agentia können DNA-Strangbrüche verursachen, sind direkt mutagen, verursachen chromosomale Veränderungen oder können xenobiotische Karzinogene (körperfremde Substanzen, die Krebs hervorrufen können) aktivieren und führen damit zum Zelltod oder zur malignen Transformation von Zellen und damit zu Krebs (Weitzman und Gordon 1990). Ebenso ist beschrieben worden, dass oxidative Alterationen in DNA-Basen zu einer Veränderung des DNA-Methylierungsmusters führen, damit die Genexpression stören und so zur Tumorentstehung beitragen können (Weitzman et al. 1994). Oxidativer Stress wird zudem seit mehr als einem halben Jahrhundert als Hauptgrund für das Fortschreiten des Alterungsprozesses betrachtet (Balaban et al. 2005, Beal 2005).

Lange Zeit schien es so, dass diese ROS und RNS nur ein Abfallprodukt des Stoffwechsels sind und ein rein zerstörerisches Potential besitzen, durch neuere Studien gab es allerdings Belege für physiologische Wirkungen reaktiver Sauerstoffspezies.

Eine wichtige Rolle spielen ROS in der Abwehr von Mikroorganismen durch die phagozytischen Zellen (Neutrophile, Eosinophile und Makrophagen) des Immunsystems. Obwohl der „Respiratory Burst“ von Phagozyten schon 1933 entdeckt worden war (Baldrige und Gerard 1933), dauerte es einige Jahrzehnte, bis klar wurde, dass der erhöhte Sauerstoffverbrauch nicht der Energiegewinnung, sondern der Produktion von ROS diene, die für die Zerstörung und anschließende Phagozytose von Bakterien unabdingbar wichtig sind (Sbarra und Karnovsky 1959, Iyer et al. 1961, Babior 1984).

Es sind außerdem Protein-Tyrosin-Phosphatasen beschrieben worden, deren Aktivität durch Wasserstoffperoxid beeinflusst werden kann, indem die Thiolgruppen (R-SH) von Cysteinresten im aktiven Zentrum der Enzyme reversibel zu Sulfensäureresten (R-SOH) oxidiert werden. Die so modifizierten Enzyme sind dann nicht mehr in der Lage, Proteine zu dephosphorylieren (Lee et al. 1998, Salmeen et al. 2003).

ROS spielen ebenfalls eine kritische Rolle in der Apoptose. Das mitochondriale Enzym $p66^{\text{Shc}}$ produziert unter Einwirkung proapoptotischer Signale Wasserstoffperoxid und erhöht dadurch die Membranpermeabilität von Mitochondrien, um so den programmierten Zelltod einzuleiten (Giorgio et al. 2005). Zusätzlich dazu sind wichtige Funktionen von ROS in der Entwicklung von Synapsen und der synaptischen Plastizität (Milton und Sweeney 2011), der Einleitung von Entzündungsprozessen, der Regulation der Gentranskription und diversen anderen intrazellulären Signalwegen mit Wirkung auf Proliferation und Differenzierung (Dooley et al. 2004) beschrieben.

Auch in vielen pathologischen Prozessen und diversen Krankheitsbildern ist ein erhöhtes Auftreten von oxidativem Stress bekannt. In einem Mausmodell des Rett-Syndroms wurde eine erhöhte ROS-Produktion beschrieben (Großer et al. 2012), ebenso in neurodegenerativen Erkrankungen wie der Alzheimerschen und Parkinsonschen Krankheit und amyotropher Lateralsklerose (Barnham et al. 2004), Atherosklerose, der koronaren Herzkrankheit, verschiedenen Erkrankungen der Niere, der Leber, des Pankreas, des Auges und des Bewegungsapparates (Rahman et al. 2012).

Trotz des enormen Erkenntnisgewinns der letzten Jahre auf dem Gebiet der ROS, ihrer Entstehung und Wirkung, sind noch viele Fragen ungeklärt. Darüber, wie die ROS in ihrer Signalwirkung irgendeine Spezifität in der Veränderung bestimmter Zielmoleküle erreichen, können bis jetzt nur Vermutungen angestellt werden, genauso ist unbekannt, ob die erhöhte Konzentration von ROS in den Erkrankungen eine Ursache oder Auswirkung ebenjener ist und hier eventuelle therapeutische Ansätze gefunden werden können.

1.3 Optische Redox-Indikatoren und ihre Eigenschaften

Die Quantifizierung verschiedener Redox-Systeme wurde auf vielfältige Arten und Weisen versucht. Es gibt Methoden zur Bestimmung von Molekülen wie Glutathion, Ascorbat oder Thioredoxinen durch diverse enzymatische Assays, Hochleistungsflüssigkeitschromatographie oder Auftrennung in Gelen. Vorteile dieser Methoden sind die zweifelsfreie Identifizierung der jeweiligen Redoxpaare, die Möglichkeit der genauen Bestimmung von reduziertem zu oxidiertem Anteil der Moleküle und des Redoxpotentials. Allerdings werden bei diesen Vorgehensweisen die zu untersuchenden Zellen zerstört, weswegen keine dynamischen Messungen möglich sind, Oxidationsartefakte auftreten und keinerlei Aussagen über eine Kompartimentspezifität getroffen werden können, da der gesamte Zellinhalt gemischt wird (Meyer und Dick 2010). Daher sind die Methoden für die heutigen Fragestellungen, die vor allem Messungen an lebenden Zellen, Geweben oder sogar ganzen Organismen erfordern, die am besten in Echtzeit und mit guter Kompartimentspezifität erfolgen sollten, nicht mehr geeignet.

Um auch lebende Zellen zu untersuchen, stehen optische Redox-Indikatoren zur Verfügung, darunter fluoreszente Farbstoffe. Über Jahre war der Farbstoff Dichlorodihydrofluorescein, der Wasserstoffperoxid detektieren soll (LeBel et al. 1992), der am häufigsten genutzt. Neben diesem und seinen Derivaten gibt es eine ganze Palette weiterer Farbstoffe, die als optische Redox-Indikatoren verwendet wurden und werden. Auch diese Art der ROS-Bestimmung ist aber mit einigen Problemen behaftet: So sind die Farbstoffe entweder nicht spezifisch genug für bestimmte ROS, werden schon in Anwesenheit von molekularem Sauerstoff oder durch die Belichtung bei den Messungen allein oxidiert oder diffundieren aus den Zellen. Mit diesen Farbstoffen sind ebenfalls keine dynamischen Echtzeitmessungen möglich, da ihre Oxidation unter physiologischen Bedingungen zumeist nicht reversibel ist (Foster et al. 2006).

Die neuesten und aktuell vielversprechendsten optischen Redox-Indikatoren sind Proteine, die auf Grundlage des *green fluorescent protein (wildtype-GFP, wtGFP)* hergestellt wurden. Das wtGFP ist ein 27 kDa schweres, aus einer einzigen Aminosäurekette bestehendes Protein (Prasher et al. 1992), das 1962 von

Shimomura und Kollegen aus der Qualle *Aequorea victoria* isoliert wurde (Shimomura et al. 1962). Sein Name stammt daher, dass es unter Belichtung mit langwelligem UV- oder blauem Licht im grünen Spektralbereich Licht emittiert. Das Protein hat Absorptionsmaxima für die Fluoreszenzexcitation bei 395 nm und 475 nm und ein einzelnes Emissionsmaximum bei 509 nm, diese Eigenschaften werden durch die besondere Beschaffenheit seines Chromophors hervorgerufen (Abb. 2). Durch Veränderung der Aminosäuresequenz des wtGFP wurden verschiedene andere fluoreszierende Proteine geschaffen, so zum Beispiel das *enhanced GFP* (EGFP; Mutation S65T) mit einer deutlich stärkeren, aber pH-abhängigen Fluoreszenzemission (Heim et al. 1995), oder das *yellow fluorescent protein* (YFP, Mutation S65T/T203Y), das ein einzelnes Anregungsmaximum bei 513 nm und sein Emissionsmaximum bei 527 nm hat (Wachter et al. 1998).

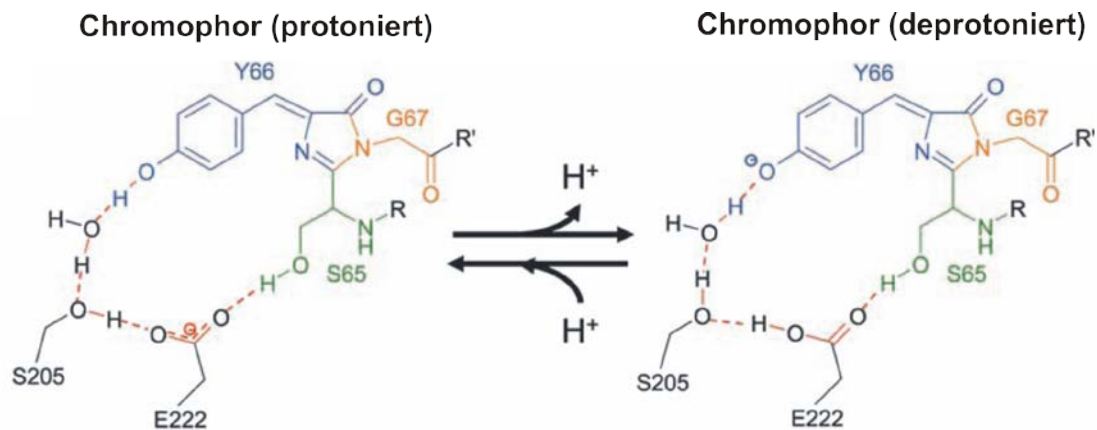


Abb. 2: Chromophor des wtGFP aus der Qualle *Aequorea victoria*

Der Chromophor des wtGFP besteht aus den drei Aminosäuren S65 (grün), Y66 (blau) und G67 (gelb). Das Absorptionsmaximum des Proteins hängt vom Protonierungszustand der phenolischen Hydroxylgruppe des Tyrosins an Position 66 ab. Wird diese Hydroxylgruppe deprotoniert, wird gleichzeitig die Glutaminsäure an Position 222 protoniert. In der neutralen, protonierten Form des Chromophors liegt das Absorptionsmaximum bei 395 nm, in der anionischen, deprotonierten Form bei 475 nm (Abbildung modifiziert nach Meyer und Dick 2010).

Um auf dieser Grundlage einen optischen Redox-Indikator zu erschaffen, wurde versucht, zwei Cysteine in die Aminosäurekette einzufügen, die bei Oxidation eine intramolekulare Disulfidbrücke ausbilden sollten, um so die Tertiärstruktur des Proteins und damit die Fluoreszenzemission zu verändern. Den ersten Versuch unternahmen hier Ostergaard und Kollegen, die auf Grundlage von YFP das *redoxsensitive YFP* (rxYFP) erschufen, das bei Oxidation der Cysteinreste und Ausbildung einer intramolekularen Disulfidbrücke die Intensität seiner Fluoreszenz

um den Faktor 2 verringert (Ostergaard et al. 2001). Da das rxYFP genau wie das YFP allerdings nur ein einziges Anregungsmaximum für die Fluoreszenzemission hat, sind mit diesem rxYFP keine ratiometrischen Messungen möglich, zudem ist unklar, ob das rxYFP genau wie das YFP empfindlich auf Chlorid-Anionen reagiert (Wachter et al. 2000).

Um auch ratiometrische Messungen zu ermöglichen und damit Probleme wie schwankende Farbstoffkonzentrationen, Bleichung der Fluoreszenz durch Belichtung und unterschiedliche Zelldurchmesser in den Versuchen zu reduzieren, haben Hanson und Kollegen *redoxsensitive GFPs* (roGFPs) auf der Basis des ursprünglichen wtGFPs aus *Aequorea victoria* und einiger Derivate erschaffen (Hanson et al. 2004). Dazu führten sie zunächst die Mutation C48S in die Ausgangsproteine ein, um mögliche unerwünschte Ausbildungen von Disulfidbrücken zu verhindern, und ersetzten dann die Aminosäuren S147 und Q204 durch Cystein. Auf der Grundlage von wtGFP entstand so das roGFP1 und auf der Grundlage des EGFP das roGFP2, die sich in ihren Eigenschaften im Grunde sehr ähnlich sind. Die Fluoreszenz des roGFP2 ist allerdings aufgrund der S65T-Mutation pH-abhängig, sodass es bei niedrigen pH-Werten nur sehr schwach fluoresziert (Dooley et al. 2004, Hanson et al. 2004).

Das roGFP1 hat als optischer Redox-Indikator zwei diskrete Anregungsmaxima seiner Fluoreszenz bei 395 nm und 470 nm. Es emittiert Licht bei einem Emissionmaximum um 510 nm (Hanson et al. 2004, Meyer und Dick 2010). Die zwei Anregungsmaxima sind durch die unterschiedlichen möglichen Protonierungszustände des Chromophors von roGFP1 bedingt, der mit dem Chromophor von wtGFP identisch ist. Das ratiometrische Verhalten der Fluoreszenzemission kommt durch die beiden eingefügten Cysteinreste zustande, denn wenn die Thiolgruppen dieser beiden Aminosäurereste bei Oxidation eine Disulfidbrücke ausbilden und damit die Tertiärstruktur des Proteins verändern, wird der Chromophor in seiner protonierten Form stabilisiert und das Gleichgewicht zwischen protonierter und deprotonierter Form zugunsten der protonierten Form verschoben. Da das Anregungsmaximum des protonierten Chromophors bei 395 nm liegt, steigt dementsprechend die Absorption des Proteins bei 395 nm und sinkt bei 470 nm, wenn die Cysteinreste oxidiert werden. Umgekehrtes ist der Fall bei der Reduktion der Disulfidbrücke, hier erhöht sich dann die Absorption bei

470 nm und sie sinkt bei 395 nm (Dooley et al. 2004, Hanson et al. 2004).

Aus dem Quotienten der Fluoreszenzemission von roGFP1 bei Anregung mit Licht der Wellenlängen 395 nm und 470 nm können die roGFP1-Fluoreszenz-Ratio (F395 nm/F470 nm) berechnet und so mit geringer Störanfälligkeit quantitative Aussagen über den Redox-Zustand des jeweiligen Kompartiments der Zelle getroffen werden, in dem das roGFP vorhanden ist. Bei einer Oxidation des Proteins steigt F395 nm/F470 nm, bei Reduktion ist es der umgekehrte Fall. Diese Analysen sind in Echtzeit in lebenden Zellen und Geweben mit hoher zeitlicher und räumlicher Auflösung möglich (Dooley et al. 2004, Hanson et al. 2004, Björnberg et al. 2006). Da roGFP1 ein Redoxpotential von ungefähr -270 mV besitzt, ist es vor allem für reduzierende Zellkompartimente wie das Zytosol oder die mitochondriale Matrix geeignet, weil es hier ein gutes ratiometrisches Verhalten zeigt. In oxidierenden Kompartimenten wie dem endoplasmatischen Retikulum läge es unabhängig von Veränderungen des Redox-Status in physiologischen Ausmaßen vollständig oxidiert vor und ist daher für Aussagen über Veränderungen des Redox-Status ungeeignet (Meyer und Dick 2010).

Es konnte gezeigt werden, dass der Redox-Zustand von roGFP vor allem vom zellulären Glutathion-Pool abhängt und das Angleichen des Redox-Gleichgewichts von roGFP und Glutathion durch die Glutaredoxine katalysiert wird, roGFP *in vitro* nicht aber auf andere redox-aktive Substanzen wie NADPH, Ascorbat, die Protein-Disulfid-Isomerasen oder Thioredoxine reagiert (Meyer et al. 2007, Gutscher et al. 2008, Meyer und Dick 2010). Da die Fluoreszenzemission von roGFP1 von intrazellulärem Chlorid und dem pH-Wert in physiologischen Schwankungsbereichen nur vernachlässigbar gering beeinflusst wird (Funke et al. 2011), scheint es zur Anwendung in lebenden Zellen besonders geeignet.

1.4 Generierung transgener Redox-Indikator-Mäuse

Zuvor sind bereits transgene Mauslinien mit dem Redox-Indikator roGFP zu verschiedenen Zwecken generiert worden. Guzman und Kollegen berichteten 2010 von einer Mauslinie mit mitochondrialer Expression von roGFP in dopaminergen Neuronen der Substantia Nigra, mit der sie die Entstehung von oxidativem Stress bei Schrittmacherpotentialen in diesen Neuronen beobachten konnten (Guzman et al. 2010). Wolf und Kollegen haben mit ihrer Veröffentlichung aus dem Jahre 2014 gezeigt, dass sie oxidativen Stress in epidermalen Keratinozyten in lebenden Mäusen mit einer transgenen Expression von roGFP1 unter der Kontrolle des Promotors von Elongationsfaktor 1- α sichtbar machen konnten (Wolf et al. 2014).

Die in dieser Arbeit untersuchte transgene Mauslinie war bereits vor Beginn dieser Arbeit von der Arbeitsgruppe Müller in Kooperation mit dem Labor für transgenen Service des Max-Planck-Instituts für Experimentelle Medizin Göttingen mit dem Verfahren der pränukleären Injektion eines DNA-Konstrukts in eine befruchtete Eizelle einer C57BL/6J-Maus, das zu Beginn der Achtziger Jahre des vergangenen Jahrhunderts zum Beispiel von H.W. Gordon etabliert wurde, generiert worden (Gordon und Ruddle 1981).

Das injizierte Konstrukt enthielt eine kodierende Sequenz für das roGFP1-Protein unter der Kontrolle des murinen Thy1.2-Promotors, wobei dieser Promotor eine spezifische Expression des Transgens im Zytosol von Neuronen sicherstellen sollte (Caroni 1997, Feng et al. 2000), da der empfindliche Stoffwechsel von Neuronen im Mittelpunkt des allgemeinen Forschungsinteresses steht. Mit geringer Wahrscheinlichkeit integrieren eine oder mehrere Kopien des Konstrukts an einer zufälligen Stelle ins Genom der befruchteten Eizelle und die daraus erwachsende Maus trägt das Transgen in jeder ihrer Zellen und gibt es auch an ihre Nachkommen weiter.

Die so injizierten befruchteten Eizellen waren in eine scheinträchtige Amme transferiert und von dieser ausgetragen worden, danach wurden die neugeborenen Mäuse auf das Vorhandensein des Transgens mittels einer Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) überprüft.

Mit einer Maus, die das Konstrukt in ihr Genom integriert hatte, wurde dann eine transgene Zuchtlinie aufgebaut. Die Nachkommen dieser Maus wurden ebenfalls mittels einer PCR auf das Vorhandensein des Transgens überprüft, wobei die PCR an einer Schwanzbiopsie mit einem Standardprotokoll von den technischen Assistenten der Arbeitsgruppe durchgeführt wurde. Die Generierung und Weiterzucht sowie die transkardiale Perfusionsfixierung des Gehirns dieser transgenen Tiere erfolgte im Rahmen des genehmigten Versuchsvorhabens mit dem Aktenzeichen 33.9-42502-04-12/0992. Die Isolation des Hirngewebes (nach vorheriger Dekapitation) zur Durchführung der optischen Messungen an akuten Hirnschnitten erfolgte im Rahmen des angezeigten Projektes „Anoxie und neuronale Netzwerke (T13/08)“.

1.5 Ziele der Arbeit

In vorangegangenen Arbeiten der Arbeitsgruppe Müller konnte gezeigt werden, dass in einem Mausmodell des Rett-Syndroms erhöhte ROS-Produktion in den Mitochondrien erfolgt und dass das Redoxpotential des Zytosols im Vergleich zu nicht erkrankten Tieren weiter zur Oxidation verschoben ist (Großer et al. 2012). Bisher wurden die Versuche an Zell- und Hirnschnittkulturen hippokampaler Neurone durchgeführt, die erst nach einer Transfektion mit einem viralen Vektor roGFP1 exprimierten.

Um auch an akuten Hirnschnitten der Mäuse dynamische Redox-Messungen vornehmen zu können, musste eine transgene Mauslinie generiert werden, die roGFP1 in ihren Neuronen exprimiert. Eine transgene roGFP1-Maus mit neuronenspezifischer Expression des Redox-Indikators könnte zudem für neurophysiologische Grundlagenforschung, die Evaluation der Rolle der Redoxbalance im Alterungsprozess oder die Erforschung anderer, vor allem neuronaler Erkrankungen von großem Interesse sein, da bei Beginn dieses Projektes noch niemand eine derartige transgene Tierlinie mit zytosolischer roGFP1-Expression in zentralen Neuronen veröffentlicht hatte.

Bei der Generierung transgener Tiere mit dem gewählten Verfahren der pränukleären Injektion ist allerdings nicht gewährleistet, dass das Transgen stabil

vererbt wird und nicht eventuell durch eine ungünstige Insertionsstelle im Genom des Tieres zu einer Beeinträchtigung der Maus führen kann (Ohtsuka et al. 2010). Ein in irgendeiner Weise beeinträchtigtes Tier könnten für eine Kreuzung mit Tiermodellen schwerer Krankheiten natürlich nicht verwendet werden, da eine Auswirkung des Transgens auf den Krankheitsverlauf nicht auszuschließen wäre. Aus diesem Grund sollte in dieser Arbeit sichergestellt werden, dass die transgenen Tiere absolut gesund und keine adversen Effekte nachweisbar sind.

Zudem gibt es keine Möglichkeit vorherzusagen, ob und in welchem genauen Muster das Transgen unter der Kontrolle des verwendeten Promotors exprimiert wird (Caroni 1997, Feng et al. 2000). Daher hatte diese Arbeit das Ziel, die Expression des Transgens v.a. in den für Anoxie und Ischämie hochgradig vulnerablen und daher gegenüber Alterationen des Redox-Status besonders empfindlichen Hirnregionen des Hippokampus (Schmidt-Kastner und Freund 1991, Wilde et al. 1997, Wang et al. 2007, Weller et al. 2014) und darüber hinaus auch exemplarisch in anderen Hirnregionen zu kartografieren.

Ferner sollte mit einigen Experimenten eine ausreichende Funktionsfähigkeit des ratiometrischen Redox-Indikators roGFP1 in akuten Hirnschnitten der transgenen Tiere sichergestellt werden. Zudem wurden durch weitere Tests und Analysen und regelmäßige phänotypische Beobachtung der Tiere ihre Entwicklung und ihr Wachstum beurteilt, um negative Effekte der Insertion des Transgens auf die Gesundheit und das Wohlbefinden der Tiere auszuschließen.

Erste Ergebnisse dieser Arbeit wurden bereits auf einem Kongress im Rahmen eines Posterbeitrags veröffentlicht und vorgestellt (Kolbrink et al. 2015).

2 Material und Methoden

Da die transgene roGFP1-Mauslinie mit der offiziellen Bezeichnung C57BL/6-TG(Thy1.2-roGFP1c) noch nie zuvor untersucht oder charakterisiert worden war, sollten an jedem der vorhandenen Tiere möglichst viele Parameter bestimmt, beziehungsweise möglichst viele unterschiedliche Untersuchungen durchgeführt werden, um eine genaue Charakterisierung der Tiere zu gewährleisten. Insgesamt wurden 105 Mäuse im Rahmen der verschiedenen Tests analysiert, davon 37 transgene Tiere und 68 Wildtypen. Die untersuchten Tiere entstammten einer Kreuzung des männlichen transgenen Foundertiers (C57BL/6-TG(Thy1.2-roGFP1c)) mit C57BL/6J-Wildtypweibchen.

2.1 Bewertung von Motorik, Wachstum und Verhalten

In dieser Arbeit sollte der allgemeine phänotypische Zustand der transgenen Tiere bewertet werden. Die zu untersuchenden Tiere durchliefen drei aufeinander folgende Versuchstage auf dem Rota-Rod®, einen Open-Field-Test und wurden gewogen und vermessen. Die Tests wurden jeweils an den männlichen und weiblichen transgenen Nachkommen des Foundertiers (transgene Tiere, TG) durchgeführt. Als Vergleichsgruppen dienten die nicht transgenen Tiere des jeweils gleichen Geschlechts aus den selben Würfen (Wildtyp-Tiere, WT).

2.1.1 Rota-Rod®

Zur Prüfung der motorischen Fähigkeiten der Mäuse mussten sie vom postnatalen Tag 40 bis 42 täglich einmal auf dem Rota-Rod® (Ugo-basile) laufen. Diese Methode war 1957 von N.W. Dunham und T.S. Miya zuerst als „rolling roller apparatus“ zur einfachen Beurteilung neuronaler Schäden in Nagetieren beschrieben worden und wird seitdem als Standard verwendet (Dunham und Miya 1957). Für diesen Test wurden die Mäuse auf eine rotierende Stange gesetzt, die bei einer festgelegten Geschwindigkeit (5 rpm) startet und dann sukzessive bis zu einer Maximalgeschwindigkeit (50 rpm) über fünf Minuten beschleunigte (Abb. 3).

Um nicht herunterzufallen, mussten die Mäuse dabei immer schneller laufen, bis sie nicht mehr in der Lage waren, sich eigenständig auf der Stange zu halten. Gemessen wurde die Zeit vom Starten des Geräts bis zu dem Zeitpunkt, an dem die Maus von der Stange gefallen war oder sich fünf volle Umdrehungen ohne weitere eigene Bewegung festgehalten hatte. Tatsächlich erreichte nur eines der untersuchten Tiere die mögliche Maximalgeschwindigkeit. Es wurde jeweils nur eine Maus zurzeit auf das Rota-Rod® gesetzt, um eine Ablenkung durch weitere Tiere zu vermeiden.

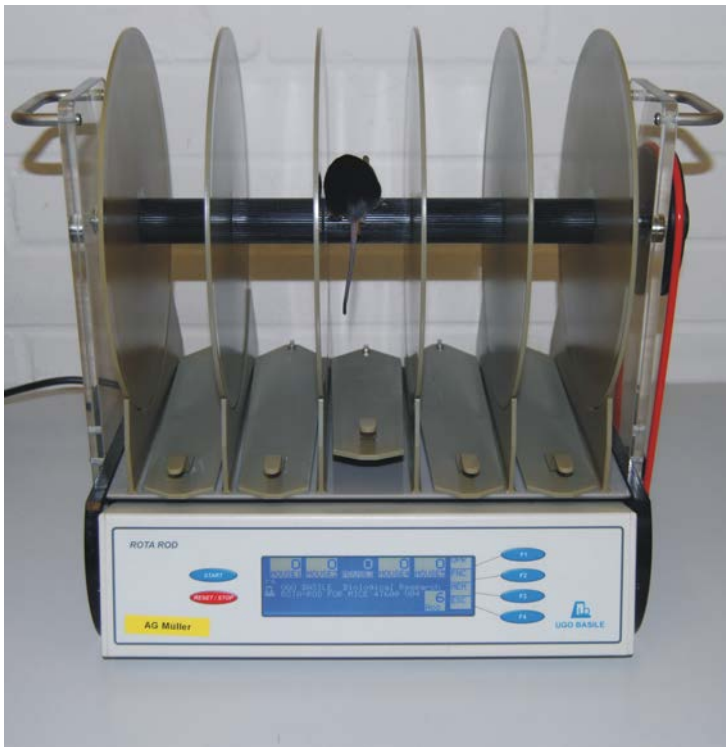


Abb. 3: Eine Maus während des motorischen Verhaltenstests auf dem Rota-Rod®

Wenn das Tier von der rotierenden Stange fiel und damit den Kippschalter unter ihm betätigte, war die Messung für den jeweiligen Tag beendet.

2.1.2 Open-Field

Seit seiner Entwicklung durch Calvin Hall (Hall 1934, Hall 1936) ist der Open-Field-Test in der Verhaltensforschung in allen denkbaren Variationen an diversen Tieren – von Wirbellosen (Kakerlaken (Creed Jr und Miller 1990) und Spinnen (Carducci und Jakob 2000)) über Vögel (Hühner und Wachteln) bis hin zu den Säugetieren (einem großen Teil der bekannten Nagetiere, Katzen, Hunden und sogar menschlichen Kleinkindern) – durchgeführt worden, um die verschiedensten Verhaltensweisen

(z.B. Bewegungs-, Fress-, Putz- und Defäkationsverhalten) zu beurteilen (Walsh und Cummins 1976).

Um das Explorationsverhalten der Mäuse zu quantifizieren, durchliefen alle Tiere vor ihrer Präparation für die Experimente einen Open-Field-Test. Dabei wurde die Maus in einer reizarmen Umgebung in die Mitte eines Testfeldes von 45x45 cm mit schwarzem Boden gesetzt. In diesem Testfeld zeichnete ein Gitter aus 16 Infrarotstrahlen und Detektoren, die auf 2 cm und 6 cm Höhe über dem Boden des Feldes angebracht waren, die Bewegungen der Maus über einen Zeitraum von fünf Minuten auf und analysierte zudem, zu welchem Zeitpunkt sich die Maus an welcher Stelle des Feldes befand (Abb. 4).

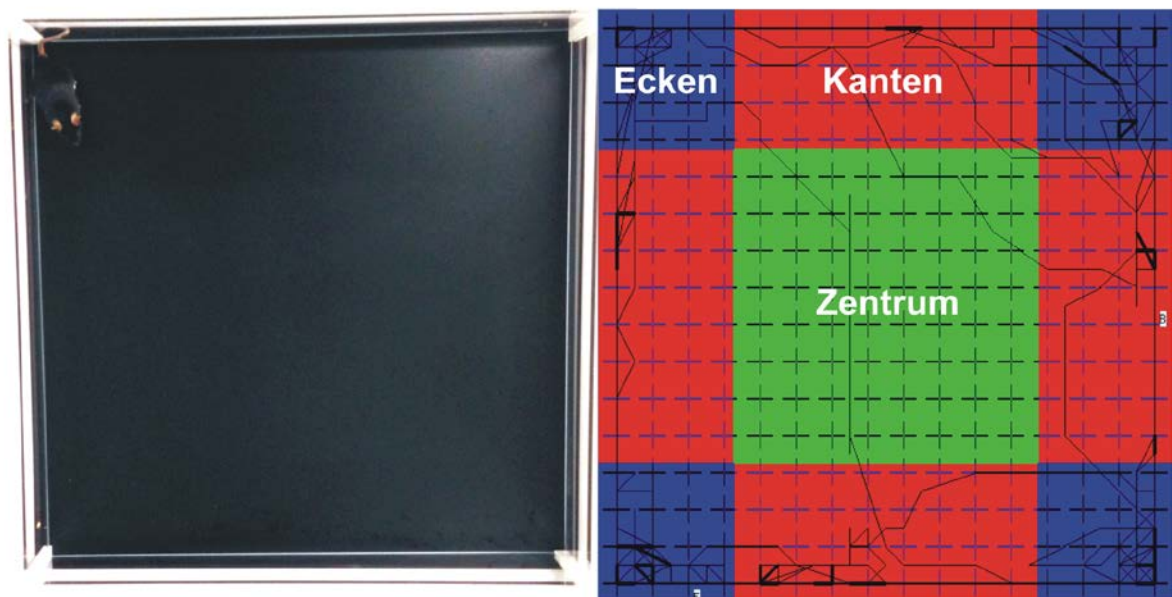


Abb. 4: Open-Field

Auf der linken Seite ist eine Maus im Testareal zu sehen. Das Tier konnte sich während des Verhaltenstests ungestört und frei bewegen. Rechts ist die Zonenaufteilung des Testareals, die für die Auswertung des Experiments vorgenommen wurde, abgebildet. Hierzu wurde die Fläche in die drei Zonen „Ecken“, „Kanten“ und „Zentrum“ gegliedert und die relative Verweildauer der Tiere in den jeweiligen Zonen bestimmt. In schwarzen Linien ist eine beispielhafte Laufspur einer Maus dargestellt.

2.1.3 Gewicht und Größe

Die Mäuse wurden ab der Geburt in regelmäßigen Abständen von drei Tagen in einer Plastikschiene auf einer Laborwaage (Kern®, PCB 1000-2) bis zum 50. Tag gewogen. Die Tiere wurden bei $24\pm 1^\circ\text{C}$ gehalten mit Licht zwischen 07:00 und 19:00 Uhr, sie hatten freien Zugang zu Wasser und Futter (Haltungsfutter für Ratten und Mäuse mit 19% Rohprotein, ssniff Spezialdiäten GmbH). Vor der Dekapitation wurde in tiefer Ethernarkose die Körperlänge der Mäuse gemessen, wobei die Strecke von der Nase bis zum Schwanzansatz durch Anlegen eines Lineals bestimmt wurde.

2.2 Herstellung der Hirnschnitte und Blutanalysen

Für diese Arbeit wurden akute und fixierte Hirnschnitte der Mäuse hergestellt und die fixierten Hirnschnitte immunhistochemisch gefärbt. Zusätzlich wurden aus dem bei der Dekapitation anfallenden Blut der Hämatokrit und der Blutglukosespiegel der Tiere bestimmt.

2.2.1 Präparation der akuten Hirnschnitte

Für die Präparation der Hirnschnitte wurden zunächst 200 ml artifizielle cerebrospinale Flüssigkeit (ACSF) auf Eis gekühlt und für 15 Minuten mit Carbogen (Gasgemisch aus 95% O_2 und 5% CO_2) begast. Die exakte Zusammensetzung der bei allen Methoden verwendeten Lösungen ist in Kapitel 2.4 einzusehen. Sodann wurde die Maus in einem Exsikkator mit einem ethergetränkten Papiertuch in eine tiefe Ethernarkose versetzt und anschließend mit einer großen Schere dekapitiert. Die Kalotte der Maus wurde von kaudal mediansagittal mit einer kleinen Schere zügig bis zum Beginn des Gesichtsschädels durchtrennt, mit einer Pinzette aufgebrochen und das Gehirn vorsichtig mit einem kleinen Spatel an den Riechkolben aus dem Schädel gelöst. Daraufhin wurde das Gehirn mit einem Löffel für zwei bis drei Minuten in eiskalte ACSF gelegt, um durch Herunterkühlen des Gewebes ischämische Schäden im weiteren Verlauf der Präparation zu minimieren.

Nachdem das Gewebe abgekühlt war, wurde mit einem Skalpell das Kleinhirn abgetrennt, die Schnittfläche vorsichtig mit einem Papiertuch getrocknet, das Gehirn mit der Schnittfläche nach unten mit Sekundenkleber (Roti®Coll1, Roth) auf einen kalten Kunststoffblock geklebt und in einer mit eiskalter ACSF gefüllten Schale mit einem 752M Vibroslice (Campden Instruments) in Scheiben von 400 µm Dicke geschnitten. Es wurden nur Schnitte weiter verwendet, in denen der Hippokampus klar sichtbar und das Gewebe in Gänze unbeschädigt erhalten war. Dann wurden die Hemisphären mediansagittal mit einem Skalpell voneinander getrennt und in eine mit ACSF gefüllte Prä-Inkubationskammer überführt, in der sie bei Raumtemperatur mit Carbogen begast wurden und vor der weiteren Verwendung für mindestens 90 Minuten ruhen mussten, um sich vom Präparationstrauma zu erholen.

2.2.2 Herstellung der fixierten Hirnschnitte und Immunhistochemie

Für die immunhistochemischen Färbungen wurden Gehirne von Mäusen verwendet, die zuvor durch eine transkardiale Perfusion mit Paraformaldehyd fixiert worden waren. Diese Perfusion wurde ausschließlich durch wissenschaftliche Mitarbeiter der Arbeitsgruppe durchgeführt und war im Rahmen des Versuchsvorhabens (AZ 33.9-42502-04-12/0992) explizit genehmigt. Es sollten Sagittalschnitte des Gehirns angefertigt werden, dazu wurden die Gehirne der Tiere zunächst an einer Seitenkante mit einem Skalpell begradigt und dann mit Sekundenkleber (Roti®Coll1, Roth) auf den Schneideblock geklebt. Sodann wurde das Gehirn mit einer Pipette in 2% Agar in PBS-Lösung (Phosphatgepufferte Salzlösung, *phosphate buffered saline*) eingegossen und in PBS-Lösung liegend mit einem LeicaVT1200S-Vibratom in 30 µm dicke Scheiben geschnitten. Die Schnitte wurden dann zunächst in PBS mit 0,02% Natriumazid gelagert.

Um sie zu färben, wurden die Schnitte bei Raumtemperatur für 30 Minuten mit 0,2% des nicht-ionischen Tensids Triton® X-100 (Sigma-Aldrich) in PBS permeabilisiert, dann zur Blockade unspezifischer Proteinbindungsstellen mit 20% Eselserum (Sigma-Aldrich) in PBS für 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um im Anschluss über Nacht bei 4°C mit dem primären Antikörper (MAB377, Anti-NeuN Antibody, Merck-Millipore) in einer Konzentration von 10 µg/ml in 2% BSA

(Bovines Serumalbumin, Sigma-Aldrich)/PBS zu reagieren. Am nächsten Tag wurden die Schnitte drei mal für je 5 Minuten in PBS gewaschen, um überschüssigen primären Antikörper zu entfernen, und mussten danach mit dem sekundären Antikörper (ab96880, Goat Anti-Mouse IgG H&L (Dylight550®) preadsorbed, abcam) in einer Konzentration von 2 µg/ml in 2% BSA/PBS bei Raumtemperatur zwei Stunden lang reagieren. Zuletzt wurden die Schnitte drei weitere Male für jeweils fünf Minuten in PBS gewaschen, um überschüssige nicht gebundene sekundäre Antikörper zu entfernen, dann mit Dako Fluorescent Mounting Medium (Dako) eingedeckt und mussten zum Abschluss 24 Stunden trocknen.

2.2.3 Blutanalysen

Nachdem die Tiere dekapitiert worden waren, wurden zwei Mikro-Hämatokritkapillaren (Brand GmbH&Co KG) mit dem Blut der Tiere gefüllt, auf einer Seite verschlossen, danach bei 13000 rpm für fünf Minuten in einer Hämatokritzentrifuge (Mikro 2200, Hettich Zentrifugen) zentrifugiert und dann der Hämatokrit der Tiere durch Ablesen auf der Skala im Rotordeckel bestimmt. Zusätzlich wurde aus dem Dekapitationsblut mittels eines Blutzuckermessgeräts (Contour®, Bayer) die Konzentration von Glukose im Blut der Mäuse bestimmt, um etwaige Veränderungen im Stoffwechsel der Tiere auszuschließen.

2.3 Optische Verfahren zur Analyse des Expressionsmusters und funktionellen Antwortverhaltens

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene optische Verfahren zur Analyse des roGFP1-Expressionsmusters im Gehirn der Tiere und zur Überprüfung der Funktionsfähigkeit des Redox-Indikators verwendet. Es erfolgten mikroskopische Aufnahmen der fixierten und immunhistochemisch gefärbten Hirnschnitte mittels Auflichtfluoreszenz, dynamischer ratiometrischer Messungen der roGFP1-Fluoreszenzemission an akuten Hirnschnitten und Aufnahmen von akuten und fixierten Hirnschnitten mit der 2-Photonen-Laser-Scanning-Mikroskopie.

2.3.1 Ratiometrische Messungen an akuten Hirnschnitten

Die ratiometrischen Messungen fanden an einem aufrechten Fluoreszenzmikroskop (AxioTech vario, Zeiss) statt, auf das eine hochsensitive CCD-Kamera (Imago QE, PCO Imaging, 62% Quanteneffizienz bei 500 nm, 12 bit, 1376x1040 Pixel) montiert war. Als polychromatische Lichtquelle für die Fluoreszenzmikroskopie diente eine Xenon-Hochdrucklampe (Polychrom V, Till Photonics®). Um die polychromatische Lichtquelle und die CCD-Kamera anzusteuern, wurde die Steuerungs- und Bildbearbeitungssoftware Till Vision® (Till Photonics®, Gräfeling, Deutschland) verwendet, mit der auch die gewünschten Wellenlängen, Belichtungszeiten und Bildraten eingestellt wurden.

Die Hirnschnitte wurden dabei in eine Submersions-Messkammer gelegt, die mit angewärmter ACSF mit einer Flussrate von 3 bis 4 ml pro Minute kontinuierlich gespült wurde, um das Gewebe vital zu halten. Die ACSF wurde in einem Wasserbad (Haake) bei 40°C angewärmt und mit Carbogen begast. Von dort aus wurde die Lösung mit einer Peristaltikpumpe (Watson Marlow 205S) mit 30 Umdrehungen pro Minute angesaugt und über einen 5 ml Flüssigkeit fassenden Windkessel durch dünne Tygon®-Schläuche in die Messkammer gepumpt. Um ein übermäßiges Abkühlen der Lösungen in den Schläuchen zwischen Wasserbad und Messkammer zu vermeiden, führte das letzte Stück des Schlauches vor der Kammer durch einen Wärmetauscher. Am Ende herrschte während der Messung eine konstante Temperatur von ungefähr 32°C um den Hirnschnitt. Da die Rollenlager der Peristaltikpumpe eventuell einen ungleichmäßigen Fluss der Lösungen bewirken und beim Wechsel der Ansaugkanüle zwischen den verschiedenen Lösungen Luftblasen in das System gelangen könnten, war der Windkessel notwendig, um einen gleichmäßigen Fluss der Lösungen durch das System sicherzustellen. Die ACSF wurde, nachdem sie über den Hirnschnitt geflossen war, von einer kleinen Unterdruckpumpe aus der Messkammer in eine 5-Liter-Sammelflasche abgesaugt (Abb. 5).

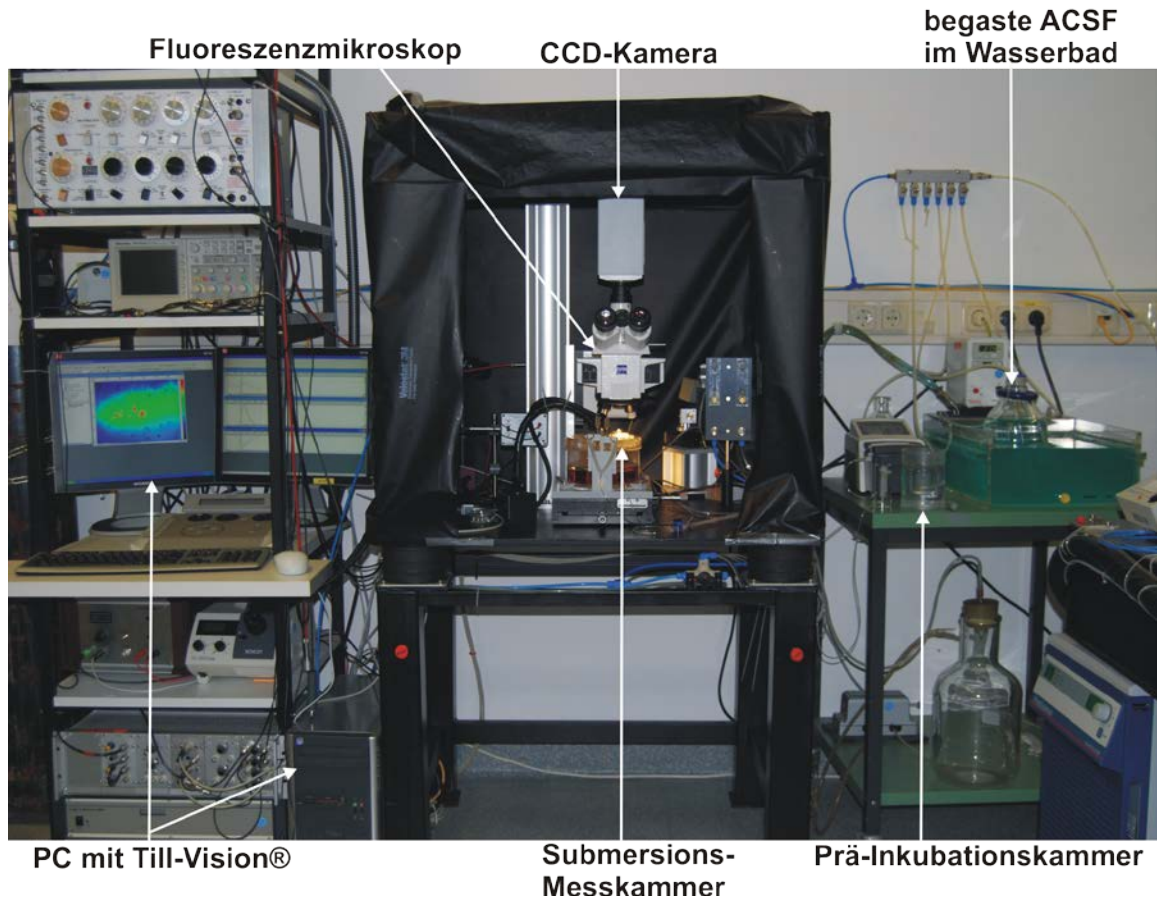


Abb. 5: Optischer Arbeitsplatz zur Analyse akuter Gewebeschnitte

Die Abbildung zeigt den optischen Arbeitsplatz. Vor ihrer Verwendung in den Messungen, lagen die Schnitte in einer ACSF-gefüllten und mit Carbogen begasteten Prä-Inkubationskammer und wurden dann zur Messung in die Submersionsmesskammer überführt, in der sie kontinuierlich mit angewärmter ACSF superfundiert wurden. Während der Messung wurde der Versuchsaufbau von allen Seiten mit schwarzer, antistatischer Folie abgedeckt, um den Einfall von Streulicht zu vermeiden.

Die untersuchten Mäuse exprimierten den zytosolischen Redox-Indikator roGFP1 in ihren Neuronen, daher war die Durchführung der Fluoreszenzmikroskopie ohne weitere Verwendung von fluoreszierenden Farbstoffen möglich. Für die ratiometrische Anregung des Fluorophors wurde Licht der Wellenlängen 395 nm und 470 nm gewählt, da bei diesen Wellenlängen die zwei Anregungsmaxima des roGFP1-Proteins liegen (Dooley et al. 2004, Hanson et al. 2004). Dieses Anregungslicht wurde über eine Lichtfaser in den Auflichtstrahlengang des Mikroskops eingekoppelt und von einem dichroitischen Spiegel (DC 495) auf das Präparat gelenkt. Bei einem Dichroit handelt es sich um ein speziell beschichtetes Glas, das in einem Winkel von 45° in den Strahlengang eingebracht wird und die besondere Eigenschaft hat, Licht unterhalb einer bestimmten Wellenlänge zu reflektieren, dabei aber durchlässig für Licht oberhalb dieser Wellenlänge zu sein.

Bei der Fluoreszenzmikroskopie werden Elektronen der fluoreszenten Moleküle (Fluorophore) durch Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt und auf ein höheres Energieniveau versetzt, fallen dann spontan auf ihr Ausgangsniveau zurück und emittieren dabei Licht einer höheren, d.h. energieärmeren Wellenlänge. Es ist also sinnvoll, den Reflexionsbereich des Dichroiten so zu wählen, dass das Anregungslicht – also das Licht der niedrigeren Wellenlänge – auf das Präparat gelenkt wird, er aber durchlässig für das längerwellige emittierte Licht ist, das die CCD-Kamera erreichen soll. Um den Durchtritt von unspezifischer Hintergrundfluoreszenz zusätzlich zu verringern, wird in den Emissionsstrahlengang ein Emissionsfilter (*Emitter*, Bandpassfilter, BP 525/50 nm) eingebracht, damit allein die Fluoreszenz des Präparats zur hochsensitiven CCD-Kamera gelangt. Das Licht der Anregungswellenlänge wurde vor den eigentlichen Messungen durch ein 5x Objektiv (Zeiss, Epiplan, 0.13 NA) auf das Präparat fokussiert, um die zu untersuchenden Hirnregion auszuwählen. Danach wurde ein 63x Wasserimmersionsobjektiv (Zeiss, Apochromat, 1.0 NA) benutzt, um einzelne Neurone für die Messung auszuwählen und bei der Messung eine möglichst hohe Detektionseffizienz zu gewährleisten.

Für die Messung und Bildbearbeitung diente ebenfalls die Software Till Vision®. Zunächst wurde ein Bild zur Übersicht erstellt (*Snapshot*), in dem dann die zu beobachtenden Zellen als ROI (*region of interest*) markiert wurden. Der Ablauf der eigentlichen Messung wurde in einem individuell zusammengestellten Protokoll festgelegt, in dem Belichtungszeit der beiden Wellenlängen (15 ms jeweils für 395 und 470 nm), Bildrate (0,1 Hz) und der Aufzeichnungsmodus der Rohdaten (2x2 Binning) definiert wurden. Ein 2x2 Binning bedeutet, dass Quadrate aus jeweils 4 angrenzenden Pixeln zu einem Bildpunkt zusammengefasst werden, wobei die Helligkeit der einzelnen Pixel addiert wird. Diese Methode bietet den Vorteil eines erheblichen Empfindlichkeitsgewinns für die Detektion der Fluoreszenz und reduziert die Größe der zu speichernden Daten auf ein Viertel, geht allerdings mit einem entsprechenden Verlust an räumlicher Auflösung einher.

Es wurden die Intensität der Fluoreszenz bei Belichtung mit den beiden Wellenlängen in Echtzeit erfasst und ein Quotient aus der Emission bei 395 nm und der Helligkeit bei 470 nm gebildet, um bei der späteren Auswertung Unterschiede im Ausgangsniveau zwischen den verschiedenen Schnitten durch diesen

Quotienten herauszurechnen (Funke et al. 2011, Großer et al. 2012). Zusätzlich konnte an einem Echtzeitbild die Lage des Schnitts betrachtet werden, um eventuelle kleinere Lageveränderungen des Schnitts aus dem Fokus des Mikroskops zu korrigieren. Die Intensitätsinformationen der ROIs wurden nach dem Ende des Versuchs und der Speicherung der Messung in eine Microsoft Excel®-Tabelle übertragen und im Detail analysiert. Das Erstellen der Messspuren und Diagramme, sowie die quantitative und statistische Auswertung der Daten erfolgten ebenfalls mit Microsoft Excel® und bei den multiplen Vergleichen zusätzlich mit SigmaStat3.5®.

Bei den Messungen unter anoxischen Bedingungen wurde eine spezielle, mit Natriumsulfit versetzte und mit einem sauerstofffreien Gasgemisch (95% N₂, 5% CO₂) begaste Lösung verwendet. Da das Hirngewebe unter Sauerstoffentzug aber so stark anschwellt, dass die zu beobachtenden Zellen schon nach kurzer Zeit aus dem Fokus des Mikroskops verschwanden, war der Einsatz eines automatisierten Protokolls für die Aufnahmen der Präparate nicht möglich. Stattdessen wurde zu Beginn der Messung eine markante Ansammlung von Neuronen im Präparat ausgewählt, die dann nach 10 Minuten Anoxie und nach 10 weiteren Minuten der Reoxygenierung manuell wieder aufgesucht wurde, um jeweils ein weiteres Bild aufzuzeichnen und daraus die relativen Veränderungen der Fluoreszenzemission zu bestimmen.

2.3.2 Fluoreszenzmikroskopie der fixierten Hirnschnitte

Die mikroskopischen Aufnahmen der immunhistochemisch gefärbten Schnitte wurden an einem aufrechten Fluoreszenzmikroskop (Olympus, BX51WI) mit einer hochsensitiven, hochauflösenden CCD-Kamera (Retiga Exi Fast 1394, Qimaging, 55% Quanteneffizienz bei 500 nm, 12 bit, 1392x1040 Pixel) gemacht. Als Lichtquelle diente ein LED-Beleuchtungssystem (pE-2, CoolLED) mit einer Anregungswellenlänge von 490 nm für roGFP1 und 565 nm für Dylight550®, die in das Mikroskop durch eine Lichtfaser eingekoppelt wurden. Um das Anregungslicht von der Emission zu trennen, wurde im Fall der roGFP1-Emission ein Dichroit (DC499) verwendet, im Fall von Dylight550® wurden zusätzlich zu einem Dichroit (DC565) ein Bandpassfilter für die Exzitation (BP 543/22) und ein weiterer

Bandpassfilter für die Emission (BP 605/70) in den Strahlengang eingebaut. Für die roGFP1-Übersichtsaufnahmen wurde ein 4x Objektiv (Olympus, XLFluor 4x/340, 0.28 NA) mit einer Belichtungszeit von 1 bis 1,5 s je nach Hirnregion benutzt. Für die Detailaufnahmen der unterschiedlichen Hirnregionen wurde ein 20x Wasserimmersionsobjektiv (Olympus, XLUMPlanF, 0.95 NA) mit einer Belichtungszeit von 150 bis 450 ms für roGFP1 und 0,7 bis 1,25 s für die Dylight550®-Emission verwendet. Die Aufnahmen wurden mit einem 2x2 Binning erstellt. Zur Steuerung der Kamera und der Bildaufnahmen diente die Software QCapture Suite® (QImaging, Surrey, British Columbia, Canada).

2.3.3 Zwei-Photonen-Laser-Scanning-Mikroskopie

Die Zwei-Photonen-Laser-Scanning-Mikroskopie (*Two-Photon-Laser-Scanning-Microscopy*, TPLSM) ist eine besondere Form der Fluoreszenzmikroskopie. Obwohl die physikalischen Grundlagen dieses Verfahrens schon 1931 von Maria Göppert-Mayer in Göttingen beschrieben worden waren (Göppert-Mayer 1931), wurde die Methode der TPLSM erst 1990 von Denk et al. etabliert (Denk et al. 1990). Bei der TPLSM nutzt man den Effekt der Zwei-Photonen-Absorption, bei der statt eines energiereichen Photons wie bei der „normalen“ (1-Photon) Fluoreszenzexcitation zwei energieärmere Photonen, deren Energie sich bei diesem Phänomen aufsummiert, zeitgleich von den Fluorophoren absorbiert werden (Abb. 6).

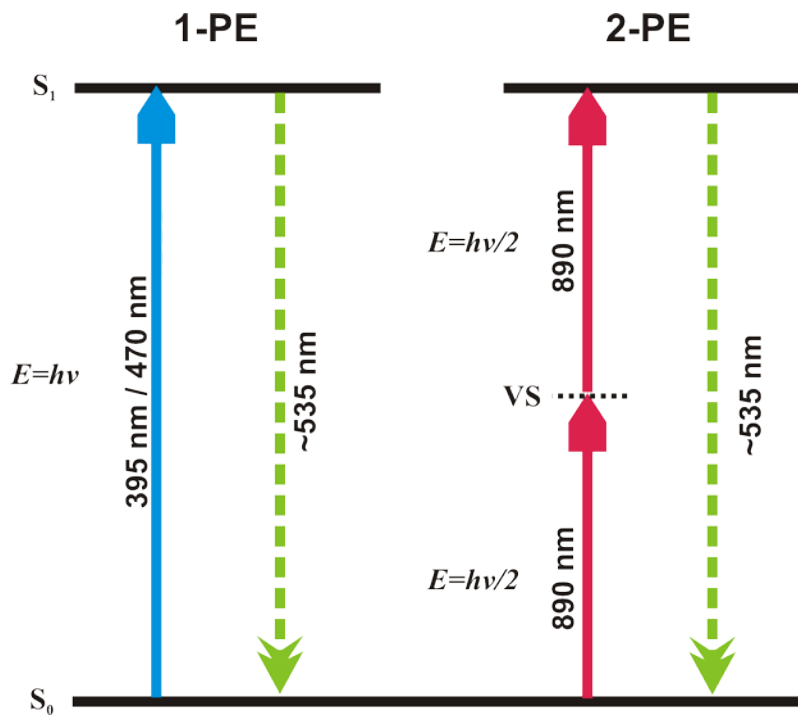


Abb. 6: Jablonski-Diagramm zur 1- und 2-Photonen-Fluoreszenz

Bei der 1-Photonen-Exzitation (1-PE) wird ein Elektron durch die Absorption eines Photons einer bestimmten Energie von seinem Grundzustand (S_0) in einen angeregten Zustand (S_1) versetzt. Fällt das angeregte Elektron auf sein ursprüngliches Energieniveau zurück, wird dabei sichtbares Licht emittiert, dieser Vorgang wird als Fluoreszenz bezeichnet.

Bei der 2-Photonen-Exzitation (2-PE) hingegen werden zwei Photonen der halben Energie von einem Elektron absorbiert, das dabei einen virtuellen Zwischenzustand (VS) durchläuft, um das höhere Energieniveau, das die Grundlage für die Fluoreszenz bildet, zu erreichen. Die Wellenlängen des anregenden Lichts im Diagramm entsprechen den in dieser Arbeit zur Exzitation der roGFP1-Fluoreszenz verwendeten.

Aus diesem Grund kann die Anregung der Fluoreszenz bei dieser Methode mit im Vergleich zur herkömmlichen Fluoreszenzmikroskopie längerwelligem Infrarotlicht erfolgen, was einige Vorteile mit sich bringt. Längerwelliges Licht wird weniger intensiv gestreut als kurzwelliges Licht, daher ermöglicht die TPLSM eine höhere Eindringtiefe in das Gewebe. Diese Methode kann sogar benutzt werden, um das Gewebe in lebenden Tieren auch in longitudinalen Studien zukünftig womöglich über Jahre zu beobachten (Helmchen und Denk 2005). Außerdem hat das Infrarotlicht eine deutlich geringere Phototoxizität als ultraviolette oder blaue Strahlung. Ein weiterer Vorteil der TPLSM liegt darin, dass der Laserstrahl nur im Zentrum des Fokus ausreichend intensiv ist, um überhaupt Fluorophore anzuregen, sodass die gesamte vom Präparat erzeugte Fluoreszenz aufgefangen werden kann (Weitfeld-Detektion, *non-descanned detection*) und nicht erst das Licht aus Ebenen über und unter dem Fokus durch eine Lochblende räumlich gefiltert werden muss (*descanned detection*). Um Licht mit einer für die Auslösung dieses Phänomens

ausreichenden Photonendichte zu produzieren, sind allerdings leistungsstarke, ultrakurzgepulste Laser notwendig. Die Bilder werden in der Laser-Scanning-Mikroskopie dadurch produziert, dass das Präparat vom Laserstrahl pixelweise abgefahren wird und im Anschluss digital aus den einzelnen Bildpunkten das Gesamtbild berechnet wird.

Das Herzstück des in dieser Arbeit verwendeten Versuchsaufbaus ist ein gepulstes Titan:Saphir-Laser-System (Mai Tai eHP DeepSee, Newport Spectra Physics), durch das die Anregung des roGFP1, wie auch des in der Immunhistochemie verwendeten Antikörpers DyLight550® bei einer Wellenlänge von 890 nm erfolgte. Es wurde ein aufrechtes Mikroskop (BX51 WI, Olympus) mit einem 20x Wasserimmersionsobjektiv (Olympus, XLUMPlanFI, 0.95 NA) verwendet (Abb. 7). Als Scan-Kopf diente ein TriM Scope II, der mit der Software ImSpector (LaVision Biotec) gesteuert wurde. Ein Dichroit (670DCXXR) im Strahlengang trennte die Emissionsstrahlung von der zur Anregung verwendeten Laserstrahlstrahlung. Die Messung der Fluoreszenzemission erfolgte als Weitfeld-Detektion durch zwei hochsensitive Photomultiplier (H7421/H7422 Serie, Hamamatsu). Die Aufteilung der Emissionsstrahlung auf die beiden Detektoren erfolgte durch einen dichroiten Strahlteiler (565 DCXR) und durch einen roten (BP 600/40), beziehungsweise grünen (BP 535/40) Bandpassfilter, um die Emission durch roGFP1 von der Emission durch Dylight550® spektral zu trennen.

Das Zwei-Photonen-Laser-Scanning-Mikroskop wurde verwendet, um Aufnahmen sowohl von fixierten als auch von akuten Hirnschnitten zu erstellen. Es wurden Einzelbilder sowie 30- μm -Z-Stapel typischerweise mit einer Auflösung von 1000x1000 Pixeln bei einer Größe von 300x300 μm , was 300 nm pro Pixel entspricht, und einem Z-Ebenen-Abstand von 0,5 μm aufgenommen. Die fixierten Schnitte wurden wie in Kapitel 2.2.2 beschrieben hergestellt und konnten ohne weitere Modifikation des Versuchsaufbaus direkt unter das Objektiv gelegt werden. Für die Aufnahmen der akuten Hirnschnitte war der Einbau einer Submersionsmesskammer nötig, die ähnlich wie in Kapitel 2.3.1 beschrieben betrieben wurde. Allerdings wurde die ACSF hier aus der Messkammer nicht in ein Abfallgefäß abgesaugt, sondern in einem Kreislauf wieder in das Ausgangsgefäß zurückgeführt.

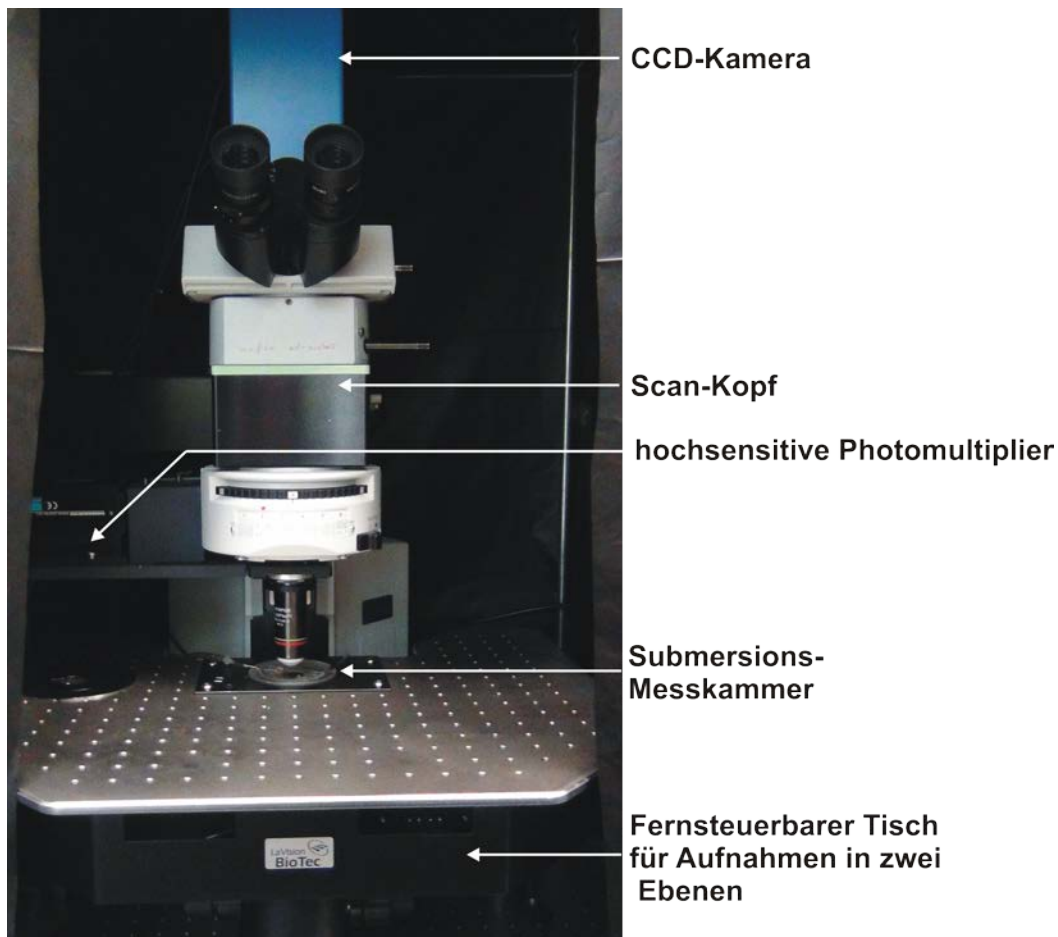


Abb. 7: Setup für die 2-Photonen-Laser-Scanning-Mikroskopie

Da das Mikroskop zur punktgenauen Einkopplung des Laserstrahls in den Strahlengang stationär bleiben muss, befindet sich das Präparat hierbei auf einem fernsteuerbaren Tisch, der während der Messungen softwaregestützt bewegt wurde, um geeignete Bereiche des Präparats auszuwählen. Im Scan-Kopf befinden sich Spiegel, die dafür sorgen, dass der Laserstrahl während des Scanvorgangs das Präparat Punkt für Punkt abtasten kann, um später aus den einzelnen Bildpunkten das Gesamtbild zu rekonstruieren.

2.4 Chemikalien und Zusammensetzung der Lösungen

Die zur Präparation der Hirnschnitte, bei den optischen Messungen und bei der Zwei-Photonen-Laser-Scanning-Mikroskopie der akuten Hirnschnitte verwendete ACSF-Lösung enthält folgende Bestandteile pro Liter: 130 mM NaCl, 24 mM NaHCO₃, 10 mM Glukose, 3,5 mM KCl, 1,25 mM NaH₂PO₄, 1,2 mM CaCl₂, und 1,2 mM MgSO₄. Zur Herstellung der Lösung wurde vollentsalztes Wasser in einem Messkolben des gewünschten Volumens vorgelegt und zunächst nacheinander die MgSO₄- und CaCl₂-Stammlösungen unter Schwenken zugegeben. Danach wurden die zehnfach ACSF-Stammlösung (enthält NaCl, NaHCO₃, KCl und NaH₂PO₄) und die Glukoselösung zugegeben und das fehlende

Volumen mit vollentsalztem Wasser aufgefüllt. Diese Prozedur sollte gewährleisten, dass alle verwendeten Salze in Lösung blieben. Während der Messungen wurde die Lösung durch begasen mit Carbogen (95% O₂, 5% CO₂) und eine konstante Temperatur von 40°C auf einen physiologischen pH-Wert von 7,4 eingestellt.

Die für die Immunhistochemie verwendete PBS-Lösung (Phosphatgepufferte Salzlösung, *phosphate buffered saline*) enthält pro Liter 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl und 12 mM Phosphatpuffer in Form von HPO₄²⁻ und H₂PO₄⁻. Die Lösung wurde aus einer zehnfachen Stammlösung verdünnt und mit 1 M NaOH auf einen pH von 7,4 titriert.

Bei den optischen Messungen wurde Dithiothreitol (DTT) als Reduktionsmittel verwendet. Dazu wurde zunächst eine 1 M Stammlösung von DTT in destilliertem Wasser angesetzt und bei 4°C gelagert, die dann vor jedem Experiment auf die Endkonzentration von 10 mM in ACSF verdünnt wurde. Als Oxidationsmittel diente H₂O₂, das in einer 30%-Ausgangslösung bei 4°C aufbewahrt wurde. Um zu verhindern, dass sich ein größerer Teil des Wasserstoffperoxids schon vor Beginn des Experiments zersetzte, wurde die verwendete 5 mM Lösung von H₂O₂ in ACSF frisch vor jeder Verwendung angesetzt.

Für die Messungen unter anoxischen Bedingungen wurde zunächst ACSF-Lösung mit zusätzlich 1 mM Natriumsulfit angesetzt und für eine Stunde im Wasserbad mit einem Gemisch aus 95% Stickstoff und 5% Kohlenstoffdioxid begast. Das Natriumsulfit sollte durch die Schläuche oder durch die Wasseroberfläche der Messkammer gelangten Sauerstoff bei der Oxidation zu Natriumsulfat aus der Lösung abfangen, um eine ausreichend schwere Hypoxie des Gewebes sicherzustellen.

Zur transkardialen Perfusion der Mäuse und Aufbewahrung der fixierten Gehirne wurde eine Lösung aus PBS mit 4% Paraformaldehyd verwendet.

Die verwendeten Chemikalien sind in der nachfolgenden Tabelle nochmals alphabetisch mit den jeweiligen Lieferanten aufgelistet.

Chemikalien	Lieferant
CaCl ₂	Sigma-Aldrich
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich
H ₂ O ₂	Sigma-Aldrich
Glukose	Merck
KCl	Merck
MgSO ₄	Merck
Natriumazid (NaN ₃)	Sigma-Aldrich
NaCl	Merck
NaHCO ₃	Sigma-Aldrich
Na ₂ HPO ₄	Merck
NaH ₂ PO ₄	Merck
Na ₂ SO ₃	Sigma-Aldrich
Paraformaldehyd 95% (PFA)	Sigma-Aldrich

Tabelle 2: Überblick über die verwendeten Chemikalien

2.5 Statistik

Die Datenerhebung in dieser Arbeit erfolgte an 105 Mäusen im Alter zwischen 10 und 105 Tagen, wobei sich diese Zahl aus 37 transgenen Tieren und 68 ihrer nicht-transgenen Geschwister zusammensetzt. In Abschnitt 3.1 ist mit der Anzahl der Experimente (n) jeweils die Anzahl der mit den verschiedenen Methoden untersuchten Tiere bezeichnet, während in Abschnitt 3.4. mit der Anzahl der Experimente die Anzahl der jeweils begutachteten roGFP1-positiven Neurone in den Hirnschnitten genannt ist.

Die statistische und quantitative Analyse der Daten erfolgte bei den Vergleichen zwischen den transgenen Tieren und ihren Geschwistern mit dem Programm Microsoft Excel®. Die Prüfung auf signifikante Unterschiede zwischen den Wildtypen und transgenen Tieren erfolgte mit dem ungepaarten zweiseitigen T-Test nach Student.

Bei den Vergleichen der unterschiedlichen Hirnregionen in den akuten Hirnschnitten wurde für die statistische und quantitative Analyse das Programm SigmaStat3.5® (Aspire Software International, Ashburn, Virginia, USA) verwendet. Zur Prüfung

signifikanter Änderungen in der Verbesserung der Laufleistung der Tiere auf dem Rota-Rod® und in der roGFP1-Fluoreszenz nach Gabe der Drogen und bei Anoxie in den verschiedenen Hirnregionen kam ein zweiseitiger Einstichproben-t-Test zur Anwendung, bei dem die jeweilige Veränderung gegen den Standard (definiert als 1,0 oder 100%) getestet wurde. Bei der Prüfung der Signifikanz in den Unterschieden der Baseline-Oxidation zwischen den verschiedenen Hirnregionen handelt es sich um multiple Vergleiche. Daher wurde hier als entsprechende Varianzanalyse der Kruskal-Wallis-Test mit einem paarweisen Vergleich nach Dunn als post-hoc-Test durchgeführt.

Sämtliche Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt. In den Diagrammen sind signifikante Veränderungen auf dem 5%-Niveau ($p < 0,05$) mit einem Stern (*), auf dem 1%-Niveau ($p < 0,01$) mit zwei Sternen (**) und auf dem 0,1%-Niveau ($p < 0,001$) mit drei Sternen (***) markiert.

3 Ergebnisse

3.1 Bewertung des Allgemeinzustandes der Mäuse

Da das Konstrukt bei der prä nukleären Injektion an einer zufälligen, nicht vorhersagbaren Stelle ins Genom der Maus integriert, könnte prinzipiell die Expression anderer Gene gestört werden, was nachteilige Effekte für die Maus haben kann (Ohtsuka et al. 2010). Durch eine wie auch immer geartete Auswirkung des Transgens auf den Gesundheitszustand der Maus könnte die Linie für die spätere Kreuzung mit kranken Tiermodellen nicht oder nur eingeschränkt nutzbar sein, weshalb eine solche Beeinträchtigung unbedingt auszuschließen ist.

Während der Dauer der Experimente ist nur ein einziges weibliches Wildtyp-Tier, das zuvor bereits eine stark retardierte Entwicklung zeigte, vorzeitig am 22. postnatalen Tag verstorben. Alle anderen Wildtypen und auch die transgenen Tiere entwickelten sich äußerlich völlig unauffällig (Abb. 8) und zeigten bei der Betrachtung ihres Situs während der Präparation keine offensichtlichen abnormen Veränderungen.

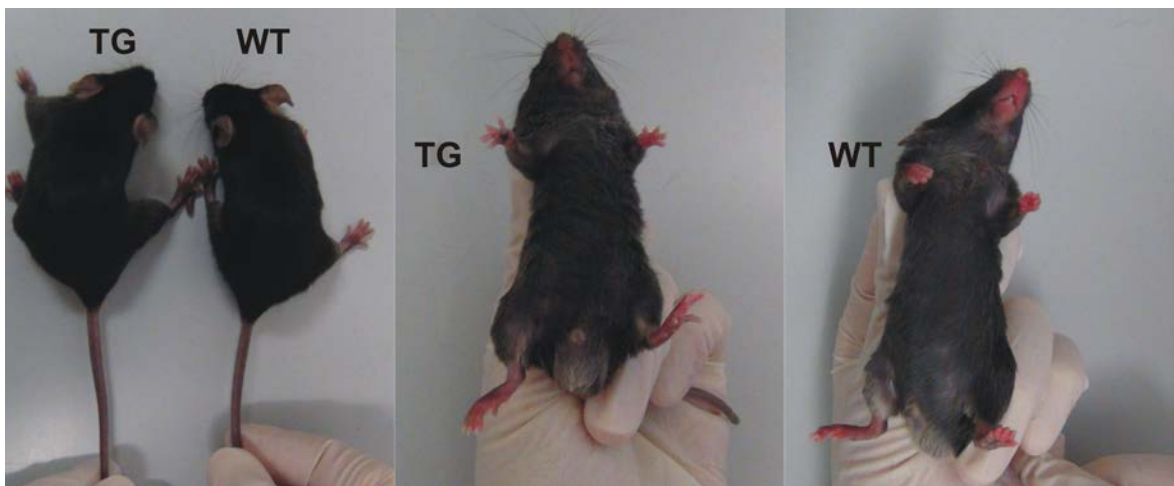


Abb. 8: Phänotypisches Erscheinungsbild der Tiere

Äußerlich sind die transgenen roGFPC-Tiere (TG) nicht von ihren Wildtyp-Geschwistern (WT) oder anderen Tieren der C57BL/6J-Linie unterscheidbar.

Um Wachstum, Futteraufnahme und Stoffwechsellistung der transgenen Tiere im Vergleich zu ihren nicht-transgenen Geschwistern zu beurteilen, wurden die Gewichte der Tiere in regelmäßigen Abständen von jeweils 3 Tagen bestimmt. Da nicht alle Tiere zur gleichen Zeit geboren wurden, wurde zur Auswertung der Daten das Gewicht der Tiere vom postnatalen Tag 4 an in Intervallen von je 3 Tagen gemittelt. Es ergaben sich unterschiedliche Fallzahlen, weil nicht exakt gleich viele Tiere jeder Versuchsgruppe geboren wurden.

Insgesamt wurden 25 männliche Wildtypen, 13 männliche transgene Tiere, 17 weibliche Wildtypen und 14 weibliche transgene Mäuse gewogen. Die Tiere nahmen alle von Geburt an kontinuierlich zu, zeigten allerdings eine Verlangsamung oder einen kleinen Rückgang der Gewichtszunahme zwischen Tag 15 und 21. Gegen Ende des Beobachtungszeitraumes waren die Weibchen etwas leichter als die Männchen, wie es bei einer normalen Entwicklung der Tiere zu erwarten ist (Abb. 9A).

Zusätzlich dazu wurde die Körperlänge der Tiere vor der Präparation bestimmt, während diese mit Ether narkotisiert waren. Die Wildtypen waren $8,2 \pm 0,3$ cm (Männchen, $n=12$) und $7,8 \pm 0,2$ cm (Weibchen, $n=12$), die transgenen Tiere $8,1 \pm 0,3$ cm (Männchen, $n=9$) und $7,8 \pm 0,3$ cm (Weibchen, $n=10$) lang. Zwischen den Wildtyp- und transgenen Tieren gleichen Geschlechts waren keine signifikanten Unterschiede zu finden (Abb. 9B).

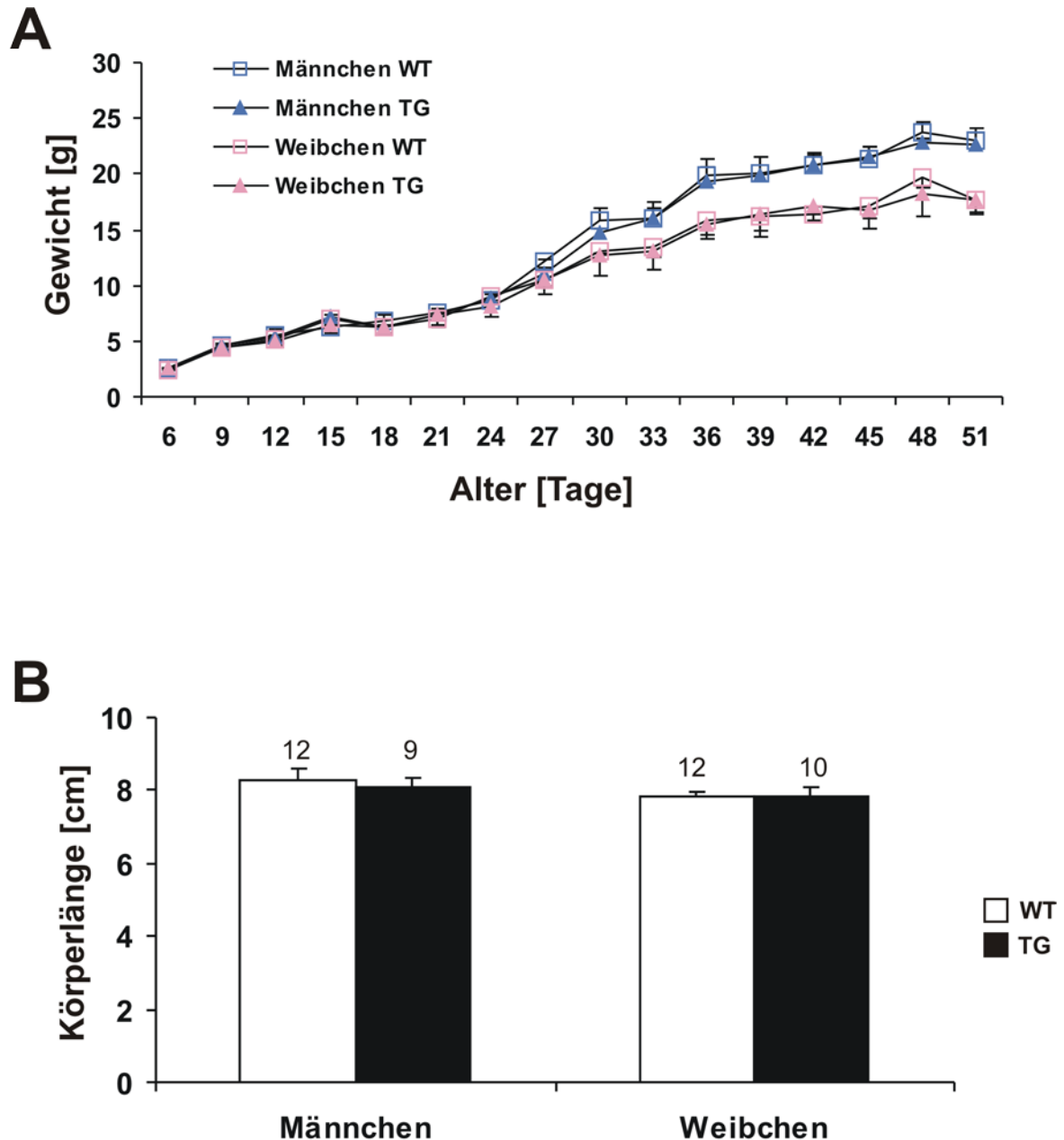


Abb. 9: Gewichtszunahme und Körperlänge der Tiere im Vergleich

A) Die Wachstumskurve zeigt das durchschnittliche Gewicht der männlichen und weiblichen transgenen Tiere und ihrer Wildtyp-Geschwister in Zeiträumen von jeweils 3 Tagen bis zu ihrem 51. Lebenstag. Das angegebene Alter auf der Abszisse beinhaltet jeweils den Mittelwert des angegebenen und der zwei vorherigen Tage, also bei „3“ Tag 1 bis 3, bei „6“ Tag 4 bis 6 und so fort.

B) Dieses Diagramm stellt die Körperlänge der Mäuse um den 55. Entwicklungstag dar, die vor ihrer Präparation für die Versuche bestimmt wurde. Es zeigten sich in Länge und Gewicht keine signifikanten Unterschiede zwischen den Vergleichsgruppen. In allen Diagrammen sind Mittelwerte aufgetragen, die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. In Balkendiagrammen ist die Anzahl der untersuchten Tiere bzw. Zellen für jede Gruppe über dem jeweiligen Balken angegeben.

Bei der Präparation der Tiere für die Experimente wurden aus dem Dekapitationsblut zudem der Blutglukosespiegel und der Hämatokrit bestimmt. Die männlichen Wildtypen waren zum Zeitpunkt der Datengewinnung im Durchschnitt 52 Tage alt, hatten eine Blutglukosekonzentration von 238 ± 25 mg/dl und einen Hämatokrit von $44 \pm 3\%$ ($n=12$). Die transgenen männlichen Tiere waren im Durchschnitt 57 Tage alt, hatten eine Blutglukosekonzentration von 226 ± 49 mg/dl und einen Hämatokrit von $45 \pm 3\%$ ($n=9$). Zwischen den männlichen Tieren waren hier keine signifikanten Unterschiede festzustellen (Abb. 10A).

Die weiblichen Wildtypen waren im Durchschnitt 51 Tage alt und hatten eine Blutglukosekonzentration von 198 ± 42 mg/dl. Ihr Hämatokrit betrug $45 \pm 1\%$ ($n=12$). Die transgenen weiblichen Tiere waren bei der Präparation im Durchschnitt 54 Tage alt, hatten eine Blutglukosekonzentration von 217 ± 25 mg/dl und einen Hämatokrit von $45 \pm 1\%$ ($n=12$). Auch zwischen den weiblichen Tieren waren in diesen Parametern keine signifikanten Unterschiede zu finden, sie zeigten aber etwas geringere Blutglukosespiegel als die männlichen Tiere (Abb. 10B).

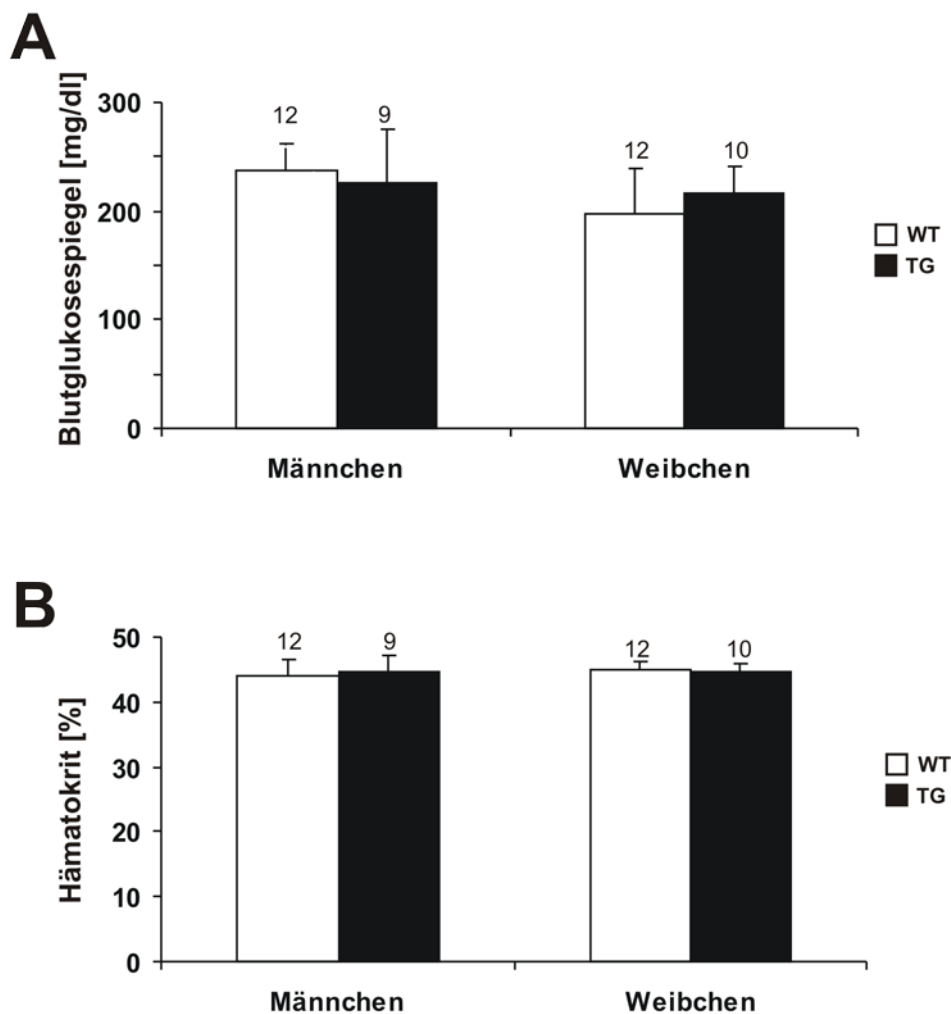


Abb. 10: Analyse von Blutglukosespiegel und Hämatokrit

Die Parameter wurden aus dem Dekapitationsblut von männlichen und weiblichen transgenen (TG) und Wildtyp-Tieren (WT) während der Herstellung der Hirnschnitte bestimmt. Das Diagramm **A)** zeigt die Konzentration von Glukose im Blut der Tiere. In **B)** ist der Hämatokrit der Mäuse dargestellt. Die Gruppen selben Geschlechts unterschieden sich in keinem der untersuchten Parameter signifikant.

3.2 Motorische Koordination und Umweltexploration

Zur Prüfung ihrer motorischen Fähigkeiten und eventuellen Feststellung neurologischer Defizite der Tiere wurden Rota-Rod®- und Open-Field-Tests durchgeführt. Auf dem Rota-Rod® wurden die Mäuse an drei aufeinander folgenden Tagen laufen gelassen.

Am ersten Tag hielten sich die Wildtyp-Männchen durchschnittlich 93 ± 62 s auf dem Gerät, am zweiten Tag 149 ± 57 s und am dritten Tag 167 ± 60 s ($n=28$). Die transgenen Männchen hielten sich am ersten Tag 104 ± 62 s, am zweiten Tag 141 ± 45 s und am dritten Tag 190 ± 34 s ($n=17$). Es zeigten sich hier keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Genotypen (Abb. 11A).

Die Wildtyp-Weibchen liefen am ersten Tag 101 ± 63 s, am zweiten 158 ± 69 s und am dritten 173 ± 58 s ($n=17$). Die transgenen weiblichen Tiere liefen am ersten Tag durchschnittlich 166 ± 75 s, am zweiten Tag 218 ± 59 s und am dritten Tag 241 ± 105 s ($n=16$) und damit an jedem Tag signifikant länger als die Wildtyp-Weibchen ($p<0,05$; Abb. 11B).

Der erste Tag des motorischen Tests diente nur der Eingewöhnung, zur Beurteilung des motorischen Lernens der Tiere wurde die Verbesserung der Laufleistung vom zweiten auf den dritten Tag bestimmt. Die durchschnittliche Laufleistung des dritten Tages gegenüber dem zweiten Tag betrug bei den männlichen Wildtypen $119,9 \pm 45,7\%$ und zeigte damit keine signifikante Verbesserung ($n=28$). Die männlichen transgenen Tiere erreichten hingegen $151,3 \pm 65,5\%$ und damit eine signifikante Verbesserung ihrer Laufleistung ($p<0,01$, $n=13$). Die Veränderungen bei den weiblichen Tieren waren nicht signifikant und betrugen bei den Wildtypen $139,6 \pm 99,4\%$ ($n=17$) und bei den entsprechenden transgenen Tieren $122,4 \pm 79,5\%$ ($n=16$).

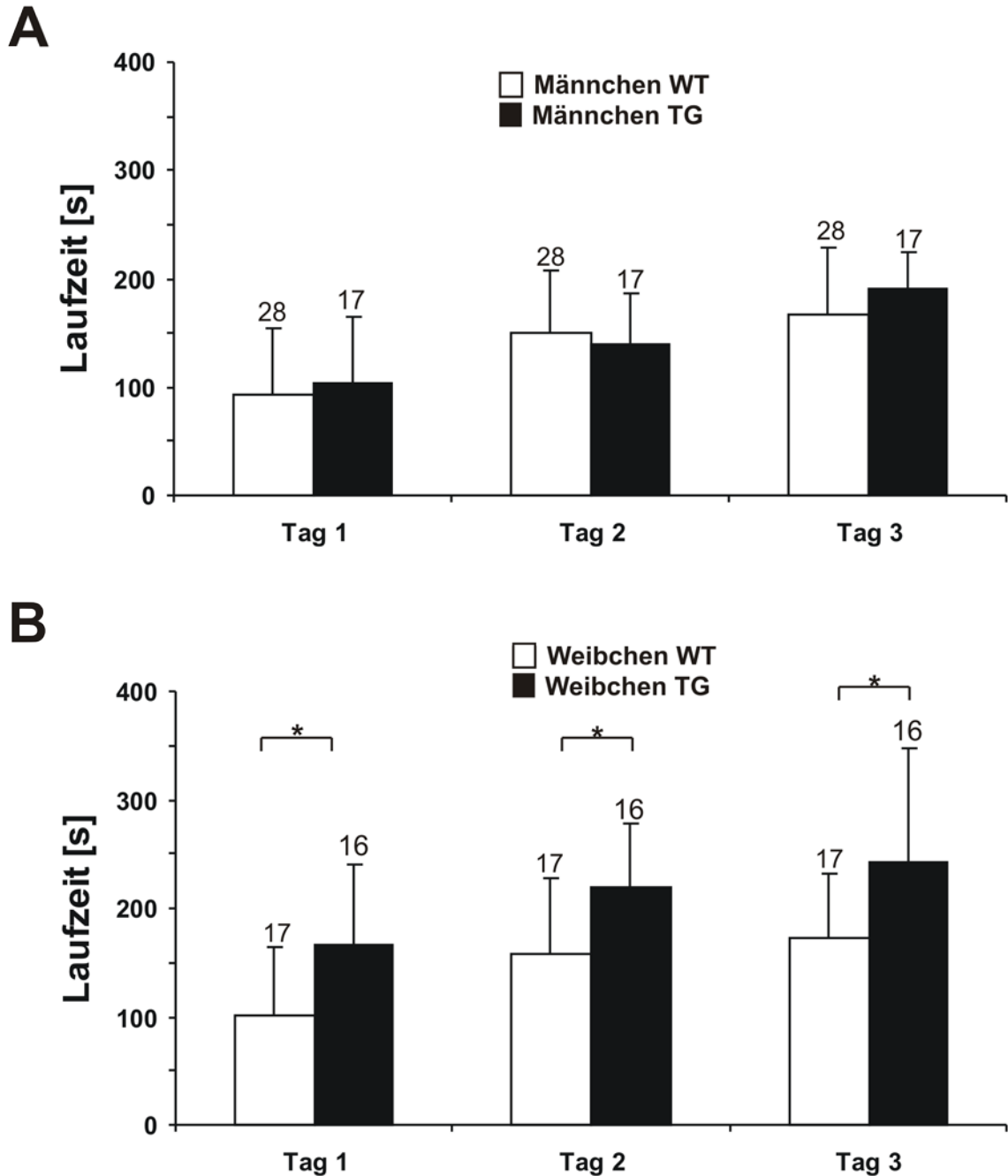


Abb. 11: Rota-Rod® Laufzeiten

A) Gemittelte Laufzeiten der männlichen transgenen Tiere (*Männchen TG*) und der männlichen Wildtypen (*Männchen WT*), die an drei aufeinander folgenden Tagen auf dem Rota-Rod® gemessen wurden. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Genotypen.

B) Dargestellt sind die Laufzeiten der weiblichen transgenen Tiere (*Weibchen TG*) und der entsprechenden Wildtyp-Mäuse (*Weibchen WT*). Die weiblichen transgenen Tiere liefen an jedem Tag signifikant länger als die Vergleichsgruppe.

Durch Open-Field-Tests sollte das Umweltexplorationsverhalten der Tiere analysiert werden. Während dieser Experimente mussten sich die Mäuse für jeweils fünf Minuten im Testareal bewegen. Dabei wurden die mittlere Laufgeschwindigkeit der Mäuse, die zurückgelegte Strecke, die Aufenthaltsdauer in verschiedenen Zonen des Testfelds (Abb. 5, Kapitel 2.3.1) und die Zeit, in der die Mäuse bewegungslos verharrten, bestimmt.

Die männlichen Wildtypen bewegten sich mit einer durchschnittlichen Geschwindigkeit von $4,1 \pm 1,2$ cm/s und legten $12,3 \pm 3,6$ m zurück. Dabei verbrachten sie $29,9 \pm 8,6\%$ ihrer Zeit an den Kanten der Testfläche, $10,7 \pm 11,8\%$ in der Mitte, $37,6 \pm 10,9\%$ der Zeit in den Ecken und blieben $31,6 \pm 9,8\%$ der Zeit bewegungslos (n=22). Die transgene Vergleichsgruppe (n=10) zeigte hier keine signifikanten Unterschiede (Abb. 12A).

Die weiblichen Wildtyp-Mäuse liefen mit einer Durchschnittsgeschwindigkeit von $4,9 \pm 1,2$ cm/s eine Gesamtstrecke von $14,8 \pm 3,6$ m. Sie hielten sich während $31,0 \pm 5,9\%$ der Zeit an den Kanten, während $7,7 \pm 3,5\%$ in der Mitte und während $60,9 \pm 8,1\%$ in den Ecken der Testfläche auf und blieben während $32,8 \pm 9,8\%$ der gesamten Zeit bewegungslos sitzen. Auch hier zeigten die transgenen Weibchen (n=10) keine signifikanten Unterschiede in ihrem Explorationsverhalten (Abb. 12B).

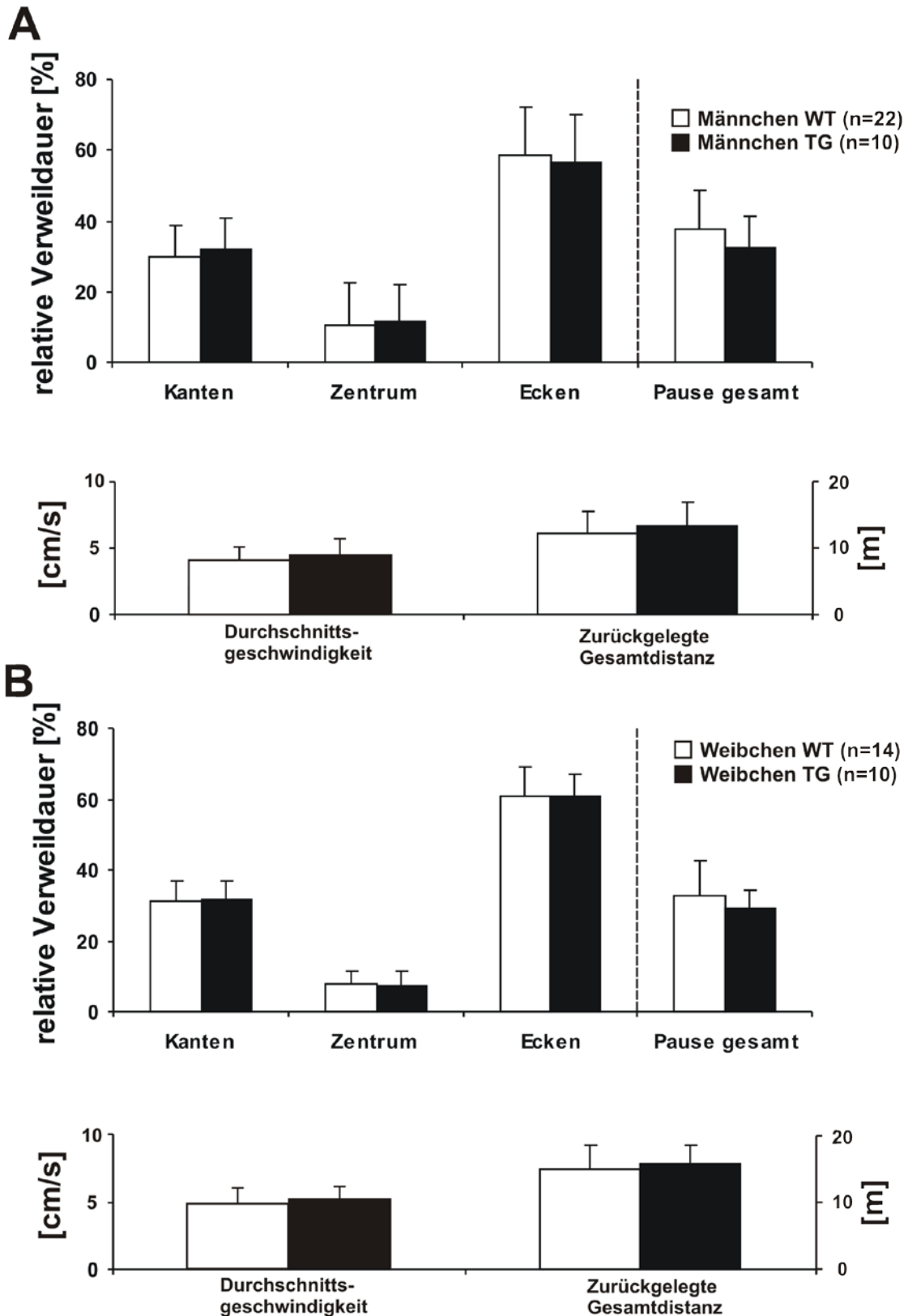


Abb. 12: Analyse des Explorationsverhaltens durch Open-Field-Tests

A) Gezeigt sind die relative Verweildauer der männlichen Tiere in den Zonen der Testfläche, ihre durchschnittliche Bewegungsgeschwindigkeit, zurückgelegte Gesamtdistanz und den Anteil der Zeit, den sie über die gesamte Dauer des Verhaltenstests bewegungslos verbrachten (*Pause gesamt*).

B) Diese Diagramme zeigen die selben Parameter für die weiblichen Tiere. Es waren keine signifikanten Unterschiede zwischen transgenen Tieren und Wildtypen festzustellen.

3.3 Charakterisierung des roGFP1-Expressionsmusters

In vorherigen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass DNA-Konstrukte unter der Kontrolle des Thy1.2-Promotors, die in verschiedene Zuchtlinien auf die gleiche Weise eingebracht worden waren, unter Umständen zu sehr unterschiedlicher oder auch gar keiner Proteinexpression in den transgenen Tieren führen können (Caroni 1997, Feng et al. 2000). Es ist also nicht vorhersagbar, ob und in welchen Hirnarealen und Neuronentypen im Detail das transgene Tier nach der pronukleären Mikroinjektion eine Expression des roGFP1-Proteins zeigt und daher für jede transgene Zuchtlinie nötig, ebendiese Expression zu charakterisieren. Besonderes Augenmerk wurde hierbei auf die Expression des Proteins im Hippokampus der Tiere gelegt, da die dort gelegenen Neurone besonders sensibel auf metabolische Änderungen und Anoxie reagieren und daher im speziellen Interesse der Forschungsbemühungen stehen (Schmidt-Kastner und Freund 1991, Wilde et al. 1997, Wang et al. 2007, Weller et al. 2014).

Um zu beweisen, dass das roGFP1 tatsächlich in Neuronen exprimiert wird und zur ungefähren Abschätzung des Anteils der Neurone, die das Protein exprimieren, wurde eine immunhistochemische Färbung gegen das neuronenspezifische nukleäre Protein NeuN durchgeführt, das in fast allen Neuronentypen von Vertebraten exprimiert wird, wobei einige Zelltypen wie zum Beispiel Purkinje-Zellen im Kleinhirn, Mitralzellen im Riechkolben und die Photorezeptoren der Retina keine NeuN-Expression zeigen (Mullen et al. 1992).

Alle mit optischen Methoden untersuchten Tiere (n=36) zeigten allerdings das selbe stabile Expressionsmuster unabhängig von Geschlecht und Alter. Die dargestellten Abbildungen der fluoreszenzmikroskopischen Methoden sind in Pseudofarben eingefärbt, grün entspricht der roGFP1-, rot entspricht der Anti-NeuN-Fluoreszenz.

Zunächst wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop Übersichtsaufnahmen der immunhistochemisch gefärbten Hirnschnitte von vier Hirnregionen unter Verwendung eines 4x Objektivs erstellt, wobei hier die roGFP1-Emission aufgezeichnet wurde. Eine Projektion der Hirnregionen auf einen Nissl-gefärbten Hirnschnitt ist in Abb. 13 zu sehen.

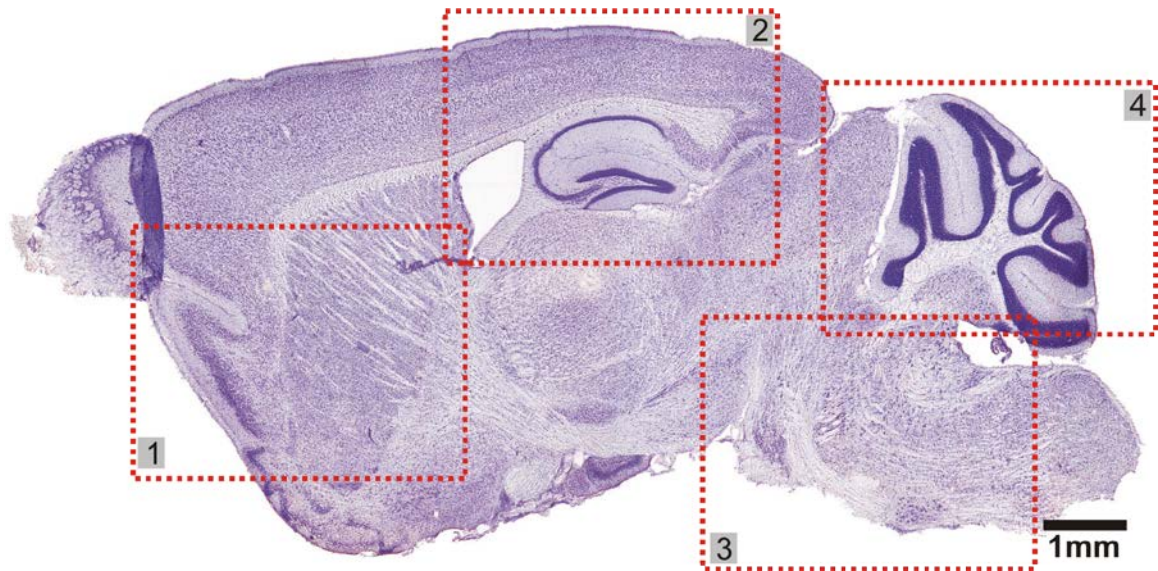


Abb. 13: Übersicht über die mikroskopisch untersuchten Hirnregionen

Das Bild zeigt einen Nissl-gefärbten Hirnschnitt einer Maus. Die gekennzeichneten Regionen entsprechen den fluoreszenzmikroskopischen Übersichtsaufnahmen in den nachfolgenden Abbildungen. Untersucht wurden eine frontale Rindenregion mit angrenzenden Basalganglien (1), der Hippokampus (2), ein Ausschnitt des Hirnstamms (3) und das Kleinhirn (4) (Abbildung modifiziert nach Paxinos und Franklin 2001, S. 296).

Von exemplarischen Bereichen dieser Hirnregionen wurden dann unter Verwendung eines 20x Objektivs Aufnahmen mit dem Fluoreszenzmikroskop erstellt, hierbei wurden die roGFP1-Fluoreszenz und die NeuN-Dylight550®-Fluoreszenz mit unterschiedlichen Wellenlängen angeregt, separat aufgezeichnet und überlagert, um das Expressionsmuster des roGFP1-Proteins genauer beurteilen zu können.

Um schließlich die Morphologie der exprimierenden Zellen und die Homogenität der Verteilung des Proteins in den Perikaryen und Fortsätzen der Zellen beurteilen zu können, wurden hochauflösende Aufnahmen der Gewebe mit einem 2-Photonen-Laser-Scanning-Mikroskop gemacht, durch das sowohl roGFP1 als auch der verwendete fluoreszierende Antikörper angeregt und die spektral aufgetrennte Emission der beiden Fluorophore mit zwei separaten Detektorkanälen aufgenommen wurde. Alle hier gezeigten Abbildungen dieser Methode entsprechen Maximalprojektionen von Z-Stapeln aus jeweils 61 Einzelbildern, die in der XY-Ebene dargestellt sind.

Die mit 1 gekennzeichnete Region (Abb. 13, 1) enthält die Strukturen des frontalen Vorderhirns, insbesondere die frontale Großhirnrinde. Eine größere Anzahl von roGFP1-exprimierenden Neuronen ist in den orbitalen Bereichen des präfrontalen Cortex (Abb. 14A) zu sehen, die nach ventral hin in die *Area piriformis* (Abb. 14A, PIR) ausläuft, in der sich dann noch vereinzelt fluoreszierende Neurone finden lassen. In den tieferliegenden Bereichen des *Caudoputamens* (Abb. 14A, CP) sind keine roGFP1-positiven Zellen auszumachen, diese Gebiete erscheinen mit Ausnahme der sie durchstoßenden Fasermassen, die etwas heller sind, dunkel.

Von den Bereichen des orbitalen Cortex (Abb. 14A, ORB) wurden vergrößerte fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen und Aufnahmen mit dem 2-Photonen-Laser-Scanning-Mikroskop angefertigt. Es fällt auf, dass trotz des deutlichen Anteils exprimierender Zellen tatsächlich nur ein Bruchteil aller vorhandenen Neurone roGFP1 enthält, wie in den Overlay-Darstellungen der gegen NeuN gefärbten Präparate sichtbar wird. Besonders kräftige und homogene roGFP1 Färbung zeigen die größeren Pyramidenzellen des Isocortex (Abb. 14C), deren teilweise kräftig leuchtenden apikalen Dendriten schon in der Übersichtsaufnahme der Region zu erahnen sind.

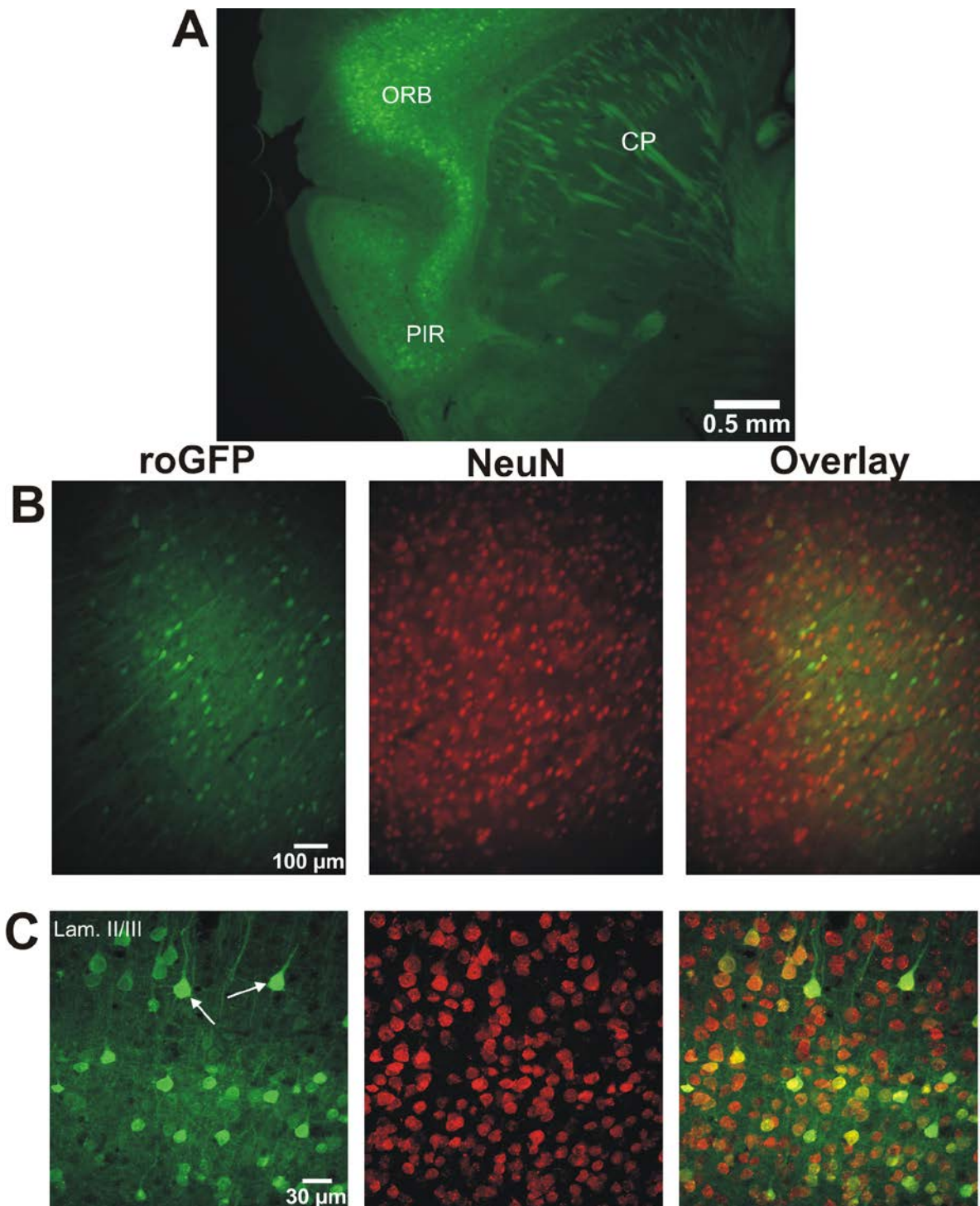


Abb. 14: Expressionsanalyse am frontalen Hirnabschnitt (adultes männliches Tier)

A) Übersichtsaufnahme mit einer CCD-Kamera durch das Fluoreszenzmikroskop: Gut sichtbar sind die orbitalen Bereiche des präfrontalen Cortex (*ORB*), Neurone in der Area piriformis (*PIR*) und das Caudoputamen (*CP*).

B) Vergrößerte Aufnahmen des in **A** als **ORB** gekennzeichneten Bereichs. V.l.n.r.: roGFP1-Fluoreszenz, Fluoreszenz des immunhistochemisch markierten neuronalen Proteins NeuN, Overlaydarstellung.

C) Aufnahmen mit dem 2-Photonen-Laser-Scanning-Mikroskop des in **A** als **ORB** markierten Bereichs. Dargestellt ist ein Ausschnitt aus der Lamina II/III (*Lam. II/III*) des Isocortex, zwei der in dieser Schicht zu findenden Pyramidenzellen, deren Apikale Dendriten gut zu erkennen sind, sind exemplarisch mit Pfeilen markiert.

Die Übersichtsaufnahme der mit 2 benannten Region (Abb. 13, 2) zeigt den Hippokampus und angrenzende Areale des Isocortex der Maus. Von der Hippokampusformation wurden höherauflösende Bilder der CA1- und CA3-Region und des Gyrus dentatus erstellt, um sie im Detail zu analysieren.

Im Bereich der CA1-Region ist im Vergleich mit den übrigen Anteilen des Gehirns die quantitativ und qualitativ größte Expression von roGFP1 festzustellen. Ein großer Teil der im *Stratum pyramidale* gelegenen Neurone (Abb. 15B; C) erscheint kräftig und homogen gefärbt und auch die ins *Stratum radiatum* verlaufenden Fortsätze der Pyramidenzellen sind in den Aufnahmen des 2-Photonen-Laser-Scanning-Mikroskops deutlich zu erkennen.

Die Pyramidenzellen der CA3-Region erscheinen schon in der Übersichtsaufnahme (Abb. 15A, CA3) bis auf wenige Ausnahmen ungefärbt. In der Fluoreszenzmikroskopie mit stärkerer Vergrößerung und den 2-Photon-Aufnahmen (Abb. 16A; B) bestätigt sich das Bild. Pro Schnittebene sind in der Regel nicht mehr als 2 bis maximal 10 roGFP1-positive Neurone in der gesamten Region darstellbar, diese sind allerdings sehr stark und homogen gefärbt und zeigen kräftige Ausläufer.

Der Gyrus dentatus erscheint in der Übersichtsaufnahme (Abb. 15A, GD) insgesamt schwächer gefärbt. In der hochauflösenden Darstellung (Abb. 16D) ergibt sich jedoch ein sehr inhomogenes Bild. Sehr wenige Körnerzellen in der *Lamina granularis* zeigen eine sehr starke Expression, viele exprimieren nur schwach oder sehr schwach, der größte Teil der Zellen aber ist ungefärbt. In der *Lamina plexiformis* finden sich wenige schwach gefärbte Zellen.

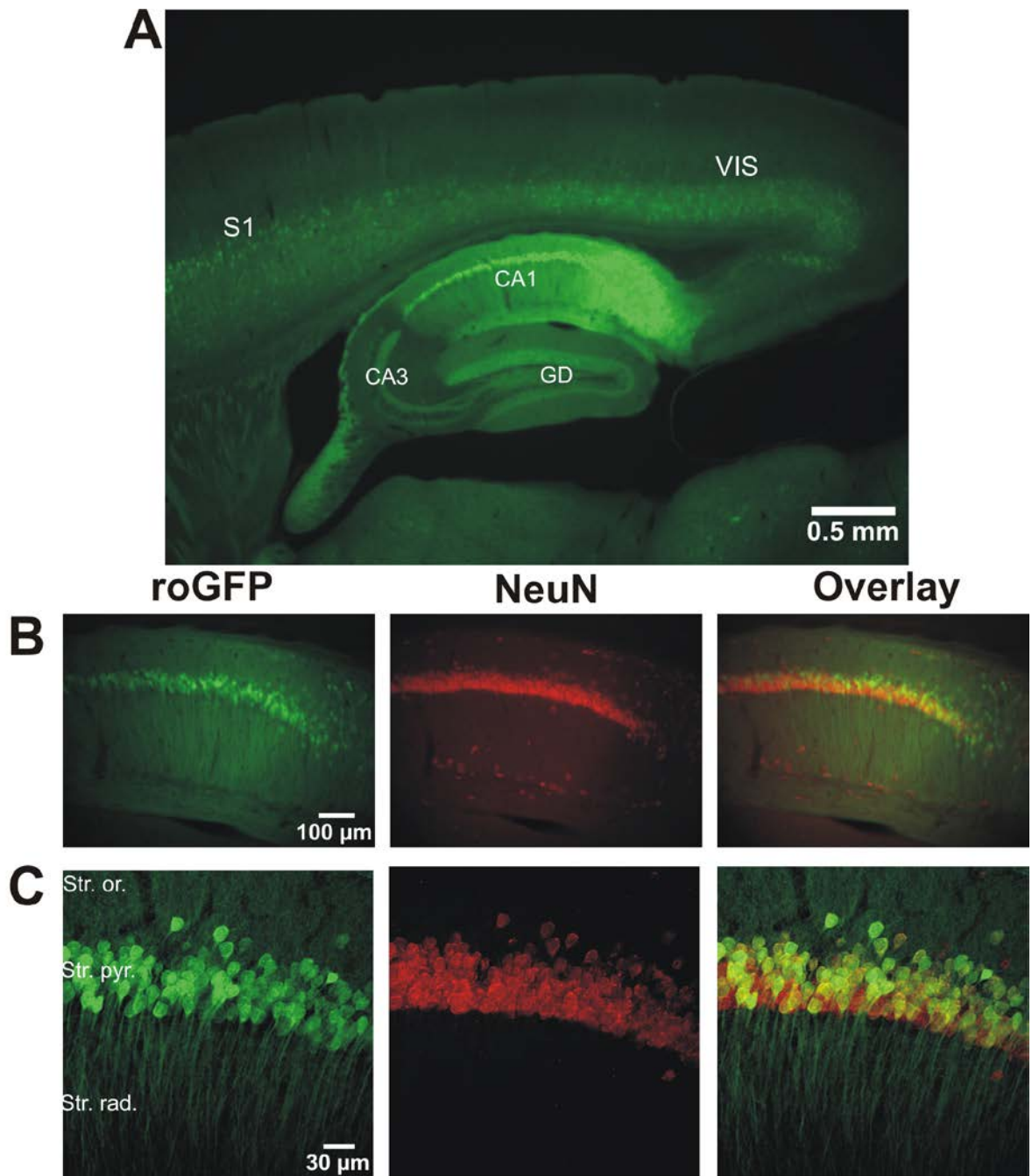


Abb. 15: roGFP1-Expression in der Hippokampusformation (adultes männliches Tier)

A) Übersichtsaufnahme mit einer CCD-Kamera durch das Fluoreszenzmikroskop: Sichtbar sind dorsal des Hippokampus die somatosensiblen Rindenareale (S1), die visuellen Rindenareale (VIS) und der Hippokampus selbst mit den Pyramidenzellen der CA1- und CA3-Region und dem Gyrus dentatus (GD).

B) Vergrößerte Aufnahmen der CA1-Region mit. V.l.n.r. : roGFP1-Fluoreszenz, Fluoreszenz des immunhistochemisch markierten neuronalen Proteins NeuN, Overlaydarstellung.

C) Aufnahmen der CA1-Region mit einem 2-Photonen-Laser-Scanning-Mikroskop: Gut zu sehen sind die kräftig gefärbten Perikaryen der Pyramidenzellen im Stratum pyramidale (Str. pyr.), deren ebenfalls gefärbte Fortsätze sich ins Stratum radiatum (Str. rad.) erstrecken. Auf der gegenüberliegenden Seite der Pyramidenzellschicht liegt das zellarme Stratum oriens (Str. or.)

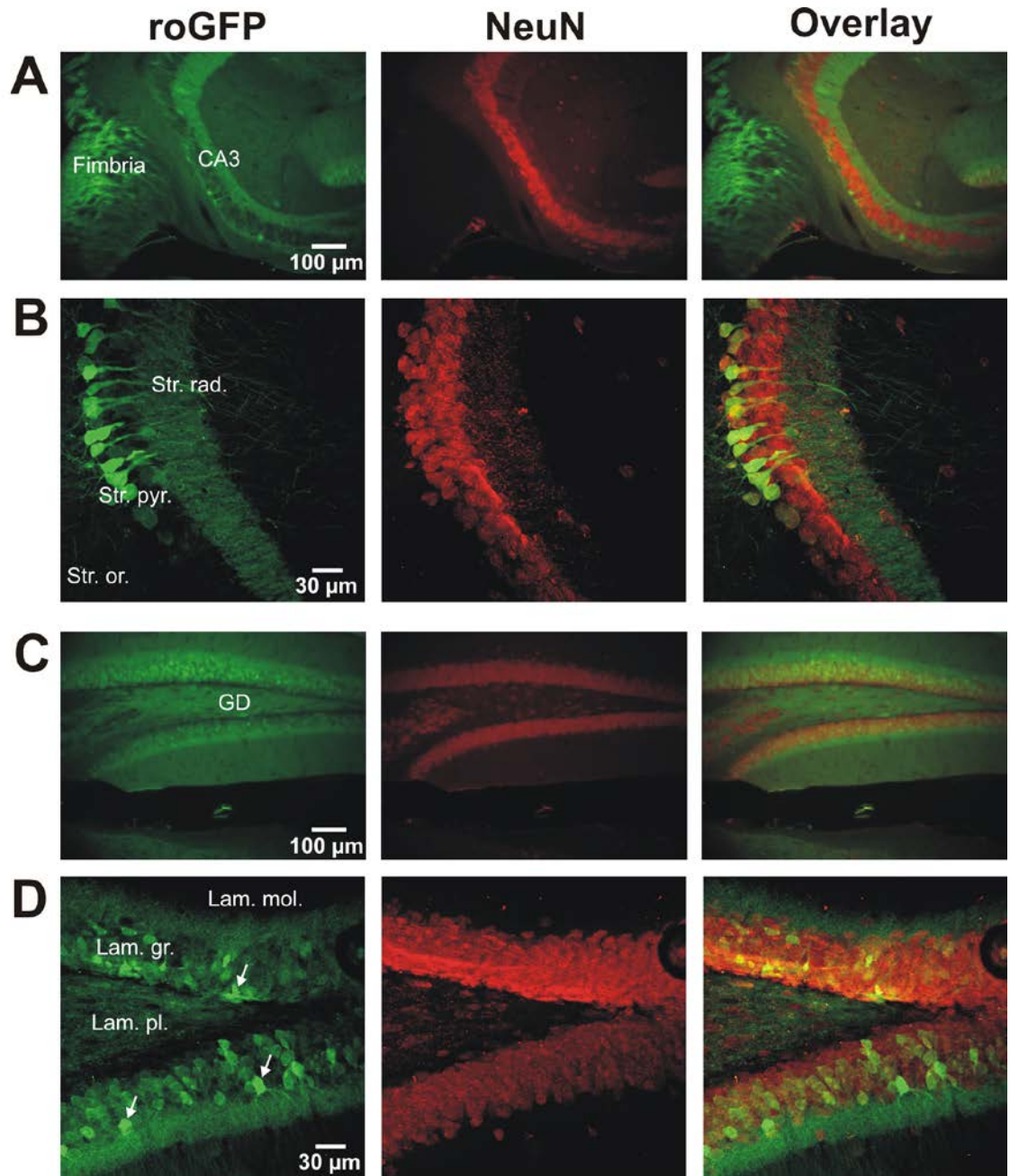


Abb. 16: roGFP1-Expression in der Hippokampusformation (Fortsetzung)

A) Dargestellt sind vergrößerte Aufnahmen der CA3-Region mit dem Fluoreszenzmikroskop.

B) In diesen Aufnahmen der CA3-Region mit dem 2-Photonen-Laser-Scanning-Mikroskop sind einige roGFP1-positive Pyramidenzellen im Stratum pyramidale (*Str. pyr.*) zu sehen, deren Fortsätze sich ins Stratum radiatum (*Str. rad.*) erstrecken, unten links das Stratum oriens (*Str. or.*).

C) Vergrößerte Aufnahmen des Gyrus dentatus mit dem Fluoreszenzmikroskop.

D) Bei den hier dargestellten Aufnahmen des 2-Photonen-Laser-Scanning-Mikroskops vom Gyrus dentatus sind besonders stark exprimierende Körnerzellen der Lamina granularis (*Lam. gr.*) mit Pfeilen versehen. Im Hilus des Gyrus dentatus sieht man die Lamina plexiformis (*Lam. pl.*), außerhalb liegt die zellarme Lamina molecularis (*Lam. mol.*).

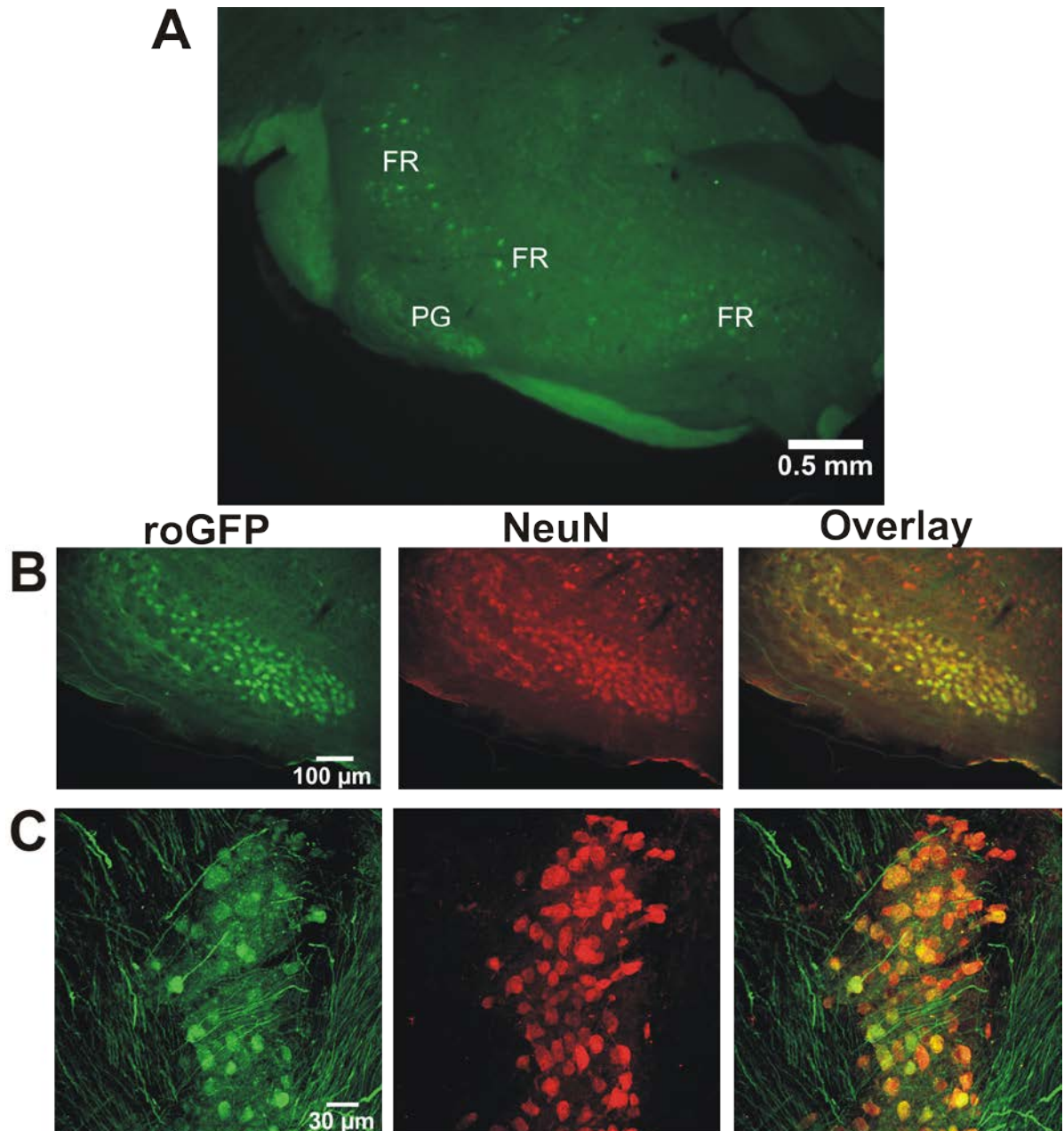


Abb. 17: roGFP1-Expression im Hirnstamm (adultes männliches Tier)

A) Fluoreszenzmikroskopische Übersichtsaufnahme der Region: Eine große Ansammlung roGFP1-positiver Zellen ist in der pontinen grauen Substanz (*PG*) zu sehen. Außerdem exprimieren einige Kerngruppen der Formatio reticularis (*FR*) über den gesamten Hirnstamm roGFP1.

B) Vergrößerte Aufnahmen der pontinen Grauen Substanz. V.l.n.r.: roGFP1-Fluoreszenz, Fluoreszenz des immunhistochemisch markierten neuronalen Proteins NeuN, Overlaydarstellung.

C) Aufnahmen des pontinen Graus mit dem 2-Photonen-Laser-Scanning-Mikroskop. Nahezu alle der vorhandenen Neurone exprimieren roGFP1, außerdem fluoreszieren die sie umgebenden Fasermassen der Pons.

Die dritte Übersichtsaufnahme (Abb. 17A) zeigt einen Ausschnitt des Hirnstamms im Bereich der Pons. Einige Kerngebiete der *Formatio reticularis* (Abb. 17A, FR) zeigen verglichen mit dem umgebenden Gewebe eine qualitativ sehr starke Expression von roGFP1. Ein Ausschnitt aus dem Bereich der *pontinen grauen Substanz* (Abb. 17A, PG) wurde wegen seiner Auffälligkeit in der Übersichtsaufnahme exemplarisch in höherer Vergrößerung und mit dem 2-Photonen-Laser-Scanning-Mikroskop dargestellt. Eine große Anzahl der Neurone, die in die ventralen Fasermassen der Pons eingebettet sind, exprimiert roGFP1 und auch die Ausläufer der Zellen und die sie umgebenden, aus Axonen bestehenden Fasern sind deutlich gefärbt (Abb. 17C).

In der Übersichtsaufnahme des Kleinhirns (Abb. 18A) scheinen die Neurone der Kleinhirnrinde nur schwach zu fluoreszieren. Bei höherer Vergrößerung (Abb. 18B; C) ist zu erkennen, dass ein nicht unerheblicher Anteil der sehr kleinen Körnerzellen des *Stratum granulosum* roGFP1 exprimieren. Allerdings ist keine einzige der großen Purkinjezellen, die im *Stratum purkinjense* zu erwarten sind, durch roGFP1 angefärbt.

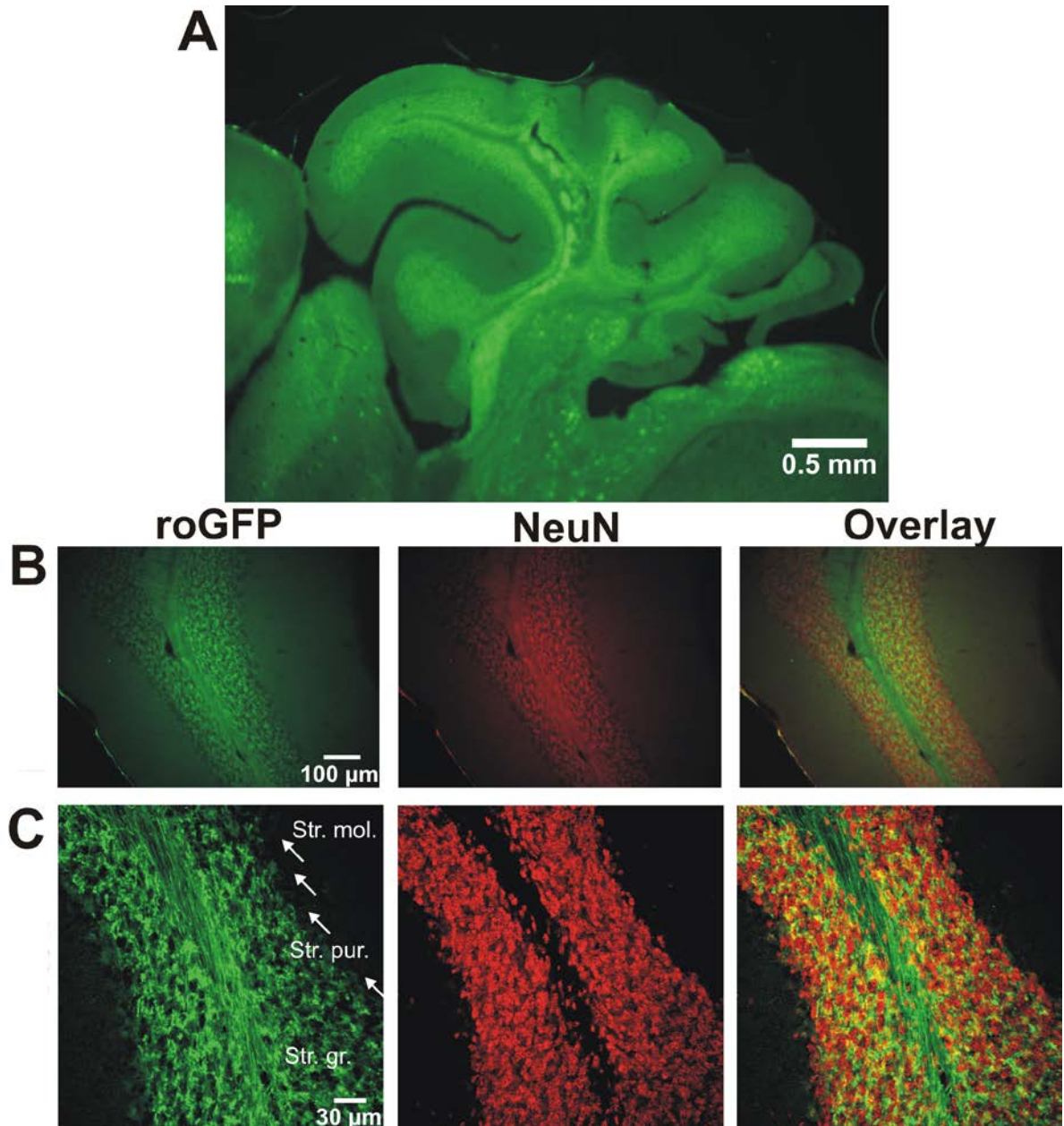


Abb. 18: roGFP1-Expressionsmuster des Kleinhirns (adultes männliches Tier)

A) Übersichtsaufnahme der Region: Die Kleinhirnrinde und ihre Schichtung sind in der Aufnahme gut auszumachen.

B) Vergrößerte Aufnahmen der Kleinhirnrinde mit einem Fluoreszenzmikroskop.

C) Aufnahmen der Kleinhirnrinde mit dem 2-Photonen-Laser-Scanning-Mikroskop: Die Körnerzellen im Stratum granulosum (*Str. gr.*) exprimieren teilweise roGFP1. Das mit Pfeilen markierte Stratum purkinjense (*Str. pur.*), in dem die großen Purkinjezellen zu erwarten wären, zeigt in keiner der Aufnahmen fluoreszente Neurone. Außen ist das zellarme Stratum moleculare (*Str. mol.*) zu sehen.

Da alle Tiere bei ihrer Untersuchung mindestens 35 Tage alt waren, wurden, um eine auch in jüngeren Stadien zu erwartende Expression des roGFP1-Proteins zu bestätigen, akute Hirnschnitte jeweils einer männlichen und einer weiblichen zehn Tage alten Maus mit dem 2-Photonen-Laser-Scanning-Mikroskop untersucht (Abb.19). Abgebildet wurden die CA1-, CA3- und Gyrus-dentatus-Region des Hippokampus und ein Ausschnitt der Großhirnrinde. Die Tiere zeigten auch in diesem jungen Alter ein Expressionsmuster, das dem der adulten Tiere glich. Bei diesen Tieren sind trotz identischer Untersuchungsmethode deutlich detail- und kontrastreichere Aufnahmen entstanden als bei den älteren Exemplaren, sodass die Neurone und ihre Fortsätze sehr viel distinkter dargestellt wurden.

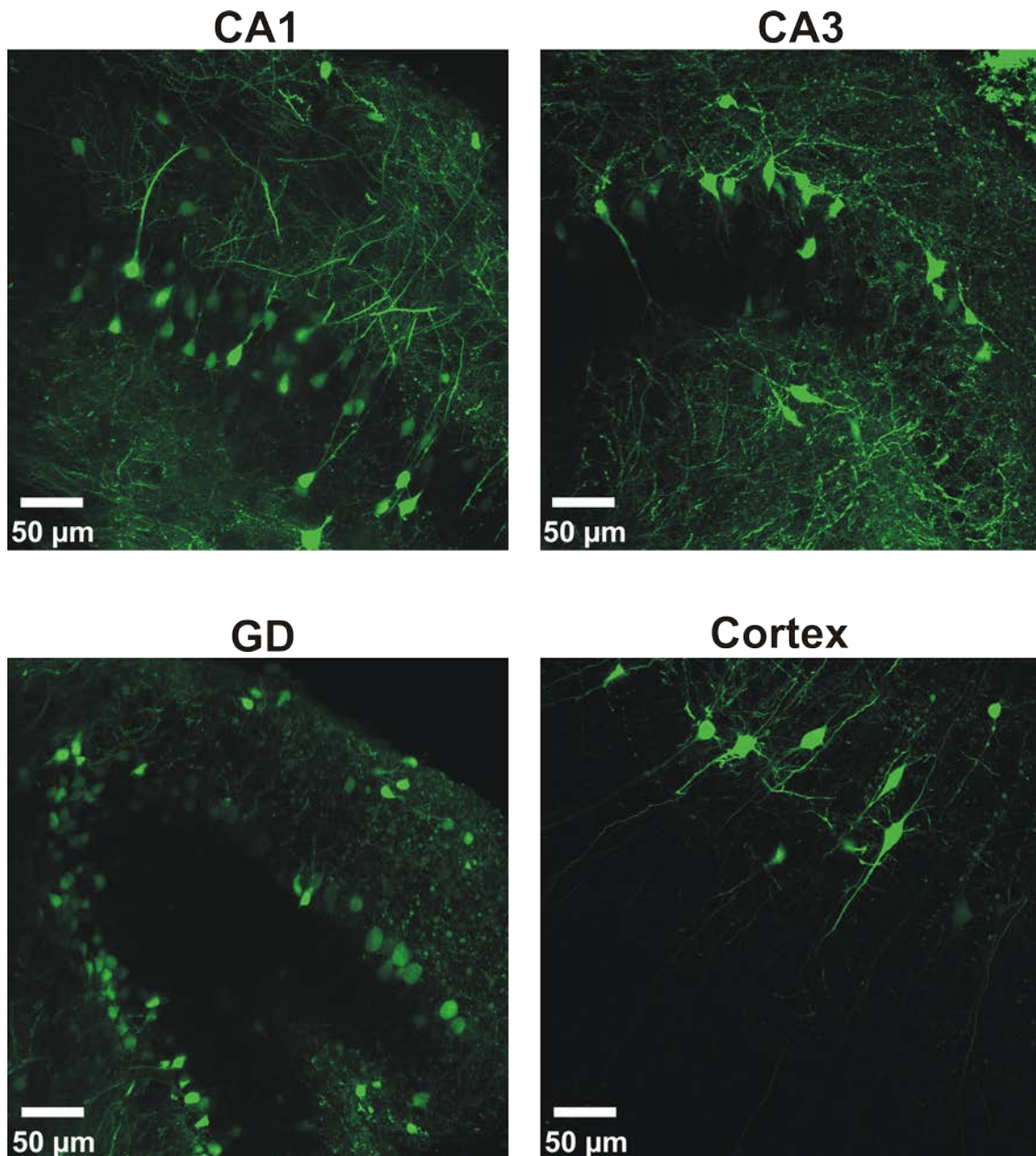


Abb. 19: roGFP1-Expressionsmuster ausgewählter Hirnregionen eines 10 Tage alten männlichen Tieres

Die Aufnahmen wurden mit einem 2-Photonen-Laser-Scanning-Mikroskop erstellt. Dargestellt sind eine Aufnahme der CA1-Region des Hippokampus (CA1), eine Aufnahme der CA3-Region des Hippokampus (CA3), eine Aufnahme des Gyrus dentatus (GD) und eine Aufnahme der Großhirnrinde (Cortex). Das 10 Tage alte Tier zeigt ein ähnliches Expressionsmuster wie die adulten Tiere, allerdings ist der Kontrast der Aufnahmen des transluzenten jungen Gehirns deutlich höher.

3.4 Prüfung der Redox-Sensitivität des exprimierten roGFP1

Das Protein roGFP1, das in 2004 an der University of Oregon entwickelt worden war, sollte zuverlässig und weitestgehend unabhängig von äußeren Einflüssen wie dem pH-Wert und schwankenden Ionenkonzentrationen in der umgebenden Lösung als fluoreszenter Redox-Indikator dienen (Dooley et al. 2004, Hanson et al. 2004). Dass es dazu in transfizierten Kulturen hippokampaler Zellen und Schnitte in der Lage ist, wurde von anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Müller bereits bestätigt (Funke et al. 2011, Großer et al. 2012). Um nun sicherzugehen, dass auch das von den transgenen Tieren in ihren Neuronen exprimierte Protein redoxsensitiv ist, wurde die Reaktion des Proteins auf starke Oxidations- und Reduktionsmittel und auch auf endogen erzeugte reaktive Sauerstoffspezies getestet.

Alle Untersuchungen zur Prüfung der Redox-Sensitivität wurden an akuten Hirnschnitten von mindestens drei verschiedenen adulten Tieren pro Hirnregion in vier unterschiedlichen Hirnregionen durchgeführt: Im Hippokampus an den Pyramidenzellen der CA1-Rindenregion, den Pyramidenzellen der CA3-Rindenregion, den Körnerzellen des Gyrus dentatus und an Neuronen der Großhirnrinde.

3.4.1 Kalibrierung des roGFP1-Antwortbereichs

Die zytosolische Expression des Redox-Indikators roGFP1 lässt Rückschlüsse auf den Oxidationszustand des Zytosols der Zelle zu, da das Protein ins Redox-Puffersystem der Zelle eingebunden ist und sich dementsprechend Veränderungen des Oxidationszustandes der Zelle auch auf den Oxidationszustand der für die Änderung der Fluoreszenzemission kritischen Thiol-Gruppen beziehungsweise Disulfidbrücken seiner beiden Cystein-Reste auswirken (Hanson et al. 2004).

Um semiquantitative Aussagen über den Oxidationszustand einer roGFP1-

exprimierenden Zelle treffen zu können, muss zunächst die maximal mögliche Antwort des Proteins in beide Richtungen – das heißt sowohl bei Oxidation als auch bei Reduktion – bestimmt werden, um so den roGFP1-Antwortbereich zu kalibrieren. Diese Kalibrierung ist bereits an Schnitt- und Zellkulturen etabliert (Hirt 2013, Hanson et al. 2004, Funke et al. 2011, Großer et al. 2012). Sie erfolgt durch Gabe von Sättigungsdosen von H_2O_2 (5 mM) und DTT (10 mM). Dabei wird angenommen, dass unter Einwirkung von H_2O_2 das gesamte roGFP1 der Zellen oxidiert wird. Die dabei gemessenen Maxima werden als oberes Ende des roGFP1-Antwortbereichs (*100% oxidiert*) definiert. Ebenso wird davon ausgegangen, dass unter Einwirkung von DTT das gesamte roGFP1 der Zellen reduziert wird, sodass die dabei gemessenen Minimalwerte als unteres Ende (*0% oxidiert*) des roGFP1-Antwortbereichs festgelegt werden können.

Da die Experimente jeweils an einer größeren Anzahl akuter Hirnschnitte durchgeführt wurden und in jedem Hirnschnitt und jeder Hirnregion eine unterschiedliche Anzahl vitaler Neurone roGFP1 exprimierten, ist die Anzahl der untersuchten Zellen für jede der vier Hirnregionen und jede der beiden applizierten Substanzen unterschiedlich.

Zunächst wurde das Antwortverhalten des exprimierten roGFP1 bei Oxidation überprüft, indem die Schnitte für 3 Minuten mit 5 mM Wasserstoffperoxid umspült wurden. In allen untersuchten Regionen führte H_2O_2 zu einem raschen Anstieg der roGFP1-Ratio, der zumindest innerhalb des Untersuchungszeitraums von ungefähr 25 Minuten nur teilweise reversibel war (Abb. 20A)

Der nach Applikation von H_2O_2 gemessene maximale Anstieg in der Fluoreszenz-Ratio F395 nm/F470 nm wurde auf einen Mittelwert der 50 s vor Applikation gemessenen Baseline bezogen und daraus der prozentuale Anstieg der Fluoreszenz-Ratio errechnet (Abb. 20B).

In den CA1-Pyramidenzellen lag die Grundlinie der roGFP1-Fluoreszenz bei $1,18 \pm 0,04$, der maximale Anstieg erreichte $2,25 \pm 0,13$, was einem prozentualen Anstieg um $91,2 \pm 9,92\%$ ($n=19$) entsprach. In den Körnerzellen des Gyrus dentatus lag die Grundlinie der roGFP1-Fluoreszenz bei $1,24 \pm 0,07$, der maximale Anstieg erreichte $2,46 \pm 0,13$, was einem prozentualen Anstieg um $98,21 \pm 17,55\%$

(n=15) entsprach. Die untersuchten Zellen der CA1-Region und des Gyrus dentatus zeigten den stärksten Anstieg der roGFP1-Fluoreszenzratio. In den CA3-Pyramidenzellen lag die Grundlinie der roGFP1-Fluoreszenz bei $1,37 \pm 0,09$, der maximale Anstieg erreichte $1,84 \pm 0,12$, was einem prozentualen Anstieg um $34,93 \pm 7,23\%$ (n=17) entsprach, in dieser Region wurde der schwächste Anstieg der roGFP1-Fluoreszenzratio bei H_2O_2 -Applikation gemessen. In den Neuronen des Cortex lag die Grundlinie der roGFP1-Fluoreszenz bei $1,17 \pm 0,08$, der maximale Anstieg erreichte $2,04 \pm 0,13$, was einem prozentualen Anstieg von $74,4 \pm 14,77\%$ (n=13) und damit einem mittelstarken Anstieg der roGFP1-Fluoreszenzratio entsprach.

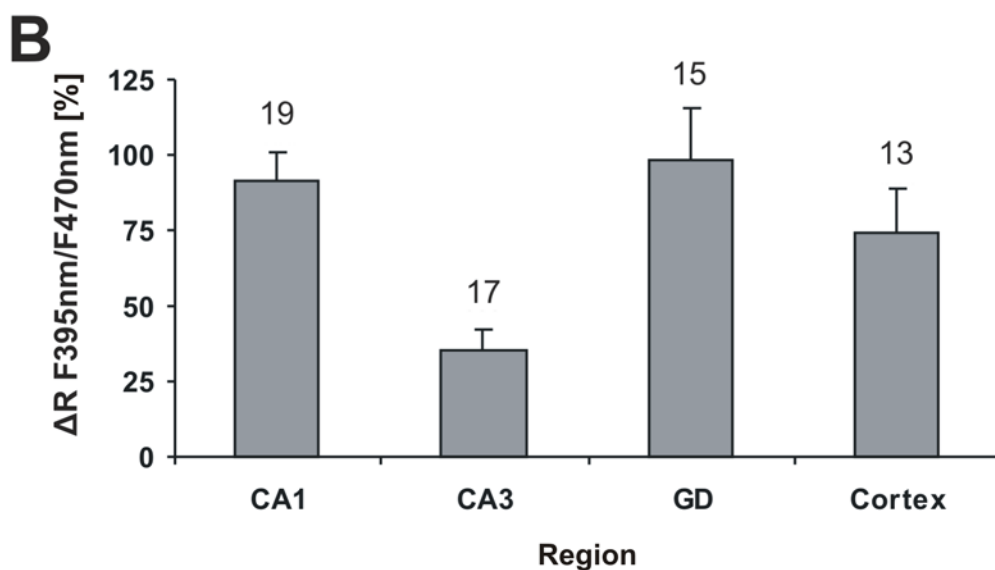
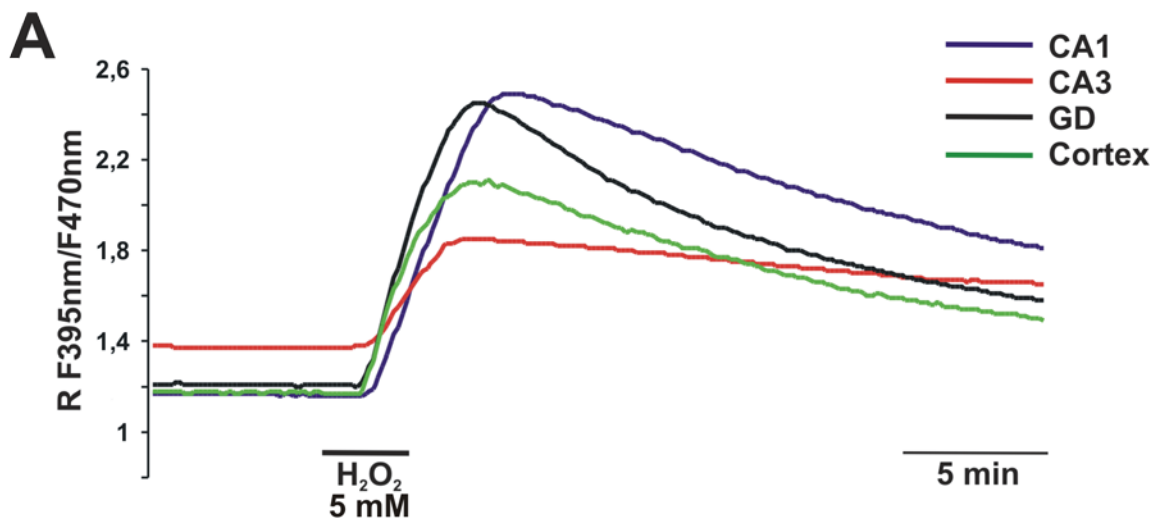


Abb. 20: Reaktionen verschiedener Hirnregionen auf Oxidation durch H₂O₂

A) Diese beispielhaften Spuren stellen die Zunahme in der Fluoreszenz-Ratio von roGFP1 bei Oxidation des Hirngewebes durch Wasserstoffperoxid (H₂O₂) dar. Sie wurden an akuten Hirnschnitten adulter Tiere bei Applikation von 5 mM H₂O₂ für 3 Minuten gemessen. Aufgetragen sind exemplarische Reaktionen der CA1-Pyramidenzellen (CA1), der CA3-Pyramidenzellen (CA3), der Körnerzellen des Gyrus dentatus (GD) und der Neurone der Großhirnrinde (Cortex).

B) Das Diagramm zeigt die relativen Veränderungen der roGFP1-Fluoreszenz-Ratio nach Gabe von H₂O₂. Die gemessene Fluoreszenz-Ratio stieg in allen Hirnregionen nach Applikation des Oxidationsmittels deutlich im Vergleich zur vorher gemessenen Baseline an. Da man bei Verwendung einer so hohen Dosis von H₂O₂ davon ausgehen kann, dass das gesamte in den Zellen vorhandene roGFP1 oxidiert ist, wurden die bei diesen Messungen bestimmten Maxima der jeweiligen Hirnregion als obere Grenze des roGFP1-Antwortbereichs festgelegt.

Um das Verhalten des Redox-Indikators bei Reduktion zu prüfen, wurden die Hirnschnitte für 3 Minuten mit 10 mM Dithiothreitol umspült. Der Effekt des DTT wurde auf die 50 s zuvor gemessene Baseline normiert. In allen untersuchten Regionen führte die Applikation von DTT zu einem Abfallen der roGFP1-Fluoreszenzratio, das sich während des ungefähr 25 minütigen Untersuchungszeitraums nicht vollständig erholte.

In den CA1-Pyramidenzellen des Hippokampus lag die Baseline der Fluoreszenz-Ratio bei $1,17 \pm 0,04$, das nach Gabe von DTT beobachtete Minimum erreichte $1,01 \pm 0,02$ und entsprach damit einem Abfallen der Ausgangs-Ratio um $13,58 \pm 2,42\%$ (n=30). In den CA3-Pyramidenzellen lag die Baseline bei $1,35 \pm 0,09$ und fiel nach Applikation von DTT auf $1,11 \pm 0,05$ und damit um $18,04 \pm 2,67\%$ (n=14). In den Körnerzellen des Gyrus dentatus betrug die roGFP1-Grundlinie bei diesen Messungen $1,21 \pm 0,06$, fiel bei Applikation von DTT auf $1,02 \pm 0,01$ und damit um $15,93 \pm 3,85\%$ (n=20). In den Neuronen der Großhirnrinde lag die roGFP1-Grundlinie anfänglich bei $1,19 \pm 0,07$ und fiel nach der Applikation von DTT auf $1,00 \pm 0,02$, was einem prozentualen Abfall um $15,64 \pm 3,54\%$ entsprach (n=15).

Da durch die Reduktion mit DTT nur deutlich geringere Veränderungen der roGFP1-Fluoreszenzratio provoziert werden konnten als durch die Oxidation mit H₂O₂, wird bereits an diesem Punkt ersichtlich, dass das Redox-Gleichgewicht der Zelle unter basalen Bedingungen stärker auf der Seite der reduzierenden, als der oxidierenden Einflüsse liegt.

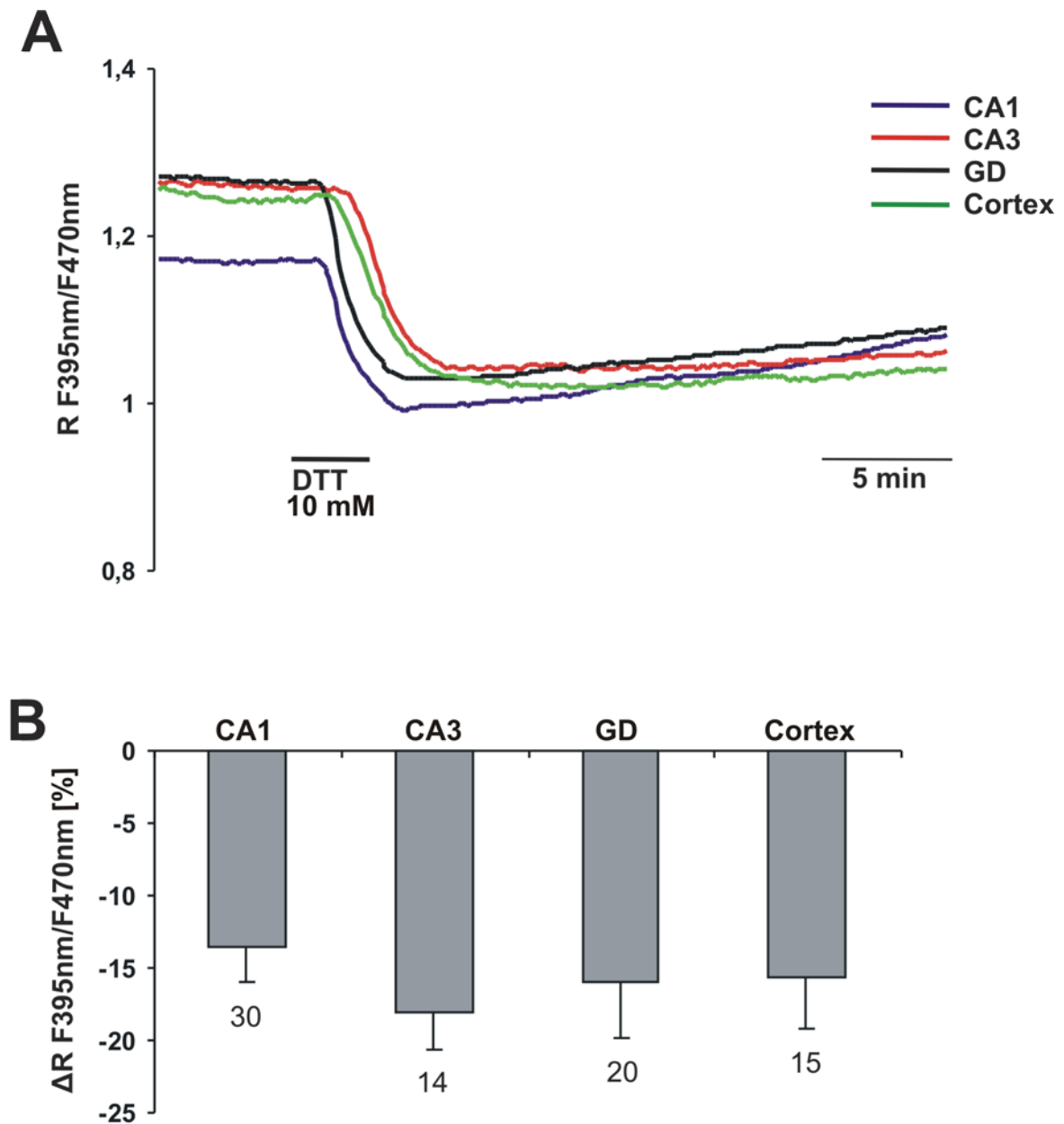


Abb. 21: Reaktionen verschiedener Hirnregionen auf Reduktion durch DTT

A) Gezeigt sind Beispielspuren der roGFP1-Fluoreszenz-Ratio der vier untersuchten Hirnregionen bei Reduktion des Hirngewebes durch Dithiothreitol (DTT). Hier wurde an akuten Hirnschnitten adulter Tiere gemessen, die mit 10 mM DTT für 3 Minuten behandelt worden waren. Da die eingesetzte Dosis des Reduktionsmittels sehr hoch war, sollte das gesamte roGFP1 reduziert worden sein.

B) In dem Diagramm sind die relativen Veränderungen der roGFP1-Fluoreszenz-Ratio nach DTT-Applikation in den einzelnen Hirnregionen dargestellt. In allen vier Regionen sank die Ratio nach Gabe des Reduktionsmittels im Vergleich zur vorher gemessenen Baseline. Die bei diesen Messungen bestimmten absoluten Minima wurden als untere Grenze des roGFP1-Antwortbereichs in den jeweiligen Hirnregionen festgelegt.

Es ergaben sich also für die roGFP1-Fluoreszenz-Ratio der verschiedenen Hirnregionen unterschiedliche Antwortbereiche (Abb. 22). In den CA1-Pyramidenzellen reichte die provozierbare Antwort von $1,01 \pm 0,02$ (0% oxidiert, n=30) bis $2,25 \pm 0,13$ (100% oxidiert, n=19). Für die Körnerzellen des Gyrus dentatus ergab sich ein Antwortbereich von $1,02 \pm 0,01$ (0% oxidiert, n=20) bis $2,46 \pm 0,13$ (100% oxidiert, n=15), damit zeigten diese beiden Areale den größten Antwortbereich aller untersuchten Hirnregionen. Den kleinsten Antwortbereich zeigten die CA3-Pyramidenzellen mit einem Minimum von $1,11 \pm 0,05$ (0% oxidiert, n=14) und der maximal provozierbaren Antwort von $1,84 \pm 0,12$ (100% oxidiert, n=17). Die Neurone der Großhirnrinde zeigten insgesamt einen mittelgroßen Antwortbereich zwischen $1,00 \pm 0,02$ (0% oxidiert, n=15) und $2,04 \pm 0,13$ (100% oxidiert, n=13).

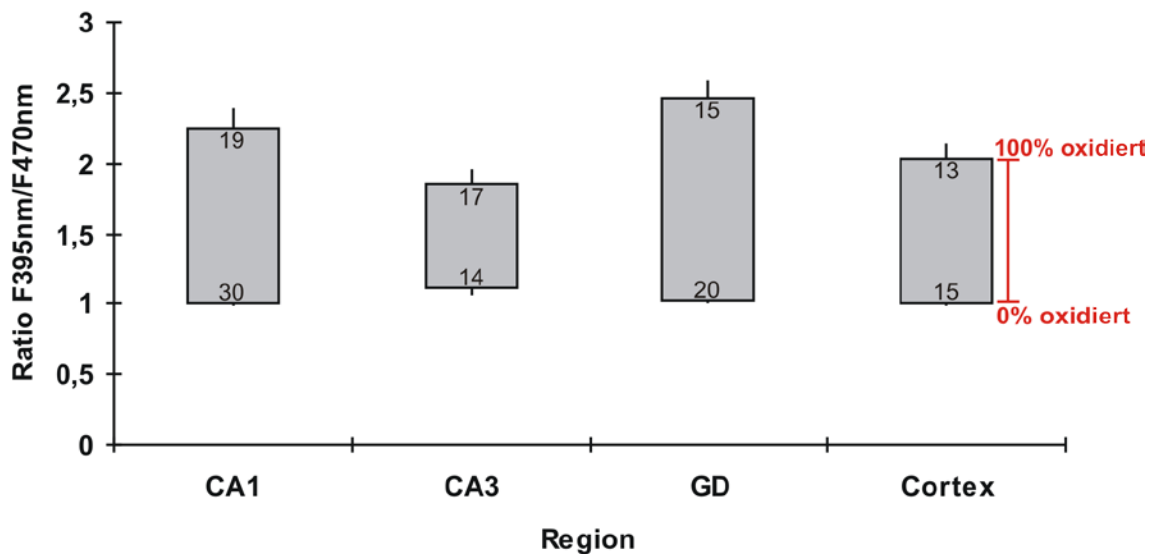


Abb. 22: Kalibrierung des roGFP1-Antwortbereichs verschiedener Hirnregionen

Die maximal mögliche Oxidation (100% oxidiert) von roGFP1 im Zytosol der Neurone wurde bei Applikation einer Sättigungsdosis (5 mM) H_2O_2 auf die Hirnschnitte bestimmt. Die maximale Reduktion (0% oxidiert) wurde bei Applikation einer Sättigungsdosis (10 mM) DTT bestimmt. Für jede untersuchte Hirnregion wurde ein individueller Antwortbereich von roGFP1 bestimmt.

3.4.2 Quantifizierung der relativen Baseline-Oxidation

Mit Hilfe der kalibrierten roGFP1-Antwortbereiche kann der relative Oxidationszustand einer Zelle ausgehend von der roGFP1-Baseline nun beschrieben werden. Dazu wird aus den gemessenen Baselinewerten und ihrer Lage im roGFP1-Antwortbereich der jeweiligen Hirnregion das Verhältnis von oxidiertem zu reduziertem roGFP1 (*relative Baseline-Oxidation*) in den Zellen bestimmt.

Für die CA1-Pyramidenzellen ergab sich in akuten Hirnschnitten adulter Tiere eine relative Baseline-Oxidation von $13,1 \pm 3,0$ % (n=49), für die CA3-Pyramidenzellen ergaben sich $34,5 \pm 11,9$ % (n=31), für die Körnerzellen des Gyrus dentatus ergaben sich $14,5 \pm 4,7$ % (n=34) und für die Neurone der Großhirnrinde $17,4 \pm 6,9$ % (n=28). Der Unterschied in der Baseline-Oxidation der CA3-Pyramidenzellen erwies sich als signifikant erhöht ($p < 0,05$) gegenüber den anderen drei untersuchten Regionen (Abb. 23).

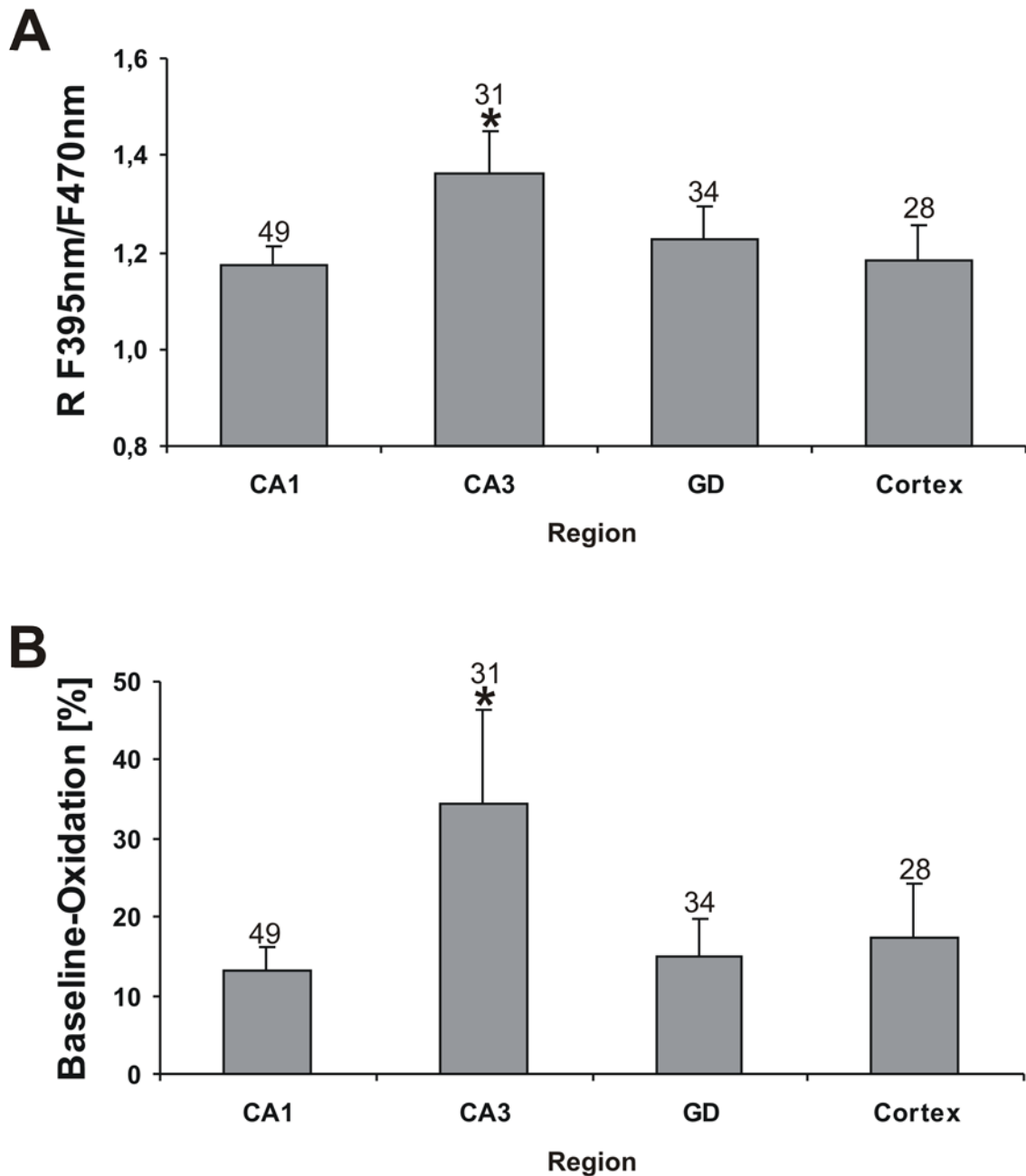


Abb. 23: Unterschiedlicher Baseline-Oxidationszustand von roGFP1 in verschiedenen Hirnregionen

A) Hier sind die absoluten Werte für die Baseline der roGFP1-Fluoreszenzratio dargestellt, die aus allen untersuchten Zellen gemittelt wurden. Die Pyramidenzellen der CA3-Region zeigen unter Ruhebedingungen ein signifikant höheres Oxidations-Grundniveau als die anderen Hirnregionen.

B) Aus den in den vier Hirnregionen gemessenen Baseline-Ratios wurden mit den kalibrierten roGFP1-Antwortbereichen Unterschiede im Gleichgewicht von oxidiertem zu reduziertem zytosolischem roGFP1 berechnet (*relative Baseline-Oxidation*). Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied zu den drei anderen getesteten Regionen in den CA3-Pyramidenzellen des Hippokampus in der Baseline-Oxidation der Neurone.

3.4.3 Veränderung der endogenen ROS-Produktion durch Anoxie

Um eine Beeinflussbarkeit der roGFP1-Oxidation auch durch endogene Veränderung der ROS-Produktion nachzuweisen, wurden die akuten Hirnschnitte Episoden von zehn Minuten Anoxie und anschließender zehnmütiger Reoxygenierung ausgesetzt und währenddessen die roGFP1-Fluoreszenzratio bestimmt. Nach zehn Minuten Anoxie und weiteren zehn Minuten Reoxygenierung zeigte sich in allen vier beobachteten Hirnregionen ein signifikanter Anstieg in den roGFP1-Fluoreszenzratios (Abb. 24). In den CA1-Pyramidenzellen stieg die Fluoreszenz-Ratio bei Anoxie um $6,2 \pm 3,9\%$ und nach zehnmütiger Reoxygenierung weiter auf $13,6 \pm 6,6\%$ über dem Baseline-Niveau ($n=8$). Die CA3-Pyramidenzellen zeigten nach der Anoxie-Episode einen Anstieg der roGFP1-Ratio um $6,8 \pm 1,4\%$ und nach der Reoxygenierungs-Phase um $17,0 \pm 3,1\%$ ($n=6$). In den Körnerzellen des Gyrus Dentatus stieg die roGFP1-Fluoreszenz-Ratio nach den zehn Minuten der Anoxie um $6,3 \pm 2,6\%$ und nach den zehn Minuten der Reoxygenierung um $13,7 \pm 4,7\%$ ($n=9$). Die Neurone des Cortex zeigten nach zehn Minuten Anoxie einen Anstieg der Fluoreszenz-Ratio um $5,1 \pm 3,5\%$ und nach der Reoxygenierung um $10,8 \pm 2,9\%$ ($n=8$).

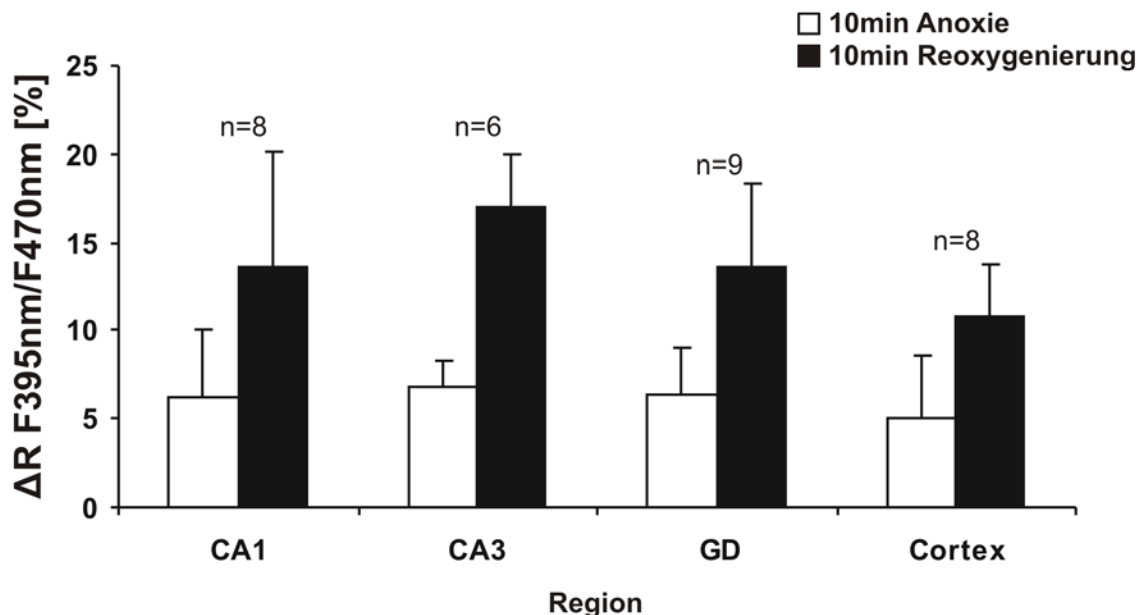


Abb. 24: Reaktion des Redox-Indikators roGFP1 auf Anoxie und anschließende Reoxygenierung

Das Diagramm zeigt den prozentualen Anstieg der roGFP1-Ratio in den vier Hirnregionen nach 10 min Anoxie und nach 10 weiteren Minuten der Reoxygenierung. Die Veränderungen waren in allen Regionen signifikant gegenüber der gemessenen Baseline. Die roGFP1-Ratio stieg bei der Messung nach 10 Minuten Anoxie und nach weiteren 10 Minuten der Reoxygenierung in den beobachteten Hirnregionen an.

4 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine neue transgene Mauslinie mit neuronenspezifischer Expression des optischen Redox-Indikators roGFP1 eingehend untersucht. Dabei wurde sowohl der allgemeine Gesundheitszustand der Mäuse bewertet als auch das Expressionsmuster des Transgens detailliert charakterisiert und die Reaktion des exprimierten Proteins auf reduzierende und oxidierende Stimuli überprüft.

Da bei der pränukleären Injektion des Thy1.2-roGFP1c-DNA-Konstrukts in die befruchtete Eizelle der Maus - dem gewählten Verfahren zur Generierung der transgenen Tiere - unvorhersehbare Veränderungen des Phänotyps der Mäuse durch den zufälligen Integrationsort des Transgens ins Genom auftreten können (Ohtsuka et al. 2010), wurden möglichst vielfältige Testverfahren angewendet, um den allgemeinen Gesundheitszustand der transgenen Tiere zuverlässig bewerten zu können. Im Speziellen wurde die Gewichtszunahme der Tiere im Verlauf ihres Wachstums beobachtet, und es wurden der Hämatokrit und die Blutglukosekonzentration bestimmt. Ferner wurden das Explorationsverhalten und die motorischen Fähigkeiten durch Tests mit dem Rota-Rod® und einen Open-Field-Test bewertet.

Die Wachstumskurven sowohl der männlichen als auch der weiblichen transgenen Mäuse gleichen denen ihrer Wildtyp-Geschwister, es zeigte sich also keine Beeinträchtigung von Wachstum oder Futteraufnahme durch das Transgen. Die vorübergehende Stagnation der Gewichtszunahme zwischen Tag 15 und 21 ist höchstwahrscheinlich darin begründet, dass die Tiere in diesem Alter abgesetzt, das heißt von ihrem Muttertier getrennt und nach Geschlechtern sortiert in neue Käfige gesetzt wurden und sie in dieser Umgewöhnungsphase weniger Futter aufnahmen. Dass z.B. die C57BL/6J-Wildtyp-Mäuse in Indianapolis bei nahezu identischen Haltungs- und Fütterungsbedingungen nahezu identische Wachstumskurven zeigen (Joshi et al. 2006), legt nahe, dass alle Genotypen dahingehend gesund sind. In der Körperlänge der Tiere, die um den 55. Entwicklungstag bestimmt wurde, zeigte sich ebenfalls kein Unterschied zwischen transgenen Tieren und Wildtypen. Der Hämatokrit der vier Untersuchungsgruppen

lag mit Mittelwerten zwischen 43 und 45% in einem Bereich, der für gesunde C57BL/6J-Mäuse normal ist (Regulier et al. 1998).

Bei der Bestimmung der Blutglukose trat eine relativ große Standardabweichung auf, die bis zu 20% des Messwertes betrug. Die große Streuung der Messwerte kam wahrscheinlich zustande, weil die Mäuse bis wenige Minuten vor der Blutzuckermessung freien Zugang zu Futter hatten und deshalb genauso an Mäusen gemessen wurde, die erst kurz zuvor gefressen hatten, wie auch an Tieren, die schon seit einigen Stunden nüchtern waren, da sie zum Beispiel geschlafen hatten. Dieses Problem könnte umgangen werden, indem den Tieren einige Stunden vor der Blutzuckermessung oder über Nacht der Zugang zu Futter verwehrt wird, wie Banerjee und Kollegen es bei ihren Messungen taten (Banerjee et al. 2004). Da die Messwerte aller Gruppen aber ähnlich stark streuten, ist nicht von einer bedeutenden Beeinträchtigung des Untersuchungsergebnisses auszugehen. Hier ließen sich keine Unterschiede im Blutglukosespiegel zwischen den Wildtyp-Tieren und den transgenen Mäusen feststellen.

Um die motorischen Fähigkeiten und das Lernvermögen der transgenen Mäuse bewerten zu können, wurden die transgenen Tiere und ihre Geschwister an drei aufeinander folgenden Tagen auf dem Rota-Rod® beobachtet. Der erste Tag des Tests sollte als Habituation für die Tiere dienen, damit sie sich an die Situation gewöhnen konnten. Der motorische Lernzuwachs der Tiere sollte sich dann in einer Verlängerung der Laufleistung vom zweiten auf den dritten Tag zeigen. Es zeigten sich zwar keine Unterschiede zwischen beiden Genotypen an den einzelnen Tagen, dennoch hatten nur die männlichen transgenen Mäuse einen signifikanten Lernzuwachs vom zweiten auf den dritten Tag der Untersuchung. Warum sowohl die männlichen Wildtypen als auch die beiden weiblichen Genotypen keinen motorischen Lernzuwachs zeigten, bleibt ungeklärt.

Bei den weiblichen Tieren stellt sich die Situation etwas anders dar: Die weiblichen transgenen Tiere hatten an jedem Tag eine signifikant längere Laufzeit auf dem Rota-Rod® als ihre Wildtyp-Geschwister, aber beide Gruppen zeigten keinen signifikanten Lernzuwachs während des Tests. Dass die transgenen Weibchen offenbar eine bessere Koordinationsfähigkeit besitzen, erscheint verwunderlich, da bisher nicht beschrieben wurde, dass sich eine pränukeäre Injektion eines

Reportergens positiv auf die motorischen Fähigkeiten der transgenen Tiere auswirkt und sie zudem keine entsprechenden Änderungen ihrer Aktivität in den Open-Field-Tests zeigten.

Mit dem Open-Field-Test, einem in der in dieser Arbeit verwendeten Form recht einfachen Verhaltenstest, sollten etwaige Auffälligkeiten im Bewegungs- und Explorationsverhalten der transgenen Tiere gefunden werden. In Bewegungsmuster, Geschwindigkeit und zurückgelegter Strecke im Open-Field waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den transgenen und den Wildtyp-Tieren zu erkennen. Da die Tiere auch beim Handling in der Haltung und für die Versuche und im Umgang mit ihren Artgenossen ein absolut normales Mäuse-Verhalten zeigten, ist davon auszugehen, dass sich das Transgen nicht auf das Explorationsverhalten der Mäuse auswirkt.

In der Literatur wird dazu geraten, zur Generierung einer neuen transgenen Tierlinie wegen des unsicheren Ergebnisses und der schlechten Vorhersagbarkeit der Expression mehrere Foundertiere zu generieren und parallel zu untersuchen (Jasin et al. 1996, Ohtsuka et al. 2010). Ursprünglich waren 10 potentielle Foundertiere generiert worden, von denen drei als transgen bestätigt werden konnten und in die Verpaarung gebracht wurden. Diese Tiere waren in der Lage, das Transgen an die nächste Generation zu vererben. Da aber eines der beiden männlichen Tiere früh gestorben war und das einzige weibliche Foundertier nur eine sehr geringe Anzahl an Nachkommen produzierte, beschränkte sich diese Arbeit auf die Charakterisierung der verbliebenen Founderlinie, die allerdings den erwarteten Anforderungen vollständig gerecht wird. Das redox-sensitive Konstrukt ist funktionell und zeigt gute Expressionslevel, eine weite Verteilung in Hippokampus und Cortex und v.a. in der CA1-Region ist es stark exprimiert. Nach den Erfahrungen anderer Forscher, die auch mit dem gewählten Verfahren arbeiteten, handelt es sich hierbei um einen sehr glücklichen Zufall, da auch Tiere komplett ohne adäquate Expression oder stabile Vererbung des Transgens hätten entstehen können (Caroni 1997, Feng et al. 2000, Ohtsuka et al. 2010).

Das gefundene Expressionsmuster des roGFP1 in den Neuronen der transgenen Tiere stellt sich wie folgt dar: Im Hippokampus exprimiert der größte Teil der CA1-Pyramidenzellen roGFP1 mit einem starken Fluoreszenzsignal. Eine geringe

Expression ist in den CA3-Pyramidenzellen und eine variable Expression in den Körnerzellen des Gyrus dentatus, von denen ein großer Teil schwach und eine geringe Anzahl stark roGFP1-positiv ist, zu finden. In der grauen Substanz der Großhirnrinde liegt eine größere Anzahl roGFP1-exprimierender Neurone. Im Kleinhirn exprimieren die Körnerzellen schwach, die Purkinjezellen überhaupt kein roGFP1. Einige Kerngebiete des Hirnstamms zeigen eine qualitativ sehr starke roGFP1-Expression.

Die Expression von Thy1.2 beginnt um den postnatalen Tag 6 (Caroni 1997) und tatsächlich ist sowohl in 10 als auch in 100 Tage alten Tiere prinzipiell ein identisches Expressionsmuster des Transgens roGFP1 unter der Kontrolle des Thy1.2-Promotors zu finden. Der Kontrast der mit optischen Verfahren erzeugbaren Abbildungen ist bei den jungen Tieren aber deutlich höher als bei älteren. Das junge Hirngewebe erscheint noch sehr zart und fast durchsichtig, da die Myelinisierung erst im Verlauf der Entwicklung immer weiter zunimmt (Norton und Poduslo 1973). Daher ist die erreichbare Eindringtiefe von Licht ins Gewebe größer, die Streuung und Autofluoreszenz geringer und die Qualität der Bilder auch bei unveränderter Methodik im Vergleich zu älterem Hirngewebe besser.

Über das Thy-1-Molekül, dessen Promotor die Expression des roGFP1 in der untersuchten Tierlinie kontrolliert, ist schon lange bekannt, dass es in großen Mengen im Gehirn vorkommt (Reif und Allen 1966, Barclay und Hyden 1979), es wurde aber nie eine detaillierte Kartierung seiner Expression im Gehirn vorgenommen. Diverse Forscher beschrieben allerdings die Expression von transgenen Proteinen, die unter der Kontrolle des Thy-1.2-Promotors stehen (Gordon et al. 1987, Caroni 1997, Feng et al. 2000).

Pico Caroni hat 1997 beispielsweise das Expressionsmuster einiger transgener sogenannter *growth-associated proteins* in Neuronen beschrieben, die unter der Kontrolle des Thy-1.2-Promotors standen (Caroni 1997). Er charakterisierte dort 8 transgene Mauslinien und deren Expressionsmuster ähnelt dem unserer roGFP1-Mauslinie teilweise stark. Die einzige wesentliche Ausnahme bilden hier die Purkinjezellen des Kleinhirns, die bei ihm in jeder Mauslinie das Transgen zumindest schwach exprimierten. Allerdings sind auch Expressionsmuster unter Thy-1.2-Kontrolle beschrieben, in denen die Purkinjezellen keine Expression

zeigten (Feng et al. 2000). Falls für spezielle Fragestellungen auch eine Expression des Transgens in den Purkinjezellen sichergestellt werden sollte, könnte nach der Methode, wie sie von Vandaele und Kollegen beschrieben wurde, vorgegangen und regulatorische Elemente des für die Purkinjezellen spezifischen *Purkine cell protein-2* verwendet werden (Vandaele et al. 1991).

Da das tatsächliche Expressionsmuster jeder transgenen Tierlinie neben dem gewählten Promotor vor allem von Ort und Anzahl der ins Genom des Foundertiers integrierten Kopien des injizierten DNA-Konstrukts abhängen (Jasin et al. 1996), erzeugen auch nach identischen Verfahren generierte Tierlinien jedes Mal ein einzigartiges Muster der Transgenexpression. Für die untersuchte roGFP1-Mauslinie sind die Anzahl der inserierten Kopien und der Insertionsort nicht bekannt. Eine Alternative zur pränukleären Injektion, um Transgene in spezielle Zellen von Tieren einzubringen, stellt der lentivirale Gentransfer dar, der ebenfalls gut etabliert ist (Blomer et al. 1997). Hierbei müsste aber jede Maus einzeln mit aufwendigen intrazerebralen Injektionen transfiziert werden, daher ist der Einsatz dieses Verfahrens zwar in der Theorie möglich, allerdings für unseren Fall höchst unpraktikabel und speziellen Fragestellungen vorbehalten.

Die generierte transgene Mauslinie soll der Beobachtung zytosolischer Redox-Veränderungen in Neuronen dienen, daher würde eine nicht-neuronale Expression des Transgens im Hirngewebe den Nutzen des Tiermodells erheblich schmälern oder es gar unbrauchbar für die vorgesehenen Anwendungen machen. Die Sequenz des Thy-1-Gens und deren Auswirkung auf die Expression in verschiedenen Geweben sind eingehend beschrieben worden und es wurden die Elemente, die die neuronale Expression treiben, von den Elementen, die für eine Expression außerhalb des zentralen Nervensystems verantwortlich sind, abgegrenzt und so ein murines Thy-1-Konstrukt erzeugt, das eine spezifische neuronale Expression in transgenen Tieren sicherstellen soll (Vidal et al. 1990, Kelley et al. 1994). Dieses Konstrukt enthält 6,5 Kilobasen des murinen Thy-1.2-Gens vom Promotor bis zum Intron, das auf Exon 4 folgt, es fehlen aber Exon 3 und die flankierenden Introns. Die entfernten Sequenzen sind für eine extraneuronale Expression notwendig, aber nicht für die Expression in Neuronen (Feng et al. 2000). Unter der Kontrolle dieses veränderten Promotors konnte in der Tat keine extraneuronale Expression festgestellt werden (Caroni 1997, Feng et al. 2000).

Da für die in dieser Arbeit charakterisierte transgene Mauslinie ebendieses Konstrukt verwendet wurde, sollte auch keine Expression des Proteins außerhalb von Neuronen feststellbar sein. Bei der näheren Betrachtung der überlagerten Bilder der Fluoreszenz von roGFP1 und der neuronenspezifischen immunhistochemischen Färbung fallen trotzdem einzelne Zellen auf, die roGFP1 klar exprimieren, nicht aber von der immunhistochemischen Färbung erfasst wurden. Dieses Phänomen erklärt sich am wahrscheinlichsten durch die verwendeten Methoden. Die immunhistochemisch gefärbten Schnitte hatten eine Dicke von 30 μm . Am stärksten durch die Färbung erfasst werden die Neurone in den Randbereichen des Schnittes, da die durch Diffusion erreichbare Konzentration der verwendeten Antikörper hier am höchsten ist. Die Neurone in der Mitte des Schnittes sind schwächer oder nicht angefärbt. Eine roGFP1-Fluoreszenz zeigen dagegen am besten Neurone, die durch die Präparation nicht beschädigt wurden, also weiter in der Mitte des Schnitts liegen. Liegt nun ein roGFP1-positives Neuron genau in der Mitte des Schnitts, zeigt es zwar eine sehr gute roGFP1-Fluoreszenz, wird durch die immunhistochemische Färbung aber eventuell nicht erfasst. In den durch die 2-Photonen-Laser-Scanning-Mikroskopie gewonnenen Bildserien (Abb. 25) ist eine Tendenz zu diesen Effekten zu erkennen.

In Anbetracht dieser Beobachtungen und der Tatsachen, dass die vorherigen Untersuchungen zweifelsfrei zeigen konnten, dass es bei dem verwendeten Promotor keine extraneuronale Expression des Transgens gibt (Kelley et al. 1994, Caroni 1997, Feng et al. 2000) und dass die fraglichen Zellen morphologisch klar Eigenschaften von Neuronen (Größe; Axonhügel; Axone) aufweisen, ist auch hier von einer neuronenspezifischen Expression des Transgens auszugehen.

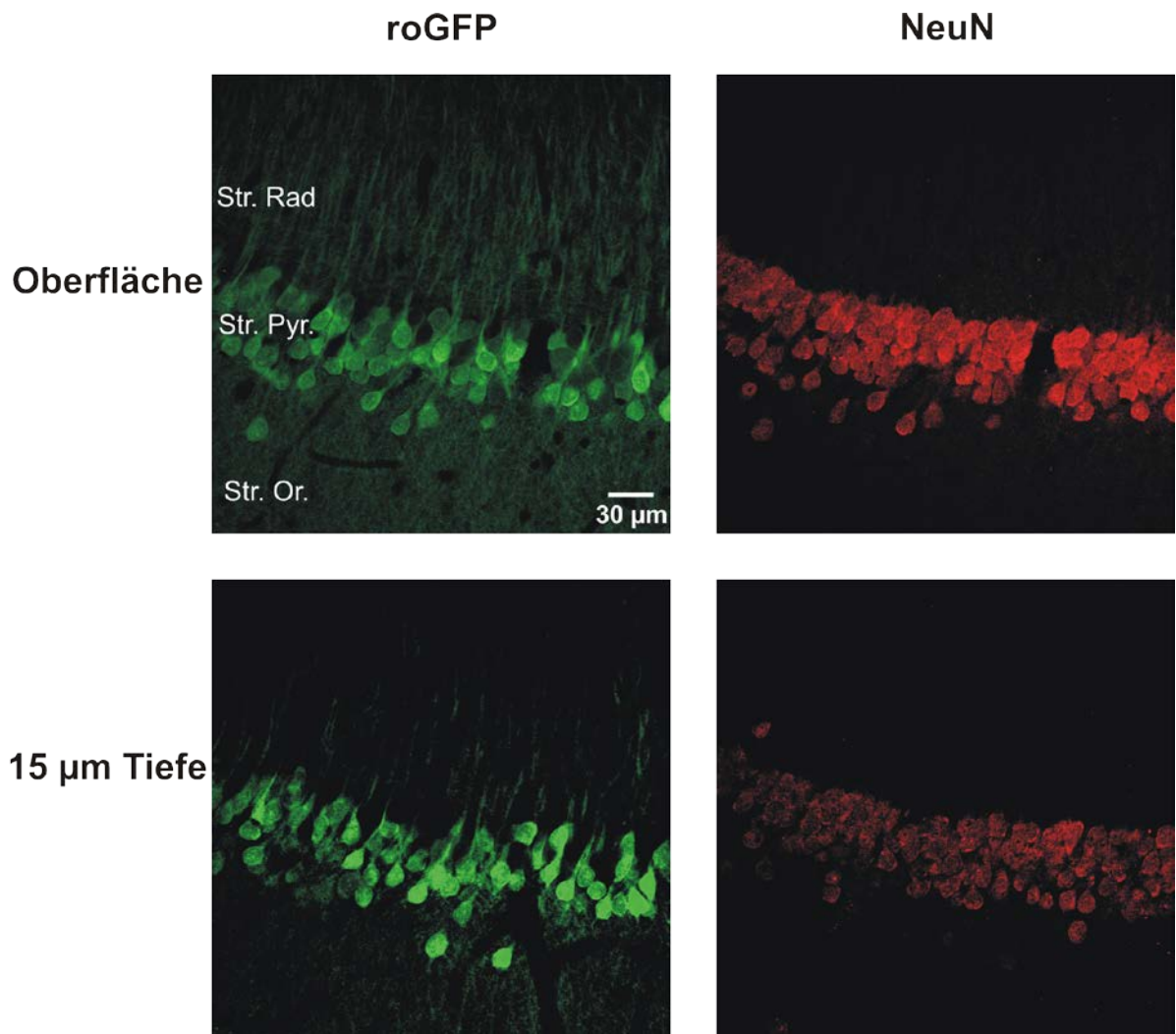


Abb. 25: Unterschiedliche Signalstärken der immunhistochemischen Färbungen je nach Eindringtiefe ins Präparat (CA1-Region, adultes männliches Tier)

Die Bilder zeigen die Fluoreszenzsignale des roGFP1 und des für die Immunhistochemie verwendeten Antikörpers. Dargestellt ist jeweils eine Bildebene von der Oberfläche und eine aus der Mitte eines 30 µm dicken Bilderstapels, der mit dem 2-Photonen-Laser-Scanning-Mikroskop aufgenommen wurde. Es ist deutlich zu erkennen, dass an der Oberfläche des Präparats die Signalstärke der immunhistochemischen Färbung deutlich stärker im Vergleich zur roGFP-Fluoreszenz ist, als es in der Mitte des Präparats in einer Tiefe von 15 µm unter der Oberfläche der Fall ist. Aus diesem Grund erscheinen in den Overlaydarstellungen vereinzelt roGFP-positive Zellen nicht von der Färbung gegen das Protein NeuN erfasst worden zu sein.

Die absolute Fluoreszenzemission von roGFP1 ist extrem kontext- und methodenabhängig und hängt von den im Exzitations- und Emissionsstrahlengang verwendeten optischen Komponenten, der Belichtungszeit und vor allem den verwendeten Zellen und Geweben ab. In jeder der bisherigen Publikationen wurden andere Werte für maximal und minimal erreichbare Fluoreszenz-Ratio und dementsprechend variierende Antwortbereiche beschrieben (ein Anstieg der roGFP1-Fluoreszenzratio zeigt eine Oxidation des Proteins, ein Abfallen eine Reduktion des Proteins an, der Mechanismus ist in Kapitel 1.3 beschrieben und soll

an dieser Stelle nicht wiederholt werden).

Die geringsten beschriebenen absoluten Werte sind an transfizierten HeLa-Zellen gemessen worden, die roGFP1 in ihrem Zytosol exprimierten. Es ergab sich ein Antwortbereich der Ratio F400 nm/F480 nm zwischen 0,4 und 0,8 mit einer Baseline-Oxidation des roGFP1 von 16% in den Zellen, was einem dynamischen Antwortbereich vom Faktor 2 entspricht (Dooley et al. 2004). Die selbe Arbeitsgruppe um S.J. Remington an der University of Oregon veröffentlichte ebenfalls Untersuchungen von roGFP1-transfizierten HeLa-Zellen, die das Protein in ihrer Mitochondrienmatrix exprimierten. Hier beschrieben sie eine Baseline-Oxidation des roGFP1 von 33%, sie fanden absolute Werte der Ratio F400 nm/F480 nm von 1,5 bis 5,0 und damit einen dynamischen Antwortbereich von 3,3 (Hanson et al. 2004).

Obwohl sich die Messungen nur durch die Lokalisation des roGFP1 und die zur Oxidation beziehungsweise Reduktion des Proteins verwendeten Substanzen (Dooley et al. verwendeten Aldrithiol und DTT, Hanson et al. verwendeten H₂O₂ und DTT) unterschieden, ergaben sich doch gravierende Unterschiede vor allem in den absoluten Werten der Ratio F400 nm/F480 nm. Ähnlich verhält es sich mit den bisher in der Arbeitsgruppe Müller gefundenen Ergebnissen. Bei Messungen an neonatalen roGFP1-transfizierten hippokampalen Schnittkulturen von C57BL/6J-Mäusen wurde zunächst eine roGFP1-Baseline-Oxidation von 32,1% beobachtet. Absolut betrug die roGFP1-Fluoreszenz-Baseline $1,26 \pm 0,18$ bei Minimal- und Maximalwerten zwischen $0,92 \pm 0,11$ und $1,98 \pm 0,36$ und damit einem dynamischen Antwortbereich von 2,2 (Großer et al. 2012). Nach kleineren methodischen Veränderungen der Kultivierungsbedingungen und der Anregungs- und Emissionsfiltersätze ergab sich eine berechnete Baseline-Oxidation von nur noch 5,2%, obwohl die hier gemessenen absoluten Baselinewerte (Ratio F395nm/F470nm = $1,24 \pm 0,11$) sich von den vorher bestimmten nicht unterschieden. Die Ursache für diese Abweichungen lag in den Minima und Maxima der Ratio F395 nm/F470 nm, die für die Kalibrierung des roGFP1-Antwortbereichs benutzt wurden, der zwischen $1,08 \pm 0,04$ und $4,01 \pm 0,56$ lag und damit einen erstaunlich großen dynamischen Antwortbereich von fast 4 ergab (Hirt 2013).

Aus diesen Ergebnissen muss der Schluss gezogen werden, dass nach bisherigem

Kenntnisstand jede semiquantitative Aussage über den Oxidationszustand eines Zellkompartiments auf Grundlage der roGFP-Fluoreszenzemission einer genauen Kalibrierung des Antwortbereichs für jeden Genotyp, die unterschiedlichen verwendeten Geräte und optischen Parameter und die jeweilige Form der Präparation (Zellkultur, Slice-Kultur, juveniles und adultes Gewebe *in vivo*) bedarf. Dieses Verfahren kann gute Ergebnisse in einzelnen Studien liefern, diese Studien können aber auf keinen Fall in den absoluten bestimmten Werten und nur bei wenigstens einigermaßen übereinstimmenden dynamischen Antwortbereichen in den relativen Ergebnissen miteinander verglichen werden, da sich selbst eine marginal unterschiedliche Methodik in diesem Fall deutlich auswirken kann.

In dieser Arbeit wurde erstmals der roGFP1-Antwortbereich im Zytosol von Neuronen adulter akuter Hirnschnitte bestimmt. Um zu überprüfen, ob dieser Antwortbereich in verschiedenen Hirnregionen und unterschiedlichen Neuronen derselbe ist, wurde die Methode an vier verschiedenen Hirnregionen exemplarisch durchgeführt. Die Bestimmung der oberen und unteren Grenzen des Antwortbereichs erfolgte wie in den bisherigen Arbeiten der Arbeitsgruppe (Funke et al. 2011, Großer et al. 2012) durch Applikation von H₂O₂ als Oxidationsbeziehungsweise DTT als Reduktionsmittel. In den CA1-Pyramidenzellen, den Körnerzellen des Gyrus dentatus und den Neuronen des Cortex ergab sich eine Baseline-Oxidation des roGFP1 zwischen 13% und 17%, die sich in den einzelnen Regionen nicht wesentlich unterschied (genaue Ergebnisse siehe Kapitel 3.4.2). Der dynamische Antwortbereich des roGFP1 lag zwischen 2 und 2,4 (CA1: 2,2; GD: 2,4; Cortex: 2,0). Diese Werte sind in Anbetracht der Tatsache, dass es sich hier um akute Hirnschnitte und nicht um Schnittkulturen oder einzelne Zellen handelt, sehr gut mit den oben beschriebenen vorherigen Ergebnissen vereinbar. Auch die in den CA3-Pyramidenzellen bestimmten Werte (relative Baseline-Oxidation 34,5 ± 11,9%; dynamischer Antwortbereich 1,7) fügen sich einzeln betrachtet gut in das Gesamtbild der bisherigen Messungen ein, unterscheiden sich aber in ihrer Fluoreszenz-Baseline und ihrem dynamischen Antwortbereich signifikant von den anderen Hirnregionen. Da sich sowohl die absoluten als auch die relativen Baselinewerte der Messungen unterscheiden, ist davon auszugehen, dass die Veränderungen tatsächlich in Unterschieden der Hirnregion begründet sind.

Es wurde bereits beschrieben, dass die Neurone einiger Hirnregionen,

insbesondere die CA1-Pyramidenzellen besonders empfindlich auf Veränderungen des Redox-Status reagieren, wohingegen die CA3-Pyramidenzellen eher unempfindlich sind (Schmidt-Kastner und Freund 1991, Wilde et al. 1997, Wang et al. 2007). Auch in dieser Arbeit offenbarte der zytosolische Redox-Indikator roGFP1 regionale Unterschiede im Gewebe und es konnte festgestellt werden, dass der provozierbare roGFP1-Antwortbereich der CA1-Pyramidenzellen und des Gyrus dentatus deutlich größer ist als der der CA3-Pyramidenzellen. Die CA3-Pyramidenzellen zeigten allerdings eine höhere Baseline-Oxidation als die anderen Regionen des Hippokampus und obwohl für die CA3-Region eine vergleichsweise große Unempfindlichkeit gegenüber oxidativem Stress und Sauerstoffentzug beschrieben worden war, konnten hier in der relativen Veränderung der roGFP1-Fluoreszenz unter Anoxie keine Unterschiede zwischen den einzelnen Hirnregionen gefunden werden. Es bleibt unklar, ob der kleinere roGFP1-Antwortbereich tatsächlich durch eine bessere Redox-Pufferkapazität der Zellen oder andere Unterschiede der Gewebe der einzelnen Regionen zu begründen ist. Warum einzelne Populationen von Neuronen empfindlicher auf Stress reagieren, ist ebenfalls nicht genau bekannt. Um hier Klarheit zu schaffen, ist weiterführende Forschung auf diesem Gebiet erforderlich.

Um auch eine Detektion von endogen erzeugten ROS durch roGFP1 nachzuweisen, wurde in dieser Arbeit die roGFP1-Fluoreszenzemission unter anoxischen Bedingungen in akuten Hirnschnitten gemessen. Eine erhöhte extramitochondriale Generierung reaktiver Sauerstoffspezies bei Hypoxie durch die NADPH-Oxidase und die Xanthin-Oxidase ist beschrieben worden (Walder et al. 1997, Harrison 2004). Es gab längere Zeit Unklarheiten darüber, ob die mitochondriale ROS-Produktion bei Hypoxie und Anoxie ansteigt oder abfällt, die gefundenen Ergebnisse variierten zum Teil stark je nach methodischem Ansatz, Art der Präparation der untersuchten Zellen und Hirnregionen, Schweregrad der Hypoxie/Anoxie und den verwendeten Sensoren (Duranteau et al. 1998, Moudgil et al. 2005, Waypa und Schumacker 2005, Chen und Lesnefsky 2006). Mit diversen unterschiedlichen Ansätzen ist allerdings eine deutlich gesteigerte ROS-Produktion nach Reoxygenierung beschrieben worden, die für die sogenannten Reperfusionsschäden verantwortlich ist (Walder et al. 1997, Harrison 2004, Abramov et al. 2007, Haga et al. 2009).

Bisherige Untersuchungen des zytosolischen Redoxstatus unter Hypoxie mit dem Redox-Indikator roGFP lieferten widersprüchliche Ergebnisse: Während Desireddi und Kollegen von einem Anstieg der roGFP-Fluoreszenzratio und damit einer gesteigerten ROS-Produktion unter Hypoxie in glatten Muskelzellen der Arteriolen in Lungenschnitten von Mäusen berichteten, sich bei ihnen die roGFP-Fluoreszenz aber nach Reoxygenierung schnell komplett erholte (Desireddi et al. 2010), fand eine andere Arbeitsgruppe in AML12-Leberzellen unter Hypoxie zunächst einen Abfall der roGFP-Fluoreszenzratio und bei Reoxygenierung einen langdauernden Anstieg (Haga et al. 2009). Die einzige bisherige Publikation, in der roGFP1 in Hippokampuskulturen aus neonatalen Mäusen und Ratten unter schweren Hypoxieepisodes von 8 Minuten und anschließender Reoxygenierung untersucht wurde, zeigte während der Hypoxie einen signifikanten Abfall der roGFP1-Fluoreszenzratio – das heißt eine verringerte ROS-Produktion – ohne weitere Veränderung auch bei Reoxygenierung (Funke et al. 2011, Großer et al. 2012). Die Ursache ist unklar.

In den für diese Arbeit durchgeführten Experimenten an akuten Hirnschnitten adulter Mäuse zeigte sich nach 10 Minuten Anoxie in allen untersuchten Hirnregionen ein signifikanter Anstieg der roGFP1-Fluoreszenzratio zwischen 3% und 6%, der sich nach 10 Minuten Reoxygenierung noch deutlich verstärkte. Letzteres ist mit den gängigen Theorien zur ROS-Produktion bei Hypoxie und Reperfusionsschäden mit dem größten Teil der vorangegangenen Veröffentlichungen vereinbar. Da auf diesem Gebiet bisher aber teilweise sehr widersprüchliche Ergebnisse publiziert worden sind, sollten sich zukünftige Forschungsbemühungen eingehender mit diesem Thema befassen und hier Klarheit schaffen. Für diese Arbeit ist entscheidend, dass endogene Veränderungen des zytosolischen Redoxstatus unter Anoxie in Nervengewebe auftreten und auch mit roGFP1 beobachtet werden können.

Artefakte, die durch etwaige hypoxiebedingte pH-Schwankungen hervorgerufen werden könnten, können in diesem Fall ausgeschlossen werden, da das verwendete roGFP1 in vorangegangenen Untersuchungen keine pH-Sensitivität zeigte (Funke et al. 2011, Weller et al. 2014). In dieser Arbeit wurde erstmalig roGFP1 für Messungen im Hippokampus adulter Mäuse verwendet, daher stehen keine Vergleichsdaten zur Verfügung. Warum genau sich die roGFP1-

Fuoreszenzratio unter anoxischen Bedingungen zur Oxidation hin verschiebt, bleibt unklar, zumal in Zellkultur eine Reduktion für diesen Fall beschrieben wurde (Funke et al. 2011, Großer et al. 2012). Eine mögliche Ursache könnte eine deutlich höhere Vulnerabilität des adulten Gewebes gegen Hypoxie/Anoxie sein. Zudem ist der Beitrag einer eventuellen Interferenz der FAD/NADH- Autofluoreszenz im Gewebe, der in Zellkultur ausgeschlossen werden kann, zu klären.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Das Ziel dieser Arbeit war es, eine neue transgene Mauslinie mit neuronenspezifischer zytosolischer Expression des ratiometrischen optischen Redox-Indikators roGFP1 zu charakterisieren und die mögliche Nutzbarkeit dieser Mauslinie für die neurophysiologische Forschung zu evaluieren. Dabei wurde durch die Bestimmung verschiedener physiologischer Parameter und Verhaltensanalysen zunächst überprüft, ob die transgenen Tiere gesund und frei von Beeinträchtigungen durch die Insertion des Transgens in ihr Genom sind. Danach wurde das neuronale Expressionsmuster des roGFP1 in akuten und fixierten Hirnschnitten mit verschiedenen optischen Methoden untersucht. Zum Abschluss wurde die Funktionsfähigkeit des exprimierten roGFP1 überprüft, indem erst der Antwortbereich des roGFP1 in akuten Hirnschnitten wie bereits in vorangegangenen Arbeiten (Dooley et al. 2004, Hanson et al. 2004, Funke et al. 2011, Großer et al. 2012) kalibriert und dann die Antwort des Proteins auf die endogene Produktion reaktiver Sauerstoffspezies unter Anoxie bestimmt wurde.

Die transgenen Tiere zeigen verglichen mit Wildtyp-Mäusen keinerlei Beeinträchtigung ihrer Gesundheit und ein völlig normales Verhalten. Die Tiere exprimieren das roGFP1 kräftig in den besonders häufig untersuchten CA1-Pyramidenzellen des Hippokampus, den Neuronen der Großhirnrinde und in den Kerngebieten des Hirnstamms, auch die Kalibrierung des roGFP1-Antwortbereichs liefert valide Werte, und eine Detektion endogen erzeugter reaktiver Sauerstoffspezies ist möglich. Insgesamt erfüllt die untersuchte Mauslinie die an sie gestellten Anforderungen und ist somit für die neurophysiologische Grundlagenforschung wie auch die Kreuzung mit Tiermodellen neuronaler Erkrankungen geeignet.

Mittlerweile wird die synaptische Plastizität der transgenen Tiere in der Arbeitsgruppe Müller untersucht. Im nächsten Schritt soll die transgene Mauslinie in ein Mausmodell des Rett-Syndroms, einer neuronalen Erkrankung, für die bereits erhöhter oxidativer Stress und eine verminderte synaptische Plastizität beschrieben ist (Großer et al. 2012, Janc und Müller 2014), eingekreuzt werden, um erkrankte Tiere mit endogener Produktion eines optischen Redox-Indikators zu generieren, mit denen dann eine einfache Beobachtung von Alterationen des Redox-Status *in vivo* möglich sein soll. Zusätzlich zur transgenen roGFP1-Mauslinie mit zytosolischer Expression des Transgens wurde bereits eine transgene roGFP1-Mauslinie mit mitochondrialer Expression generiert und soll demnächst ebenfalls untersucht werden, da der erhöhte oxidative Stress im Rett-Syndrom vor allem aus einer Entgleisung des mitochondrialen Stoffwechsels resultieren soll (Großer et al. 2012).

Neben der bereits in der Arbeitsgruppe geplanten Verwendung der transgenen Maus scheinen die Tiere aber auch für neurophysiologische Forschungen auf anderen Gebieten geeignet. Messungen des Redox-Status sind jetzt in intaktem Gewebe möglich, ohne vorher Eingriffe wie intrazerebrale Injektionen von viralen Vektoren durchführen zu müssen. Damit können neben den kultivierten neonatalen Präparationen jetzt auch adulte Stadien untersucht und sogar longitudinale Studien *in vivo* durchgeführt werden. Denkbar sind zum Beispiel detaillierte Echtzeitanalysen der Veränderungen des Redox-Status in Tieren bei Schlaganfällen oder zerebraler Minderperfusion, die bis dato so nicht möglich waren, oder Untersuchungen in Tiermodellen neurodegenerativer Erkrankungen wie Morbus Parkinson, der Alzheimerschen Erkrankung oder der amyotrophen Lateralsklerose, für die ein erhöhtes Auftreten von oxidativem Stress schon länger beschrieben ist und eingehend erforscht wird (Andersen 2004, Barnham et al. 2004).

Für diese transgene roGFP1-Mauslinie – genau wie für weitere transgene Tierlinien mit einer Expression von optischen Redox-Sensoren in einem anderen Kontext – sind unzählige Anwendungen in der Forschung vorstellbar, die zu wichtigen Erkenntnissen nicht nur auf dem Gebiet der Grundlagenforschung, sondern auch zum Verständnis und damit der möglichen zukünftigen Heilung diverser neuronaler Erkrankungen beitragen könnten.

6 Anhang

6.1 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACSF	artifizielle cerebrospinale Flüssigkeit
BP	Bandpassfilter
BSA	bovines Serumalbumin
C	Cystein
CA1-3	Cornu Ammonis-Region 1 bis 3 des Hippokampus
CCD	<i>charge-coupled device</i>
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
C57BL/6J	verbreiteter Inzucht-Mausstamm
DC	Dichroit
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> ; Desoxyribonukleinsäure
E	Glutaminsäure
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
FADH	Flavin-Adenin-Dinukleotid (reduziert)
G	Glycin
GD	Gyrus dentatus des Hippokampus
GSH/GSSG	Glutathion/Glutathiondisulfid
H ⁺	Proton
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
LED	<i>light-emitting diode</i>
n	Anzahl der Experimente
N ₂	Stickstoff
NA	numerische Apertur
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (reduziert)
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotidphosphat (reduziert)
NO•	Stickstoffmonoxid
O ₂	Sauerstoff
•O ₂ ⁻	Superoxid-Anion

OH ⁻	Hydroxid-Anion
•OH	Hydroxyl-Radikal
ONOO ⁻	Peroxynitrit
p	Signifikanzwert
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
Q	Glutamin
R F395 nm/F470 nm	Fluoreszenz-Ratio von roGFP1 bei Anregung mit Licht der Wellenlänge 395 nm und 470 nm
ΔR F395 nm/F470 nm	relative Veränderung der Fluoreszenz-Ratio von roGFP1 bei Anregung mit Licht der Wellenlänge 395nm und 470nm
RNS	reaktive Stickstoffspezies
roGFP	redoxsensitives grün fluoreszierendes Protein
ROI	<i>region of interest</i>
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
R-SH	Thiolgruppe
R-SOH	Sulfensäurerest
rxYFP	redoxsensitives gelb fluoreszierendes Protein
S	Serin
T	Threonin
TG	transgene Tiere
TPLSM	Zwei-Photononen-Laser-Scanning-Mikroskopie
UV	ultraviolette Strahlung
v.a.	vor allem
WT	Wildtyp-Tiere
wtGFP	Wildtypvariante des <i>green fluorescent protein</i>
Y	Tyrosin
YFP	<i>yellow fluorescent protein</i>
z.B.	zum Beispiel

6.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auswahl einiger reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffspezies	9
Tabelle 2: Überblick über die verwendeten Chemikalien	34

6.3 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schema zur Entstehung der wichtigsten ROS und RNS	8
Abb. 2: Chromophor des wtGFP aus der Qualle <i>Aequorea victoria</i>	13
Abb. 3: Eine Maus während des motorischen Verhaltenstests auf dem Rota-Rod®	20
Abb. 4: Open-Field.....	21
Abb. 5: Optischer Arbeitsplatz zur Analyse akuter Gewebeschnitte.....	26
Abb. 6: Jablonski-Diagramm zur 1- und 2-Photonen-Fluoreszenz.....	30
Abb. 7: Setup für die 2-Photonen-Laser-Scanning-Mikroskopie	32
Abb. 8: Phänotypisches Erscheinungsbild der Tiere.....	36
Abb. 9: Gewichtszunahme und Körperlänge der Tiere im Vergleich	38
Abb. 10: Analyse von Blutglukosespiegel und Hämatokrit	39
Abb. 11: Rota-Rod® Laufzeiten	41
Abb. 12: Analyse des Explorationsverhaltens durch Open-Field-Tests.....	43
Abb. 13: Übersicht über die mikroskopisch untersuchten Hirnregionen.....	45
Abb. 14: Expressionsanalyse am frontalen Hirnabschnitt (adultes männliches Tier)	47
Abb. 15: roGFP1-Expression in der Hippokampusformation (adultes männliches Tier)	49
Abb. 16: roGFP1-Expression in der Hippokampusformation (Fortsetzung)	50
Abb. 17: roGFP1-Expression im Hirnstamm (adultes männliches Tier)	51
Abb. 18: roGFP1-Expressionsmuster des Kleinhirns (adultes männliches Tier).....	53
Abb. 19: roGFP1-Expressionsmuster ausgewählter Hirnregionen eines 10 Tage alten männlichen Tieres.....	55
Abb. 20: Reaktionen verschiedener Hirnregionen auf Oxidation durch H ₂ O ₂	59
Abb. 21: Reaktionen verschiedener Hirnregionen auf Reduktion durch DTT	60
Abb. 22: Kalibrierung des roGFP1-Antwortbereichs verschiedener Hirnregionen ..	61
Abb. 23: Unterschiedlicher Baseline-Oxidationzustand von roGFP1 in verschiedenen Hirnregionen.....	63
Abb. 24: Reaktion des Redox-Indikators roGFP1 auf Anoxie und anschließende	

Reoxygenierung	64
Abb. 25: Unterschiedliche Signalstärken der immunhistochemischen Färbungen je nach Eindringtiefe ins Präparat (CA1-Region, adultes männliches Tier)	71

7 Literaturverzeichnis

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

Andersen JK (2004): Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? *Nat Med* 10, 18-25

Apel K, Hirt H (2004): Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol* 55, 373-399

Babior MB (1984): The Respiratory Burst of Phagocytes. *J Clin Invest* 73, 599-601

Balaban RS, Nemoto S, Finkel T (2005): Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell* 120, 483-495

Baldrige CW, Gerard RW (1933): The Extra Respiration of Phagocytosis. *Am J Physiol* 103, 235

Banerjee RR, Rangwala SM, Shapiro JS, Rich AS, Rhoades B, Qi Y, Wang J, Rajala MW, Poci A, Scherer PE et al. (2004): Regulation of fasted blood glucose by resistin. *Science* 303, 1195-1198

Barclay AN, Hyden H (1979): Localization of the Thy-1 antigen by immunofluorescence on neurons isolated from rat brain. *J Neurochem* 32, 1583-1586

Barnham KJ, Masters CL, Bush AI (2004): Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Nat Rev Drug Discov* 3, 205-214

Beal MF (2005): Less stress, longer life. *Nat Med* 11, 598-599

Berlett BS, Stadtman ER (1997): Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem* 272, 20313-20316

Björnberg O, Ostergaard H, Winther JR (2006): Measuring intracellular redox conditions using GFP-based sensors. *Antioxid Redox Signal* 8, 354-361

Blomer U, Naldini L, Kafri T, Trono D, Verma IM, Gage FH (1997): Highly efficient and sustained gene transfer in adult neurons with a lentivirus vector. *J Virol* 71, 6641-6649

Carducci JP, Jakob EM (2000): Rearing environment affects behaviour of jumping spiders. *Anim Behav* 59, 39-46

Caroni P (1997): Overexpression of growth-associated proteins in the neurons of adult transgenic mice. *J Neurosci Methods* 71, 3-9

Chen Q, Lesnefsky EJ (2006): Depletion of cardiolipin and cytochrome c during

- ischemia increases hydrogen peroxide production from the electron transport chain. *Free Radic Biol Med* 40, 976-982
- Creed Jr RP, Miller JR (1990): Interpreting animal wall-following behavior. *Experientia* 42, 758-761
- Denk W, Strickler JH, Webb WW (1990): Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science* 248, 73-76
- Desireddi JR, Farrow KN, Marks JD, Waypa GB, Schumacker PT (2010): Hypoxia increases ROS signaling and cytosolic Ca²⁺ in pulmonary artery smooth muscle cells of mouse lungs slices. *Antioxid Redox Signal* 12, 595-602
- Dooley CT, Dore TM, Hanson GT, Jackson WC, Remington SJ, Tsien RY (2004): Imaging dynamic redox changes in mammalian cells with green fluorescent protein indicators. *J Biol Chem* 279, 22284-22293
- Dunham NW, Miya TS (1957): A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. *J Am Pharm Assoc* 46, 208-209
- Duranteau J, Chandel NS, Kulisz A, Shao Z, Schumacker PT (1998): Intracellular signaling by reactive oxygen species during hypoxia in cardiomyocytes. *J Biol Chem* 273, 11619-11624
- Feng G, Mellor RH, Bernstein M, Keller-Peck C, Nguyen QT, Wallace M, Nerbonne JM, Lichtman JW, Sanes JR (2000): Imaging neuronal subsets in transgenic mice expressing multiple spectral variants of GFP. *Neuron* 28, 41-51
- Finkel T (2011): Signal transduction by reactive oxygen species. *J Cell Biol* 194, 7-15
- Foster KA, Galeffi F, Gerich FJ, Turner DA, Müller M (2006): Optical and pharmacological tools to investigate the role of mitochondria during oxidative stress and neurodegeneration. *Prog Neurobiol* 79, 136-171
- Funke F, Gerich FJ, Müller M (2011): Dynamic, semi-quantitative imaging of intracellular ROS levels and redox status in rat hippocampal neurons. *Neuroimage* 54, 2590-2602
- Giorgio M, Migliaccio E, Orsini F, Paolucci D, Moroni M, Contursi C, Pelliccia G, Luzi L, Minucci S, Marcaccio M et al. (2005): Electron transfer between cytochrome c and p66Shc generates reactive oxygen species that trigger mitochondrial apoptosis. *Cell* 122, 221-233
- Göppert-Mayer M (1931): Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen. *Ann Phys* 9, 273-294
- Gordon JW, Ruddle FH (1981): Integration and stable germ line transmission of genes injected into mouse pronuclei. *Science* 214, 1244-1246
- Gordon JW, Chesa PG, Nishimura H, Rettig WJ, Maccari JE, Endo T, Seravalli E, Seki T, Silver J (1987): Regulation of Thy-1 gene expression in transgenic mice.

Cell 50, 445-452

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

Gutscher M, Pauleau AL, Marty L, Brach T, Wabnitz GH, Samstag Y, Meyer AJ, Dick TP (2008): Real-time imaging of the intracellular glutathione redox potential. *Nat Methods* 5, 553-559

Guzman JN, Sanchez-Padilla J, Wokosin D, Kondapalli J, Ilijic E, Schumacker PT, Surmeier DJ (2010): Oxidant stress evoked by pacemaking in dopaminergic neurons is attenuated by DJ-1. *Nature* 468, 696-700

Haga S, Remington SJ, Morita N, Terui K, Ozaki M (2009): Hepatic ischemia induced immediate oxidative stress after reperfusion and determined the severity of the reperfusion-induced damage. *Antioxid Redox Signal* 11, 2563-2572

Hall CS (1934): Emotional behavior in the rat I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. *J Comp Psychol* 18, 385-403

Hall CS (1936): Emotional behavior in the rat III. The relationship between emotionality and ambulatory activity. *J Comp Psychol* 22, 345-352

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

Harrison R (2004): Physiological roles of xanthine oxidoreductase. *Drug Metab Rev* 36, 363-375

Heim R, Cubitt AB, Tsien RY (1995): Improved green fluorescence. *Nature* 373, 663-664

Helmchen F, Denk W (2005): Deep tissue two-photon microscopy. *Nat Methods* 2, 932-940

Hirt U: Extramitochondriale und mitochondriale Produktion reaktiver Sauerstoffspezies im Hippokampus MeCP2-defizienter Mäuse. *Med. Diss. Göttingen* 2013

Iyer G, Islam DMF, Quastel JH (1961): Biochemical Aspects of Phagocytosis. *Nature* 192, 535-541

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

Jasin M, Moynahan ME, Richardson C (1996): Targeted transgenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 8804-8808

- Joshi MA, Jeoung NH, Obayashi M, Hattab EM, Brocken EG, Liechty EA, Kubek MJ, Vattam KM, Wek RC, Harris RA (2006): Impaired growth and neurological abnormalities in branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase kinase-deficient mice. *Biochem J* 400, 153-162
- Kelley KA, Friedrich VL, Jr., Sonshine A, Hu Y, Lax J, Li J, Drinkwater D, Dressler H, Herrup K (1994): Expression of Thy-1/lacZ fusion genes in the CNS of transgenic mice. *Brain Res Mol Brain Res* 24, 261-274
- Kolbrink B., Wagener K., Kempkes B., Müller M. (2015). Redox-indicator mice stably expressing genetically-encoded roGFP. *Acta Physiologica*, 213: Suppl 699, P256.
- LeBel CP, Ischiropoulos H, Bondy SC (1992): Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem Res Toxicol* 5, 227-231
- Lee SR, Kwon KS, Kim SR, Rhee SG (1998): Reversible inactivation of protein-tyrosine phosphatase 1B in A431 cells stimulated with epidermal growth factor. *J Biol Chem* 273, 15366-15372
- Marnett LJ (1999): Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutat Res* 424, 83-95
- Meyer AJ, Dick TP (2010): Fluorescent protein-based redox probes. *Antioxid Redox Signal* 13, 621-650
- Meyer AJ, Brach T, Marty L, Kreye S, Rouhier N, Jacquot JP, Hell R (2007): Redox-sensitive GFP in *Arabidopsis thaliana* is a quantitative biosensor for the redox potential of the cellular glutathione redox buffer. *Plant J* 52, 973-986
- Milton VJ, Sweeney ST (2011): Oxidative stress in synapse development and function. *Dev Neurobiol* 72, 100-110
- Moudgil R, Michelakis ED, Archer SL (2005): Hypoxic pulmonary vasoconstriction. *J Appl Physiol* (1985) 98, 390-403
- Mullen RJ, Buck CR, Smith AM (1992): NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development* 116, 201-211
- Murphy MP (2009): How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J* 417, 1-13
- Norton WT, Poduslo SE (1973): Myelination in rat brain: changes in myelin composition during brain maturation. *J Neurochem* 21, 759-773
- Ohtsuka M, Ogiwara S, Miura H, Mizutani A, Warita T, Sato M, Imai K, Hozumi K, Sato T, Tanaka M et al. (2010): Pronuclear injection-based mouse targeted transgenesis for reproducible and highly efficient transgene expression. *Nucleic Acids Res* 38, 198
- Ostergaard H, Henriksen A, Hansen FG, Winther JR (2001): Shedding light on

disulfide bond formation: engineering a redox switch in green fluorescent protein. *Embo J* 20, 5853-5862

Paxinos G, Franklin KBJ *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. 2. Auflage, Academic Press, San Diego 2001

Prasher DC, Eckenrode VK, Ward WW, Prendergast FG, Cormier MJ (1992): Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* 111, 229-233

Rahman T, Hosen I, Islam MMT, Shekhar HU (2012): Oxidative Stress and Human Health. *Adv Biosci Biotechnol* 3, 997-1019

Regulier E, Schneider BL, Deglon N, Beuzard Y, Aebischer P (1998): Continuous delivery of human and mouse erythropoietin in mice by genetically engineered polymer encapsulated myoblasts. *Gene Ther* 5, 1014-1022

Reif AE, Allen JM (1966): Mouse nervous tissue iso-antigens. *Nature* 209, 523

Salmeen A, Andersen JN, Myers MP, Meng TC, Hinks JA, Tonks NK, Barford D (2003): Redox regulation of protein tyrosine phosphatase 1B involves a sulphenylamide intermediate. *Nature* 423, 769-773

Sbarra AJ, Karnovsky ML (1959): The biochemical basis of phagocytosis. I. Metabolic changes during the ingestion of particles by polymorphonuclear leukocytes. *J Biol Chem* 234, 1355-1362

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

Shimomura O, Johnson FH, Saiga Y (1962): Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J Cell Comp Physiol* 59, 223-239

van der Vliet A, Eiserich JP, Halliwell B, Cross CE (1997): Formation of reactive nitrogen species during peroxidase-catalyzed oxidation of nitrite. A potential additional mechanism of nitric oxide-dependent toxicity. *J Biol Chem* 272, 7617-7625

Vandaele S, Nordquist DT, Feddersen RM, Tretjakoff I, Peterson AC, Orr HT (1991): Purkinje cell protein-2 regulatory regions and transgene expression in cerebellar compartments. *Genes Dev* 5, 1136-1148

Vidal M, Morris R, Grosveld F, Spanopoulou E (1990): Tissue-specific control elements of the Thy-1 gene. *Embo J* 9, 833-840

Wachter RM, Elsliger MA, Kallio K, Hanson GT, Remington SJ (1998): Structural basis of spectral shifts in the yellow-emission variants of green fluorescent protein. *Structure* 6, 1267-1277

Wachter RM, Yarbrough D, Kallio K, Remington SJ (2000): Crystallographic and energetic analysis of binding of selected anions to the yellow variants of green

fluorescent protein. *J Mol Biol* 301, 157-171

Walder CE, Green SP, Darbonne WC, Mathias J, Rae J, Dinauer MC, Curnutte JT, Thomas GR (1997): Ischemic stroke injury is reduced in mice lacking a functional NADPH oxidase. *Stroke* 28, 2252-2258

Walsh RN, Cummins RA (1976): The Open-Field Test: a critical review. *Psychol Bull* 83, 482-504

Wang X, Pal R, Chen XW, Kumar KN, Kim OJ, Michaelis EK (2007): Genome-wide transcriptome profiling of region-specific vulnerability to oxidative stress in the hippocampus. *Genomics* 90, 201-212

Waypa GB, Schumacker PT (2005): Hypoxic pulmonary vasoconstriction: redox events in oxygen sensing. *J Appl Physiol* 98, 404-414

Weitzman SA, Gordon LI (1990): Inflammation and cancer: role of phagocyte-generated oxidants in carcinogenesis. *Blood* 76, 655-663

Weitzman SA, Turk PW, Milkowski DH, Kozlowski K (1994): Free radical adducts induce alterations in DNA cytosine methylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 1261-1264

Weller J, Kizina KM, Can K, Bao G, Muller M (2014): Response properties of the genetically encoded optical HO sensor HyPer. *Free Radic Biol Med* 76C, 227-241

Wilde GJ, Pringle AK, Wright P, Iannotti F (1997): Differential vulnerability of the CA1 and CA3 subfields of the hippocampus to superoxide and hydroxyl radicals in vitro. *J Neurochem* 69, 883-886

Wolf AM, Nishimaki K, Kamimura N, Ohta S (2014): Real-time monitoring of oxidative stress in live mouse skin. *J Invest Dermatol* 134, 1701-1709

Danksagung

Mein größter Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Michael Müller für seine zugleich motivierte und motivierende Betreuung, die vielen Anregungen, das geduldige Beantworten aller meiner Fragen und seine fachliche Unterstützung, nicht nur in der Theorie, sondern auch in der praktischen Umsetzung. Ohne seinen großartigen Einsatz wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Ich möchte ihm auch herzlich für die Korrektur dieser Arbeit danken.

Ganz besonders bedanke ich mich auch bei Belinda Kempkes, die mir mit ihrem grandiosen technischen Geschick und Wissen jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand und bei der Lösung aller nur denkbaren Probleme und auch bei plötzlichen Fahrten ins Klinikum keine Mühen scheute.

Desweiteren möchte ich Frau Dr. Christiane Menzfeld danken. Ohne ihre überragenden EDV-Kenntnisse wäre ich in der schriftlichen Ausarbeitung dieser Arbeit verloren gewesen.

Ich danke auch Prof. Dr. Swen Hülsmann, Dr. Michal Fortuna, Oliwia Janc, Axel Zigan und allen anderen, die mich bei dieser Arbeit fachlich oder moralisch, auch bei gemeinsamen sportlichen Aktivitäten und Oktoberfestbesuchen unterstützt haben.

Für die Finanzierung des für diese Arbeit verwendeten 2-Photonen-Laser-Scanning-Mikroskopiesystems gilt mein Dank der Universitätsmedizin Göttingen und dem Land Niedersachsen (Großgeräte-Antrag INST 1525/14-1 FUGG).

Lebenslauf

Am 05.06.1992 wurde ich, Benedikt Kolbrink, als Sohn von Sieglinde Kolbrink-Wolf, geb. Kauhs, und Andreas Kolbrink in Bückeberg geboren.

Meine Mutter arbeitet als biologisch-technische Assistentin im Amt für Wasser- und Abfallwirtschaft des Landkreises Nienburg/Weser, mein Vater wurde 1987 Soldat und ist seit 1998 Berufssoldat. Im Jahre 1995 wurde mein einziger Bruder Alexander in Bückeberg geboren.

Ich besuchte in den ersten zwei Schuljahren 1997 und 1998 die Grundschule Heeßen und wechselte nach der Scheidung meiner Eltern und einem Umzug zur Friedrich-Ebert-Grundschule in Nienburg/Weser. Von 2001 bis 2003 besuchte ich die Orientierungsstufe Nienburg/Weser und danach ab 2003 das Marion-Dönhoff-Gymnasium Nienburg, an dem ich 2010 mein Abitur erlangte.

Einen Monat nach meinem Schulabschluss wurde ich im Juli 2010 zum Wehrdienst eingezogen, den ich zunächst in der Lützow-Kaserne Schwanewede und dann in der Clausewitz-Kaserne Nienburg ableistete.

Seit dem Sommersemester 2011 studiere ich Humanmedizin an der Georg-August-Universität Göttingen, an der ich mein Zweites Ärztliches Staatsexamen voraussichtlich im Wintersemester 2017/2018 ablegen werde.

Diese Arbeit habe ich am Institut für Physiologie und Pathophysiologie der Georg-August-Universität Göttingen in der Abteilung für Neuro- und Sinnesphysiologie unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. rer. nat. Michael Müller angefertigt.

Kongress-Mitteilungen:

Kolbrink B., Wagener K., Kempkes B., Müller M. (2015). Redox-indicator mice stably expressing genetically-encoded roGFP. *Acta Physiologica*, 213: Suppl 699, P256.