

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

Bestimmung der mitochondrialen Atmungskettenfunktion im Rett- Syndrom mittels hochauflösender Respirometrie

INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von

Verena Maria Husemann

aus

Holzminden

Göttingen 2022

Dekan: Prof. Dr. med. W. Brück

Betreuungsausschuss

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

Ko-Betreuer/in: Prof. Dr. rer. nat. R. Kehlenbach

Prüfungskommission

Referent/in:

Ko-Referent/in:

Drittreferent/in:

Datum der mündlichen Prüfung:

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Bestimmung der mitochondrialen Atmungskettenfunktion im Rett-Syndrom mittels hochauflösender Respirometrie" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den

.....
(Unterschrift)

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis.....	V
1 Einleitung	1
1.1 Die Atmungskette	1
1.1.1 Komplex I (NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase).....	2
1.1.2 Komplex II (Succinat-Dehydrogenase)	2
1.1.3 Ubichinon (Coenzym Q).....	3
1.1.4 Komplex III (Ubichinon-Cytochrom-c-Oxidoreduktase).....	3
1.1.5 Cytochrom.....	4
1.1.6 Komplex IV (Cytochrom-c-Oxidase)	4
1.1.7 ATP-Synthase.....	4
1.2 Stadien der mitochondrialen Atmung	5
1.3 Reaktive Sauerstoffspezies	6
1.3.1 Entstehung und Bedeutung reaktiver Sauerstoffspezies im Rahmen der Atmungskette	6
1.3.2 Abbau reaktiver Sauerstoffspezies.....	10
1.3.3 Pathologische Effekte von ROS	11
1.4 Rett-Syndrom.....	12
1.4.1 Genetischer Hintergrund des Rett-Syndroms	13
1.4.2 Charakteristische Symptome des Rett-Syndroms.....	14
1.4.3 Mitochondrien und das Rett-Syndrom	16
1.5 Wahl der Regionen Cerebellum und Hirnstamm.....	18
1.6 Ziele dieser Arbeit	18
2 Material und Methoden	19
2.1 Untersuchte Mauslinien.....	19
2.2 Isolierung der Mitochondrien und Erhebung allgemeiner Parameter	20
2.2.1 Bestimmung der Proteinkonzentration: Bradford-Assay.....	22
2.3 Western-Blot	23
2.4 Bestimmung des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs mit Hilfe eines hochauflösenden Respirometers.....	26
2.4.1 Ablauf der Messung- SUIIT 1- Protokoll	27
2.4.2 Polarografischer Sauerstoffsensoren (POS)	36
2.4.3 Sensor-Service.....	37
2.4.4 O ₂ -Hintergrund-Korrektur	37
2.4.5 Software DatLab.....	38
2.5 Statistik.....	38

3	Ergebnisse	40
3.1	Allgemeine Parameter des Phänotyps.....	40
3.1.1	Körpergewicht.....	40
3.1.2	Körperlänge.....	41
3.1.3	Blutglukosespiegel.....	42
3.1.4	Hämatokrit.....	43
3.2	Reinheitskontrolle der isolierten Mitochondrien mittels Western Blot.....	44
3.3	Vergleich des O ₂ -Verbrauchs innerhalb der Mausgruppen.....	46
3.3.1	O ₂ -Verbrauch des Cerebellums.....	46
3.3.2	O ₂ -Verbrauch des Hirnstammes.....	55
3.4	Vergleich zwischen Cerebellum und Hirnstamm.....	62
3.4.1	Mausgruppen WT, <i>mCAT^{+/T}</i> und WT+AO.....	62
3.4.2	Mausgruppen <i>Mecp2^{-/y}</i> , <i>Mecp2^{-/y}+ mCAT^{+/T}</i> , <i>Mecp2^{-/y}+AO</i>	66
4	Diskussion	71
4.1	Validität der genutzten Methoden.....	71
4.1.1	Validierung der Qualität isolierter Mitochondrien.....	71
4.1.2	Validierung der Messung des mitochondrialen O ₂ -Verbrauchs.....	72
4.2	O ₂ -Verbrauch in Mitochondrien des Rett-Syndroms.....	74
4.3	Ausblick.....	78
5	Zusammenfassung	80
6	Literaturverzeichnis	82

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Übersicht über die Atmungskette (Mitchell 1961).....	2
Abbildung 2: ROS- Produktion im Mitochondrium.	10
Abbildung 3: Messung der Körperlänge.....	21
Abbildung 4: Küvetten für die Standardkurve.....	23
Abbildung 5: Übersicht über den Versuchsaufbau.	27
Abbildung 6 Messkammer im Oroboros-Respirometer.	27
Abbildung 7: Gasaustausch innerhalb der Kammer.	28
Abbildung 8: SUIT 1-Protokoll für isolierte Mitochondrien mit entsprechenden Stadien der Atmung.....	31
Abbildung 9: Grafische Darstellung der Einspeisungssubstanzen.....	34
Abbildung 10: Ausschnitt aus einer Beispielmessung vom Cerebellum eines Wildtyp Männchens im Alter von 50 Tagen einer Messkammer.....	35
Abbildung 11: Schema des Respirometers mit POS im Detail.....	36
Abbildung 12: Oroboros-Respirometer mit den Hamilton Mikrospritzen.....	38
Abbildung 13: Gewicht.....	41
Abbildung 14: Körperlänge.....	42
Abbildung 15: Blutglukose.....	43
Abbildung 16: Hämatokrit.....	44
Abbildung 17: Quantifizierung der Ergebnisse des Western Blots mittels Densitometrie.	45
Abbildung 18: Vergleich der mitochondrialen Sauerstoffverbrauchsrate im Cerebellum verschiedener Mausgruppen.	48
Abbildung 19: Vergleich der normierten mitochondrialen Sauerstoffverbrauchsrate (FCR(bc)) im Cerebellum verschiedener Mausgruppen.	54
Abbildung 20: Vergleich der mitochondrialen Sauerstoffverbrauchsrate im Hirnstamm verschiedener Mausgruppen.	58
Abbildung 21: Vergleich der normierten mitochondrialen Sauerstoffverbrauchsrate (FCR(bc)) im Hirnstamm verschiedener Mausgruppen.	60
Abbildung 22: Vergleich der mitochondrialen Sauerstoffverbrauchsrate verschiedener Hirnregionen.	63
Abbildung 23: Vergleich der normierten mitochondrialen Sauerstoffverbrauchsrate (FCR(bc)) verschiedener Hirnregionen.....	65
Abbildung 24: Vergleich der mitochondrialen Sauerstoffverbrauchsrate verschiedener Hirnregionen.	67
Abbildung 25: Vergleich der normierten mitochondrialen Sauerstoffverbrauchsrate (FCR(bc)) verschiedener Hirnregionen.....	69
Abbildung 26: Beispielmessspur von der Firma Oroboros.....	73

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Stadien der Atmung.	6
Tabelle 2: Auszug reaktiver Sauerstoffspezies und ausgewählte Bedeutungen, modifiziert nach (Kohen und Nyska 2002; Lushchak 2014).	7
Tabelle 3: PBS	21
Tabelle 4: Isolationspuffer A	22
Tabelle 5: Antikörper	23
Tabelle 6: Mitochondrien-Isolationspuffer.....	24
Tabelle 7: SDS-Puffer	24
Tabelle 8: Tris-Tricin-Gradienten Gel, Zusammensetzung der Gelkomponenten	25
Tabelle 9: MiR05.....	29
Tabelle 10: SUIT 1-Protokoll.	30

Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
Ama	Antimycin A
ANOVA	<i>analysis of variance</i> , Varianzanalyse
AO	Antioxidantien
APS	Ammoniumperoxodisulfat
As	Ascorbat
ATP	Adenosintriphosphat
Az	Azid
BSA	bovines Serumalbumin
c	Cytochrom c
CI	Atmungskettenkomplex I
CII	Atmungskettenkomplex II
CIII	Atmungskettenkomplex III
CIV	Atmungskettenkomplex IV
Cal	Calreticulin
CB	Cerebellum
CCCP	Carbonylcyanid-m-chlorophenylhydrazon
CoA	Coenzym A
COX6a	Cytochrome C Oxidase Untereinheit 6a
D	ADP
DHAP	Dihydroxyacetonphosphat
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
ETF	Elektronentransferierendes Flavoprotein
ETS	<i>electron transfer system capacity</i> , Elektronentransfersystemkapazität
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FCR (bc)	<i>flux control ratio (baseline corrected)</i>
G	Glutamat
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
Gp	Glycerophosphat
GSH	Glutathion, reduzierte Form
GSSG	Glutathion, oxidierte Form
GPX	Glutathion-Peroxidase
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> , Meerrettichperoxidase
HS	Hirnstamm
M	Malat
<i>mCAT</i>	mitochondriale Katalase
MeCP2	<i>methyl-CpG binding protein</i>
MiR05	mitochondriales Respirationsmedium 05
n	Anzahl der verwendeten Mäuse

NADH	Nikotinamidadenindinukleotid
NADP ⁺	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat
Oct	Octanolycarnitin
OXPPOS	Oxidative Phosphorylierung
P	Pyruvat
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i> , phosphatgepufferte Salzlösung
PEEK	Polyetheretherketon
PMP70	70 kDa peroxisomales Membranprotein
POS	<i>polarographic oxygen sensor</i> , polarografischer Sauerstoffsensord
Q	Ubichinon
RNS	<i>reactive nitrogen species</i> , reaktive Stickstoffspezies
ROS	<i>reactive oxygen species</i> , reaktive Sauerstoffspezies
ROX	<i>residual oxygen consumption</i> , residueller Sauerstoffverbrauch
Rot	Rotenon
RTT	Rett-Syndrom
S	Succinat
SDS	<i>sodiumdodecylsulfat</i> , Natriumdodecylsulfat
SOD	Superoxiddismutase
SUIT	<i>substrate-uncoupler-inhibitor titration</i> , Substrat-Entkoppler-Inhibitor-Titration
TBS-T	<i>tris-buffered saline with Tween 20</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tris-Tricin	Tris(hydroxymethyl)aminomethan-N-(Tri(hydroxymethyl)methyl)glycin
TMPD, T _m	N,N,N',N'-Tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride
U	<i>uncoupler</i> , Entkoppler
WT	Wildtyp

1 Einleitung

Mitochondriale Dysfunktionen stellen eine zentrale Problematik bei vielen unterschiedlichen Krankheiten dar. Zu diesen zählen Diabetes mellitus (Kadowaki 1994; Suzuki et al. 1994), Morbus Parkinson (Parker et al. 1989), Morbus Alzheimer (Parker et al. 1990) sowie das Rett-Syndrom (Eeg-Olofsson et al. 1988; Großer et al. 2012; Müller und Can 2014; Ruch et al. 1989). In dieser Arbeit soll der Zusammenhang von Redox-Imbalancen und der mitochondrialen Effizienz mit Hilfe des Sauerstoffverbrauchs untersucht werden. Exemplarisch wird hierfür das Rett-Syndrom analysiert und charakterisiert. Hierbei wird ein Fokus auf der Atmungskette, der Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) sowie deren Rolle im Rahmen des Rett-Krankheitsbildes liegen.

1.1 Die Atmungskette

Im Jahr 1966 beschrieb Peter Mitchell die Abläufe der Atmungskette, wofür er 1978 den Nobelpreis für Chemie erhielt (Mitchell 1966). Die Atmungskette ist in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert und aus mehreren Bestandteilen aufgebaut, zu denen die Komplexe I – IV zählen. Im Laufe der Atmungskette werden Elektronen von Reduktionsäquivalenten, welche vor allem im Citratzyklus durch die Oxidation von Acetyl-CoA entstehen, über mehrere Redox-Schritte auf Sauerstoff (O_2) übertragen. Über Komplex I, III und IV werden Protonen von der Mitochondrienmatrix in den Intermembranraum transportiert. Die hierbei freiwerdende Energie wird genutzt, um einen Protonengradienten über der inneren Mitochondrienmembran aufzubauen. Diese Energie wird benötigt, um durch die F_0F_1 -ATPase mit Hilfe des von der Atmungskette generierten Protonengradienten den Energieträger Adenosintriphosphat (ATP) zu generieren (s. Abbildung 1). Dementsprechend dienen die Komplexe der Atmungskette dem Aufbau des Protonengradienten und bieten hiermit die unablässige Voraussetzung für die endergone Reaktion von $ADP + P_i \rightarrow ATP$, welches ein universeller Stoffwechselmediator für den menschlichen Organismus ist (Mitchell 1966). Durch den Transport der Elektronen in den Intermembranraum entsteht ein Membranpotential. Auf Grund des Konzentrationsunterschieds der Protonen in der Matrix und dem Intermembranraum entsteht ein Konzentrationsunterschied und hierdurch ein chemisches Potential. Die Summe aus elektrischem Spannungsgefälle und chemischem Konzentrationsgefälle ergibt letztlich die elektromotorische Kraft mit einer Spannungsdifferenz von etwa $\Delta 200$ mV (Maloney et al. 1974; Mitchell 1966; Mitchell und Moyle 1969). Diese elektrochemische Kraft ist die Grundlage für die Generierung des energiereichen ATPs (Mitchell 1961).

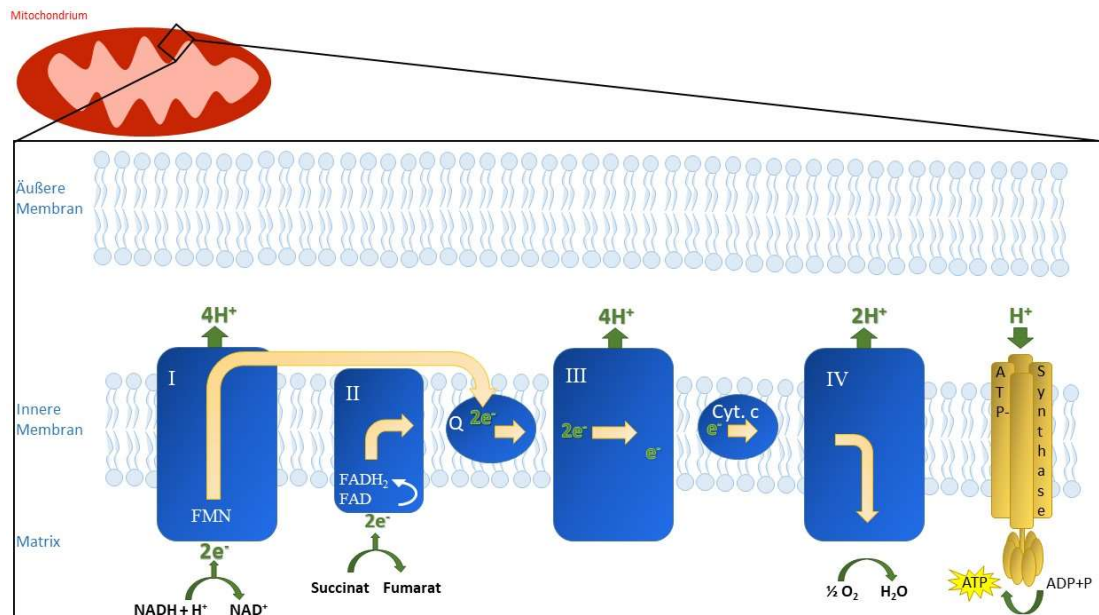


Abbildung 1: Übersicht über die Atmungskette (Mitchell 1961). Ablauf des Elektronentransports während der Atmungskette in der inneren Mitochondrienmembran. Q = Ubichinon

1.1.1 Komplex I (NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase)

Dies ist der größte Komplex der Atmungskette mit einem Molekulargewicht von mehr als 900 kDa (Cecchini 2003). Das beschriebene Protein besteht aus einem membranständigen und einem peripheren, in die Matrix des Mitochondriums hineinragenden, Teil. An Komplex I wird NADH, welches im Citratzyklus und in der β -Oxidation von Fettsäuren entsteht, zu $\text{NAD}^+ + \text{H}^+ + 2\text{e}^-$ oxidiert. Im Gegenzug wird mit Hilfe der beiden freiwerdenden Elektronen das im Komplex I gebundene FMN (Flavinmononucleotid) zu FMNH_2 reduziert. Nachfolgend werden die Elektronen über acht Eisen-Schwefel-Cluster letztlich auf Ubichinon (Q) übertragen, welches dadurch zu Ubichinol (Ubihydrochinon, QH_2) reduziert wird. Demzufolge werden Elektronen in die Atmungskette eingespeist, welche im späteren Verlauf schrittweise auf Sauerstoff übertragen werden und diesen somit reduzieren. Die Redox-Reaktion wird in der hydrophoben Domäne von Komplex I katalysiert und es wird hierbei ein großer Teil der zellulären reaktiven Sauerstoffspezies produziert, welche unter anderem in der Atmungskette anfallen. Die durch die Redox-Reaktionen freiwerdende Energie wird in elektrochemische Energie umgewandelt, indem vier Protonen von der Matrix in den Intermembranraum der Mitochondrien gepumpt werden und somit ein Protonengradient aufgebaut wird (Hirst 2013; Mitchell 1966).

1.1.2 Komplex II (Succinat-Dehydrogenase)

Als einziges membrangebundenes Element des Citratzyklus ist Komplex II ein Verbindungsglied zwischen dem Citratzyklus und der Atmungskette, da er Bestandteil von beiden ist (Cecchini 2003). Dieser Komplex oxidiert Succinat zu Fumarat in der Mitochondrienmatrix und überträgt ebenfalls zwei Elektronen auf Ubichinon (Huang und

Millar 2013). Die aus der Oxidation von Succinat freiwerdenden Elektronen werden dabei auf Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) transferiert, welches eine prosthetische Gruppe der Succinat-Dehydrogenase ist. Im weiteren Verlauf werden die zwei Elektronen auf drei aufeinanderfolgende Eisen-Schwefel-Cluster geleitet, welche sich im peripheren Teil der Succinat-Dehydrogenase befinden (Yankovskaya et al. 2003). Auf Grund der Tatsache, dass diese Cluster jeweils nur ein Elektron aufnehmen können, läuft die Reoxidation von FADH_2 zu FAD über eine radikalische, aber stabile Zwischenform ab und jeweils ein Elektron wird auf die Eisen-Schwefel-Cluster weitergeleitet. Von dort gelangen sie auf eine Häm-Gruppe, die im membranständigen Teil dieses Komplexes angesiedelt ist (Rouault und Tong 2008). Abschließend kommt es zur Übertragung der Elektronen auf das in der Membran frei lösliche Ubichinon (Kim und Winge 2013). Über Komplex II werden im Unterschied zu den restlichen Komplexen der Atmungskette jedoch keine Protonen in den Intermembranraum gefördert, da sie zurück in die Matrix abgegeben werden (Cecchini 2003).

1.1.3 Ubichinon (Coenzym Q)

Dieses fettlösliche und somit in der Membran bewegliche, kleine Coenzym kommt in zwei Formen vor: die oxidierte Form ist Ubichinon, welches zwei Elektronen von den Komplexen I und II sowie von der ETF-Ubichinon-Oxidoreduktase oder der Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase aufnehmen und hierdurch zu Ubichinol reduziert werden kann. Die Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase wandelt Glycerin-3-Phosphat zu Dihydroxy-acetonphosphat um und erhält die hierfür nötigen Elektronen von NADH aus dem Zytosol, welches während der Glycolyse gebildet wird. Im Laufe der β -Oxidation in der Mitochondrienmatrix entsteht FADH_2 , welches zwei Elektronen auf Elektronen-transferierende Flavoproteine (ETF) gibt und diese dann über Ubichinol in die Atmungskette einspeisen kann. Ubichinol kann die aufgenommenen Elektronen nun auf Komplex III transferieren (Ebadi et al. 2001).

1.1.4 Komplex III (Ubichinon-Cytochrom-c-Oxidoreduktase)

Dieser Komplex transloziert Elektronen von Ubichinol auf Cytochrom c über den Q-Zyklus, wodurch der Elektronentransfer mit der Erzeugung des Protonengradienten gekoppelt wird, um mit der gewonnenen Energie die ATP-Synthase antreiben zu können (Crofts 2004). Ubichinol wird zu Ubichinon oxidiert, wobei zwei Protonen von Ubichinol in den Intermembranraum transferiert und außerdem noch zwei weitere Protonen mit der aus dem Elektronenfluss gewonnenen Energie in den Intermembranraum befördert werden. Folglich trägt dieser Komplex mit dem Transport von vier H^+ zum Aufbau des Protonengradienten über der inneren Mitochondrienmembran bei. Um die beiden Elektronen von Ubichinol auf Komplex III zu übertragen, bindet es an der Q_0 -Bindestelle dieses Komplexes. Von dort führt der Weg der Elektronen über ein Eisen-Schwefel-Cluster, dem sogenannten Rieske-Zentrum, zu Cytochrom c, welches nicht-kovalent an Komplex III ist. Dieses Cluster kann jedoch nur jeweils ein Elektron aufnehmen. Das andere Elektron reduziert ein zusätzliches

Ubichinon, welches an der Qi-Bindestelle des Komplexes III ebenfalls gebunden ist. Durch die folgende Abgabe der beiden Protonen in den Intermembranraum wird das Ubichinol in der Qo-Bindestelle wieder zu Ubichinon oxidiert und löst sich von Komplex III. In einem weiteren Schritt bindet wieder ein neues Ubichinol an die Qo-Stelle und gibt seine Elektronen wie zuvor beschrieben ab, folgend hat Cytochrom c zwei Elektronen in Summe erhalten (Bénil et al. 2009; Mitchell 1975).

1.1.5 Cytochrom

Dieses kleine Protein, bestehend aus 104 Aminosäuren, hat als prosthetische Gruppe ein Häm c kovalent gebunden und kann mit dessen zentralem Eisenion ein einzelnes Elektron transportieren. Frei im Intermembranraum der Mitochondrien beweglich, kann es somit den weiteren Elektronenfluss von Komplex III zu Komplex IV ermöglichen (Swanson et al. 1977). Cytochrom c befindet sich im Intermembranraum und kann die äußere Mitochondrienmembran nicht durchdringen. Dies ist entscheidend, da es als Auslöser für die Signalkaskade der intrinsischen Apoptose in Zellen fungiert, sobald es auf Grund von Schäden der äußeren Mitochondrienmembran in das Zytoplasma übertritt (Bertini et al. 2006).

1.1.6 Komplex IV (Cytochrom-c-Oxidase)

Dieser Komplex ist der letzte der Atmungskette und besteht aus mehreren Untereinheiten, deren Funktionen zum Teil unbekannt sind. Untereinheit I ist die größte Untereinheit mit zwölf Transmembranhelices und enthält zwei Cytochrome, Cytochrom a und a_3 , und ein Kupferatom. Zwischen dem Kupferatom und dem Eisenatom des Häm a_3 wird der molekulare Sauerstoff komplexiert, was letztlich dessen Reduktion ermöglicht (Michel et al. 1998). Die an Cytochrom c gebundenen Elektronen werden nun auf Sauerstoff übertragen, was schließlich dessen Reduktion zu Wasser zur Folge hat. Cytochrom c wird im Gegenzug oxidiert und kann dadurch zur Neuaufnahme von Elektronen zum Komplex III zurückkehren. Die dabei freiwerdende Energie wird genutzt, um bis zu vier weitere Protonen über die innere Mitochondrienmembran zu transportieren und hierbei den Protonengradienten weiter auszubauen.

1.1.7 ATP-Synthase

Die ATP-Synthase nutzt den von der Atmungskette erzeugten Protonengradienten, um mit Hilfe von oxidativer Phosphorylierung ATP zu produzieren. Auf diese Weise wird ein Großteil dieses Energieträgers im menschlichen Organismus gewonnen (Erecinska und Silver 1989). Dieses Enzym befindet sich in der inneren Mitochondrienmembran, reicht in die Matrix hinein und besteht aus zwei Teilen mit mindestens 17 Untereinheiten. Unterschieden werden der F_0 -Teil, welcher die Membran durchzieht und einen Protonenkanal enthält, und der lösliche F_1 -Teil in der Peripherie, aus drei katalytischen

Untereinheiten bestehend, an welchem die Synthesereaktion der ATP-Generierung abläuft (Boyer 1993). Die Fo-Einheit besteht aus den Untereinheiten a, b₂, c₉₋₁₂, die F₁-Einheit aus den Untereinheiten α ₃, β ₃, γ , δ , ϵ . Mechanisch gekoppelt sind diese beiden Teile durch die Rotation der Untereinheit γ im Zentrum des katalytischen Hexagons der Untereinheiten $\alpha\beta\gamma$ (Engelbrecht und Junge 1997). Dieses Enzym nutzt den elektrochemischen Protonengradienten, um ADP in ATP umzuwandeln (Capaldi et al. 1994)

1.2 Stadien der mitochondrialen Atmung

Die mitochondriale Atmung kann in fünf Stufen eingeteilt werden. Dies geschieht in Abhängigkeit von den vorhandenen und limitierenden Substanzen und wurde das erste Mal von Chance und Williams 1956 beschrieben (Chance und Williams 1956). Auch Oroboros Instruments, Innsbruck, Österreich (im Folgenden als Oroboros bezeichnet) bezieht sich auf diese Stadien, betitelt sie aber mit eigenen Bezeichnungen. In Tabelle 1 sind diese Stadien und ihre jeweiligen Charakteristika dargestellt. Dort ebenfalls einsehbar sind drei Bezeichnungen von Oroboros, welche im später beschriebenen Messprotokoll Anwendung finden werden (s. Abbildung 8). Diese sind den entsprechenden Stadien von Chance und Williams zugeordnet. Während Chance und Williams sich auf die Stadien der physiologischen Atmung konzentrierten, wird durch Oroboros auch auf Zustände eingegangen, welche durch Gabe von Substanzen unter experimentellen Bedingungen mit Mitochondrienpräparationen hervorgerufen werden. Bei allen von ihnen beschriebenen Stadien ist Sauerstoff im Überschuss vorhanden, außer im Stadium V, Anoxie-Stadium (von Oroboros als *anoxic* betitelt), da dieser hierbei verbraucht wurde.

Die initiale Gabe von Substraten speist die Atmungskette mit Energieäquivalenten und beschreibt das Leck-Stadium (Oroboros: *LEAK*) in der Abwesenheit von ADP. Wird ADP nun in Sättigung hinzugegeben, wird die Atmung in das Stadium der oxidativen Phosphorylierung (Oroboros: *OXPHOS*) versetzt. Durch die darauffolgende Gabe von Entkopplern wird die maximale Atmung stimuliert, was als Elektronentransportkapazität (Oroboros: *electron transfer system capacity, ETS*) bezeichnet wird. Wird die Atmungskette nun gehemmt, ist das Stadium des residualen Sauerstoffverbrauchs (Oroboros: *residual oxygen consumption, ROX*) zu messen. Dieses Stadium kann auch vor der Gabe jeglicher Substanzen ermittelt werden, denn ein Fehlen von Substraten sowie dem Ausgangssubstrat ADP verhindert das Funktionieren der Atmung. Als Routine (Oroboros: *Routine*) wird die physiologische Atmung *in vivo* bezeichnet.

Tabelle 1: Stadien der Atmung. Die Kreise markieren die sich ändernden Komponenten, durch welche Änderung das jeweilige Stadium eingeleitet wird. Die Pfeile bezeichnen, ob die jeweilige Kategorie in diesem Stadium hoch (↑) oder niedrig (↓) ist. Die Farbkodierung der einzelnen Stadien entspricht jener von Oroboros Instruments.

Stadium	ADP Level	Substrat	Atmungsrate	Limitierender Faktor	Oroboros-Bezeichnung
I.	↓	↓	↓	ADP	<i>Routine</i>
II.	Ⓢ	0	↓	Substrate	<i>ROX</i>
III.	↑	Ⓢ	↑	Atmungskettenenzyme	<i>OXPPOS</i>
IV.	Ⓢ	↑	↓	ADP	<i>LEAK</i>
V.	↑	↑	Ⓢ	Sauerstoff	<i>anoxic</i>

1.3 Reaktive Sauerstoffspezies

Sauerstoff an sich ist recht reaktionsträge, kann aber in bestimmten Formen auftreten, welche sehr reaktionsfreudig sind, da sie ein ungepaartes Elektron tragen. Diese werden als reaktive Sauerstoffspezies bezeichnet und entstehen durch gelegentliche Übertragung von Elektronen auf molekularen Sauerstoff. Dies geschieht während der Atmungskette in den Mitochondrien sowie ebenfalls im Zytosol durch Oxidasen und Enzyme aus der P450 Familie im endoplasmatischen Retikulum. Den Hauptteil der ROS-Produktion stellt die Generierung im Mitochondrium dar (Boveris und Chance 1973), dies entspricht etwa 90% der gesamten Produktion (Lushchak 2014), der restliche Anteil wird extramitochondrial erzeugt. Außerdem können auch reaktive Stickstoffspezies (*reactive nitrogen species*, RNS) gebildet werden, welche sich vom Stickstoffmonoxid (NO^{*}) ableiten. Die Bildung dieses Stoffes wird durch die NO-Synthase (NOS) katalysiert, welche die proteinogene Aminosäure Arginin unter Verwendung molekularen Sauerstoffs zu Citrullin und NO reagieren lässt (Nathan und Xie 1994). Ein sehr reaktives RNS ist das Peroxynitrit (Ischiropoulos et al. 1992).

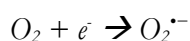
1.3.1 Entstehung und Bedeutung reaktiver Sauerstoffspezies im Rahmen der Atmungskette

Im Laufe der Atmungskette werden Elektronen von NADH und FADH₂ über mehrere Zwischenschritte auf Sauerstoff übertragen. Während dieser Reaktionen entstehen zu einem geringen Prozentsatz (Boveris und Chance 1973; Boveris et al. 1972) ROS. Dies sind zum Teil radikale Sauerstoffverbindungen, jedoch werden auch stabile, sehr reaktive Verbindungen dazu gezählt. Als freie Radikale werden alle Atome oder Moleküle bezeichnet, welche ein oder mehrere ungepaarte Elektronen besitzen (Ebadi et al. 2001). Allen ROS gemeinsam ist, dass sie sich von molekularem Sauerstoff ableiten (s. Tabelle 2).

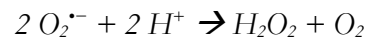
Tabelle 2: Auszug reaktiver Sauerstoffspezies und ausgewählte Bedeutungen, modifiziert nach (Kohen und Nyska 2002; Lushchak 2014).

Formel	Bezeichnung	Bedeutung
Freie Radikale		
$O_2^{\bullet -}$	Hyper(Super-)oxid-Anion	Hauptvertreter mitochondrialer ROS (Murphy 2009), Respiratory burst
OH^{\bullet}	Hydroxylradikal	Fenton Reaktion (ROS-Bildung durch Eisensalz-katalysierte Oxidation organischer Verbindungen unter Beteiligung von OH^{\bullet})
RO_2^{\bullet}	Peroxy-Radikal	Entsteht bei Oxidation von Fettsäuren in biologischen Membranen
RO^{\bullet}	Alkoxyradikal	
NO^{\bullet}	Stickstoffmonoxid	Vasodilatator
Nichtradikale		
H_2O_2	Wasserstoffperoxid	Respiratory burst Physiologischer Botenstoff, starkes Oxidationsmittel (Herstellung von T_3/T_4)
NO_2	Stickstoffdioxid	
$HOCl$	Hypochlorige Säure	
$ONOOH$	Peroxynitrit	
HNO_2	Salpetrige Säure	
O_3	Ozon	
1O_2	Singulett-Sauerstoff	

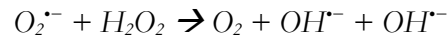
ROS entstehen im Organismus, indem zunächst ein Elektron auf molekularen Sauerstoff (O_2) übertragen wird und somit das reaktive Superoxid-Anion ($O_2^{\bullet -}$) entsteht:



Dies ist ein Vorläufer der meisten anderen ROS. Die Superoxiddismutase formt aus diesem folglich Wasserstoffperoxid (H_2O_2):



Diese Reaktion kann jedoch auch spontan ablaufen. H_2O_2 kann ebenfalls direkt mit Superoxidanionen reagieren:



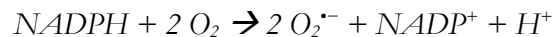
Hierbei entsteht das Hydroxylradikal OH^{\cdot} , welches sehr reaktiv ist (Cheeseman und Slater 1993).

Die Atmungskette bietet viele Möglichkeiten, an denen Elektronen direkt auf Sauerstoff übertragen werden können, was in vielen Geweben die Hauptquelle für Superoxid-Anionen darstellt. Auf Grund der reduzierenden Umgebung innerhalb der Mitochondrien sind viele Komponenten in der Lage, ein einzelnes Elektron auf Sauerstoff zu übertragen.

Welcher der Komplexe der Atmungskette die meisten ROS produziert, ist abhängig vom Gewebe. Während beim Herzen und der Lunge Komplex III der Vorreiter in der Produktion von ROS zu sein scheint (Barja 1999; Turrens und Boveris 1980; Turrens et al. 1982), wirkt im Gehirn Komplex I unter physiologischen Bedingungen hauptverantwortlich für die Generierung der ROS (Barja und Herrero 1998). Somit spielt vor allem Komplex I eine maßgebliche Rolle im Einfluss von ROS auf Alterungsprozesse und zentralnervös bedingte Krankheiten wie Morbus Parkinson (Barja 1999; Barja und Herrero 1998; Schapira 1994).

ROS sind, wie ihr Name schon zeigt, sehr reaktionsfreudige Substanzen und können somit Schaden in ihrer unmittelbaren zellulären Umgebung anrichten. In niedrigen Konzentrationen sind ROS nicht schädlich, sondern sogar notwendig, beispielsweise im Rahmen der Signalübertragung (Lander 1997). H_2O_2 nimmt eine wichtige Rolle ein, indem es posttranslational die Sulfhydrylgruppe der Aminosäuren Cystein reversibel oxidiert, sodass Disulfidbindungen, Sulfonsäurereste oder Gluthathionylierungen entstehen. Somit wird ein erheblicher Einfluss auf die Regulation und Modulation der Aktivität von Proteinen ausgeübt (Leichert und Dick 2015). Eine Vielzahl an Proteinfamilien nutzen ein System auf Basis Cystein-abhängiger chemischer Umwandlungen (Weerapana et al. 2010). Des Weiteren ist eine geringe Dosis an ROS essenziell, da sie auch physiologische Aufgaben erfüllen (Goldstein 2002). Im Zytosol wirken sie als Signalstoffe sowie außerhalb von Zellen als Abwehr gegenüber Mikroorganismen, die in beschädigtes Gewebe eingedrungen sind (Rhee 1999; Skulachev 2012). Letzteres wird als *respiratory burst* bezeichnet und ist durch einen rapiden Anstieg des Sauerstoffverbrauchs gekennzeichnet (Babior 1984). Besagtes ereignet sich in neutrophilen Granulozyten sowie Makrophagen. Diese Immunzellen können im Zuge dessen nach Phagozytose von Fremdkörpern diese innerhalb der Zelle eliminieren. Dieser Vorgang wird durch die NADPH-Oxidase ermöglicht, welche ein im körpereigenen Genom codiertes Enzym zur Herstellung toxischer ROS darstellt. Hierdurch kommt die ebenfalls physiologische Bedeutung dieser reaktiven Sauerstoffverbindungen zum Tragen. Das in

phagozytierenden Zellen auftretende Enzym nutzt als Substrat die reduzierte Form des $NADP^+$ (Nikotinamidadenindinukleotidphosphat) und Sauerstoff:



Als Produkt entstehen die oxidierte Form des NADP ($NADP^+$) sowie zwei Superoxidanionen (Vignais 2002). Diese reagieren sofort, spontan oder katalysiert, durch die Superoxiddismutase, wie zuvor bereits beschrieben, zu Wasserstoffperoxid (Babior 1984). Dass auch H_2O_2 vielfältige physiologische Bedeutungen für den Körper hat, wird ebenfalls am Beispiel der Synthese der Schilddrüsenhormone T_3 und T_4 verdeutlicht, bei welcher H_2O_2 als essenzielles Oxidationsmittel fungieren muss (Björkman und Ekholm 1984; Taurog 1970).

Wird aber eine bestimmte Schwelle der Konzentration an ROS überschritten, ist dies potenziell zytotoxisch und führt unter Umständen zu Zellschäden oder sogar zum Zelltod. Dieser Prozess wird als *Mitobormesis* bezeichnet (Barcena et al. 2018; Ristow und Schmeisser 2011; Schulz et al. 2007). Steigt die ROS-Produktion von Mitochondrien zu stark, kommt es zur Ausbildung der sogenannten MPTP (*mitochondrial permeability transition pore*). Dieser in der inneren Mitochondrienmembran befindliche Proteinkomplex wird unter bestimmten pathologischen Bedingungen gebildet und führt zu einer (kalziumabhängigen) erhöhten Permeabilität der Mitochondrienmembranen für Moleküle mit einer Größe bis zu 1,5 kDa Molekulargewicht, wodurch es zu einem Anschwellen der Mitochondrien mit folgender Ruptur der äußeren Mitochondrienmembran kommt. Dies setzt Faktoren frei, welche die intrinsische Apoptose einleiten und zum Tod der Zelle führen (Bernardi und Forte 2007; Costantini et al. 1996; Srinivasan 2015).

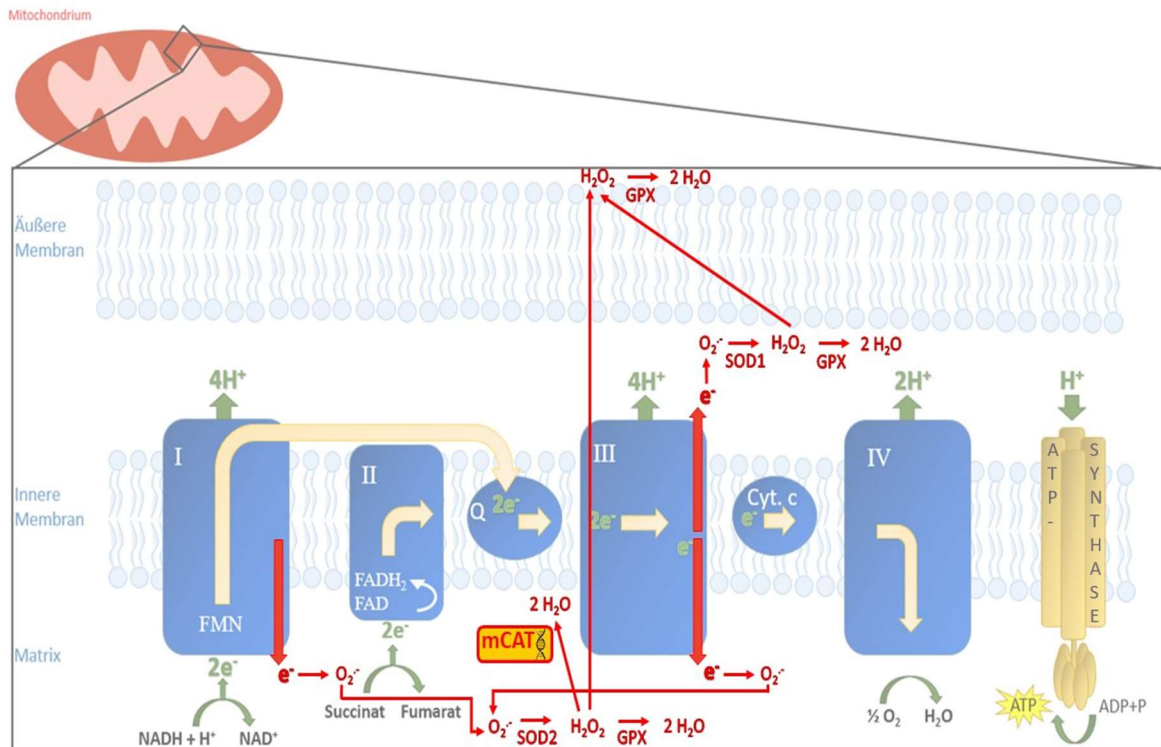
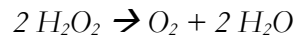


Abbildung 2: ROS- Produktion im Mitochondrium. Dargestellt sind häufige Reaktionen, bei welchen reaktive Sauerstoffspezies im Laufe der Atmungskette anfallen.

1.3.2 Abbau reaktiver Sauerstoffspezies

Der Entstehung von Superoxid-Anionen und Wasserstoffperoxid stehen verschiedene Mechanismen der Mitochondrien zum Abbau dieser gegenüber (Turrens 2003). $O_2^{\bullet -}$ wird sowohl im Intermembranraum als auch in der Matrix produziert. Die im Intermembranraum entstehenden Superoxid-Anionen können zwar teilweise über einen spannungsgesteuerten Anionenkanal (*vDAC*), ein Kanal in der äußeren Mitochondrienmembran, in das Zytosol geleitet werden (Colombini et al. 1996; Schein et al. 1976), jedoch wird der Großteil dieser von der in der Matrix befindlichen Superoxiddismutase (SOD2) abgebaut. Bei den SODs handelt es sich um Enzyme, die Superoxidanionen, wie bereits beschrieben, zu Sauerstoff und Wasserstoffperoxid entschärfen (McCord und Fridovich 1969). Diese Reaktion kann ebenfalls spontan ablaufen, wird aber durch die Tätigkeit des Enzyms verstärkt (Turrens 2003). Es lassen sich verschiedene Formen der Superoxiddismutase beschreiben, nämlich die Mangan-abhängige SODs (MnSOD, SOD 2) und Kupfer- und Zink-abhängige SODs (CuZnSOD, SOD 1), welche sich in ihrem Auftreten in menschlichen Zellen unterscheiden. Die MnSOD sind in der Mitochondrienmatrix und der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert (Fridovich 1995), wohingegen die CuZnSOD im Intermembranraum sowie im Zytoplasma zu finden sind (Okado-Matsumoto und Fridovich 2001; Weisiger und Fridovich 1973) (s. Abbildung 2). Des Weiteren existiert eine SOD 3, ebenfalls Kupfer- und Zink-abhängig, welche sich im Extrazellularraum befindet (Chang et al. 1988; Zelko et al. 2002).

Ein weiteres für den Abbau reaktiver Sauerstoffspezies wichtiges Enzym ist die Katalase. Diese kommt im Zytosol vor und katalysiert die folgende Reaktion:



Somit eliminiert die im Zytosol eukaryotischer Zellen vorkommende Katalase das zuvor erwähnte Wasserstoffperoxid, welches unter anderem indirekt im Rahmen der Atmungskette gebildet werden kann (Lück 1965).

Des Weiteren kann Wasserstoffperoxid auch durch die Glutathion-Peroxidase (GPX) unschädlich gemacht werden. Diese oxidiert das aus drei Aminosäuren aufgebaute Glutathion und reduziert dabei Wasserstoffperoxid



Bei dieser Reaktion entsteht somit ein Glutathion-Dimer, welches über eine Disulfidbrücke verbunden ist, und durch die Glutathion-Reduktase regeneriert werden muss.

1.3.3 Pathologische Effekte von ROS

Oxidativer Stress beschreibt verschiedene fehlerhafte Prozesse, welche aus der Imbalance zwischen der Produktion von ROS und geringer antioxidativer Abwehr entstehen (Turrens 2003), bezeichnet also ein Ungleichgewicht zwischen Oxidantien und Antioxidantien und dem daraus möglicherweise resultierendem Schaden (Sies 1997). Bereits kleine Abweichungen des ROS-Haushalts resultieren in potenziellen Redox-Imbalancen, welche wiederum zu veränderten Signalwegen innerhalb der Zelle führen können (Dröge 2002). Durch unkontrolliertes Ansteigen der Konzentration an ROS werden Kettenreaktionen durch freie Radikale ausgelöst, welche Proteine (Stadtman und Levine 2000), Fette (Rubbo et al. 1994) und DNA (LeDoux et al. 1999; Richter et al. 1988) angreifen.

Jede Redox- (Reduktions-Oxidations-) Reaktion kann in die beiden dazugehörigen Halbreaktionen aufgeteilt werden: die Reduktion des einen Reaktionspartners und die Oxidation des anderen. Der Zusammenhang zwischen Reduktion und Oxidation wird wie folgt definiert:



Gemessen wird das Reduktions- und Oxidationsvermögen von Stoffen mit Hilfe des Redoxpotentials. Dieses, auch als Redox-Spannung bezeichnet, umfasst die Potentialdifferenz zwischen einem Stoff und einer standardisierten Wasserstoffelektrode und stellt die treibende Kraft jeder Redox-Reaktion dar (De Bolster 1997).

Um den Redox-Status einer Zelle zu messen, wird häufig das Verhältnis von Glutathion in reduzierter (GSH) zu oxidierten (GSSG) Form im Zytosol ermittelt (Enns und Cowan 2017). Dies wird dadurch begründet, dass Glutathion, welches im Zytosol synthetisiert wird, das zweithäufigste Molekül in diesem Zellkompartiment darstellt (Bennett et al. 2009) und den bedeutendsten Einfluss auf die Redox-Balance der Zelle hat. Aus diesen Gründen ist die

genannte Ratio ein sehr gutes Maß für den Redox-Status der Zelle (Jones 2006; Schafer und Buettner 2001). Ein niedriger Wert des Verhältnisses von reduzierter zu oxidiertem Form von Glutathion spricht somit für ein oxidatives Milieu, beispielsweise hervorgerufen durch eine erhöhte Konzentration an reaktiven Sauerstoffspezies. Physiologisch ist im Zytosol, verglichen mit extrazellulär, ein reduzierendes Milieu vorherrschend, somit liegt der Großteil aller Glutathion-Moleküle in seiner reduzierten Form mit der Thiolgruppe (GSH) vor. Im endoplasmatischen Retikulum findet sich hingegen ein vergleichsweise oxidatives Milieu, so kann das Verhältnis von GSH/GSSG 3:1 bis sogar 1:1 betragen (Hwang et al. 1992).

Eine Redox-Imbalance wird aktuell als Ursache oder Begleiterscheinung vieler Krankheiten gehandelt wie beispielsweise das Down-Syndrom (Kędziora und Bartosz 1988), Demenz und Morbus Alzheimer (Behl und Moosmann 2002; Benzi und Moretti 1995; Mecocci et al. 1997), Krebs (Toyokuni et al. 1995; Wang und Yi 2008), Morbus Parkinson (Liu et al. 2010; Xu und Møller 2010), das Rett-Syndrom (De Felice et al. 2009; Großer et al. 2012; Müller 2019; Müller und Can 2014) und weitere.

Tatsächlich konnte die Imbalance des Verhältnisses von GSH/GSSG bei der Krankheit Rett-Syndrom quantitativ nachgewiesen werden, wobei das Verhältnis stark zugunsten der oxidierten Form verschoben ist (44%ige Erhöhung von GSSG in dermalen Fibroblasten von Patientinnen des Rett-Syndroms (Signorini et al. 2014), eine signifikante Abnahme von GSH im Skelettmuskel von Mäusen mit ausgeprägtem Phänotyp des Rett-Syndroms (Gold et al. 2014)) und die Annahme einer mitochondrialen Redox-Imbalance beim Rett-Syndrom konnte darüber hinaus belegt werden (Großer et al. 2012; Müller und Can 2014). Nicht zuletzt Prof. Dr. Andreas Rett selbst hat schon in einer Einzelfallstudie einen Mangel der wichtigen Reduktionsmittel Vitamin C und Glutathion in einer *post-mortem* Hirnuntersuchung einer Rett-Patientin beschreiben können (Sofic et al. 1987).

Da diese Imbalance durch zu hohe Dosen reaktiver Sauerstoffspezies zu pathologischen Veränderungen im Organismus führen kann, wird eine Senkung derselben als eine mögliche Therapieoption in der Forschung erwogen. Beispielsweise ist die Gabe von Futter mit einer Beimischung antioxidativer Bestandteile für gesunde sowie am Rett-Syndrom (*Mecp2^{-/-y}*) erkrankte Mäuse ein Ansatz der Forschung der AG Müller. Ebenso wird in dieser Arbeitsgruppe der Einfluss einer genetisch in die Mitochondrien integrierten Katalase an diesen Tieren erprobt (s. 2. Material- Methoden).

1.4 Rett-Syndrom

Das Rett-Syndrom (RTT) ist eine neurologische Entwicklungsstörung, welche fast ausschließlich weibliche Patientinnen betrifft und mit einer Prävalenz von etwa 1: 10000-15000 (Chahrour und Zoghbi 2007; Hagberg 1985; Kim und Cook 2000) auftritt. Sie wird unter der Kennzeichnung ICD-10-GM-2020 F84.2 im ICD-10 Katalog aufgeführt und zu den tiefgreifenden Entwicklungsstörungen gerechnet. Diese zeichnen sich laut ICD-10

Katalog dadurch aus, dass sie mit Sicherheit im Laufe der Kindheit einsetzen, eine Entwicklungseinschränkung besonders in Zusammenhang mit der Entfaltung des Zentralnervensystems mitbringen und stetig verlaufen, also ohne Rezidive oder Remissionen.

Als Prof. Dr. Andreas Rett, ein Neuropädiater aus Wien, das Rett-Syndrom erstmals 1966 publizierte, benannte er es als „eigenartiges hirnatrophisches Syndrom bei Hyperammonämie im Kindsalter“ (Rett 1966). In diesem Artikel beschrieb er seine Beobachtungen zu einer Gruppe seiner Patientinnen mit in sich kongruenten Symptomen. Ihm fiel auf, dass sich die Patientinnen in den ersten Monaten unauffällig entwickelten, jedoch mit etwa einem Jahr anfangen, Symptome zu zeigen. Falls sie wenige kurze Worte erlernt hatten, so verloren sie diese Fähigkeit. Ebenso verhielt es sich mit dem Gang. Außerdem wurde eine starke geistige Retardierung festgestellt. Des Weiteren äußerte er in diesem Artikel die Vermutung eines Enzymdefekts im Harnstoffzyklus als Ursache des Rett-Syndroms. Da Prof. Dr. Rett die Krankheit nur an Mädchen beobachten konnte, schloss er auf eine genetische Entstehung.

1.4.1 Genetischer Hintergrund des Rett-Syndroms

Mit der Schlussfolgerung, dass das Rett-Syndrom genetischen Ursprungs war, lag der Wiener Neuropädiater richtig, denn wie festgestellt werden konnte, ist eine Mutation im *MECP2*-Gen, welches für das *methyl-CpG binding protein* kodiert, eine ausschlaggebende Ursache für das klassische Rett-Syndrom (Amir et al. 1999; Huppke et al. 2000). Im Jahre 2004 postulierte Percy (Percy und Lane 2004), dass 80% der Fälle, die die Symptome des Rett-Syndroms erfüllen, eine Mutation in diesem Gen innehaben, weswegen diese Erkrankungsform auf *MECP2*-Basis als das klassische Rett-Syndrom bekannt wurde. Die Art der Mutation, ob nonsense-, frameshift- oder missense- Mutation, ist hochvariabel und vielfältig, wodurch bereits eine große Anzahl an *MECP2*-Mutationen identifiziert werden konnte. Der Lokus innerhalb des Exons 3 und 4 des *MECP2*-Gens kann ebenfalls sehr variabel sein (Shahbazian und Zoghbi 2001). Abhängig von der Stelle innerhalb der Gensequenz, an welcher die Mutation entsteht, kann ein gekürztes Protein gebildet werden, welches möglicherweise noch an methylierte CpG Nucleotide binden und teilweise mit der Transkription interferieren kann, jedoch gehen diese Mutationen mit einem Verlust oder zumindest einer deutlichen Einschränkung der normalen Proteinfunktion einher (Shahbazian und Zoghbi 2001; Wan et al. 1999).

Die Mutationen entstehen durch *de-novo* Mutationen in der Keimbahn, häufig durch einen Austausch von Cytosin zu Thymin an CpG hotspots (Kim und Cook 2000; Wan et al. 1999). Das *MECP2*-Gen wird X-chromosomal vererbt. Entsteht diese Mutation nun in der Keimbahn des Vaters, sind die Töchter, welche immer das X-Chromosom von ihrem Vater vererbt bekommen, betroffen. Die Söhne können folglich die Erkrankung nur von ihrer Mutter vererbt bekommen, was aber nur im seltenen Fall der erblichen Variante des RTT geschieht. Dies ist einer der Gründe, warum fast ausschließlich Mädchen am Rett-Syndrom

erkranken. Des Weiteren ist zu beachten, dass männliche Patienten im Gegensatz zu weiblichen nur ein einziges X-Chromosom besitzen und sollte das *MECP2*-Gen auf diesem fehlerhaft sein, ist es der Zelle nicht möglich, das dazugehörige Protein fehlerfrei an einen zweiten, gesunden Allel zu synthetisieren, wie es theoretisch bei weiblichen Individuen der Fall ist. Dies begründet, warum die Krankheit bei männlichen Individuen einen deutlich schwereren Verlauf als bei Mädchen nimmt und in den meisten Fällen schon während der Schwangerschaft zum Abort führt. Förderlich für das Überleben der RTT-Patientinnen ist, dass Frauen zwei X-Chromosomen besitzen und der Lyon-Hypothese folgend in jeder Zelle eines dieser beiden X-Chromosomen zufällig inaktiviert wird (Lyon 1961). Aus diesem Grund weisen Frauen ein genetisches Mosaik auf. Infolgedessen variiert der Schweregrad der Erkrankung bei weiblichen Patientinnen sehr stark, abhängig davon wie hoch der Anteil inaktiver gesunder X-Chromosomen ist.

Das *MECP2*-Gen befindet sich auf dem 28. Genlocus des X-Chromosoms, einem Abschnitt des langen (q) Arms (Xq28). Das von diesem Gen exprimierte Protein bindet über seine *methyl-CpG-binding domain* (MBD) an DNA Oligonukleotide in DNA-Promotoren, welche mindestens ein methyliertes CpG-Paar besitzen und leitet somit zu einer Inhibierung und Aktivierung der Transkription hin (Chahrour et al. 2008; Nan et al. 1993). Des Weiteren besitzt es eine Transkriptionsrepressionsdomäne. Diese kann sich mit dem Sin3A Corepressor Komplex verbinden und somit die Transkription unterdrücken (Laherty et al. 1997; Shahbazian und Zoghbi 2001).

1.4.2 Charakteristische Symptome des Rett-Syndroms

Besonders neurologische Defizite sind bei RTT-Patientinnen auffällig. Dies rührt daher, dass die messenger-Ribonukleinsäure (mRNA), welche für das Protein MeCP2 kodiert, zwar in vielen verschiedenen Geweben exprimiert wird, jedoch eine etwa sechsfach höhere Konzentration im Gehirn, verglichen mit den übrigen, erreicht (Shahbazian und Zoghbi 2001). Ist dieses Protein nun nicht mehr voll funktionsfähig, macht sich das insbesondere als geistige Retardierung bemerkbar.

Die Symptome des RTT können in notwendige Merkmale, Diagnose unterstützende Symptome sowie Ausschlusskriterien eingeteilt werden (Hagberg et al. 1985; Neul et al. 2010; Trevathan 1988). Neben dem klassischen Rett-Syndrom gibt es auch weitere verschiedene Varianten dieser Erkrankung. Allen gemeinsam ist, dass sie die notwendigen Symptome aufweisen, sie unterscheiden sich jedoch in der Entwicklung möglicher Kriterien. Dies macht die Diagnosestellung unter Umständen kompliziert, weshalb auch heute noch vielen Patientinnen (zunächst) eine falsche Diagnose gestellt wird.

Zu den notwendigen Symptomen werden unauffälliges Verhalten sowie eine scheinbar normale psychomotorische Entwicklung in den ersten sechs Lebensmonaten gezählt. Mit sechs bis 18 Monaten fangen die Patientinnen jedoch an, Symptome zu zeigen (Marschik et

al. 2013). Die normale Entwicklung stoppt und bereits erlernte Fähigkeiten, wie beispielsweise das Sprechen einzelner Worte oder das Stehen, werden nach und nach verlernt. Außerdem verlieren sie die zielgerichtete Nutzung der Hände und die Patientinnen bilden die stereotypen Handwaschbewegungen oder ein stetes Klatschen aus, welche als ein Kennsymptom des RTT betrachtet werden. Ebenfalls sind die Patientinnen durch Störungen der Kommunikation sowie sozialen Rückzug geprägt. Sie erfahren starke Einschränkungen im Sprachverständnis sowie in der Sprachproduktion und leiden unter schwerer psychomotorischer Retardierung. Eine weitere Auffälligkeit ist die um das dritte Lebensjahr auftretende Mikrozephalie, resultierend aus einer Verzögerung des Kopfwachstums (Chahrouh und Zoghbi 2007; Hagberg et al. 1983). Zu beachten ist jedoch, dass ein notwendiges Kriterium für die Diagnose RTT ist, dass der Kopfumfang bei der Geburt den Normalwerten entspricht. In einem Alter zwischen einem und vier Jahren treten Ataxie sowie Apraxie auf.

Neben diesen notwendigen Kriterien gibt es auch Merkmale, die auftreten können, es aber für die Diagnosestellung nicht zwangsläufig müssen. Zu den diagnoseunterstützenden Symptomen zählen zum Beispiel respiratorische Komplikationen, also periodische Apnoe während der Wachphasen und Hyperventilation sowie Atemstillstände (Julu et al. 2001). Das Auftreten von intrauteriner Wachstumsverzögerung, Anzeichen von Speicherkrankheiten, Retinopathie, perinatal erworbene Hirnschäden sowie neurologische Schäden auf Grund von Infektionen oder Traumata sind jedoch Ausschlusskriterien, welche gegen das RTT sprechen (Trevathan 1988).

Das klassische RTT kann in vier Stufen eingeteilt werden, welche 1986 von Dr. Hagberg beschrieben wurden (Chahrouh und Zoghbi 2007; Hagberg und Witt-Engerström 1986):

Das erste Stadium wird als Stagnationsphase bezeichnet, umfasst Monate und wird in einem Alter von etwa sechs bis 18 Monaten durchlaufen. Es ist gekennzeichnet durch den Stillstand der Entwicklung des Kindes nach dem Durchlaufen einer normalen Schwangerschaft und der ersten Lebensmonate bis zu diesem Zeitpunkt und eine nun einsetzende veränderte Kommunikation in der Form, dass weniger Augenkontakt hergestellt wird. Außerdem zeigt sich ein verlangsamtes Kopfwachstum mit der daraus resultierenden Mikrozephalie sowie vermindertes Interesse am Spielen wird auffällig.

Die Regressionsphase umschreibt das zweite Stadium der Erkrankung: Eine Abwärtsentwicklung des Zustandes der Patientinnen macht dieses Stadium aus, welches Wochen bis Monate anhält und im Alter von ein bis vier Jahren auftritt. Haben die Patientinnen zuvor das Sprechen einzelner Worte oder das Stehen erlernt, gehen diese Fähigkeiten nun verloren. Die Nutzung der Hände wird verlernt und die typischen Handwaschbewegungen erscheinen. Es treten Atemunregelmäßigkeiten sowie Hyperventilation auf, die Bewegung wird ungeschickt und es kommt zu Ataxie und Apraxie. Veränderungen des Soziallebens sind beobachtbar, welche vergleichbar mit dem Autismus

sind, wodurch häufig nicht die richtige Diagnose gestellt wird (Chahrour und Zoghbi 2007; Hagberg und Witt-Engerström 1986).

Im dritten Stadium, der pseudostationären oder Plateauphase, zeigt sich die mentale Retardierung der Patientinnen. Es tritt im Vorschul- oder frühen Schulalter auf und zieht sich über mehrere Jahre. Gekennzeichnet ist diese Phase durch eine sich prominent zeigende Apraxie, eine Dysfunktion der Grobmotorik sowie einer steigenden Wahrscheinlichkeit des Auftretens einer Epilepsie (Chahrour und Zoghbi 2007; Hagberg und Witt-Engerström 1986).

Das letzte Stadium verläuft über mehrere Jahrzehnte, wird als motorisches Verschlechterungsstadium bezeichnet und beginnt um das zehnte Lebensjahr. Die Mobilität der Patientinnen wird zunehmend stark eingeschränkt. Viele Betroffene sind an den Rollstuhl gebunden und leiden unter schweren Behinderungen einschließlich Lähmungen. Die Epilepsien nehmen wieder ab und die Patientinnen durchlaufen die Pubertät normal, wobei es aber zu einer Wachstumsverzögerung kommt. Außerdem werden sie häufig kachektisch. Auf Grund der Nervenschädigung kommt es zudem zur Skoliose (Chahrour und Zoghbi 2007; Hagberg und Witt-Engerström 1986).

1.4.3 Mitochondrien und das Rett-Syndrom

Mitochondrien übernehmen eine Vielzahl von Aufgaben in der Zelle. Dazu gehören, wie bereits beschrieben, die Atmungskette mit dazugehöriger ATP- und ROS-Produktion. Neben dieser Tätigkeit finden in diesem Organell der Citratzyklus und die Beta-Oxidation statt. Des Weiteren ist das Mitochondrium auch ein Ort der Synthese verschiedener Substanzen wie beispielsweise Eisen-Schwefel-Cluster und Membranlipide. Wichtig ist ebenfalls die Steuerung der Apoptose der Zelle und die Aufrechterhaltung der intrazellulären Kalzium-Konzentration, um somit Prozesse wie intrazelluläre Signalübertragungen und -kaskaden aufrecht zu halten. Auf Grund dieser Vielfalt an Aufgaben ist es naheliegend, dass mitochondriale Dysfunktionen als potenzielle Ursache für viele neurodegenerative Krankheiten in Frage kommen können. Ein Grund für den großen Einfluss der Beschaffenheit der Mitochondrien auf die Gehirnfunktion wird dadurch demonstriert, dass das Gehirn trotz seines Anteils von 2% an der Körpermasse in etwa 20% des gesamten Sauerstoffverbrauchs ausmacht (Erecinska und Silver 1989; Foster et al. 2006; Moreira et al. 2010).

Auch das Rett-Syndrom ist eine Erkrankung, bei welcher die Mitochondrien betroffen sind. Sowohl morphologische Veränderungen, wie beispielsweise vergrößerte Ausdehnung und Vakuolisierung (Eeg-Olofsson et al. 1990; Ruch et al. 1989), als auch biochemische Veränderungen (Dotti et al. 1993; Müller und Can 2014) dieser Organellen lassen sich hierbei erkennen.

Eine in diesem Kontext besonders relevante Aufgabe des MeCP2-Proteins ist die Kontrolle des Promoters für ein Protein, welches Teil der Atmungskette ist. Komplex III der mitochondrialen Atmungskette, die Ubichinol-Cytochrom-c-Oxidoreduktase, besteht aus elf Untereinheiten. Hiervon wird eine Untereinheit durch mitochondriale DNA codiert, die restlichen zehn Untereinheiten durch das nukleare Genom. Eine der zehn nuklear codierten Untereinheiten ist das sogenannte UQCRC1 (*Ubiquinol- Cytochrome c reductase core 1*)- Protein (Unni et al. 2019). Der Promoter des für dieses Protein codierenden Gens wird durch das MeCP2- Protein reguliert. An Gesamthirnproben von *Mecp2^{-/-}* - Mäusen, welche ein Tiermodell des RTT darstellen, konnte demonstriert werden, dass diese Tiere die entsprechende Untereinheit überexprimierten und die Zellatmung insuffizient wurde (Kriaucionis et al. 2006). Diese Erkenntnis macht deutlich, dass der fehlerfreie Ablauf der Atmungskette abhängig von der einwandfreien Funktionalität des MeCP2-Proteins ist.

Ebenfalls konnten eine erhöhte ROS-Produktion sowie ein erhöhter Sauerstoffbedarf der Mitochondrien durch Mitarbeiter sowohl dieser als auch anderer Arbeitsgruppen gezeigt werden. Zum einen wurden die Regionen Kortex und Hippocampus untersucht (Can et al. 2019), während andere Gruppen das gesamte Mäusehirn ohne Unterteilung in Regionen analysiert haben (De Filippis et al. 2015; Kriaucionis et al. 2006). Da bei diesen Messungen bereits Auffälligkeiten gezeigt werden konnten, sollen sie im Rahmen dieser Arbeit durch weiterführende experimentelle Beobachtungen charakterisiert und die Stärke ihrer Ausprägung innerhalb einzelner Hirnregionen wie Kleinhirn und Hirnstamm analysiert werden. Diese Versuche sollen eine ergänzende Grundlage für das Verständnis pathologischer Aberrationen mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs in *Mecp2^{-/-}*- Mäusen bilden, um ein erweitertes Verständnis für die Pathologien des Rett-Syndroms zu schaffen.

1.5 Wahl der Regionen Cerebellum und Hirnstamm

Für die Versuche in dieser Arbeit wurden die Regionen Cerebellum und Hirnstamm ausgewählt. Auf Grund der Tatsache, dass RTT-Patientinnen große Einschränkungen im Bereich der Motorik erfahren (s. 1.6 Rett-Syndrom) und diese durch das Cerebellum maßgeblich gesteuert wird, wurde diese Region als eine der beiden zu untersuchenden gewählt. Des Weiteren sind Probleme der Atmung eine prominente Komplikation bei erkrankten Patientinnen, was die Wahl des Hirnstamms als weitere Region für die nachstehenden Experimente begründet, da hier die maßgeblichen Kerne zur Steuerung der Atmung lokalisiert sind.

1.6 Ziele dieser Arbeit

Bei Experimenten weiterer Mitarbeiter der Arbeitsgruppe Müller wurde bereits gezeigt, dass die Wasserstoffperoxid-Produktion in *Mecp2^{-/-}*-Mäusen höher ist als bei Wildtyp-Mäusen derselben Linie. Die Regionen Kortex und Hirnstamm haben, verglichen mit den Regionen Cerebellum, Mittelhirn und Hippocampus, die höchsten ROS-Freisetzungsraten, wobei die letztgenannte Region die niedrigsten Raten aufweist.

Durch die hier vorliegende Arbeit soll nun hinterfragt werden, welchen Einfluss die reaktiven Sauerstoffspezies auf die Effizienz der Atmungskette in den Mitochondrien haben, da diese als Ursache für viele neurodegenerativen Erkrankungen gehandelt werden. Die Atmungsketteneffizienz soll in diesem Zusammenhang über den Sauerstoffverbrauch dargestellt werden.

Hierbei wird ein besonderes Augenmerk auf eine Antioxidantienfütterung (AO-Futter) und eine genetisch integrierte Katalase in Mitochondrien (*mCAT^{+/T}*) als Therapieansätze, welche die ROS-Konzentration beeinflussen, gelegt. Diese werden dafür an gesunden Mäusen und an Mäusen, welche Symptome des Rett-Syndroms ausprägen, erprobt. Darüber hinaus soll untersucht werden, ob eine Senkung der ROS-Konzentration die Effizienz der Mitochondrien verbessert, um möglicherweise mit Antioxidantienfutter oder einer mitochondrialen Katalase (*mCAT^{+/T}*) eine Steigerung der Mitochondrieneffizienz bei Krankheiten mit fehlerhaften und / oder veränderten Mitochondrien, wie beispielsweise dem Rett-Syndrom, zu erzielen.

2 Material und Methoden

Für sämtliche hier beschriebenen Experimente und Untersuchungen an Mäusen oder von ihnen gewonnenem Gewebe gibt es Genehmigungen von der Tierschutzkommission der Universität Göttingen und dem Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmitteltechnik (LAVES) unter dem Aktenzeichen G16/2177 sowie für die spezielle Fütterung der Mäuse unter dem Aktenzeichen G17/2544. Die in dieser Arbeit erläuterten Messungen wurden an isolierten Mitochondrien aus Cerebellum und Hirnstamm vollzogen.

Die Mäuse leben in einem Tierstall unter ständig kontrollierten und konstant gehaltenen Bedingungen. Es herrscht eine Temperatur von 20 – 24°C und eine relative Luftfeuchtigkeit von 50 – 70%. Von 6 Uhr morgens bis 18 Uhr abends ist die Beleuchtung eingeschaltet, wodurch ein stetig gleicher Tag-Nacht-Rhythmus herrscht. Die Tiere haben zu jeder Zeit Zugang zu Wasser und ihrem Futter, Zuchtfutter für Nagetiere ohne besondere Zusätze (ssniff-Spezialdiäten), oder für die gekennzeichneten Gruppen zum Antioxidantienfutter (ssniff-Spezialdiäten) mit den zusätzlichen Inhaltsstoffen (s. 2.1).

Alle in dieser Arbeit beschriebenen Untersuchungen wurden an männlichen Mäusen im Alter von durchschnittlich 50 Tagen abgehalten.

2.1 Untersuchte Mauslinien

Die Messungen wurden an Tieren sechs verschiedener Gruppen durchgeführt, welche folgend miteinander verglichen werden. Alle Tiere entstammen ursprünglich der Reihe C57BL/6J. Eine der Gruppen wird durch Wildtyp (WT)-Mäuse dieser Linie gebildet.

Ein therapeutischer Ansatz war die Fütterung der Mäuse mit Antioxidantienfutter (AO-Futter). Die Fütterung der Mäuse mit Antioxidantien- sowie normalem Futter wurde nicht im Rahmen dieser Arbeit untersucht, sondern war bereits etabliert. Das Antioxidantienfutter ist Zuchtfutter für Nagetiere mit einer Beimischung von drei verschiedenen Substanzen: Vitamin E, um die Lipidperoxidierungs-Kettenreaktion zu unterbinden (Traber und Stevens 2011), α -Liponsäure, ein Radikalfänger (Packer et al. 1995), sowie N-Acetylcystein, welches antioxidativ wirkt und eine Vorstufe des Glutathions ist (Bridgeman et al. 1991; van Zandwijk 1995). Diese Kombination wurde gewählt, um ein möglichst breites Wirkungsspektrum zu erreichen; durch die gegenseitige Potenzierung sind zudem geringe Wirkungskonzentrationen ausreichend. Diese Tiere stellen die Gruppe der WT+AO-Mäuse dar.

Eine der untersuchten Tiergruppen entstammt einer transgenen Mauslinie, welche eine Katalase in den Mitochondrien ($mCAT^{+/T}$) exprimiert (Schriner et al. 2005). Die Erstbeschreiber konnten zeigen, dass oxidative Schäden sowie die H₂O₂-Produktion in diesen Tieren verringert werden konnten. Ebenfalls ist zu bemerken, dass diese Ergebnisse ohne erkennbare schädliche Nebenwirkungen erreicht wurden und auch die mediane und

maximale Lebenserwartung gegenüber WT-Mäusen um 5 bzw. 5,5 Monate verlängert werden konnte.

Die das Rett-Syndrom imitierende Gruppe ist eine Mauslinie, bei welcher das *MECP2*-Gen durch die Cre-loxP-Technologie deletiert wurde (Guy et al. 2001). Diese *Mecp2*^{-/y}-Mauslinie weist Symptome wie eine veränderte Beweglichkeit, ein geringeres Gewicht, Störungen der Atmung, welche sich durch Phasen von Hyperventilation sowie Apnoe zeigen, und kleinere Zellsomata in Kortex und Cerebellum auf (Chen et al. 2001; Fischer et al. 2009; Guy et al. 2001). Außerdem konnte durch die Arbeitsgruppe Müller bereits dargestellt werden, dass die Redoxbalance dieser Tiere gestört ist (Großer et al. 2012; Müller und Can 2014).

Ein Teil dieser *Mecp2*^{-/y}-Mäuse hat das zuvor beschriebene Antioxidantienfutter bekommen und stellt eine weitere Gruppe dar (*Mecp2*^{-/y}+AO).

Des Weiteren wurden die Experimente ebenfalls an den *mecp2*-Mäusen durchgeführt, welche zusätzlich die mitochondriale Katalase exprimieren (*Mecp2*^{-/y} + *mCAT*^{+/T}).

2.2 Isolierung der Mitochondrien und Erhebung allgemeiner Parameter

Vor jeder Messung wurde das Tier auf der Präzisionswaage für Kleintiere PCB 1000-2 (Kern & Sohn) gewogen. Die für die Messung ausgewählte Maus wurde mit Diethylether (Honeywell Riedel-de Haen) betäubt, die Körperlänge von Nasenspitze bis Schwanzwurzel mittels eines Lineals bestimmt (s. Abbildung 3) und mit Hilfe einer chirurgischen Schere durch eine entsprechend qualifizierte Person der Arbeitsgruppe Müller dekapitiert. In diesem Zuge wurde der Hämatokrit unter Verwendung von Natrium-heparinisierten Mikro-Hämatokritkapillaren (Brand GmbH & Co. KG) und der Zentrifuge Mikro 220 (Hettich) sowie der Glukosewert des Blutes unter Zuhilfenahme des Blutzuckermessgerätes Contour XT (Bayer) und der dazugehörigen Teststreifen Contour next (Ascensia Diabetes Care Deutschland GmbH) untersucht. Um das Gehirn zu extrahieren, wurde das Fell inklusive der darunterliegenden Haut vom Nacken bis zur Nase durch einen Schnitt abgesetzt und der darunterliegende Schädelknochen eröffnet. Die entstandenen Teile des Schädels wurden mit einer Pinzette entfernt und das freiliegende Gehirn mit einem runden Spatel aus dem Schädel entnommen und zunächst für einige Minuten in eisgekühlter, phosphatgepufferter Salzlösung (*phosphate-buffered saline*, PBS) inkubiert (Zusammensetzung s. Tabelle 3). All diese Schritte wurden zügig durchgeführt, um die Verweildauer des Gehirns außerhalb der gekühlten Flüssigkeit auf ein Minimum zu begrenzen. Darauf folgend wurden das Cerebellum und der Hirnstamm mit einem Schnitt durch ein Skalpell vom restlichen Teil des Gehirns getrennt. Diese beiden Regionen wurden durch einen stumpfen Spatel oder vorsichtig mit einem Skalpell voneinander gelöst. Während der Präparation wurde das Gewebe mehrmals mit kühler PBS überschüttet. Der Hirnstamm und das Cerebellum wurden jeweils in einen mit 700 µL Isolationspuffer A gefüllten, auf Eis gelagerten Glasmörser überführt und mit

etwa 40 Stößen homogenisiert. Die Isolationspuffer A und B wurden laut Protokoll der Firma Oroboros Instruments (MipNet 20.07) hergestellt (s. Tabelle 4). Der gesamte Inhalt des Mörsergefäßes wurde mit einer Glaspasteurpipette in ein 1,5 mL-Eppendorf-Röhrchen überführt und bei 4°C zentrifugiert. Verwendet wurde die Zentrifuge Mikro 220 R (Hettich). Der erste Zentrifugationsdurchlauf dauerte 15 min bei $800 \times g$. Der entstandene Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Röhrchen gefüllt und 30 min bei $800 \times g$ zentrifugiert. Für den dritten Durchlauf wurde der nun entstandene Überstand in ein weiteres Eppendorf-Röhrchen überführt und für 10 min bei $10000 \times g$ zentrifugiert. Das nach dem dritten Zentrifugationsschritt abgesetzte Pellet enthält schließlich die isolierten Mitochondrien und wurde nun in 100 μ L Isolationspuffer B (s. Tabelle 4) gelöst.



Abbildung 3: Messung der Körperlänge. Gezeigt wird die Messung der Körperlänge von Nasenspitze bis Schwanzwurzel mit Hilfe eines Lineals. Hier sind exemplarisch eine WT-Maus (links) und eine *Mecp2*^{-/-}-Maus (rechts) nebeneinander dargestellt.

Tabelle 3: PBS

Substanz	Konzentration	Hersteller
NaCl	137 mM	Merck
KCl	2,7 mM	Merck
Na ₂ HPO ₄	10 mM	Merck
KH ₂ PO ₄	2 mM	Merck

Der pH-Wert wurde mittels NaOH auf 7,4 eingestellt.

Tabelle 4: Isolationspuffer A

Substanz	Konzentration	Hersteller
Saccharose	320 mM	Roth
Tris	10 mM	Roth
EDTA	1 mM	Sigma-Aldrich
Bovines Serumalbumin (BSA)	2,5 g/L	Sigma-Aldrich

Isolationspuffer B hat die gleiche Zusammensetzung wie Isolationspuffer A, enthält jedoch kein BSA. Der pH-Wert wurde mittels HCl auf 7,4 eingestellt.

2.2.1 Bestimmung der Proteinkonzentration: Bradford-Assay

Um die Konzentration der Mitochondrien in der Suspension zu bestimmen, wurde ein Bradford Assay durchgeführt. Dieser beruht darauf, dass der Farbstoff Coomassie Brilliant blue G-250 (*Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent*, Bio-Rad Laboratories) an Proteine bindet und so seine Farbe von rot zu blau verändert. Daraus entsteht eine Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nm zu 595 nm, welche mit Hilfe des Absorptionsspektrometers gemessen wird. Bis der Farbstoff an den Proteinen bindet, dauert es etwa 2 min. Stabil bleibt diese Verbindung für 60 min (Bradford 1976).

Zunächst wurde eine Standardkurve mit dem Spektrophotometer DU 800 (Beckmann Coulter) und der dazugehörigen Software erstellt, wobei fünf Küvetten mit je 20 μ L Proteinstandards (mit einer aufsteigenden Proteinkonzentration von 0 mg BSA/mL, 0,2 mg BSA/mL, 0,5 mg BSA/mL, 0,7 mg BSA/mL und 0,9 mg BSA/mL) und je 1 mL Farbreagenz, zu 20% bestehend aus dem *Protein Assay Dye Reagent Concentrate* (Bio-Rad) mit dem Farbstoff Coomassie blau und zu 80% aus destilliertem Wasser, befüllt, gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert wurden.

Nach dem Erstellen der Standardkurve wurden die Mitochondrienproben gemessen: hierfür wurden zwei Küvetten pro Gewebe mit jeweils 10 μ L Isolationspuffer B, 10 μ L des gelösten Pellets des dritten Zentrifugationsschrittes und 1 mL Farblösung befüllt, gemischt und nach 5 Minuten Inkubationszeit die Proteinkonzentration im Spektrophotometer bestimmt. Mit dem Ergebnis konnte somit das Volumen errechnet werden, welches 30 μ g Mitochondrien entspricht.

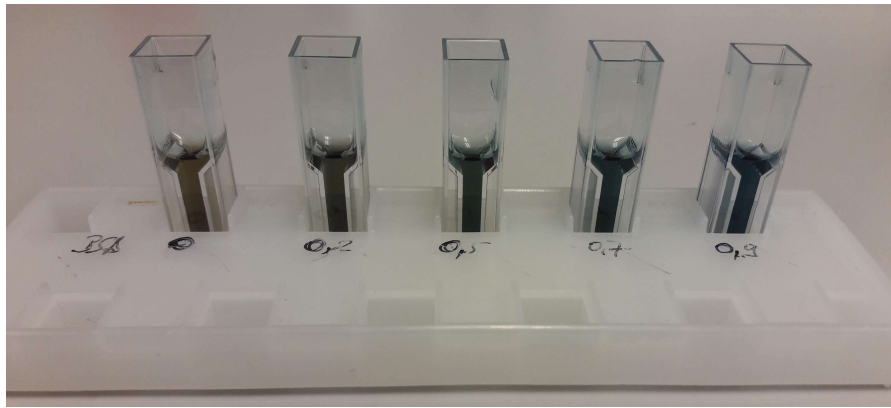


Abbildung 4: Küvetten für die Standardkurve. Abgebildet sind die fünf Küvetten für die Standardkurve des Bradford-Assays. In jeder Küvette sind 1 mL Farbreagenz und jeweils 20 μ L der Proteinstandards mit einer Konzentration von links nach rechts aufsteigend von 0 bis 0,9 mg BSA/mL.

2.3 Western-Blot

Mit dem im Abschnitt 2.2 beschriebenen Bradford-Assay wurde die Menge an Proteinen in der mit Mitochondrien angereicherten Suspension bestimmt. Um ebenfalls die Reinheit dieser Lösung zu überprüfen und den Anteil der mitochondrialen Proteine zu bestimmen, wurde exemplarisch an dem gewonnenen Gewebe der Kleinhirne von vier Wildtyp-Mäusen im Alter zwischen 50 und 54 Tagen ein Western-Blot durchgeführt. Untersucht werden sollte die Konzentration an Proteinen aus den Mitochondrien, dem Zytosol, dem endoplasmatischen Retikulum und den Peroxisomen. Die hierfür verwendeten Antikörper inklusive ihrer Molekülmassen sind in Tabelle 5 aufgelistet. Da in der AG Müller Western-Blots nicht etabliert sind, wurde dieser Versuch in Kooperation mit Bettina Homberg der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Rehling aus dem Zentrum Biochemie und Molekulare Zellbiologie Göttingen durchgeführt.

Tabelle 5: Antikörper

Antikörper	Organelle/ Zellkompartiment	Molekülmasse	Antikörperursprung	Hersteller
Anti-COX 6a	Mitochondrien	12 kDa	Hase	AG Rehling*
Anti-GAPDH	Zytosol	36 kDa	Maus	AG Rehling*
Anti-Calreticulin	Endoplasmatisches Retikulum	44 kDa	Hase	Cell Signaling Technology
Anti-PMP70	Peroxisomen	75 kDa	Hase	abcam

* Antikörper selbst erzeugt, Zentrum für Biochemie und Molekulare Zellbiologie Göttingen

Zu Beginn wurden die Mitochondrien dieser Tiere, wie in 2.2 beschrieben, isoliert. Zusätzlich zu dem Pellet des dritten Zentrifugationsschritts, welches normalerweise für die Messungen im Oroboros-Respirometer verwendet wird, wurden die Pellets der ersten beiden Schritte der Zentrifugation sowie der Überstand des dritten Durchlaufs aufbewahrt und Letzter bei 73°C zusätzlich auf 100 µL eingedampft. Die Pellets wurden jeweils in 100 µL Mitochondrien-Isolationspuffer (Zusammensetzung s. Tabelle 6) gelöst. Im Folgenden wurde von den drei Pellets sowie dem Überstand ein Bradford-Assay, wie in 2.2.1 beschrieben, angefertigt, um die Konzentration an Proteinen zu bestimmen und das Volumen, welches 30 µg Proteine enthält, zu ermitteln. Diese Menge wurde in Eppendorf Röhrchen überführt und 5 min bei 10000 × g zentrifugiert, der Überstand verworfen und die nun entstandenen Pellets in Natriumdodecylsulfat (SDS)-Puffer (Zusammensetzung s. Tabelle 7) gelöst und 5 min bei 95°C aufgeköcht.

Tabelle 6: Mitochondrien-Isolationspuffer

Substanz	Konzentration	Hersteller
HEPES	20 mM	Sigma-Aldrich
Mannitol	220 mM	Sigma-Aldrich
Saccharose	70 mM	Roth
EDTA	1 mM	Sigma-Aldrich
Phenylmethylsulfonylflourid (PMSF)	0,5 mM	Sigma-Aldrich

Tabelle 7: SDS-Puffer

Substanzen	Menge für 100 mL	Hersteller
2% SDS	2 g	Sigma-Aldrich
10% Glycerol	10 mL	Sigma-Aldrich
60 mM Tris (pH 6,8)	727 mg	Sigma-Aldrich
0,2 – 1% β-Mercaptoethanol	0,2 – 1 mL	Sigma-Aldrich
0,01% Bromphenolblau	0,01 mL	Sigma-Aldrich

Im nächsten Schritt wurde das Gel für die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) zubereitet. Um den unterschiedlich großen Molekülmassen gerecht zu werden, wurde ein Tris(hydroxymethyl)aminomethan-N-(Tri(hydroxymethyl)methyl)glycin- (Tris-Tricin-) Gradientengel (Zusammensetzung s. Tabelle 8) ausgewählt. Die Gele wurden in 18% und 10% angefertigt und im

Gradientenmixer vereint. Um die Polymerisation einzuleiten, wurden 10%iges Ammoniumperoxodisulfat (APS) und Tetramethylethyldiamin (TEMED) hinzugegeben und die Gele aufgegossen. Anschließend wurden sie mit Isopropanol benetzt. Nachdem dies abgeschlossen war, wurde das 4%ige Sammelgel dazu gegossen. Da die Molekülmassen der Antikörper gegen das endoplasmatische Retikulum und gegen das Zytosol nahe beieinander liegen (s. Tabelle 5), wurden zwei getrennte Gele mit jeweils Gewebe aller vier Mäuse angefertigt, um die Banden später klar definieren zu können. Auf ein Gel wurden die Antikörper gegen Mitochondrien und das Zytosol gegeben, auf das andere Gel die Antikörper gegen Peroxisomen und das endoplasmatische Retikulum. In jedem der beiden Gele wurden die gelösten Pellets der drei Zentrifugationsschritte der Mitochondrien-Isolation sowie der Überstand des letzten Durchlaufs aller vier Mäuse geladen.

Tabelle 8: Tris-Tricin-Gradienten Gel, Zusammensetzung der Gelkomponenten

Substanz	18%	10%	4% (Sammelgel)	Hersteller
Acrylamid-Mix (96% Acrylamid, 3 g Bis- Acrylamid/200 mL)	2,97 mL	1,65 mL	0,5 mL	Sigma-Aldrich
Gel-Puffer (1,87 M Tris, pH 8,8)	2,67 mL	2,67 mL	2 mL	Sigma-Aldrich
50% Glycerol	2,08 mL	-	-	Sigma-Aldrich
dH ₂ O	0,28 mL	3,68 mL	3,5 mL	
Endvolumen	8 mL	8 mL	6 mL	Sigma-Aldrich
TEMED	3 µL	3 µL	6 µL	Sigma-Aldrich
10% APS	40 µL	40 µL	60 µL	Sigma-Aldrich

Um die Proteine in dem jeweiligen Gel laufen zu lassen, wurden den Gelkammern die Puffer für die Kathode (pH 8,25, bestehend aus 1 M Tris, 1 M Tricin und 1% SDS, alles von Sigma-Aldrich) und die Anode (pH 8,45, bestehend aus 2 M Tris, Sigma-Aldrich) hinzugegeben und über 14,5 h eine Spannung von 80 V angelegt, die Stromstärke betrug kontinuierlich 25 mA. Um im Folgenden die Proteine auf die jeweilige Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran zu übertragen, wurde sich des Semi-Dry-Blot-Systems bedient und die Proteine von den Gelen unter einer Stromstärke von 220 mA auf die Membranen übertragen. Anschließend wurden die Membranen getrocknet. Um die Membranen zu blocken, wurden diese mit TBS-T (*tris-buffered saline with Tween 20*, Sigma-Aldrich) inklusive 5% Milchpulver benetzt. Als nächstes wurden die Membranen für 12 Stunden bei Raumtemperatur in TBS-T mit 5% Milch, in

welchem die Primärantikörper gelöst waren, inkubiert. Darauffolgend wurden die Membranen dreimal jeweils für 10 min in TBS-T gesäubert, dann über eine Stunde hinweg in einer Flüssigkeit mit den Sekundärantikörpern, welche an die Meerrettichperoxidase (*Horseradish peroxidase*, HRP) gekoppelt waren, gelagert und im Anschluss wieder dreimal für jeweils 10 min in TBS gereinigt. Für die Detektion der HRP wurde das Pierce™ ECL Western Blotting Substrat (Thermo Fisher), ein Chemilumineszenzsubstrat auf Luminolbasis, verwendet. Für eine Minute wurden die Membranen mit Detektionsreagenzien 1 und 2, welche zu gleichen Teilen vertreten waren, benetzt, die überschüssige Flüssigkeit verworfen und mit klarer Plastikfolie überdeckt. Für die Detektion der Chemilumineszenz wurde eine Belichtungszeit pro Bild von 30 s ausgewählt und durch das Gerät Amersham™ ImageQuant™ 800 Biomolecular Imager (Bioke) aufgezeichnet.

2.4 Bestimmung des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs mit Hilfe eines hochauflösenden Respirimeters

Zur Messung wurde der Oxygraph-2k, ein hochauflösendes Respirimeter, der Firma Oroboros Instruments zusammen mit der Software Datlab derselben Firma verwendet, um den Sauerstoffverbrauch von Mitochondrien quantitativ in Echtzeit zu messen. Das Gerät besitzt zwei getrennte Kammern, welche es erlauben, zwei Proben parallel zu untersuchen. Das Volumen dieser Kammern beträgt exakt 2 mL. Diese Kammern aus Glas befinden sich in einem isolierenden Kupferblock, wodurch die Temperatur mit Hilfe eines Peltier-Thermostats exakt kontrolliert werden kann. Während der Messungen wurde eine Temperatur von 37°C konstant gehalten. Um die Kammern luftdicht zu verschließen, kann in jede Kammer ein zylindrischer Titaniumstopper, umgeben von einem Vilton-O-Ring, eingelassen werden, welcher, bis auf den schmalen Titanium-Einführungskanal, die Kammern abschließt (s. Abbildung 6). Durch den Einführungskanal können das zu untersuchende Gewebe sowie die Substrate und Hemmstoffe für die Messungen mit Hilfe von Mikrospritzen (Hamilton™) in die Kammern gegeben werden. Ein Magnet erzeugt ein rotierendes Magnetfeld, welches die Rührstäbe aus Polyetheretherketon (PEEK) antreibt. Diese laufen mit 750 Umdrehungen pro Minute. Das Material der Kammern und der Rührstäbe wurde bewusst gewählt, um die Sauerstoffdiffusion zu minimieren, um die sog. residuelle, also nicht durch Mitochondrien erzeugte, Atmung so gering wie möglich zu halten (Gnaiger 2001, 2006).



Abbildung 5: Übersicht über den Versuchsaufbau. Zu sehen sind das hochauflösende Respirometer und das für die Messung notwendige Zubehör. Der Oxygraph ist an einen Computer angeschlossen, der in Echtzeit die gemessenen Daten abbildet und die Programmsteuerung des Oxygraphen übernimmt (nicht Teil der Grafik).

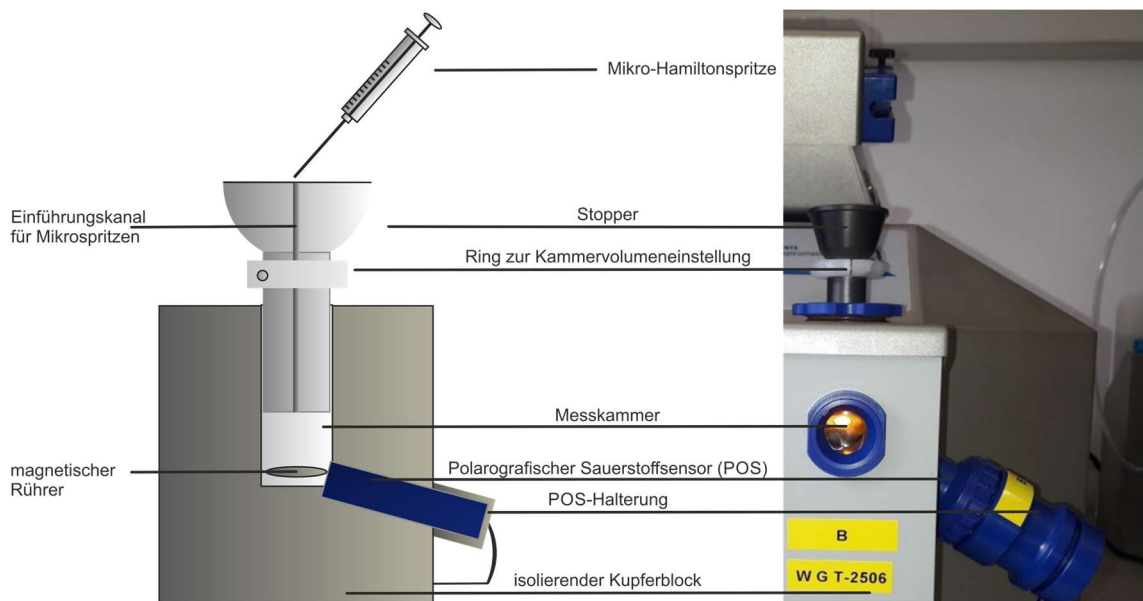


Abbildung 6 Messkammer im Oroboros-Respirometer. Schematische Darstellung einer der zwei Messkammern des Oroboros-Respirometers im Vergleich mit einem Foto: mit Hilfe von Micro-Hamilton Spritzen werden die Mitochondrien und die Substanzen nacheinander in die Messkammer injiziert. Diese ist von einem isolierenden Kupferblock umgeben, der die gewünschte Temperatur (37°C) auf 0,05°C genau adjustieren kann.

2.4.1 Ablauf der Messung- SUIT 1- Protokoll

Je 30 µg der in Isolationspuffer B enthaltenen Mitochondrien von Cerebellum und Hirnstamm wurden in jeweils eine der beiden Kammern des Respirometers gegeben. Vor jeder Messung wurden drei Waschschritte mit destilliertem Wasser, wie im Protokoll der

Oroboros-Instruments-Website beschrieben, durchgeführt. Außerhalb der Messzeiten wurden die Kammern mit 70%iger Ethanollösung befüllt aufbewahrt. Nach dem dritten Waschschrift wurde das Wasser aus den Kammern entfernt und mit mitochondrialem Respirationsmedium (*Mitochondrial Respiration Medium* 05, MiR05) (s. Tabelle 9) befüllt und durch die Stopper verschlossen. Darauf folgend wurde in jede Kammer 5 μL Katalase gegeben, um eine Konzentration von 280 U/mL zu erreichen, und die Kammern einen definierten Spalt breit geöffnet. Dadurch entstand eine Gasphase oberhalb der Flüssigkeit in den Kammern (s. Abbildung 7). Die entstandene Grenzfläche zwischen der Gasphase und dem MiR05-Puffer ermöglicht den Austausch des Sauerstoffs der Umgebungsluft mit dem in der Flüssigkeit gelösten Sauerstoff.

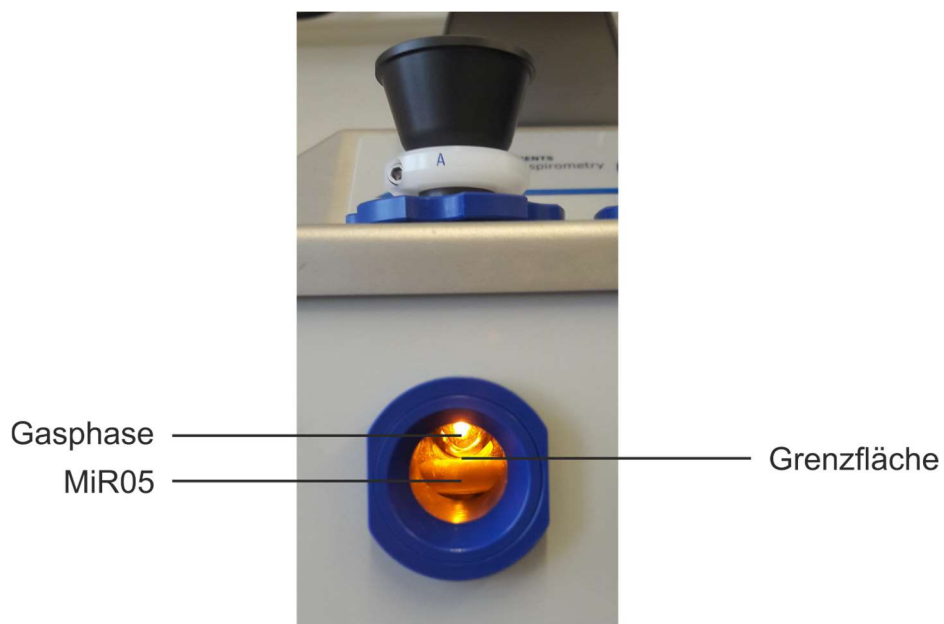


Abbildung 7: Gasaustausch innerhalb der Kammer. Zu sehen sind die Gasphase, die Flüssigkeit sowie die Grenzfläche dazwischen als Ort des Gasaustausches in der Kammer des Respirometers, welche einen Spalt breit geöffnet ist.

Anschließend wurde erwartet, dass die Sauerstoffkonzentration innerhalb der Kammern einen Gleichgewichtszustand (*steady state*) erreicht. Währenddessen wurde ein Rührstabtest durchgeführt, bei welchem die Rührstäbe in jeder Kammer zeitgleich für 30 Sekunden stillstanden und die unmittelbaren Antworten der Sauerstoffsensoren auf gleiche Reaktionszeit überprüft wurden. Danach wurden die Kammern geschlossen und das Titrationsprotokoll (s. Tabelle 10) wurde schrittweise ausgeführt. Für die in dieser Arbeit beschriebenen Messungen wurde das *substrate-uncoupler-inhibitor-titration* (SUIT) 1-Protokoll verwendet, welches für die funktionelle Charakterisierung isolierter Mitochondrien ausgelegt ist.

Tabelle 9: MiR05

Substanz	Konzentration	Hersteller
EGTA	0,5 mM	Sigma-Aldrich
MgCl ₂	3 mM	Merck
Lactobionsäure	60 mM	Sigma-Aldrich
Taurin	20 mM	Sigma-Aldrich
KH ₂ PO ₄	10 mM	Merck
HEPES	20 mM	Sigma-Aldrich
D-Saccharose	110 mM	Roth
BSA	1 g/L	Sigma-Aldrich

Der pH-Wert dieses Respirationspuffers wurde mit Hilfe von KOH (1 M) auf 7,1 eingestellt.

Tabelle 10: SUIT 1-Protokoll. Übersicht über die für die Messung in angegebener Reihenfolge und Konzentration verwendeten Substanzen. *Ort der Einspeisung* erklärt, auf welche Weise die jeweilige Substanz Elektronen der Atmungskette zuführt. *Aktive Einspeisungswege* bezeichnet alle zu dem Zeitpunkt aktiven Zugänge. Zur grafischen Darstellung der Atmungsstadien nach der Zugabe der Substanzen vergleiche Abbildung 8.

Substrat	Abk.	Ort der Einspeisung	Aktive Einspeisungswege	Konzentration in der Spritze [gelöst in]	Konz. in 2 mL Kammervol. [mM]	Titrationvolumen [μ L]
<i>Pyruvat</i>	P	NADH	NADH	2 M [H ₂ O]	5	5
<i>Malat</i>	M	NADH	NADH	0,4 M [H ₂ O]	2	10
<i>ADP</i>	D	-	NADH	0,5 M [H ₂ O]	2,5	10
<i>Cytochrom c</i>	C	-	NADH	4 M [H ₂ O]	10	5
<i>Entkoppler</i>	U	-	NADH	1 mM [EtOH]	0,5 pro Schritt	1 pro Schritt
<i>Glutamat</i>	G	NADH	NADH	2 M [H ₂ O]	10	10
<i>Succinat</i>	S	Succinat	NADH, Succinat	1 M [H ₂ O]	10	20
<i>Octanoyl-Carnitin</i>	Oct	Fettsäureoxidation	NADH, Succinat, Fettsäureoxidation	0,1 M [H ₂ O]	0,5	10
<i>Rotenon</i>	Rot	-	Succinat	1 mM [EtOH]	0,5	1
<i>Glycerophosphat</i>	Gp	Glycerophosphat	Succinat, Glycerophosphat	1 M [H ₂ O]	10	20
<i>Anitmycin A</i>	Ama	-	-	5 mM [EtOH]	2,5	1
<i>Ascorbat</i>	As	-	Komplex IV	0,8 M [H ₂ O]	2	5
<i>TMPD</i>	Tm	Komplex IV	Komplex IV	0,2 M [H ₂ O]	0,5	5
<i>Azid</i>	Azd	-	-	4 M [H ₂ O]	200	100

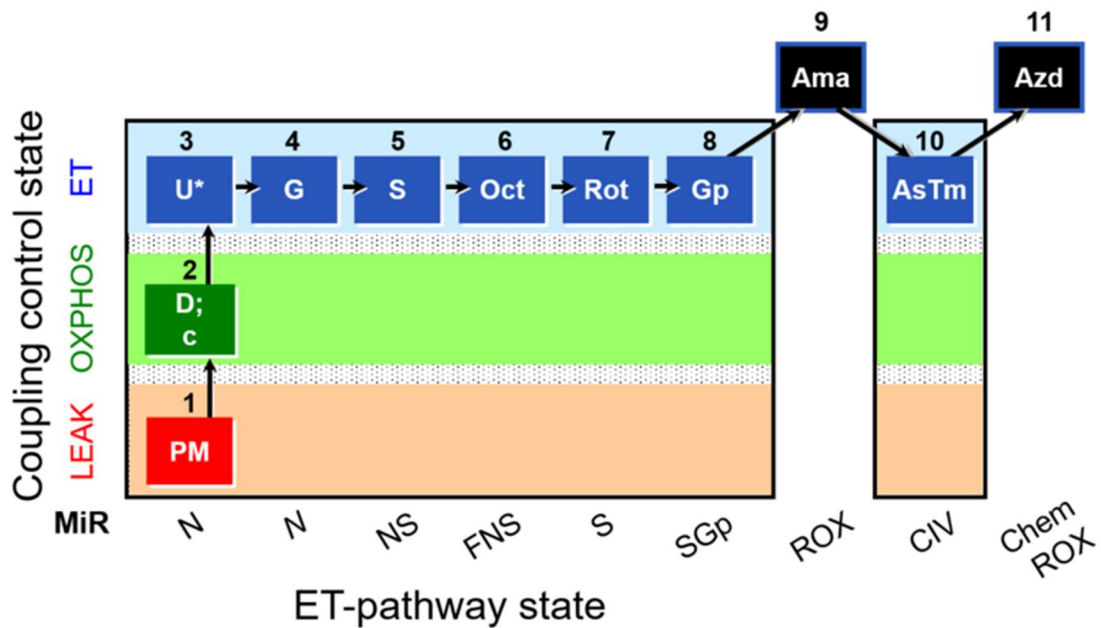


Abbildung 8: SUIIT 1-Protokoll für isolierte Mitochondrien mit entsprechenden Stadien der Atmung. Pyruvat, Malat (PM), ADP (D), Cytochrom c (c), Entkoppler CCCP (U), Glutamat (G), Succinat (S), Octanoylcarnitin (Oct), Rotenon (Rot), Glycerophosphat (Gp), Antimycin A (Ama), Ascorbat, TMPD (AsTm), Azid (Azd). Gezeigt werden die aufeinanderfolgenden Zugaben der Substanzen während der Messung und die daraus resultierenden Atmungszustände (*Coupling control state*). *LEAK* bedeutet, dass Substrate für die Atmungskette zur Verfügung stehen, wobei diese jedoch nicht mit der ATP-Synthase gekoppelt ist. *OXPHOS* steht für oxidative Phosphorylierung, da mit der Zugabe von ADP Substrate für die ATP-Synthase zur Verfügung stehen und die Oxidation von Sauerstoff in der Atmungskette mit der Phosphorylierung des ADP durch die ATP-Synthase gekoppelt sind. *ET* steht für *electron transfer*, dem Stadium, ab welchem die Atmungskette durch eine zuvor erfolgte Entkopplung nun unabhängig von der ATP-Synthase und damit auf Maximalgeschwindigkeit läuft. Die *ET-pathway states* zeigen, über welche Substanzen Elektronen in die Atmungskette eingeschleust werden: NADH (N), NADH und Succinat (NS), Fettsäureoxidation, NADH und Succinat (FNS), Succinat (S), Succinat und Glycerophosphat (SGp), Komplex IV der Atmungskette (CIV). ROX bezeichnet die residuelle Atmung, bei der zwar über die Hemmung des Komplexes III der Elektronentransfer in der Atmungskette blockiert wird, die Aktivität des Komplexes IV jedoch noch nicht unmittelbar unterbrochen ist. *Chem ROX* (*chemical ROX*) steht für den verbleibenden Sauerstoffverbrauch nach direkter Hemmung von Komplex IV (Doerrier et al. 2018). Verwendung der Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Erich Gnaiger, Oroboros Instruments, vom 01.12.2022.

Vorweg anzumerken ist, dass die Schritte von der Zugabe von Pyruvat und Malat bis zu der Zugabe Antimycin A die sog. Protokollsequenz umfassen, die darauffolgenden Substanzen dienen der Qualitätskontrolle. In Abbildung 9 sind die Einspeisungswege der im Folgenden beschriebenen Substanzen außerdem grafisch dargestellt.

Nach den Mitochondrien werden Pyruvat (P, Sigma-Aldrich) und Malat (M, Sigma-Aldrich) als erste Substrate hinzugegeben. Pyruvat, das Anion der Brenztraubensäure, ist als einfachste α -Ketosäure ein C3-Körper mit je einer Keto- und Carboxygruppe als funktionelle Gruppen. Es entsteht im menschlichen Organismus als Spaltprodukt der Glukose in der Glykolyse. Die Pyruvat-Dehydrogenase wandelt Pyruvat über mehrere Reaktionsschritte zu Acetyl-CoA

um, welches dann ins Mitochondrium gelangt und in den Citratzyklus eingespeist wird und somit zur Gewinnung von Reduktionsäquivalenten beiträgt.

Malat entsteht im menschlichen Körper durch die Reduktion von Oxalacetat und wird dann im Austausch mit α -Ketoglutarat über den Malat-Aspartat-Shuttle ins Mitochondrium transportiert. Dort wird es wieder zu Oxalacetat oxidiert und generiert in diesem Zug $\text{NADH} + \text{H}^+$ in der Mitochondrienmatrix. Der Großteil, der aus Malat gewonnenen Energie, kommt daher, dass es als Metabolit des Citratzyklus agiert, welcher einen großen Beitrag zur Energiegewinnung leistet, indem Reduktionsäquivalente generiert werden. Somit werden durch die Zugabe von Pyruvat und Malat die Reduktionsäquivalente $\text{NADH} + \text{H}^+$ erzeugt, über welche Elektronen in Komplex I der Atmungskette eingeschleust werden. Die Atmung befindet sich dementsprechend im Leck-Stadium (s. Abbildung 8), welches über die Abwesenheit von Adeninnukleotiden wie ADP und daraus resultierend über die fehlende Kopplung der Atmungskette mit der ATP-Synthase, welche auf Grund fehlender Substrate nicht arbeiten kann, definiert wird (für eine genauere Beschreibung sämtlicher Stadien der Atmung siehe Kapitel 1.2).

Im nächsten Schritt wird ADP (D, Merck) hinzugegeben, wodurch die Atmungskette nun mit der ATP-Synthase gekoppelt ist und ATP produziert werden kann. Dadurch wird die Atmung in den Zustand *OXPHOS*, oxidative Phosphorylierung, gebracht. ATP entsteht durch die ATP-Synthase, welche an die Atmungskette gekoppelt ist und stellt die Hauptenergiequelle für intrazelluläre Stoffwechselwege dar. Die ursprünglich in die Atmungskette eingespeiste Energie befindet sich damit nach Reaktion der ATP-Synthase zu maximal 40% in der gewonnen, energiereichen Phosphorsäureanhydrid-Bindung zwischen zweitem und drittem Phosphat des erzeugten ATPs. Nach Zugabe von ADP im Überschuss wird der Sauerstoffverbrauch der Atmungskette in Anwesenheit der vorher zugegebenen Substrate Pyruvat und Malat gemessen. Dieser O_2 -Verbrauch wird für das weitere Verfahren als *basale Atmungsrate* definiert (Gnaiger und Kemp 1990; Larsen et al. 2011).

Cytochrom c (c, Sigma-Aldrich) wird im Anschluss an ADP titriert. Cytochrom c ist in die innere Mitochondrienmembran integriert und spielt eine wichtige Rolle als Elektronentransporter von Komplex III auf Komplex IV in der Atmungskette. Außerdem kann es als Signalstoff für Apoptose fungieren, da es physiologischerweise nicht die äußere Membran durchqueren kann. Dies wird sich auch in dem verwendeten SUIT 1-Protokoll zu Nutze gemacht: wird bei der Zugabe von Cytochrom c ein Anstieg des Sauerstoffverbrauchs beobachtet, ist dies ein Zeichen dafür, dass Cytochrom c in die Mitochondrien gelangt ist und somit die Mitochondrienmembran nicht mehr intakt ist. Es dient dementsprechend zur Kontrolle der Intaktheit der äußeren Membran isolierter Mitochondrien.

Als Entkoppler wurde Carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone (CCCP, U, Sigma-Aldrich) verwendet. Dies ist ein kanalbildendes Ionophor, welches eine protonendurchlässige Pore in die innere Mitochondrienmembran einbaut (Kasianowicz et al. 1984) und demzufolge Protonen vom Intermembranraum in die Mitochondrienmatrix

zurücklaufen lässt. Dadurch bricht der Protonengradient zusammen und die ATP-Synthase wird von ihrer physiologischen Arbeitsweise abgehalten. Infolgedessen wird erreicht, dass die Atmungskette zur Kompensation des Protonenlecks mit maximaler Leistung läuft. Um diesen Effekt zu erzielen, ist eine optimale Endkonzentration essenziell. Auf Grund dessen wird CCCP schrittweise titriert, sodass mit jeder Zugabe die Konzentration von CCCP in der Kammer um $0,5 \mu\text{M}$ steigt und die Reaktion abgewartet und beurteilt wird: steigt der Sauerstoffverbrauch nach der Gabe verglichen mit vor der Injektion an, so wurden in diese Kammer weitere $0,5 \mu\text{M}$ hinzugegeben. War dies nicht der Fall, wurde das Protokoll fortgesetzt und zu Glutamat übergegangen. Nach Gabe des Entkopplers wird der Sauerstoffverbrauch gemessen, welcher an seinem Gipfel die maximale respiratorische Kapazität (*electron transfer system capacity, ETS*) abbildet.

Im Mitochondrium wird Glutamat (G, Sigma-Aldrich) zu α -Ketoglutarat umgewandelt, wobei diese Transaminierung für den Abbau von Oxalacetat zu Aspartat durch die Aspartat-Aminotransferase (AST) benötigt wird. Oxalacetat entsteht durch die Oxidation von Malat, wobei $\text{NADH} + \text{H}^+$ entsteht und darüber Elektronen über Komplex I in die Atmungskette eingeschleust werden. Ein wichtiger Aspekt der Energiegewinnung durch Glutamat ist, dass es in den Citratzyklus eingespeist wird, welcher viele Reduktionsäquivalente generiert und somit einen großen Beitrag zum Energiegewinn liefert.

Darauffolgend wird Succinat (S, Sigma-Aldrich) in die Kammern titriert, welches durch die Succinat-Dehydrogenase in der inneren Mitochondrienmembran zu Fumarat oxidiert wird. Folglich ist Succinat Bestandteil sowohl des Citratzyklus als auch der Atmungskette. Die zwei bei der Oxidation freiwerdenden Elektronen werden direkt über Komplex II der Atmungskette zugeführt, außerdem werden die energieliefernden Prozesse des Citratzyklus stimuliert. Der nach diesem Schritt gemessene Sauerstoffverbrauch stellt den *Referenzzustand* dar, da er die höchstmögliche Stimulation des Sauerstoffverbrauchs innerhalb der Protokollsequenz aufzeigt.

DL Octanoylcarnitin (Oct, Tocris Bioscience) ist eine acht C-Atom-lange, kovalent an Carnitin gebundene Fettsäure und ein Substrat für die β -Oxidation in Mitochondrien, bei welcher die Reduktionsäquivalente NADH und FADH_2 entstehen. Somit wird bei diesem Schritt die Atmungskette über Komplex I und das ETF mit Elektronen gespeist.

Rotenon (Rot, Sigma-Aldrich) bindet an die Ubichinon Bindestelle von Komplex I und verhindert somit die Übertragung von Elektronen der Eisen-Schwefel-Cluster auf Ubichinon sowie den reversen Elektronenfluss von Komplex II zu Komplex I. Daraus resultierend kommt Komplex I zum Erliegen (Heikkila et al. 1985).

Glycerin-3-Phosphat (Gp, Sigma-Aldrich) entsteht aus der NADH-abhängigen Reduktion des in der Glykolyse entstandenen DHAP (Dihydroxyacetonphosphat) und speist Elektronen direkt über Ubichinon in die Atmungskette ein, da Glycerophosphat durch den Glycerophosphat-Dehydrogenasekomplex zu DHAP oxidiert wird.

Antimycin A (Ama, Sigma-Aldrich) hemmt Komplex III der Atmungskette. Da Komplex I zuvor durch Rotenon gehemmt wurde und für Komplex IV noch keine Substrate hinzugegeben wurden, können nun keine Elektronen mehr in die Atmungskette eingeschleust werden, sodass der nun zu messende Sauerstoffverbrauch als ROX bezeichnet wird.

N,N,N',N'-Tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride (TMPD, Tm, Sigma-Aldrich) ist ein Substrat für Komplex IV, da es Cytochrom c reduziert, was zu einer maximal möglichen Aktivität der Cytochrom-c-Oxidase führt. Um TMPD selbst in reduziertem Zustand zu halten, wird direkt zuvor Ascorbat (As, Sigma-Aldrich) als Reduktionsmittel hinzugegeben. Der folgend gemessene Sauerstoffverbrauch bildet nun den Elektronenfluss nur durch diesen Komplex ab, da zuvor mit Rotenon und Antimycin A alle weiteren Einspeisungswege gehemmt wurden.

Azid (Azd, Sigma-Aldrich) wird zum Schluss hinzugegeben, es bindet irreversibel an die Sauerstoffbindungsstelle der Cytochrome c Oxidase. Folglich kommt der Aufbau des Protonengradienten zum Erliegen, was letztlich zu einem Stopp der Aktivität der ATP-Synthase führt. Infolgedessen wird die Phosphorylierung von ADP verhindert und die Energiegenerierung in Form von ATP bleibt aus.

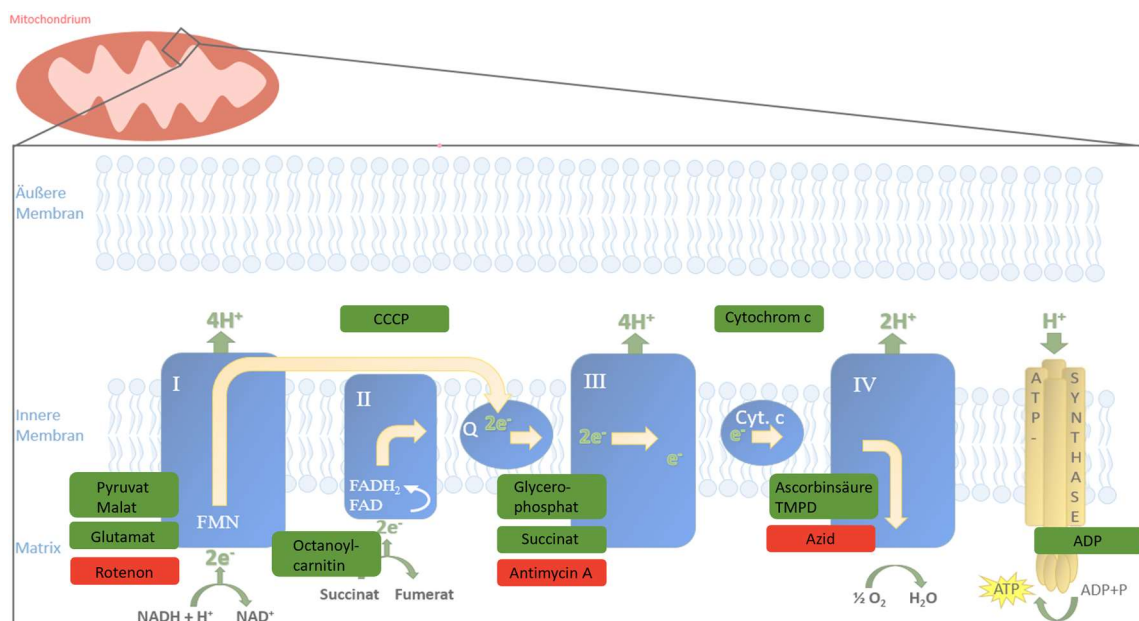


Abbildung 9: Grafische Darstellung der Einspeisungssubstanzen. Dargestellt ist eine Übersicht über die mitochondriale Atmungskette (vgl. 1.1) sowie die während der Messung hinzugegebenen Substrate (in grün hinterlegten Boxen) und Hemmstoffe (in rot hinterlegten Boxen), was bereits in 2.4.1 beschrieben wurde.

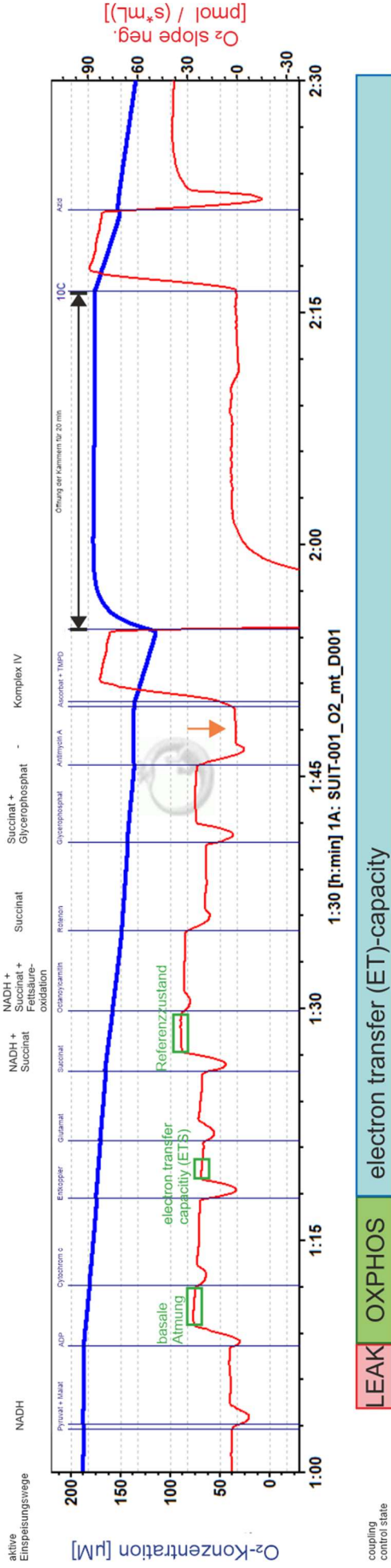


Abbildung 10: Ausschnitt aus einer Beispielmessung vom Cerebellum eines Wildtyp Männchens im Alter von 50 Tagen einer Messkammer. Aufgetragen ist die Sauerstoffkonzentration (blaue Kurve) sowie deren negative Ableitung (rote Kurve) gegenüber der Zeit. Die senkrechten blauen Striche markieren die Zugabe der jeweils über den Strichen genannten Substanzen. Die Zugabe der Mitochondrien sowie der Katalase erfolgte vor dem hier sichtbaren Zeitintervall. Anhand der Beschriftung oberhalb der Grafik ist zu sehen, dass ab der Zugabe von Pyruvat und Malat Elektronen über NADH der Atmungskette zugeführt werden (s. aktive Einspeisungswege in Tabelle 10). Der Sauerstoffverbrauch geht bis zur Zugabe von Succinat nicht über das basale Niveau hinaus, da erst ab diesem Zeitpunkt sowohl Komplex I als auch Komplex II mit Substraten bedient werden. Die darauffolgende Gabe von Octanoylcarnitin fügt den Einspeisungswege über die Fettsäureoxidation hinzu. Durch die Zugabe des Hemmstoffs Rotenon werden zwei dieser Einspeisungswege nicht mehr angesprochen, sodass lediglich Elektronen über Succinat eingebracht werden. Mit der sich anschließenden Zugabe von Glycerophosphat werden darüber zusätzlich Elektronen eingespeist. Durch Antimycin A wird Komplex III blockiert und alle bisherigen Einspeisungswege werden gehemmt, was daran erkennbar ist, dass kein Sauerstoffverbrauch mehr vorhanden ist, die rote Kurve daher gegen Null geht (siehe oranger Pfeil). Ascorbat und TMPD eröffnen dann den Zugangsweg über Komplex IV zur Elektroneneinspeisung. Nach der Zugabe dieser beiden Substanzen werden die Kammer zur Reoxygenierung geöffnet, erkennbar an dem raschen Anstieg der Sauerstoffkonzentration. Unterhalb des Graphen ist erkennbar, in welchem Atmungsstadium (s. 1.2) sich die untersuchten Mitochondrien zum jeweiligen Zeitpunkt befinden.

2.4.2 Polarografischer Sauerstoffsensor (POS)

Die polarografischen Sauerstoffsensoren befinden sich in jeder der beiden Kammern des Respirometers und messen den jeweiligen Sauerstoffverbrauch. Die Kathode besteht aus Gold und besitzt einen Durchmesser von 2 mm. Die Anode besteht aus Silber und steht mit der Kathode über eine Kaliumchlorid-Lösung in Verbindung. Von der Kammer werden sie getrennt durch eine sauerstoffdurchlässige Membran. Der hindurchdiffundierte Sauerstoff wird an der Kathode reduziert, wodurch Hydroxidionen gebildet werden und so die Sauerstoffkonzentration an der Kathode gegen Null gehalten wird. Die Hydroxidionen werden folgend an der Silber-Anode oxidiert. Durch diesen Vorgang fallen Silberionen an, welche durch das Chlorid in der Lösung zu Silberchlorid reagieren und sich an der Anode anlagern. Durch diese Reaktionen entsteht ein Strom, der direkt proportional zum Sauerstoffpartialdruck in der jeweiligen Kammer ist und somit den Sauerstoffverbrauch messbar macht (Gnaiger 2001, 2006).

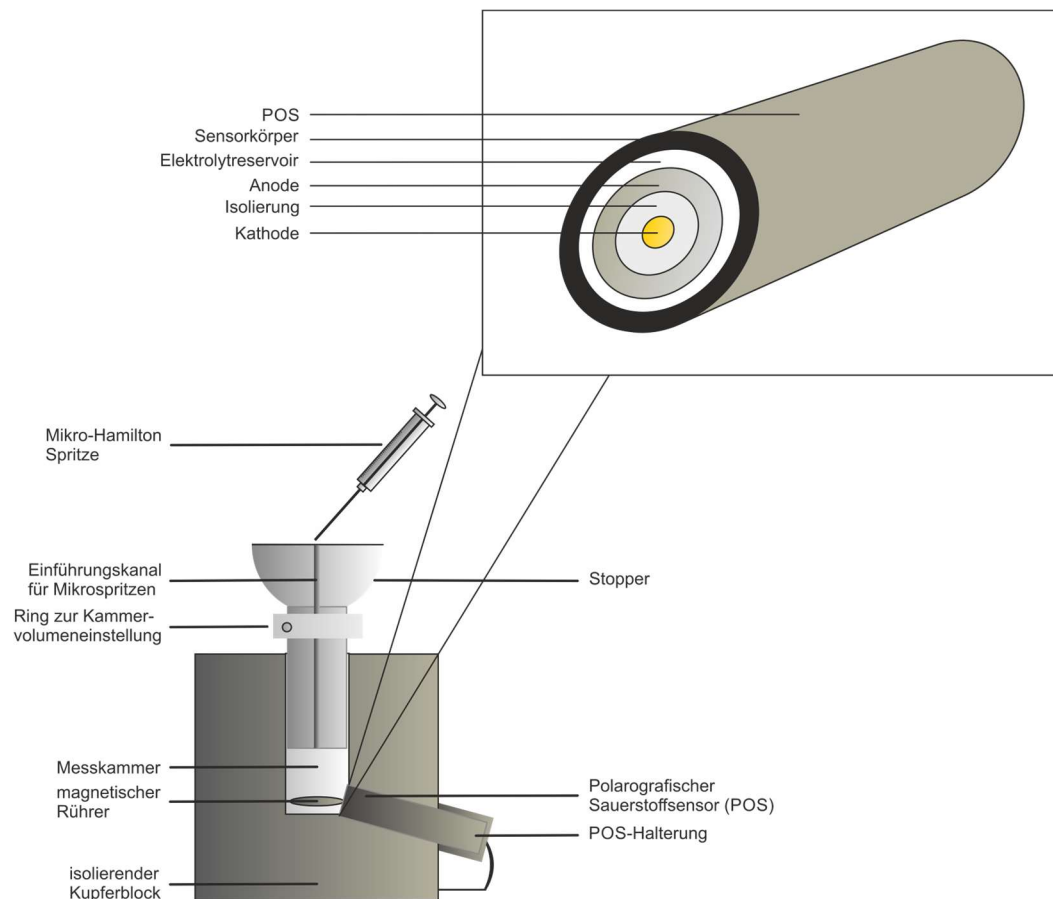


Abbildung 11: Schema des Respirometers mit POS im Detail. Die Vergrößerung bildet die Frontansicht des polarografischen Sauerstoffsensors einer Kammer ab. Zentral ist die Gold-Kathode mit der umliegenden Isolierung dargestellt, gefolgt von der Silber-Anode, dem Elektrolytreservoir sowie dem Sensorkörper, bestehend aus PEEK (Gnaiger 2001).

2.4.3 Sensor-Service

Das Oroboros-Respirometer misst mit Hilfe der sog. OroboPOS, polarographic oxygen sensors (POS), den Sauerstoffgehalt in den Messkammern sehr akkurat. Dabei kann es nach ein paar Monaten dazu kommen, dass das empfangene Signal nicht mehr exakt gemessen werden kann, sondern auch Störsignale eingefangen werden. Dies ist daran erkennbar, dass während der Messung, schon vor Zugabe der Substanzen, die Kurven für die Messung des Sauerstoffverbrauchs unruhig verlaufen und Schwankungen mit einer Amplitude größer als der zu tolerierenden $\pm 4 \text{ pmol/s}\cdot\text{mL}$ (MipNet06.03) innerhalb eines Datenerhebungsintervalls von 2 s überschritten werden. Ebenso ist erkennbar, dass die Sensitivität der Sensoren nachlässt, was in einem verlangsamten Antwortverhalten während des Rührstabtestes sichtbar ist. Des Weiteren sinkt das Signal-Rauschverhältnis und die Messung wird sichtbar unruhiger. Um den Sensor-Service durchzuführen, wird der OroboPOS vom Oroboros-Respirometer entfernt und wie im Oroboros-Protokoll MiPNet19.18 beschrieben auseinandergebaut und die folgenden Schritte werden ausgeführt: Zuerst wird die Kathode gereinigt, indem sie in einer Petrischale über ein Reinigungstuch mit Polierpaste, welche $0,3 \mu\text{M}$ Aluminiumoxid enthält, gerieben wird. Danach wird die Anode gereinigt, indem 25%ige Ammoniaklösung darauf geträufelt wird und drei Zyklen von jeweils 10 min Inkubationszeit abgewartet werden. Auch die elektrischen Verbindungen sollen im Rahmen dieses Service kontrolliert und ggf. gereinigt werden. Im weiteren Schritt wird eine neue Membran auf den Sensor gelegt, wobei unter die Membran destilliertes Wasser mit 1 mM Kaliumchlorid getropft wird. Besonders zu beachten ist, dass keine Blasen unter der Membran eingeschlossen werden. Danach kann der Sensor wieder in das Oroboros-Respirometer eingebaut werden.

2.4.4 O₂-Hintergrund-Korrektur

Auch die polarografischen O₂-Sensoren selbst verbrauchen Sauerstoff, um den Sauerstoffgehalt in der Kammer zu messen, was als Teil des residuellen Sauerstoffverbrauchs bezeichnet wird. Um diesen bestimmen zu können, muss gelegentlich eine O₂-Hintergrund-Kalibrierung durchgeführt werden. Diese wird im MiPNet12.10-Protokoll der Firma Oroboros erläutert und anhand dessen durchgeführt: Dafür wird schrittweise jeweils 10 mM Dithionit-Lösung über maschinell-ansteuerbare Hamilton Mikrospritzen (*titration injection micropump*, TIP) in die beiden Kammern des Oroboros-Respirometers injiziert (s. Abbildung 12). Der Stufenweise, vordefinierte, Sauerstoffverbrauch durch Dithionit wird nun genutzt, um eine Kalibrierung der sensorbasierten Sauerstoffmessung vorzunehmen. Am Ende der Titrationstreppe durch Dithionit liegt kein Sauerstoff mehr in der Kammer vor. Bleibt weiterhin ein messbarer Sauerstoffverbrauch bestehen, entspricht dieser der O₂-Hintergrundaktivität der Sensoren. Für die Messung werden die beiden Hamilton-Spritzen auf dem Oroboros-Respirometer angebracht, beide haben ein Fassungsvermögen von 200 μL und injizieren direkt in die Kammern. Auf diese Kalibrierungswerte wird sich bei jeder Messung bezogen, damit die Messergebnisse dem Hintergrund-Sauerstoffverbrauch

angepasst werden. Somit sind alle in dieser Arbeit gezeigten, nicht näher beschriebenen, Messwerte kalibrierte sowie Hintergrund-korrigierte Sauerstoffverbrauchsdaten.

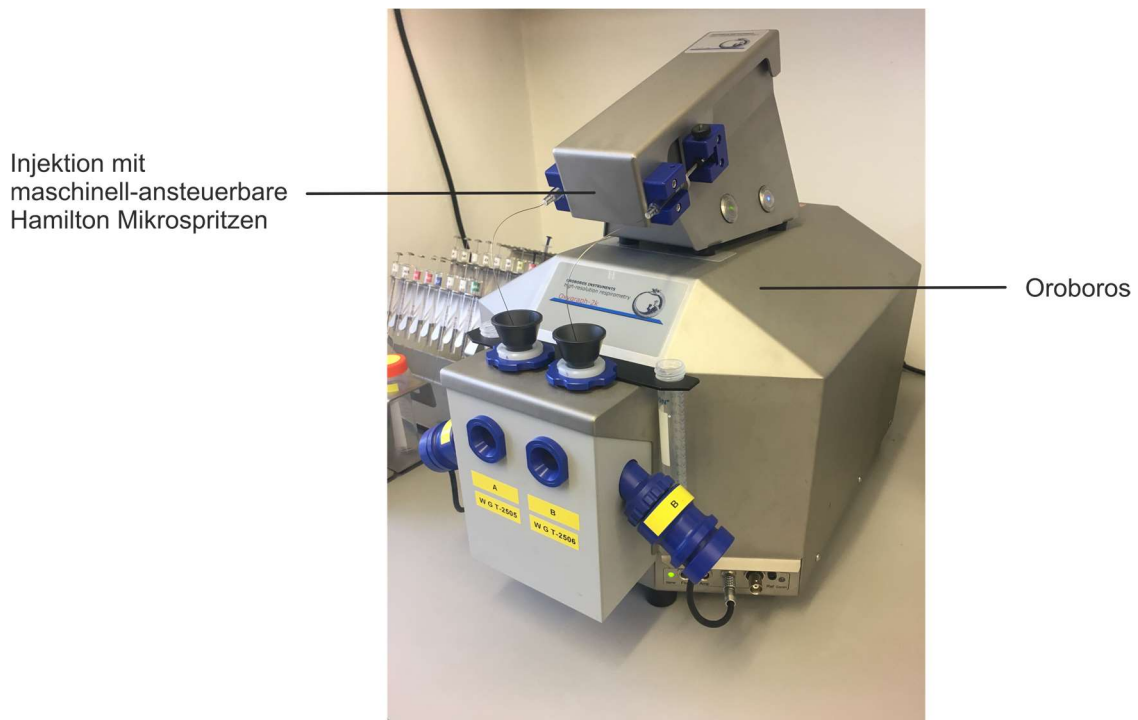


Abbildung 12: Oroboros-Respirometer mit den Hamilton Mikrospritzen. Zu sehen ist das Respirometer mit installierten maschinell-ansteuerbaren Hamilton Mikrospritzen für die O₂-Hintergrund-Kalibrierung.

2.4.5 Software DatLab

Für sämtliche Messungen mit dem Respirometer wurde die Software DatLab der Firma Oroboros Mäuse der Gruppen WT, WT+AO, $mCAT^{+/T}$, $Mecp2^{-/y}$, $Mecp2^{-/y}+AO$ und $Mecp2^{-/y}+mCAT^{+/T}$ verwendet. Über diese ist es möglich, in Echtzeit die Sauerstoffkonzentration in den beiden Kammern sowie den daraus errechneten Sauerstoffverbrauch aufzuzeichnen. Auch die Transformierung der generierten Graphen in die Messwerte läuft über diese Software und die so erstellten Datenpunkte können zu weiterführenden Datenauswertungsprogrammen kopiert werden.

2.5 Statistik

Um die Tiere maximal nutzen, wurden Teile der Maus, welche nicht für die hier beschriebenen Experimente genutzt wurden, durch andere Mitglieder der AG Müller für Versuche verwendet.

Im Rahmen meiner Arbeit wurden 78 Mäuse verwendet, um Messungen im Oroboros-Respirometer durchzuführen sowie um vor diesen Experimenten noch die unten beschriebenen Körperdaten zu erheben. Der Stichprobenumfang (n) umfasst die Anzahl der

jeweils verwendeten Mäuse. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe einer Varianzanalyse (*analysis of variance*, ANOVA) mittels GraphPad Prism 8. Als *post-hoc*-Test wurde *Holm-Sidak's* oder *Tukey's multiple comparison test* verwendet. Die gezeigten Daten sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt. Die Signifikanzniveaus wurden wie folgt definiert: * für das 5%-Niveau ($p < 0,05$), ** für das 1%-Niveau ($p < 0,01$) sowie *** für das 0,1%-Niveau ($p < 0,001$) markiert. Eine Tendenz wurde definiert zwischen einem 5 – 10%-Niveau ($0,05 < p < 0,1$).

3 Ergebnisse

Mit dieser Arbeit sollte herausgefunden werden, ob der mitochondriale Sauerstoffverbrauch bei Mäusen, welche am Rett-Syndrom erkrankt sind, verändert ist im Vergleich zu gesunden Mäusen. Außerdem sollte der Einfluss von AO-Futter sowie einer Katalase in den Mitochondrien im Gehirn untersucht werden. Zur Messung wurde das hochauflösende Oroboros-Respirometer mit dem dazugehörigen SUIT 1-Protokoll wie in 2.4 beschrieben verwendet. Dazu wurden isolierte Mitochondrien aus dem Kleinhirn und Hirnstamm von Mäusen der Gruppen WT, WT+AO, *mCAT*^{+/T}, *Mecp2*^{-/y}, *Mecp2*^{-/y}+AO und *Mecp2*^{-/y}+*mCAT*^{+/T} genutzt.

Ebenfalls sollten die verschiedenen Gruppen untereinander hinsichtlich ihrer etwaigen Varianz der phänotypischen Merkmale verglichen werden. Hierfür wurden die möglichen Auswirkungen auf den Phänotyp mittels Körperlängen- und Körpergewichtsmessung sowie die Blutglukose und der Hämatokrit angeschaut werden.

3.1 Allgemeine Parameter des Phänotyps

Zur Untersuchung des möglichen Einflusses des Fehlens des MeCP2-Proteins wurden bei allen der für die Experimente mit dem Oroboros-Respirometer verwendeten Tiere die Parameter Körperlänge, Körpergewicht, Blutglukose und Hämatokrit während der Präparation für die Sauerstoffverbrauchsmessung bestimmt und verglichen. Diese Werte sind im Folgenden dargestellt.

3.1.1 Körpergewicht

Um zu überprüfen, ob das MeCP2-Protein Einfluss auf das Körpergewicht 50 Tage alter männlicher Mäuse nimmt, wurden Mäuse der Gruppen WT, WT+AO, *mCAT*^{+/T}, *Mecp2*^{-/y}, *Mecp2*^{-/y}+AO und *Mecp2*^{-/y}+*mCAT*^{+/T} gewogen und in einer Grafik gegeneinander aufgetragen (s. Abbildung 13).

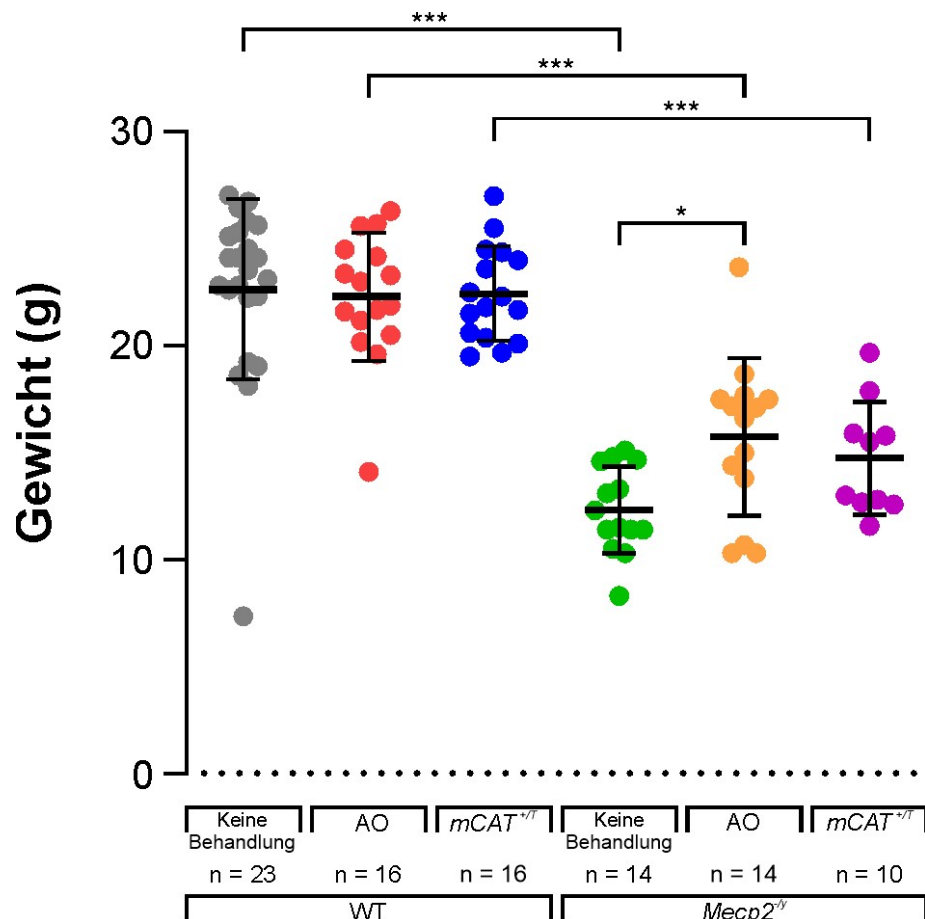


Abbildung 13: Gewicht. Aufgetragen ist das Körpergewicht in Gramm der Mäuse der Gruppen WT (n = 23), WT+AO (n = 16), *mCAT*^{+/T} (n = 16), *Mecp2*^{-/y} (n = 14), *Mecp2*^{-/y}+AO (n = 14) und *Mecp2*^{-/y}+ *mCAT*^{+/T} (n = 10). Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar. Die statistische Auswertung erfolgte durch einen *two-way* ANOVA mit Sidak's *post-hoc*-Test ($p \leq 0,001$ für WT vs. *Mecp2*^{-/y} (***)), ($p \leq 0,001$ für WT+AO vs. *Mecp2*^{-/y}+AO (***) und ($p \leq 0,001$ für *mCAT*^{+/T} vs. *Mecp2*^{-/y}+ *mCAT*^{+/T} (***)) sowie durch einen *two-way* ANOVA mit Tukey's *post-hoc*-Test ($p = 0,016$ für *Mecp2*^{-/y} vs. *Mecp2*^{-/y}+AO(*)).

Es zeigt sich, dass die Mäuse, welchen das MeCP2-Protein fehlt, signifikant leichter sind gegenüber den WT-Mäusen. Dies ist auch zu beobachten, wenn beide Gruppen jeweils mit AO-Futter gefüttert wurden oder eine mitochondriale Katalase exprimiert haben. Des Weiteren zeigt sich, dass die Mäuse der Gruppen *Mecp2*^{-/y}+AO signifikant schwerer sind als die unbehandelten Mäuse der *Mecp2*^{-/y}- Gruppe.

3.1.2 Körperlänge

Um den Einfluss des MeCP2-Proteins auf die Körpergröße männlicher Mäuse im Alter von 50 Tagen zu untersuchen, wurde die Körperlänge der Mäuse der Gruppen WT, WT+AO, *mCAT*^{+/T}, *Mecp2*^{-/y}, *Mecp2*^{-/y}+AO und *Mecp2*^{-/y}+ *mCAT*^{+/T} von der Nasenspitze bis zur Schwanzwurzel gemessen und miteinander verglichen (s. Abbildung 14).

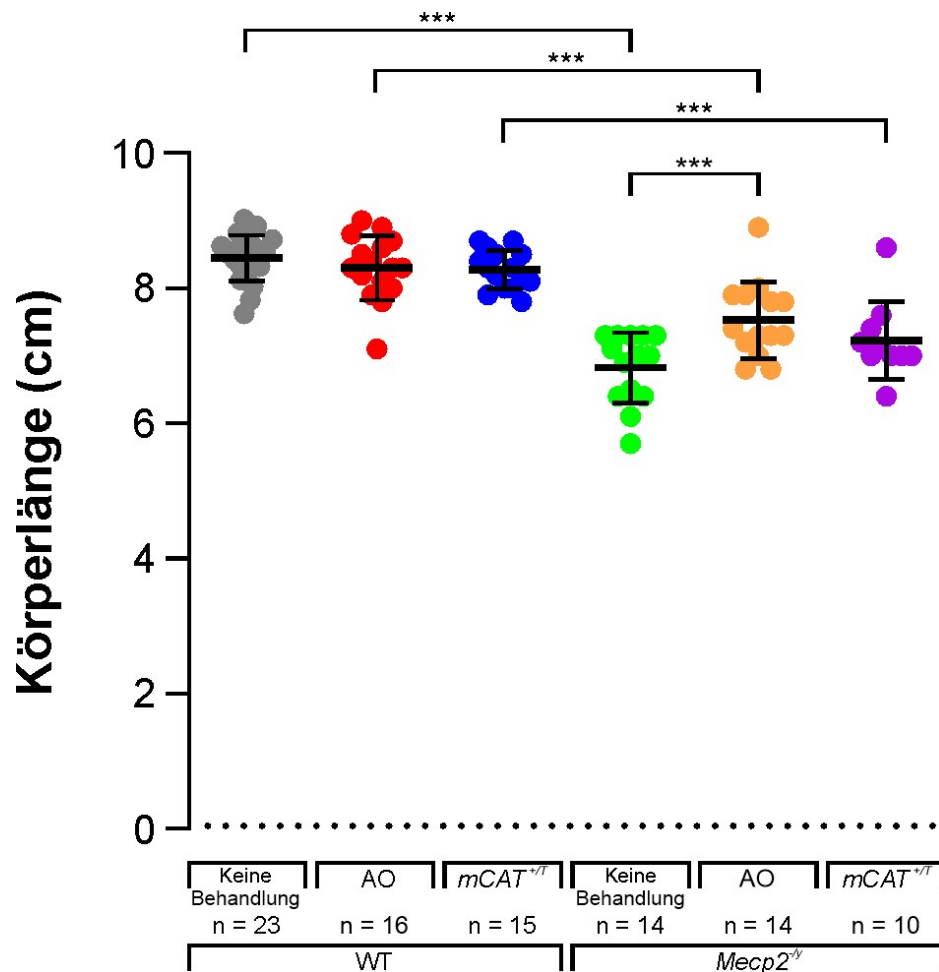


Abbildung 14: Körperlänge. Dargestellt ist die Körperlänge in cm der Mäuse der Gruppen WT (n = 23), WT+AO (n = 16), *mCAT*^{+/T} (n = 15), *Mecp2*^{-/-} (n = 14), *Mecp2*^{-/-}+AO (n = 14) und *Mecp2*^{-/-}+ *mCAT*^{+/T} (n = 10). Die Standardabweichung ist durch die Fehlerbalken aufgezeichnet. Statistisch ausgewertet wurden die Daten durch einen *two-way* ANOVA mit Sidak's *post-hoc*-Test ($p \leq 0,001$ für WT vs. *Mecp2*^{-/-} (***)), ($p \leq 0,001$ für WT+AO vs. *Mecp2*^{-/-}+AO (***)), ($p \leq 0,001$ für *mCAT*^{+/T} vs. *Mecp2*^{-/-}+ *mCAT*^{+/T} (***)) sowie durch einen *two-way* ANOVA mit Tukey's *post-hoc*-Test ($p = 0,0003$ für *Mecp2*^{-/-} vs. *Mecp2*^{-/-}+AO (***)).

Erkennbar ist, dass die Mäuse, welche kein MeCP2-Protein tragen, signifikant kürzer sind, verglichen mit den WT-Mäusen. Dies gilt auch für die Mausgruppen, welche mit Antioxidantien gefüttert wurden und die, die eine mitochondriale Katalase tragen. Außerdem sind die *Mecp2*^{-/-}+AO-Mäuse signifikant größer als die Mäuse der Gruppe *Mecp2*^{-/-}.

3.1.3 Blutglukosespiegel

Neben dem Einfluss des MeCP2-Proteins auf die phänotypischen Kennwerte Körperlänge und Körpergewicht wurden auch die Glukosewerte dieser Tiere auf mögliche Unterschiede hin untersucht. Die Mäuse entstammen den Gruppen WT, WT+AO, *mCAT*^{+/T}, *Mecp2*^{-/-}, *Mecp2*^{-/-}+AO und *Mecp2*^{-/-}+ *mCAT*^{+/T} (s Abbildung 15).

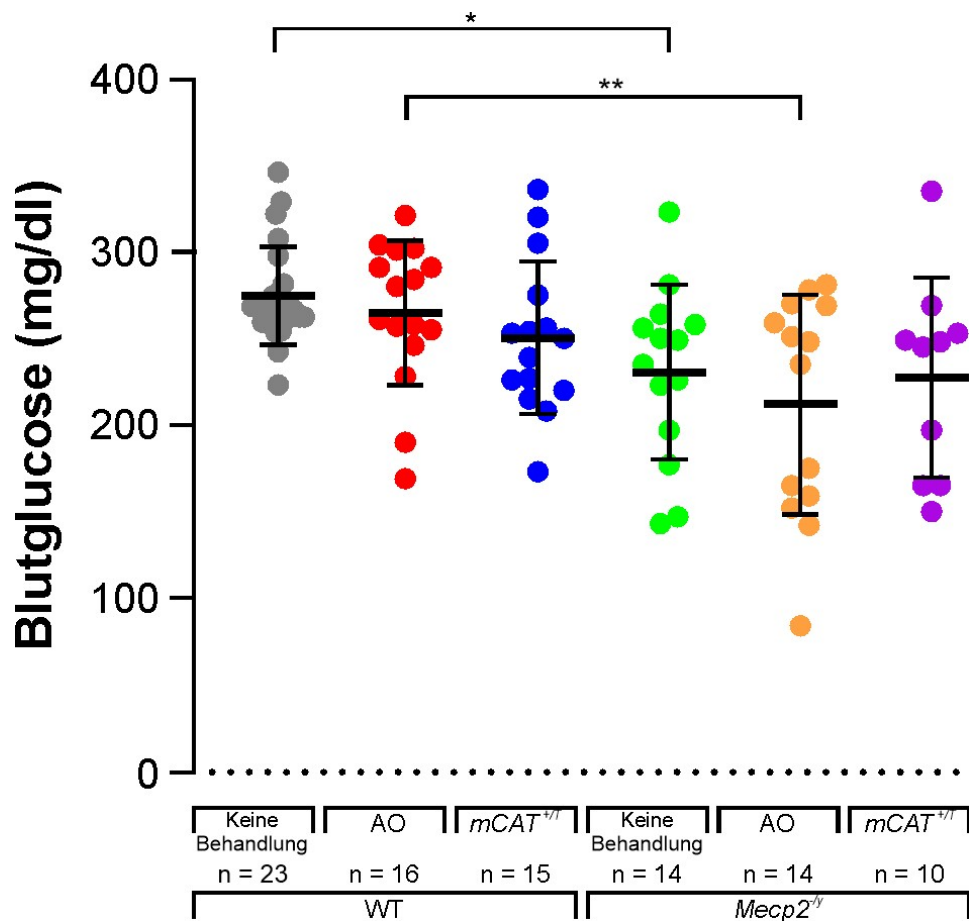


Abbildung 15: Blutglukose. Diese Grafik zeigt die Glukosewerte in mg/dl der Mäuse der Gruppen WT (n = 23), WT+AO (n = 16), *mCAT*^{+/T} (n = 15), *Mecp2*^{-/y} (n = 14), *Mecp2*^{-/y}+AO (n = 14) und *Mecp2*^{-/y}+*mCAT*^{+/T} (n = 10). Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. Für die statistische Auswertung wurde sich eines *two-way* ANOVA mit Sidak's *post-hoc*-Test bedient (p = 0,0207 für WT vs. *Mecp2*^{-/y} (*)) und (p = 0,0077 für WT+AO vs. *Mecp2*^{-/y}+AO (**)). Zwischen den restlichen Gruppen sind keine Signifikanzen erkennbar.

Auffällig ist, dass die *Mecp2*^{-/y}-Mäuse signifikant niedrigere Blutglukosespiegel aufweisen als die Wildtyp-Mäuse. Auch sind die Blutglukosewerte der *Mecp2*^{-/y}+AO-Mäuse statistisch signifikant niedriger als die Werte der WT+AO-Mäuse.

3.1.4 Hämatokrit

Der Hämatokrit der Mäuse der Gruppen WT, WT+AO, *mCAT*^{+/T}, *Mecp2*^{-/y}, *Mecp2*^{-/y}+AO und *Mecp2*^{-/y}+*mCAT*^{+/T} wurde gemessen und miteinander verglichen, um den Einfluss des MeCP2-Proteins auf den Hämatokrit hin zu überprüfen (s. Abbildung 16).

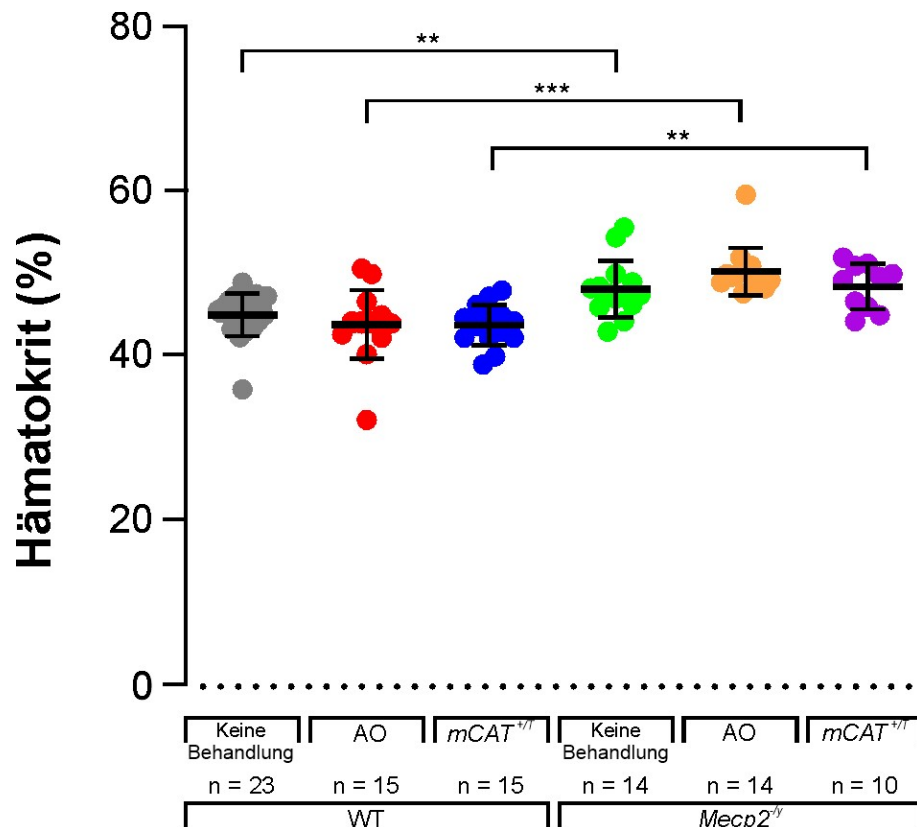


Abbildung 16: Hämatokrit. Aufgeführt ist der Hämatokrit in Prozent der Mäuse der Gruppen WT (n = 23), WT+AO (n = 15), *mCAT*^{+/T} (n = 15), *Mecp2*^{-/y} (n = 14), *Mecp2*^{-/y}+AO (n = 14) und *Mecp2*^{-/y}+ *mCAT*^{+/T} (n = 10). Die Standardabweichung ist in Form der Fehlerbalken aufgezeichnet. Die statistische Auswertung wurde mit Hilfe eines *two-way* ANOVA mit Sidak's *post-hoc*-Test durchgeführt (p = 0,0039 für WT vs. *Mecp2*^{-/y} (**)), (p ≤ 0,001 für WT+AO vs. *Mecp2*^{-/y}+AO (***) und (p = 0,0011 für *mCAT*^{+/T} vs. *Mecp2*^{-/y}+ *mCAT*^{+/T} (**)).

Es zeigt sich, dass der Hämatokrit der *Mecp2*^{-/y}-Mäuse signifikant erhöht ist gegenüber dem der Wildtyp-Mäusen. Dies ist auch unter AO-Futter-Gabe zu beobachten sowie bei Expression einer mitochondriale Katalase.

3.2 Reinheitskontrolle der isolierten Mitochondrien mittels Western Blot

Um die isolierten Mitochondrien auf ihre Reinheit hin zu überprüfen, wurde ein exemplarischer Western Blot mit vier 50 Tage alten männlichen Mäusen der Wildtyp-Gruppe wie in 2.3 beschrieben durchgeführt und ausgewertet. Hierfür wurde das Cerebellum der Gehirne verwendet. Es wurde der Anteil an zytosolischen Bestandteilen mittels des Antikörpers gegen GAPDH, der Anteil an Proteinen des endoplasmatischen Retikulum mittels des Antikörpers gegen Calreticulin (Cal), der Anteil der Bestandteile von Peroxisomen mittels des Antikörpers gegen PMP70 sowie die mitochondrialen Anteile mittels des Antikörpers gegen COX6a untersucht.

Für die Quantifizierung der Ergebnisse dieser Messungen wurden die Banden des Western Blots unter Zuhilfenahme des Programms *ImageJ* densitometrisch ausgewertet. (s. Abbildung 17). Für die folgende grafische Darstellung wurde die Mitochondriensuspension verwendet, welche den Ursprung der 30 µg Mitochondrien für die Messungen mit dem Oroboros-Respirometer darstellt. Die densitometrischen Zahlenwerte der Banden wurden auf den jeweiligen GAPDH-Wert der Maus normiert und miteinander verglichen.

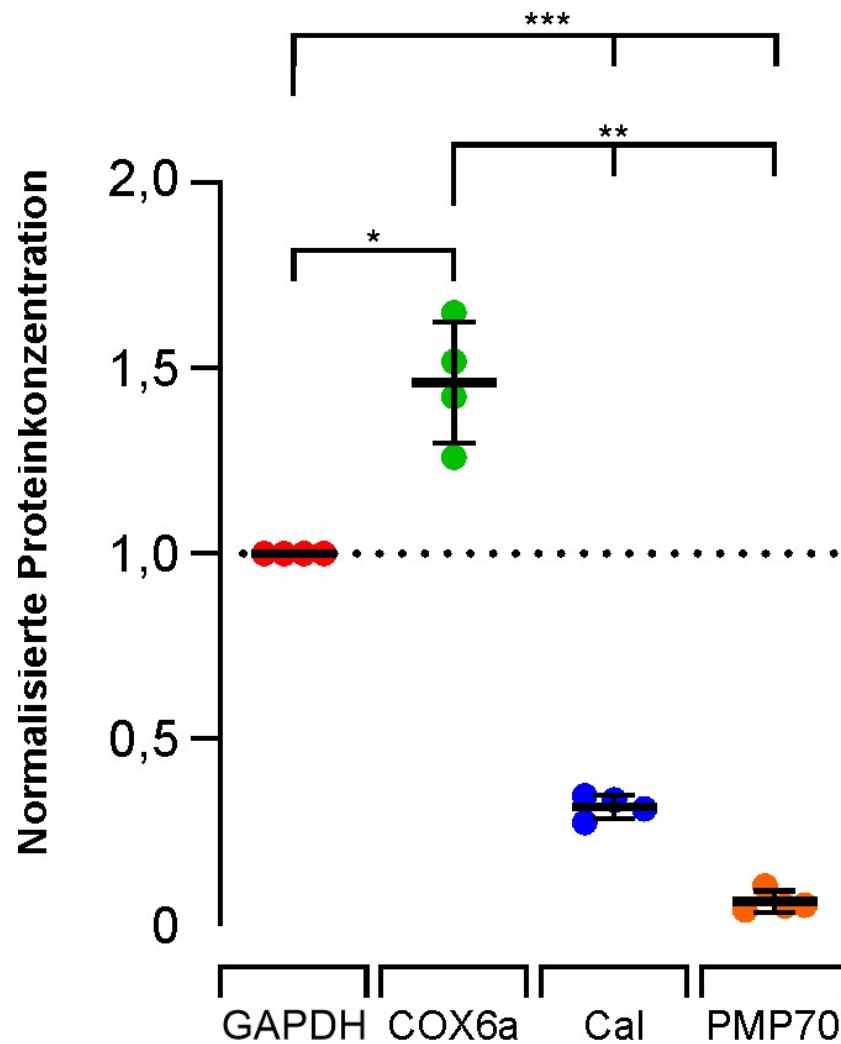


Abbildung 17: Quantifizierung der Ergebnisse des Western Blots mittels Densitometrie. Dargestellt sind die Werte der densitometrischen Messung der Banden des Western Blot von 50 Tage alten Wildtyp Männchen ($n = 4$), wobei jeder Wert auf den Wert der GAPDH-Bande der jeweiligen Maus normiert wurde. Die statistische Auswertung erfolgte mittels eines *one-way* ANOVA ($p < 0,001$ für GAPDH vs. Calreticulin und PMP70 (***)), ($p \leq 0,0018$ für COX6a vs. Calreticulin und PMP70 (**)) und ($p = 0,0324$ für GAPDH vs. COX6a (*)), die Fehlerbalken bilden die Standardabweichung ab. Normiert sind die Werte auf die GAPDH-Werte.

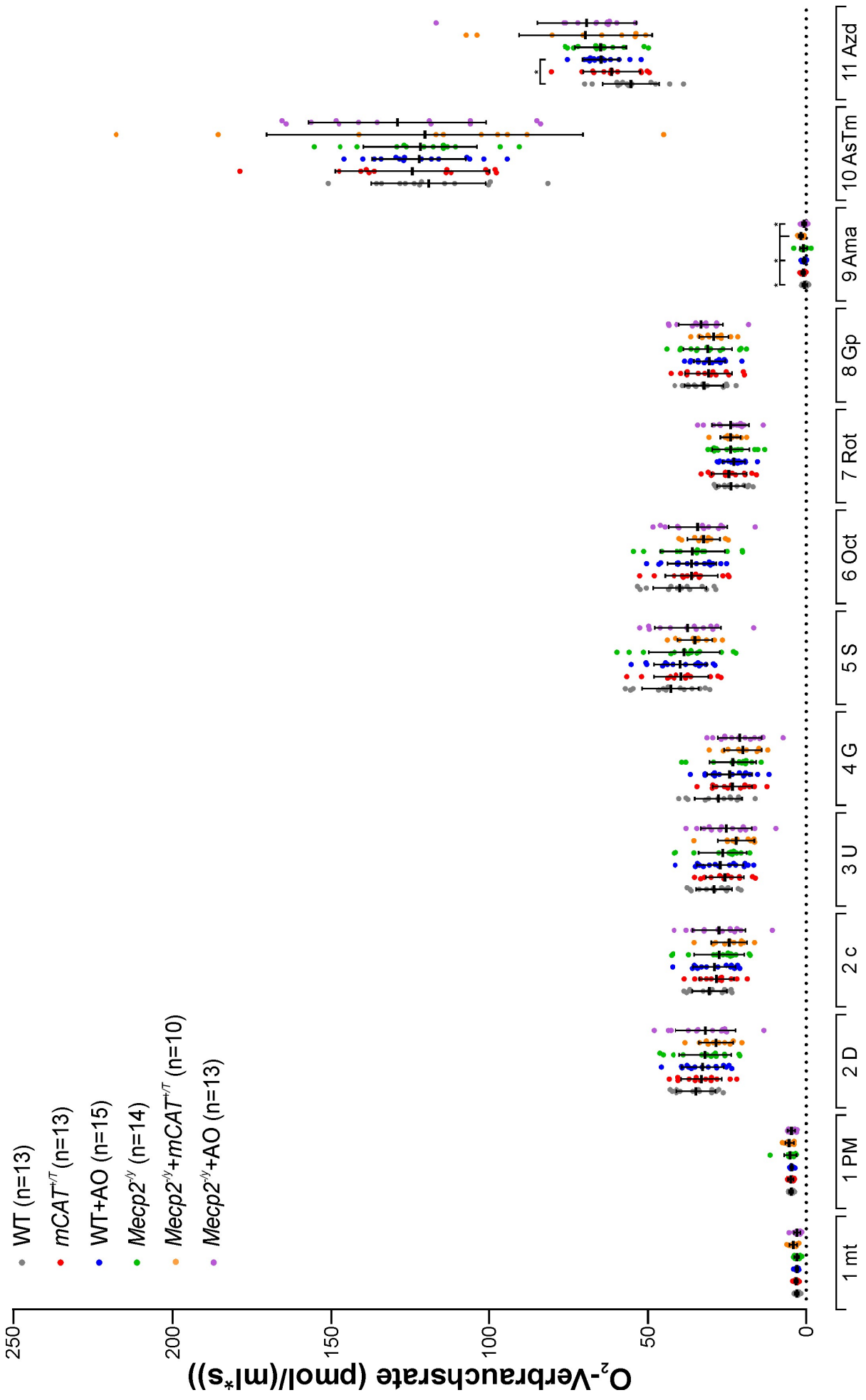
Erkennbar ist, dass die Bande mit Antikörpern gegen mitochondriale Bestandteile (COX6a) unter der Normierung auf zytosolische Bestandteile (GAPDH) die signifikant höchste Dichte aufweist und sich somit überwiegend mitochondriale Proteine in der Lösung

befinden. Dennoch handelt es sich nicht um eine hochreine Mitochondrienisolation, denn es sind auch geringe Anteile von ER sowie Peroxisomen nachweisbar.

3.3 Vergleich des O₂-Verbrauchs innerhalb der Mausgruppen

3.3.1 O₂-Verbrauch des Cerebellums

Um den Sauerstoffverbrauch der Mitochondrien aus den Hirnregionen Cerebellum und Hirnstamm von Mäusen zu untersuchen, wurden respirometrische Messungen zur Sauerstoffbestimmung mit dem Oroboros-Respirometer durchgeführt. Um die einzelnen Reaktionen und Komplexe der Atmungskette im Detail genauer anschauen zu können, wurde das SUT 1-Protokoll verwendet (s. 2.4.1). Während dieses Protokolls werden ausgewählte Atmungsstadien erreicht, welche im Folgenden unter Betrachtung der verschiedenen Mausgruppen analysiert werden können (s. 1.2). Hierbei wurden die Gruppen WT, *mCAT*^{+/T}, WT+AO, *Mecp2*^{-/y}, *Mecp2*^{-/y}+ *mCAT*^{+/T} und *Mecp2*^{-/y}+AO analysiert, um den Einfluss des MeCP2-Proteins, eines Antioxidantienfutters und einer mitochondrialen Katalase auf den O₂-Verbrauch der Mitochondrien zu untersuchen. Die experimentell erhobenen Datenpunkte sind in den folgenden Diagrammen dargestellt, vergleichend hierzu siehe Abbildung 10: Ausschnitt aus einer Beispielmessung vom Cerebellum eines Wildtyp Männchens im Alter von 50 Tagen einer Messkammer.



Titrationsssequenz des SUJ1-Protokolls

Abbildung 18: Vergleich der mitochondrialen Sauerstoffverbrauchsrate im Cerebellum verschiedener Mausgruppen. Dargestellt ist die Sauerstoffverbrauchsrate von Mitochondrien des Cerebellums über die Stadien des Oroburos-Protokolls hinweg. Miteinander verglichen werden hierbei die Mausgruppen WT, $mCAAT^{+/T}$, WT+AO, $Mecp2^{-/y}$, $Mecp2^{-/y}+mCAAT^{+/T}$ und $Mecp2^{-/y}+AO$. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. Die Daten stellen die kalibrierten sowie Hintergrund-korrigierten Sauerstoffverbrauchsraten dar. Das dargestellte Volumen von einem Milliliter enthält 15 μg untersuchter Proteinmenge. Die statistische Testung erfolgte durch einen *two-way* ANOVA mit *Tukey's post-hoc*-Test: 9Ama: $p = 0,013$ für WT vs. $Mecp2^{-/y}+mCAAT^{+/T}$, $p = 0,015$ für AO vs. $Mecp2^{-/y}+mCAAT^{+/T}$, $p = 0,027$ für $Mecp2^{-/y}+AO$ vs. $Mecp2^{-/y}+mCAAT^{+/T}$. Signifikanz sind wie folgt dargestellt: * für $p \leq 0,05$.

In Abbildung 18 sind die Sauerstoffverbrauchsdaten (kalibriert sowie Hintergrund-korrigiert) der Mitochondrienpräparate der einzelnen Mausgruppen während der Stadien des SUIT 1-Protokolls sichtbar.

Die Stadien 1mt und 1PM stellen den Hintergrundverbrauch der hinzugegebenen Mitochondrien dar. Durch die Gabe von Pyruvat und Malat standen zwar Substrate zur Speisung des CI zur Verfügung, jedoch liegt noch kein ADP vor. Die ATP-Synthase kann daher noch nicht arbeiten und hemmt die Aktivität der CI-IV durch Rückstau des erzeugten Protonengradienten. Der O_2 -Verbrauch ist in diesen Stadien dementsprechend niedrig, signifikante Unterschiede können nicht festgestellt werden.

Nach Zugabe von ADP im Stadium 2D wurde der Protonengradient nun durch die Aktivitätssteigerung der ATP-Synthase abgebaut. Zur Aufrechterhaltung des Gradienten ist eine Aktivität der CI-IV nötig, was sich im gemessenen Anstieg des O_2 -Verbrauchs widerspiegelt. Auch in diesem Stadium sind keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen erkennbar.

Die Zugabe von Cytochrom c im Stadium 2c prüfte die Integrität der äußeren Mitochondrienmembran: Wäre diese korrumpiert, könnte Cytochrom c zum CIV gelangen und diesen direkt speisen. Der O_2 -Verbrauch würde im Folgenden steigen. In den vorliegenden Messpunkten ist ein solches Phänomen jedoch nicht zu beobachten, was einen Qualitätsnachweis für die Integrität der verwendeten Mitochondrien darstellt.

Im Stadium 3U kam es durch Zugabe von CCCP zur Entkopplung der Atmungskette von der Aktivität der ATP-Synthase, wodurch die CI-IV nun in ihrer maximal möglichen Geschwindigkeit arbeiten können. Interessanterweise lässt sich zum vorherigen Stadium keine Steigerung des O_2 -Verbrauchs feststellen. Dies bedeutet, dass die Geschwindigkeit der ATP-Synthase in allen Mausgruppen keine limitierende Größe für die Aktivität der CI-IV darstellt und diese bereits in ihrer Abhängigkeit der ATP-Synthase maximal schnell arbeiten.

In dieser Konstellation erfolgte im Stadium 4G durch Zugabe von Glutamat die zusätzliche Speisung des CI. Eine weitere Steigerung des O_2 -Verbrauchs ließ sich in keiner Mausgruppe feststellen, was bedeutet, dass der CI bereits in maximal möglicher Geschwindigkeit arbeitete.

Durch Zugabe von Succinat im Stadium 5S konnte hingegen eine Steigerung des O_2 -Verbrauchs erzeugt werden. Dies demonstriert, dass die CIII-IV über weitere Kapazitäten in ihrer Umsatzgeschwindigkeit verfügten, der Elektronentransfer durch CI jedoch nicht ausreichend war, um diese vollständig auszuschöpfen. Durch zusätzliche Speisung von Elektronen über den CII konnte die Aktivität der CIII-IV weiter gesteigert werden, wodurch der O_2 -Verbrauch nochmals anstieg. Jedoch konnten auch in diesem Stadium keine signifikanten Unterschiede zwischen den Mausgruppen festgestellt werden.

Im Stadium 6Oct wurde durch Zugabe von Octanoylcarnitin die β -Oxidation stimuliert und über die dabei gewonnenen Elektronen über ETF auf Ubichinon übertragen. Dies stellt somit eine direkte Speisung des CIII unabhängig von CI und CII dar. Eine Steigerung des

O₂-Verbrauchs ist dennoch nicht zu beobachten, was dafürspricht, dass die vorherige Speisung der CI-II bereits genügend Elektronen lieferte, um eine maximale Aktivität der CIII-IV zu erreichen. Da sich das Gehirn nahezu ausschließlich durch Glukose ernährt und mangels Fettsäuren, welche nicht die Bluthirnschranke passieren können, spielt die β -Oxidation in zentralnervösen Neuronen eine untergeordnete Rolle. Die hier isolierten Mitochondrien können nun zwar die hinzugegebenen Fettsäuren metabolisieren, dieser Effekt ist somit in-vivo jedoch von geringer Tragweite.

Im Stadium 7Rot kam es durch Zugabe von Rotenon zur Hemmung des CI, was zur deutlichen Herabsetzung des O₂-Verbrauchs führte. Dementsprechend reicht die noch vorhandene Speisung von CII (Succinat) und CIII (Octanoylcarnitin) nicht aus, um die Aktivität der Atmungskette auf dem vorherigen Niveau zu halten. Durch eine weitere Zugabe von Glycerin-3-Phosphat (Stadium 8Gp), was nach Oxidation Elektronen auf Ubichinon überträgt und damit ebenfalls direkt CIII speist, ließ sich der O₂-Verbrauch jedoch wieder erhöhen. Auch bei diesen beiden Stadien finden sich keine Unterschiede im Sauerstoffverbrauch zwischen den Mausgruppen.

Durch Gabe von Antimycin A, welches CIII hemmt, wird die Aktivität der gesamten Atmungskette im Stadium 9Ama gehemmt, da in der bisherigen Konstellation noch keine direkte Speisung von CIV erfolgt. Der hier vorliegende Restverbrauch von O₂ stellt dementsprechend einen Hintergrundverbrauch dar, der nicht durch die Aktivität der Atmungskette verursacht wird. In diesem Stadium zeigen sich signifikante Unterschiede zwischen der Gruppe *Mecp2*^{-y/+} *mCAT*^{+T} zu den Gruppen WT, WT+AO sowie *Mecp2*^{-y/+}+AO. In Anbetracht der Tatsachen, dass diese vor allem durch die geringe Standardabweichung innerhalb der *Mecp2*^{-y/+} *mCAT*^{+T}-Gruppe begünstigt werden und es sich hier um eine Hintergrundaktivität handelt, ist diese Beobachtung als nicht-wegweisend und ohne grundlegenden Erkenntnisgewinn zu sehen.

Nach Zugabe von Ascorbat und TMPD kommt es nun zur direkten Speisung des CIV. Da dieser den terminalen Komplex der Atmungskette darstellt und für die Umsetzung von $\frac{1}{2}$ O₂ zu H₂O verantwortlich ist, zeigt sich in den Messungen hierbei der höchste O₂-Verbrauch im SUT 1-Protokoll. Auch in diesem Stadium ist kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen feststellbar, was bedeutet, dass der CIV bei allen Mausmodellen unter direkter Speisung vergleichbar effizient arbeitet. Jedoch ist in diesem Stadium auch eine hohe Streubreite der Datenpunkte zu beobachten, wodurch nicht ausgeschlossen werden kann, dass subtile Unterschiede zwischen den Gruppen möglicherweise nicht erkannt wurden.

Im Stadium 11Azd erfolgt durch Gabe von Azid letztlich die direkte Hemmung des CIV. Eine weitere Umsetzung des O₂ in diesem Komplex sollte dementsprechend nicht mehr erfolgen, wodurch ein Abfall des O₂-Verbrauchs auf das Level im Stadium 9Ama zu erwarten wäre. Während der O₂-Verbrauch im Vergleich zum vorherigen Stadium zwar deutlich absinkt, erreicht er die erwarteten Werte des zuvor beobachteten Hintergrundverbrauchs zum von Oroboros Instruments vorgegebenen Messzeitpunkt jedoch (noch) nicht. Ein

möglicher Erklärungsansatz hierfür könnte die unvollständige Hemmung des CIV bei der hier verwendeten Azid-Konzentration sein. Darüber hinaus sind diese Datenpunkte zu einem festen, vorgegebenen Zeitpunkt erhoben worden, bei welchem der O₂-Verbrauch immer noch am Fallen war. Bei später erfolgender Messung wären deutlich niedrigere Werte beobachtet worden. In diesem Stadium ist ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen WT und WT+AO sichtbar. Da in diesem Stadium jedoch der O₂-Verbrauch unter vollständiger Hemmung der CI-IV untersucht wird, ist die Beobachtung dieser Signifikanz hierbei von minderer Bedeutung.

Es lässt sich zusammenfassen, dass die generelle Durchführung des SUIT 1-Protokolls erfolgreich absolviert werden konnte, da der über die Stadien hinweg regulär verlaufende und von Oroboros Instruments beschriebene O₂-Verbrauch beobachtet werden konnte. Jedoch ließ sich in keinem der Stadien (außer 9Ama und 11Azid) ein signifikanter Unterschied feststellen. Es ist daher festzuhalten, dass -in Betracht der kalibrierten und Hintergrund-korrigierten Sauerstoffverbrauchsrate- weder die Gabe von AO-Futter noch die Expression einer mitochondrialen Katalase zur ROS-Senkung einen Einfluss auf den mitochondrialen O₂-Verbrauch der Wildtyp- sowie *Mecp2*^{-/-}-Tiere im Cerebellum hatte.

Es ist zu erwähnen, dass das gewonnene Mitochondrien-Pellet im Rahmen des Isolationsprotokolls nie identisch ist, wodurch selbst bei exakten Bradford-Assays (und somit konstanter Proteinmenge) der prozentuale Anteil mitochondrialer Proteine von Probe zu Probe unterschiedlich ausfallen kann. Letztlich kann somit die finale Menge der analysierten Mitochondrien variieren, was zur Zunahme der Standardabweichung bei Darstellung der Sauerstoffverbrauchsrate (kalibriert sowie Hintergrund-korrigiert) des O₂-Verbrauchs führen kann.

Daher wird von Oroboros Instruments allgemein empfohlen, die gemessenen Datenpunkte in der Darstellung der sogenannten *flux control ratio (baseline corrected)* (FCR (bc)) zu analysieren. Dabei wird zuerst die Hintergrundaktivität (im Stadium 9Ama gemessen) von allen anderen Stadien abgezogen (= *baseline corrected*). Anschließend werden sämtliche Messpunkte auf den O₂-Verbrauch im Referenzstadium 5S (Zugabe von Succinat) normiert. Unter der Annahme, dass sich der O₂-Verbrauch in diesem Stadium proportional zur untersuchten Mitochondrienmenge verhält, können Abweichungen in der verwendeten Mitochondrienmenge durch diese Normierung aufgehoben werden. Folglich sinkt die Streuung der Messpunkte und potenziell signifikante, jedoch subtile Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen könnten nun sichtbar werden. Darüber hinaus sind die als FCR (bc) angegebenen Daten nun zwischen den Laboren vergleichbar – trotz Verwendung unterschiedlicher Mitochondrienmengen der untersuchten Proben.

Die Angabe der Daten als FCR (bc) ist dabei jedoch nicht komplikationslos. Die Normierung auf das Referenzstadium 5S ergibt dann Sinn, wenn man annimmt, dass der dort gemessene O₂-Verbrauch ausschließlich von der Menge der Mitochondrien in der untersuchten Probe abhängig ist. Sollten die Mitochondrien selbst in den unterschiedlichen Gruppen unterschiedlich effizient arbeiten und die Unterschiede im 5S Stadium daher nicht durch eine abweichende Mitochondrienzahl, sondern deren qualitativer Alteration zustande kommen, führt die Normierung auf dieses Stadium zur ungerechtfertigten Verzerrung der Messpunkte aller anderen Stadien. Gerade in diesem Stadium sind jedoch ggf. Unterschiede im O₂-Verbrauch von Mitochondrien aus Mecp2-defizienten Gehirnen zu erwarten, die nicht nur durch eine Variation ihrer Mitochondrienzahl, sondern auch durch ihre mangelnde Integrität bzw. Effizienz (Can et al. 2019; De Filippis et al. 2015; Valenti et al. 2017) bedingt sein könnten. Die Interpretation der FCR-Darstellung kann daher unter Umständen irreführend sein.

Vor- und Nachteile der Darstellung als normierte FCR-Werte müssen daher bei Betracht der folgenden Ergebnisse im Hinterkopf behalten werden. Die normierten Daten als Darstellung der FCR (bc) sind in Abbildung 19 zu sehen:

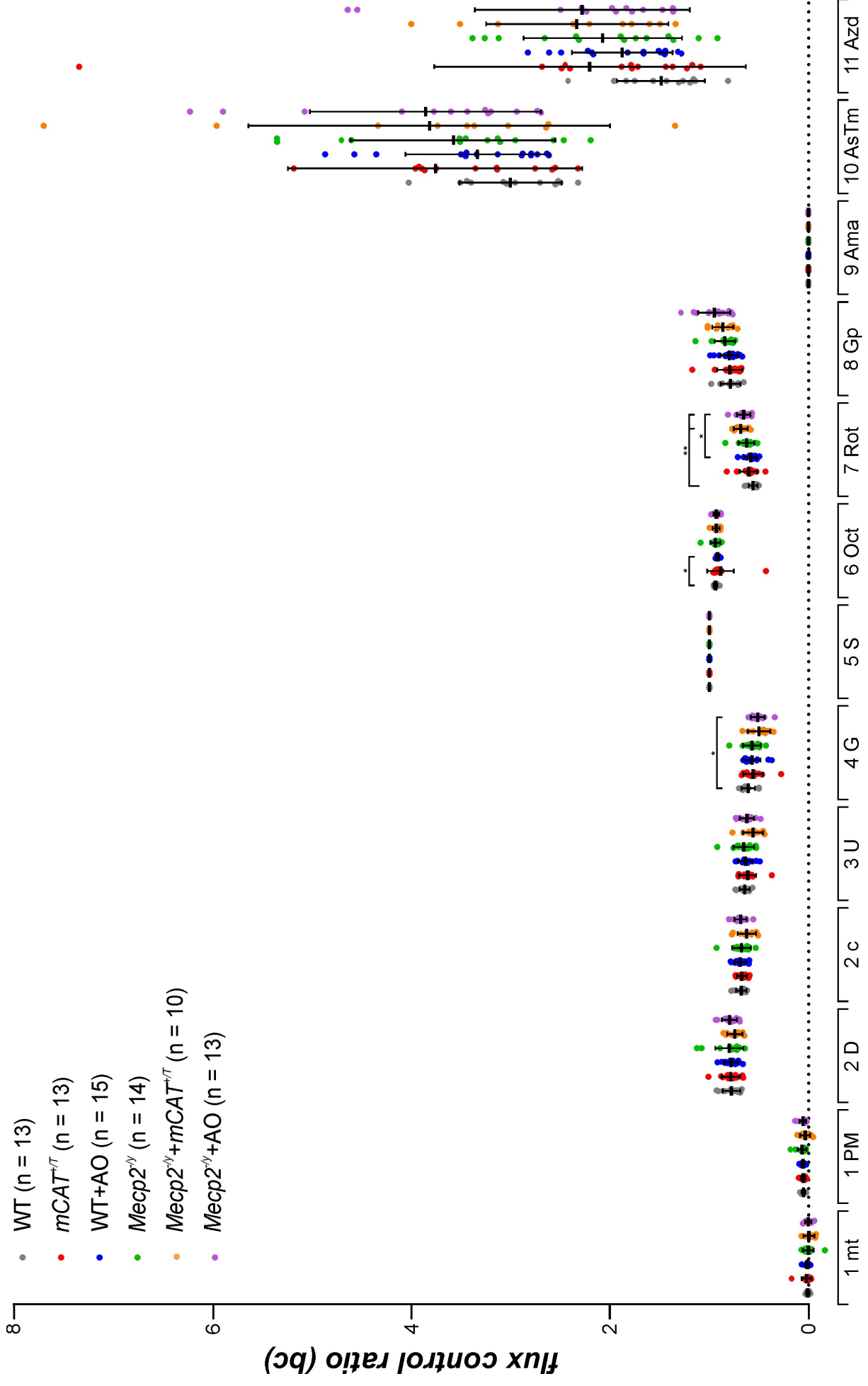


Abbildung 19: Vergleich der normierten mitochondrialen Sauerstoffverbrauchsrate (FCR(bc)) im Cerebellum verschiedener Mausgruppen. Dargestellt ist die normierte Sauerstoffverbrauchsrate von Mitochondrien des Cerebellums über die Stadien des Oroboros-Protokolls hinweg. Miteinander verglichen werden hierbei die Mausgruppen WT, *mC.AT^{+/-T}*, WT+AO, *Mep2^{-/-y}*, *Mep2^{-/-y} + mC.AT^{+/-T}* und *Mep2^{-/-y} + AO*. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar. Die Werte des Sauerstoffverbrauchs sind als *flux control ratio (baseline corrected)* auf das Stadium 5S (Succinat; = 1) normiert und das Stadium 9Ama (Antimycin A; = 0) subtrahiert. Das dargestellte Volumen von einem Milliliter enthält 15 µg untersuchter Proteinmenge. Die statistische Testung erfolgte durch einen *two-way* ANOVA gefolgt vom *Tukey's post-hoc*-Test: 4G: $p = 0,023$ für WT vs. *Mep2^{-/-y} + AO*. 6Oct: $p = 0,039$ für WT vs. WT+AO. 7Rot: $p = 0,002$ für WT vs. *Mep2^{-/-y} + mC.AT^{+/-T}*. $p = 0,005$ für WT vs. *Mep2^{-/-y} + AO*, $p = 0,01$ für AO vs. *Mep2^{-/-y} + mC.AT^{+/-T}*. Signifikanz sind wie folgt dargestellt: * für $p \leq 0,05$ und ** $p \leq 0,01$.

Wie in Abbildung 19 sichtbar, sind dieselben Daten nun auf das Stadium 5S (=1) normiert und die Werte von Stadium 9Ama (=0) subtrahiert. Der Verlauf des O₂-Verbrauchs mit Ansteigen in den Stadien 2D und 5S sowie 10AsTm bleiben dabei erhalten.

Im Vergleich der Mausgruppen fallen nun weitere Unterschiede auf: Im Stadium 4G (maximale Speisung des CI) findet sich ein signifikant verringerter Sauerstoffverbrauch der *Mecp2*^{-/-}+AO-Gruppe im Vergleich zur WT-Gruppe. Generell scheint der Verbrauch aller *Mecp2*^{-/-}-Mausgruppen in diesem Stadium tendenziell niedriger als bei den WT-Mäusen, jedoch ist nur zur *Mecp2*^{-/-}+AO Gruppe eine statistische Signifikanz erreicht worden.

Auch im Stadium 6Oct (direkter Speisung des CIII) findet sich nun ein signifikant erniedrigter O₂-Verbrauch der WT+AO-Gruppe im Vergleich zur WT-Gruppe. Die Relevanz dieser Signifikanz ist jedoch fraglich, da in Gesamtschau der Daten dieses Stadiums der statistische Unterschied am ehesten der sehr geringen Streubreite zu verdanken ist, während ein tatsächlich stark abgenommener O₂-Verbrauch der WT+AO Gruppe nicht augenscheinlich ist.

Nach Hemmung des CI im Stadium 7Rot dreht sich das Bild aus Stadium 4G um: Die drei *Mecp2*^{-/-}-Mausgruppen zeigen einen tendenziell erhöhten O₂-Verbrauch, wobei dieser Effekt vor allem bei den Gruppen *Mecp2*^{-/-}+ *mCAT*^{+/-} / *Mecp2*^{-/-}+AO sichtbar ist und diese daher eine statistische Signifikanz zur WT-Gruppe aufzeigen.

Es lässt sich zusammenfassen, dass bei den Mausgruppen mit Knockout des *MECP2*-Gens ein tendenziell niedrigerer O₂-Verbrauch bei primärer Aktivität des CI zu vermuten ist, wobei bei Hemmung des CI der O₂-Verbrauch dieser Gruppen steigt. Dieser Effekt ist vor allem bei zusätzlicher Anwendung von AO-Futter oder von *mCAT*^{+/-} ausgeprägt, wodurch nur bei diesen Gruppen eine statistische Signifikanz zu WT-Mäusen erreicht wird. Es ist anzumerken, dass diese Effekte lediglich durch die normierte FCR-Darstellung sichtbar werden.

3.3.2 O₂-Verbrauch des Hirnstammes

Im Nachfolgenden sind die erhobenen Messdaten der verschiedenen Mausgruppen mit Mitochondrienproben aus dem Hirnstamm zu sehen. Abbildung 20 zeigt dabei die gewonnenen Sauerstoffverbrauchsraten (kalibriert sowie Hintergrund-korrigiert). Der Verlauf des O₂-Verbrauchs ist dabei zu dem des Cerebellums nahezu identisch: Nach Zugabe von ATP im Stadium 2D, von Succinat im Stadium 5S sowie von Ascorbat und TMPD im Stadium 10AsTm sind Anstiege des Sauerstoffverbrauchs sichtbar. Lediglich im Stadium 3U finden sich Unterschiede: Während die Entkopplung der Atmungskette von der ATP-Synthase im Cerebellum den O₂-Verbrauch nicht weiter steigern konnte, sind im Hirnstamm bei fast allen Mausgruppen leichte Steigerungen im Vergleich zum vorherigen Stadium 2c sichtbar. Dies spricht dafür, dass die Komplexe CI-IV aus Mitochondrien des Hirnstammes

vor der Entkopplung noch ungenutzte, wenn auch nur geringfügige, Umsetzungskapazitäten hatten, die im Cerebellum nicht sichtbar waren.

Im direkten Vergleich der Mausgruppen untereinander zeigen sich in den dargestellten Sauerstoffverbrauchsraten (kalibriert sowie Hintergrund-korrigiert) wiederum keine signifikanten Unterschiede während der einzelnen Stadien. Daher muss auch in Anbetracht dieser Daten festgehalten werden, dass weder die Gabe von AO-Futter noch die Expression einer mitochondrialen Katalase zur ROS-Senkung einen Einfluss auf den O₂-Verbrauch der Wildtyp- sowie *Mecp2*^{-/-}-Tiere in der Hirnregion des Hirnstammes hatte.

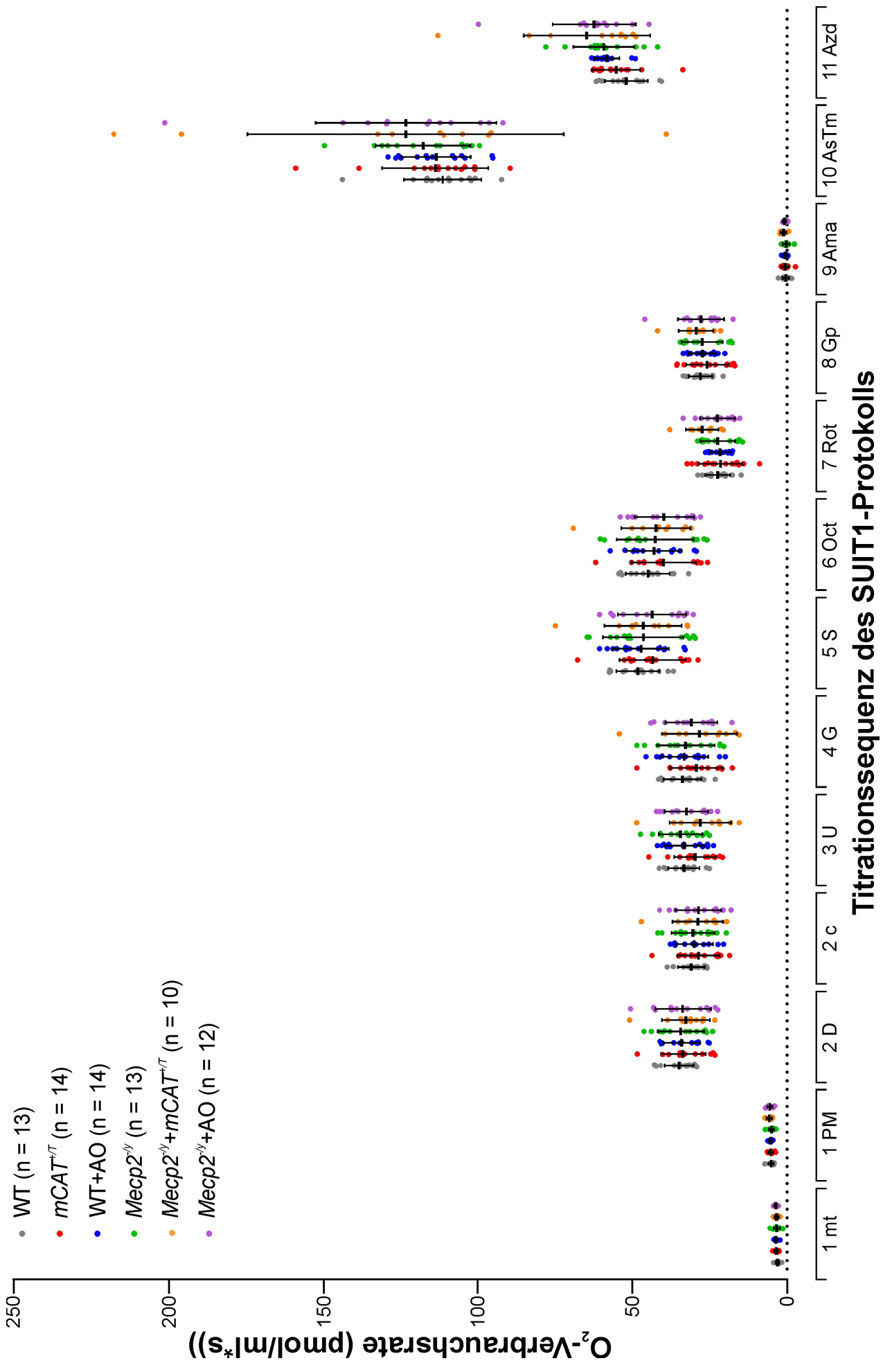


Abbildung 20: Vergleich der mitochondrialen Sauerstoffverbrauchsrate im Hirnstamm verschiedener Mausgruppen. Dargestellt ist die Sauerstoffverbrauchsrate von Mitochondrien des Hirnstammes über die Stadien des Oroboros-Protokolls hinweg. Miteinander verglichen werden hierbei die Mausgruppen WT, *mCMT^{+/-}*, WT+AO, *Meap2^{-/-}*, *Meap2^{-/-}*+*mCMT^{+/-}* und *Meap2^{-/-}*+AO. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. Die Daten stellen die kalibrierten sowie Hintergrund-korrigierten Sauerstoffverbrauchsraten dar. Das dargestellte Volumen von einem Milliliter enthält 15 µg untersuchter Proteinmenge. Die statistische Testung erfolgte durch einen *two-way* ANOVA mit *Tukey's post-hoc*-Test: Es konnten keine signifikanten genotypspezifischen oder behandlungsinduzierten Unterschiede festgestellt werden.

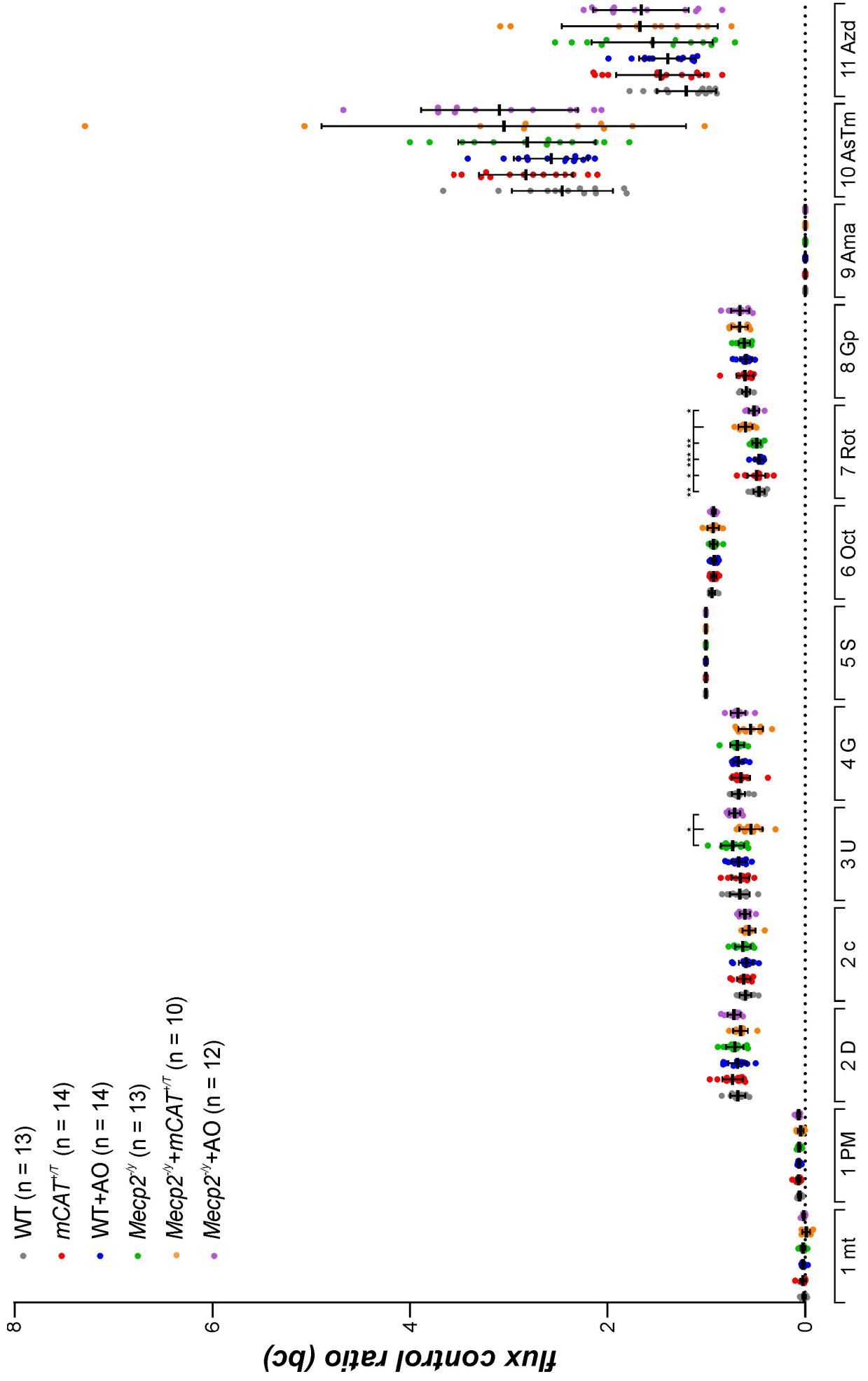


Abbildung 21: Vergleich der normierten mitochondrialen Sauerstoffverbrauchsrate (FCR(bc)) im Hirnstamm verschiedener Mausgruppen. Dargestellt ist die normierte Sauerstoffverbrauchsrate von Mitochondrien des Hirnstamms über die Stadien des Oroboros-Protokolls hinweg. Miteinander verglichen werden hierbei die Mausgruppen WT, $mCAI^{+/T}$, WT+AO, $Mecp2^{-/y}$, $Mecp2^{-/y} + mCAI^{+/T}$ und $Mecp2^{-/y} + AO$. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar. Die Werte des Sauerstoffverbrauchs sind als *flux control ratio (baseline corrected)* auf das Stadium 5S (Succinat, = 1) normiert und das Stadium 9Ama (Antimycin A; = 0) wurde subtrahiert. Das dargestellte Volumen von einem Milliliter enthält 15 μ g untersuchter Proteinmenge. Die statistische Testung erfolgte durch einen *two-way ANOVA* mit *Tukey's post-hoc*-Test: 3U: $p \leq 0,013$ für $Mecp2^{-/y} + mCAI^{+/T}$ vs. $Mecp2^{-/y}$, $Mecp2^{-/y} + AO$. 7Rot: $p \leq 0,045$ für $Mecp2^{-/y} + mCAI^{+/T}$ vs. WT, $mCAI^{+/T}$, WT+AO, $Mecp2^{-/y}$, WT+AO, $Mecp2^{-/y} + AO$. Signifikanz sind wie folgt dargestellt: * für $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ und *** $p \leq 0,001$.

Nach Normierung der Daten und deren Darstellung als FCR (bc) wird vor allem der Effekt einer Mausgruppe sichtbar: Der Knockout des *MECP2*-Gens in Kombination mit der Anwendung der mitochondrialen Katalase (*mCAT*) führt dazu, dass diese Mausgruppe über die Stadien 2D bis 4G den konstant niedrigsten Durchschnittswert im O₂-Verbrauch zeigt. Vor allem im Stadium 3U, also nach Entkopplung der Atmungskette, sind dabei Signifikanzen zu den Gruppen *Mecp2*^{-/-} und *Mecp2*^{-/-}+AO festzustellen. Nach Hemmung des CI im Stadium 7Rot dreht sich das Bild dabei wieder einmal um, wobei der O₂-Verbrauch der *Mecp2*^{-/-}+ *mCAT*^{+/+}-Hirnstamm-Mitochondrien nun im Vergleich zu allen Mausgruppen erhöht ist.

Abschließend bleibt jedoch festzuhalten, dass unter keinen Umständen eine signifikante Änderung des O₂-Verbrauchs der reinen *Mecp2*^{-/-}-Mausgruppe zur WT-Gruppe sichtbar war. Der alleinige Knockout des *MECP2*-Gens an sich hatte dementsprechend nie eine Konsequenz in Bezug auf veränderte O₂-Verbrauchsraten. Lediglich unter Kombination des Knockouts des *MECP2*-Gens mit der Applikation von AO-Futter oder der mitochondrialen Katalase ließen sich teils signifikante Effekte zu den Wildtyp-Gruppen feststellen, wenn auch in relativ milder Ausprägung.

3.4 Vergleich zwischen Cerebellum und Hirnstamm

3.4.1 Mausgruppen WT, *mCAT^{+/T}* und WT+AO

Um zu untersuchen, ob die Mitochondrien der Hirnregionen Cerebellum und Hirnstamm unterschiedlich viel Sauerstoff verbrauchen, wurden die Messungen mit dem Oroboros-Respirometer vergleichend zwischen diesen Gruppen ausgewertet und in den folgenden Diagrammen dargestellt.

Die Sauerstoffverbrauchsdaten (kalibriert sowie Hintergrund-korrigiert) der Gruppen WT, *mCAT^{+/T}* und WT+AO sind in Abbildung 23 aufgetragen. Vergleicht man die Messergebnisse an Mitochondrien von WT Mäusen zwischen Cerebellum und Hirnstamm (A), lassen sich während keinem der Atmungsstadien signifikante Unterschiede im O₂-Verbrauch feststellen. Es lässt sich dementsprechend festhalten, dass es bei Betrachtung dieser Daten keinen Hinweis auf Unterschiede zwischen den beiden Hirnregionen in Bezug auf den O₂-Verbrauch gibt.

Dasselbe Bild zeigt sich bei Betrachtung der Sauerstoffverbrauchsdaten (kalibriert sowie Hintergrund-korrigiert) der *mCAT^{+/T}*-Gruppe (B). Die alleinige Expression der mitochondrialen Katalase scheint auf beide Hirnareale denselben bzw. keinen Effekt zu haben.

Die Gabe von AO-Futter an WT Mäuse (C) führt in den meisten Stadien ebenfalls nicht zu deutlichen Änderungen in einer der beiden Regionen. Zwar zeigen sich in den Stadien 1mt, 1PM und 11Azd signifikante Unterschiede, jedoch handelt es sich bei diesen Stadien um Hintergrundaktivitäten des O₂-Verbrauchs. Daher sind die dort auftretenden Signifikanten ohne besondere Relevanz. Lediglich im Stadium 4G ist ein signifikanter Unterschied festzustellen: Hierbei zeigt sich ein erhöhter Sauerstoffverbrauch im Hirnstamm im Vergleich zum Cerebellum. Diese Tendenz zeigt sich auch in den 4G Stadien der WT- und *mCAT^{+/T}*-Mausgruppen, ist hier jedoch geringfügig schwächer ausgeprägt, wodurch keine Signifikanz erreicht wird.

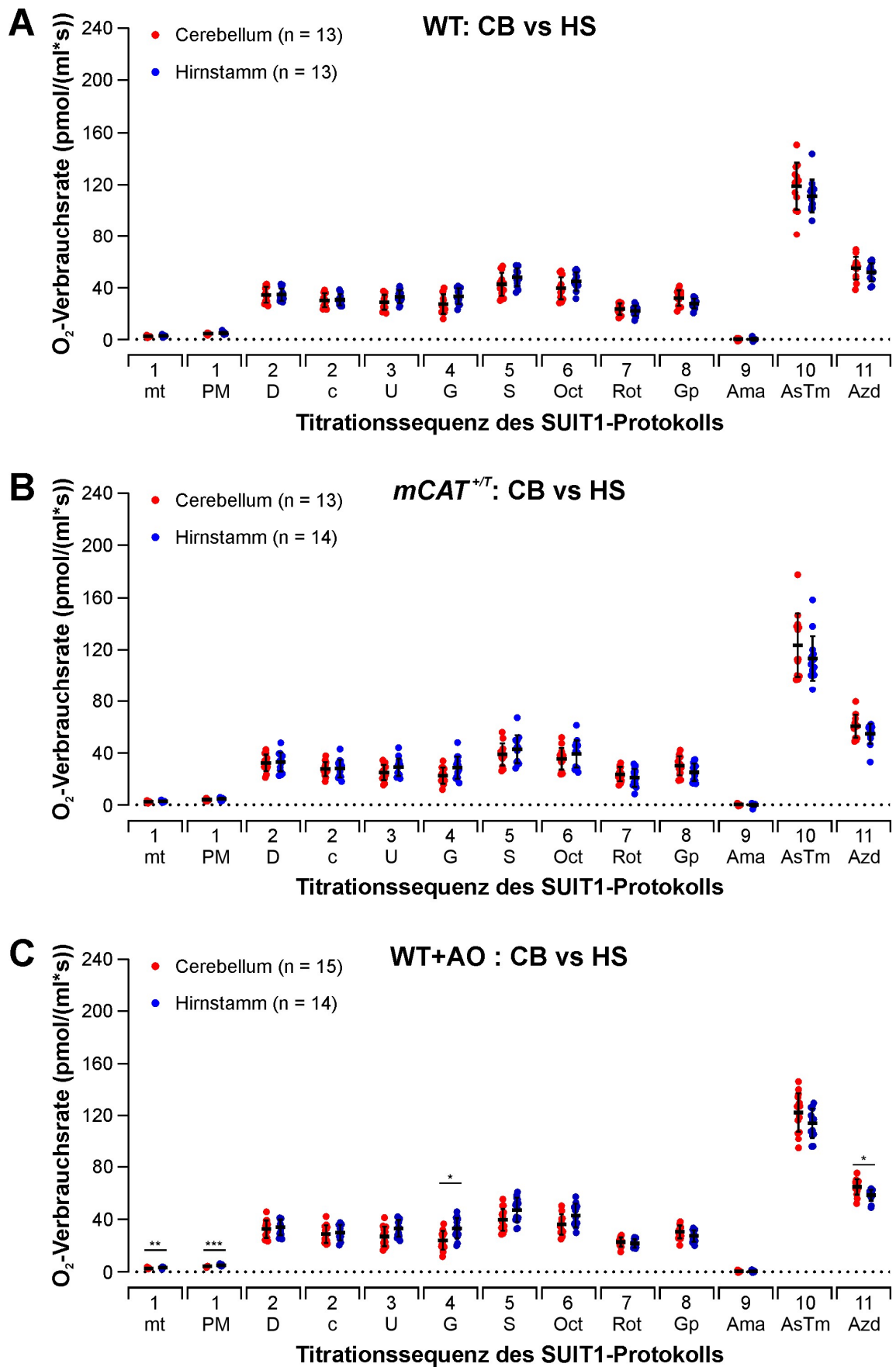


Abbildung 22: Vergleich der mitochondrialen Sauerstoffverbrauchsrate verschiedener Hirnregionen. (A-C) Dargestellt ist die Sauerstoffverbrauchsrate von Mitochondrien aus Wildtyp (A), *mCAT*^{+/T} (B) und

WT+AO (C) über die Stadien des Oroboros-Protokolls hinweg. Miteinander verglichen werden hierbei die Hirnregionen Cerebellum (rot) und Hirnstamm (blau). Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. Die Daten stellen die kalibrierten sowie Hintergrund-korrigierten Sauerstoffverbrauchsdaten dar. Das dargestellte Volumen von einem Milliliter enthält 15 μg untersuchter Proteinmenge. Die statistische Testung erfolgte durch einen *two-way* ANOVA mit *Holm-Sidak's post-hoc*-Test. (A): Es konnten keine Signifikanzen festgestellt werden. (B): Es konnten keine Signifikanzen festgestellt werden. (C): $p = 0,002$ für 1mt, $p = 0,0003$ für 1PM, $p = 0,036$ für 4G, $p = 0,029$ für 11Azd. Signifikanzen sind wie folgt dargestellt: * für $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ und *** $p \leq 0,001$.

In Abbildung 23 ist die normierte FCR (bc)-Darstellung der Daten zu sehen. Dadurch, dass der O_2 -Verbrauch der cerebellären Mitochondrien in den kalibrierten und Hintergrund-korrigierten Sauerstoffverbrauchsdaten des Stadiums 5S niedriger als im Hirnstamm war, führt die Normierung auf dieses Stadium zum relativen Anstieg der cerebellären O_2 -Verbrauchsdaten. Hierdurch ergeben sich folgende neue Unterschiede:

In allen 3 Gruppen ist der O_2 -Verbrauch im Cerebellum nun in einigen Atmungsstadien signifikant höher als im Hirnstamm (vgl. Abbildung 23). Vor allem ist dieser Unterschied in den Stadien 7Rot und 8Gp zu beobachten. In Relation zum Stadium 4G, in welchem kein Unterschied (WT, *mCAT^{+/+}*) oder gar ein höherer O_2 -Verbrauch im Hirnstamm (WT+AO) ist, würde dies bedeuten: Bei maximaler Speisung des CI (Stadium 4G) zeigen cerebelläre Mitochondrien keinen gesteigerten O_2 -Verbrauch, jedoch wird dieser durch die Hemmung des CI und alleiniger Speisung von CII-III (Stadium 7Rot) erreicht. Diese Beobachtungen ergeben sich jedoch nur durch die Darstellung der FCR (bc)-Auswertung und sind nicht in den lediglich kalibrierten und Hintergrund-korrigierten Sauerstoffverbrauchsdaten sichtbar.

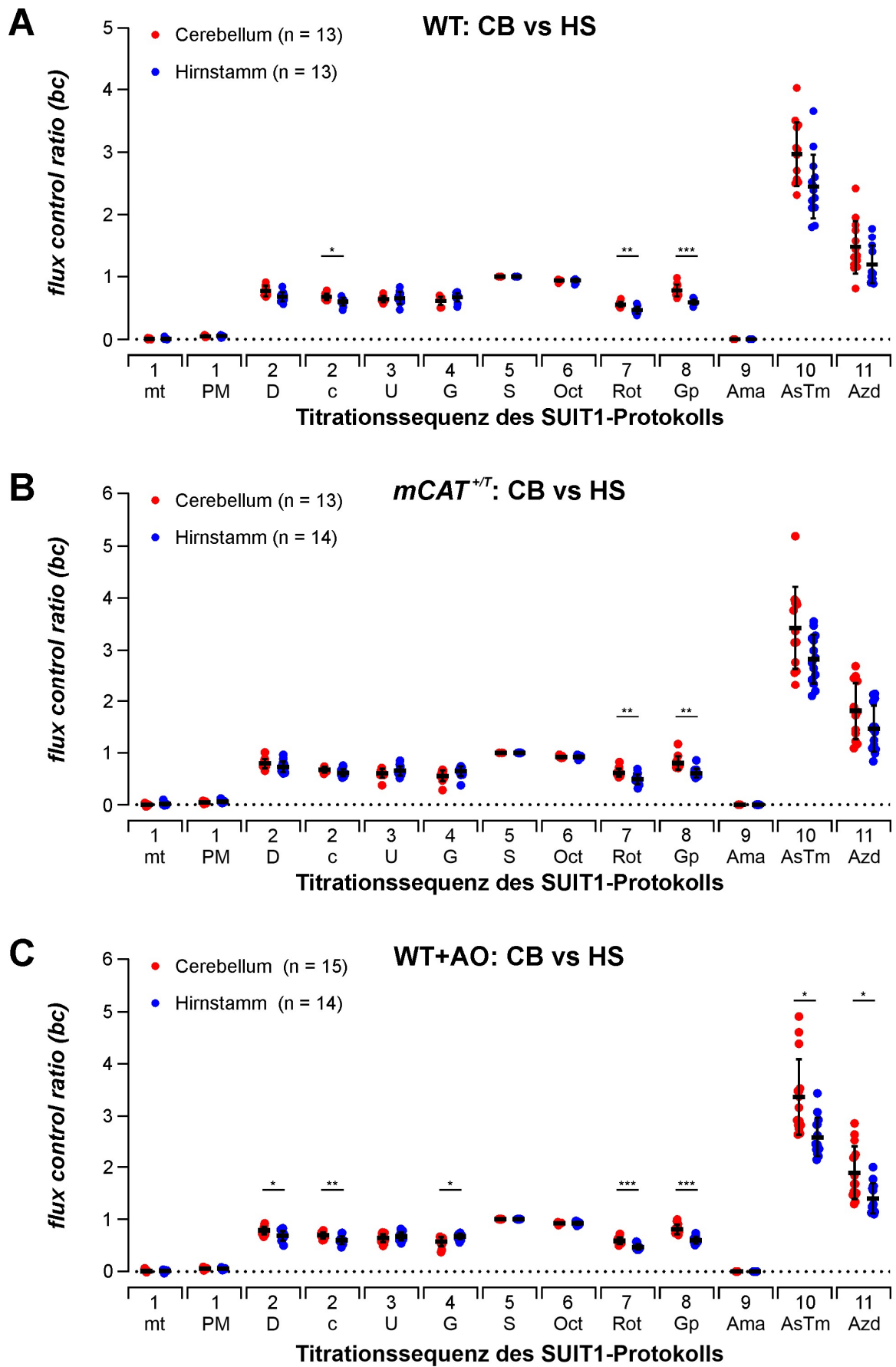


Abbildung 23: Vergleich der normierten mitochondrialen Sauerstoffverbrauchsrate (FCR(bc)) verschiedener Hirnregionen. (A-C) Dargestellt ist die normierte Sauerstoffverbrauchsrate von

Mitochondrien aus Wildtyp (A), *mCAT*^{+/-T} (B) und WT+AO (C) über die Stadien des Oroboros-Protokolls hinweg. Miteinander verglichen werden hierbei die Hirnregionen Cerebellum (rot) und Hirnstamm (blau). Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar. Die Werte des Sauerstoffverbrauchs sind als *flux control ratio (baseline corrected)* auf die Stadien 5S (Succinat; = 1) und 9Ama (Antimycin A; = 0) normiert. Das dargestellte Volumen von einem Milliliter enthält 15 µg untersuchter Proteinmenge. Die statistische Testung erfolgte durch einen *two-way* ANOVA mit *Holm-Sidak's post-hoc*-Test. (A): p = 0,021 für 2c, p = 0,001 für 7Rot, p = 0,0002 für 8Gp. (B): p = 0,031 für 7Rot, p = 0,002 für 8Gp. (C): p = 0,037 für 2D, p = 0,009 für 2c, p = 0,011 für 4G, p < 0,0001 für 7Rot und 8Gp, p = 0,02 für 10AsTm, p = 0,047 für 11Azd. Signifikanzen sind wie folgt dargestellt: * für p ≤ 0,05, ** p ≤ 0,01 und *** p ≤ 0,001.

Es lässt sich zusammenfassen, dass auch für den Vergleich der Hirnregionen innerhalb der Mausgruppen WT, *mCAT*^{+/-T} und WT+AO keine bedeutsamen Unterschiede im O₂-Verbrauch der Sauerstoffverbrauchsraten (kalibriert sowie Hintergrund-korrigiert) festgestellt werden konnten. Eventuelle signifikante Unterschiede ließen sich durch Normierung auf 5S erreichen: Vor allem unter Hemmung des CI zeigt sich ein erhöhter O₂-Verbrauch im Cerebellum im Vergleich zum Hirnstamm. Diese Signifikanzen sind jedoch kritisch zu betrachten: Die O₂-Verbrauchsraten werden durch Normierung auf das Stadium 5S aneinander angeglichen, obwohl Mitochondrien unterschiedlicher Regionen zugrunde liegen, die diesen potenziell physiologischen Unterschied hervorrufen. Dies könnte zur künstlichen Verzerrung der Messpunkte anderer Stadien führen, was die Entwicklungen dortiger Signifikanzen nach sich zieht.

3.4.2 Mausgruppen *Mecp2*^{-/-y}, *Mecp2*^{-/-y} + *mCAT*^{+/-T}, *Mecp2*^{-/-y} + AO

Die Sauerstoffverbrauchsraten (kalibriert sowie Hintergrund-korrigiert) des O₂-Verbrauchs für die Mausgruppen *Mecp2*^{-/-y}, *Mecp2*^{-/-y} + *mCAT*^{+/-T} und *Mecp2*^{-/-y} + AO sind in Abbildung 24 ersichtlich. Bei Auswertung dieser Daten ist zusammenzufassen, dass in allen drei Mausgruppen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Hirnregionen in sämtlichen Atmungsstadien des Protokolls gefunden werden konnten.

Dies zeigt, dass auch unter Ausschaltung des *MECP2*-Gens der Einsatz von AO-Futter oder der mitochondrialen Katalase *mCAT* keinen isolierten Einfluss auf den O₂-Verbrauch einer der beiden Hirnregionen hat.

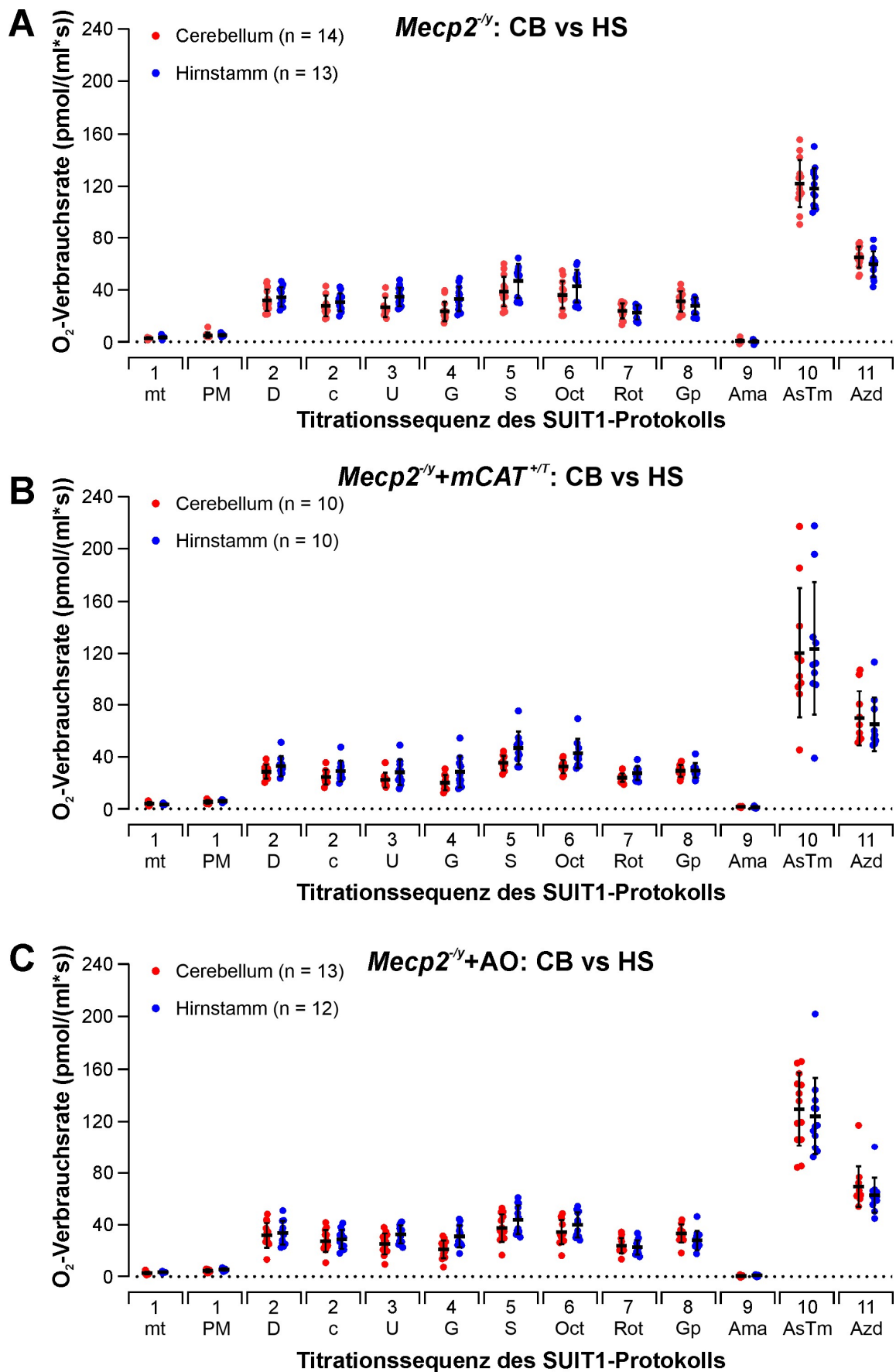


Abbildung 24: Vergleich der mitochondrialen Sauerstoffverbrauchsrate verschiedener Hirnregionen. (A-C) Dargestellt ist die Sauerstoffverbrauchsrate von Mitochondrien aus $Mecp2^{-/y}$ (A), $Mecp2^{-/y} + mCAT^{+/T}$ (B)

und *Mecp2^{-/-}*+AO (C) über die Stadien des Oroboros-Protokolls hinweg. Miteinander verglichen werden hierbei die Hirnregionen Cerebellum (rot) und Hirnstamm (blau). Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung. Die Daten stellen die kalibrierten sowie Hintergrund-korrigierten Sauerstoffverbrauchsraten dar. Das dargestellte Volumen von einem Milliliter enthält 15 μ g untersuchter Proteinmenge. Die statistische Testung erfolgte durch einen *two-way* ANOVA mit *Holm-Sidak's post-hoc*-Test. (A-C): Es konnten keine Signifikanzen festgestellt werden.

Bei Betrachtung der FCR (bc)-Werte ist hierbei dasselbe Phänomen wie zuvor sichtbar. Durch Normierung auf das Stadium 5S werden die O₂-Verbrauchswerte des Cerebellums relativ zu denen des Hirnstammes angehoben.

Hierdurch zeigen sich, analog zu den oben dargestellten WT-/ *mCAT^{+/+}*-/WT+AO-Gruppen, signifikant erhöhte O₂-Verbrauchsraten der cerebellären Mitochondrien vor allem in den Stadien 7Rot und 8Gp, während sie im ungehemmten Stadium 4G niedriger ausfallen.

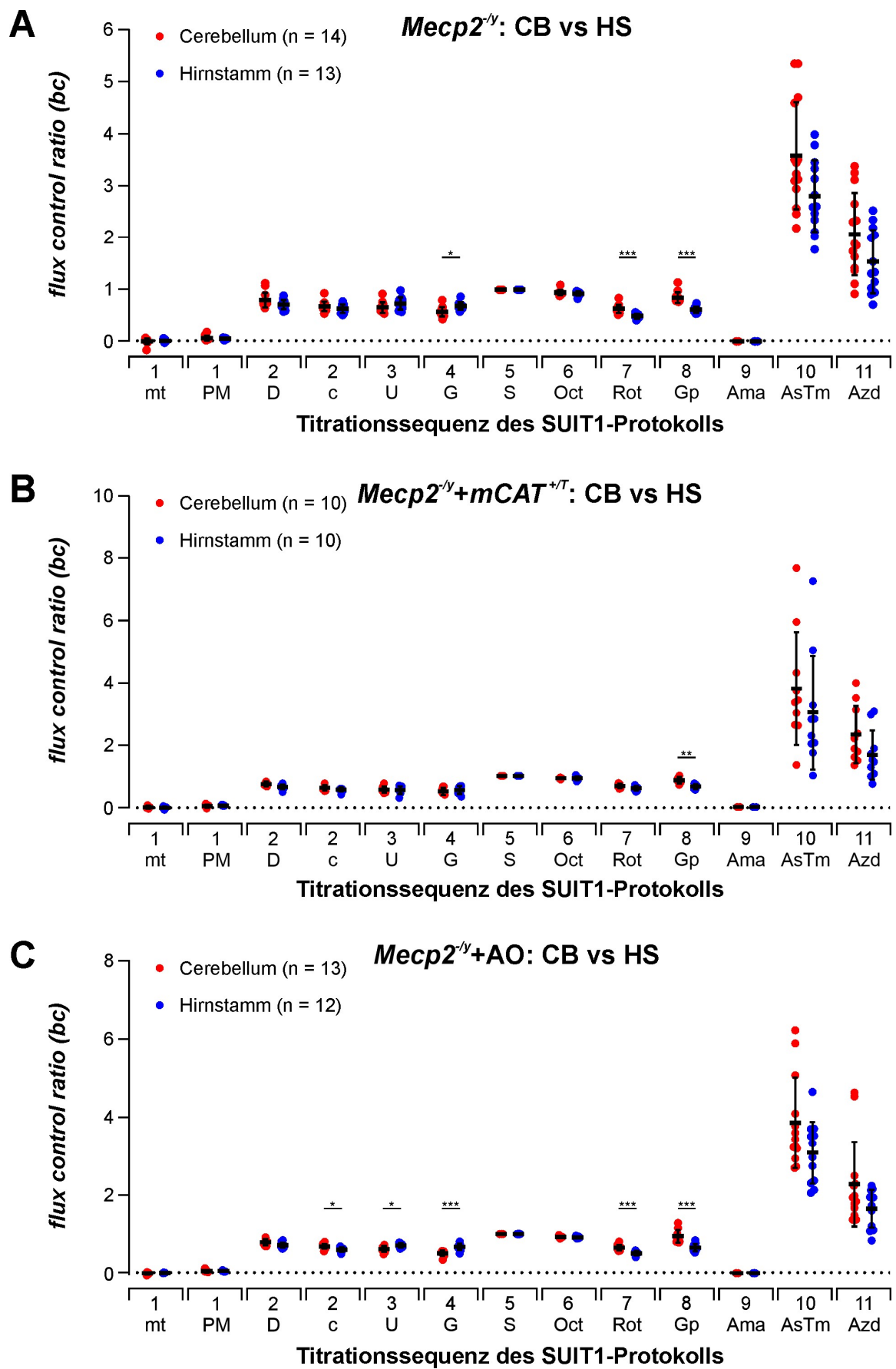


Abbildung 25: Vergleich der normierten mitochondrialen Sauerstoffverbrauchsrate (FCR(bc)) verschiedener Hirnregionen. (A-C) Dargestellt ist die normierte Sauerstoffverbrauchsrate von

Mitochondrien aus *Mecp2^{-/y}* (A), *mecp2⁺ mCAT^{+/T}* (B) und *Mecp2^{-/y}+AO* (C) über die Stadien des Oroboros-Protokolls hinweg. Miteinander verglichen werden hierbei die Hirnregionen Cerebellum (rot) und Hirnstamm (blau). Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar. Die Werte des Sauerstoffverbrauchs sind als *flux control ratio (baseline corrected)* auf die Stadien 5S (Succinat; = 1) normiert und das Stadium 9Ama (Antimycin A; = 0) subtrahiert. Das dargestellte Volumen von einem Milliliter enthält 15 µg untersuchter Proteinmenge. Die statistische Testung erfolgte durch einen *two-way* ANOVA mit *Holm-Sidak's post-hoc*-Test. (A): $p = 0,018$ für 4G, $p = 0,0002$ für 7Rot, $p < 0,0001$ für 8Gp. (B): $p = 0,002$ für 8Gp. (C): $p = 0,025$ für 2c, $p = 0,03$ für 3U, $p = 0,0001$ für 4G, $p < 0,0001$ für 7Rot, $p = 0,0002$ für 8Gp. Signifikanzen sind wie folgt dargestellt: * für $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ und *** $p \leq 0,001$.

Beim Vergleich des O₂-Verbrauchs innerhalb der *Mecp2^{-/y}-/ Mecp2^{-/y}+ mCAT^{+/T}-/ Mecp2^{-/y}+AO*-Mausgruppen lässt sich Folgendes zusammenfassen: Bei Betracht der Sauerstoffverbrauchsraten (kalibriert sowie Hintergrund-korrigiert) lässt sich bei keiner Mausgruppe ein Unterschied in einem der Atmungsstadien feststellen. Dies bedeutet, dass weder bei vorliegendem Knockout des *MECP2*-Gens selbst noch bei dem zusätzlichen Einsatz der mitochondrialen Katalase oder von AO-Futter eine vornehmliche Wirkung auf eine der beiden Hirnareale Cerebellum oder Hirnstamm nachgewiesen werden konnte.

4 Diskussion

Mitochondrien sind als ein wichtiges Organell der Zelle an einer Vielzahl von Abläufen beteiligt. Dazu zählen die Energiegewinnung des Organismus, die Aufrechterhaltung von Signalübertragungen durch die Stabilisierung der Kalzium-Konzentration sowie die Steuerung der Apoptose. Darüber hinaus nehmen sie Einfluss auf die Aufrechterhaltung eines physiologischen Redox-Gleichgewichts. Störungen der Mitochondrien und damit einhergehender Fehlfunktion dieser Aufgaben können die Ursache für viele Krankheiten sein, unter anderem auch des Rett-Syndroms. Beim Rett-Syndrom konnten einerseits morphologische Veränderungen wie vergrößerte Ausdehnung und Vakuolisierung gezeigt werden (Eeg-Olofsson et al. 1990; Ruch et al. 1989), andererseits auch biochemische Veränderungen detektiert werden (Dotti et al. 1993; Müller und Can 2014): Mitochondrien stellen eine wesentliche Quelle der zellulären ROS-Entstehung dar (Chance et al. 1979), was die Vermutung unterstützt, dass die im Rett-Syndrom sichtbare mitochondriale Dysfunktion an der zellulären und systemischen Verschiebung der Redox-Balance der Erkrankung beteiligt ist (De Felice et al. 2009; Großer et al. 2012; Pecorelli et al. 2011). Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit der mitochondriale O₂-Verbrauch als potenzielles Qualitätskriterium der Mitochondrien im Rett-Mausmodell (*Mecp2^{-/-}*) und in Wildtyp-Mäusen untersucht. Zusätzlich wurde beide Mausmodelle mit der Gabe durch Antioxidantienfutter und unter Expression einer mitochondrialen Katalase untersucht, welche zum Schutz übermäßiger ROS-Produktion beitragen und somit der Fehlfunktion der Rett-Mitochondrien entgegenwirken könnten.

4.1 Validität der genutzten Methoden

4.1.1 Validierung der Qualität isolierter Mitochondrien

Um zu beweisen, dass das genutzte Protokoll zuverlässig die Isolation von Mitochondrien aus dem jeweiligen Hirngewebe gewährleistet, wurden derartig gewonnene Proben durch einen Western Blot analysiert (siehe Abbildung 17). Es konnte dabei nachgewiesen werden, dass keine reine Mitochondriensuspension untersucht werden konnte, da sich neben mitochondrialen Proteinen (COX6a) auch Proteine anderer Organellen (Cytosol, ER, Peroxisomen) im zentrifugierten Pellet befanden. Den deutlich größten Anteil an der untersuchten Probe hatten jedoch die mitochondrialen Proteine: Nach densitometrischer Analyse und Normierung auf den cytosolischen Marker GAPDH war die Dichte der mitochondrialen Proteinmarker signifikant am höchsten. Dies zeigt, dass die untersuchten Proben zwar nicht hochreine Mitochondriensuspensionen sind, aber andere Organellen durch die 3 Zentrifugationsschritte zum größten Teil eliminiert werden konnten und mehrheitlich mitochondriale Proteine in den O₂-Verbrauchsmessungen untersucht worden sind. Daher wurde für die Experimente in dieser Arbeit eine Mitochondrien-angereicherte Suspension verwendet.

Zwar stehen andere Isolationsmethoden zur Verfügung, welche die Reinheit der Mitochondriensuspensionen weiter erhöhen können, jedoch ebenfalls Nachteile mit sich bringen: Beispielsweise kann die Aufreinigung von Mitochondrien mittels Zentrifugation über einen Sucrose-Gradienten erfolgen (Clark und Nicklas 1970), jedoch führte die lange Dauer des Isolationsverfahrens sowie dessen hypertone Umgebung zur Beeinträchtigung der mitochondrialen Aktivität und Validität. Dies erschwert die korrekte Untersuchung von physiologischen Funktionsparametern der isolierten Mitochondrien. Alternativ wurde auch die Isolation von Mitochondrien durch eine Percoll-Gradienten-Zentrifugation beschrieben, nach welcher die Aktivität der Mitochondrien für ca. zwei Stunden erhalten bleibt (Kristian 2010; Sims 1990). Im Rahmen meiner Experimente war es jedoch essenziell, ein möglichst schonendes Protokoll zu nutzen, welches auch bis zu vier Stunden nach Isolation metabolisch intakte Mitochondrien erzeugen kann. Darüber hinaus sollte das Protokoll möglichst zeiteffizient sein, da durch Analyse von sechs Mausgruppen in zwei Hirnregionen eine sehr hohe Anzahl an Tieren großer Stichprobenmenge und entsprechend hohem Zeitaufwand analysiert werden musste. Dies konnte durch Nutzung des in Kapitel 2.2 beschriebenen Isolationsprotokolls unter Inkaufnahme von geringfügigen Abstrichen der Probenreinheit erreicht werden.

4.1.2 Validierung der Messung des mitochondrialen O₂-Verbrauchs

Um davon ausgehen zu können, dass die Messungen nach dem SUIIT 1-Protokoll erfolgreich durchgeführt wurden, sollte der Anstieg oder Abfall des O₂-Verbrauchs wie zu erwarten auf die Zugabe der einzelnen Substrate oder Hemmstoffe für Mitochondrien reagieren. Ist der in der Kammer gemessene O₂-Verbrauch wirklich auf die dort befindlichen Mitochondrien zurückzuführen, muss der O₂-Verbrauch (zumindest der Wildtyp-Tiere) bei Zugabe von Substraten wie ADP oder auch Succinat steigen bzw. nach Zugabe von Hemmstoffen wie Rotenon und Antimycin A fallen. Im Folgenden ist eine exemplarischen Messspur des Herstellers Oroboros Instruments zu sehen, welche mit Messspuren aus in unserem Labor durchgeführten Experimenten verglichen werden kann (s. Abbildung 10: Ausschnitt aus einer Beispielmessung vom Cerebellum eines Wildtyp Männchens im Alter von 50 Tagen einer Messkammer.). Das Übereinstimmen des O₂-Verbrauchs während der einzelnen Stadien legt den mitochondrialen Ursprung der gemessenen Veränderungen nahe:

Darüber hinaus kann der mitochondriale Ursprung des gemessenen O₂-Verbrauchs durch Applikation von Antimycin A bewiesen werden, welches Teil des SUIIT 1-Protokolls ist. Da zu diesem Zeitpunkt nur Substrate zur Speisung der Komplexe CI-III vorliegen, sollte durch Hemmung des CIII mittels Antimycin A der gemessene O₂-Verbrauch auf ein Minimum absinken. Wie in Abbildung 18 beispielsweise sichtbar, liegt der in diesem Stadium gemessene O₂-Verbrauch nahezu bei 0.

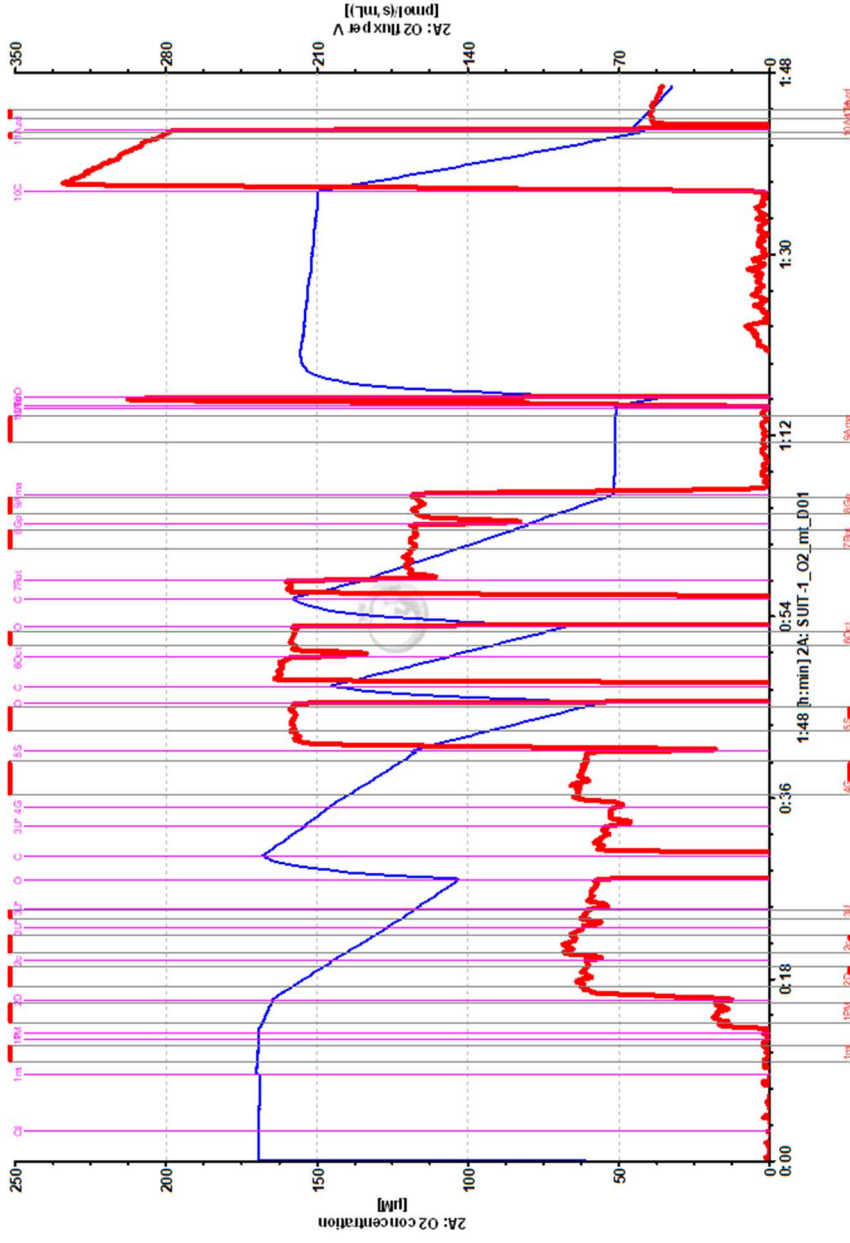


Abbildung 26: Beispielmesskurve von der Firma Oroboros. Gezeigt ist der von Oroboros-Instrumenten zur Verfügung gestellte beispielhafte Verlauf des Sauerstoffverbrauchs während der Untersuchung isolierter Mitochondrien unter Zuhilfenahme des SUIT 1-Protokolls. Die magentafarbenen senkrechten Striche markieren den Zeitpunkt der Zugabe der jeweiligen Substanz, begonnen mit der Zugabe der Mitochondrien (1mt). Die blaue Kurve stellt den Sauerstoffgehalt innerhalb der Messkammer dar, die rote Kurve ist die Ableitung der blauen Kurve und symbolisiert somit den jeweiligen Sauerstoffverbrauch. Die senkrechten grauen Striche zeigen die Markierungen zur Auswertung der Messdaten, welche in dieser Abbildung vernachlässigt werden können (Oroboros 2019). Siehe zum Vergleich einer in dieser Arbeit generierten Originalspur Abbildung 10. Verwendung der Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Erich Gnaiger, Oroboros Instruments, vom 01.12.2022.

Dies bestätigt zweifelsfrei, dass, neben den Mitochondrien, keine weitere nennenswerte Sauerstoffverbrauchsquelle in der Mitochondriensuspension enthalten ist. Die Differenzen zu 0 stellen dementsprechend den Hintergrundverbrauch dar und wurden auch im Rahmen der FCR (bc)-Daten ebenfalls von den gemessenen Werten abgezogen.

Ein weiteres wichtiges Qualitätskriterium lässt sich im Stadium 2c, das heißt, Zugabe von Cytochrom c, ablesen. Bei diesem Stadium wurde die Intaktheit der äußeren Mitochondrienmembran überprüft und stellt ein essenzielles Integritätskriterium dar. Sollte die äußere Membran der Mitochondrien durchlässig sein, wären die erhobenen Daten nicht aussagekräftig. Die Intaktheit kann über die Zugabe von Cytochrom c geprüft werden: Sollte die äußere Membran durchlässig sein, könnte Cytochrom c in den Intermembranraum diffundieren und direkt den CIV speisen. Hierdurch würde ein starker Anstieg des O₂-Verbrauchs sichtbar werden. Die Tatsache, dass dieses Phänomen in meinen Experimenten nie beobachtet werden konnte, spricht für die Güte der verwendeten Mitochondrien und bestätigt somit die schonenden Eigenschaften des verwendeten Isolationsprotokolls.

Des Weiteren ist anhand der phänotypischen Merkmale erkennbar, dass es sich bei den verwendeten Mausproben um Wiltyp sowie *Mecp2*^{-/-}- Mäuse handelt, da das Gewicht, die Körperlänge, die Blutglukose sowie der Hämatokrit zwischen diesen Gruppen unterschiedlich waren. Eine wichtige Beobachtung hierbei ist zudem, dass, sowohl innerhalb der WT- als auch in der *Mecp2*^{-/-}- Gruppen die zusätzliche Katalase sowie das AO-Futter keine negativen Effekte auf die vier genannten Parameter haben.

4.2 O₂-Verbrauch in Mitochondrien des Rett-Syndroms

Veränderungen im O₂-Verbrauch isolierter Mitochondrien aus Tieren des Rett-Mausmodells wurden bereits von anderen Arbeitsgruppen beschrieben (De Filippis et al. 2015; Kriaucionis et al. 2006). Ziel dieser Arbeit war es, zu untersuchen, inwiefern derartige Veränderungen speziell in Mitochondrien des Cerebellums und des Hirnstammes auftreten. Darüber hinaus sollte analysiert werden, ob solche Veränderungen durch die Gabe von AO-Futter oder der Expression einer mitochondrialen Katalase - beides Methoden, um einer erhöhten mitochondrialen ROS-Produktion entgegenzuwirken - potenziell reversibel sind.

Bereits im Jahr 2006 wurden von Kriaucionis et al. die O₂-Verbrauchsraten durch polarografische O₂-Elektroden in isolierten Mitochondrien des Gesamthirns von *Mecp2*^{-/-}-Mäusen gemessen. In diesen Messungen konnte ein erhöhter O₂-Verbrauch in allen Atmungsstadien gezeigt werden (Kriaucionis et al. 2006). Ebenso wurde beschrieben, dass der O₂-Verbrauch in *Mecp2*^{-/-}-Mikroglia-Zellen erhöht ist (Jin et al. 2015). Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, dass auch in weiblichen Rett-Mäusen (MeCP2-308) erhöhte O₂-Verbrauchsraten in, aus Gesamthirn isolierten, Mitochondrien zu beobachten sind, wenn diese mittels Substraten für CII (z.B. Succinat) gespeist wurden (De Filippis et al. 2015; Valenti et al. 2017). Darüber hinaus finden sich auch gegensätzliche Daten in der Literatur:

So wurde etwa auch beschrieben, dass von Stammzellen abgeleitete, *MECP2* mutierte menschliche Neurone eine verringerte basale O₂-Verbrauchsrate aufzeigen (Li et al. 2013). Bei der Erhebung dieser Daten wurde jedoch auf die Zellzahl und nicht wie üblich auf die Proteinmenge normiert, weshalb diese Ergebnisse auch nicht direkt mit denen meiner Arbeit vergleichbar sind.

Aktuell wird vermutet, dass der erhöhte O₂-Verbrauch größtenteils der mitochondrialen ROS-Produktion im CI entstammt, wobei dies besonders stark bei Speisung des CII mittels Succinat und reversem Flux der Elektronen von CII zu CI zu beobachten ist (Votyakova und Reynolds 2001). Dieses Phänomen würde ebenfalls erklären, warum die Redox-Balance in Rett-Mäusen zum Oxidativen hin verschoben ist.

Eine weitere wichtige Grundlage für die Durchführung meiner Doktorarbeit sind von meiner Arbeitsgruppe publizierte Ergebnisse (Can et al. 2019): In dieser Arbeit wurden ebenfalls die mitochondrialen O₂-Verbrauchsdaten unter verschiedenen Bedingungen gemessen, jedoch optisch mit Hilfe des *Seahorse XF96* der Firma Seahorse Bioscience. Unter anderem wurde dabei der CI mittels Malat und Pyruvat gespeist und der O₂-Verbrauch unter Zugabe von ADP sowie anschließend dem Entkoppler FCCP gemessen. Weder in isolierten Mitochondrien des Herzens noch denen des Cortex oder Hippocampus konnten in dieser Konstellation Unterschiede zwischen *Mecp2*^{-/-} und Wildtyp-Mäusen festgestellt werden. Wurden die isolierten Mitochondrien jedoch ausschließlich mit Succinat und damit über CII gespeist, konnte ein deutlich erhöhter O₂-Verbrauch in *Mecp2*^{-/-}-Mitochondrien des Cortex und Hippocampus im Vergleich zur WT-Gruppe mit Hilfe des *Seahorse*-Respirometers festgestellt werden. Wurde hingegen zusätzlich der CI-Inhibitor Rotenon appliziert, war dieser Unterschied nicht mehr sichtbar. Dieses Phänomen reiht sich damit in die oben beschriebene Hypothese ein: Durch Speisung des CII kommt es zur Elektronen Reflux zum CI, in welchem es zur gesteigerten ROS-Produktion in *Mecp2*^{-/-}-Mäusen kommt. Mit Verschiebung des Redox-Potenzials geht eine mitochondriale Dysfunktion einher, welche als sog. „*energy wasting state*“ beschrieben werden kann und durch einen erhöhten O₂-Verbrauch bei gleichzeitig erniedrigter ATP-Bildung charakterisiert ist (Can et al. 2019).

Die oben beschriebenen Phänomene des Kortex und des Hippocampus konnte ich durch die in meiner Arbeit durchgeführten Experimente am Hirnstamm und Cerebellum dabei nur sehr begrenzt reproduzieren:

Wie in Abbildung 18 und Abbildung 20 sichtbar, ließen sich zwar im Stadium 2D (Speisung von CI) keine Unterschiede im O₂-Verbrauch zwischen WT und *Mecp2*^{-/-} feststellen, was mit den oben genannten, zuvor von unserer Arbeitsgruppe publizierten Daten in Einklang steht. Jedoch konnte ich in meinen Untersuchungen den gesteigerten O₂-Verbrauch der *Mecp2*^{-/-}-Mitochondrien bei primärer Speisung des CII durch Succinat in den von mir untersuchten Hirnregionen nicht beobachten. Dies entspricht innerhalb des von mir verwendeten SUIT 1-Protokolls am ehesten dem Stadium 5S, in welchem keine Signifikanzen sichtbar werden.

Jedoch muss auch angemerkt werden, dass in diesem Stadium zwar CII direkt gespeist wird, aber durch das angewendete SUIT 1-Protokoll bedingt bereits zusätzlich Substrate zur Speisung des CI vorliegen. Dies stellt einen Unterschied zum oben genannten Messverfahren dar, mithilfe dessen unsere Arbeitsgruppe den erhöhten O₂-Verbrauch unter reiner Succinat-Gabe im Cortex und Hippocampus gemessen hatte. Weiterhin habe ich ein neues Respirometer der Firma Oroboros verwendet, wohingegen die zuvor erhobenen Daten mit dem *Seahorse*-Respirometer erhoben wurden, welches den Sauerstoffgehalt optisch und nicht, wie in meinen Messungen, polarografisch erfasst. Bei korrekter Durchführung der Experimente sollte dies -zumindest bei exakt gleichen Versuchsprotokollen- jedoch eigentlich keinen signifikanten Einfluss auf den gemessenen O₂-Verbrauch haben.

Ein weiterer Grund, warum ich keine Unterschiede zwischen den Gruppen im Stadium 5S feststellen konnte, könnte die Herkunft der isolierten Mitochondrien sein. Der erhöhte O₂-Verbrauch durch vorherige Arbeiten (Can et al. 2019) ist in Mitochondrien des Cortex und des Hippocampus festgestellt wurden. Möglicherweise ist die Aktivität des MeCP2-Transkriptionsfaktors in diesen Regionen von besonderer Bedeutung und führt bei Abwesenheit zur Ausprägung metabolischer Funktionsänderungen der dortigen Mitochondrien. Es ist nicht auszuschließen, dass MeCP2 in den von mir untersuchten Regionen Cerebellum und Hirnstamm eine untergeordnetere Rolle spielt und ein erhöhter O₂-Verbrauch in der Folge nicht messbar oder so schwach ausgeprägt ist, dass die untersuchte Stichprobengröße nicht zur Offenlegung des Unterschieds ausgereicht hat. Auch dürfte sich zweifelsfrei der metabolische Bedarf der verschiedenen Hirnregionen klar unterscheiden. Darüber ist es durch die Methodik nicht vollends möglich, die sich real abspielenden Verhältnisse des Rett-Syndroms vollständig abzubilden: Während den hier isolierten Mitochondrien die Substrate im Überfluss zugegeben werden, sind diese in intakten Zellen bzw. Gewebe ggf. limitiert bzw. können von der Zelle nicht in adäquater Menge bereit gestellt werden. Dies wäre nur in intakten Zellen messbar, was bei adultem Hirngewebe nicht ohne Weiteres zu realisieren ist.

Darüber hinaus ist, wie oben beschrieben, gezeigt worden, dass auch die ATP-Produktion in *Mecp2*^{-/-}-Mitochondrien niedrig ist. Die Aktivität der Atmungskette korreliert dabei in der Regel mit dem ADP/ATP-Umsatz der ATP-Synthase. Dieser Umsatz ist jedoch eine Variable, die in unseren Experimenten nicht kontrolliert worden ist. Es bietet sich daher in Zukunft an, die Experimente unter gleichzeitiger Messung des ADP/ATP-Umsatzes zu wiederholen und auf diesen zu normieren. Hierdurch könnten weitere Unterschiede zwischen den Mausgruppen potenziell sichtbar werden. Auch bleibt zu bedenken, dass methodisch bedingt nur Mitochondrien-angereicherte Suspensionen verwendet wurden. Die durchgeführte Proteinbestimmung liefert den Gesamtprotein-Gehalt und nicht die reine Menge an Mitochondrien. Daher ist nicht auszuschließen, dass der relative Anteil an Mitochondrien zwischen den unterschiedlichen Hirnregionen variiert haben könnte.

Eine zusätzliche Beobachtung, die auch von Can und Kollegen gezeigt worden ist (Can et al. 2019), war ebenfalls in meinen Experimenten sichtbar: In allen sechs Mausgruppen führte die Entkopplung der Atmungskette durch CCCP zu keiner weiteren Steigerung der O₂-Verbrauchsrate. Die erfolgreiche Reproduktion dieser Daten zeigt, dass die maximale Umsatzgeschwindigkeit bzw. die Aktivität der Atmungskette in den untersuchten Mitochondrien nicht durch die native Geschwindigkeit der nachgeschalteten ATP-Synthase limitiert ist.

Letztlich bestand ein wichtiges Ziel meiner Arbeit darin, zu untersuchen, ob und inwiefern die Unterschiede im O₂-Verbrauch zwischen *Mecp2*^{-/-}- und WT-Mitochondrien durch Gabe von AO-Futter oder die Expression von *mCAT* reversibel sein könnten. Von derartigen Unterschieden war zu Beginn des Projekts aufgrund der zuvor publizierten Daten unserer Arbeitsgruppe auszugehen (Can et al. 2019) – zumindest bei direkter Speisung des CII mittels Succinat. Wie oben beschrieben konnte ein derartiger Unterschied in den hier untersuchten Mitochondrien aus Cerebellum und Hirnstamm nicht gefunden werden. Dennoch war es von Interesse zu schauen, ob die zusätzliche Nutzung von *mCAT* oder von AO-Futter bei WT- und *Mecp2*^{-/-}-Tieren einen Effekt erzielte. Wie in Abbildung 18 und Abbildung 20 gezeigt, hat sich weder der O₂-Verbrauch der *mCAT*^{+/-}/WT+AO-Gruppen von dem der reinen WT-Gruppe unterschieden noch konnten signifikante Unterschiede zwischen den *Mecp2*^{-/-}+ *mCAT*^{+/-}/ *Mecp2*^{-/-}+AO-Gruppen und der reinen *Mecp2*^{-/-}-Gruppe festgestellt werden. Dies ist ein Hinweis dafür, dass die Aufnahme von Antioxidantien oder der Expression von *mCAT* zwar zum Abbau von mitochondrialen ROS führen kann, dieser jedoch nicht zwangsläufig eine Verbesserung oder Änderung der Effizienz der Atmungskette in WT- und *Mecp2*^{-/-}-Mäusen nach sich zieht, was an einem unveränderten O₂-Verbrauch sichtbar ist. Es bleibt daher fraglich, ob die Verwendung eines solchen Therapieansatzes zur klinischen Besserung des Rett-Syndroms führen wird, sofern die gezeigten Symptome auch wirklich durch den beschriebenen *energy wasting state* der Mitochondrien verursacht werden.

Um hingegen feststellen zu können, ob AO-Futter oder *mCAT*-Expression als Therapieansätze im Rett-Syndrom wirksam sein könnten, muss zumindest ein Unterschied im Sauerstoffverbrauch zwischen Wildtyp- und *Mecp2*^{-/-}-Mäusen vorliegen. Erst dann könnte präzise untersucht werden, inwiefern eine solche Intervention den O₂-Verbrauch auf WT-Level senken könnte. Da diese Voraussetzung in meinen untersuchten Proben nicht gegeben war, ist die Aussagekraft der untersuchten Wirkung von AO-Futter und *mCAT* vergleichsweise gering.

Die von mir erhobenen Daten erlauben darüber hinaus, Aussagen über den O₂-Verbrauch in den verschiedenen Hirnregionen von Cerebellum und Hirnstamm zu treffen. Die Analyse der Sauerstoffverbrauchsraten (kalibriert sowie Hintergrund-korrigiert) zeigt dabei, dass sich der O₂-Verbrauch in Wildtyp-Mäusen zwischen diesen beiden Hirnarealen nicht voneinander unterscheidet. Auch die Applikation von AO-Futter oder der Expression von *mCAT* ließ

keine richtungsweisenden Unterschiede in diesen Tieren sichtbar werden. Auch der Vergleich von Cerebellum und Hirnstamm innerhalb der *Mecp2^{-/-}*-Mausgruppen zeigte keine Veränderungen: Weder beim reinen *Mecp2^{-/-}*-Rett-Mausmodell noch nach dessen Modifikation durch Gabe von AO-Futter oder Expression von *mCAT* verhielten sich die Mitochondrien des einen Hirnareals anders als die der anderen Region.

Es muss dabei erwähnt werden, dass die Darstellung der Sauerstoffverbrauchsdaten als auf das Stadium 5S normierte FCR-Daten teils zu signifikanten Unterschieden führte. Da jedoch in der Literatur gezeigt worden ist, dass in genau diesem Stadium Unterschiede zwischen *Mecp2^{-/-}*- und WT-Mäusen zu erwarten sind, ist eine Angleichung der Datengruppen auf dieses Stadium suboptimal und verzerrt die Messpunkte aller anderen Stadien aufgrund dieses Effektes. Andererseits würde aber eben diese Normierung eventuelle Unterschiede des relativen Mitochondrien-Gehaltes der verwendeten Suspensionen korrigieren.

Es lässt sich zusammenfassen, dass sich die erhobenen Daten aus Experimenten mit Mitochondrien des Cerebellums und des Hirnstammes in sich valide sind, jedoch nur bedingt in den durch die Literatur beschriebenen komplexen und teils auch widersprüchlichen Kontext einbetten lassen. Um zu klären, wodurch diese Unterschiede zustande kommen (verschiedene Hirnregionen, Messprotokolle, etc.), müssen in Zukunft weitere Studien zu diesem Thema durchgeführt werden.

4.3 Ausblick

Während der O₂-Verbrauch der Mitochondrien des Cerebellums und des Hirnstammes in dieser Arbeit in verschiedenen Mausgruppen detailliert untersucht worden ist, bleiben jedoch einige Fragestellungen offen.

Aufgabe künftiger Studien könnte es unter anderem sein, die von mir durchgeführten Experimente mit dem selben Protokoll im Oroboros-Respirometer mit Mitochondrien aus Cortex und Hippocampus zu wiederholen; Hirnregionen, in denen ein Unterschied zwischen Wildtyp- und *Mecp2^{-/-}*-Mäusen bereits vorbeschrieben ist (Can et al. 2019). Sollte auch mit diesen Hirnregionen erneut kein Unterschied feststellbar sein, muss hinterfragt werden, ob das SUIT 1-Protokoll und/oder die respirometrische Sauerstoffmessung von Oroboros für die Untersuchungen unserer Fragestellungen geeignet ist, da zumindest das Isolationsprotokoll der Mitochondrien im wesentlichen Teilen identisch war.

Darüber hinaus ist es in Zukunft von Vorteil, die Experimente durchzuführen und parallel den ADP/ATP-Umsatz zu ermitteln. Auf diesen können dann nachfolgend die O₂-Verbrauchsraten normiert werden. Diese Art der Auswertung stellt dabei sicher, dass die Atmungskette sowie ATP-Synthese über alle Gruppen hinweg gleich schnell arbeiten und dadurch etwaige Unterschiede potenziell erst sichtbar und analysierbar werden. Gleichermaßen können die Experimente um die direkte Messung der H₂O₂-Produktion

erweitert werden, um die gemessenen O₂-Verbrauchsdaten in direkte Korrelation dazu zu setzen. Auch könnte eine exakte Quantifizierung der Mitochondrienmenge vorteilhaft sein, um diesen Unsicherheitsfaktor auszuschließen. Anbieten würde sich hier z.B. die Bestimmung der Citratsynthase-Aktivität als Maß für die tatsächlich vorliegende Mitochondrienmenge in den jeweiligen Proben. Parallel zum O₂-Verbrauch können zusätzlich die mitochondrialen Membranpotenziale zur vollständigen Bewertung der Mitochondrienfunktion gemessen werden.

Ein weiterer Ansatz wäre, in die Messkammer zu Beginn des Experiments Paraquat hinzuzugeben (Castello et al. 2007). Dieses führt zur künstlichen Erzeugung von ROS in Mitochondrien. Diese Konstellation könnte wiederum zu Veränderungen des mitochondrialen O₂-Verbrauchs führen und es kann untersucht werden, ob und inwiefern diese potenziell durch *mCAT*-Expression oder AO-Futter reversibel sind. Ebenfalls wäre interessant zu quantifizieren, ob durch eine gesteigerte, z.B. durch Paraquat induzierte, ROS-Last in den Mitochondrien nun eine Erhöhung des O₂-Verbrauchs des Cerebellums oder Hirnstamms sichtbar wird, welche möglicherweise nicht ohne künstliche ROS-Steigerung feststellbar ist.

Ebenso ist vorstellbar, weitere Mausgruppen zu untersuchen. Beispielsweise könnte eine Mausgruppe sowohl *mCAT* exprimieren als auch gleichzeitig AO-Futter erhalten. Der kombinierte Effekt beider Interventionen ist in der Folge möglicherweise potent genug, um auch einen Einfluss auf den mitochondrialen O₂-Verbrauch von Mäusen mit oder ohne *MECP2*-Knockout zu erreichen. Ein derartiges Mausmodell stand zur Zeit der Durchführung meiner Experimente noch nicht zur Verfügung.

Darüber hinaus können die Experimente auch an weiblichen Mäusen durchgeführt werden. Diese haben einen schwächer ausgeprägten Phänotyp, wodurch ein höheres Lebensalter erreicht werden kann, in welchem Änderungen im mitochondrialen O₂-Verbrauch vor allem feststellbar sein könnten. Ein entscheidender Nachteil ist jedoch, dass diese Versuchstiere gegebenenfalls zyklusabhängigen Veränderungen unterliegen, die die erhobenen Messdaten beeinflussen können. Daher haben wir uns auch im Rahmen dieser Arbeit auf männliche Tiere des Rett-Mausmodells beschränkt.

Letztlich bleibt auch zu klären, warum der in der Literatur beschriebene Elektronen-Reflux von CII zu CI als wichtigste Quelle der mitochondrialen ROS-Produktion gerade in Rett-Mäusen so viel stärker ausgeprägt zu sein scheint. Auch in Wildtyp-Mäusen ist dieser Elektronenfluss sowie die daraus entstehende ROS-Produktion möglich. Die Tatsache, dass der von Can et al. beschriebene erhöhte O₂-Verbrauch unter Succinatgabe nach Hemmung des CI auf demselben Niveau der WT-Gruppe lag, spricht tatsächlich dafür, dass dieser Mechanismus eine zentrale Rolle in der mitochondrialen ROS-Produktion in Rett-Mäusen spielt (Can et al. 2019). Warum genau dies jedoch nur in Rett-Mäusen so stark sichtbar ist und welche molekularen Veränderungen etwaiger Atmungskettenkomplexe daran beteiligt sein könnten, ist bisher ungeklärt.

5 Zusammenfassung

Das Rett-Syndrom ist eine Erkrankung, die häufig durch pathologische Veränderungen des *MECP2*-Gens, einem essenziellen Transkriptionsfaktor, verursacht wird. Sie resultiert in verschiedenen morphologischen sowie biochemischen Veränderungen in Mitochondrien, welche eine Vielzahl von intrazellulären Prozessen, wie beispielsweise ATP- sowie ROS-Produktion oder die Steuerung der Apoptose, beeinflussen. Die beim Rett-Syndrom resultierende Störung des Redox-Gleichgewichts verändert die physiologischen Abläufe in Neuronen erkrankter Patientinnen. Da dieser Einfluss womöglich eine große Rolle in der Ausprägung der Symptome bei betroffenen Personen spielt, ist die Manipulation und Korrektur der Redox-Balance als therapeutischer Ansatz verfolgt worden. In meiner Arbeit untersuche ich daher die Auswirkung auf transgene Mäuse eines Rett-Mausmodells durch die Applikation von Antioxidantienfutter oder der Expression einer mitochondrialen Katalase.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass -mutmaßlich durch die Verschiebung der Redox-Balance bedingt- der mitochondriale Sauerstoffverbrauch als Zeichen einer ineffizienten Atmungskette erhöht ist. In meiner Arbeit wurden Wildtyp-Mäuse und *Mecp2^{-/-}*-Mäuse untersucht, wobei Letztere ein Tiermodell für das Rett-Syndrom darstellen. Jede der beiden Mausgruppen wurde zusätzlich durch Gabe von Antioxidantienfutter oder einer mitochondrialen Katalase modifiziert, um ein physiologisches Redox-Gleichgewicht potenziell wiederherzustellen. In den resultierenden sechs Mausgruppen konnte nun der Sauerstoffverbrauch von isolierten Mitochondrien aus Cerebellum und Kleinhirn mit Hilfe des Oroboros-Respirometers analysiert werden. Hierfür wurden die einzelnen Komplexe der Atmungskette gezielt mit Substraten und Hemmstoffen angesteuert und somit differenziert betrachtet. Des Weiteren wurde vor jeder dieser Messungen das Gewicht, die Körperlänge, die Blutglukose sowie der Hämatokrit dieser Mäuse bestimmt und hinsichtlich des Einflusses des Fehlens des MeCP2-Proteins auf diese phänotypischen Merkmale hin verglichen.

Unsere Ergebnisse zeigten, dass sich der Sauerstoffverbrauch zwischen Wildtyp- und *Mecp2^{-/-}*-Mäusen isoliert im Cerebellum oder im Hirnstamm nicht voneinander unterscheiden. Dies ist im Hinblick darauf interessant, dass ein erhöhter Verbrauch in Proben des Cortex und Hippocampus bereits mehrfach gezeigt wurde, jedoch in den von mir untersuchten Hirnregionen nicht sichtbar war. Darüber hinaus konnte ich zeigen, dass weder der Einsatz von Antioxidantienfutter noch die Anwendung einer mitochondrialen Katalase Einfluss auf den Sauerstoffverbrauch hatte. Daher stellen diese Interventionen - zumindest in Bezug auf Cerebellum und Hirnstamm- keinen Therapieansatz zur Verbesserung der mitochondrialen Effizienz im Rett-Syndrom dar, zeigen interessanterweise jedoch ebenso keine negativen Effekte in Wildtyp-Mäusen. Die Analyse der phänotypischen Merkmale offenbarte, dass die *Mecp2^{-/-}*-Mäuse signifikant leichter und kleiner sind, einen erhöhten Hämatokrit aufweisen sowie zum Teil erniedrigte Blutglukosewerte aufzeigen. Diese Parameter decken sich mit bereits publizierten Daten zum Rett-Mausmodell und

beweisen, dass die untersuchten Tiere die volle Ausprägung des Rett-Syndroms zum Zeitpunkt der Messung aufzeigten.

Es lässt sich zusammenfassen, dass der mitochondriale Sauerstoffverbrauch als Zeichen der Atmungsketteneffizienz in Tieren des Rett-Mausmodells weder im Cerebellum noch im Hirnstamm Unterschiede zu Wildtyp-Mäusen zeigte. Dies steht im Kontrast zu vorherigen Publikationen, in denen ein erhöhter Sauerstoffverbrauch in Mitochondrien-Proben des Cortex und Hippocampus erhöht waren. Warum es diese Unterschiede zwischen den Hirnregionen gibt, muss im Rahmen weiterer Arbeiten untersucht werden. Darüber hinaus lässt sich festhalten, dass weder die Verabreichung von Antioxidantienfutter noch die Expression einer mitochondrialen Katalase weder einen positiven noch negativen Effekt auf den mitochondrialen Sauerstoffverbrauch hatten.

6 Literaturverzeichnis

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

Babior B (1984): The respiratory burst of phagocytes. *J Clin Invest* 73, 599-601

Barcena C, Mayoral P, Quiros PM (2018): Mitohormesis, an Antiaging Paradigm. *Int Rev Cell Mol Biol* 340, 35-77

Barja G (1999): Mitochondrial oxygen radical generation and leak: sites of production in states 4 and 3, organ specificity, and relation to aging and longevity. *J Bioenerg Biomembr* 31, 347-366

Barja G, Herrero A (1998): Localization at complex I and mechanism of the higher free radical production of brain nonsynaptic mitochondria in the short-lived rat than in the longevous pigeon. *J Bioenerg Biomembr* 30, 235-243

Behl C, Moosmann B (2002): Antioxidant neuroprotection in Alzheimer's disease as preventive and therapeutic approach. *Free Radic Biol Med* 33, 182-191

Bénit P, Lebon S, Rustin P (2009): Respiratory-chain diseases related to complex III deficiency. *Biochim Biophys Acta* 1793, 181-185

Bennett BD, Kimball EH, Gao M, Osterhout R, Van Dien SJ, Rabinowitz JD (2009): Absolute metabolite concentrations and implied enzyme active site occupancy in *Escherichia coli*. *Nat Chem Biol* 5, 593

Benzi G, Moretti A (1995): Are reactive oxygen species involved in Alzheimer's disease? *Neurobiol Aging* 16, 661-674

Bernardi P, Forte M (2007): The mitochondrial permeability transition pore. *Novartis Found Symp* 287, 157-164; discussion 164-159

Bertini I, Cavallaro G, Rosato A (2006): Cytochrome c: occurrence and functions. *Chem Rev* 106, 90-115

Björkman U, Ekholm R (1984): Generation of H₂O₂ in isolated porcine thyroid follicles. *Endocrinology* 115, 392-398

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

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

Boyer PD (1993): The binding change mechanism for ATP synthase--some probabilities and possibilities. *Biochim Biophys Acta* 1140, 215-250

Bradford MM (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254

Bridgeman MM, Marsden M, MacNee W, Flenley DC, Ryle AP (1991): Cysteine and glutathione concentrations in plasma and bronchoalveolar lavage fluid after treatment with N-acetylcysteine. *Thorax* 46, 39-42

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

Capaldi RA, Aggeler R, Turina P, Wilkens S (1994): Coupling between catalytic sites and the proton channel in F1F0-type ATPases. *Trends Biochem Sci* 19, 284-289

Castello PR, Drechsel DA, Patel M (2007): Mitochondria are a major source of paraquat-induced reactive oxygen species production in the brain. *J Biol Chem* 282, 14186-14193

Cecchini G (2003): Function and structure of complex II of the respiratory chain. *Annu Rev Biochem* 72, 77-109

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

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

Chance B, Williams GR (1956): The respiratory chain and oxidative phosphorylation. *Adv Enzymol Relat Subj Biochem* 17, 65-134

Chance B, Sies H, Boveris A (1979): Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 59, 527-605

Chang LY, Slot JW, Geuze HJ, Crapo JD (1988): Molecular immunocytochemistry of the CuZn superoxide dismutase in rat hepatocytes. *J Cell Biol* 107, 2169-2179

Cheeseman KH, Slater TF (1993): An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull* 49, 481-493

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

Clark JB, Nicklas WJ (1970): The metabolism of rat brain mitochondria. Preparation and characterization. *J Biol Chem* 245, 4724-4731

Colombini M, Blachly-Dyson E, Forte M (1996): VDAC, a channel in the outer mitochondrial membrane. *Ion Channels* 4, 169-202

Costantini P, Chernyak BV, Petronilli V, Bernardi P (1996): Modulation of the mitochondrial permeability transition pore by pyridine nucleotides and dithiol oxidation at two separate sites. *J Biol Chem* 271, 6746-6751

Crofts AR (2004): The cytochrome bc1 complex: function in the context of structure. *Annu Rev Physiol* 66, 689-733

De Bolster M (1997): Glossary of terms used in bioinorganic chemistry (IUPAC recommendations 1997). *Pure Appl Chem* 69, 1251-1304

De Felice C, Ciccoli L, Leoncini S, Signorini C, Rossi M, Vannuccini L, Guazzi G, Latini G, Comporti M, Valacchi G, et al. (2009): Systemic oxidative stress in classic Rett syndrome. *Free Radic Biol Med* 47, 440-448

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

Doerrier C, Garcia-Souza LF, Krumschnabel G, Wohlfarter Y, Mészáros AT, Gnaiger E (2018): High-resolution fluoroimetry and OXPHOS protocols for human cells, permeabilized fibers from small biopsies of muscle, and isolated mitochondria. *Methods Mol Biol* 1782, 31-70

- Dotti MT, Manneschi L, Malandrini A, De Stefano N, Caznerale F, Federico A (1993): Mitochondrial dysfunction in Rett syndrome. An ultrastructural and biochemical study. *Brain Dev* 15, 103-106
- Dröge W (2002): Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82, 47-95
- Ebadi M, Govitrapong P, Sharma S, Muralikrishnan D, Shavali S, Pellett L, Schafer R, Albano C, Eken J (2001): Ubiquinone (coenzyme q10) and mitochondria in oxidative stress of parkinson's disease. *Biol Signal Recept* 10, 224-253
- Eeg-Olofsson O, Al-Zuhair AG, Teebi AS, Al-Essa MM (1988): Abnormal mitochondria in the Rett syndrome. *Brain Dev* 10, 260-262
- Eeg-Olofsson O, Al-Zuhair AG, Teebi AS, Daoud AS, Zaki M, Besisso MS, Al-Essa MM (1990): Rett syndrome: a mitochondrial disease? *J Child Neurol* 5, 210-214
- Engelbrecht S, Junge W (1997): ATP synthase: a tentative structural model. *FEBS Lett* 414, 485-491
- Enns GM, Cowan TM (2017): Glutathione as a redox biomarker in mitochondrial disease—Implications for therapy. *J Clin Med* 6, 50
- Erecinska M, Silver IA (1989): ATP and brain function. *J Cereb Blood Flow Metab* 9, 2-19
- Fischer M, Reuter J, Gerich FJ, Hildebrandt B, Hägele S, Katschinski D, Müller M (2009): Enhanced hypoxia susceptibility in hippocampal slices from a mouse model of Rett syndrome. *J Neurophysiol* 101, 1016-1032
- 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
- Fridovich I (1995): Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem* 64, 97-112
- Gnaiger E (2001): Bioenergetics at low oxygen: dependence of respiration and phosphorylation on oxygen and adenosine diphosphate supply. *Respir Physiol* 128, 277-297
- Gnaiger E (2006): The oxygraph for high-resolution respirometry. *Mitochondrial Physiology Network* 6.1: 1-19

Gnaiger E, Kemp RB (1990): Anaerobic metabolism in aerobic mammalian cells: information from the ratio of calorimetric heat flux and respirometric oxygen flux. *Biochim Biophys Acta* 1016, 328-332

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

Goldstein N (2002): Reactive oxygen species as essential components of ambient air. *Biochemistry (Mosc)* 67, 161-170

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

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

Hagberg B (1985): Rett syndrome: Swedish approach to analysis of prevalence and cause. *Brain Dev* 7, 276-280

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

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

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

Heikkila RE, Nicklas WJ, Vyas I, Duvoisin RC (1985): Dopaminergic toxicity of rotenone and the 1-methyl-4-phenylpyridinium ion after their stereotaxic administration to rats: implication for the mechanism of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine toxicity. *Neurosci Lett* 62, 389-394

Hirst J (2013): Mitochondrial complex I. *Annu Rev Biochem* 82, 551-575

Huang S, Millar AH (2013): Succinate dehydrogenase: the complex roles of a simple enzyme. *Curr Opin Plant Biol* 16, 344-349

Huppke P, Laccone F, Krämer N, Engel W, Hanefeld F (2000): Rett syndrome: analysis of MECP2 and clinical characterization of 31 patients. *Human molecular genetics* 9, 1369-1375

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

Ischiropoulos H, Zhu L, Beckman JS (1992): Peroxynitrite formation from macrophage-derived nitric oxide. *Arch Biochem Biophys* 298, 446-451

Jacob H (1970): Redox potential. *Methods Microbiol* 2, 91-123

Jin L-W, Horiuchi M, Wulff H, Liu X-B, Cortopassi GA, Erickson JD, Maezawa I (2015): Dysregulation of glutamine transporter SNAT1 in Rett syndrome microglia: a mechanism for mitochondrial dysfunction and neurotoxicity. *J Neurosci* 35, 2516-2529

Jones DP (2006): Redefining oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* 8, 1865-1879

Julu PO, Kerr AM, Apartopoulos F, Al-Rawas S, Engerström IW, Engerström L, Jamal GA, Hansen S (2001): Characterisation of breathing and associated central autonomic dysfunction in the Rett disorder. *Arch Dis Child* 85, 29-37

Kadowaki T (1994): Mutations in the mitochondrial gene in patients with NIDDM. *Nihon Rinsho* 52, 2708-2714

Kasianowicz J, Benz R, McLaughlin S (1984): The kinetic mechanism by which CCCP (carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone) transports protons across membranes. *J Membr Biol* 82, 179-190

Kędziora J, Bartosz G (1988): Down's syndrome: a pathology involving the lack of balance of reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med* 4, 317-330

Kim SJ, Cook EH, Jr (2000): Novel de novo nonsense mutation of MECP2 in a patient with Rett syndrome. *Hum Mutat* 15, 382-383

Kim HJ, Winge DR (2013): Emerging concepts in the flavinylation of succinate dehydrogenase. *Biochim Biophys Acta Bioenerg* 1827, 627-636

Kohen R, Nyska A (2002): Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol Pathol* 30, 620-650

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

Kristian T (2010): Isolation of mitochondria from the CNS. *Curr Protoc Neurosci* Chapter 7, Unit 7.22

Laherty CD, Yang WM, Sun JM, Davie JR, Seto E, Eisenman RN (1997): Histone deacetylases associated with the mSin3 corepressor mediate mad transcriptional repression. *Cell* 89, 349-356

Lander HM (1997): An essential role for free radicals and derived species in signal transduction. *FASEB J* 11, 118-124

Larsen FJ, Schiffer TA, Sahlin K, Ekblom B, Weitzberg E, Lundberg JO (2011): Mitochondrial oxygen affinity predicts basal metabolic rate in humans. *FASEB J* 25, 2843-2852

LeDoux SP, Driggers WJ, Hollensworth BS, Wilson GL (1999): Repair of alkylation and oxidative damage in mitochondrial DNA. *Mutat Res* 434, 149-159

Leichert LI, Dick TP (2015): Incidence and physiological relevance of protein thiol switches. *Biol Chem* 396, 389-399

Li Y, Wang H, Muffat J, Cheng AW, Orlando DA, Lovén J, Kwok SM, Feldman DA, Bateup HS, Gao Q, et al. (2013): Global transcriptional and translational repression in human-embryonic-stem-cell-derived Rett syndrome neurons. *Cell Stem Cell* 13, 446-458

Liu W-B, Zhou J, Qu Y, Li X, Lu C-T, Xie K-L, Sun X-L, Fei Z (2010): Neuroprotective effect of osthole on MPP⁺-induced cytotoxicity in PC12 cells via inhibition of mitochondrial dysfunction and ROS production. *Neurochem Int* 57, 206-215

Lück H: Catalase. In: Bergmeyer H-U (Hrsg): *Methods of Enzymatic Analysis*. Academic Press 1965, 885-894

Lushchak VI (2014): Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chem Biol Interact* 224, 164-175

Lyon MF (1961): Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.). *Nature* 190, 372-373

Maloney PC, Kashket ER, Wilson TH (1974): A protonmotive force drives ATP synthesis in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 71, 3896-3900

Marschik PB, Kaufmann WE, Sigafos J, Wolin T, Zhang D, Bartl-Pokorny KD, Pini G, Zappella M, Tager-Flusberg H, Einspieler C, et al. (2013): Changing the perspective on early development of Rett syndrome. *Res Dev Disabil* 34, 1236-1239

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

Mecocci P, Cherubini A, Polidori M, Cecchetti R, Chionne F, Senin U (1997): Oxidative stress and dementia: new perspectives in AD pathogenesis. *Aging Clin Exp Res* 9, 51-52

Michel H, Behr J, Harrenga A, Kannt A (1998): Cytochrome c oxidase: structure and spectroscopy. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 27, 329-356

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

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

Mitchell P (1975): The protonmotive Q cycle: a general formulation. *FEBS Lett* 59, 137-139

Mitchell P, Moyle J (1969): Estimation of membrane potential and pH difference across the cristae membrane of rat liver mitochondria. *Eur J Biochem* 7, 471-484

Moreira PI, Zhu X, Wang X, Lee HG, Nunomura A, Petersen RB, Perry G, Smith MA (2010): Mitochondria: a therapeutic target in neurodegeneration. *Biochim Biophys Acta* 1802, 212-220

Müller M (2019): Disturbed redox homeostasis and oxidative stress: Potential players in the developmental regression in Rett syndrome. *Neurosci Biobehav Rev* 98, 154-163

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

Murphy MP (2009): How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J* 417, 1-13

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

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

Neul JL, Kaufmann WE, Glaze DG, Christodoulou J, Clarke AJ, Bahi-Buisson N, Leonard H, Bailey ME, Schanen NC, Zappella M, et al. (2010): Rett syndrome: revised diagnostic criteria and nomenclature. *Ann Neurol* 68, 944-950

Okado-Matsumoto A, Fridovich I (2001): Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver: Cu,Zn-SOD in mitochondria. *J Biol Chem* 276, 38388-38393

Packer L, Witt EH, Tritschler HJ (1995): alpha-Lipoic acid as a biological antioxidant. *Free Radic Biol Med* 19, 227-250

Parker WD, Jr., Boyson SJ, Parks JK (1989): Abnormalities of the electron transport chain in idiopathic Parkinson's disease. *Ann Neurol* 26, 719-723

Parker WD, Jr., Filley CM, Parks JK (1990): Cytochrome oxidase deficiency in Alzheimer's disease. *Neurology* 40, 1302-1303

Pecorelli A, Ciccoli L, Signorini C, Leoncini S, Giardini A, D'Esposito M, Filosa S, Hayek J, De Felice C, Valacchi G (2011): Increased levels of 4HNE-protein plasma adducts in Rett syndrome. *Clin Biochem* 44, 368-371

Percy AK, Lane JB (2004): Rett syndrome: clinical and molecular update. *Curr Opin Pediatr* 16, 670-677

Rett A (1966): Über ein eigenartiges hirnatrophisches Syndrome bei Hyperammonämie in Kindsalter. *Wien Med Wochenschr* 116, 723-726

Rhee SG (1999): Redox signaling: hydrogen peroxide as intracellular messenger. *Exp Mol Med* 31, 53-59

Richter C, Park JW, Ames BN (1988): Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 6465-6467

Ristow M, Schmeisser S (2011): Extending life span by increasing oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 51, 327-336

Rouault TA, Tong WH (2008): Iron-sulfur cluster biogenesis and human disease. *Trends Genet* 24, 398-407

Rubbo H, Radi R, Trujillo M, Telleri R, Kalyanaraman B, Barnes S, Kirk M, Freeman BA (1994): Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. Formation of novel nitrogen-containing oxidized lipid derivatives. *J Biol Chem* 269, 26066-26075

Ruch A, Kurczynski TW, Velasco ME (1989): Mitochondrial alterations in Rett syndrome. *Pediatr Neurol* 5, 320-323

Schafer FQ, Buettner GR (2001): Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic Biol Med* 30, 1191-1212

Schapira AH (1994): Evidence for mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease--a critical appraisal. *Mov Disord* 9, 125-138

Schein SJ, Colombini M, Finkelstein A (1976): Reconstitution in planar lipid bilayers of a voltage-dependent anion-selective channel obtained from paramecium mitochondria. *J Membr Biol* 30, 99-120

Schriner SE, Linford NJ, Martin GM, Treuting P, Ogburn CE, Emond M, Coskun PE, Ladiges W, Wolf N, Van Remmen H, et al. (2005): Extension of murine life span by overexpression of catalase targeted to mitochondria. *Science* 308, 1909-1911

Schulz TJ, Zarse K, Voigt A, Urban N, Birringer M, Ristow M (2007): Glucose restriction extends *Caenorhabditis elegans* life span by inducing mitochondrial respiration and increasing oxidative stress. *Cell Metab* 6, 280-293

Shahbazian MD, Zoghbi HY (2001): Molecular genetics of Rett syndrome and clinical spectrum of MECP2 mutations. *Curr Opin Neurol* 14, 171-176

Sies H (1997): Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol* 82, 291-295

Signorini C, Leoncini S, De Felice C, Pecorelli A, Meloni I, Ariani F, Mari F, Amabile S, Paccagnini E, Gentile M, et al. (2014): Redox imbalance and morphological changes in skin fibroblasts in typical Rett syndrome. *Oxid Med Cell Longev* 2014, 195935

Sims NR (1990): Rapid isolation of metabolically active mitochondria from rat brain and subregions using Percoll density gradient centrifugation. *J Neurochem* 55, 698-707

Skulachev VP (2012): Mitochondria-targeted antioxidants as promising drugs for treatment of age-related brain diseases. *J Alzheimers Dis* 28, 283-289

Sofic E, Riederer P, Killian W, Rett A (1987): Reduced concentrations of ascorbic acid and glutathione in a single case of Rett syndrome: a postmortem brain study. *Brain Dev* 9, 529-531

Srinivasan B (2015): Mitochondrial permeability transition pore: an enigmatic gatekeeper. *New Horizons Sci. Technol* 1, 47-51

Stadtman ER, Levine RL (2000): Protein oxidation. *Ann N Y Acad Sci* 899, 191-208

Suzuki Y, Kadowaki H, Katagiri H, Suematsu M, Atsumi Y, Hosokawa K, Kadowaki T, Oka Y, Yazaki Y, Matsuoka K (1994): Posttreatment neuropathy in diabetic subjects with mitochondrial tRNA (Leu) mutation. *Diabetes Care* 17, 777-778

Swanson R, Trus BL, Mandel N, Mandel G, Kallai OB, Dickerson RE (1977): Tuna cytochrome c at 2.0 Å resolution. I. Ferricytochrome structure analysis. *J Biol Chem* 252, 759-775

Taugog A (1970): Thyroid peroxidase and thyroxine biosynthesis. *Recent Prog Horm Res* 26, 189-247

Toyokuni S, Okamoto K, Yodoi J, Hiai H (1995): Persistent oxidative stress in cancer. *FEBS Lett* 358, 1-3

Traber MG, Stevens JF (2011): Vitamins C and E: beneficial effects from a mechanistic perspective. *Free Radic Biol Med* 51, 1000-1013

Trevathan E (1988): Diagnostic criteria for Rett syndrome. *Ann Neurol* 23, 425-428

Turrens JF (2003): Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol* 552, 335-344

Turrens JF, Boveris A (1980): Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *Biochem J* 191, 421-427

Turrens JF, Freeman BA, Levitt JG, Crapo JD (1982): The effect of hyperoxia on superoxide production by lung submitochondrial particles. *Arch Biochem Biophys* 217, 401-410

Unni S, Thiyagarajan S, Srinivas Bharath MM, Padmanabhan B (2019): Tryptophan oxidation in the UQCRC1 subunit of mitochondrial complex III (ubiquinol-cytochrome c reductase) in a mouse model of myodegeneration causes large structural changes in the complex: A molecular dynamics simulation study. *Sci Rep* 9, 10694

Valenti D, de Bari L, Vigli D, Lacivita E, Leopoldo M, Laviola G, Vacca RA, De Filippis B (2017): Stimulation of the brain serotonin receptor 7 rescues mitochondrial dysfunction in female mice from two models of Rett syndrome. *Neuropharmacology* 121, 79-88

van Zandwijk N (1995): N-acetylcysteine (NAC) and glutathione (GSH): antioxidant and chemopreventive properties, with special reference to lung cancer. *J Cell Biochem Suppl* 22, 24-32

Vignais P (2002): The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism. *Cell Mol Life Sci* 59, 1428-1459

Votyakova TV, Reynolds IJ (2001): $\Delta\Psi_m$ -Dependent and -independent production of reactive oxygen species by rat brain mitochondria. *J Neurochem* 79, 266-277

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

Wang J, Yi J (2008): Cancer cell killing via ROS: to increase or decrease, that is the question. *Cancer Biol Ther* 7, 1875-1884

Weerapana E, Wang C, Simon GM, Richter F, Khare S, Dillon MB, Bachovchin DA, Mowen K, Baker D, Cravatt BF (2010): Quantitative reactivity profiling predicts functional cysteines in proteomes. *Nature* 468, 790-795

Weisiger RA, Fridovich I (1973): Superoxide dismutase. Organelle specificity. *J Biol Chem* 248, 3582-3592

Xu XM, Møller SG (2010): ROS removal by DJ-1: Arabidopsis as a new model to understand Parkinson's disease. *Plant Signal Behav* 5, 1034-1036

Yankovskaya V, Horsefield R, Tornroth S, Luna-Chavez C, Miyoshi H, Leger C, Byrne B, Cecchini G, Iwata S (2003): Architecture of succinate dehydrogenase and reactive oxygen species generation. *Science* 299, 700-704

Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ (2002): Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic Biol Med* 33, 337-349

Danksagung

Ich danke Prof. Dr. Michael Müller für die Überlassung des Themas, die hervorragende Betreuung und eine schöne und spannende Zeit im Labor. Ebenso danke ich Belinda Kempkes für Hilfe in jeder Situation während der Durchführung sämtlicher Schritte im Labor.

Ein weiterer Dank geht an Bettina Homberg und die AG Rehling für die Durchführung der Western Blots.

Auch möchte ich mich bei meinem Zweitbetreuer Prof. Dr. Kehlenbach für die anregenden Diskussionen während der beiden Fortschrittsberichte sowie für die Begutachtung meiner Dissertation danken.

Darüber hinaus danke ich der gesamten AG Müller sowie der AG Hülsmann für die Hilfsbereitschaft und die großartige Arbeitsatmosphäre.