

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

Redoxmodulation epileptischer Krampfanfälle in einem Mausmodell für das Rett-Syndrom

INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von

Niklas Held

aus

Bad Nauheim

Göttingen 2024

Dekan: Prof. Dr. med. W. Brück

Betreuungsausschuss

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

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

Prüfungskommission

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

Ko-Referent/in:

Drittreferent/in:

Datum der mündlichen Prüfung:

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Redoxmodulation epileptischer Krampfanfälle in einem Mausmodell für das Rett-Syndrom" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den

.....
(Unterschrift)

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis.....	VI
1. Einleitung	7
1.1 Das klassische Rett-Syndrom	7
1.2 Molekulare Pathogenese.....	8
1.3 Epilepsie im Rett-Syndrom.....	11
1.4 Mögliche Pathomechanismen.....	14
1.5 Das Redox-Gleichgewicht der Zelle	15
1.6 Auswirkung von oxidativem Stress	18
1.7 Therapieansatz: Verbessertes Redox-Gleichgewicht.....	20
1.8 Ziel dieser Arbeit.....	21
2. Material und Methoden	23
2.1 Mausmodell	23
2.2 Behandlung mit Antioxidantien	23
2.3 Verwendete Lösungen.....	24
2.4 Herstellung der akuten Hirnschnitte	25
2.5 Versuchsaufbau.....	26
2.6 Ablauf der Messung	27
2.7 Auswertung.....	28
2.8 Statistik.....	30
3. Ergebnisse.....	31
3.1 Startzeit der Krampfentladungen.....	31
3.1.1 CA1	31
3.1.2 CA3.....	33
3.2 Frequenzanalyse.....	35
3.2.1 CA1	35
3.2.2 CA3.....	40
3.3 Amplitudenanalyse	44
3.3.1 CA1	44
3.3.2 CA3.....	49
3.4 <i>Spreading depression</i> im Cortex.....	53
4. Diskussion.....	58
4.1 Frequenz	59
4.2 Amplitude	61

4.3	Startzeit der Krampfentladungen.....	63
4.4	<i>Spreading depression</i> im Cortex.....	64
4.5	Limitationen des Studiendesigns und Ausblick	65
5.	Zusammenfassung	70
6.	Literaturverzeichnis	72

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Herstellung der Gehirnschnitte.....	25
Abbildung 2: Übersichtsaufnahme des Versuchsaufbaus.	26
Abbildung 3: Positionierung der Elektroden im Hirnschnitt.....	27
Abbildung 4: Beispielhafte Messregistrierung.....	28
Abbildung 5: <i>Eventdetection</i>	29
Abbildung 6: Auswertung der Entladungsamplituden.....	29
Abbildung 7: Mittlere Startzeit der ersten Krampfentladung in der Hippocampusregion CA1 während Applikation von Bicucullin (10 μ M).	32
Abbildung 8: Mittlere Startzeit der ersten Krampfentladung in der Hippocampusregion CA1 unter Behandlung mit 4-AP (100 μ M).....	33
Abbildung 9: Mittlere Startzeit der ersten Krampfentladung in der Hippocampusregion CA3 während des Einwaschens von Bicucullin (10 μ M).	34
Abbildung 10: Mittlere Startzeit der ersten Krampfentladung in der Hippocampusregion CA3 während Applikation von 4-AP (100 μ M).....	35
Abbildung 11: Mittlere Entladungsfrequenz in der Hippocampusregion CA1 unter Behandlung mit Bicucullin (10 μ M).....	36
Abbildung 12: Frequenzverteilung aller Hirnschnitte in der Hippocampusregion CA1 während des Einwaschens von Bicucullin (10 μ M).....	37
Abbildung 13: Mittlere Entladungsfrequenz in der Hippocampusregion CA1 während Applikation von 4-AP (100 μ M).....	38
Abbildung 14: Frequenzverteilung aller Hirnschnitte in der Hippocampusregion CA1 unter Behandlung mit 4-AP (100 μ M).....	39
Abbildung 15: Mittlere Entladungsfrequenz in der Hippocampusregion CA3 während des Einwaschens von Bicucullin (10 μ M).....	40
Abbildung 16: Frequenzverteilung aller Hirnschnitte in der Hippocampusregion CA3 während Applikation von Bicucullin (10 μ M).	41
Abbildung 17: Mittlere Entladungsfrequenz in der Hippocampusregion CA3 unter Behandlung mit 4-AP (100 μ M).	42
Abbildung 18: Frequenzverteilung aller Hirnschnitte in der Hippocampusregion CA3 während des Einwaschens von 4-AP (100 μ M).	43
Abbildung 19: Mittlere Amplitude in der Hippocampusregion CA1 während Applikation von Bicucullin (10 μ M).	45
Abbildung 20: Amplitudenverteilung aller Hirnschnitte in der Hippocampusregion CA1 unter Behandlung mit Bicucullin (10 μ M).	46
Abbildung 21: Mittlere Amplitude in der Hippocampusregion CA1 während des Einwaschens von 4-AP (100 μ M).....	47
Abbildung 22: Amplitudenverteilung aller Hirnschnitte in der Hippocampusregion CA1 während Applikation von 4-AP (100 μ M).....	48
Abbildung 23: Mittlere Amplitude in der Hippocampusregion CA3 unter Behandlung mit Bicucullin (10 μ M).....	49
Abbildung 24: Amplitudenverteilung aller Hirnschnitte in der Hippocampusregion CA3 während des Einwaschens von Bicucullin (10 μ M).	50
Abbildung 25: Mittlere Amplitude in der Hippocampusregion CA3 während Applikation von 4-AP (100 μ M).....	51
Abbildung 26: Amplitudenverteilung aller Hirnschnitte in der Hippocampusregion CA3 unter Behandlung mit 4-AP (100 μ M).	52
Abbildung 27: Mittlere Startzeit der ersten <i>spreading depression</i> im Cortex während des Einwaschens von ACSF mit erniedrigter Magnesiumkonzentration (0,25 mM).....	54

Abbildung 28: Mittlere Startzeit der ersten <i>spreading depression</i> im Cortex während Applikation von Bicucullin (10 μM).	55
Abbildung 29: Mittlere Startzeit der ersten <i>spreading depression</i> im Cortex unter Behandlung mit 4-AP (100 μM).	56
Abbildung 30: Übersicht der <i>spreading depressions</i> im Cortex der gemessenen Hirnschnitte.	57

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht häufiger physiologischer ROS	16
--	-----------

Abkürzungsverzeichnis

ACSF	<i>artificial cerebrospinal fluid</i>
AEDs	<i>anti-epileptic drugs</i> (Antiepileptika)
AOF	Antioxidantien-Futter
ATP	Adenosintriphosphat
BDNF	<i>brain-derived neurotrophic factor</i>
BIC	Bicucullin
CA1	<i>Cornu ammonis 1</i> ; Region 1 des hippocampalen Ammonshorns
CA3	<i>Cornu ammonis 3</i> ; Region 3 des hippocampalen Ammonshorns
CDKL 5	<i>cyclin-dependent kinase-like 5</i> (humanes Gen)
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EEG	Elektroenzephalogramm
FOXP 1	<i>forkhead box protein G1</i> (humanes Gen)
MECP2	<i>methyl-CpG-binding protein 2</i> (humanes Gen)
MeCP2	<i>methyl-CpG-binding protein 2</i> (exprimiertes Protein)
<i>Mecp2</i>	<i>methyl-CpG-binding protein 2</i> (nicht-humanes Gen)
<i>Mecp2</i> ^{-/-}	Mausmodell des Rett-Syndroms (hemizygot männliches Tier)
<i>Mecp2</i> ^{-/-} AO	Mausmodell des Rett-Syndroms (hemizygot männliches Tier) mit AOF
MBD	Methyl-CpG-Bindungsdomäne
NLS	Kernlokalisationsignal
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	<i>reactive oxygen species</i> , reaktive Sauerstoffspezies
RTT	Rett-Syndrom
SD	Standardabweichung
SOD	Superoxiddismutase
WT	Wildtyp
WT AO	Wildtyp mit Antioxidantienfütterung
4-AP	4-Aminopyridin

1. Einleitung

1.1 Das klassische Rett-Syndrom

Das klassische Rett-Syndrom (RTT) ist eine progressiv verlaufende neurologische Entwicklungsstörung, die erstmals 1966 vom österreichischen Neuropädiater Andreas Rett beschrieben wurde und fast ausschließlich Mädchen betrifft (Hagberg et al. 1983; Rett 1966). Erst 33 Jahre später konnten als Ursache Mutationen im X-chromosomal lokalisierten *methyl-CpG-binding protein 2*-Gen (*MECP2*) detektiert werden (Amir et al. 1999). Mit einer Prävalenz von ungefähr 1/10.000 unter der weiblichen Bevölkerung ist das RTT die zweithäufigste Ursache für eine tiefgreifende Entwicklungsstörung nach der Trisomie 21, der Bekanntheitsgrad ist bei einer Inzidenz von ca. 50 Neuerkrankten pro Jahr in Deutschland jedoch deutlich geringer (Hagberg 1985; Laurvick et al. 2006).

Die Diagnosestellung erfolgt anhand klinischer Symptome, die in notwendige und unterstützende Merkmale unterteilt werden. Notwendiges Kriterium ist neben der anfänglich normalen Entwicklung der Kinder bis zum Alter von 6 bis 18 Monaten das Einsetzen eines verzögerten Kopfwachstums, das klinisch oft der erste Hinweis auf ein möglicherweise vorliegendes RTT sein kann. Der in Folge auftretende Verlust bereits erlangter psychomotorischer Fähigkeiten, wie das Ausführen zielgerichteter Handbewegungen, und Rückschritte in aktiver und empfangender Sprache mündet im Kardinalsymptom des Syndroms, den stereotypischen *hand washing movements*. Dabei handelt es sich um automatisierte, auswringend, klatschend oder waschend imponierende Handbewegungen vor Brust und Gesicht. Als unterstützende Diagnosekriterien können Atemstörungen mit intermittierender Hypoxie während den Wachphasen, Veränderungen im Elektroenzephalogramm (EEG), Krampfanfälle, Spastik, sowie Skoliose und autonome Dysregulation des Gefäßsystems herangezogen werden (Group 1988; Neul et al. 2010).

Zur Beschreibung des Krankheitsverlaufs wurde 1986 ein vierstufiges Modell veröffentlicht, das die klinischen Symptome in zeitliche Reihenfolge zueinander setzt und gruppiert (Hagberg et al. 1986).

Stufe 1 (*early onset stagnation stage*) beginnt mit dem Auftreten der ersten Symptome zwischen dem 6. und 18. Lebensmonat. Die bis dato unauffällig verlaufende Entwicklung stagniert über Monate und erste Verschlechterungen von motorischen Fähigkeiten, Sprache sowie verminderte soziale Interaktion sind zu beobachten.

Stufe 2 (*rapid destructive stage*) schließt sich, zwischen dem ersten und dritten Lebensjahr einsetzend, mit einer Dauer von Wochen bis wenige Monate als kurze aber schwerwiegende Episode an. Der Verlust bereits erlernter Sprach- und Bewegungsfähigkeiten setzt sich fort, hinzu kommen Atmungsunregelmäßigkeiten sowie erste autistische Verhaltenszüge.

Stufe 3 (*pseudostationary stage*) erstreckt sich vom Vorschulalter bis in die ersten Schuljahre und ist charakterisiert durch Fortschritte bei der sozialen Interaktion, die autistischen Züge treten mehr in den Hintergrund. Auch motorisch können Verbesserungen erkennbar sein, gleichzeitig ist die Auftretenswahrscheinlichkeit epileptischer Anfälle in diesem Krankheitsabschnitt maximal. Das Gros der Rett-Patienten verbleibt ein Leben lang in dieser, auch als Plateauphase bezeichneten Stufe.

Stufe 4 (*late motor deterioration stage*) geht mit einer Verschlechterung der Motorik bis hin zu Lähmungserscheinungen einher, viele Patienten in dieser Krankheitsphase sind lebenslänglich an den Rollstuhl gebunden. Skoliotische Veränderungen als Zeichen veränderter neuromotorischer Aktivität und Kachexie können sich einstellen, die Pubertät scheint unbeeinträchtigt zu verlaufen. Die Epilepsie und soziale Interaktion bereiten mit zunehmendem Alter weniger Probleme, doch die mentale Beeinträchtigung verhindert, wie auch in den vorherigen Stufen, eine selbstständige Lebensführung.

Im Vergleich zur allgemeinen Bevölkerung ist die Lebenserwartung von Rett-Patienten verringert, doch viele erreichen durchaus die fünfte und sechste Lebensdekade (Tarquinio et al. 2015). Die Ergebnisse einer englischen Studie zu Todesursachen beim RTT beschreiben einen unerwartet eintretenden Tod bei einem Viertel der Patienten, vermutlich oft assoziiert mit kardiorespiratorischen Störungen (Rohdin et al. 2007). Etwa 13 Prozent der Patienten erliegen in jungem Alter frühen schweren epileptischen Anfällen (Kerr et al. 1997).

Neben dem hier beschriebenen klassischen RTT gibt es abweichende Phänotypen und Krankheitsverläufe, die unter dem Begriff des atypischen oder varianten Rett-Syndroms zusammengefasst werden und Mutationen in anderen Genloci zu Grunde liegen haben. Patientinnen mit der atypischen Variante weisen einige, aber nicht alle notwendigen Kriterien des klassischen RTT auf. Aufgrund der breiten klinischen Heterogenität wurden für das atypische RTT Untergruppen definiert. So gibt es eine mild verlaufende „erhaltene Sprache Variante“, die „frühe Anfälle Variante“ mit verkürzter unauffälliger postnataler Entwicklungszeit oder die „kongenitale Variante“. Der Krankheitsverlauf kann im Vergleich zum klassischen RTT sowohl milder als auch schwerwiegender ausfallen (Neul et al. 2010). Manche Autoren argumentieren deshalb, dass es sich genau genommen um eigenständige Syndrome unabhängig von der Rett-Erkrankung handeln müsse.

1.2 Molekulare Pathogenese

Lange Zeit wurde eine dominante X-chromosomal gekoppelte Genmutation als Krankheitsursache für das RTT vermutet, da die Erkrankung anfänglich nur bei Mädchen diagnostiziert und den für das X-Chromosom hemizygoten männlichen Ungeborenen mit der vermeintlichen Mutation keine Überlebenschance zugerechnet wurde. Die Annahme der X-chromosomal bedingten Krankheitsätiologie konnte mit Entdeckung der *MECP2*-Mutation bei Rett-Patientinnen 1999 bestätigt und ein komplett neues Feld für die Forschung

an der Erkrankung eröffnet werden (Amir et al. 1999). Entdeckungen der Folgejahre wie die der Arbeitsgruppe um Guy, dass im Mausmodell für das Rett-Syndrom Verbesserungen des Phänotyps durch Re-Aktivierung des ausgeschalteten *Mecp2*-Gens beobachtet werden können, unterstreichen dessen zentrale Ausgangsstellung in der Pathogenese (Guy et al. 2007).

Das *MECP2*-Gen, lokalisiert auf dem langen q-Arm des X-Chromosoms (Genlocus Xq28), kodiert für das *methyl-CpG-binding protein 2* (MeCP2), ein ubiquitär im menschlichen Körper exprimiertes Protein, das in Nervengewebe in besonders hohen Spiegeln nachweisbar ist (Jung et al. 2003; Meehan et al. 1989). Es reguliert als Transkriptionsfaktor eine Vielzahl von Genen, was nicht nur seinen Wirkungskreis auf die Zellphysiologie, sondern auch die Erforschung seiner Funktionen ungemein komplex macht. Die erste Zeit lag dabei der Fokus auf der inhibitorischen Wirkung des MeCP2, inzwischen schreibt man ihm jedoch eine deutlich vielseitigere Rolle mit durchaus auch aktivierender Komponente zu (Chahrour et al. 2008). Selbst auf Ebene der Ribonukleinsäuren (RNA) scheint es am Splicing verschiedener Transkripte beteiligt zu sein, wodurch sich einmal mehr seine komplexe Einbindung in die biochemischen Zellprozesse zeigt (Young et al. 2005).

Die Funktion des MeCP2 als Transkriptionsfaktor wird mit Hilfe dreier funktioneller Domänen gewährleistet. Über das *nuclear localization signal* (NLS) gelangt das translatierte Protein an seinen hauptsächlichen Wirkungsort, den Zellkern, doch auch im Zytoplasma scheint das Protein durchaus eine Aufgabe zu erfüllen (Miyake und Nagai 2007). Die Methyl-CpG-Bindungsdomäne (MBD), bestehend aus 85 Aminosäuren, lagert das Protein an selektive Desoxyribonukleinsäure-Sequenzen (DNA) an, die das Dinukleotid Cytosin-phosphatidyl-Guanin (CpG) mit einer 5'-Methylierung am Cytosin vorweisen. Diese, auch als CpG-Inseln bezeichneten Regionen, finden sich in großer Anzahl über das gesamte Genom verteilt und sind oft Bestandteil von Promotern (Thomson et al. 2010). Das so über die CpG-Inseln an die DNA gebundene MeCP2 kann nun mit seiner 104 Aminosäuren zählenden Repressordomäne (TRD) im Zusammenspiel mit Cofaktoren (Histondeacetylase HDACS und Sin3a) einen Proteinkomplex konstituieren, der die Transkription des Gens verringert, indem durch Deacetylierung von Histonen das lokale Chromatin stärker kondensiert (Jones et al. 1998; Matijevic et al. 2009).

Als Transkriptionsfaktor für eine Vielzahl an Genen, die für unterschiedlichste Zellkomponenten kodieren, lässt sich die Tragweite der MeCP2-Funktionen nur durch die Analyse von Beobachtungen bei veränderter Expression schrittweise nachvollziehen. So scheint MeCP2 für die Synaptogenese und Instandhaltung der synaptischen Plastizität von großer Bedeutung zu sein (Guy et al. 2011; Na et al. 2013). Auch Alterationen der Mitochondrien in Morphologie und Funktion sind auf das Fehlen von MeCP2 zurückzuführen (Gibson et al. 2010; Pecorelli et al. 2013).

Je nach Studie fehlt bis zu 97% der Patienten mit RTT das MeCP2 in seiner vollen Funktionstüchtigkeit, bedingt durch Mutationen an unterschiedlichsten Stellen des 76.000

Basenpaare umfassenden Genlocus, dessen 4 Exons zu zwei leicht unterschiedlichen Isoformen des Proteins zusammengefügt werden (Neul et al. 2008). Inzwischen sind hunderte Mutationen beschrieben, wobei acht sogenannte hot-spot-Mutationen, die zu zwei Dritteln in den Exons 3 und 4 lokalisiert sind, 60% der klassischen Rett-Fälle ausmachen (Dolce et al. 2013; Matijevic et al. 2009). Mit Ausnahme einiger weniger familiären Häufungen sind über 99% der Mutationen im *MECP2*-Gen *de-novo* entstandene *missense*-, *frameshift*- oder *nonsense*-Mutationen, die zum Einbau falscher Aminosäuren in den hochkonservierten funktionellen Proteindomänen oder zu einem vorzeitigen Transkriptionsstopp führen, wodurch Faltung und Funktion des Proteins beeinträchtigt werden. Vorherrschend sind dabei Desaminationen von methyliertem Cytosin, wodurch die Base Thymin entsteht (Wan et al. 1999). Auch Deletionen und Insertionen sind beschrieben (Christodoulou et al. 2003).

Die beobachtete Bandbreite verschiedenster klinischer Manifestationen des RTT ließ vermuten, dass eine Korrelation zwischen Mutationsart und daraus resultierendem Phänotyp bestehen und somit Mutationsart und -ort prognostische Hinweise für den zu erwartenden Krankheitsverlauf liefern könnten. Während einige Veröffentlichungen keine Korrelation bestätigen konnten, untermauern Ergebnisse einer Arbeitsgruppe um Huppke die Annahme. In der NLS-Region lokalisierte Mutationen scheinen die schwersten Phänotypen hervorzurufen, während C-terminale Deletionen mit den mildesten Formen einhergehen. Mutationen, die einen vorzeitigen Translationsstopp bewirken, rufen tiefgreifendere Symptome hervor als *missense*-Mutationen (Huppke et al. 2002). Bebbington und Kollegen konnten Mutationsorte mit schwererer und milderer assoziierter Symptomlast konkretisieren (Bebbington et al. 2008). Deutlich wurde jedoch auch, dass die zufällig erfolgende X-Inaktivierung eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung des Phänotypen spielt, was das Beispiel zweier Zwillingsschwestern mit identischen *MECP2*-Mutationen aber unterschiedlichen Phänotypen verdeutlicht (Ishii et al. 2001). Genannte X-Inaktivierung, bezeichnet als Lyon Hypothese, erfolgt während der weiblichen Embryonalentwicklung und dient der Kompensation des doppelt vorliegenden Genmaterials (Lyon 1961). Wird in einem Großteil der Zellen durch Zufall das X-Chromosom mit dem Gendefekt stillgelegt, kann es zu einer Entwicklung unterschiedlicher Phänotypen bei gleicher Mutation kommen, wie es bei den beiden Schwestern der Fall war.

Familiäre Häufungen des RTT sind eine Seltenheit mit weniger als 1% der Fälle, doch ihr Beitrag für ein besseres Verständnis der Zusammenhänge zwischen Mutation und Klinik ist beachtlich. Während die Entstehung der *de-novo*-Mutationen vor allem der Keimbahn des Mannes zugeschrieben wird, der sein X-Chromosom ausschließlich an seine Töchter weitergibt, sind bei familiär auftretenden Fällen auch genetische Veränderungen der Mutter entscheidend (Girard et al. 2001). So kann bei einem der Elternteile eine Keimbahnmutation in Form eines genetischen Mosaiks vorliegen, sodass einige der Spermien- bzw. Eizellen in den Keimdrüsen die dominante Mutation aufweisen und bei Weitergabe an die Folgegeneration zum Krankheitsausbruch führen. In anderen Fällen ist bei der Mutter eine vorhandene

genetische Mutation für das RTT nachgewiesen, doch da sie aufgrund vorteilhafter X-Inaktivierung keine oder kaum Symptome aufweist, kann sie als Konduktorin die Aberration an ihre Kinder weitervererben, die ein typisches RTT entwickeln können (Schanen et al. 1997).

Auch wenn in dieser Arbeit übersichtshalber nur von weiblichen Patienten gesprochen wird, sei an dieser Stelle erwähnt, dass inzwischen durchaus auch Rett-Diagnosen bei Jungen gestellt werden. Da sie hemizygot Träger für das X-Chromosom sind, betreffen Mutationen aus dem Spektrum des klassischen RTT jede Zelle ihres Körpers, was zu schweren Verläufen mit frühzeitiger neonataler Enzephalopathie und Versterben innerhalb der ersten Jahre führt. Anders sieht es bei Mutationen mit gleichzeitiger Chromosomenanomalie aus, wie es bei männlichen Rett-Patienten mit dem Klinefelter-Syndrom entdeckt wurde (XXY). Wie auch bei seltenen somatischen Mosaikformen entwickeln diese männlichen Patienten einen klassischen, dem weiblichen Phänotypen der Rett-Symptomatik ähnelnden Krankheitsverlauf, der oft auch milder ausfällt (Villard 2007).

Neben den Veränderungen im *MECP2*-Gen beim klassischen RTT sind inzwischen Mutationen in weiteren Genloci, dem *CDKL 5* und dem *FOXP 1* Gen detektiert worden, die ursächlich für einen Großteil der atypischen Rett-Diagnosen sind. Das Gen *CDKL 5* codiert für die *cyclin-dependent kinase-like 5 (CDKL 5)*, die über Phosphorylierung die Aktivität des MeCP2 reguliert und somit in direkter Verbindung durch einen gemeinsamen Signalweg steht (Mari et al. 2005). Eine Mutation im Gen dieser Kinase ruft einen mit dem klassischen RTT überlappenden Phänotypen hervor, der sich aber durch früheres Eintreten erster Symptome in Form von epileptischen Krämpfen innerhalb der ersten drei Lebensmonate unterscheidet (Scala et al. 2005; Tao et al. 2004). Mutationen im *FOXP 1*-Gen, das für das gehirnspezifische Transkriptionsrepressorprotein *forkhead box protein G1* codiert, wurden als Ursache für das relativ selten auftretende kongenitale RTT gefunden, das immer mit einer Mikrozephalie einhergeht (Ariani et al. 2008).

Abschließend sei erwähnt, dass nicht jede Mutation im *MECP2*-Gen zwangsläufig die Diagnose RTT nach sich zieht. Die Erkenntnis, dass MeCP2 auch in der Ätiologie des Angelman-Syndroms, der X-chromosomalen mentalen Retardierung und einiger Autismus-Formen eine Rolle spielt, unterstreicht einmal mehr seine Komplexität und die damit verbundene Notwendigkeit eines besseren Verständnisses seiner Funktionen (Carney et al. 2003; Hammer et al. 2002; Kankirawatana et al. 2006; Watson et al. 2001).

1.3 Epilepsie im Rett-Syndrom

Epileptische Anfälle sind für Rett-Patienten und deren Angehörige bzw. Pflegende eine der großen Herausforderungen der Erkrankung und stellen eine bedeutende Einschränkung der Lebensqualität dar (Nadia et al. 2008). Mit einer Auftretenswahrscheinlichkeit von 50-90%

ist die Mehrheit der Patienten im Laufe ihrer Erkrankung von Epilepsie betroffen, was sie zu einem Kernsymptom des Rett-Syndroms macht (Dolce et al. 2013).

Klinisch manifestiert sich Epilepsie in Form von Anfällen, die durch abnormale, gleichzeitig unkontrollierte Entladungen größerer Gruppen von Neuronen entstehen. Eine Epilepsie liegt nach Definition der *International League Against Epilepsy* (ILEA) vor, wenn zwei oder mehr symptomatische Anfälle mit identifizierbarer Ursache im Abstand von mindestens einem Tag auftreten, ein symptomatischer Anfall mit allgemeinem Rückfallrisiko festgestellt wird oder ein Epilepsiesyndrom diagnostiziert wurde (Fisher et al. 2014).

Da epileptische Anfälle der Rett-Patienten in den seltensten Fällen im klinischen Umfeld beobachtet und als EEG aufgezeichnet werden können, stützen sich die Zahlen der Studien vor allem auf Augenzeugenberichte, strukturierte Interviews oder Fragebögen mit den Eltern bzw. den Pflegenden, was absolut verlässliche Zahlen zum Symptom Epilepsie beim RTT erschwert (Rugg-Gunn et al. 2001). So treten typische Rett-Symptome wie unkontrollierte Bewegungsaktivitäten (Zucken, Zittern, Kopfdrehen), Atmungsunregelmäßigkeiten (Aussetzer mit Zyanosen, Hyperventilation) oder plötzliches Starren mit Mydriasis oft als paroxysmale Ereignisse (gr. anfallsartig) auf, ähnlich einem epileptischen Anfall. Auf der anderen Seite werden einige Epilepsiefälle, vor allem mit partieller Ätiologie, nicht erkannt (d'Orsi et al. 2009; Glaze et al. 1998).

Im Durchschnitt treten die ersten epileptischen Anfälle bei Patienten mit RTT im Alter von ungefähr drei bis vier Jahren auf, was im Vergleich zu anderen neurologischen Erkrankungen mit Beeinträchtigung relativ spät ist. Verfrühtes Auftreten in Verbindung mit früheren tiefgreifenderen Entwicklungsstörungen ist tendenziell mit weniger gut kontrollierbaren und schwereren Anfällen assoziiert, während ein späterer Beginn nach dem Erreichen des fünften Lebensjahres in untersuchten Patientengruppen signifikant besser kontrollierbare Epilepsieformen präsentiert (Jian et al. 2007; Nissenkorn et al. 2010). Frequenz und Stärke der epileptischen Anfälle erreichen ihren Höhepunkt zwischen dem siebten und zwölften Lebensjahr, was im Schema für den Krankheitsverlauf der Plateau-Phase (Stufe 3) entspricht. Generalisiert tonisch-klonische sowie komplex-fokale Anfälle sind dabei die vorherrschenden Anfallsarten. Bei vielen Rett-Patienten treten im Laufe der Erkrankung zwei oder mehr unterschiedliche Anfalls-Formen auf (Cardoza et al. 2011). Post-Pubertär kommt es zur Abflachung der Symptomatik, sowohl Frequenz als auch Schwere der Anfälle verringern sich. Eine allgemein beobachtete Verschiebung hin zu vermehrten partiellen statt generalisierten epileptischen Ereignissen bringt dabei oftmals einen Gewinn an Lebensqualität mit sich (Steffenburg et al. 2001).

Therapeutisch kann mit Anti-epileptischen Substanzen (*anti-epileptic drugs*, AEDs) bei der Mehrzahl der Patienten eine Besserung der Epilepsie in Hinblick auf Anfallsschwere und Frequenz erreicht werden. Ein gutes Drittel der von Epilepsie betroffenen Rett-Patienten (20-40% je nach Studie) spricht nicht auf AEDs an, was vom Anteil her mit Epilepsieformen anderer Ätiologie vergleichbar ist (French 2007). Signifikante Aussagen für ein

bestwirksames Therapiekonzept können auf Basis der bisherigen wissenschaftlichen Erkenntnisse nicht gemacht werden. Zu klein ist die Anzahl der Studien und zu groß die Spannbreite der verwendeten AEDs. So sprechen Huppke und Kollegen auf Basis ihrer 110 Patienten umfassenden Studie Carbamazepin eine signifikant bessere Wirksamkeit in der Monotherapie gegenüber Valproat zu, das in Kreuzreaktion mit Hemmung von Histondeacetylasen die Rett-Symptomatik vermutlich verschlechtern könnte (Huppke et al. 2007; Phiel et al. 2001). Zwei andere Studien hingegen beschreiben einen starken therapeutischen Effekt von Valproat neben Carbamazepin und Lamotrigin, die gleichzeitig die drei am häufigsten verordneten AEDs für Rett-Patienten sind (Dolce et al. 2013; Krajnc et al. 2011). Folglich wird die Entscheidung für eine Therapieoption weiterhin vor allem auf Basis der beobachteten Anfallsart und dem Erscheinungszeitpunkt getroffen werden. Knapp ein Fünftel der Rett-Patienten musste in den Studien eine Polytherapie mit drei oder mehr AEDs aufgrund schwer kontrollierbarer Epilepsie erhalten (Jian et al. 2007; Krajnc et al. 2011). Es bedarf weiterer möglichst groß angelegter Studien, um genauere Aussagen über die Wirksamkeit der unterschiedlichen AEDs treffen zu können (Krajnc 2015).

Wichtiges Instrument zur Diagnostik der Epilepsie und Spezifizierung von Anfallsart und Ursprungsregion ist weiterhin das EEG, das die summierten Potentialschwankungen kortikaler Neurone abbildet. Auch in der Unterscheidung von echten Anfällen und paroxysmal auftretenden, nicht-epileptischen Verhaltenscharakteristika bei Rett-Patienten kann das EEG Aufschluss bringen (Dolce et al. 2013).

Neben den typischen Anfalls-Entladungsmustern bei Rett-Patienten mit Epilepsie zeigt das EEG bei fast jedem Rett-Patienten, also auch denen ohne Epilepsie, abnormale Ergebnisse ab dem zweiten bis vierten Lebensjahr, oft mit Einsetzen der zweiten Krankheitsstufe (Hagne et al. 1989). Verlangsamte Hintergrund-Aktivitäten und centrotemporale Spikes treten auf, sowie eine Zunahme von epileptischen EEG-Abnormalitäten in den Schlafphasen, wie fehlende oder stark verminderte Schlafspindeln (Garofalo et al. 1988). Während Stufe drei der Erkrankung vor allem durch die hohe Prävalenz epileptischer Anfälle und das Fehlen von Non-REM-Schlaf-Charakteristika charakterisiert ist, bleibt die verlangsamte Hintergrund-Aktivität meistens bis in die Stufe vier bestehen, wo langsame theta-Rhythmen beobachtet und mit der Hypererregbarkeit der motorischen und sensomotorischen Neurone in Verbindung gebracht werden (Niedermeyer et al. 1997).

Bei der großen Anzahl an bisher bekannten Rett-bedingenden Mutationstypen kommt unausweichlich die Frage auf, ob neben der Beziehung zwischen Mutationsart und Phänotyp auch speziell im Hinblick auf die Schwere der epileptischen Anfälle eine mögliche Korrelation auszumachen ist. Die Studienergebnisse sind sich in dieser Fragestellung uneinig. Einige beschreiben durchaus eine Verbindung zwischen schwerwiegenden Mutationen in der MBD (darunter die beiden Hot-spot-mutationen p.T158M und p.R106W) oder der NLS des MeCP2 und damit einhergehenden schwereren Anfällen im Vergleich zu mildereren Verläufen der Epilepsie bei *late truncations* und C-terminalen Deletionen (Dolce et al. 2013; Jian et al.

2006). Andere kommen hingegen zu dem Schluss, dass keine signifikante Relation zwischen Mutationstyp und Schwere der Epilepsie besteht (Nissenkorn et al. 2010). So vermuten Nissenkorn und Kollegen, dass *MECP2* selbst ein epilepsieförderndes Gen sein könnte. Ein möglicher Erklärungsansatz für diese kontroversen Ergebnisse könnten die stark variierenden Patientengrößen der Studien sowie die unterschiedlichen X-Inaktivierung bei Patienten mit demselben Genotypen sein (Krajnc 2015).

Unabhängig von der Frage nach möglichen Phänotyp-Genotyp-Korrelationen wurde ein interessanter Gen-Polymorphismus im BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*) entdeckt, der bei einem Fünftel der allgemeinen Bevölkerung zu finden ist und einen protektiven Einfluss sowohl auf die gesamte Krankheitsschwere als auch auf den Zeitpunkt des Beginns epileptischer Anfälle zu haben scheint (Dolce et al. 2013). Das codierte Protein schützt als neuronaler Wachstumsfaktor die Nervenzellen und fördert ihre Differenzierung und synaptische Plastizität (Ghosh et al. 1994). Da die *BDNF*-Transkription direkt von MeCP2 hochreguliert wird, liegen bei Rett-Patienten ohne den Polymorphismus niedrigere BDNF-Level vor, während bei Individuen mit vorhandenem Polymorphismus und dadurch gesteigerter synaptischer Sekretion ein in vielen Belangen milderer Phänotyp zu beobachten ist (Nectoux et al. 2008). Im Mausmodell konnte dieser positive Einfluss von erhöhtem BDNF in *Mecp2*-mutierten Mäusen nachgewiesen werden (Chang et al. 2006).

1.4 Mögliche Pathomechanismen

Wie für die gesamte Bandbreite der klinischen Symptomatik beim RTT gilt auch für die Epilepsie, dass der Pathomechanismus vom Gendefekt zum Phänotyp bis dato ungeklärt bleibt. Deshalb liegt der Fokus vor allem auf der Identifikation von Zielstrukturen, mit denen das MeCP2 interagiert, um seine weitreichenden Einflüsse auf diesem Wege besser zu verstehen. Beobachtete funktionelle Zellveränderungen mit vermutlich potentiell auslösendem bzw. förderndem Einfluss auf das Entwickeln einer Epilepsie sind folglich die derzeitigen Ansatzpunkte, die wie bei einem Puzzle Teil um Teil in Zukunft für ein klareres Bild sorgen sollen.

Ein mögliches Puzzleteil ist die Beobachtung einer durch die *MECP2*-Mutation bedingten schlecht angepassten synaptischen Plastizität, die ein Ungleichgewicht von Exzitation und Inhibition induziert und somit neben Lern- und Verhaltensschwierigkeiten das Auftreten von Epilepsie begünstigen könnte (Dani et al. 2005). Synaptische Plastizität ist dabei der dem Lernen zugrundeliegende Prozess an der Synapse zwischen zwei Neuronen, die durch wiederholte Beanspruchung und dadurch induzierte molekulare Signalwege in ihrer Funktion und Verbindung gestärkt wird. Den vorhergegangenen Ansatz könnten die Beobachtungen von Chao und Kollegen stützen, die eine deutliche Beeinträchtigung MeCP2-defizienter, inhibitorisch wirkender GABAerger Neurone mit resultierenden Rett-typischen Symptomen im Mausmodell beschreiben, was eine Übererregbarkeit des neuronalen Netzwerkes begünstigen könnte (Chao et al. 2010).

Ein weiterer Faktor, bzw. um im Bild zu bleiben, ein weiteres Puzzleteil mit Epilepsie begünstigender Wirkung wird den beobachteten Mitochondrienveränderungen bei Rett-Patienten zugeschrieben, die sich unter anderem negativ auf das zelluläre Gleichgewicht von Oxidation und Reduktion zu Gunsten von oxidativem Stress auswirken, aber lange Zeit in der Rett-Forschung kaum Beachtung fanden. Das Wissen um eine Vielzahl redoxmodulierter Ionenkanäle und erste Erkenntnisse über signifikant verminderte Hypererregbarkeit bei antioxidativ behandelten MeCP2-defizienten Mäusen unterstützen diese Annahme und bilden die Grundlage für vorliegende Arbeit (Janc und Müller 2014).

Zum ersten Mal aufmerksam auf mögliche Mitochondrienveränderungen beim RTT wurde man Ende der achtziger Jahre anhand untersuchter Muskelbiopsien von Rett-Patienten. Die beobachteten morphologischen Abweichungen, unter dem Elektronenmikroskop imponierend als intramitochondriale Vakuolen in aufgeblähten Mitochondrien, wurden kurze Zeit später auch im Gehirn nachgewiesen (Cornford et al. 1994; Eeg-Olofsson et al. 1988; Ruch et al. 1989). Auch funktionelle Beeinträchtigungen der Mitochondrien und ihrer Enzyme konnten in verschiedensten Geweben nachgewiesen werden. Sie manifestieren sich bei Rett-Patienten vor allem an der Atmungskette, die verringerte Spiegel der Cytochrom-c-Oxidase (*subunit 1*) sowie der Succinat-Cytochrom-c-Reduktase zeigt (Coker und Melnyk 1991; Gibson et al. 2010). In Kombination mit einem vermuteten Protonen-Leck der inneren Mitochondrienmembran ist die effiziente Arbeit der Atmungskette beeinträchtigt, was sich letztendlich in niedrigeren Adenosintriphosphat-Spiegeln (ATP) in Gehirnzellen und erhöhten Lactatwerten aufgrund vermehrter anaerober Glycolyse im Blut widerspiegelt (Haas et al. 1995; Kriaucionis et al. 2006; Saywell et al. 2006). Die Zellen gleichen ihre defiziente Zellatmung offenbar mit Hochregulation ihrer basalen respiratorischen Aktivität aus, in deren Folge konsequenterweise der Sauerstoffverbrauch steigt und vermehrt reaktive Sauerstoffspezies (ROS) in den Mitochondrien entstehen (Boveris und Chance 1973). In Kombination mit beobachteten abgesenkten Spiegeln der antioxidativ wirkenden Superoxiddismutase (SOD) in Erythrozyten und des Tocopherols (Vitamin E) im Plasma von Rett-Patienten, deutet vieles auf erhöhten oxidativen Stress für die Körperzellen allgemein, als auch speziell für die Nervenzellen hin (Formichi et al. 1998; Sierra et al. 2001). So konnten im Blut von Rett-Patienten erhöhte Werte für oxidative Stressmarker wie das Malondialdehyd nachgewiesen und mit Hilfe eines redoxsensitiven Fluoreszenzproteins roGFP1 im Gehirn von MeCP2-defizienten Mäusen vermehrte oxidative Grundbedingungen sowie ein anfälligeres Redox-Gleichgewicht optisch sichtbar gemacht werden (Großer et al. 2012; Sierra et al. 2001).

1.5 Das Redox-Gleichgewicht der Zelle

Redoxreaktionen sind Übertragungen von Elektronen zwischen zwei Reaktionspartnern, von denen der eine oxidiert und der andere reduziert wird. Dieser simple Mechanismus ist ein grundlegender Bestandteil des Zellmetabolismus und notwendige Voraussetzung für die

Aufrechterhaltung des Zellmilieus. Um die Funktion und Integrität von Enzymen, Transportproteinen, Membranlipiden oder kontinuierliche DNA-Reparaturen zu gewährleisten, ist ein Gleichgewicht zwischen Stoffen mit oxidierenden und reduzierenden Eigenschaften essenziell. Die Wichtigkeit dieses Gleichgewichtes spiegelt sich in den umfangreichen zellulären Systemen wider, die als Gegenspieler der im Zellstoffwechsel physiologisch anfallenden Moleküle mit oxidierenden Eigenschaften fungieren.

Einen Großteil dieser anfallenden reaktiven Moleküle stellen die reaktiven Sauerstoffspezies dar (kurz ROS für *reactive oxygen species*), eine breite Gruppe von Radikalen und Nicht-Radikalen mit einem oder mehreren ungepaarten Elektronen, die starke oxidierende und somit reaktionsfreudige Eigenschaften besitzen. Zu den zahlenmäßig am häufigsten im Körper vorkommenden ROS gehören die im Folgenden genannten (**Tabelle 1**), die in unterschiedlichen Zelltypen und Zellkompartimenten entstehen.

Tabelle 1: Übersicht häufiger physiologischer ROS

Superoxidradikal	$O_2^{\cdot-}$
Hydroxylradikal	$\cdot OH$
Wasserstoffperoxid	H_2O_2
Alkoxyradikal	RO^{\cdot}
Peroxyradikal	ROO^{\cdot}
Hypochlorit-Anion	$HOCL$
Stickstoffmonoxidradikal	NO^{\cdot}

Hauptentstehungsort für endogene ROS sind die Mitochondrien (Boveris und Chance 1973). Die Generierung der Energieeinheit ATP steht dabei im Fokus ihrer metabolischen Aktivitäten. Nicht umsonst hat sich deshalb die metaphorische Bezeichnung „Kraftwerk der Zelle“ in der breiten Bevölkerung durchgesetzt. Dieser Energie-konservierende Prozess, der als oxidative Phosphorylierung bezeichnet wird, findet bei der aeroben Zellatmung in den Komplexen der Atmungskette statt, die in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert sind. Grundlegendes Prinzip ist dabei die kontrollierte Freisetzung von Energie aus katabolischen Reduktionsäquivalenten durch schrittweise Übertragung bzw. Oxidation der Elektronen entlang eines Redoxpotentials, wodurch die Energie zum Aufbau eines Protonengradienten zwischen Matrix und Intermembranraum bereitgestellt wird. Dieses so entstehende transmembrane Potential ($\Delta\Psi_m$) wird von der ATP-Synthase als treibende Kraft für die ATP-Generierung durch oxidative Phosphorylierung genutzt (Mitchell 1961). Der über die Atmung aufgenommene Sauerstoff ist essentiell für die „Entsorgung“ der kontinuierlich in der Atmungskette anfallenden Elektronen, um den protonenpumpenden Elektronenfluss aufrecht zu erhalten. Als finaler Elektronenakzeptor nimmt er an der

Cytochrom-C-Oxidase (Komplex 4) Elektronen auf und reagiert mit Protonen zu Wasser ($O_2 + 4H^+ + 4e^- \rightarrow 2H_2O$).

Doch wie in jeder Maschine läuft selbst der beste Prozess nicht immer optimal ab, sodass *in vitro* ca. 1-2% (*in vivo* wahrscheinlich deutlich weniger) des täglich aufgenommenen Sauerstoffs an Komplex 4 oder bereits an Komponenten der Komplexe 1, 2 und 3 (v.a. Eisen-Schwefel-Cluster) in einer Nebenreaktion ein einzelnes Elektron aufnehmen, somit unvollständig reduziert sind und zu reaktiven Superoxidanionen werden, die zum Wasserstoffperoxid oder zum hochreaktiven Hydroxy-Radikal weiterreagieren können (Andreyev et al. 2005; Loschen et al. 1974; Murphy 2009).

Neben den in den Mitochondrien anfallenden ROS gibt es weitere zelluläre Orte und Prozesse im Körper mit ROS-produzierender Eigenschaft. So nutzen die Peroxisomen molekularen Sauerstoff als Oxidationsmittel zum Abbau langkettiger Fettsäuren, das dabei entstehende Wasserstoffperoxid wird über Katalasen zum Großteil abgebaut. Cytochrom-P450-Enzyme katalysieren im Rahmen der Biotransformation von ausscheidungspflichtigen Stoffen Übertragungsreaktionen mit molekularem Sauerstoff, bei denen als Nebenprodukte Oxidantien entstehen können. Und auch Zellen der Immunabwehr generieren im Zuge inflammatorischer Prozesse gezielt ROS wie NO, H₂O₂ und OCL, die mit ihrem Potential zur DNA- und Proteinschädigung zur Bekämpfung von Bakterien oder virusinfizierter Zellen beitragen (Babior 1984).

Neben den beschriebenen endogenen Entstehungsorten von ROS sei an dieser Stelle erwähnt, dass auch zugeführte exogene Oxidantien auf zelluläre Geschehnisse Einfluss nehmen. So wurde 1990 dem im Zigarettenrauch enthaltenem NO schädliche oxidierende Wirkung auf die DNA peripherer Leukozyten nachgewiesen (Kiyosawa et al. 1990). Und auch die Exposition gegenüber UV- und ionisierender Strahlung bedingt eine vermehrte ROS-Entstehung in den Zellen und damit deren Schädigung (Leach et al. 2001).

Um sich vor Schädigung durch die anfallenden Oxidantien und das damit verschobene Gleichgewicht zwischen oxidierenden und reduzierenden Molekülen zu schützen, verfügt die Zelle über eine Reihe von Molekülen und Mechanismen, die als Antioxidantien bzw. Reduktionsmittel Gegenspieler der Oxidantien sind. Um das Redox-Gleichgewicht möglichst konstant zu halten, wird die Transkription einiger Antioxidantien direkt durch vermehrten oxidativen Stress induziert (Storz et al. 1990). Nach ihrer Wirkungsweise können sie in enzymatische und nicht-enzymatische Antioxidantien untergliedert werden.

Prominente Vertreter der Enzym-Gruppe sind die SOD und die im Zytosol lokalisierte Katalase (eine Peroxidase), die vor allem am „Hotspot“ der ROS-Konzentration, den Mitochondrien, Hand in Hand arbeiten. Dort anfallende Superoxidanionen werden von der SOD in Wasserstoffperoxid umgesetzt, aus dem die Katalase reaktionsträge Wasser- und Sauerstoffmoleküle generiert (McCord und Fridovich 1969).

Nicht-enzymatische Verbindungen wie das ubiquitär in den Zellen vorkommende Tripeptid Glutathion fungieren als direkte Reduktionsmittel. Genanntes atypisches Peptid reduziert Oxidantien durch Abspaltung eines Wasserstoffs vom seinem Thiol-Cysteinrest und reagiert mit einem weiteren oxidierten Molekül Glutathion zum Glutathiondisulfid, das über das Enzym Glutathionreduktase unter Zuhilfenahme von Reduktionsäquivalenten in Form von $\text{NADPH} + \text{H}^+$ wieder zu zwei Molekülen Glutathion reduziert werden kann (Meister 1995).

Weitere wichtige Bestandteile des zellulären Redoxsystems sind die Vitamine C und E sowie die Carotinoide, besser als Pro-Vitamin A (Vorläufer) bekannt. Das Vitamin C, auch als Ascorbinsäure bezeichnet, verfügt über einen Lactonring als funktionelle Gruppe, der als Reduktionsmittel zwei Elektronen abgeben kann und in Folge dessen in seine oxidierte Form, die Dehydroascorbinsäure, übergeht. Mit seiner lipophilen Seitenkette aus Isoprenoid-Bausteinen lagert sich das Tocopherol genannte Vitamin E in Membranen ein und unterbricht dort die Oxidantien-induzierte Oxidation der Doppelbindungen von ungesättigten Fettsäuren, die sonst durch unkontrollierte Kettenreaktionen (als Lipidoxidationskette bezeichnet) Membranschädigungen nach sich ziehen würden. Die Carotinoide sind neben ihrer Wirkung als Antioxidans vor allem umgewandelt in Vitamin A als elementarer Bestandteil des Rhodopsins von Bedeutung für den menschlichen Körper (Ames et al. 1993; Frei 1994).

Auch die in Tee, Schokolade und Rotwein enthaltenden Polyphenole, eine Gruppe von Pflanzenbestandteilen, wirken als Antioxidantien (Quideau et al. 2011).

Kommt es unvermeidlich doch zu oxidativ bedingten Zellschäden können diese über Reparatur- und Abbaumechanismen von der Zelle eliminiert werden, um eine Apoptose-induzierende Akkumulation von Zellschäden zu vermeiden. So werden oxidierte DNA-Bausteine von Nukleasen entfernt, Polymerasen setzen die neuen Bausteine ein und Ligasen verbinden sie mit dem Strang. Oxidierte Proteine werden von Proteasen zerlegt und oxidierte Lipide von der Glutathionperoxidase zerstört (Ames et al. 1993).

Dauerhaft erhöhte Level an Oxidantien führen zu oxidativem Stress, dem die Zelle ausgesetzt ist. Allgemein kann oxidativer Stress als ein Ungleichgewicht zugunsten der ROS-Produktion gegenüber der Antioxidantien-Abwehr definiert werden (Ott et al. 2007).

1.6 Auswirkung von oxidativem Stress

Die stark oxidierende Eigenschaft des Sauerstoffs ist für die Zelle ein zweischneidiges Schwert. Sauerstoff ermöglicht, im Vergleich zu Lebewesen mit anaerobem Stoffwechsel, durch sein hohes Standardpotential in der elektrochemischen Spannungsreihe eine viel effizientere Energiegewinnung. Der Preis hierfür ist die dauerhafte Gefahr von thermodynamisch begünstigten Nebenreaktionen des Sauerstoffes mit einer Vielzahl an Zellkomponenten. Die dabei entstehenden ROS wirken als oxidativer Stressoren schädigend

auf Zellkomponenten wie Zellmembranen, Proteine und das Erbgut und beeinflussen den physiologischen Ablauf biochemischer Prozesse (Skulachev 1996).

Freie Radikale nehmen in der Pathogenese einiger bedeutender Erkrankungen entscheidende Rollen ein. Neben der Entstehung von Krebserkrankungen, Diabetes mellitus, Autoimmunerkrankungen sowie Atherosklerose könnte auch das wenig bekannte RTT oxidativen Stress als möglichen Baustein seiner Pathogenese beinhalten (Ferguson 2010; Oberley 1988; Plachta et al. 1992).

Ungesättigte Fettsäuren sind Bestandteile von Membranen und Ziel reaktionsfreudiger Sauerstoffradikale, die über Anstoßen einer Lipidoxidationskette die Integrität der Zelle gefährden. So sind oxidativ bedingte Membranschäden beim RTT beschrieben und werden als möglicher Faktor für das Auftreten von epileptischen Anfällen vermutet (Sierra et al. 2001). Und auch bei Epilepsie-Patienten anderer Ätiologie konnten oxidativer Stress und damit einhergehende Membranschädigung mit dem Auftreten der Epilepsie in Verbindung gebracht werden (Sudha et al. 2001).

Auch Schädigungen der Erbinformation, die kodiert und konserviert in der DNA von Zellkern und Mitochondrien vorliegt, sind eine allgegenwärtige Gefahr für die Zelle. Sauerstoffradikale können DNA-Bestandteile, wie die Desoxyribose oder Basen, durch Oxidation verändern (Aust und Eveleigh 1999). Deutlich macht dies der Fakt, dass in der mitochondrialen DNA bereits unter physiologischen Bedingungen zwischen 10- und 20-fach mehr akkumulierte oxidative Schäden als im nuklearen Erbgut beobachtet wurden, begründet durch die räumliche Nähe zu den ROS-generierenden Komplexen der Atmungskette, das Nicht-Vorhandensein protektiv wirkender Histone und Introns sowie eine geringere Reparaturaktivität (Ames et al. 1995; Richter et al. 1988). Auch für das menschliche Gehirn wurden diese Beobachtungen bestätigt und als möglicher Faktor für die Entwicklung neurodegenerativer Erkrankungen, wie zum Beispiel der Alzheimererkrankung, ins Gespräch gebracht (Mecocci et al. 1993; Smith et al. 1991).

Der Einfluss von Oxidantien auf zelluläre Proteine fand neben den eindrucklichen Beobachtungen von Membran- und Erbgutschädigung längere Zeit weniger Beachtung, doch inzwischen sind auch alterskorrelierte oxidative Proteinschäden, die vor allem in den Mitochondrien anfallen, Gegenstand der Forschung (Stadtman 1992).

Neben genannten Gewebsschädigungen sind auch funktionelle Veränderungen redoxmodulierter Proteine beim RTT mit dem erhöhten oxidativen Stress naheliegend. So gibt es eine Vielzahl von Ionenkanälen und Rezeptoren, die über ein verändertes Redox-Verhältnis direkt oder indirekt über Regulator-Proteine in ihrer Funktion beeinträchtigt werden (Kourie 1998). Beispielfhaft zu nennen sind NMDA-, GABA_A-Kanäle und spannungs-modulierte K⁺-Kanäle, deren Aktivität durch veränderte Redox-Verhältnisse abnimmt (Aizenman et al. 1989; Müller und Bittner 2002; Sah et al. 2002). Im Kontrast dazu sind Proteine wie ein spannungsmodulierter Na⁺-Kanal bekannt, auf die sich vermehrte oxidative Belastung der Zelle aktivitätsfördernd auswirkt (Hammarström und Gage 2000).

Neben all diesen Ionen-Kanal-gekoppelten Rezeptoren gibt es weitere Proteine wie den redoxmodulierten HDL-Scavenger-Rezeptor B1 oder verschiedenste Wachstumsfaktor-Rezeptoren, in deren Signalwegen ROS ein Bestandteil sind (Huang et al. 1996; Sticozzi et al. 2013).

Die Mitochondrien liefern nicht nur die notwendige Energie für das Überleben der Zelle, sondern stehen auch im Fokus des physiologischen Prozesses der Apoptose, die als kontrollierter Zelltod alter oder zu stark geschädigter Zellen sowohl extrinsisch als auch intrinsisch induziert werden kann. Während beim extrinsischen Weg eine Liganden-Rezeptor-Interaktion die zelluläre Kaskade der Caspasen aktiviert, können gewisse Spiegel an mitochondrialen DNA-Schäden und ROS von den Mitochondrien ausgehend die Freisetzung mitochondrialer Moleküle (Cytochrom-c und weitere pro-apoptotische Proteine) in den Intermembranraum und später in das Zytosol bewirken, die dort ebenfalls über Caspasen-Aktivierung die intrinsische Selbstzerstörung der Zelle induzieren. Antioxidative Enzyme in den Mitochondrien wirken diesem Mechanismus entgegen, haben also gewissermaßen eine antiapoptotische Wirkung (Ott et al. 2007).

1.7 Therapieansatz: Verbessertes Redox-Gleichgewicht

Antioxidantien sind in der heutigen Zeit für die breite Masse der Bevölkerung kein Fremdwort mehr. Seit 1955 oxidativer Stress und der Prozess des Alterns erstmals in direktem Zusammenhang erwähnt wurden, stehen Antioxidantien heutzutage als Nahrungsergänzungsmittel und Diäten (z.B. in Form von vermehrtem Früchte- und Gemüseverzehr) einmal mehr im Fokus der Öffentlichkeit, versprechen sie doch Prävention einer Vielzahl von Erkrankungen und Verzögerung des natürlichen Alterns (Harraan 1955; Radimer et al. 2004). Doch inzwischen werden immer mehr kritische Stimmen laut, die den Nutzen hochdosierter Antioxidantienpräparate in Frage stellen oder ihnen sogar im Gegenteil schädliche Auswirkungen zusprechen (Miller et al. 2005). Trotz dieser ambivalenten Sicht auf den Gebrauch von Radikalfängern als „Gesundheits-Prophylaxe“ der breiten Bevölkerung, könnten Antioxidantien für Rett-Patienten einen großen Mehrwert bereithalten.

Aufgrund der evidenten Beobachtungen von vermehrtem oxidativem Stress in den Zellen der Rett-Patienten bieten sich Antioxidantien sowohl für das RTT allgemein als auch speziell für die damit einhergehende Epilepsie als mögliche Therapie an. Über deren Wirksamkeit dürfte letzten Endes die noch ungewisse Stellung des Redox-Ungleichgewichts in der Pathogenese des RTT entscheidend sein: ist es nur eine von vielen Begleiterscheinung oder direkter Bestandteil der Pathogenese?

Zur Stabilisierung des Redox-Gleichgewichtes bieten sich neben der genannten Supplementierung antioxidativer Substanzen zur Reduktion des zellulären ROS-Levels zwei weitere therapeutische Angriffspunkte an. Sowohl das Verhindern der ROS-Entstehung wie

auch die Hochregulation zelleigener Radikalfänger könnten das langfristige Ziel eines ausgeglichenen Redox-Verhältnisses ermöglichen. Diese Ansätze sind im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht von Bedeutung.

Ein Cocktail aus Antioxidantien ist der verfolgte Ansatz, der dieser Arbeit zu Grunde liegt. Erste Versuche der Arbeitsgruppe deuten darauf hin, dass dem oxidativen Stress durchaus eine Schlüsselrolle in der Rett-Pathogenese einzuräumen und der Einsatz von Antioxidantien vielversprechend ist. So zeigten mit Trolox, einem wasserlöslichen Vitamin-E-Derivat, inkubierte akute Hirnschnitte von MeCP2-defizienten Mäusen eine verbesserte synaptische Kurzzeit-Plastizität, wiederhergestellte synaptische Langzeit-Plastizität, verbesserte Hypoxietoleranz sowie signifikant verringerte neuronale Hypererregbarkeit (Janc und Müller 2014). In einer Folgestudie konnte bei systemisch intraperitoneal injiziertem Trolox Verbesserungen des Blutglukosespiegels, der Lipidperoxidation und der Hypoxie-Toleranz am Mausmodell beobachtet werden (Janc et al. 2016). Um die bei dieser Applikationsform möglichen behandlungsassoziierten Ergebnisverzerrungen zu minimieren, wurde die Behandlung der Mäuse von der intraperitonealen Injektion auf die orale Fütterung mit einer Dreifachkombination an Antioxidantien umgestellt, unter deren Einfluss sich ebenfalls eine positive Beeinflussung von Wachstum, Gehirnstruktur und hippocampaler Synapsenplastizität nachweisen ließ (Baroncelli et al. 2022). Dies deckt sich mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen am Rett-Mausmodell, die unter anderem durch die Zufütterung mit dem antioxidativ wirksamen Kurkumin eine Reduktion der ROS-Produktion in der erkrankten Gruppe nachweisen konnten (Panighini et al. 2013).

Und auch im klinischen Bereich wird der Ansatz der Reduktion von oxidativem Stress zur Verbesserung der Rett-Symptomatik bereits erprobt. So wurde in Italien eine klinische Studie der Phase 2 durchgeführt, die einen möglichen Benefit des EPI-743, ein Molekül mit noch unklarem Wirkmechanismus aber antioxidativen Eigenschaften, für Rett-Patienten untersuchte und signifikante Verbesserungen im Kopfumfang der behandelten Patientengruppe nachweisen konnte (Enns und Cohen 2019). Und auch der oralen Behandlung mit ungesättigten ω -3-Fettsäuren konnte ein signifikant positiver Effekt auf die Krankheitssymptomatik bescheinigt werden (De Felice et al. 2012; Maffei et al. 2014).

Ob die Behandlung mit Antioxidantien und die damit einhergehende Verbesserung des Redox-Gleichgewichts auch einen positiven Effekt auf die epileptische Symptomatik im RTT hat, konnte in genannten Studien bisher nicht signifikant nachgewiesen werden. Doch die in den vorherigen Kapiteln erwähnten redoxmodulierten Ionen-Kanäle bzw. redoxgeschädigten Zellkomponenten unterstützen diesen Ansatz.

1.8 Ziel dieser Arbeit

Wie in den vorherigen Kapiteln der Einleitung beschrieben, ist die Konfrontation mit Epilepsie für den Großteil der Rett-Patienten alltägliche Realität. Antiepileptika mindern die

Krankheitslast zwar deutlich, sind aber weit davon entfernt, eine therapeutische Antwort auf die zu Grunde liegenden pathologischen Prozesse zu geben. Ob ein Cocktail aus antioxidativen Substanzen eine solche Antwort sein könnte, ist Fragestellung dieser Arbeit. Zum Einsatz kam dabei eine Kombination aus Vitamin E, α -Liponsäure sowie N-Acetyl-L-Cystein.

Als Bestandteil mehrerer *In-vivo*-Untersuchungen an MeCP2-defizienten (*Mecp2*^{-/-} oder Knockout) Mäusen dient diese Arbeit mit ihrer Fragestellung der präklinischen Beurteilung eines möglichen therapeutischen Potentials des Antioxidantien-Cocktails bei der Epilepsie-Symptomatik im Rett-Syndrom. Der Vergleich zu Wildtyp-Mäusen (WT) mit und ohne Behandlung sowie zu unbehandelten *Mecp2*^{-/-}-Tieren soll einen möglicherweise vorhandenen Benefit sichtbar machen.

2. Material und Methoden

2.1 Mausmodell

Für das RTT sind inzwischen hunderte ursächliche Mutationen bekannt, die verschiedenste Phänotypen bedingen. Folglich existieren mehrere Mausmodelle mit unterschiedlichen genetischen Modifikationen und entsprechenden Phänotypen, um Forschung zu diversen Fragestellungen zu ermöglichen (Guy et al. 2011).

Für diese Arbeit wurde das Mausmodell der Zuchtlinie B6.129P2(C)-*Mecp2*^{tm-1-1Bird} verwendet. Mit Hilfe des Cre-loxP-Systems, bestehend aus Rekombinasen und spezifischen Marker-Basensequenzen, werden die X-chromosomal lokalisierten Exons 3 und 4 des *Mecp2*-Gens herausgeschnitten, um Knockout-Mäuse zu generieren (Guy et al. 2001). Auf diese Weise genetisch veränderte heterozygote Weibchen wurden von der Arbeitsgruppe Müller für die Zucht von Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA) bezogen und mit C57BL/6J-Männchen (Wildtypen) gepaart. Daraus hervorgehende Folgegenerationen wurden mit Hilfe einer Schwanzbiopsie und Polymerase-Kettenreaktion (PCR) als weibliche Wildtypen, hemizygoten Männchen und heterozygote Weibchen genotypisiert.

Da bei den weiblichen Tieren starke Unterschiede in der Schwere des Phänotyps zu beobachten sind, bedingt durch die zufällig erfolgende Inaktivierung der X-Chromosomen, wurden für diese Arbeit ausschließlich hemizygoten Männchen für eine bessere Vergleichbarkeit untersucht, da diese einen schwereren und ähnlicheren Phänotypen entwickeln. Alle Tiere wurden im Lebensalter um ca. 50 Tage gemessen. Verringertes Körpergewicht, Atmungsunregelmäßigkeiten, ein verkleinertes Gehirnvolumen und verminderte motorische Aktivitäten in Form von unkoordiniertem Gangbild und Klammern der Hinterbeine sind bei den männlichen Phänotypen in diesem Alter klar zu erkennen gewesen (Guy et al. 2001).

Die Haltung und Pflege der Mäuse erfolgte zentralisiert für mehrere Institute der Universität Göttingen in der zentralen Tierexperimentellen Einrichtung (ZTE). Untergebracht waren die Tiere in Käfigen mit eigener Belüftung, um die aerogene Transmission potentieller Krankheiten zu verhindern. Ausgelegt mit Birkenstreu und mit ständigem Zugang zu gepresstem Futter und Wasser wurden die Tiere in einem zwölfstündigen Tag-Nacht-Rhythmus bei konstanter Temperatur gehalten. Die Separierung der Jungtiere eines Wurfes in gleichgeschlechtliche Gruppen erfolgte vor Eintritt der Geschlechtsreife gegen Ende der dritten Lebenswoche.

2.2 Behandlung mit Antioxidantien

Der Einsatz von Antioxidantien zur pharmazeutischen Reduktion des Redox-Ungleichgewichtes in Rett-Mäusen wird in der Arbeitsgruppe Müller schon länger verfolgt.

Das hierfür verwendete Vitamin E-Derivat Trolox wurde in früheren Versuchen entweder im zwei Tages Rhythmus über eine peritoneale Injektion verabreicht oder direkt auf den akuten Hirnschnitt gegeben (Janc und Müller 2014; Janc et al. 2016). Um vermehrten Stress für die behandelten Mäuse zu reduzieren wurde die unkomplizierte Zufütterung von Antioxidantien etabliert, was die Vergleichbarkeit zwischen den Versuchsgruppen mit und ohne Behandlung optimieren soll.

Das zur Behandlung der Redox-Imbalance eingesetzte Antioxidantien-Futter (AOF) wurde als Spezialanfertigung von ssniff Spezialdiäten GmbH (Soest) bezogen. Neben standardmäßigen Futterinhaltsstoffen sind als Zusätze Vitamin A, Vitamin D₃, Vitamin E, Vitamin K₃, Vitamin C, Eisen(II)-sulfat Monohydrat, Zinksulfat Monohydrat, Mangan(II)-sulfat Monohydrat, Kupfer(II)-sulfat Pentahydrat, Selen, Natriumselenit, Jod und Calciumiodat Anhydrat enthalten. Ergänzend zu den aufgeführten Substanzen ist das Futter mit 125 mg/kg Vitamin E als zellmembranständiger Radikalfänger, 2,5g/kg α -Liponsäure als Radikalfänger und Antioxidans sowie 2,5 g/kg N-Acetyl-L-Cystein als elementarer Bauteil für die Glutathionsynthese versetzt.

Die Fütterung mit dem AOF wurde mit dem Absetzen der Mäuse gegen Ende der dritten Lebenswoche begonnen, sodass diese bis zur Messung einen Monat auf das neue Futter gesetzt waren. Die Zucht der Rett-Mäuse, ihre Fütterung mit den Antioxidantien sowie die Herstellung und Verwendung der Hirnschnitte erfolgte im Rahmen der genehmigten Versuchsvorhaben G16/2177 sowie G17/2544.

2.3 Verwendete Lösungen

Das verwendete *artificial cerebrospinal fluid* (ACSF) imitiert die Eigenschaften des Liquors, um die Vitalität der sensiblen Gehirnzellen für die Zeit von einigen Stunden aufrecht zu erhalten und dadurch Messungen am isolierten Gewebe zu ermöglichen. Bestandteile des ACSF sind (in mM): 130 NaCl, 3.5 KCl, 1.25 NaH₂PO₄, 24 NaHCO₃, 1.2 CaCl₂, 1.2 MgSO₄, 10 Dextrose. Die kontinuierliche Begasung des ACSF mit Carbogen (95% O₂, 5% CO₂) stellte einen konstanten pH-Wert um 7.4 sicher.

Für das Provozieren der Krampfanfälle wurden drei unterschiedliche Lösungen verwendet. Die eine Lösung entsprach dem normalen ACSF mit veränderten Elektrolyte-Werten. Das Magnesium wurde auf 0.25 mM abgesenkt, während das Kalium auf 5 mM angehoben wurde. Durch das erhöhte Kalium extrazellulär wird das Ruhemembranpotential der Neurone depolarisiert und damit dem Schwellenpotential angenähert. Gleichzeitig begünstigt die niedrige Magnesiumkonzentration extrazellulär die Öffnung postsynaptischer NMDA-Rezeptoren.

In 250 ml dieses modifizierten ACSFs wurden für die zweite Lösung 5mM Bicucullin (gelöst in 0.9%tigem NaCl) gegeben, um eine 10 μ M Endkonzentration zu erhalten. Bicucullin

gehört zur Substanzgruppe der Alkaloide und vermindert als GABA-Rezeptorantagonist die antikonvulsive Wirkung inhibitorischer Transmitter.

Als besonders stark krampffördernde Droge wurde 4-Aminopyridin (4-AP) mit einer Endkonzentration von 100 μM in ACSF gelöst. 4-AP ist ein potenter K^+ -Kanalblocker, der das Aufrechterhalten des Ruhemembranpotentials erschwert.

2.4 Herstellung der akuten Hirnschnitte

Die für die Messungen benötigten akuten Hirnschnitte wurden in einem mehrschrittigen Ablauf hergestellt. Zu Beginn wurde die Maus gewogen und dann in einem Exsikkator mit Diethylether betäubt, vermessen und mit einer Schere dekapitiert. Diese Schritte wurden durch entsprechend autorisierte Mitarbeiter durchgeführt. Zum Isolieren des Gehirns wurde nach der Durchtrennung von Fell und Gewebe die Kalotte von kaudal ausgehend bis zum Gesichtsschädel vorsichtig gespalten, das Gehirn mit einem Spatel herausgelöst und in vorgekühltem und begastem ACSF zwischengelagert. Zeitgleich wurden drei Kapillaren zur Bestimmung des Hämatokrit befüllt sowie der Blutglukosespiegel gemessen.

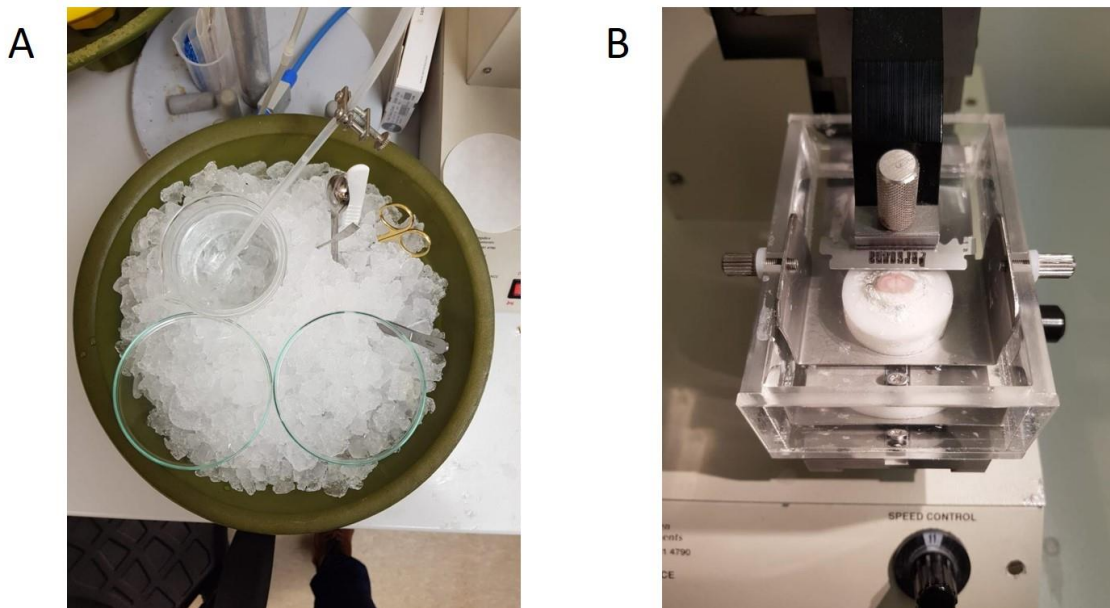


Abbildung 1: Herstellung der Gehirnschnitte. A) Die zur Präparation des Gehirns verwendeten Utensilien sowie das benötigte ACSF wurden auf Eis heruntergekühlt. B) Blick auf das Gehirn, das auf den Schneideblock geklebt und dann in die mit ACSF gefüllte Kammer eingehängt wurde. Unter langsamen Vorschub der Kammer gegen die vertikal schwingende Klinge des Vibroslicers konnten 400 μm dünne Schnitte gewonnen werden.

Um Schnitte mit der im medialen Großhirn lokalisierten Hippocampusregion zu erhalten wurden sowohl Cerebellum und Hirnstamm als auch der Frontalcortex mit dem Skalpell abgetrennt und aus dem verbleibenden Anteil 400 μm dünne Schnitte mit dem Vibroslicer (Campden Instruments, 752M Vibroslice) gefertigt. Die Hemisphären der erhaltenen

Schnitte wurden sagittal voneinander getrennt und schnellstmöglich in die begaste und mit ACSF durchspülte Vorratskammer gelegt, wo sie 90 Minuten ruhten.

2.5 Versuchsaufbau

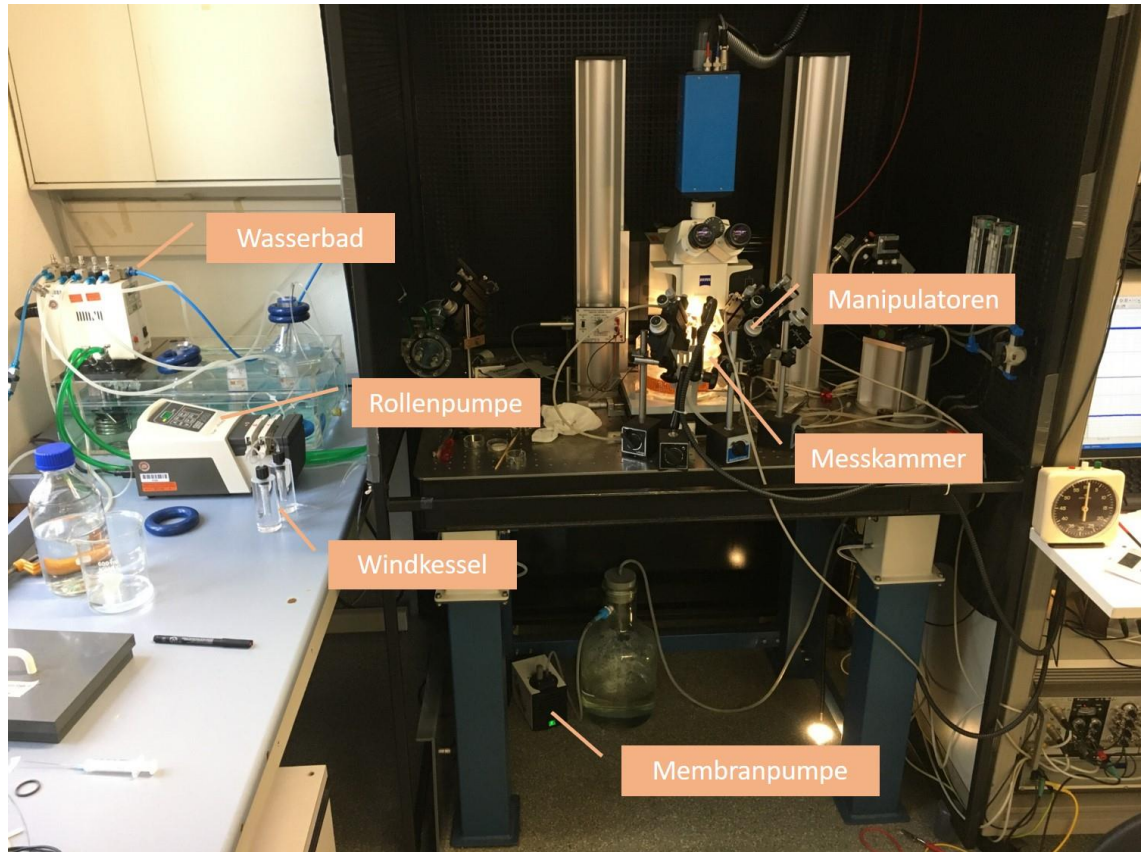


Abbildung 2: Übersichtsaufnahme des Versuchsaufbaus. Abgebildet und beschriftet sind die wesentlichen Bestandteile des Versuchsaufbaus.

Für die elektrophysiologische Messung der Hirnschnitte wurde ein spezielles Set-Up verwendet, in dem die eigens von der Institutswerkstatt angefertigte Interface-Messkammer vom Oslo-Typ das Herzstück bildet. Sie besteht aus zwei identischen, voneinander getrennten Kammern, die mit runden Nylonnetzen bestückt sind. Auf diese wurden die Hirnschnitte gelegt, die von unten mit begastem ACSF umspült (3-4ml/min), durch die Gasphase in der Kammer mit Sauerstoff versorgt und mit einem Heizstreifen in der Kammerwand bei 35 Grad warmgehalten wurden. Das ACSF und die eingesetzten krampfstimulierenden Lösungen wurden in einem Wasserbad (40 Grad) (Thermo Scientific, Haake DC10) erwärmt, mit Carbogen begast und mittels einer Rollenpumpe (Watson Marlow 205U, 30 Umdrehungen/min) über zwischengeschaltete Windkessel zur Flussoptimierung in die Kammern gefördert. Von dort saugte eine Membranpumpe (*vacuum gas pump* von VWR) die Flüssigkeiten ab. Die Ableitung der extrazellulären Feldpotentiale erfolgte durch mit ACSF befüllte Elektroden, die aus Glaskapillaren (Clark Glass, Harvard Apparatus, borosilicate glass capillaries, GC150TF-10) gezogen wurden und über Messköpfe

auf Manipulatoren befestigt waren. Über zwischengeschalteten Onset-/Offset-Regler und Analog-/Digitalwandler (Digidata) konnten die gemessenen Daten digital als Messspuren in der pClamp-Software aufgezeichnet werden. Für die elektrophysiologischen Messungen kam jeweils eine Abtastrate von 20 kHz zur Anwendung.

2.6 Ablauf der Messung

Vor Beginn der Messung wurden Schläuche und Kammer des Versuchsaufbaus mit Wasser vorgespült, bis kurz vor Start der Gehirnpräparation auf begastes ACSF gewechselt wurde. Die erzeugten Hirnschnitte wurden in der Vorratskammer auf das Netz gelegt, wo sie 90 Minuten ruhten. Zeitgleich mit dem Einlegen der Schnitte wurden die Begasung der Kammer mit Carbogen (300 ml/min) sowie der Heizstreifen eingeschaltet. Nach Ablauf der Ruhezeit wurde jeweils ein Schnitt aus der Vorratskammer auf das Netz der Messkammer überführt und ausgerichtet. Unter mikroskopischer Kontrolle wurden die drei Elektroden im Hippocampus in das *Stratum radiatum* des *Cornu ammonis 1* (CA1) und des *Cornu ammonis 3* (CA3) sowie im Cortex in die *Lamina pyramidalis interna* gesetzt und die Aufzeichnung der Messung begonnen.

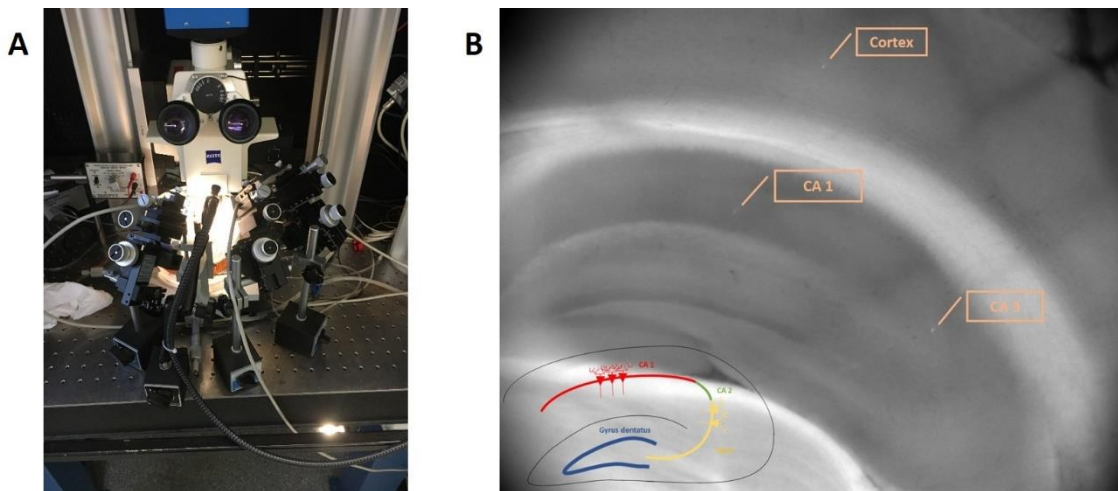


Abbildung 3: Positionierung der Elektroden im Hirnschnitt. A) Die auf Manipulatoren montierten Elektroden wurden unter mikroskopischer Sicht im Hirngewebe platziert. B) Das Bild zeigt die Elektroden in den Arealen CA 1 und CA 3 des Hippocampus sowie im Cortex. Links unten veranschaulicht eine schematische Darstellung die Hippocampusregion. Der Bildausschnitt zeigt eine Größe von 3,61 x 2,68 mm.

Der Zufluss zur Messkammer wurde nun von ACSF auf die krampfstimulierende Lösung (Bicucullin 10 μ M, 4-AP 100 μ M oder erniedrigtes Mg 0.25 mM in Kombination mit erhöhtem Kalium 5 mM) umgesteckt und die Reaktion der drei Hirnregionen aufgezeichnet. Pro Maus wurden nach Möglichkeit vier Schnitte gemessen. Beendet wurde die Messung, wenn sich innerhalb der letzten zehn Minuten ein Steady-State angedeutet hatte, also keine

offensichtlichen Veränderungen im Hinblick auf Ort, Frequenz und Amplitude der Entladungsereignisse mehr zu sehen war.

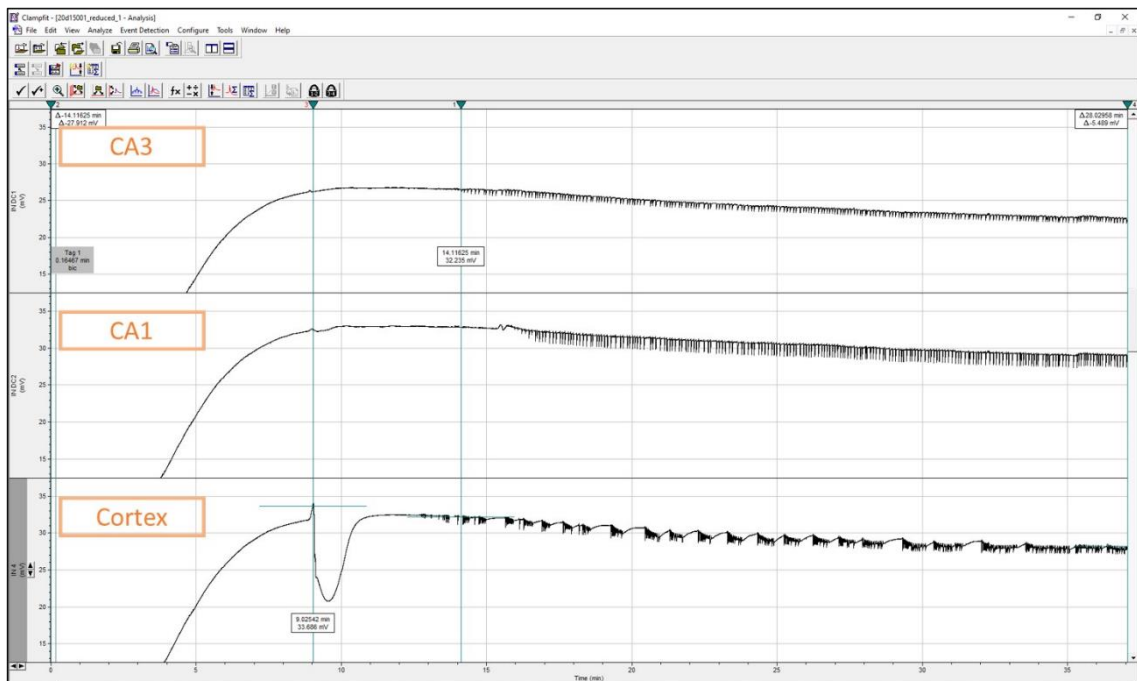


Abbildung 4: Beispielhafte Messregistrierung. Abgebildet sind die aufgezeichneten Messspuren für die drei untersuchten Hirnregionen in der Software Clampfit. In diesem Beispiel wurden im Hirnschnitt einer Knockoutmaus durch den GABA-Inhibitor Bicucullin Entladungen induziert. Nach neun Minuten trat im Cortex eine *spreading depression* auf, kurz darauf waren die ersten Krampfentladungen in den Hippocampusregionen CA1 und CA3 zu beobachten. Die anfängliche Potentialverschiebung entstand bei den Versuchen durch einen Einwascheffekt des Bicucullins auf die Referenzelektroden, der nicht mit der eigentlichen Messung interferierte.

Um vergleichbare Bedingungen für folgende Schnitte zu schaffen, wurde nach Beendigung der Messung die Messkammer für 15 Minuten mit ACSF durchspült, um die krampfstimulierende Lösung komplett aus dem System auszuwaschen.

2.7 Auswertung

Mit Hilfe der Software Clampfit 10.4 wurden die mit der pClamp-Software aufgezeichneten Messspuren aufgearbeitet und analysiert. Zunächst erfolgte eine Reduktion des Datensatzes um den Faktor 100 mit anschließender Filterung zur Verminderung aufgenommener Störgeräusche. Mit dem Tool „*Eventdetection-Threshold-Search*“ wurden alle Krampfentladungen der Spuren manuell detektiert und von dem Programm als grafische Ausschnitte und als Datentabelle zweiteilig gespeichert.

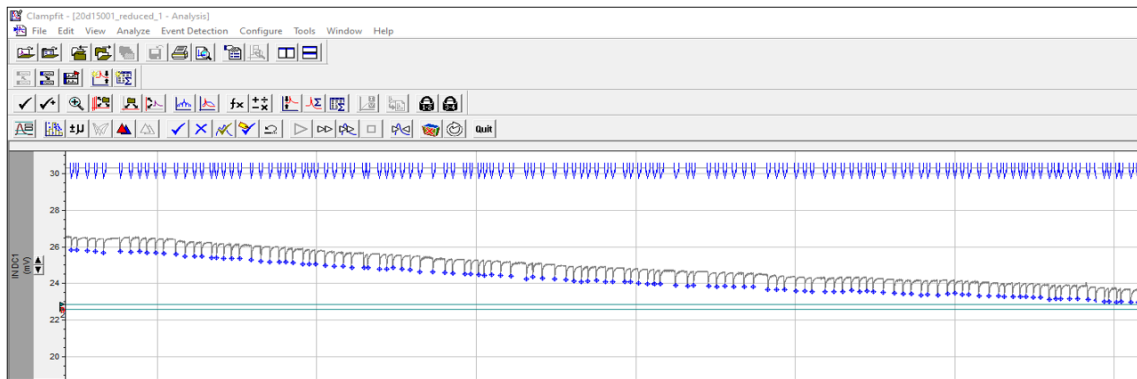


Abbildung 5: Eventdetection. Mit der Software Clampfit wurden für jede Spur manuell die Entladungen detektiert.

An den übereinandergelegten Event-Ausschnitten wurde der Betrag aus der Summe von negativem und positivem Ausschlag gebildet und so die Gesamtamplitude bestimmt. Frequenzen und Startzeiten ließen sich direkt aus den Datentabellen übernehmen.

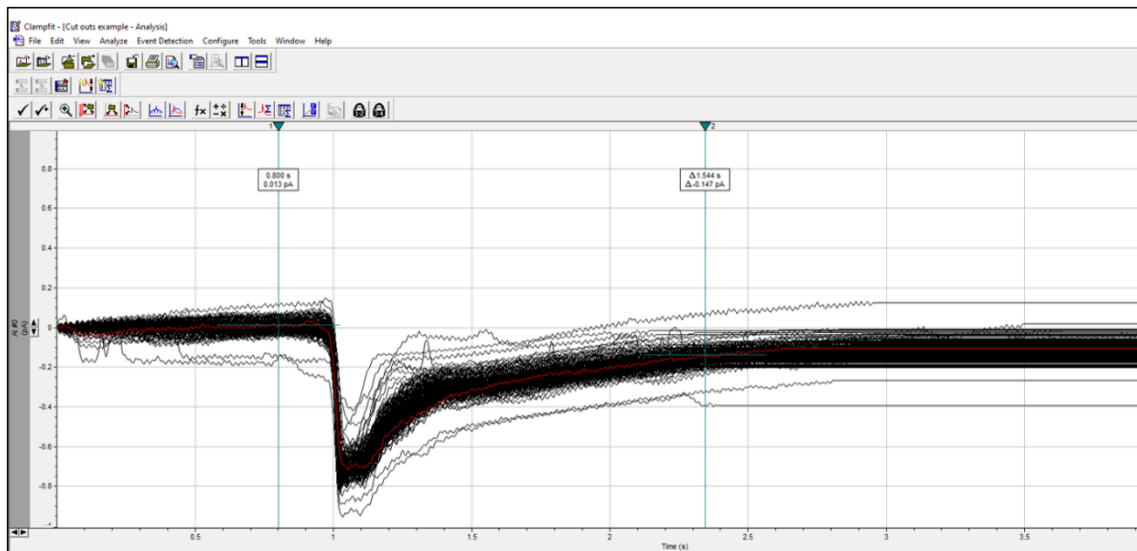


Abbildung 6: Auswertung der Entladungsamplituden. Die Ausschnitte der detektierten Events wurden mit Hilfe der Software Clampfit übereinandergelegt und hinsichtlich ihrer Amplitude ausgewertet.

In Microsoft Excel erfolgte die quantitative Auswertung und anschließende Darstellung der Daten als Histogramm für die Darstellung aller gemessenen Slices und als Balkendiagramm für die ermittelten Mittelwerte. Für die Balkendiagramme wurden die Datenreihen für jeden Slice gemittelt und aus den so gewonnenen einzelnen Mittelwerten ein repräsentativer und besser vergleichbarer Mittelwert mit zugehöriger Standardabweichung für die Gesamtheit der Slices einer Versuchsgruppe gebildet. Aufgrund der großen Streuweite der gemessenen Daten wurden Messungen, deren mittleren Werte außerhalb der doppelte SD der zugehörigen Gesamtgruppe lagen, im Zuge der Auswertung ausgeschlossen.

2.8 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Statistikprogramm SigmaStat 3.5 (Systat Software GmbH). Aufgrund vorheriger Arbeiten an dem Mausmodell konnte eine Normalverteilung der Daten angenommen werden, sodass zur besseren Vergleichbarkeit die Mittelwerte pro gemessenem Hirnschnitt gebildet wurden. Da die Gruppen mit dem Genotyp und der Fütterung durch zwei voneinander unabhängige Variablen gekennzeichnet sind, wurde eine *two-way* ANOVA durchgeführt. Statistisch signifikante Unterschiede wären mit Sternchen (*) für die entsprechenden Signifikanzniveaus gekennzeichnet worden. Für das 5%-Niveau ($p < 0,05$) mit einem Sternchen (*), für das 1%-Niveau ($p < 0,01$) mit zwei Sternchen (**) und für das 0,1%-Niveau ($p < 0,001$) mit drei Sternchen (***)

3. Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit ist es zu eruieren, ob die Behandlung mit Antioxidantien ein mögliches therapeutisches Potential im Hinblick auf die Epilepsie im RTT birgt. Zu diesem Zwecke wurden Wildtyp- und MeCP2-defiziente Mäuse unter Standard- und Antioxidantienfütterung untersucht. In angefertigten Hirnschnitten wurden Krampfentladungen provoziert, um diese mit Augenmerk auf einen möglicherweise vorhandenen Therapieeffekt auszuwerten. Zur Verwendung kamen dabei verschieden starke prokonvulsive Stimuli, unter denen sich vor allem 4-AP als potent krampfinduzierend herausstellte. Bicucullin konnte nicht in allen Versuchsgruppen verwertbare Krampfentladungen provozieren, sodass sich teilweise nur geringe Stichprobengrößen ergaben. Die verwendete Lösung mit herabgesetzter Magnesiumkonzentration konnte hingegen nicht zuverlässig Krampfentladungen provozieren und wird deshalb im Folgenden nur marginal behandelt.

Als Vergleichsparameter wurden die Frequenz und Amplitude der Krampfentladungen sowie das erste Auftreten der Entladungen im Hippocampus bzw. der *spreading depression* im Cortex festgelegt. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgt geordnet nach den untersuchten Parametern und in der Reihenfolge des Auftretens dieser im Rahmen der experimentellen Messungen.

3.1 Startzeit der Krampfentladungen

Nach Start der Messung und Beginn der Einwaschung der prokonvulsiven Lösung konnten nach einiger Zeit die ersten Veränderungen in Form von Krampfentladungen beobachtet werden. Die Startzeit der detektierten krampfähnlichen Entladungen als Parameter könnte Aufschluss über einen möglichen Effekt der AO-Fütterung geben. Wirkt sich das AOF hemmend auf die Krampfneigung der Tiere aus, wäre ein verzögerter Beginn der ersten gemessenen Entladung zu erwarten.

3.1.1 CA1

Abbildung 7 zeigt die mittlere Startzeit der ersten detektierten Entladung für die vier Versuchsgruppen unter Anwendung von Bicucullin. In der unbehandelte Wildtypgruppe setzten die Krampfentladungen im Mittel bei 847 ± 344 Sekunden, $n=7$, ein, während sie in der Knockoutgruppe mit 951 ± 310 Sekunden, $n=6$, bei Normalfütterung tendenziell später auftraten. Mit AOF behandelte Wildtypmäuse zeigten erste Entladungen bei 820 ± 676 Sekunden, $n=7$, und liegen damit ungefähr gleich auf mit der genotypisch identischen Kontrollgruppe bei deutlich größerer SD. Die behandelten Knockouttiere zeigten erste Entladungen im Mittel bei 876 ± 613 Sekunden, $n=7$, und somit tendenziell früher als die unbehandelte Knockoutgruppe. Auch hier zeigten die Messungen in der AO-Gruppe eine deutlich größere SD der erhobenen Daten. Sowohl die große Streuung der gemessenen

Startzeiten als auch der Unterschied zwischen Wildtyp- und Knockoutkontrollgruppe erschweren die Interpretation der Daten.

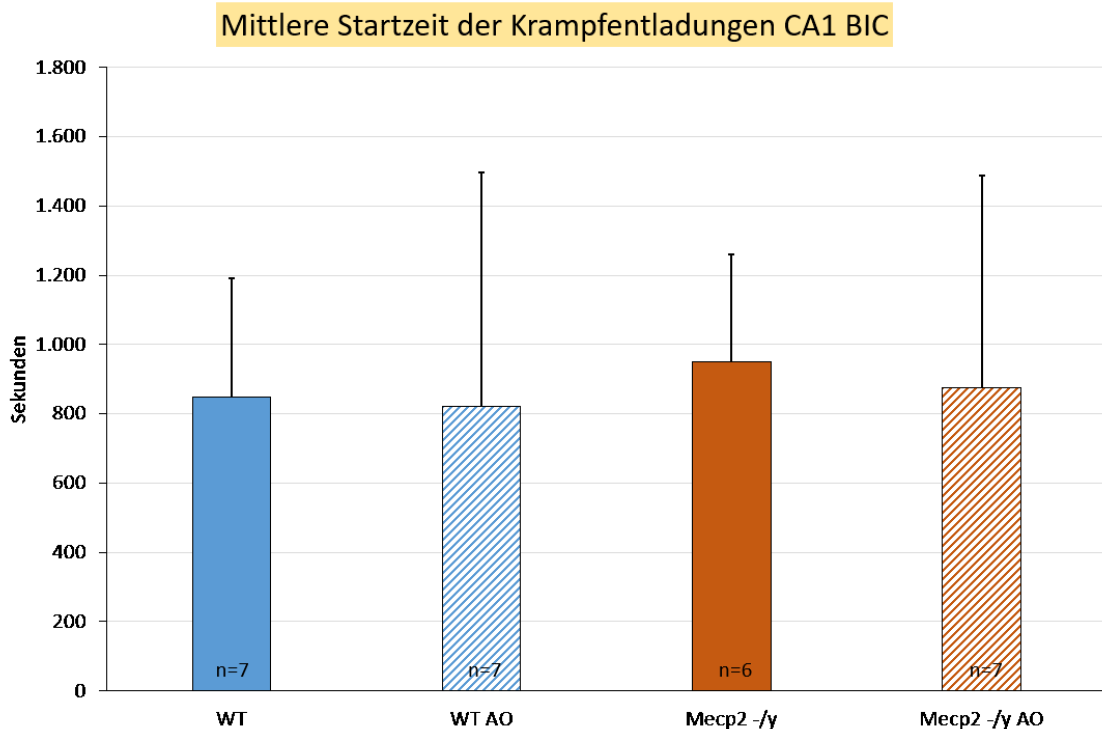


Abbildung 7: Mittlere Startzeit der ersten Krampfantladung in der Hippocampusregion CA1 während Applikation von Bicucullin (10 μ M). Dargestellt sind die Mittelwerte der Startzeiten je untersuchter Gruppe mit den zugehörigen Standardabweichungen als Fehlerindikatoren. Die Kennzeichnung der Tiergruppen erfolgt über Abkürzungen, die unverändert in den nachfolgenden Abbildungen des Ergebnisteils genutzt werden: Wildtyp (WT), Wildtyp mit Antioxidantienfutter (WT AO), Knockout (*Mecp2*^{-/y}) sowie Knockout mit Antioxidantienfutter (*Mecp2*^{-/y} AO). Die zugehörige Stichprobengröße n ist in den Balkendiagrammen eingetragen. Ein tendenziell früherer Entladungsbeginn in den Wildtypgruppen sowie eine größere SD in den behandelten Tiergruppen sind in dem vorliegenden Diagramm zu erkennen.

Die beobachteten Tendenzen aus den Versuchen mit Bicucullin deuten sich auch in den Ergebnissen der Messungen mit 4-AP an, zu sehen in **Abbildung 8**. Generell zeigte sich, dass die Krampfantladungen in Anwesenheit von 4-AP deutlich früher starteten als mit Bicucullin. Die Wildtypgruppe mit Normalfutter zeigte im Durchschnitt bei 368 ± 80 Sekunden, n=8, die ersten Entladungen, in der unbehandelten Knockoutgruppe traten diese nach 351 ± 120 Sekunden, n=13, auf. Die antioxidativ behandelten Wildtypen begannen im Mittel mit 384 ± 92 Sekunden, n=8, tendenziell etwas später als ihre Vergleichsgruppe zu krampfen, während die behandelte Knockoutgruppe bei 324 ± 84 Sekunden, n=10, erste Entladungen zeigte.

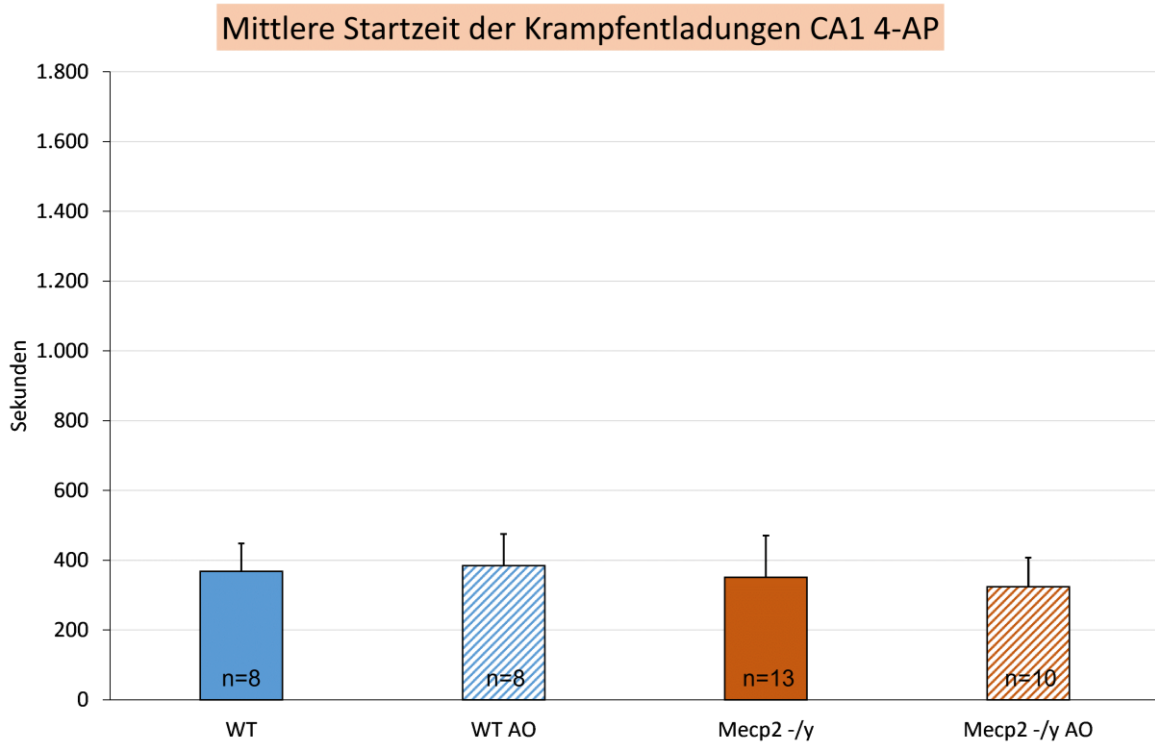


Abbildung 8: Mittlere Startzeit der ersten Krampfentladung in der Hippocampusregion CA1 unter Behandlung mit 4-AP (100 μ M). Unter AOF zeigen sich in den genotypisch unterschiedlichen Versuchsgruppen keine statistisch signifikanten Veränderungen im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe. Die Abkürzungen der Tiergruppen sind identisch mit denen in **Abbildung 7**.

3.1.2 CA3

In der Hippocampusregion CA3 zeigte sich mit Bicucullinprovokation eine Tendenz zu einem verspäteten Einsetzen der Krampfentladungen bei AO-Fütterung in der Wildtypgruppe. So trat in der Wildtypgruppe auf Normalfutter das erste detektierte Krampfereignis im Mittel bei 873 ± 303 Sekunden, $n=10$, auf, während die Knockouttiere erst bei 1133 ± 562 Sekunden, $n=8$, erste Entladungen zeigten. Unter Einwirkung von AOF betrug die durchschnittliche Startzeit innerhalb der Knockoutgruppe 814 ± 688 Sekunden, $n=6$. Die ebenfalls behandelte Wildtypgruppe begann hingegen mit 1160 ± 597 Sekunden, $n=4$, etwas später mit den ersten Krampfentladungen, wie in **Abbildung 9** dargestellt ist.

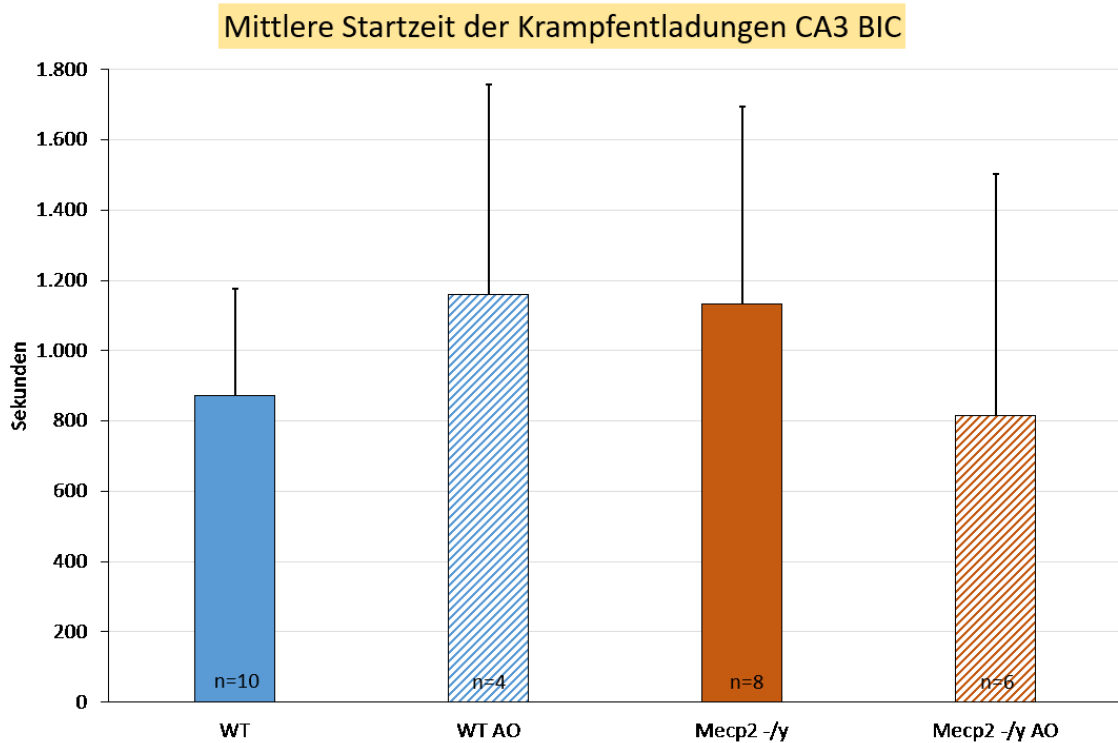


Abbildung 9: Mittlere Startzeit der ersten Krampfentladung in der Hippocampusregion CA3 während des Einwaschens von Bicucullin (10 μ M). Mit AOF setzten die Krampfentladungen im Vergleich der Wildtypgruppen untereinander tendenziell später ein, während es im Vergleich der Knockoutgruppen zu einem tendenziell verfrühten Beginn der Krampfaktivität in der behandelten Gruppe kam. Auffällig ist das durchschnittlich spätere Einsetzen der Krampfentladungen in der unbehandelten Knockoutgruppe im Vergleich zur Wildtypgruppe mit Normalfutter. Hier handelt es sich jedoch nur um Tendenzen, denn das Signifikanzniveau wurde nicht erreicht. Die Abkürzungen der Tiergruppen sind identisch mit denen in **Abbildung 7**.

Abbildung 10 zeigt für die Messungen unter Einwirkung von 4-AP mit 352 ± 66 Sekunden, $n=12$, und 343 ± 79 Sekunden, $n=9$, zwei ähnliche Mittelwerte für die Wildtyptiere ohne und mit AOF. Im Vergleich der Knockoutgruppen ist die Startzeit in der behandelten Gruppe mit 304 ± 64 Sekunden, $n=10$, im Gegensatz zu 360 ± 101 Sekunden, $n=15$, in der unbehandelten Gruppe tendenziell erniedrigt. Auffallend ist, dass, wie auch in den Ergebnissen aus CA1, bei Verwendung von 4-AP zur Krampfinduktion die Zeitpunkte der ersten Entladung in allen Gruppen nah beieinanderliegen.

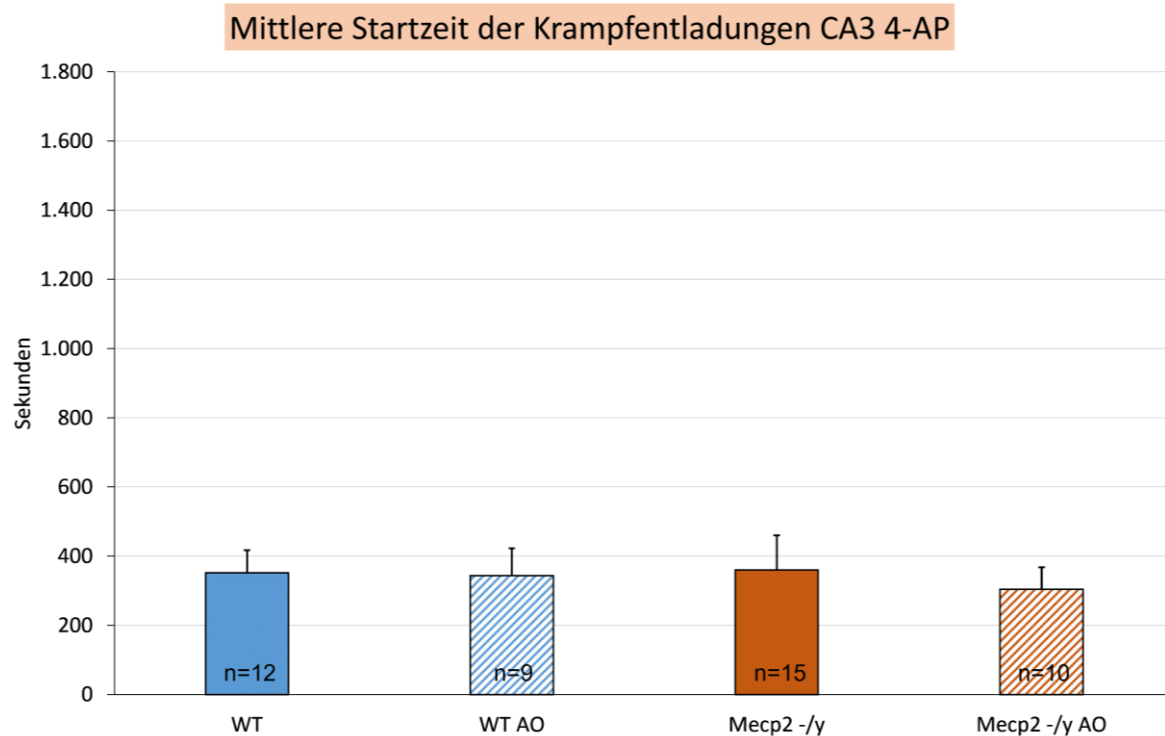


Abbildung 10: Mittlere Startzeit der ersten Krampfentladung in der Hippocampusregion CA3 während Applikation von 4-AP (100 μ M). Die mittleren Startzeiten der Krampfentladungen liegen in allen vier Versuchsgruppen nah beieinander. Statistisch signifikante Unterschiede ergaben sich weder zwischen den Genotypen, noch der Art der Fütterung. In der Knockoutgruppe zeigt sich lediglich ein tendenziell früheres Einsetzen der detektierten Entladungen mit AOF. Die Abkürzungen der Tiergruppen sind identisch mit denen in **Abbildung 7**.

3.2 Frequenzanalyse

Eine Änderung der Frequenz der Krampfentladungen könnte ein guter Indikator für eine mögliche Verbesserung der erhöhten Epileptizität im RTT sein. Die gemessenen Frequenzen wurden für jeden einzelnen Hirnschnitt gemittelt, um im Anschluss aus der Gesamtheit der Werte einen Mittelwert für die gesamte Versuchsgruppe zu bilden. Die Abweichungen der Mittelwerte der einzelnen Messungen von dem gemittelten Mittelwert sind als Standardabweichung in Form der Fehlerindikatoren in den Balkendiagrammen eingezeichnet.

3.2.1 CA1

Die Analyse der Entladungsfrequenzen in der Hippocampusregion CA1 zeigt sowohl für die Messungen mit Bicucullin als auch 4-AP eine tendenzielle Abnahme der Entladungsfrequenz bei Fütterung mit dem AOF. Aufgrund der großen Standardabweichung ergibt der Vergleich der Gruppen jedoch keine statistische Signifikanz.

In **Abbildung 11** sind die mittleren Frequenzen in den Tiergruppen unter Einwirkung von Bicucullin dargestellt. Die unbehandelte Wildtypgruppe zeigte eine durchschnittliche Entladungsfrequenz von $0,15 \pm 0,06$ Hz, $n=7$. Bei identischer Fütterung ergaben die Messungen in der Knockoutgruppe mit $0,21 \pm 0,2$ Hz, $n=6$ eine tendenziell etwas höhere Entladungsfrequenz bei dreifach größerer SD. In der Wildtypgruppe mit AO-Fütterung wurde eine durchschnittliche Entladungsfrequenz von $0,11 \pm 0,03$ Hz, $n=7$, registriert, die im Vergleich zur unbehandelten Gruppe tendenziell niedriger ausfällt. Auch die Gegenüberstellung der behandelten und nicht behandelten Knockoutgruppen zeigt eine tendenzielle Abnahme von Entladungsfrequenz und zugehöriger SD von $0,21 \pm 0,2$ Hz, $n=6$, auf $0,14 \pm 0,07$ Hz, $n=7$. Diese Verschiebung hin zu niedrigeren Frequenzen spiegelt sich in den Histogrammen aus **Abbildung 12** erkennbar wider. Auffallend sind hier die deutlich größeren Standardabweichungen in den Knockoutgruppen.

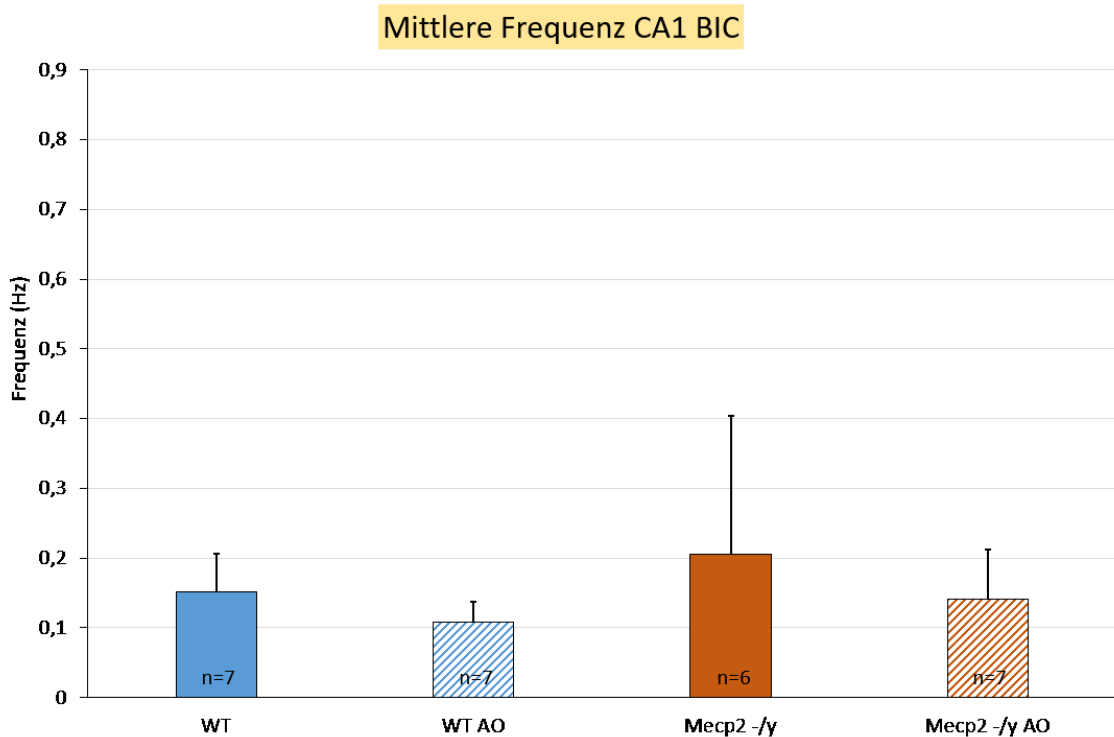


Abbildung 11: Mittlere Entladungsfrequenz in der Hippocampusregion CA1 unter Behandlung mit Bicucullin (10 μ M). Zunächst wurde für jeden Hirnschnitt ein Mittelwert der Entladungsfrequenzen berechnet, um daraus im Anschluss einen gemeinsamen Mittelwert für die gesamte Versuchsgruppe zu bilden. Mit AOF zeigt sich bei beiden Genotypen eine tendenzielle Verminderung von Entladungsfrequenz und zugehöriger SD. Im direkten Vergleich zwischen Wildtyp- und Knockoutgruppe zeigt sich ein Trend zu einer höheren durchschnittlichen Entladungsfrequenz in der Knockoutgruppe. Die Abkürzungen der Tiergruppen sind identisch mit denen in **Abbildung 7**.

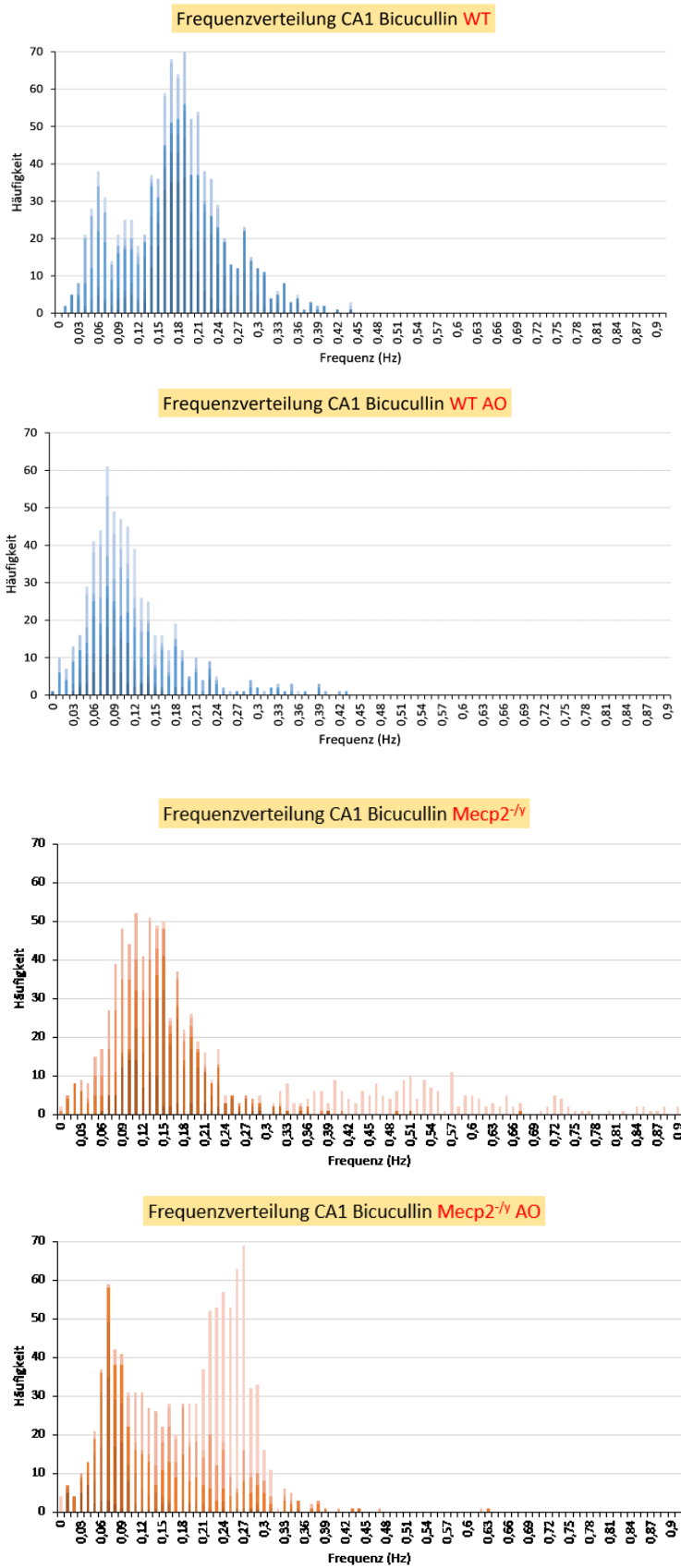


Abbildung 12: Frequenzverteilung aller Hirnschnitte in der Hippocampusregion CA1 während des Einwaschens von Bicucullin ($10 \mu\text{M}$). Dargestellt sind als Histogramme die summierten Häufigkeiten der Frequenzen aus allen gemessenen Hirnschnitten für je eine Versuchsgruppe. Jede Farbstufe im Histogramm repräsentiert einen einzelnen Hirnschnitt und zeigt so die Häufigkeitsverteilung der gemessenen Frequenzen je

Messung an. Die Abkürzungen der Tiergruppen sind identisch mit denen in **Abbildung 7**. Innerhalb der genotypisch identischen Versuchsgruppen zeigt sich in den vorliegenden Histogrammen eine Tendenz hin zur Verminderung der Entladungsfrequenzen unter Zufütterung von Antioxidantien. Das Signifikanzniveau wurde allerdings nicht erreicht.

Bei den Messungen mit 4-AP zeigte die Wildtypgruppe mit Normalfutter eine mittlere Entladungsfrequenz von $0,35 \pm 0,21$ Hz, $n=8$, die damit unter dem Wert von $0,42 \pm 0,23$ Hz, $n=13$, der unbehandelten Knockoutgruppe liegt. Unter Fütterung mit Antioxidantien zeigten beide Gruppen nur leichte Tendenzen hin zu niedrigeren Frequenzen, dargestellt in **Abbildung 13**. Die behandelte Wildtypgruppe unterscheidet sich bei einer durchschnittlichen Entladungsfrequenz von $0,32 \pm 0,12$ Hz, $n=7$, vor allem durch die verminderte SD von der Kontrollgruppe. In der Knockoutgruppe zeigt sich mit $0,33 \pm 0,11$ Hz, $n=10$, eine Tendenz zur Frequenzabnahme mit AOF, die aufgrund der hohen Streubreite der gemessenen Frequenzen und daraus folgender großer Standardabweichung jedoch relativiert betrachtet werden muss. Die Histogramme in **Abbildung 14** bilden die leichte Verschiebung der behandelten Knockoutgruppe hin zu niedrigeren Frequenzen ab, während sich die Verteilungen in den Diagrammen der Wildtypgruppen kaum unterscheiden.

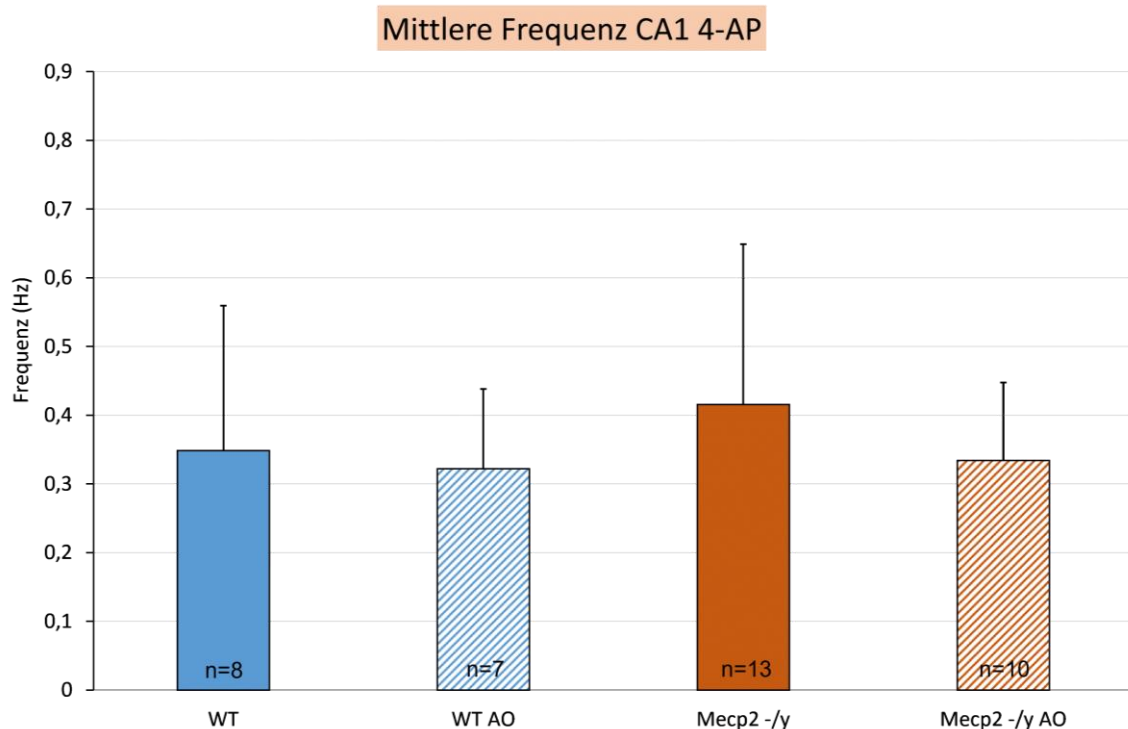


Abbildung 13: Mittlere Entladungsfrequenz in der Hippocampusregion CA1 während Applikation von 4-AP (100 μ M). Das Balkendiagramm zeigt die tendenziell höhere Entladungsfrequenz der Knockoutgruppen sowie die Tendenz zu niedrigeren Frequenzen mit AOF. Die Abkürzungen sind identisch mit denen in **Abbildung 7**.

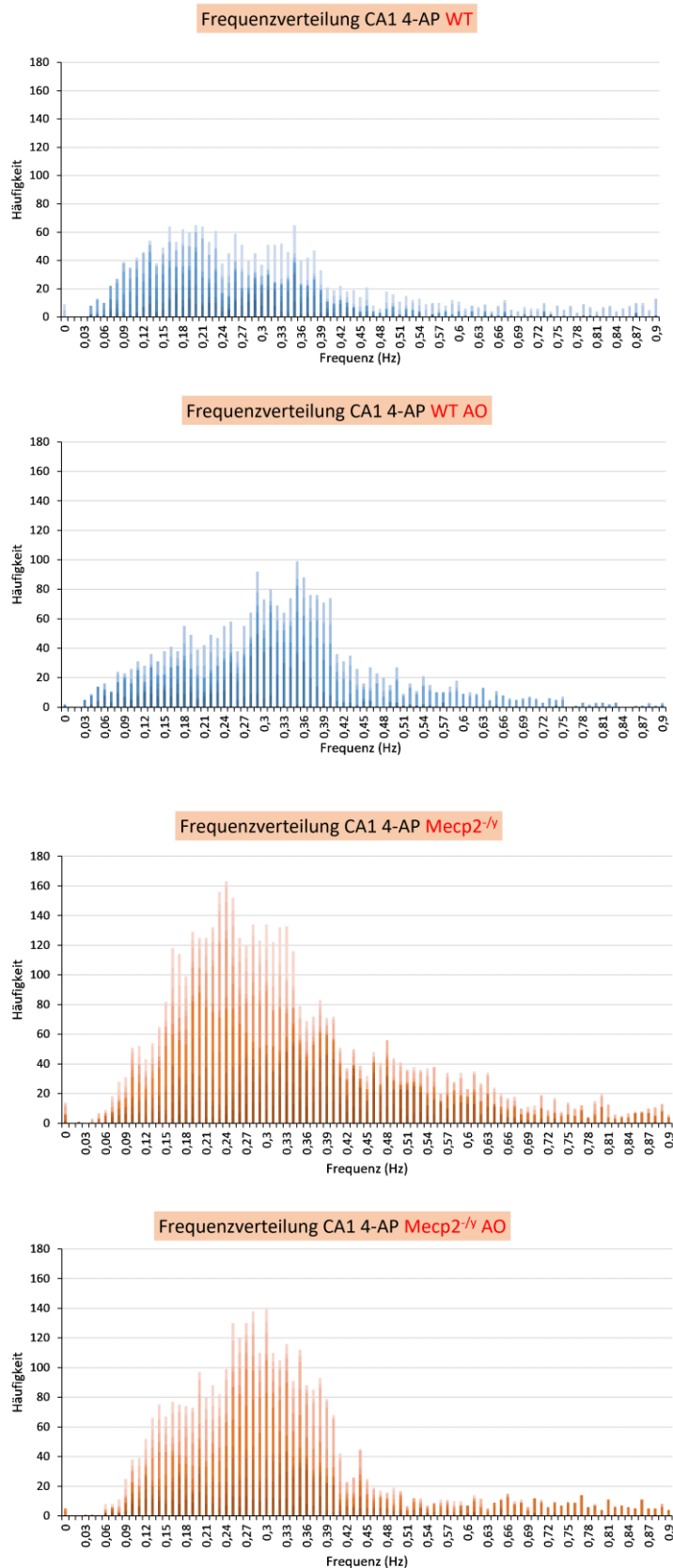


Abbildung 14: Frequenzverteilung aller Hirnschnitte in der Hippocampusregion CA1 unter Behandlung mit 4-AP (100 μ M). In den Histogrammen stellt sich vor allem die große Streubreite der gemessenen Entladungsfrequenzen dar. Die Abkürzungen der Tiergruppen sind identisch mit denen in **Abbildung 7**.

3.2.2 CA3

Die Ergebnisse in der Hippocampusregion CA3 ergeben hinsichtlich der Veränderungen der Frequenz für die Versuche mit Bicucullin und 4-AP ein zu den Ergebnissen aus CA1 ähnliches Bild.

Abbildung 15 zeigt die mittlere Frequenz der vier Versuchsgruppen unter Entladungsprovokation durch Bicucullin. Im Vergleich der unbehandelten Gruppen ergeben sich bei einer mittleren Entladungsfrequenz von $0,16 \pm 0,06$ Hz, $n=8$, für die Wildtypgruppe und $0,17 \pm 0,14$ Hz, $n=8$, für die Knockoutgruppe keine wesentlichen Unterschiede. Auffallend ist die größere SD in der Knockoutgruppe. Mit antioxidativer Behandlung zeigten beide Gruppen Tendenzen zu einer verringerten mittleren Entladungsfrequenz, die sich in den Histogrammen in **Abbildung 16** abbilden. So ergibt sich für die behandelten Wildtypmäuse eine durchschnittliche Frequenz von $0,13 \pm 0,04$ Hz, $n=4$, in der Knockoutgruppe zeigt sich eine Frequenz von $0,14 \pm 0,07$ Hz, $n=6$.

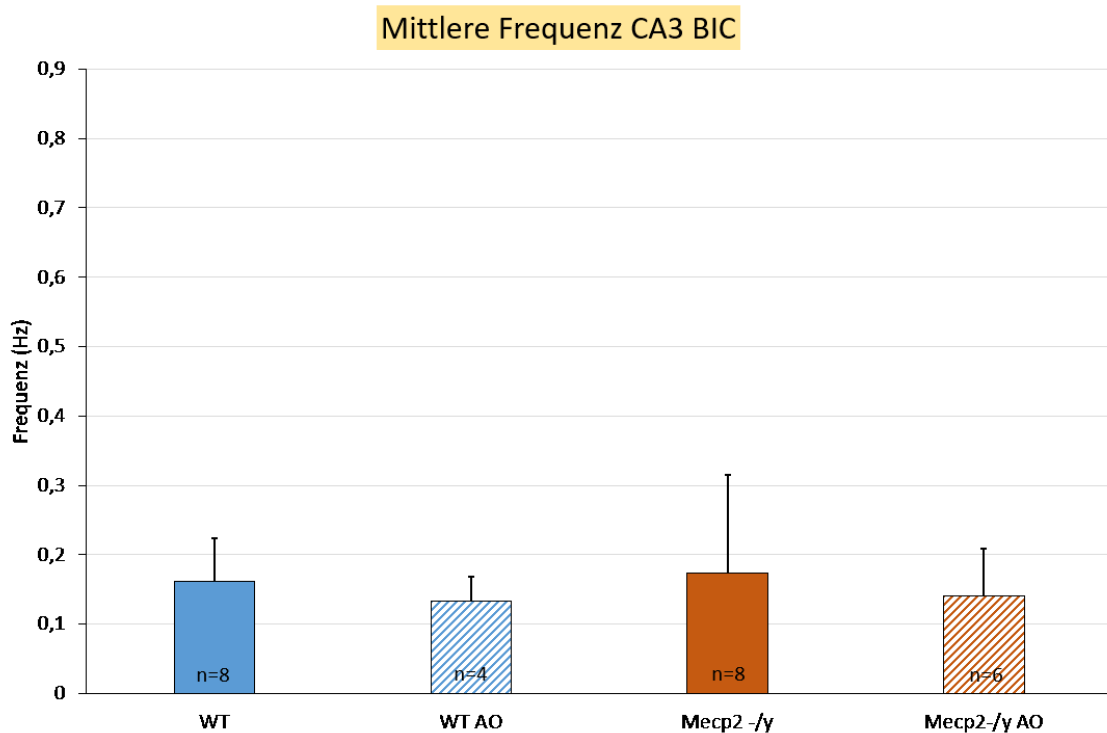


Abbildung 15: Mittlere Entladungsfrequenz in der Hippocampusregion CA3 während des Einwaschens von Bicucullin (10 μ M). Die behandelten Gruppen zeigen tendenziell eine verminderte durchschnittliche Entladungsfrequenz sowie eine verringerte SD. Die Abkürzungen der Tiergruppen sind identisch mit denen in **Abbildung 7**.

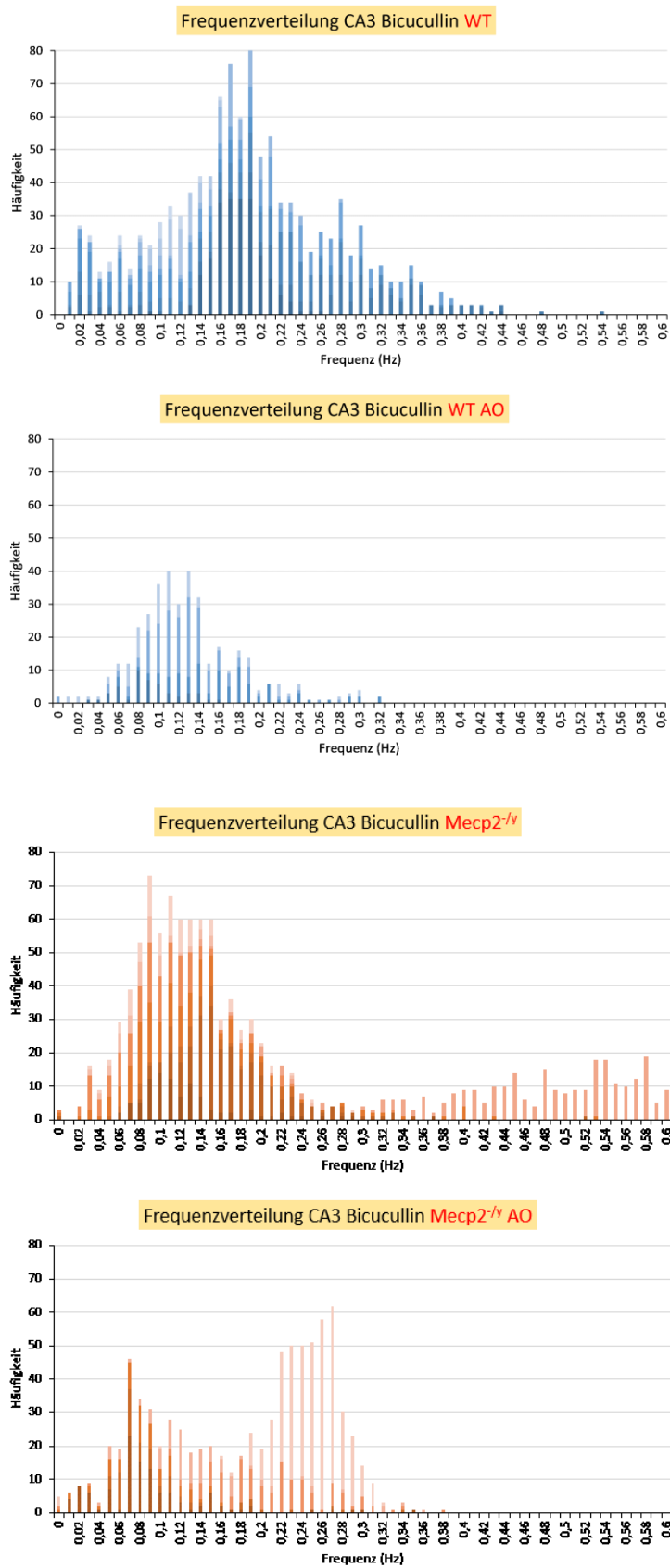


Abbildung 16: Frequenzverteilung aller Hirnschnitte in der Hippocampusregion CA3 während Applikation von Bicucullin ($10 \mu\text{M}$). Sowohl die Wildtyp- als auch Knockoutgruppen zeigen eine tendenzielle Verschiebung in niedrigere Frequenzbereiche unter Einwirkung von AOF. Die Abkürzungen der Tiergruppen sind identisch mit denen in **Abbildung 7**.

In **Abbildung 17** ist die mittlere Entladungsfrequenz in der Hippocampusregion CA3 unter Verwendung von 4-AP dargestellt. Die Kontrollgruppe der Wildtypen entlud mit $0,42 \pm 0,22$ Hz, $n=12$, im Mittel mit einer höheren Frequenz als die Knockoutgruppe mit $0,32 \pm 0,23$ Hz, $n=15$. Für die behandelte Wildtypgruppe ergaben sich Werte um durchschnittlich $0,51 \pm 0,32$ Hz, $n=9$, die im Vergleich zur Kontrollgruppe der unbehandelten Wildtypen in ihrer Tendenz unerwartet höher ausfielen. In der behandelten Knockoutgruppe änderte sich die mittlere Entladungsfrequenz mit $0,32 \pm 0,18$ Hz, $n=10$, bei leicht verringerter SD hingegen nicht. Dementsprechend gering sind die sichtbaren Veränderungen in den zugehörigen Histogrammen in **Abbildung 18**.

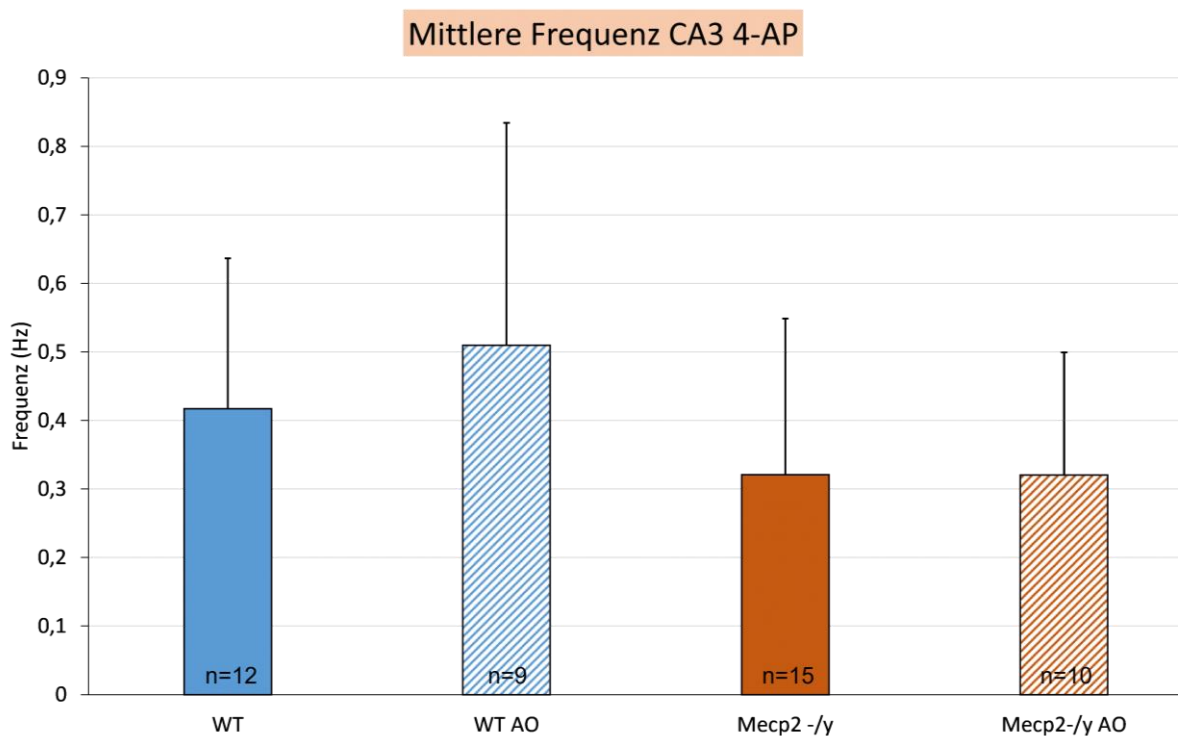


Abbildung 17: Mittlere Entladungsfrequenz in der Hippocampusregion CA3 unter Behandlung mit 4-AP (100 μ M). Auffallend ist die tendenziell höhere Entladungsfrequenz der Wildtypgruppe im Vergleich zu den Knockouttieren. Unter Zufütterung von Antioxidantien zeigt sich eine Tendenz zur Zunahme der Entladungsfrequenz in der Wildtypgruppe. Die Abkürzungen der Tiergruppen sind identisch mit denen in **Abbildung 7**.

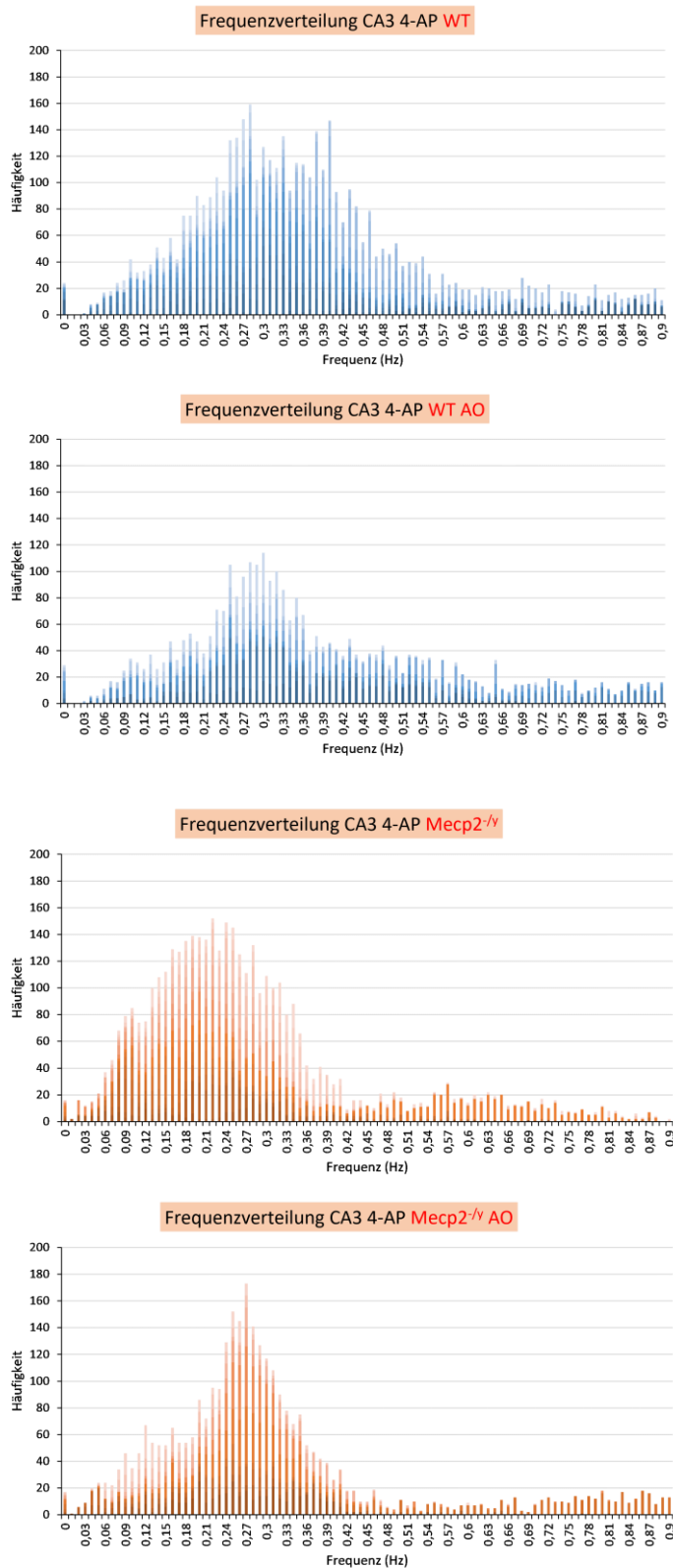


Abbildung 18: Frequenzverteilung aller Hirnschnitte in der Hippocampusregion CA3 während des Einwaschens von 4-AP (100 μ M). Die Histogramme zeigen eine breite Streuweite der gemessenen Frequenzen ohne Tendenzen hin zu niedrigeren Werten in den behandelten Gruppen. Die Abkürzungen der Tiergruppen sind identisch mit denen in **Abbildung 7**.

3.3 Amplitudenanalyse

Neben der zuvor betrachteten Frequenz könnten auch Veränderungen in der Amplitude der Entladungen Aufschluss darüber geben, ob die Fütterung mit Antioxidantien einen positiven Effekt auf das Krampfverhalten der untersuchten Tiergruppen hat. In diesem Fall wäre eine Abnahme der Amplitude unter der Antioxidantien-Fütterung als Ausdruck einer verminderten Übererregbarkeit zu erwarten. Wie auch bei den Ergebnissen zur Entladungsfrequenz wurden, unter Annahme einer Normalverteilung der Daten, zur besseren Vergleichbarkeit innerhalb einer Gruppe die Amplituden der einzelnen Messungen gemittelt, um aus den so erhaltenen Mittelwerten einen erneuten Mittelwert für die gesamte Versuchsgruppe zu bilden. Die Abweichungen der Mittelwerte der einzelnen Messungen von dem mittleren Mittelwert sind als Standardabweichung in Form der Fehlerindikatoren in den Balkendiagrammen eingezeichnet.

Im Folgenden sind die Ergebnisse aufgeteilt nach Hirnregion dargestellt.

3.3.1 CA1

Abbildung 19 zeigt die durchschnittlichen Amplituden für die vier Gruppen. Im Vergleich der unbehandelten Gruppen ist auffallend, dass die Wildtypen mit $1,66 \pm 0,48$ mV, $n=6$, eine tendenziell größere mittlere Amplitude als die Knockoutgruppe mit $0,89 \pm 0,82$ mV, $n=6$, zeigten. Unter Behandlung mit AOF lässt sich eine verminderte Amplitude mit $1,23 \pm 0,83$ mV, $n=7$, bei den Wildtypen beobachten, während die behandelte Knockoutgruppe mit $0,97 \pm 0,55$ mV, $n=6$, eine leichte Tendenz hin zu höheren Amplituden bei niedrigerer SD zeigt. In den Histogrammen in **Abbildung 20** ist zu erkennen, wie breit die Werte der Amplituden der unterschiedlichen Hirnschnitte gefächert sind, was auch Ausdruck in den großen Standardabweichungen aller vier Versuchsgruppen findet.

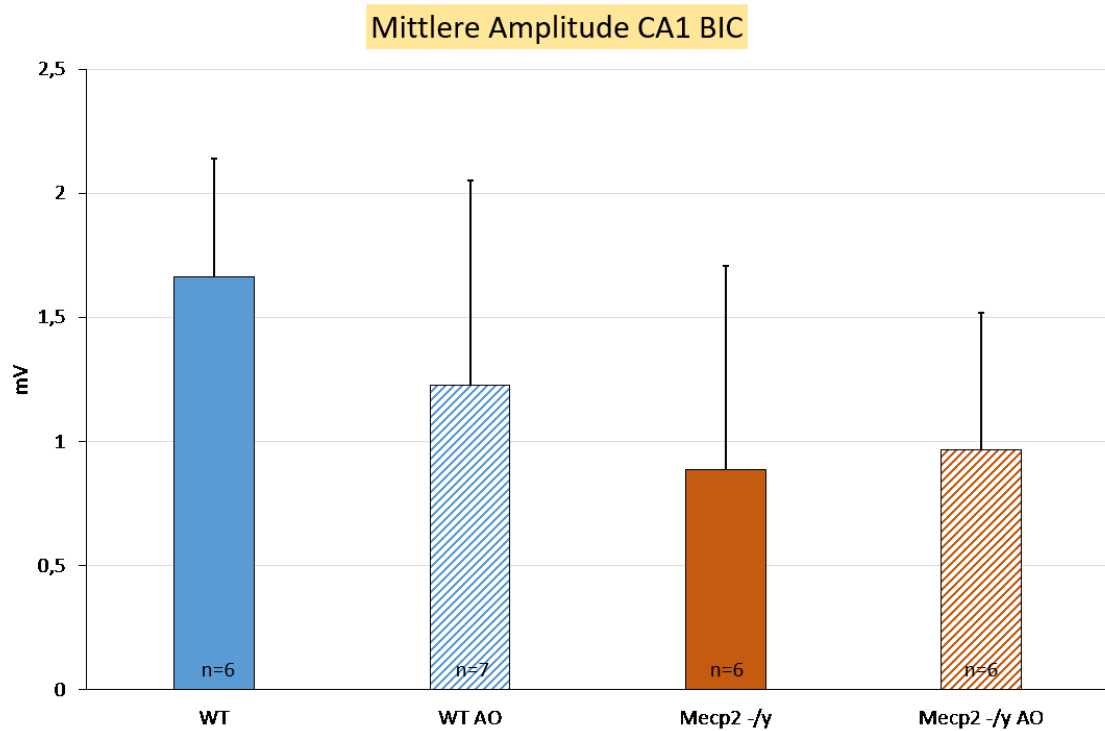


Abbildung 19: Mittlere Amplitude in der Hippocampusregion CA1 während Applikation von Bicucullin (10 μ M). Dargestellt ist der Mittelwert für die jeweilige Versuchsgruppe mit zugehöriger SD und Stichprobenanzahl n. Die gemessenen Amplituden wurden für jeden Hirnschnitt gemittelt, um daraus einen Mittelwert für die gesamte Gruppe zu bilden. Auffallend sind die tendenziell größeren Amplituden in den Wildtypgruppen sowie die gegenläufigen Tendenzen unter Behandlung mit AOF. Die Abkürzungen der Tiergruppen sind identisch mit denen in **Abbildung 7**.

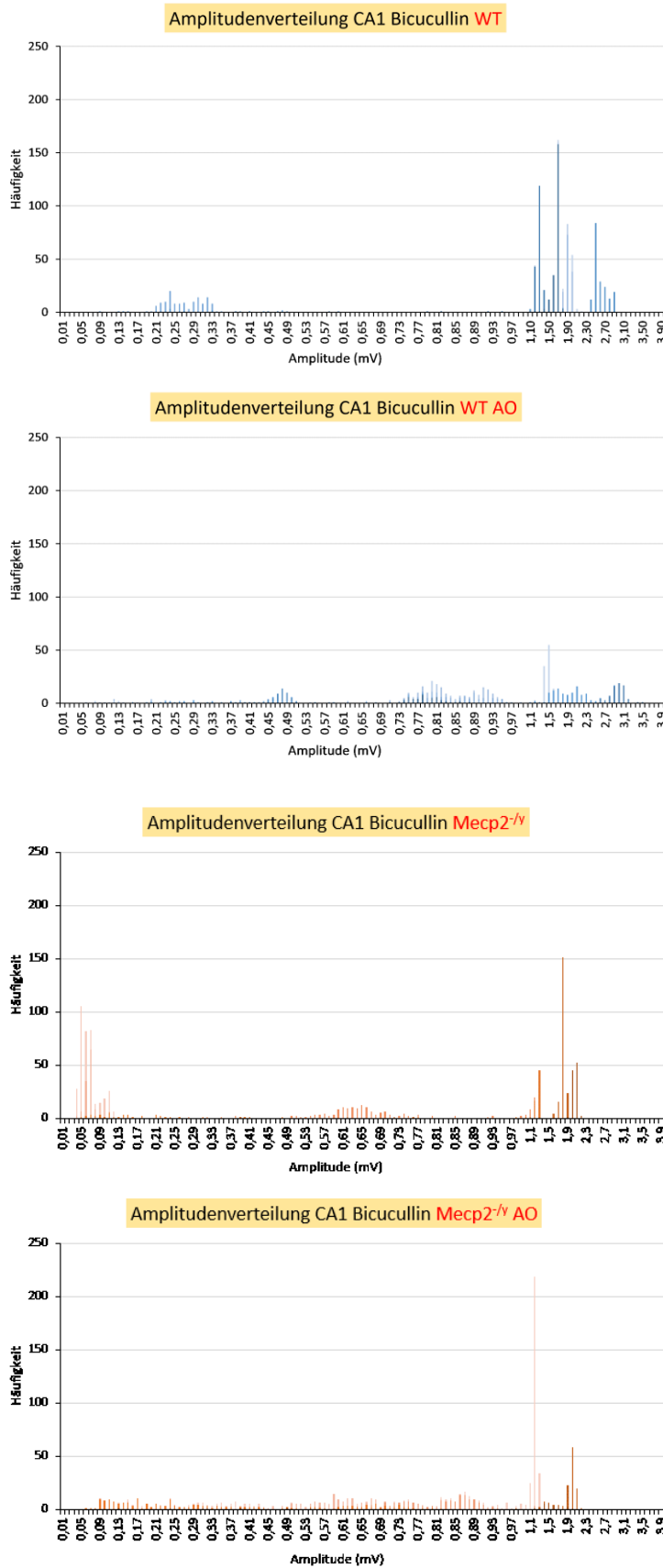


Abbildung 20: Amplitudenverteilung aller Hirnschnitte in der Hippocampusregion CA1 unter Behandlung mit Bicucullin (10 μ M). Dargestellt sind die summierten Häufigkeiten der Amplituden aus allen gemessenen Hirnschnitten für je eine Versuchsgruppe. Jede Farbstufe im Histogramm repräsentiert einen

einzelnen Hirnschnitt und zeigt so die Häufigkeitsverteilung der gemessenen Frequenzen je Messung an. Die Abkürzungen der Tiergruppen sind identisch mit denen in **Abbildung 7**. Auffallend ist die breite Verteilung der Amplituden innerhalb der Versuchsgruppen.

Die Versuche mit 4-Aminopyridin ergeben ein zu den mit Bicucullin umgekehrtes Bild für die Hippocampusregion CA1. So zeigt **Abbildung 21** mit mittleren Amplituden von $0,15 \pm 0,08$ mV, $n=9$, für die Wildtypgruppe und $0,14 \pm 0,07$ mV, $n=11$, in der Knockoutgruppe ähnliche Werte für die unbehandelten Gruppen. Die Wildtypen mit AOF liegen mit einer durchschnittlichen Amplitude von $0,19 \pm 0,05$ mV, $n=9$, über den mittleren Werten der unbehandelten Kontrollgruppe, während sich im Vergleich der Knockoutgruppen unter Behandlung mit Bicucullin eine schwache Tendenz hin zu niedrigeren Amplituden mit Werten um $0,12 \pm 0,06$ mV, $n=10$, zeigt. **Abbildung 22** veranschaulicht diese leichten Verschiebungen der Werte bei großer Streubreite.

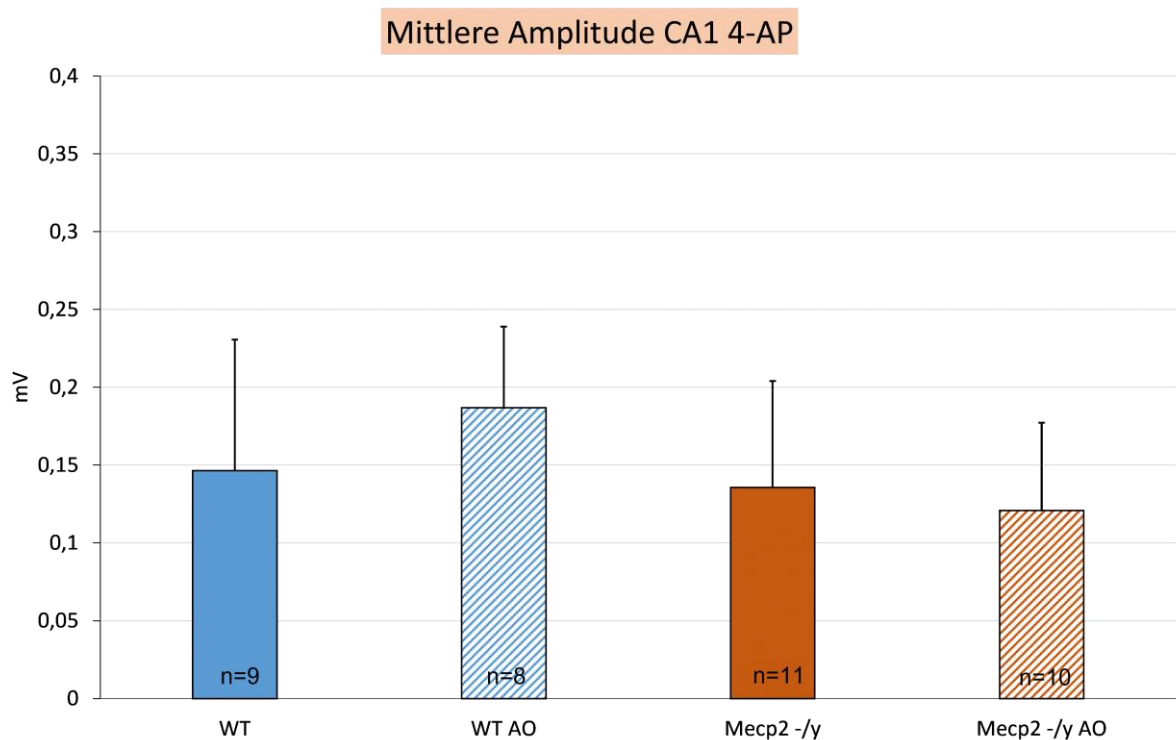


Abbildung 21: Mittlere Amplitude in der Hippocampusregion CA1 während des Einwaschens von 4-AP (100 μ M). Während die behandelte Wildtypgruppe eine tendenziell höhere Entladungsamplitude präsentiert, zeigt der Vergleich der Knockoutgruppen eine leichte Tendenz hin zu niedrigeren Amplituden unter Einwirkung von AOF. Die Abkürzungen der Tiergruppen sind identisch mit denen in **Abbildung 7**.

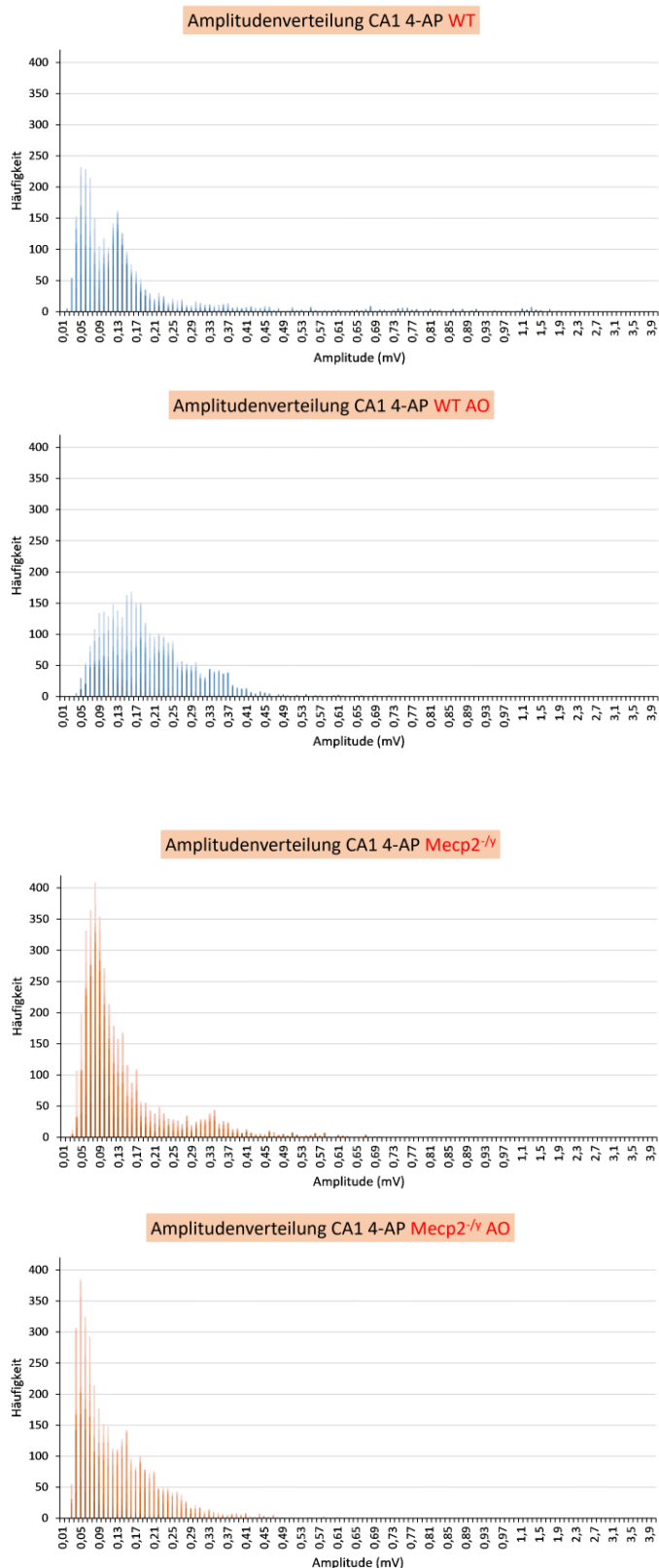


Abbildung 22: Amplitudenverteilung aller Hirnschnitte in der Hippocampusregion CA1 während Applikation von 4-AP (100 μ M). Die Histogramme bilden die leicht gegensätzliche Verschiebung der Amplitudenverteilung zwischen den genotypisch unterschiedlichen Gruppen ab. Die Abkürzungen der Tiergruppen sind identisch mit denen in **Abbildung 7**.

3.3.2 CA3

Abbildung 23 zeigt die mittleren Amplituden für die vier untersuchten Gruppen in der Hirnregion CA3 unter Bicucullin-Provokation. Auffällig ist die tendenziell etwas größere Amplitude von im Mittel $1,18 \pm 0,87$ mV, $n=7$, in der Wildtypgruppe mit Normalfutter neben dem erhobenen Wert von $0,89 \pm 0,92$ mV, $n=8$, für die unbehandelten Knockouttiere. Mit AOF zeigten sowohl die Mäuse mit als auch ohne MeCP2-defizienz deutlich geringere Amplituden, die aufgrund der großen SDs der unbehandelten Gruppen jedoch nicht signifikant verringert sind. Die Werte der behandelten Wildtypgruppe liegen bei $1,02 \pm 0,57$ mV, $n=4$, für die Knockoutgruppe mit antioxidativer Behandlung ergaben sich mittlere Amplituden von $0,46 \pm 0,31$ mV, $n=6$. Die große Varianz der gemessenen Amplituden zeigen die Histogramme in **Abbildung 24**.

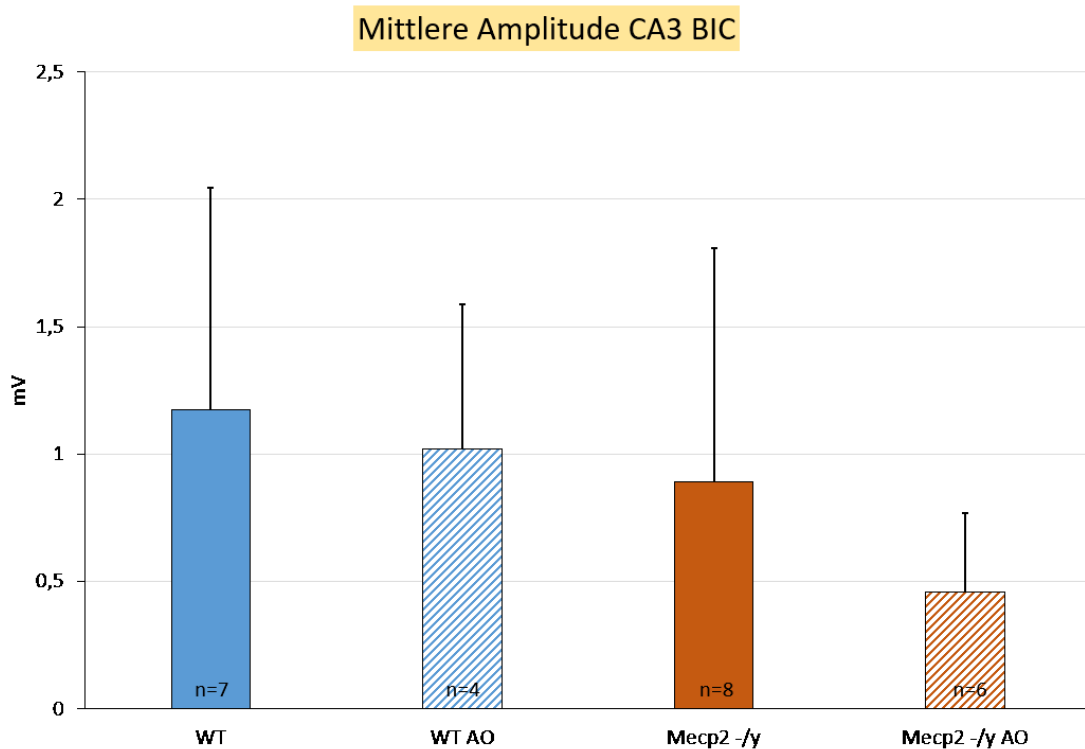


Abbildung 23: Mittlere Amplitude in der Hippocampusregion CA3 unter Behandlung mit Bicucullin (10 μ M). Die Entladungen der unbehandelten Wildtypgruppe zeigen im Mittel eine tendenziell größere Amplitude als die der Knockoutgruppe auf Normalfutter. Mit AOF behandelte Tiere beider Genotypen zeigen deutliche Tendenzen hin zu niedrigeren Amplituden bei verringerter SD. Die Abkürzungen der Tiergruppen sind identisch mit denen in **Abbildung 7**.

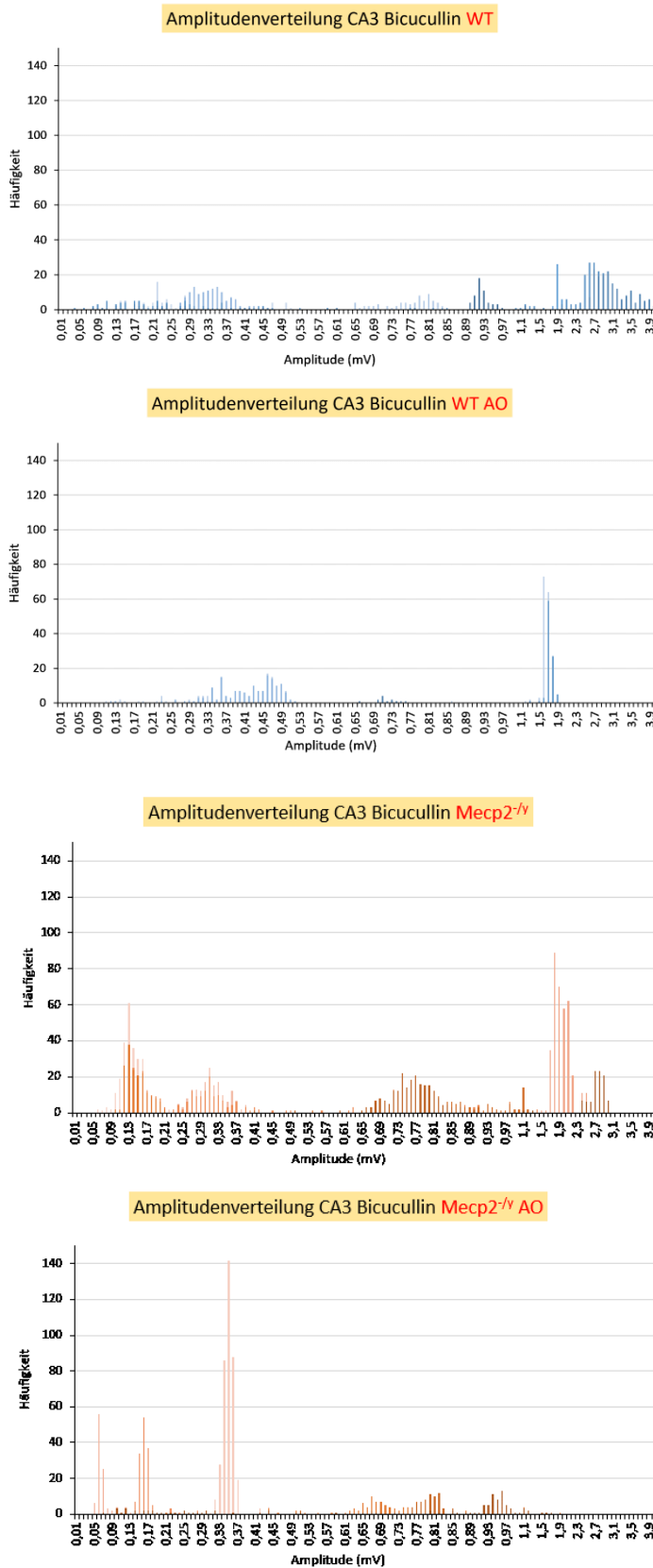


Abbildung 24: Amplitudenverteilung aller Hirnschnitte in der Hippocampusregion CA3 während des Einwaschens von Bicucullin (10 μ M). Die Histogramme der einzelnen Gruppen visualisieren die große Varianz der Entladungsamplitude zwischen den einzelnen Hirnschnitten innerhalb einer Gruppe. Die Abkürzungen der Tiergruppen sind identisch mit denen in **Abbildung 7**.

Auch die Ergebnisse der Messungen mit 4-AP zeigen Tendenzen hin zu einem leichten Rückgang der durchschnittlichen Amplitude unter Therapie mit dem AOF, zu sehen in **Abbildung 25**. Die unbehandelte Wildtypgruppe liegt mit Werten von $0,17 \pm 0,18$ mV, $n=12$, etwas unter der mittleren Amplitude der Knockoutkontrollgruppe mit $0,19 \pm 0,12$ mV, $n=13$. Unter AO-Fütterung zeigen die Wildtypgruppe mit $0,14 \pm 0,07$ mV, $n=8$, und die Knockoutgruppe mit $0,14 \pm 0,08$ mV, $n=9$, identische und im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollgruppen erniedrigte Amplitudenwerte, die aufgrund der großen SD jedoch nicht signifikant verringert sind. Die Histogramme in **Abbildung 26** unterstreichen die Tendenz zu niedrigeren Amplituden unter AO-Fütterung.

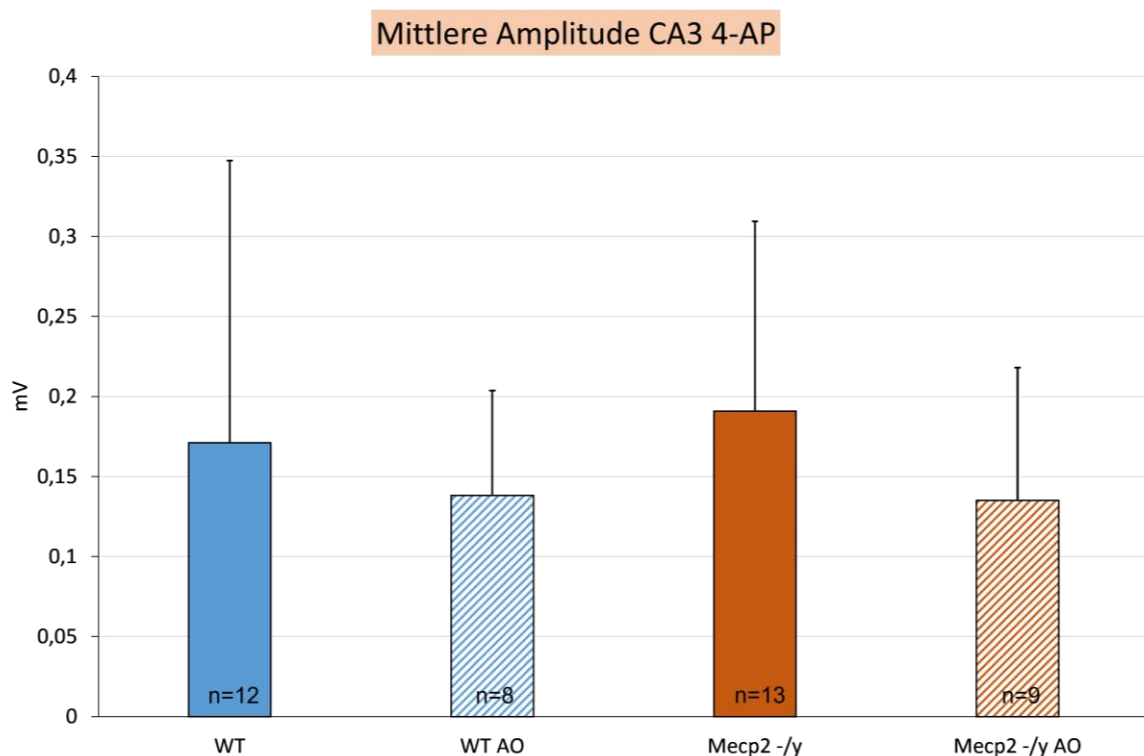


Abbildung 25: Mittlere Amplitude in der Hippocampusregion CA3 während Applikation von 4-AP (100 μ M). Sowohl Knockout- als auch Wildtypgruppe präsentieren unter Behandlung mit AOF tendenziell kleinere mittlere Amplituden mit verringerter SD. Die Abkürzungen der Tiergruppen sind identisch mit denen in **Abbildung 7**.

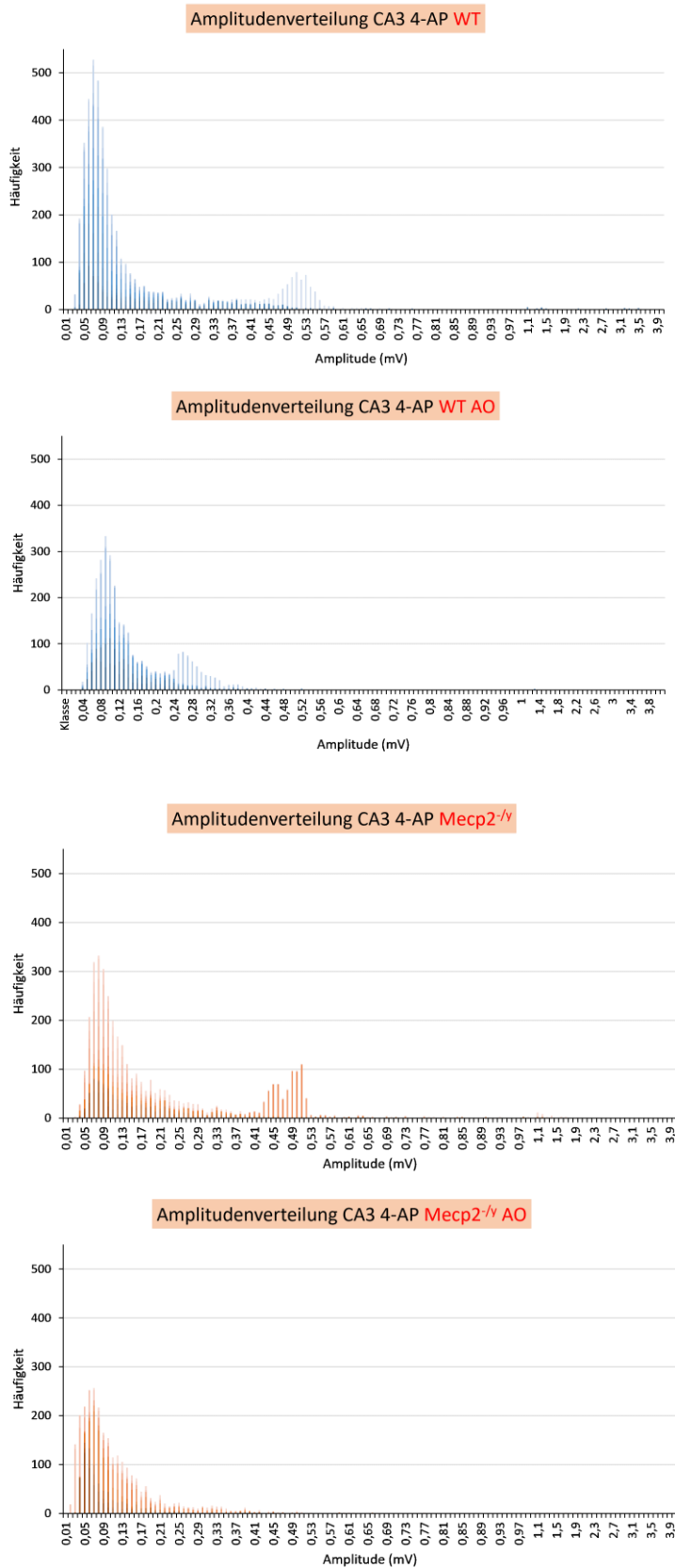


Abbildung 26: Amplitudenverteilung aller Hirnschnitte in der Hippocampusregion CA3 unter Behandlung mit 4-AP (100 μ M). Im Vergleich der genotypisch identischen Gruppen zeigt sich die Linksverschiebung der summierten Werte in den behandelten Gruppen hin zu niedrigeren Amplituden. Die Abkürzungen der Tiergruppen sind identisch mit denen in **Abbildung 7**.

3.4 *Spreading depression* im Cortex

Während die vorherigen Parameter allesamt auf die Entladungen in der Hippocampusregion angewendet wurden, sollen nun die parallel aufgezeichneten Beobachtungen aus der *Lamina pyramidalis interna* des Cortex näher betrachtet werden. Im Gegensatz zu den doch in Aussehen und Art sich ähnelnden Krampfentladungen in den Ableitungen des *Cornu ammonis*, stellte sich das Bild der aufgezeichneten Krampfentladungen im Cortex viel heterogener dar. Von keinen über unregelmäßig auftretende bis hin zu kontinuierlich gruppierten Entladungen stellte sich die Auswertung der Hirnschnitte hinsichtlich der Fragestellung nach einem möglichen Therapieeffekt durch das AOF schwierig dar. Auffallend war das Auftreten von *spreading depressions* in gut der Hälfte der gemessenen Hirnschnitte, die als Parameter für den Vergleich der Cortexableitungen der Tiergruppen ausgewählt und hinsichtlich des zeitlichen Musters ihres Auftretens ausgewertet wurden. Ein denkbarer Effekt der Fütterung wäre eine Erhöhung des mittleren Entladungszeitpunktes.

Abbildung 27 visualisiert die mittleren Startzeiten der ersten *spreading depressions* im Cortex unter Verwendung der Krampfentladungs-stimulierenden Lösung mit herabgesetzter Magnesiumkonzentration, die sich in der Hippocampusregion als nicht potent genug erwiesen hat, um dort zuverlässig Entladungen zu provozieren. Innerhalb der Wildtypgruppen lagen die Werte mit 1620 ± 728 Sekunden, $n=7$, bei Normalfutter und 1720 ± 495 Sekunden, $n=7$, mit AOF nah beieinander. Die Knockouttiere ohne Behandlung zeigten die erste *spreading depression* im Durchschnitt bei 2272 ± 830 Sekunden, $n=6$, und damit tendenziell später als die Wildtypkontrollgruppe. Unter Fütterung mit Antioxidantien lag der Wert für die Knockoutgruppe mit 1789 ± 723 Sekunden, $n=6$, darunter.

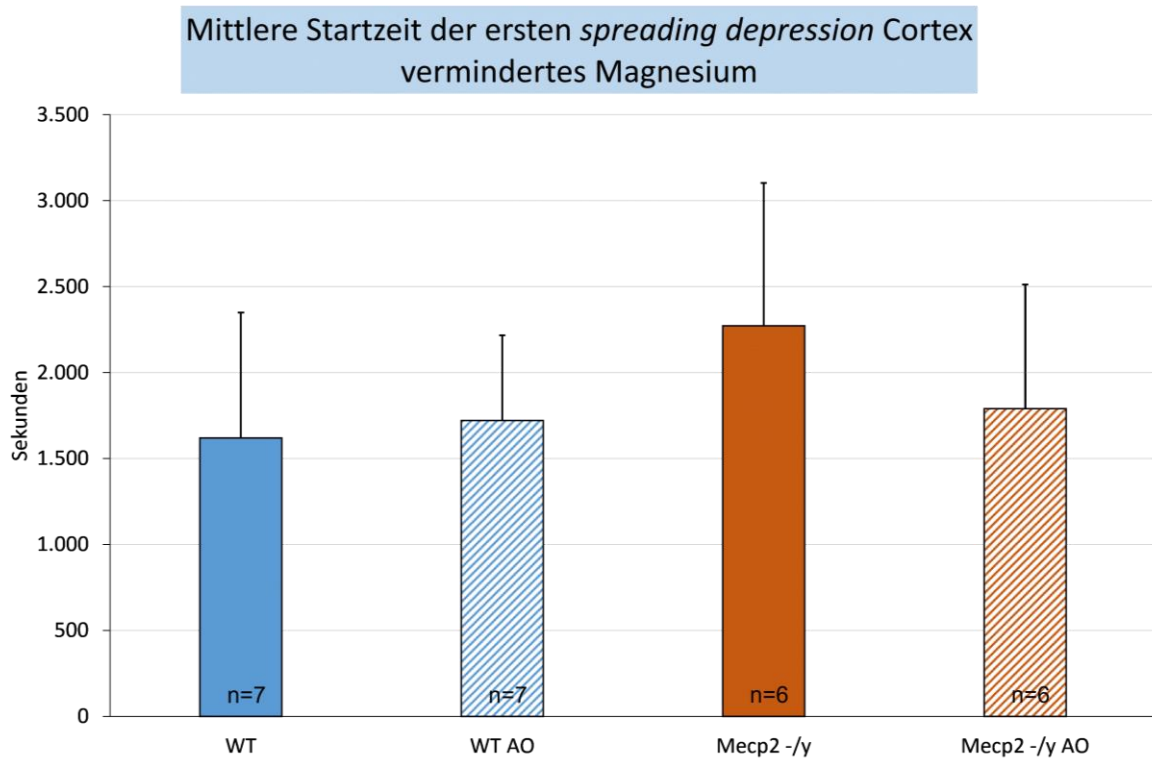


Abbildung 27: Mittlere Startzeit der ersten *spreading depression* im Cortex während des Einwaschens von ACSF mit erniedrigter Magnesiumkonzentration (0,25 mM). Dargestellt sind die Mittelwerte mit den zugehörigen Standardabweichungen als Fehlerindikatoren. Auffallend ist ein tendenziell späteres mittleres Auftreten der *spreading depressions* bei den MeCP2-defizienten Mäusen. Die Abkürzungen der Tiergruppen sind identisch mit denen in **Abbildung 7**.

Abbildung 28 zeigt, dass sich die Mittelwerte für die *spreading depressions* in den Messungen mit Bicucullin im Verhältnis zueinander ähnlich denen unter der Lösung mit verminderter Magnesiumkonzentration verhalten. So liegt der Wert für die behandelten Wildtypen mit 688 ± 239 Sekunden, $n=9$, tendenziell über den 611 ± 202 Sekunden, $n=10$, für die Gruppe auf Normalfutter. In der unbehandelte Knockoutgruppe wurden *spreading depressions* im Mittel erste bei 850 ± 559 Sekunden, $n=12$, und somit tendenziell später als in der Wildtypgruppe ohne AOF detektiert. Unter Fütterung mit Antioxidantien traten die ersten *spreading depressions* in der Knockoutgruppe verfrüht um 688 ± 192 Sekunden, $n=7$, auf.

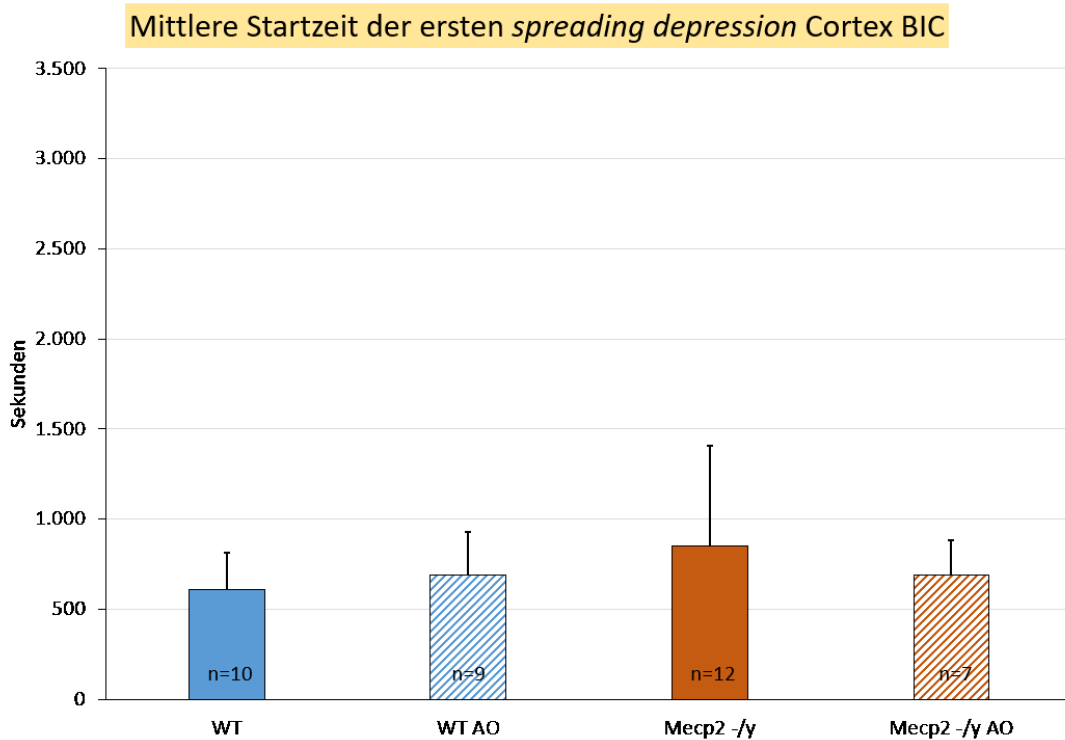


Abbildung 28: Mittlere Startzeit der ersten *spreading depression* im Cortex während Applikation von **Bicucullin (10 μ M)**. Die unbehandelten Knockouttiere zeigen im Durchschnitt tendenziell später *spreading depressions* als die Wildtypen, unter Einwirkung von AOF sind gegenläufige Tendenzen des zeitlichen Auftretens zu erkennen. Die Abkürzungen der Tiergruppen sind identisch mit denen in **Abbildung 7**.

Und auch in den Messungen unter 4-AP lässt sich dieses Trendverhalten der Gruppen zueinander beobachten, siehe **Abbildung 29**. Die Wildtypgruppe mit Normalfutter zeigt die erste *spreading depression* im Durchschnitt bei 809 ± 33 Sekunden, $n=9$, und somit ebenfalls eher früher als die unbehandelten Knockouttiere mit 1015 ± 525 Sekunden, $n=12$. Bei den mit AOF behandelten Wildtypen traten die *spreading depressions* im Mittel nach 1177 ± 689 Sekunden, $n=9$, und damit tendenziell später als in der Kontrollgruppe auf. Die Messungen in der behandelten Knockoutgruppe ergaben mit 694 ± 349 Sekunden, $n=7$, ein in der Tendenz verfrühtes Auftreten im Vergleich zu den unbehandelten MeCP2-defizienten Tieren.

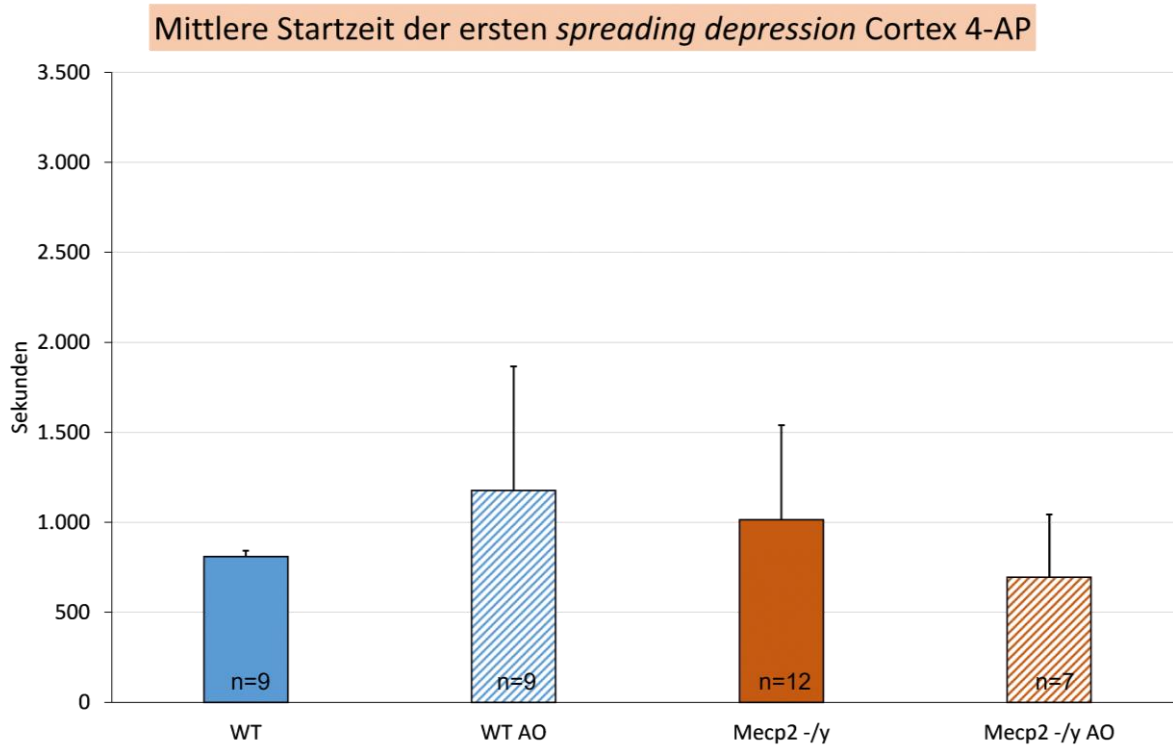


Abbildung 29: Mittlere Startzeit der ersten *spreading depression* im Cortex unter Behandlung mit 4-AP (100 μ M). Die unbehandelten Knockouttiere zeigten im Durchschnitt tendenziell später *spreading depressions* als die Wildtypen, unter AOF sind gegenläufige Tendenzen des zeitlichen Auftretens zu erkennen. Die Abkürzungen der Tiergruppen sind identisch mit denen in **Abbildung 7**.

Abbildung 30 stellt als Übersicht die Anzahl der Hirnschnitte mit und ohne detektierter *spreading depression* im Cortex dar, aufgeteilt nach Tiergruppen und verwendeter prokonvulsiver Lösung. Bicucullin provozierte in der Mehrzahl der Hirnschnitte kortikale *spreading depressions*, während 4-AP in der Mehrheit keine *spreading depression* im Cortex hervorrief.

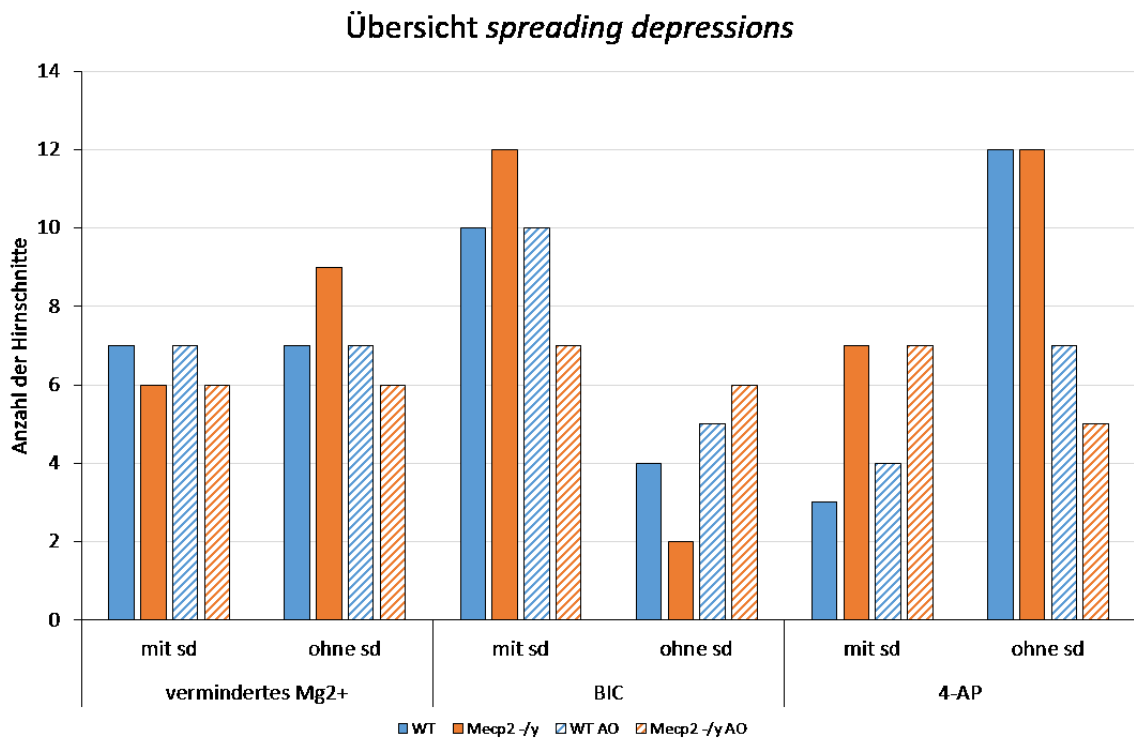


Abbildung 30: Übersicht der *spreading depressions* im Cortex der gemessenen Hirnschnitte. Dargestellt ist, aufgeteilt nach Gruppe und verwendeter Lösung, die Anzahl der Hirnschnitte mit und ohne gemessener *spreading depression* (Abgekürzt in dieser Abbildung mit sd) im Cortex. Die Abkürzungen der Tiergruppen sind identisch mit denen in **Abbildung 7**. Die verwendeten Lösungen sind wie folgt abgekürzt: erniedrigte Magnesiumkonzentration von 0,25 mM (vermindertes Mg²⁺); Bicucullin 10 μM (BIC); 4-Aminopyridin 100 μM (4-AP). Bicucullin provozierte als einzige verwendete Substanz in der Mehrzahl der Hirnschnitte kortikal detektierte *spreading depressions*.

4. Diskussion

Für die Rett-Patienten und ihre Angehörigen bzw. Pflegenden ist die Epilepsie und der Umgang mit ihr ein zentraler und oft die Lebensqualität bestimmender Aspekt im Leben mit der komplexen Erkrankung (Nadia et al. 2008). Mit den gängigen Antiepileptika besteht zwar eine durchaus wirksame Möglichkeit der symptomatischen Therapie, doch die zugrundeliegenden Ursachen der neuronalen Vulnerabilität gegenüber epileptischen Anfällen werden durch die eingesetzten Substanzen nicht adressiert. Der im Rahmen dieser Arbeit therapeutisch eingesetzte Antioxidantiencocktail im Mausmodell für das RTT greift direkt in das gestörte zelluläre Redox-Gleichgewicht, einen der möglichen Teilpathomechanismen der Epilepsieneigung, ein und sollte im Hinblick auf seine antikonvulsive Wirksamkeit anhand festgelegter Parameter evaluiert werden (Waldbaum und Patel 2010).

Auf der Suche nach pathophysiologischen Veränderungen auf zellulärer Ebene durch die Mutation im MECP2-Gen fielen früh deutlich erhöhte Marker für oxidative Zellschädigung auf, die durch weitere Beobachtungen wie eine verminderte Aktivität der SOD oder die vermehrte mitochondriale ROS-Produktion aufgrund einer insuffizienten Atmungskette untermauert und somit zu einem vielversprechenden wissenschaftlichen Ansatz mit möglicher therapeutischer Konsequenz wurden (De Felice et al. 2014; Gibson et al. 2010; Großer et al. 2012; Sierra et al. 2001). Dass der Einsatz von Antioxidantien im Mausmodell für das RTT vielversprechend ist, konnte von der Arbeitsgruppe Müller in früheren Versuchsreihen bereits gezeigt werden. Eine wiederhergestellte Langzeit-Plastizität bei verbesserter Kurzzeit-Plastizität, eine höhere Hypoxietoleranz sowie signifikant verringerte neuronale Hypererregbarkeit konnten bei mit dem löslichen Vitamin-E-Derivat inkubierten Hirnschnitten von *Meep2^{+/y}* Mäusen nachgewiesen werden (Müller und Can 2014). Als nächster Schritt verbesserten sich bei systemischer intraperitonealer Applikation weiterer Parameter wie der Blutglukosespiegel und die Lipidperoxidation (Janc et al. 2016). Um mögliche behandlungsassoziierte Ergebnisverzerrungen zu minimieren, wurde die Behandlung der Mäuse von der intraperitonealen Injektion auf die weniger invasive orale Fütterung mit einem Antioxidantiencocktail umgestellt, unter der sich ebenfalls eine positive Beeinflussung von Wachstum, Gehirnstruktur und hippocampaler Synapsenplastizität nachweisen ließ (Baroncelli et al. 2022).

Eine Übertragung der Beobachtungen des Redox-Ungleichgewichtes aus den präklinischen Versuchen auf am RTT erkrankte Studienteilnehmer zeigte erste Erfolge in Form einer signifikanten Größenzunahme des Kopfumfanges unter Behandlung mit dem antioxidativ wirkendem EPI-743, auch wenn der primäre Studienendpunkt einer signifikanten Symptomverbesserung nicht erreicht wurde (Enns und Cohen 2019).

Jedoch unterstrichen die Versuchsergebnisse am Mausmodell für das RTT auch die Wichtigkeit einer ausgewogenen Redox-Homöostase und einer individuellen Dosisfindung. So ergaben sich in der Wildtypgruppe unter Langzeitbehandlung mit AOF metabolische

Verschlechterungen in Form von Übergewicht und erhöhten Blutglukosespiegeln, die mit einem im Gegensatz zum RTT vermehrt reduziertem Zellmilieu durch die Zufütterung zu erklären sind (Baroncelli et al. 2022). Mit Blick auf die vielfältigen Aufgaben von ROS in der Zellkommunikation und Signaltransduktion sowie das Wissen um die Existenz einer Vielzahl von redoxmodulierten Ionenkanälen und Proteinen, dürfte der Aspekt des vulnerablen Redox-Gleichgewichtes auch in der Epilepsie-Symptomatik von Bedeutung sein (Kourie 1998). In Zusammenschau mit den bereits in der zweiten Lebenswoche bei MeCP2-defizienter Mäuse beobachteten Verschiebungen des Redox-Gleichgewichts hin zu stärker oxidierten Bedingungen, sollte eine frühe und an die symptom schwere adaptierte antioxidative Therapieoptimierung sowohl in zukünftigen präklinischen als auch klinischen Versuchen zum RTT berücksichtigt werden (Baroncelli et al. 2022; Großer et al. 2012). Der Umstand, dass mit dem X-chromosomal lokalisierten Gendefekt und der physiologisch zufälligen X-Inaktivierung ein von Patientin zu Patientin variierender Krankheitsverlauf bei unterschiedlicher Krankheitschwere vorliegt, unterstreicht die Notwendigkeit einer in Zukunft individuell abgestimmten antioxidativen Behandlungsstrategie (Ishii et al. 2001).

Im Hinblick auf das komplexe Symptom der Epilepsie im RTT konnte in den Versuchen der Arbeitsgruppe Müller bisher keine eindeutige Verbesserung in diesem Bereich durch die intraperitoneale antioxidative Intervention nachgewiesen werden (Janc und Müller 2014). Folglich ergab sich die Fragestellung, ob unter dem optimierten Behandlungsschema mit dem oralen Antioxidantiencocktail nun ein möglicher Effekt hinsichtlich der Epilepsie sichtbar sein würde, was Gegenstand dieser Arbeit ist.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bis dato sowohl im Mausmodell als auch in den klinischen Patientenstudien kein positiver Effekt antioxidativer Behandlungen hinsichtlich der starken Epilepsieneigung bei Rett-Patienten gefunden werden konnte. Die Ergebnisse dieser Arbeit werden im Folgenden den einzelnen untersuchten Parametern entsprechend diskutiert.

4.1 Frequenz

Bei Betrachtung der detektierten Ereignisfrequenz zeigte sich weder unter Einsatz von Bicucullin (10 μM) noch von 4-AP (100 μM) eine signifikante Änderung des Parameters durch die AO-Fütterung. Die mit Bicucullin provozierten Entladungen offenbarten zwar sowohl im CA1 als auch CA3 von Wildtypen und Knockout unter AOF solide Tendenzen hin zu einer Abnahme der Frequenz, ohne jedoch einen signifikanten Unterschied zu erreichen. Die Gegenüberstellung der unbehandelten Gruppen zeichnet für die beiden verwendeten prokonvulsiven Lösungen ein unterschiedliches Bild. Während die mittlere Frequenz unter Verwendung von Bicucullin in beiden Hippocampusregionen sowohl bei den Wildtypen als auch den Knockouttieren mit Normalfutter auf vergleichbarem Niveau

liegt, zeigen die Messungen mit 4-AP tendenziell gegenläufige Frequenzwerte der Tiergruppen zwischen den Hirnregionen CA1 und CA3. Erwähnenswert ist die Beobachtung, dass die unbehandelte Knockoutgruppe in den Versuchen mit Bicucullin eine in der Tendenz deutlich größere SD der gemessenen Frequenzen als die Vergleichsgruppe der Wildtiere mit Normalfütterung zeigt. Unter Verwendung von 4-AP kommt es auch in der Wildtypgruppe zu einer breiteren Streuung der gemessenen Frequenzen mit konsekutiv größerer SD. Festzuhalten ist, dass die gemessenen Frequenzen zwischen Wildtyp- und Knockoutgruppe keine Erhöhung bei den erkrankten Tieren zeigten, wie sie eigentlich bei dem beschriebenen Ungleichgewicht zwischen Exzitation und Inhibition hin zu vermehrter Übererregbarkeit in MeCP2-defizientem Hippocampus zu vermuten gewesen wäre (Calfa et al. 2011). Hieraus ergibt sich die Frage, in wie weit die Frequenz als Vergleichsparameter für die Fragestellung aussagekräftig ist.

Die Ergebnisse der Frequenzmessung mit Bicucullin decken sich jedoch mit denen der Gruppe um McLeod, die nur bei niedriger dosiertem Bicucullin mit Konzentrationen zwischen 0.1 bis 3 μM eine signifikant höhere Frequenz im *Stratum radiatum* des CA1 MeCP2-defizienter Hirnschnitte zeigen konnten, während bei der auch in dieser Forschungsarbeit verwendeten Konzentration von 10 μM Bicucullin kein signifikanter Unterschied mehr nachweisbar war (McLeod et al. 2013). Folglich scheint die hohe Dosis an Bicucullin die für epileptische Anfälle protektiv wirkenden GABAergen Strukturen im Gehirn der gesunden Wildtypgruppe zu neutralisieren, was im Hinblick auf die in dieser Arbeit fehlende Signifikanz der Frequenzabnahme unter AOF eine mögliche Ursache und Erklärung hierfür sein könnte und dementsprechend für zukünftige ähnliche Versuche bei niedrigerer Dosierung ein interessanter Ansatzpunkt sein dürfte. Die zentrale Stellung der Beeinträchtigung GABAerger Neurone im RTT wird von den Beobachtungen unterstrichen, dass eine alleinige Wiederherstellung der *Mecp2*-Transkription in GABAergen Neuronen ansonsten MeCP2-defizienter Mäuse einen Großteil der Krankheitssymptome umkehren konnte (Ure et al. 2016).

Festzuhalten bleibt, dass unter antioxidativer Therapie die durch Bicucullin provozierten Krampfentladungen eine solide Tendenz sowohl in CA1 als auch CA3 hin zu niedrigeren Frequenzen zeigten.

Die durch den potenten Kaliumkanalblocker 4-AP in einer Konzentration von 100 μM ausgelösten Entladungen in den Hippocampusregionen erscheinen hinsichtlich ihrer Frequenz im Gegensatz zu den mit Bicucullin gemessenen Ergebnissen wenig aussagekräftig, da sich aufgrund großer Standardabweichungen der untersuchten Hirnschnitte die teils ambivalenten Tendenzen nur schwer einordnen lassen. In Zusammenschau mit den Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen lassen sich jedoch einige Parallelen erkennen, die bei der besseren Einordnung helfen können.

So passt die in CA1 gemessene tendenziell höhere Frequenz in der unbehandelten Knockoutgruppe im Vergleich zur Wildtypgruppe ebenfalls zu den Beobachtungen, die

McLeod und Kollegen bei einer Konzentration von 50 μM 4AP gemacht haben (McLeod et al. 2013). In CA3 fiel hingegen eine um knapp 25% verringerte durchschnittliche Frequenz der Entladungen in der Knockoutgruppe im Gegensatz zu den ebenfalls unbehandelten Wildtypen auf, was im Einklang mit vorherigen Ergebnissen der Arbeitsgruppe Müller steht (Janc und Müller 2014). Bei der Inkubation von Hirnschnitten MeCP2-defizienter Mäuse mit dem Vitamin E-Derivat Trolox registrierte die Arbeitsgruppe damals im *Stratum pyramidale* des CA3 neben der höheren Frequenz in der unbehandelten Wildtypgruppe im Vergleich zu den Knockouttieren nur eine leichte Tendenz der Frequenzabnahme unter antioxidativer Behandlung, was im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls in der Ableitung aus CA1 zu beobachten war, jedoch nicht im CA3 (Janc und Müller 2014).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Beobachtungen der Entladungsfrequenz unter Provokation mit 4-AP mit den Ergebnissen früherer Versuche teilweise übereinstimmen und leichte Tendenzen zu einer Abnahme der Entladungsfrequenz mit möglicherweise konsekutiver Verbesserung der Epileptieneigung zeigen.

Eine weitere interessante Beobachtung ist die tendenziell deutlich geringere Standardabweichung der behandelten Knockoutgruppe im Vergleich zur erkrankten Kontrollgruppe. In den Messungen mit Bicucullin reduziert sich die Standardabweichung um durchschnittlich 62,5% (75% CA1 und 50 % CA3), in den Messungen mit 4-AP im Mittel um gut ein Drittel (52% CA1 und 22% CA3). In den Wildtypgruppen sind diese beobachteten Effekte weniger oder auch teilweise gegensätzlich ausgeprägt, was mit der bekannten Wildtypverschlechterung bei vermutetem Redox-Ungleichgewicht hin zu einem zu reduziertem Zellmilieu unter antioxidativer Behandlung erklärbar sein könnte (Baroncelli et al. 2022). Diese Beobachtung einer tendenziell verminderten Streuung der Frequenzen in der Knockoutgruppe unter antioxidativer Fütterung eröffnet den Raum für weitere Untersuchungen, in wie weit sich der therapeutische Ansatz der Redox-Modulation stabilisierend auf das komplexe neuronale Ungleichgewicht ausübt, dass sich aus dem Funktionsverlust im MECP2-Gen und den dadurch hervorgerufenen Veränderungen auf zellulärer bzw. synaptischer Ebene ergibt (Goffin und Zhou 2012).

4.2 Amplitude

Die zu Beginn der Versuche getroffene Wahl, die Amplitude der detektierten Krampfentladungen als Referenzparameter für eine mögliche Objektivierung eines Behandlungseffekts auf die epileptische Krampfneigung zu untersuchen, ist in der Hinsicht interessant, dass die Amplitude bis dato weder von der Arbeitsgruppe Müller noch von weiteren Arbeiten zu diesem Thema in der Literatur ausgewertet wurde.

Ein signifikanter Effekt der Antioxidantienfütterung auf die Amplitude konnte nicht nachgewiesen werden, doch deuteten sich in der Hirnregion CA3 Tendenzen hin zu einer

Verringerung der Entladungsamplitude sowohl in der behandelten Wildtier- als auch der Knockoutgruppe bei Entladungsprovokation durch 4-AP und Bicucullin an.

In der Hirnregion CA1 widersprechen sich die Tendenzen zwischen den Versuchen mit den konvulsionsinduzierenden Substanzen, bedingt unter anderem durch die doch deutliche Standardabweichung der erhobenen Daten.

Auffallend ist die Tendenz hin zu höheren Amplituden in den mit Bicucullin induzierten Entladungen bei den Wildtypen im Vergleich zur Knockoutgruppe. Unter AOF kommt es zu einer tendenziellen Abnahme in der Wildtypgruppe, die sich jedoch immer noch über dem durchschnittlichen Amplitudenniveau der Knockouttiere bewegt.

Ein möglicher Erklärungsansatz für diese Differenz ist die beschriebene verringerte kortikale Vernetzung zwischen glutamatergen Pyramidenzellen in kortikalen Schichten von Rett-Mäusen, die in Form verminderter dendritischer Fortsätze auch im Hippocampus von Bedeutung zu sein scheint (Belichenko et al. 2009; Chao et al. 2007; Dani et al. 2005). Untersuchungen an gewonnenen pluripotenten Stammzellen von Rett-Patienten, zeigten nach ihrer Differenzierung zu Neuronen eine deutlich reduzierte exzitatorische Amplitude und Frequenz als Zeichen eines veränderten neuronalen Netzwerkes (Marchetto et al. 2010). Eine Dysfunktion glutamaterger Synapsen würde eine verminderte Feldpotentialamplitude bei Krampfentladungen der Knockoutgruppe erklären (Goffin und Zhou 2012).

Als weiterer positiver Effekt der antioxidativen Behandlung ist, wie auch schon in der Diskussion des Frequenzparameters beschrieben, eine Verringerung der Standardabweichung innerhalb der Knockoutgruppe als mögliches Korrelat für eine positive Beeinflussung des gestörten neuronalen Gleichgewichts zwischen Inhibition und Exzitation zu beobachten. So verringert sich die Standardabweichung der mit Bicucullin gemessenen Hirnschnitte im Mittel um gut die Hälfte (51%, CA1 37% und CA3 66%), in den mit dem Kaliumkanalblocker 4-AP provozierten Entladungen kam es zu einer Abnahme der Streubreite um durchschnittlich knapp ein Viertel (24%, CA3 33% und CA1 15%).

Die Wahl der Amplitude als möglicher Parameter muss wegen der vorliegenden inhomogenen Ergebnisse diskutiert werden. So ist zu erwähnen, dass Eindringtiefe und -winkel der Elektroden in das Hirngewebe die gemessenen Entladungsamplituden beeinflussen. Aufgrund der Verwendung anteriorer als auch posteriorer Hirnschnitte mit der Hippocampusregion war in der methodischen Durchführung dieser Arbeit eine gewisse Varianz in der Einbringung der Elektroden in den unterschiedlichen Hirnschnitt nicht zu vermeiden. Grundsätzlich sprechen die in der Region CA3 beobachteten soliden Tendenzen hin zu einer Verringerung der Amplitude unter der antioxidativen Therapie für die Wahl der Amplitude als geeigneter Parameter, um die Krampfanfälligkeit im Mausmodell für das RIT zu objektivieren.

4.3 Startzeit der Krampfentladungen

Auch die gemessene Zeit bis zum Auftreten der ersten krampfähnlichen Entladungen zeigt ein ambivalentes und uneindeutiges Bild. In CA1 und CA3 traten die ersten Entladungen unter Provokation durch 4-AP sowohl in der unbehandelten Wildtyp als auch der Knockoutgruppe zu fast identischen Zeiten auf, erwartbarer wäre ein verfrühter Beginn in den nachweislich hypererregbaren MeCP2-defizienten Hirnschnitten gewesen. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass die gewählte Dosis mit 100 μM des bekanntermaßen sehr potenten krampf-induzierenden 4-AP einen vorhandenen Unterschied zwischen den Gruppen egalisiert. Die behandelten Knockoutmäuse zeigten unter 4-AP eine leichte Tendenz zum verfrühten Beginn der Entladungen, während in der Wildtypgruppe keine wirkliche Veränderung unter antioxidativer Fütterung festzustellen war.

Diese Beobachtung bestätigt frühere Ergebnisse der Arbeitsgruppe, die in CA3 unter 4-AP ebenfalls keinen zeitlichen Unterschied im Auftreten epileptischer Entladungen zwischen MeCP2-defizienten Mäusen im Vergleich zur Wildtypgruppe nachweisen konnten. Eine Verschiebung der Entladungsstartzeit innerhalb der Wildtypgruppe unter Behandlung mit dem Vitamin E Derivat Trolox nach hinten, wie sie in dem Versuch beschrieben wurde, konnte im Rahmen dieser Arbeit unter der Antioxidantienfütterung nicht registriert werden (Janc und Müller 2014).

Im Vergleich der reinen gemessenen Startzeiten mit früheren Versuchen der Arbeitsgruppe ist festzuhalten, dass bei identischer Dosis von 4-AP und gleichem Versuchsaufbau der durchschnittliche Beginn der Entladungen in dieser Arbeit um 200 Sekunden verfrüht registriert wurde. Da unter Einwaschung von 4-AP ein schleichender Beginn der krampfartigen Entladungen mit anfänglich minimalen Ausschlägen in den abgeleiteten Extrazellulären Feldpotentialen zu beobachten ist, die sich dann in Amplitude und Frequenz über die Zeit intensivieren und deutlicher darstellen, erfolgt bei der Datenauswertung eine individuelle Festlegung, ab wann die registrierte Potentialänderung als eindeutig drogeninduziert zu werten ist. Daraus folgt, dass beim Vergleich der Daten bezüglich der Startzeit eine Betrachtung der absoluten Werte zugunsten der relativen Veränderungen vermieden werden sollte.

Die Messungen mit Bicucullin ergaben für die Hirnregionen CA1 und CA3 ein identisches Bild. Im Vergleich der Kontrollgruppen zeigte sich konträr zu vorherigen Erwartungen eine Tendenz hin zu einem späteren Auftreten von Krampfentladungen bei den Knockouttieren. Unter AO-Fütterung ergab sich in der Wildtypgruppe ein tendenziell späteres Einsetzen der ersten detektierten Entladung, während die Knockouttiere unter der Zufütterung eher früher als ihre Kontrollgruppe Krampfereignisse zeigten.

Insgesamt scheint die Startzeit der ersten Entladungen als Parameter in seiner Aussagekraft begrenzt zu sein, da ein fehlender Unterschied zwischen den Kontrollgruppen den

Stellenwert der Startzeit als eine gute Repräsentation der Krampfneigung im Rett-Mausmodell in Frage stellt.

4.4 *Spreading depression* im Cortex

Bei der *spreading depression* kommt es durch ein Überwiegen der nach intrazellulär gerichteten Ionenströme zu einer massiven, sich in der grauen Substanz ausbreitenden Depolarisation einer großen Anzahl an Neuronen und Gliazellen mit gleichzeitiger Umverteilung der Ionen zwischen Extra- und Intrazellulärraum und dadurch bedingtem Zusammenbruch des Membranpotentials (Leão 1944; Somjen 2001). Nach einem vorübergehenden Verlust der neuronalen Funktion wird eine Normalisierung der Membranpotentiale und damit auch der abgeleiteten extrazellulären Feldpotentiale auf das ursprüngliche Niveau einige Minuten nach Auftritt der *spreading depression* erreicht. Auslöser für eine *spreading depression* können neben Hypoxie eine erhöhte extrazelluläre Kaliumkonzentration, verminderte Osmolarität oder ein ins alkalische verschobene pH-Wert sein (Chebabo et al. 1995; Lauritzen et al. 1988).

Die im Rahmen der Versuche für diese Arbeit detektierten *spreading depressions* in der Cortexableitung ergaben hinsichtlich des Zeitpunktes ihres ersten Auftretens bei allen verwendeten konvulsionsbegünstigenden Substanzen ein ähnliches Ergebnisbild.

Durchschnittlich trat die erste *spreading depression* in der unbehandelten Knockoutgruppe tendenziell später als in der Wildtypgruppe auf. Unter der antioxidativen Therapie näherten sich die gemessenen Zeitpunkte durch ein späteres Auftreten in der Wildtypgruppe und ein verfrühtes Einsetzen bei den Knockouttieren aneinander an. Deutet man das spätere Auftreten der ersten *spreading depression* als Endpunkt für einen positiven Therapieeffekt des Antioxidantiencocktails, könnte dieser tendenziell nur der behandelten Wildtypgruppe zugesprochen werden.

Die dazu jedoch gegenläufige Tendenz in der behandelten Knockoutgruppe sowie die Beobachtung, dass die *spreading depressions* im Vergleich der unbehandelten Kontrollgruppen tendenziell später in der Knockoutgruppe aufgetreten sind, werfen die Frage auf, in wie weit die Neigung zur Entwicklung einer in ihrer Entstehung komplexen *spreading depression* ein repräsentativer und damit guter Parameter für die Bewertung antioxidativer Behandlungseffekte auf die Epileptieneigung im Rett-Mausmodell darstellt.

Ein möglicher Erklärungsansatz für das verspätete Auftreten der ersten *spreading depression* im Knockoutcortex könnte die Beobachtung sein, dass in kortikalen Neuronen MeCP2-defizienter Mäuse eine Gleichgewichtsverschiebung hin zu vermehrter Inhibition vorliegt, während im Hippocampus die Exzitation überwiegt (Dani et al. 2005).

Zu den verwendeten krampfstimulierenden Substanzen lässt sich festhalten, dass *spreading depressions* am potentesten durch Bicucullin ausgelöst wurden, was die zentrale Stellung des dadurch inhibierten GABAergen Systems in der Prävention epileptischer Ereignisse im Cortex verdeutlicht (Treiman 2001). Und auch die abgesenkte Magnesiumkonzentration im

ACSF konnte in der Hälfte der untersuchten Hirnschnitte *spreading depressions* auslösen, während ein potenter Einfluss auf den Hippocampus nicht zu beobachten war.

4.5 Limitationen des Studiendesigns und Ausblick

In Zusammenschau der diskutierten Ergebnisse ergibt sich ein vielschichtig einzuordnendes Bild. Eine signifikante Veränderung der ausgewählten Parameter zum Beschreiben einer möglichen antikonvulsiven Wirkung der antioxidativen Fütterung ergab sich nicht, auch wenn durchaus starke Tendenzen im Bereich der Frequenz- und Amplitudenabnahme unter AO-Therapie für die Knockoutmäuse bescheinigt werden können. Trotz alledem oder gerade aufgrund der fehlenden Signifikanz und teils ambivalenten Ergebnissen soll eine kritische Reflexion des Studiendesigns sowie ein Ausblick für sich daraus ergebende mögliche nächste Schritte erfolgen.

Als Modell für die untersuchte Erkrankung stellen die MeCP2-defizienten Mäuse einen zentralen und wertvollen Bestandteil für die Forschung zu diesem Thema dar. Das Auftreten von typischen klinischen Symptomen wie eine reduzierte Mobilität bei motorischen Koordinationsstörungen, neuromorphologische Veränderungen in Form einer verminderten Hirnmasse, als auch die für diese Arbeit von Bedeutung seienden Beobachtungen von vermehrtem oxidativem Stress sowie gehäuftes Auftreten epileptischer Krampfanfälle in Mäusen mit defektem *Mecp2*-Gen, prädestinieren sie für die Forschung auf diesen Gebieten (Vashi und Justice 2019). Aufgrund der stark heterogenen phänotypischen Symptomentwicklung in den für das X-Chromosom heterozygoten weiblichen Tieren, basierend auf der zufällig erfolgenden X-Inaktivierung, wurden für eine bessere Vergleichbarkeit ausschließlich schwerer beeinträchtigte männliche Knockoutmäuse verwendet, die aufgrund ihrer hemizygoten Ausstattung mit dem X-Chromosom einen Verlust von MeCP2 in jeder Zelle ihres Körpers tragen. Fehlende signifikante Verbesserungen bei diesen deutlich stärker erkrankten männlichen Tieren lassen die Frage unbeantwortet, in wie weit die antioxidative Therapie einen wohlmöglich anderen Effekt auf die weniger stark beeinträchtigten weiblichen Tiere hätte, die die fast ausschließlich weiblichen Rett-Patientinnen mit ihrem Mosaik aus MeCP2-defizienten und gesunden Zellen deutlich besser abbilden (Shahbazian et al. 2002).

Auch in der Art der epileptischen Anfälle unterscheiden sich die untersuchten Rett-Mausmodelle von den zu beobachtenden Anfallsarten bei Rett-Patientinnen. Während die erkrankten Mädchen ein hochvariables Anfallsspektrum mit zumeist generalisiert tonisch-klonischen Anfällen aufweisen ist der vorherrschende Typus bei den erkrankten Tieren der Absence-Anfall (Cardoza et al. 2011; Fallah und Eubanks 2020). Dementsprechend wäre es für die bessere Übertragbarkeit kommender Studien von Vorteil, repräsentative Mausmodelle für die Epilepsiesymptomatik im RTT zu identifizieren. *In-vivo*-Studien am intakten Gehirn könnten in diesem Zusammenhang geeigneter sein als *In-vitro*-Studien an isoliertem Hirngewebe, um die komplexe Genese der Epilepsie besser erfassen zu können.

Neben dem Mausmodell selbst unterliegt auch die Verabreichung und Dosierung des Antioxidantiencocktails limitierenden Faktoren. So konnte gezeigt werden, dass bereits in der neonatalen Phase vor Auftreten erste Symptome mitochondriale Veränderungen einhergehend mit Verschiebung des Redox-Gleichgewichtes im Hippocampus von MeCP2-defizienten Mäusen vorliegen (Großer et al. 2012). Auch im Hirnstamm zeigen sich bereits innerhalb der ersten Lebenswoche eine Imbalance zwischen neuronaler Exzitation und Inhibition (Medrihan et al. 2008). Folglich verspricht ein möglichst früher Beginn der stabilisierenden antioxidativen Therapie die größten Effekte, um die von MeCP2 maßgeblich regulierte Synaptogenese und somit neuronale Netzwerkentwicklung zu unterstützen (Mullaney et al. 2004). Die im Rahmen dieser Arbeit verwendete orale Applikationsform konnte jedoch erst mit dem Umstieg auf feste Nahrungsaufnahme der Mäuse gegen Ende der dritten Lebenswoche begonnen und über gut vier Wochen zur Messung weitergeführt werden. Die somit ausgelassene Stillzeit zu Beginn könnte ein entscheidender Zeitraum sein, der den positiven Effekt der antioxidativen Behandlung vermindert. Beispielhaft für die Notwendigkeit und Wirksamkeit möglichst früher Interventionen im RTT zeigte eine Studie am Mausmodell, in der MeCP2-defiziente Mäuse bereits vor Auftritt der Symptome trainiert wurden, eine signifikante Verzögerung der Krankheitssymptommanifestation sowie Verbesserungen motorischer als auch kognitiver Fähigkeiten, während ein Beginn des Trainings nach Manifestation der Symptome keinen Effekt mehr erzielen konnte (Achilly et al. 2021). Diese Beobachtungen unterstreichen einmal mehr die wichtige Rolle einer möglichst frühen Intervention, die für zukünftige Untersuchungen des frühen Redox-Ungleichgewichtes beim RTT von Interesse sein sollte und mit Hinblick auf die kontinuierlich ablaufende Entwicklung des neuronalen Netzwerkes auch einen denkbaren Benefit für die Epilepsiesymptomatik haben dürfte.

Auch die richtige Dosisfindung stellt neben dem frühen optimalen Beginn der Therapie eine Herausforderung dar. Betrachtet man das Redox-Gleichgewicht als eine sich in Waage haltende Summe aus oxidierten und reduzierten Zellkomponenten, die zu beiden Seiten ins Ungleichgewicht geraten kann, ergibt sich daraus die Notwendigkeit einer an die Krankheitsschwere angepassten Dosierung der antioxidativen Therapie. Für eine individuelle Dosierung spricht neben der bereits beschriebenen Verschlechterung von Wildtypmäusen unter AOF die Beschreibung eines engen Zusammenhanges zwischen *Mecp2*-Expression und Epilepsieanfälligkeit (Baroncelli et al. 2022). So mündete bereits geringe Überexpression von *Mecp2* in einer erhöhten Krampfanfälligkeit der betroffenen Tiere, was die Labilität des Systems unterstreicht (Bodda et al. 2013).

Ein weiterer zu betrachtender Punkt ist die verwendete Dosierung der krampfstimulierenden Substanzen im Rahmen dieser Arbeit. Anspruch an die Substanzen war ein potentes Hervorrufen krampfähnlicher Entladungen in den Hirnschnitten bei gleichzeitig so niedriger Dosierung, dass Unterschiede zwischen Wildtyp und Knockoutgehirnen detektierbar blieben. Bicucullin provozierte mit Ausnahme der unbehandelten Wildtypgruppe verlässlich Krampfantladungen, doch ließen sich keine signifikanten Unterschiede in den

unbehandelten Kontrollgruppen von Wildtyp und Knockoutgruppe feststellen. Mögliche Ursache hierfür könnte eine zu hoch gewählte Dosierung gewesen sein, die die funktionalen und somit protektiv wirkenden inhibitorischen GABAergen Neurone gesunder Wildtypen vollkommen egalisiert hat. Dies deckt sich mit den Erfahrungen von McLeod und Kollegen, die in einer niedrigeren Dosierung von 0.1 und 1 μM Bicucullin signifikante und bei 3 μM deutliche Unterschiede in der Entladungsfrequenz zwischen Wildtypen und Knockoutmäusen zeigen konnten, bei einer Konzentration von 10 μM Bicucullin war der Effekt jedoch nicht mehr vorhanden (McLeod et al. 2013). Eine mögliche komplette Blockade der inhibitorischen GABAergen Synapsen durch Bicucullin sowohl beim Wildtyp als auch in den Knockoutmäusen mit teils defekten GABAergen Synapsen und verminderten GABA-Freisetzungsspiegeln würde bei der zentralen Rolle des inhibitorischen Systems in der Anfallsverhinderung die fehlenden Unterschiede in den Ergebnissen bei hoher Bicucullin-Dosierung erklären (Chao et al. 2010; Medrihan et al. 2008). Folglich wäre es für zukünftige Untersuchungen der antioxidativen Therapie spannend und ratsam, Bicucullin in niedrigeren Dosierungen zu verwenden.

Die verwendete Lösung mit herabgesetzter Magnesium- und erhöhter Kaliumkonzentration konnte in den hippocampalen Gehirnregionen nicht zuverlässig Krampfentladungen provozieren, nur im Cortex gelang in knapp der Hälfte aller gemessener Schnitte das Auslösen einer *spreading depression*. Möglicher Grund für die schwache Potenz könnte die mit 0.25 mM noch zu hohe herabgesetzte Magnesiumkonzentration gewesen sein. Eine Arbeit zu den elektrophysiologischen Auswirkungen magnesiumfreier Lösung auf Hirnschnitte von Ratten induzierte mit der in dieser Arbeit identisch verwendeten Kaliumkonzentration von 5 mM spontane Entladungen im Hippocampus nach durchschnittlich 15-45 Minuten bei einer errechneten verbliebenen Messkammerkonzentration des Magnesiums von 0.1-0.4 mM (Mody et al. 1987). Bei einer durchschnittlichen Messdauer von ungefähr einer Stunde pro Hirnschnitt bei deutlich höherer Magnesiumkonzentration konnten im Rahmen dieser Arbeit anscheinend keine ausreichend geringen Magnesiumspiegel im Gewebe erreicht werden, um durch eine ausreichende Depolarisierung der Zellmembranpotential und die Erhöhung der Öffnungswahrscheinlichkeit exzitatorischer NMDA-Rezeptoren die Krampfanfälligkeit zu erhöhen. Auch diese Erkenntnis ist für weitere Versuche in diese Richtung von Interesse.

4-Aminopyridin löste als Kaliumkanalblocker sehr potent Entladungen aus, doch die fehlenden signifikanten Unterschiede vor allem zwischen den unbehandelten Wildtyp- und Knockout-Gruppen sollten die Diskussion zulassen, in wie fern durch eine zu hoch gewählte Dosierung die vorhandenen Unterschiede in der Krampfvulnerabilität aufhebt. So konnte bei früheren Versuchen der Arbeitsgruppe ebenfalls keine Veränderung der Entladungsfrequenz zwischen Wildtyp und Knockoutmäusen bei einer Konzentration von 100 μM 4-AP gemessen werden (Janc und Müller 2014). Bei Verwendung einer halb so hohen Wirkstoffkonzentration wurde solch eine Signifikanz beschrieben, unterhalb dieser Schwelle wiederum nicht (McLeod et al. 2013). Auch frühere Ergebnisse deuten darauf hin,

dass der Einsatz von 4-AP bei niedrigeren Dosierungen und konsekutiv längerer Messungsdauer eine Darstellung der unterschiedlichen Krampfneigung zwischen Wildtyp- und Knockoutmäusen besser gewährleisten könnte (Rutecki et al. 1987).

Das intermittierende Auftreten der *spreading depressions* während der Messungen stellt eine weitere Limitation dar, da dadurch ein massiver Einfluss auf die neuronale Erregbarkeit und somit auch auf nachfolgenden Krampfantladungen entsteht, was die Vergleichbarkeit der Messungen mindert.

Die Diagnostik epileptischer Anfälle und deren genaue Zuordnung zu einer spezifischen Anfallsform stellt im klinischen Alltag noch heute eine Herausforderung dar. Langzeit-EEGs und Videoüberwachung sind Möglichkeiten, um temporäre Anfälle zu detektieren und zu charakterisieren. In der elektrophysiologischen Untersuchung von Hirnschnitten sind extrazelluläre Feldpotentialänderungen als Ausdruck der synchronen Entladungen Mittel der Wahl zu Anfallsdetektion. Die Auswertung der abgeleiteten Potentialänderungen hinsichtlich möglicher Unterschiede durch Gendefekt und/oder Behandlung bedarf einer Auswahl beschreibender Parameter. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Anfallsereignisse hinsichtlich ihrer Frequenz, Amplitude und Startzeit untersucht und gegenübergestellt, da aus theoretischen Überlegungen eine Änderung dieser Parameter als Änderung der Anfallsschwere bzw. Anfallsvulnerabilität zu werten sein dürfte. Ob diese Parameter auch am besten das zu untersuchende Merkmal der Epileptieneigung beschreiben, ist nicht eindeutig zu sagen, da aussagekräftige Arbeiten zu diesem Thema in der Literatur bisher fehlen. Unter Annahme eines leichten Effekts der antioxidativen Therapie spiegelt sich dieser vor allem in der ausgewerteten Frequenz und Amplitude der Entladungen wider, während die Startzeit- und *spreading depression*-Änderungen uneindeutig bleiben, wie auch schon früher beschrieben wurde (Janc und Müller 2014). Ein weiterer interessanter Parameter scheint die durchschnittliche Eventdauer zu sein, die in einem Paper von McLeod und Kollegen einen signifikanten Unterschied zwischen Knockout und Wildtypen zeigte (McLeod et al. 2013). Für weitere elektrophysiologische Untersuchungen zur Objektivierung der Epileptieneigung sollten dementsprechend vor allem die Parameter der Frequenz, Amplitude und Entladungsdauer herangezogen werden.

Verbunden mit der Schwierigkeit, gute deskriptive Parameter für die Epileptieneigung in gemessenen Mausmodellen zu identifizieren, ergibt sich auch die Fragestellung, in wie weit die *In-vitro*-Versuche an einzelnen Hirnschnitten die Genese epileptischer Anfälle in der Gesamtheit des neuronalen Netzwerkes im intakten Gehirn zuverlässig abbilden. So ergaben Untersuchungen in verschiedenen Gehirnregionen bezüglich des Gleichgewichts von Exzitation und Inhibition in MeCP2-defizienten Tieren konträre Ergebnisse. Während im Hippocampus eine vermehrte Übererregbarkeit beschrieben wurde, überwiegen im Cortex die inhibitorischen Komponenten bei verschlechterter Exzitation (Calfa et al. 2011; Dani et al. 2005; Moretti und Zoghbi 2006; Wood et al. 2009). Folglich mag die Summe aus den je nach Gehirnregion teils gegensätzlich vorherrschenden Veränderungen durch das Fehlen

von MeCP2 *in vivo* ein viel komplexeres und vom isolierten Gehirnschnitt abweichendes Epilepsieverhalten und somit auch ein anderes Ansprechen auf den antioxidativen Therapieansatz zeigen. Die Entwicklung von Methoden zur Verwirklichung solcher *In-vivo*-Untersuchungen könnte diesem Problem in Zukunft vielleicht Abhilfe schaffen.

Zusammengenommen zeigen die Ergebnisse durchaus Tendenzen zu einer Verbesserung der Epileptizität MeCP2-defizienter Mäuse unter Therapie mit dem Antioxidantiencocktail. Doch die beschriebenen Limitationen des verwendeten isolierten Gewebes, in der Dosierung der Stimulanzien und die dünne Literaturlage zu dem schwierig zu messen und zu beschreibendem Symptom der Epilepsie im RTT zeigen auch die Defizite und zukünftigen Lernfelder dieser Arbeit und der Forschung in diesem Gebiet allgemein auf.

Für erkrankte Rett-Patienten machen unterdessen die Studienergebnisse anderer Therapieansätze Hoffnung auf eine baldig verfügbare Therapie. So konnte unter der Behandlung mit dem bereits in den USA zugelassenem Tripeptid Trofinetid bei einem Teil der Studienteilnehmer eine deutliche Symptomverbesserung nachgewiesen werden (Neul et al. 2023). Auch gibt es erste erfolgsversprechende Einzelfallstudien zum klinischen Einsatz virusbasierter Gentransfers (Sinnott und Grey 2017).

5. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Dissertation war die Untersuchung und Evaluierung des therapeutischen Nutzens einer oralen antioxidativen Therapie auf die Epilepsiesymptomatik im RTT. Eine Verschiebung des zellulären Redox-Gleichgewichtes hin zu vermehrt oxidativen Verhältnissen sowie verminderte Serumspiegel von Antioxidantien sind beobachtete Veränderungen bei dieser komplexen neurologischen Entwicklungsstörung, demzufolge die Wiederherstellung des zellulären Redox-Gleichgewichtes ein vielversprechender Therapieansatz zu sein scheint.

In Ergänzung zu den von der Arbeitsgruppe bereits beschriebenen Verbesserungen vieler Parameter nach erfolgter AO-Fütterung, sollte nun die Auswirkung auf das komplexe Symptom der Epilepsieneigung im Mausmodell für das RTT näher betrachtet werden.

Hierfür wurden Hirnschnitte von Wildtyp- als auch *Mecp2^{fl/y}*-Mäusen mit und ohne AO-Fütterung elektrophysiologisch untersucht, indem mit prokonvulsiven Substanzen krampfähnliche Ereignisse provoziert und in den Regionen von Hippocampus und Cortex abgeleitet wurden. Die detektierten Entladungen wurden hinsichtlich der Parameter Entladungsfrequenz, Amplitude und zeitlicher Beginn analysiert, um einen möglichen antikonvulsiven Effekt zwischen den genotypisch unterschiedlichen Gruppen beschreiben zu können.

Sowohl Frequenz als auch Amplitude der Entladungen zeigten Tendenzen zu einer Verbesserung im Sinne einer verminderten Krampfneigung in den antioxidativ behandelten Knockout-Gruppen, aufgrund einer großen Standardabweichung der erhobenen Daten konnte jedoch keine statistische Signifikanz nachgewiesen werden. Die analysierten Startzeiten der ersten hippocampalen Entladungen als auch kortikal auftretenden *spreading depressions* zeigten eine ambivalente Ergebnislage und stellten sich somit als weniger gute deskriptive Parameter für die Epilepsieneigung im untersuchten Mausmodell dar.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die orale Fütterung mit einem Antioxidantiencocktail keinen signifikanten Effekt auf die Epilepsieneigung im Rett-Mausmodell zeigen konnte. Jedoch sind Tendenzen hin zu einer Verbesserung einzelner Parameter zu beobachten gewesen, die eine weiterführende Untersuchung der therapeutischen Redox-Stabilisierung als Behandlungsansatz für die Epilepsie im RTT unterstützen. Die Arbeit erweitert die wenigen bisherigen vorhandenen Forschungsergebnisse zur Bedeutung der Redox-Imbalance für die Epilepsiesymptomatik im RTT. Die Erkenntnisse über die Limitationen der vorliegenden Arbeit können dabei für zukünftig weiterführende Versuche zu diesem Thema von Nutzen sein.

Die bis dato insgesamt wenig verstandene Neurobiologie der Epilepsie im RTT bedarf weiterer eingehender Untersuchungen, vor allem unter dem Aspekt der schweren Belastung der Rett-Patienten durch dieses oft komplexe Symptom. Nicht umsonst schreiben Laviola

und Kollegen, dass jeder denkbare Behandlungsansatz der Epilepsie im Rett-Syndrom eine genauere Betrachtung und Erprobung wert sein sollte (Ricceri et al. 2013).

6. Literaturverzeichnis

Achilly NP, Wang W, Zoghbi HY (2021): Presymptomatic training mitigates functional deficits in a mouse model of Rett syndrome. *Nat.* 592, 596-600

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

Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM (1993): Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *PNAS* 90, 7915-7922

Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM (1995): Mitochondrial decay in aging. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 1271, 165-170

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

Andreyev AY, Kushnareva YE, Starkov A (2005): Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Biochem (Mosc)* 70, 200-214

Ariani F, Hayek G, Rondinella D, Artuso R, Mencarelli MA, Spanhol-Rosseto A, Pollazzon M, Buoni S, Spiga O, Ricciardi S (2008): FOXP1 is responsible for the congenital variant of Rett syndrome. *Am J Hum Genet* 83, 89-93

Aust AE, Eveleigh JF (1999): Mechanisms of DNA oxidation. *SEBM* 222, 246-252

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

Baroncelli L, Auel S, Rinne L, Schuster A-K, Brand V, Kempkes B, Dietrich K, Müller M (2022): Oral feeding of an antioxidant cocktail as a therapeutic strategy in a mouse model of Rett syndrome: merits and limitations of long-term treatment. *Antioxidants* 11, 1406

Bebbington A, Anderson A, Ravine D, Fyfe S, Pineda M, De Klerk N, Ben-Zeev B, Yatawara N, Percy A, Kaufmann WE (2008): Investigating genotype-phenotype relationships in Rett syndrome using an international data set. *Neurol* 70, 868-875

Belichenko PV, Wright EE, Belichenko NP, Masliah E, Li HH, Mobley WC, Francke U (2009): Widespread changes in dendritic and axonal morphology in Mecp2-mutant mouse models of Rett syndrome: evidence for disruption of neuronal networks. *J Comp Neurol* 514, 240-258

Bodda C, Tantra M, Mollajew R, Arunachalam JP, Laccone FA, Can K, Rosenberger A, Mironov SL, Ehrenreich H, Mannan AU (2013): Mild overexpression of *Mecp2* in mice causes a higher susceptibility toward seizures. *Am J Pathol* 183, 195-210

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

Calfa G, Hablitz JJ, Pozzo-Miller L (2011): Network hyperexcitability in hippocampal slices from *Mecp2* mutant mice revealed by voltage-sensitive dye imaging. *J Neurophysiol* 105, 1768-1784

Cardoza B, Clarke A, Wilcox J, Gibbon F, Smith PE, Archer H, Hryniewiecka-Jaworska A, Kerr M (2011): Epilepsy in Rett syndrome: association between phenotype and genotype, and implications for practice. *Seizure* 20, 646-649

Carney RM, Wolpert CM, Ravan SA, Shahbazian M, Ashley-Koch A, Cuccaro ML, Vance JM, Pericak-Vance MA (2003): Identification of MeCP2 mutations in a series of females with autistic disorder. *Pediatr Neurol* 28, 205-211

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

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

Chao H-T, Chen H, Samaco RC, Xue M, Chahrour M, Yoo J, Neul JL, Gong S, Lu H-C, Heintz N (2010): Dysfunction in GABA signalling mediates autism-like stereotypies and Rett syndrome phenotypes. *Nature* 468, 263-269

Chao HT, Zoghbi HY, Rosenmund C (2007): MeCP2 controls excitatory synaptic strength by regulating glutamatergic synapse number. *Neuron* 56, 58-65

Chebabo SR, Hester MA, Aitken PG, Somjen GG (1995): Hypotonic exposure enhances synaptic transmission and triggers spreading depression in rat hippocampal tissue slices. *Brain Res* 695, 203-216

Christodoulou J, Grimm A, Maher T, Bennetts B (2003): RettBASE: the IRSA MECP2 variation database—a new mutation database in evolution. *Hum Mutat* 21, 466-472

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

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

d'Orsi G, Demaio V, Minervini MG (2009): Myoclonic status misdiagnosed as movement disorders in Rett syndrome: a video-polygraphic study. *Epilepsy Behav* 15, 260-262

Dani VS, Chang Q, Maffei A, Turrigiano GG, Jaenisch R, Nelson SB (2005): Reduced cortical activity due to a shift in the balance between excitation and inhibition in a mouse model of Rett syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 12560-12565

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

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

Dolce A, Ben-Zeev B, Naidu S, Kossoff EH (2013): Rett syndrome and epilepsy: an update for child neurologists. *Pediatr Neurol* 48, 337-345

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

Enns GM, Cohen BH (2019): Clinical trials in mitochondrial disease: an update on EPI-743 and RP103. *J Inborn Errors Metab Screen* 5

Fallah MS, Eubanks JH (2020): Seizures in mouse models of rare neurodevelopmental disorders. *Neuroscience* 445, 50-68

Ferguson LR (2010): Chronic inflammation and mutagenesis. *Mutat Res-Fund Mol M* 690, 3-11

Fisher RS, Acevedo C, Arzimanoglou A, Bogacz A, Cross JH, Elger CE, Engel Jr J, Forsgren L, French JA, Glynn M (2014): ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia* 55, 475-482

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

Frei B (1994): Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: mechanisms of action. *Am J Med* 97, S5-S13

French JA (2007): Refractory epilepsy: clinical overview. *Epilepsia* 48, 3-7

Garofalo EA, Drury I, Goldstein GW (1988): EEG abnormalities and diagnosis of Rett syndrome. *Pediatr Neurol* 4, 350-353

Ghosh A, Carnahan J, Greenberg ME (1994): Requirement for BDNF in activity-dependent survival of cortical neurons. *Science* 263, 1618-1623

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

Girard M, Couvert P, Carrié A, Tardieu M, Chelly J, Beldjord C, Bienvenu T (2001): Parental origin of de novo MECP2 mutations in Rett syndrome. *Eur J Hum Genet* 9, 231-236

Glaze DG, Schultz RJ, Frost JD (1998): Rett syndrome: characterization of seizures versus non-seizures. *Electroencephalogr* 106, 79-83

Goffin D, Zhou ZJ (2012): The neural circuit basis of Rett syndrome. *Front Biol* 7, 428-435

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

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

Guy J, Cheval H, Selfridge J, Bird A (2011): The role of MeCP2 in the brain. *Annu Rev Cell Dev* 27, 631-652

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

Guy J, Gan J, Selfridge J, Cobb S, Bird A (2007): Reversal of neurological defects in a mouse model of Rett syndrome. *Science* 315, 1143-1147

Haas R, Light M, Rice M, Barshop B (1995): Oxidative metabolism in Rett syndrome: 1. Clinical studies. *Neuropediatrics* 26, 90-94

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

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, Witt-Engerström I, Opitz JM, Reynolds JF (1986): Rett syndrome: a suggested staging system for describing impairment profile with increasing age towards adolescence. *Am J Med Genet* 25, 47-59

Hagne I, Witt-Engerström I, Hagberg B (1989): EEG development in Rett syndrome. A study of 30 cases. *Electroencephalogr* 72, 1-6

Hammarström AK, Gage PW (2000): Oxygen-sensing persistent sodium channels in rat hippocampus. *J Physiol* 529, 107-118

Hammer S, Dorrani N, Dragich J, Kudo S, Schanen C (2002): The phenotypic consequences of MECP2 mutations extend beyond Rett syndrome. *Dev Disabil Res Rev* 8, 94-98

Harraan D (1956): Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.* 11, 298-300

Huang R-P, Wu J-X, Fan Y, Adamson ED (1996): UV activates growth factor receptors via reactive oxygen intermediates. *J Cell Biol* 133, 211-220

Huppke P, Held M, Hanefeld F, Engel W, Laccone F (2002): Influence of mutation type and location on phenotype in 123 patients with Rett syndrome. *Neuropediatrics* 33, 63-68

Huppke P, Köhler K, Brockmann K, Stettner GM, Gärtner J (2007): Treatment of epilepsy in Rett syndrome. *Eur J Paediatr Neurol* 11, 10-16

Ishii T, Makita Y, Ogawa A, Amamiya S, Yamamoto M, Miyamoto A, Oki J (2001): The role of different X-inactivation pattern on the variable clinical phenotype with Rett syndrome. *Brain Dev* 23, S161-S164

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

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

Jian L, Nagarajan L, De Klerk N, Ravine D, Christodoulou J, Leonard H (2007): Seizures in Rett syndrome: an overview from a one-year calendar study. *Eur J Paediatr Neurol* 11, 310-317

Jian L, Nagarajan L, De Klerk N, Ravine D, Bower C, Anderson A, Williamson S, Christodoulou J, Leonard H (2006): Predictors of seizure onset in Rett syndrome. *J Pediatr* 149, 542-547

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

Jung BP, Jugloff DG, Zhang G, Logan R, Brown S, Eubanks JH (2003): The expression of methyl CpG binding factor MeCP2 correlates with cellular differentiation in the developing rat brain and in cultured cells. *J Neurobiol* 55, 86-96

Kankirawatana P, Leonard H, Ellaway C, Scurlock J, Mansour A, Makris C, Dure L, Friez M, Lane J, Kiraly-Borri C (2006): Early progressive encephalopathy in boys and MECP2 mutations. *Neurology* 67, 164-166

Kerr A, Armstrong D, Prescott R, Doyle D, Kearney D (1997): Rett syndrome: Analysis of deaths in the British survey. *Eur Child Adolesc Psychiatry* 6, 71-74

Kiyosawa H, Suko M, Okudaira H, Murata K, Miyamoto E, Chung M-H, Kasai H, Nishimura S (1990): Cigarette smoking induces formation of 8-hydroxydeoxyguanosine, one of the oxidative DNA damages in human peripheral leukocytes. *Free Radic Res Commun* 11, 23-27

Kourie JI (1998): Interaction of reactive oxygen species with ion transport mechanisms. *Am J Physiol Cell Physiol* 275, C1-C24

Krajnc N (2015): Management of epilepsy in patients with Rett syndrome: perspectives and considerations. *Ther Clin Risk Manag* 11, 925

Krajnc N, Župančič N, Oražem J (2011): Epilepsy treatment in Rett syndrome. *J Child Neurol* 26, 1429-1433

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

Lauritzen M, Rice ME, Okada Y, Nicholson C (1988): Quisqualate, kainate and NMDA can initiate spreading depression in the turtle cerebellum. *Brain Res* 475, 317-327

Laurvick CL, De Klerk N, Bower C, Christodoulou J, Ravine D, Ellaway C, Williamson S, Leonard H (2006): Rett syndrome in Australia: a review of the epidemiology. *J Pediatr* 148, 347-352

Leach JK, Van Tuyle G, Lin P-S, Schmidt-Ullrich R, Mikkelsen RB (2001): Ionizing radiation-induced, mitochondria-dependent generation of reactive oxygen/nitrogen. *Cancer Res* 61, 3894-3901

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

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

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

Maffei S, De Felice C, Cannarile P, Leoncini S, Signorini C, Pecorelli A, Montomoli B, Lunghetti S, Ciccoli L, Durand T, et al. (2014): Effects of omega-3 PUFAs supplementation on myocardial function and oxidative stress markers in typical Rett syndrome. *Mediators Inflamm* 2014, 983178

Marchetto MC, Carromeu C, Acab A, Yu D, Yeo GW, Mu Y, Chen G, Gage FH, Muotri AR (2010): A model for neural development and treatment of Rett syndrome using human induced pluripotent stem cells. *Cell* 143, 527-539

Mari F, Azimonti S, Bertani I, Bolognese F, Colombo E, Caselli R, Scala E, Longo I, Grosso S, Pescucci C (2005): CDKL5 belongs to the same molecular pathway of MeCP2 and it is responsible for the early-onset seizure variant of Rett syndrome. *Hum Mol Genet* 14, 1935-1946

Matijevic T, Knezevic J, Slavica M, Pavelic J (2009): Rett syndrome: from the gene to the disease. *Eur Neurol* 61, 3-10

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

McLeod F, Ganley R, Williams L, Selfridge J, Bird A, Cobb SR (2013): Reduced seizure threshold and altered network oscillatory properties in a mouse model of Rett syndrome. *Neuroscience* 231, 195-205

Mecocci P, MacGarvey U, Kaufman AE, Koontz D, Shoffner JM, Wallace DC, Beal MF (1993): Oxidative damage to mitochondrial DNA shows marked age-dependent increases in human brain. *Ann Neurol* 34, 609-616

Medrihan L, Tantalaki E, Aramuni G, Sargsyan V, Dudanova I, Missler M, Zhang W (2008): Early defects of GABAergic synapses in the brain stem of a MeCP2 mouse model of Rett syndrome. *J Neurophysiol* 99, 112-121

Meehan RR, Lewis JD, McKay S, Kleiner EL, Bird AP (1989): Identification of a mammalian protein that binds specifically to DNA containing methylated CpGs. *Cell* 58, 499-507

Meister A (1995): Glutathione metabolism. *Methods Enzymol* 251, 3-7

Miller ER, Pastor-Barriuso R, Dalal D, Riemersma RA, Appel LJ, Guallar E (2005): Meta-analysis: high-dosage vitamin E supplementation may increase all-cause mortality. *Ann Intern Med* 142, 37-46

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

Miyake K, Nagai K (2007): Phosphorylation of methyl-CpG binding protein 2 (MeCP2) regulates the intracellular localization during neuronal cell differentiation. *Neurochem Int* 50, 264-270

Mody I, Lambert JD, Heinemann U (1987): Low extracellular magnesium induces epileptiform activity and spreading depression in rat hippocampal slices. *J Neurophysiol* 57, 869-888

Moretti P, Zoghbi HY (2006): MeCP2 dysfunction in Rett syndrome and related disorders. *Curr Opin Genet Dev* 16, 276-281

Mullaney BC, Johnston MV, Blue ME (2004): Developmental expression of methyl-CpG binding protein 2 is dynamically regulated in the rodent brain. *Neuroscience* 123, 939-949

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

Müller W, Bittner K (2002): Differential oxidative modulation of voltage-dependent K⁺ currents in rat hippocampal neurons. *J Neurophysiol* 87, 2990-2995

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

Na ES, Nelson ED, Kavalali ET, Monteggia LM (2013): The impact of MeCP2 loss-or gain-of-function on synaptic plasticity. *Neuropsychopharmacology* 38, 212-219

Nadia B-B, Isabelle G, Rima N, Agnès G, Gérard N, Olivier D, Catherine C (2008): Parental view of epilepsy in Rett syndrome. *Brain Dev* 30, 126-130

Nectoux J, Bahi-Buisson N, Guellec I, Coste J, De Roux N, Rosas H, Tardieu M, Chelly J, Bienvenu T (2008): The p. Val66Met polymorphism in the BDNF gene protects against early seizures in Rett syndrome. *Neurology* 70, 2145-2151

Neul J, Fang P, Barrish J, Lane J, Caeg E, Smith E, Zoghbi H, Percy A, Glaze D (2008): Specific mutations in methyl-CpG-binding protein 2 confer different severity in Rett syndrome. *Neurology* 70, 1313-1321

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

Neul JL, Percy AK, Benke TA, Berry-Kravis EM, Glaze DG, Marsh ED, Youakim JM (2023): Trofinetide for the treatment of Rett syndrome: a randomized phase 3 study. *Nat Med* 29, 1468-1475

Niedermeyer E, Naidu SB, Plate C (1997): Unusual EEG theta rhythms over central region in Rett syndrome: considerations of the underlying dysfunction. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 28, 36-43

Nissenkorn A, Gak E, Vecsler M, Reznik H, Menascu S, Ben Zeev B (2010): Epilepsy in Rett syndrome—the experience of a National Rett Center. *Epilepsia* 51, 1252-1258

Oberley LW (1988): Free radicals and diabetes. *Free Radic Biol Med* 5, 113-124

Ott M, Gogvadze V, Orrenius S, Zhivotovsky B (2007): Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis* 12, 913-922

Panighini A, Duranti E, Santini F, Maffei M, Pizzorusso T, Funel N, Taddei S, Bernardini N, Ippolito C, Viridis A, et al. (2013): Vascular dysfunction in a mouse model of Rett syndrome and effects of curcumin treatment. *PLoS ONE* 8, e64863

Pecorelli A, Leoni G, Cervellati F, Canali R, Signorini C, Leoncini S, Cortelazzo A, De Felice C, Ciccoli L, Hayek J (2013): Genes related to mitochondrial functions, protein degradation, and chromatin folding are differentially expressed in lymphomonocytes of Rett syndrome patients. *Mediators Inflamm* 2013, 137629

Phiel CJ, Zhang F, Huang EY, Guenther MG, Lazar MA, Klein PS (2001): Histone deacetylase is a direct target of valproic acid, a potent anticonvulsant, mood stabilizer, and teratogen. *J Biol Chem* 276, 36734-36741

Plachta H, Bartnikowska E, Obara A (1992): Lipid peroxides in blood from patients with atherosclerosis of coronary and peripheral arteries. *Clin Chim Acta* 211, 101-112

Quideau S, Deffieux D, Douat-Casassus C, Pouységu L (2011): Pflanzliche Polyphenole: chemische Eigenschaften, biologische Aktivität und Synthese. *Angew Chem* 123, 610-646

Radimer K, Bindewald B, Hughes J, Ervin B, Swanson C, Picciano MF (2004): Dietary supplement use by US adults: data from the National Health and Nutrition Examination Survey, 1999–2000. *Am J Epidemiol* 160, 339-349

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

Ricceri L, De Filippis B, Laviola G (2013): Rett syndrome treatment in mouse models: searching for effective targets and strategies. *Neuropharmacology* 68, 106-115

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

Rohdin M, Fernell E, Eriksson M, Albåge M, Lagercrantz H, Katz-Salamon M (2007): Disturbances in cardiorespiratory function during day and night in Rett syndrome. *Pediatr Neurol* 37, 338-344

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

Rugg-Gunn F, Harrison N, Duncan J (2001): Evaluation of the accuracy of seizure descriptions by the relatives of patients with epilepsy. *Epilepsy Res* 43, 193-199

Rutecki PA, Lebeda FJ, Johnston D (1987): 4-Aminopyridine produces epileptiform activity in hippocampus and enhances synaptic excitation and inhibition. *J Neurophysiol* 57, 1911-1924

Sah R, Galeffi F, Ahrens R, Jordan G, Schwartz-Bloom RD (2002): Modulation of the GABAA-gated chloride channel by reactive oxygen species. *J Neurochem* 80, 383-391

Saywell V, Viola A, Confort-Gouny S, Le Fur Y, Villard L, Cozzone PJ (2006): Brain magnetic resonance study of Mecp2 deletion effects on anatomy and metabolism. *Biochem Biophys Res Commun* 340, 776-783

Scala E, Ariani F, Mari F, Caselli R, Pescucci C, Longo I, Meloni I, Giachino D, Bruttini M, Hayek G (2005): CDKL5/STK9 is mutated in Rett syndrome variant with infantile spasms. *J Med Genet* 42, 103-107

Schanen NC, Dahle EJR, Capozzoli F, Holm VA, Zoghbi HY, Francke U (1997): A new Rett syndrome family consistent with X-linked inheritance expands the X chromosome exclusion map. *Am J Hum Genet* 61, 634-641

Shahbazian M, Young J, Yuva-Paylor L, Spencer C, Antalffy B, Noebels J, Armstrong D, Paylor R, Zoghbi H (2002): Mice with truncated MeCP2 recapitulate many Rett syndrome features and display hyperacetylation of histone H3. *Neuron* 35, 243-254

Sierra C, Vilaseca MA, Brandi N, Artuch R, Mira A, Nieto M, Pineda M (2001): Oxidative stress in Rett syndrome. *Brain Dev* 23 Suppl 1, S236-239

Sinnett SE, Gray SJ (2017): Recent endeavors in MECP2 gene transfer for gene therapy of Rett syndrome. *Discov Med* 132, 153-159

Skulachev VP (1996): Role of uncoupled and non-coupled oxidations in maintenance of safely low levels of oxygen and its one-electron reductants. *Q Rev Biophys* 29, 169-202

Smith C, Carney JM, Starke-Reed P, Oliver C, Stadtman E, Floyd R, Markesbery W (1991): Excess brain protein oxidation and enzyme dysfunction in normal aging and in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci* 88, 10540-10543

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

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

Steffenburg U, Hagberg G, Hagberg B (2001): Epilepsy in a representative series of Rett syndrome. *Acta Paediatr* 90, 34-39

Sticozzi C, Belmonte G, Pecorelli A, Cervellati F, Leoncini S, Signorini C, Ciccoli L, De Felice C, Hayek J, Valacchi G (2013): Scavenger receptor B1 post-translational modifications in Rett syndrome. *FEBS Lett* 587, 2199-2204

Storz G, Tartaglia LA, Ames BN (1990): Transcriptional regulator of oxidative stress-inducible genes: direct activation by oxidation. *Science* 248, 189-194

Sudha K, Rao AV, Rao A (2001): Oxidative stress and antioxidants in epilepsy. *Clin Chim Acta* 303, 19-24

Tao J, Van Esch H, Hagedorn-Greiwe M, Hoffmann K, Moser B, Raynaud M, Sperner J, Fryns J-P, Schwinger E, Gécz J (2004): Mutations in the X-linked cyclin-dependent kinase-like 5 (CDKL5/STK9) gene are associated with severe neurodevelopmental retardation. *Am J Hum Genet* 75, 1149-1154

Tarquinio DC, Hou W, Neul JL, Kaufmann WE, Glaze DG, Motil KJ, Skinner SA, Lee H-S, Percy AK (2015): The changing face of survival in Rett syndrome and MECP2-related disorders. *Pediatr Neurol* 53, 402-411

Thomson JP, Skene PJ, Selfridge J, Clouaire T, Guy J, Webb S, Kerr AR, Deaton A, Andrews R, James KD (2010): CpG islands influence chromatin structure via the CpG-binding protein Cfp1. *Nature* 464, 1082-1086

Treiman DM (2001): GABAergic mechanisms in epilepsy. *Epilepsia* 42, 8-12

Ure K, Lu H, Wang W, Ito-Ishida A, Wu Z, He L-j, Sztainberg Y, Chen W, Tang J, Zoghbi HY (2016): Restoration of Mecp2 expression in GABAergic neurons is sufficient to rescue multiple disease features in a mouse model of Rett syndrome. *eLife* 5, e14198

Vashi N, Justice MJ (2019): Treating Rett syndrome: from mouse models to human therapies. *Mamm Genome* 30, 90-110

Villard L (2007): MECP2 mutations in males. *J Med Genet* 44, 417-423

Waldbaum S, Patel M (2010): Mitochondrial dysfunction and oxidative stress: a contributing link to acquired epilepsy? *J Bioenerg* 42, 449-455

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

Watson P, Black G, Ramsden S, Barrow M, Super M, Kerr B, Clayton-Smith J (2001): Angelman syndrome phenotype associated with mutations in MECP2, a gene encoding a methyl CpG binding protein. *J Med Genet* 38, 224-228

Wood L, Gray NW, Zhou Z, Greenberg ME, Shepherd GM (2009): Synaptic circuit abnormalities of motor-frontal layer 2/3 pyramidal neurons in an RNA interference model of methyl-CpG-binding protein 2 deficiency. *J Neurosci* 29, 12440-12448

Young JI, Hong EP, Castle JC, Crespo-Barreto J, Bowman AB, Rose MF, Kang D, Richman R, Johnson JM, Berget S (2005): Regulation of RNA splicing by the methylation-dependent transcriptional repressor methyl-CpG binding protein 2. *Proc Natl Acad Sci* 102, 17551-17558

Danksagung

An dieser Stelle möchte zu aller erst meinem Doktorvater, Prof. Dr. Michael Müller, für die Bereitstellung des Dissertationsthemas sowie das geduldige und allzeit kompetente Heranführen und Begleiten in der guten wissenschaftlichen Praxis danken. Seine Tür stand im wahrsten Sinne des Wortes jederzeit offen, um auf theoretische Fragestellungen Gedankenanstöße zu geben oder bei Problemen rein praktischer Natur kurzerhand selbst am experimentellen Setup herumzuschrauben.

Ein ebenso großes Dankeschön geht an Belinda Kempkes, die als technische Assistentin wesentlich zum Erlernen und praktischen Gelingen des experimentellen Teils beigetragen hat. Darüber hinaus war sie als „gute Seele“ des Teams durch die plaudernde Überbrückung täglich anfallender Wartezeiten oder das zuversichtliche Aufbauen nach fehlgeschlagenen Versuchen eine echte Bereicherung.

Ebenfalls möchte ich Markus Kopp für die ergänzenden Messungen zur Vervollständigung der Gruppen danken.

Weiterer Dank gilt dem Zweitprüfer, Prof. Dr. Thomas Beyer, für das konstruktive Feedback im Rahmen der Fortschrittsberichte sowie die Begutachtung der Dissertation.

Zu guter Letzt möchte ich der „Laborflurgemeinschaft“ der Arbeitsgruppen Müller und Hülsmann für ein entspanntes und anregendes Arbeitsklima danken.