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

Zerebrale Kartierung der neuronalen Redox-Veränderung in einem Maus-Modell für das Rett-Syndrom

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
(für Zahnheilkunde)
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Hendrik Woeste

aus

Bocholt StT Stenern

Göttingen 2024

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

Zerebrale Kartierung der neuronalen Redox-Veränderung in einem Maus-Modell für das Rett-Syndrom

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
(für Zahnheilkunde)
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Hendrik Woeste

aus

Bocholt StT Stenern

Göttingen 2024

Dekan:	Prof. Dr. med. W. Brück

Betreuungsausschuss

Betreuer/in	Prof. Dr. rer. nat. M. Müller
Ko-Betreuer/in:	Prof. Dr. rer. Nat. I. Bogeski

Prüfungskommission

Referent/in	Prof. Dr. rer. nat. M. Müller
Ko-Referent/in:	Prof. Dr. rer. Nat. I. Bogeski
Drittreferent/in:	

Datum der mündlichen Prüfung: 08.07.2025

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Zerebrale Kartierung der neuronalen Redox-Veränderung in einem Maus-Modell 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**

Abkürzungsverzeichnis ..... **IV**

1 Einleitung **1**

1.1 Das Rett-Syndrom 1

1.2 Genetische und Molekulare Grundlagen 2

1.3 Unterschiede der Mitochondrien im Rett-Syndrom 3

1.4 Oxidativer Stress 5

1.5 Ziel der Arbeit 7

2 Material und Methoden **10**

2.1 Maus-Modell für das Rett-Syndrom 10

2.2 Redoxindikator roGFP 11

2.3 Imaging hippokampaler Schnitte 12

2.3.1 Präparation 13

2.3.2 45 µm Kryoschnitte 14

2.3.3 400 µm akute Schnitte 15

2.3.4 Reagenzien 16

2.3.5 Durchführung der optischen Messungen 17

2.4 Auswertung 23

3 Ergebnisse **26**

3.1 Kalibrierung 30

3.2 Relative Oxidationslevel und Redoxpotentiale im Vergleich der Genotypen und Geschlechter 33

3.3 Relative Oxidationslevel im Altersvergleich 46

3.4 Alternative Methoden 49

4 Diskussion **52**

4.1 Einfluss von ROS 52

4.2 Verfahren und Analyse 54

4.3 Einordnung der Ergebnisse in den Kontext des Rett-Syndroms 56

4.4 Resümee 61

5 Zusammenfassung und Ausblick 62

6 Literaturverzeichnis 64

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau und Materialien zur Präparation 13
Abbildung 2: 2-Photonen-Fluoreszenzmikroskopie Schema 18
Abbildung 3: Aufbau 2-Photonen-Mikroskop 19
Abbildung 4: 2-Photonenmikroskopie schematischer Aufbau 21
Abbildung 5: Auswertung mit dem Programm Metamorph am Beispiel 45 µm Schnitte 24
Abbildung 6: Großansicht Rohbilder Hippokampus am Beispiel von 150 µm Schnitten 26
Abbildung 7: Orientierung in Hirnschnitten 27
Abbildung 8: Mehr rostral gelegene „frühe“ Hirnschnitte 28
Abbildung 9: „späte“ (mehr caudal gelegene) Hirnschnitte 29
Abbildung 10: Bildbeispiele einiger Areale zur Verwertbarkeit von Zellen 30
Abbildung 11: Kalibrierung 31
Abbildung 12: Kalibrierung, Verwertbarkeit, Auswertung 32
Abbildung 13: Relative Oxidationsstufen der männlichen Wildtyp- und Knockoutmäuse im Hippokampus, p51-60. 35
Abbildung 14: Redoxpotential [mV] der männlichen Wildtyp- und Knockoutmäuse im Hippokampus, p51-60. 36
Abbildung 15: Relative Oxidationsstufen der weiblichen Wildtypen und heterozygoten Mäuse im Hippokampus, p51-60. 37
Abbildung 16: Redoxpotential [mV] der weiblichen Wildtypen und heterozygoten Mäuse im Hippokampus, p51-60. 38
Abbildung 17: Relative Oxidationsstufen der weiblichen Wildtypen und heterozygoten Mäuse im Hippokampus, p96-175. 39
Abbildung 18: Redoxpotential [mV] der weiblichen Wildtypen und heterozygoten Mäuse im Hippokampus, p96-175. 40
Abbildung 19: Relative Oxidationsstufen der männlichen Wildtyp- und Knockoutmäuse im Kortex, p51-60. 41
Abbildung 20: Redoxpotential [mV] der männlichen Wildtyp- und Knockoutmäuse im Kortex, p51-60. 42
Abbildung 21: Relative Oxidationsstufen der weiblichen Wildtypen und heterozygoten Mäuse im Kortex, p51-60. 43
Abbildung 22: Redoxpotential [mV] der weiblichen Wildtypen und heterozygoten Mäuse im Kortex, p51-60. 44
Abbildung 23: relative Oxidationsstufen der weiblichen Wildtypen und heterozygoten Mäuse im Kortex, p96-175. 45
Abbildung 24: Redoxpotential [mV] der weiblichen Wildtypen und heterozygoten Mäuse im Kortex, p96-175. 46
Abbildung 25: Relative Oxidationsstufen der männlichen Wildtypen p51-60 versus p96-175. 47
Abbildung 26: Relative Oxidationsstufen der weiblichen Wildtypen p51-60 versus p96-175. 48
Abbildung 27: Relative Oxidationsstufen der heterozygoten Weibchen p51-60 versus p96-175. 49

Abkürzungsverzeichnis

ACSF	artifizielle, zerebrospinale Flüssigkeit
ATP	Adenosintriphosphat
Au1/AuD/AuV	auditorischer Kortex
CA1/CA3	*Cornu Ammonis*
CCD	*charged-coupled device*
CO1	Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit 1
DA	Diamid
DG	Gyrus Dentatus
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
ECT/Ect	entorhinaler Kortex
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
$GABA_A$	γ-Aminobuttersäure
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GSH/GSSG	Glutathion reduziert/oxidiert
IP_3	Inositol-Triphosphat
LPtA	lateral-parietaler Assoziationskortex
LV	lateraler Ventrikel
M1/M2	motorischer Kortex
MeCP2	Methyl CpG bindendes Protein 2, exprimiertes Protein
Mecp2	Methyl CpG bindendes Protein 2, kodierendes Gen (Maus)
MECP2	Methyl CpG bindendes Protein 2, kodierendes Gen (Mensch)
$Mecp2^{+/y}$	männliche Wildtypmaus

Mecp2$^{-/y}$	männliche *Mecp2*-Knockoutmaus
Mecp2$^{+/+}$	weibliche Wildtypmaus
Mecp2$^{+/-}$	weibliche heterozygote *Mecp2*-Maus
MPtA	medial-parietaler Assoziationskortex
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NAD(P)$^{+}$/NAD(P)H	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat oxidiert/reduziert
NEM	N-Ethylmaleinimid
NMDA	N-methyl-D-Aspartat
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PFA	Paraformaldehyd
roGFP1c	redoxsensitives grün fluoreszierendes Protein 1 (zytosolisch exprimiert)
roGFP1m	redoxsensitives grün fluoreszierendes Protein 1 (mitochondrial exprimiert)
RNS	reaktive Stickstoffspezies
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
Rox	Redoxantwortbereich Grenzwert maximal oxidiert
Rred	Redoxantwortbereich Grenzwert maximal reduziert
RSA	retrosplenialer agranulärer Kortex
RSG	retrosplenialer granulärer Kortex
S1/S1BF/S1HL/S1Tr	primärer somatosensorischer Kortex
S2	sekundärer somatosensorischer Kortex
Slc2a4	*solute carrier 2A4*
SOD	Superoxid-Dismutase
TeA	temporaler Assoziationskortex
Thy-1.2	*thymocyte differentiation antigen1, CD90*
V1/V2L/V2ML/V2MM	visueller Kortex

1 Einleitung

1.1 Das Rett-Syndrom

Das Rett-Syndrom ist eine schwere neuronale Entwicklungsstörung, die auf einen Gendefekt zurückzuführen ist (Rett 1966). Dieser Defekt ist auf dem X-Chromosom lokalisiert und führt bei männlichen Embryonen aufgrund des hemizygot vorliegenden Chromosoms meist noch intrauterin zum Tod. Außerdem findet die Mutation vor allem spontan in Spermien statt. Aus diesem Grund sind hauptsächlich Mädchen von dieser Erkrankung betroffen. Die Prävalenz liegt bei 1:15000 – 1:10000 (Chahrour und Zoghbi 2007).

Typisch für das Rett-Syndrom ist eine anfänglich normale Entwicklung des Kindes. Diese endet nach 6-18 Monaten. Es folgt ein Stadium der Stagnation, teils auch Regression, gekennzeichnet durch Wachstumsverzögerung, Mikrozephalie und motorischer Auffälligkeiten. Dieses zweite Stadium kann bis zum dritten Lebensjahr dauern. Die motorischen Auffälligkeiten sind gekennzeichnet durch den Verlust zuvor erlernter und angewendeter Fähigkeiten. Typisch sind auch die Waschbewegungen der Hände in Brusthöhe sowie rhythmisches Wippen mit dem Oberkörper. Geistige Behinderung, teilweise bis zum vollständigen Verlust der Sprache, Epilepsie, Schlafstörungen und unregelmäßige Atmung sowie Apnoe mit intermittierender Hypoxie sind weitere Merkmale dieses Stadiums der Erkrankung (Hagberg et al. 1983; Julu et al. 2001; Chahrour und Zoghbi 2007; Stettner et al. 2008).

Etwa bis zum zehnten Lebensjahr schließt sich eine Plateauphase an. In diesem dritten Stadium des Rett-Syndroms können sich die autistischen Züge wieder etwas abschwächen. Allerdings sind häufigere Anfälle und eine langsame Verschlechterung der Grobmotorik zu beobachten. Zuletzt folgt ein viertes Stadium, das Jahrzehnte dauern kann und in welchem sich die kognitiven Fähigkeiten weiter verbessern können. Die Anfälle nehmen in ihrer Häufigkeit ab, jedoch verschlechtert sich die Motorik, so dass die Patienten irgendwann nicht mehr selbstständig laufen können (Hagberg et al. 1983). Wie alt die Patienten letztlich

werden, ist sehr unterschiedlich und hängt in großem Maße von der Schwere der Mutation des X-Chromosoms ab (Hagberg et al. 2001). Zu den häufigsten Todesursachen gehören epileptische Anfälle und akute kardiale Fehlfunktionen. Letztere werden durch unregelmäßige Atmung und Apnoe bzw. durch eine dadurch hervorgerufene Hypoxie verstärkt oder hervorgerufen (Kerr et al. 1997; Julu et al. 2001; Steffenburg et al. 2001).

1.2 Genetische und Molekulare Grundlagen

Das klassische Rett-Syndrom beruht bei über 90% der Fälle auf einem Gendefekt des X-Chromosoms. Im speziellen handelt es sich um eine Mutation des dort vorliegenden dominanten *MECP2*-Gens (Amir et al. 1999). Dieses kodiert für den Transkriptionsfaktor MeCP2 (methyl-CpG-bindendes Protein 2), welcher die Transkription verschiedenster Gene stimuliert, aber umgekehrt auch oft für ein Gen-Silencing verantwortlich ist (Chahrour et al. 2008).

Am stärksten wird MeCP2 in Neuronen des zentralen Nervensystems exprimiert (Jung et al. 2003). In besonderem Maße ist dies im Bereich der Pyramidenzellschicht des *Cornu Ammonis* 1 (CA1) des Hippokampus der Fall, schwächer im Areal CA3. Es sind über siebenhundert verschiedene Mutationen des *MECP2*-Gens bekannt, die jeweils eine schwerere oder leichtere Ausprägung des Rett-Syndroms zur Folge haben können. Als mechanistische Ursachen sind Missense-, Nonsense- und Frameshift-Mutationen zu nennen (Jian et al. 2005).

Bei einer Missense-Mutation führt eine Basenpaar-Substitution zu einer veränderten Aminosäuresequenz. Die Funktion des resultierenden Proteins ist nun unter Umständen eine andere, bzw. die ursprüngliche Funktion ist nur noch eingeschränkt vorhanden. Zu einer Nonsense-Mutation führt eine Basenpaar-Substitution, die ein Stopcodon ins *MECP2*-Gen einbaut. Dadurch wird die Transkription zu früh abgebrochen und es entstehen nur Bruchstücke des Proteins. Die Nonsense-Mutation ist in ihrer klinischen Auswirkung die gravierendste. Die Frameshift-Mutation entsteht durch Deletion, also der Entfernung von Basenpaaren aus dem Gen. In weniger gravierenden Fällen führt dies zu einer Verkürzung des Proteins, das dann eher geringe funktionelle Einbußen zeigt. Da immer drei Basenpaare

(Codon) eine Aminosäure codieren, muss eine durch drei teilbare Anzahl an Basenpaaren im Gen deletiert werden, um eine Frameshift-Mutation hervorzurufen. Diese Deletion muss außerdem im Leseraster liegen. Wird eine andere Anzahl an Basenpaaren deletiert, bzw. an einer Stelle, die das Leseraster verschiebt, so verändert sich das resultierende Protein ab dieser Stelle grundlegend. Dies kann zu einem vollständigen Funktionsverlust führen und hat ähnlich gravierende Konsequenzen wie die nonsense Mutation.

1.3 Unterschiede der Mitochondrien im Rett-Syndrom

Die Symptome des Rett-Syndroms sind denen einiger Stoffwechselkrankheiten sehr ähnlich, z. B. denen des Pyruvatdehydrogenase-Komplex-Mangels, des Pyruvatcarboxylase-Mangels, des Thiamin-Mangels oder des Leigh-Syndroms. Daher ging man anfangs davon aus, dass das Rett-Syndrom auf Fehlfunktionen der Mitochondrien und des Kohlenhydrat-Stoffwechsels zurückzuführen ist (Matsuishi et al. 1994; Haas et al. 1995a; 1995b).

Die Blutwerte einiger Patienten mit Rett-Syndrom zeigen Auffälligkeiten, die diese Theorie unterstützen. Bei ihnen findet man erhöhte und schwankende Lactat- und Pyruvat-Spiegel im Blutserum und Liquor (Eeg-Olofsson et al. 1990; Dotti et al. 1993; Matsuishi et al. 1994; Haas et al. 1995a; 1995b). Allerdings war dies nur bei Patienten der Fall, die gleichzeitig auch eine unregelmäßige Atmung aufweisen. Letztere könnte also auch ursächlich sein (Clarke et al. 1990). Weiterhin findet sich ein leicht erhöhter Glucose-Verbrauch, als Hinweis auf Veränderungen im Glucose-Stoffwechsel (Haas et al. 1995a; 1995b; Villemagne et al. 2002). Es wurde ein ca. 30% niedrigerer Blutzuckerspiegel in adulten *Mecp2*$^{-/y}$ Mäusen nachgewiesen (Janc et al. 2016) und eine erhöhte Aktivität des Glucose-Transportes *Slc2a4* (solute carrier 2A4) (Großer et al. 2012). Diese Erkenntnisse deuten auf unterschiedliche Ausprägungen des Rett-Syndroms hin, abhängig von der zu Grunde liegenden Mutation des *Mecp2*-Gens.

Beweise für eine Beteiligung der Mitochondrien haben Untersuchungen mit einem Elektronenmikroskop ergeben. Gewebeproben von Muskeln und *post mortem* gewonnenem Frontallappen zeigten Formveränderungen und Auffälligkeiten. Die Mitochondrien waren vergrößert und angeschwollen, zeigten sich unter dem Elektronenmikroskop eher

durchscheinend. Sie wiesen zudem irreguläre Christae sowie Vakuolisierung und granuläre Einschlüsse auf (Eeg-Olofsson et al. 1990; Dotti et al. 1993; Cornford et al. 1994).

Hirngewebe-Proben von Patienten verschiedenen Alters deuteten darauf hin, dass der Zustand der Mitochondrien sich im Verlauf der Zeit verschlechtert, auch wenn die neurologischen Symptome sich stabilisieren (Cornford et al. 1994). Die Erkenntnis, dass die Morphologie der Mitochondrien so deutlich verändert ist, führte zu der Annahme, dass eine Fehlfunktion bei der oxidativen Phosphorylierung ursächlich für das Rett-Syndrom sein könnte (Eeg-Olofsson et al. 1990). Einige Muskelbiopsien stützen diese Annahme durch den Nachweis reduzierter Aktivität einiger an der Atmungskette beteiligter Enzyme (NADH-Cytochrom-C-Reduktase, Succinat-Cytochrom-C-Reduktase und Cytochrom-C-Oxidase). Dies ist auch in physiologisch unauffällig erscheinenden Mitochondrien der Fall (Coker und Melnyk 1991; Dotti et al. 1993). Nicht jede Studie an Biopsie Material hat jedoch diese metabolischen Veränderungen gezeigt (Haas et al. 1995a; 1995b). In *post mortem* gewonnenem Gewebe des Frontalkortex wurde zudem festgestellt, dass Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit 1 (CO1) herunterreguliert ist. Dies ist ein weiterer Hinweis auf mögliche Fehlfunktionen der Mitochondrien im Gehirn (Gibson et al. 2010).

Ursächlich wird eine Dysregulation angenommen, bedingt durch eine Mutation auf dem X-Chromosom oder in der mitochondrialen Desoxyribonukleinsäure (DNA) (Eeg-Olofsson et al. 1990). Blutuntersuchungen an Patienten haben gezeigt, dass verschiedene mitochondrien-assoziierte Gene, inklusive derer der Atmungskomplexe und ATP-Synthase (Adenosintriphosphat-Synthase), hochreguliert sind (Pecorelli et al. 2013). Andere Untersuchungen haben allerdings abweichende Ergebnisse geliefert, was potenziell auf methodische Unterschiede zurückführbar sein könnte. Weiterführende Versuche mit Tumorzellen eines Neuroblastoms, ebenso wie Versuche mit *Mecp2*-knockout Mäusen, haben den Zusammenhang von MeCP2-Mangel und mitochondrialer Fehlfunktion bestätigt (Gibson et al. 2010). So zeigen drei Wochen alte *Mecp2*$^{-/y}$-Mäuse bereits veränderte Mitochondrien in kortiko-hippokampalen Schnitten, zeitgleich mit ersten Rett-Symptomen (Belichenko et al. 2009).

Untersuchungen zur Enzym-Aktivität und Messungen mit einer Sauerstoff-Elektrode (Clark-Elektrode) haben eine um 30% erhöhte Respirationsrate und verringerte mitochondriale

Kopplung feststellen können (Kriaucionis et al. 2006). Als Grund hierfür wird ein Protonenleck der inneren Mitochondrienmembran angenommen, dass eine kompensatorische Erhöhung der basalen mitochondrialen Respiration zu Folge hat. Unterstützt wird diese Vermutung durch erhöhte ratiometrische Werte der FAD/NADH-Autofluoreszenz (Flavin-Adenin-Dinukleotid/Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid) und weniger negative Membranpotentiale (Protonenleck) im adulten Hippokampus von *Mecp2*$^{-/y}$-Mäusen (Großer et al. 2012). Da sich trotzdem normale hippokampale ATP-Level nachweisen lassen (Fischer et al. 2009), müssen die Mitochondrien offenbar sehr viel stärker arbeiten, um die beobachtete Kompensation zu gewährleisten. Damit wäre die Gesamtkapazität der Mitochondrien drastisch herabgesetzt, was erklärt, dass unter besonderer Beanspruchung (Hypoxie oder verstärkte neuronale Aktivität) die Symptome des Rett-Syndroms deutlicher zur Geltung kommen. Gleichzeitig wird mit erhöhter ATP-Produktion, bzw. basaler mitochondrialer Respiration potentiell eine größere Menge reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) freigesetzt (De Filippis et al. 2015; Valenti et al. 2017; Can et al. 2019).

1.4 Oxidativer Stress

In allen Zellen herrscht eine Redoxbalance, die für die reibungslose Funktion der verschiedenen Komponenten essenziell ist. Viele Proteine können in oxidierter, oder reduzierter Form vorliegen und sind entsprechend in ihrer Funktion eingeschränkt oder moduliert. Aus diesem Grund gibt es verschiedene Puffersysteme und Enzyme, die Verschiebungen dieser Redoxbalance kompensieren und auffangen. Das Protein Glutathion ist einer dieser Puffer, denn es kann reduziert (GSH) oder oxidiert (GSSG) vorliegen. Kommt es durch physiologische oder pathologische Vorgänge zu einer Erhöhung an reduzierenden bzw. oxidierenden Verbindungen, so kann Glutathion in seiner jeweiligen Form diese redoxaktiven Stoffe abfangen. Es kann also stellvertretend für ein anderes Protein oxidiert/reduziert werden. Dadurch wird anderen redoxempfindlichen Enzymen die ungestörte Funktion ermöglicht und ein weitestmöglich konstantes Redoxmilieu erzeugt (Meyer et al. 2007). Weitere Redoxpuffer sind H_2O_2/H_2O, NAD(P)H/NAD(P) (Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid (-Phosphat)) und Cystein/Cystin.

Diese Redoxpuffer werden von Zell-endogenen Enzymen unterstützt, die die aggressiven Stoffe in Harmlose umwandeln. Besonders aggressiv sind reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und reaktive Stickstoffspezies (RNS). Für die Katalyse ihrer Metabolisierung sind verschiedenste, sehr effizient und schnell arbeitende, Enzyme verantwortlich. Hier ist vor allem die Superoxid-Dismutase (SOD) zur Umsetzung von Superoxid zu Wasserstoffperoxid (H_2O_2) zu nennen. SOD1 findet sich hauptsächlich im Intermembranraum von Mitochondrien und im Zytosol, während SOD2 in der Mitochondrienmatrix zu finden ist. Diese Superoxid-Dismutasen sind elementar, um eine Akkumulation von O^{2-} zu verhindern, die Proteine beschädigen und inaktivieren kann. Vor allem Proteine mit Thiol-Gruppen sind betroffen (Fridovich 1997). Weitere redoxstabilisierende Enzyme sind die Katalase, Glutathion-Peroxidase, Glutathion-Reduktase und Glutathion-Transferase.

Redoxreaktionen sind durch eine Übertragung von Elektronen gekennzeichnet. Der oxidierte Stoff gibt Elektronen ab und der reduzierte Stoff nimmt Elektronen auf. Also sind Stoffe mit hoher Elektronegativität besonders starke Oxidationsmittel. Dazu gehören im Organismus vor allem die ROS (zum Beispiel Superoxid, Hydroxyl-Radikale oder H_2O_2) und die RNS (vor allem Stickstoffmonoxid). Besonders wichtig und aggressiv in den Zellen ist Superoxid, das zu ca. 80% in den Mitochondrien gebildet wird und die zelluläre Redoxbalance stark beeinflusst (Boveris und Chance 1973). Daher wird es durch die Superoxid-Dismutase zu H_2O_2 umgesetzt, was deutlich weniger aggressiv ist und schnell in die Umgebung diffundiert. Dies ist insofern von Bedeutung, als dass H_2O_2 ein intrazellulärer Botenstoff ist und die Funktion verschiedenster zellulärer Enzyme beeinflusst. Ein Teil des Superoxids reagiert zu RNS, die Lipidperoxidation oder Proteinnitrosylierung verursachen kann (Pryor 1986).

Es wurden bisher über 890 menschliche Proteine ermittelt, die wahrscheinlich sensibel auf Änderungen im Redoxgleichgewicht reagieren (Weerapana et al. 2010). Das komplexe System aus redoxempfindlichen Enzymen oder auch Ionenkanälen (spannungsabhängige Na^+- und K^+-Kanäle) und Rezeptoren wie z. B. NMDA (N-methyl-D-Aspartat)-, $GABA_A$ (Gamma-Aminobuttersäure A)-, Ryanodin- und Inositol-Triphosphat (IP_3)-Rezeptoren ist zwangsläufig sehr anfällig und kann bei einem Redoxungleichgewicht zu zellulärem Stress führen. Als Resultat können die Zellen ihre Funktion nicht mehr adäquat erfüllen und es ergeben sich neurologische Ausfälle wie auch beim Rett-Syndrom (De Felice et al. 2012; Großer et al. 2012). Im Blutserum von Rett-Patienten wurden ein verringerter Vitamin E-

Spiegel und verringerte SOD-Aktivität nachgewiesen (Formichi et al. 1998; Sierra et al. 2001). Folglich kann man annehmen, dass die erhöhte Aktivität von Genen, die für die Regulation von oxidativem Stress verantwortlich sind (SOD1, Katalase, Peroxiredoxin 1 und Glutathion Transferasen), im Rett-Syndrom kompensierend wirken soll (Pecorelli et al. 2013).

Ebenso wurde für das Rett-Syndrom eine erhöhte Oxidation von Lipiden und Proteinen festgestellt, wofür die erhöhte mitochondriale Aktivität, zusammen mit dem verringerten Abbau von ROS und RNS, verantwortlich sein könnte (Sierra et al. 2001; De Felice et al. 2009). Außerdem ließen sich, in *post mortem* gewonnenem Gehirngewebe erniedrigte Vitamin C- und GSH-Level nachweisen. Dies und eine in *Mecp2*$^{-/y}$-Mäusen gefundene, hochregulierte Aktivität der SOD1 (Großer et al. 2012) deuten insgesamt stark darauf hin, dass das Gehirn im Rett-Syndrom oxidativem Stress ausgesetzt ist.

1.5 Ziel der Arbeit

Das Rett-Syndrom ist eine genetische Erkrankung, die unter anderem die Redoxbalance im Gehirn stört. Im Rahmen dieser Arbeit soll nun eine Kartierung der Redoxzustände in verschiedenen Hirnarealen stattfinden. Die Funktion der Nervenzellen ist empfindlich von ihrer Redoxbalance abhängig. Eine Verschiebung in Richtung oxidiert oder reduziert führt daher zu möglichen Fehlfunktionen. So könnte die Kommunikation der Zellen, ihre Entwicklung und sogar ihre Überlebensfähigkeit gestört sein. Insofern ist eine Referenzkarte des gesunden, physiologisch aktiven Gehirns wichtig, auf der die durchschnittlichen Redoxzustände in den verschiedenen Arealen ablesbar sind. Eine vergleichbare Karte des erkrankten Gehirns lässt dann Rückschlüsse auf besonders betroffene Areale zu. Zu diesem Zweck werden *Mecp2* Knock-out-Mäuse verwendet, die außerdem transgen für roGFP1c (redoxsensitives grün fluoreszierendes Protein (zytosolisch exprimiert)) sind. Das roGFP1c, als optischer Redoxindikator, erlaubt fluoreszenzmikroskopische Analysen zur Erfassung des Redoxstatus. Die Aufnahmen, mittels CCD-Kamera (*charged-coupled device)* und 2-Photonenmikroskopie, werden bei Hirnschnitten, sowohl von *Mecp2*-Mäusen als auch von Wildtyp-Mäusen (alle roGFP1c positiv), erstellt. Dies ist wichtig, um physiologische von pathologischen Werten abzugrenzen.

Die Verwendung von roGFP als Redoxindikator ist etabliert. In der Kombination mit 2-Photonenmikroskopie kann der Einsatzbereich und Nutzbarkeit dieses Indikators allerdings deutlich erweitert werden. Der in der 2-Photonenmikroskopie verwendete Laser kann tiefere Gewebeschichten erreichen. Bisher musste hauptsächlich auf sehr dünne Präparate zurückgegriffen werden und eher oberflächliche Schichten waren zu untersuchen. Mit der Methode der 2-Photonenmikroskopie ist es nun möglich Untersuchungen näher an den tatsächlichen physiologischen Bedingungen durchzuführen. Tiefere Gewebeschichten sind z. B. weniger vom Trauma der Präparation und der Veränderung des Außenmilieus beeinträchtigt. Da solche Einflüsse sich auf den Redoxstatus untersuchter Zellen auswirken können, sollte es das Bestreben sein möglichst physiologisch intakte Zellen zu untersuchen. Bis wir in der Lage sind die Hirnzellen einer Maus *in vivo* zu untersuchen, also ohne das Gehirn vorher zu extrahieren, ist dieses Vorgehen ein pragmatischer und zugleich vielversprechender Ansatz.

Unterschieden wurde hier zwischen jungen und alten Mäusen, um etwaige Veränderungen im Zeitverlauf dokumentieren zu können. Im Rett-Syndrom ist die zeitliche Komponente sehr wichtig. Da die Entwicklung zu Beginn normal ist, wäre es wünschenswert einen Zeitpunkt definieren zu können an dem das Redoxgleichgewicht pathologisch ausschert, bzw. ab wann der Organismus nicht mehr in der Lage ist Redoxstörungen zu kompensieren. Eine zu früh, oder zu spät einsetzende Therapie könnte keinen oder sogar einen nachteiligen Effekt haben. Mit Wissen über die exakten zeitlichen Veränderungen des Redoxstatus in MeCP2-defizienten Zellen könnte Patienten gezielter geholfen werden. Im Zusammenhang mit meinen Untersuchungen sind die zu betrachtenden Altersstrukturen limitiert und es wäre wünschenswert verbleibende Lücken in zukünftigen Untersuchungen zu adressieren.

Des Weiteren werden Redox-Unterschiede zwischen Weibchen und Männchen untersucht. Da Weibchen zwei X-Chromosomen besitzen und somit das *Mecp2*-Gen heterozygot vorliegt, können die Rett-Symptome und/oder Redox-Veränderungen in unterschiedlicher Ausprägung vorliegen. Bei *Mecp2*$^{-/y}$ Männchen kommt es, aufgrund des einfach vorliegenden X-Chromosoms, immer zur vollen Ausprägung der Symptome. So kann man an den Männchen wichtige Erkenntnisse bezüglich Ursachen und Verlauf der Erkrankung gewinnen. Bei den Weibchen ebenso, aber hier vor allem in Bezug auf die Schwere der Erkrankung im Zusammenhang mit der Lokalisation und der Art des Gendefekts.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Kortex- und Hippokampus-Areale in frühen (mehr rostral gelegenen) und späten (mehr caudal gelegenen) hippokampalen Schnitten untersucht, um möglichst viele Regionen abdecken zu können und lokale Unterschiede in der Redoxbalance darzustellen. Die Phänotypen sprechen dafür, dass spezielle Areale wie der motorische Kortex besonders betroffen sind. Allerdings könnten Areale beteiligt sein, die nicht direkt zu feststellbaren phänotypischen Veränderungen führen und dennoch essenziell für den Krankheitsverlauf sind. Sollte sich eine bestimmte Region als besonders betroffen herausstellen, so könnte auf diesen Ergebnissen aufbauend, gezieltere Therapieansätze entwickelt werden. Im Anschluss an diese Untersuchungen ist die Nutzbarkeit der 2-Photonenmikroskopie im Zusammenspiel mit dem angewendeten Mess-Protokoll zu beurteilen. Festzustellen wäre, ob das Protokoll oder der Aufbau verbessert und vielleicht auf andere Versuchsmodelle angewendet werden könnte. Dies gilt nicht nur im Gehirn, bezogen auf neurodegenerative Erkrankungen, sondern auch für andere periphere Organe.

2 Material und Methoden

2.1 Maus-Modell für das Rett-Syndrom

Um das Rett-Syndrom erforschen zu können, war es notwendig ein entsprechendes Maus-Modell zu kreieren. Zu diesem Zweck hat die Arbeitsgruppe von Guy und Kollegen verschiedene Mutationen am *MECP2*-Gen provoziert, die sowohl zu einem Verlust als auch zu einer Verstärkung der Funktion des MeCP2-Proteins führen. In der Konsequenz wurde ein funktionelles knock-out Modell gewählt, bei dem aufgrund umfassender Deletionen im *Mecp2*-Gen das MeCP2 Protein komplett fehlt. Die so erhaltenen *Mecp2*$^{-/y}$ und *Mecp2*$^{+/-}$ Mäuse haben phänotypisch eine analoge Entwicklung genommen, wie wir sie vom Rett-Syndrom her kennen (Guy et al. 2001).

Zu Beginn waren sie symptomfrei, entwickelten aber mit der Zeit motorische Auffälligkeiten, wie zum Beispiel das „hindlimb clasping", unregelmäßige Atmung und Missbildungen der Kiefer. Bei Männchen lagen die Hoden immer im Körper. Es wurden keine histologischen Auffälligkeiten in den verschiedenen Organen gefunden. Nach unterschiedlichem Verlauf führte eine Verschlechterung der Symptome zu Gewichtsverlust und am Ende zum Tod. Die männlichen *Mecp2*-Knockoutmäuse überleben selten länger als 55 Tage. Da Weibchen zwei X-Chromosomen haben, kompensiert hier das „gesunde" X-Chromosom jenes mit dem defekten Gen. In der Folge entstehen verschiedenste Phänotypen. Daher arbeitet die Forschung meistens mit den hemizygoten, männlichen Knockout-Mäusen (*Mecp2*$^{-/y}$), bei denen das Protein vollständig fehlt (Guy et al. 2001).

Diese genetische Veränderung simuliert zwar erfolgreich das Rett-Syndrom, aber ohne weitere Intervention können an diesen Mäusen keine fluoreszenzmikroskopischen Verfahren angewendet werden. Um dies zu ermöglichen, wird ein Redoxindikator benötigt, der auf die verwendeten Wellenlängen der Laser reagiert und stabil exprimiert wird. Daher wurde als Ausgangspunkt ein Mausmodell, welches den Redoxindikator roGFP1c in

exzitatorischen Neuronen exprimiert, verwendet (Wagener et al. 2016). In diese Linie wurden die *Mecp2*-Mäuse hineingekreuzt, um roGFP1c-positive *Mecp2*-Knockout-Mäuse zu erhalten. Unter diesen Mäusen gibt es solche, bei denen roGFP1 in Mitochondrien exprimiert wird (roGFP1m (redoxsensitives grün fluoreszierendes Protein 1 (mitochondrial exprimiert))) und solche, bei denen es im Zytosol der betreffenden Neurone exprimiert wird (roGFP1c). Für diese Arbeit wurde die zytosolische Variante verwendet, da primär die Redoxzustände im Zytosol der Neurone bewertet werden sollten.

2.2 Redoxindikator roGFP

Wie zuvor beschrieben wird ein Redoxindikator benötigt, um mittels fluoreszenzmikroskopischer Verfahren Veränderungen im Redoxstatus von Gehirnzellen zu erfassen. Viele dieser Indikatoren bereiten jedoch Schwierigkeiten durch ihre irreversiblen Oxidations-, bzw. Reduktions-Reaktionen. Zudem gibt es bei einigen der Indikatoren Probleme mit Autooxidation und Photosensivität, was die Ergebnisse verfälscht. Zusätzlich müssen für die meisten Techniken die zu untersuchenden Zellen entnommen werden, sodass tiefere Gewebeschichten nicht intakt untersucht werden können (Hanson et al. 2004).

Einen Lösungsansatz bietet ein genetisch verändertes GFP (grün fluoreszierendes Protein), das roGFP. Es existieren mehrere Formen dieses Proteins, die jeweils in spezifischen Geweben als Indikator für bestimmte Stoffkonzentrationen verwendet werden können (Hanson et al. 2004). Für uns ist das roGFP1 (redoxsensitives grün fluoreszierendes Protein *1*) wichtig, welches durch den Thy-1.2-Promotor (*thymocyte differentiation antigen 1, CD90*) reguliert, in exzitatorischen Neuronen in weiten Teilen des Mäusehirns, exprimiert wird (Wagener et al. 2016). Es gibt zwei Varianten dieses Sensors, wovon eine zytosolisch (roGFP1c) und die andere in Mitochondrien (roGFP1m) exprimiert wird. Die für uns relevante zytosolische Variante wird, bedingt durch den Thy-1.2-Promotor, nicht in allen Hirnregionen gleichmäßig exprimiert. Deswegen müssen die zu untersuchenden Areale entsprechend des adäquaten Expressionslevels ausgewählt werden. Deutlich exprimiert wird das roGFP1c vor allem im Hippokampus, Kortex (Zellschichten II, III und V), Thalamus, Cerebellum, Colliculus und einigen Nuklei des Hirnstamms. Dieses Sensorprotein ist sehr stabil und relativ unabhängig vom Milieu in den Zellen, so bleibt seine Fluoreszenz auch bei

pH- und Konzentrationsschwankungen konstant und Proteasen greifen es ebenfalls nicht an (Wagener et al. 2016).

Die Arbeitsgruppe um J.S. Remington hat Thiol-Gruppen in die Beta-barrel Struktur des Proteins an der Seitenkette His^{148} integriert. Diese Thiol-Gruppen können oxidiert/reduziert werden, wodurch sich deren Fluoreszenzverhalten verändert. Das roGFP reagiert in diesem Zusammenhang mit ROS, womit wiederum Schwankungen im Redoxgleichgewicht bestimmt werden können. Die zwei Absorptionsmaxima von roGFP1 bei 400 nm und 490 nm liegen weit genug auseinander, um ratiometrische Messungen zu ermöglichen. Diese Art der Messung eliminiert etwaige Verzerrungen durch Indikatorkonzentration, Photobleaching oder auch ungleichmäßige Exprimierung des Indikators. Es lässt sich zudem festhalten, dass eine verstärkte Oxidation die ebenfalls vorhandene Anregungsspitze bei 385 nm erhöht und eine weitere bei 470 nm verringert (Hanson et al. 2004).

Der roGFP1-Sensor lässt sich außerdem mit 2-Photonenlasern anregen, sodass bei akuten Schnitten auch tiefere Ebenen analysiert werden können. Der Phänotyp der verwendeten roGFP1c transgenen Mäuse ist normal und ohne Auffälligkeiten, so dass durch die Nutzung dieses Redoxindikator Mausmodells kein Einfluss auf die Ergebnisse zu erwarten ist (Wagener et al. 2016).

2.3 Imaging hippokampaler Schnitte

Um eine Redoxkartierung eines konkreten Hirnareals zu erstellen, muss ein Weg gefunden werden, dieses für Messungen zugänglich zu machen. Die Laser können weder durch Haut noch durch den Schädel in tiefere Regionen vordringen, um dort roGFP anzuregen. Stattdessen brauchen wir dünne Zellschichten aus den Hirnarealen, weil die zu untersuchenden Schichten in einer maximalen Tiefe von ca. 45 µm liegen sollten. Diese Tiefe ist gut geeignet, um ratiometrische Bilder mit 2-Photonenlasern zu erstellen.

2.3.1 Präparation

Legende:
1 eisgekühlte Präparationsschale
2 Skalpell
3 Pinzette
4 Schere
5 Spatel
6 Löffel
7 Sekundenkleber
8 Lichtquelle
9 Vibratom (Campden Instruments, 752M Vibroslice)

Abbildung 1: Aufbau und Materialien zur Präparation

Beide Schalen wurden in Eis gekühlt und erst zur Präparation herausgenommen. Das Filterpapier auf der umgedrehten Schale wurde mit artifizieller, zerebrospinaler Flüssigkeit (ACSF) getränkt und das zurecht präparierte Hirn auf den Sockel des Vibratoms geklebt.

Der Ablauf zur Gewinnung der akuten 400 µm Hirnschnitte war immer der gleiche. Dies war notwendig, um die Ergebnisse nicht zu verfälschen, da der Transport für die Mäuse ein Stressfaktor ist. Zucht und Verwendung der entsprechenden Mauslinien erfolgte im Rahmen der vom Niedersächsischen Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (LAVES) genehmigten Versuchsvorhaben G16/2177 und G17/2544. Mit Diethylether wurden die Mäuse in einem Exsikkator betäubt und von einer berechtigten Person fachgerecht dekapitiert.

Von dorsal wurde dann mit der Schere die Kopfhaut eingeschnitten, um diese nach vorne ziehen zu können. Während der Kopf im Bereich der Augen, auf einer gekühlten Unterlage, fixiert wurde, eröffnete ein Schnitt von dorsal entlang der Mittellinie den Schädel bis zum Frontalkortex. Lateral wurde je ein Entlastungsschnitt gemacht, um anschließend den Schädel mit einer Pinzette zu den Seiten hin aufbrechen zu können. Nun wurde der Mäusekopf senkrecht gehalten, um das Gehirn mit einem Spatel vorsichtig aus dem Schädel zu lösen. Dabei wurden mit dem Spatel der Hirnstamm und die Hirnnerven durchtrennt. Anschließend wurde das Hirn in eisgekühlte, carbogenisierte artifizielle cerebrospinale Flüssigkeit (ACSF) getaucht.

2.3.2 45 µm Kryoschnitte

Zu Beginn habe ich versucht mit einer CCD-Kamera Bilder von 45 µm Kryoschnitten zu erfassen. Der Ablauf der Präparation bis zur Extraktion des Gehirns war der Gleiche wie bei den noch folgenden akuten 400 µm Hirnschnitten. Parallel zur Präparation wurde Isopentan, in einem separaten Glasbehälter, in flüssigem Stickstoff stark heruntergekühlt. Das Gehirn wurde, nachdem es aus dem Schädel herausgelöst wurde, direkt zerteilt. Das Cerebellum und der Frontalkortex wurden mit einem Skalpell abgetrennt und die beiden Hemisphären anschließend sagittal geteilt. Nun wurde das Isopentan aus dem flüssigen Stickstoff genommen und die beiden Hemisphären für drei Minuten darin schockgefroren. Danach wurden die Hemisphären in kleine, beschriftete Eppendorf-Reaktionsgefäße gegeben und bei -80°C für einige Tage gelagert.

Am Tag, an dem die Hemisphären verwendet wurden, wurde das Kryotom auf -20°C heruntergekühlt und eine frische Klinge eingespannt. Nach einer Stunde war das Kryotom so weit gekühlt, dass eine tiefgefrorene Hemisphäre mit der dorsalen Seite und „Tissue-Tek"-Kleber auf dem dafür vorgesehenen Sockel befestigt werden konnte. Die Kälte ließ das Tissue-Tek erhärten, was an der zunehmenden Opazität zu erkennen war. Um gute Schnitte mit dem Kryotom anfertigen zu können, muss das Tissue-Tek sehr gleichmäßig und blasenfrei aufgetragen werden, bis die Hemisphäre komplett eingebettet ist. Anschließend muss das Tissue-Tek dreißig Minuten durchkühlen, damit es vollständig fest und gut zu schneiden ist. Sollte das Einbetten nicht gleichmäßig dick auf allen Seiten gelungen sein, so wurde die Einbettmasse mit einem Skalpell vorsichtig in Form geschnitzt.

Mit dem Kryotom wurden koronare 55 µm Schnitte gemacht, um bis zum Hippokampus vorzudringen. Ab hier wurden 45 µm Schnitte erstellt, die unverzüglich auf „Superfrost Plus"-Objektträger aufgezogen wurden. Pro Objektträger waren es zwischen vier und sechs Schnitte. Diese konnten dann fünf Minuten trocknen, damit sich die Schnitte bei den folgenden Behandlungsschritten nicht vom Objektträger lösen. Die verschiedenen Objektträger wurden unterschiedlichen Behandlungen unterzogen. Das Ziel hierbei war es, die Schnitte in ihrem Ist-Zustand, im Zustand höchstmöglicher Oxidation und im Zustand höchstmöglicher Reduktion zu fixieren. Zur Fixierung des Ist-Zustands wurden die Schnitte eines Objektträgers für zehn Minuten bei 4°C (eisgekühlt) und dann mit NEM (N-Ethylmaleinimid) 50 mM behandelt. Danach wurde der Objektträger für 15 Minuten in 4% PFA (Paraformaldehyd gelöst in Phosphat gepufferter Salzlösung (PBS)) bei Raumtemperatur fixiert. Am Ende folgten zwei Waschgänge in eisgekühlter PBS für je fünf Minuten. Um eine höchstmögliche Oxidation der Schnitte zu erreichen, wurde eine Behandlung analog zur Fixation des Ist-Zustands durchgeführt, wobei vorweg ein weiterer Behandlungsschritt durchzuführen war. Hier wurden die Schnitte mit Diamid (DA) 1 mM für zehn Minuten bei 4°C behandelt. Die maximale Reduktion wurde erreicht, indem der Schnitt mit Dithiothreitol 20 mM (DTT) behandelt wurde. Nach allen Behandlungsschritten mussten die Schnitte auf den Objektträgern ca. eine Stunde trocken. Anschließend konnten Bilder mit der CCD-Kamera aufgezeichnet werden.

2.3.3 400 µm akute Schnitte

Am Ende zielführend war das Imaging mit 400 µm akuten Hirnschnitten. Im Anschluss an die Präparation ruhte das Gehirn ca. eine Minute im ACSF. Danach wurde, auf gekühlter Unterlage, der Frontalkortex und das Cerebellum mithilfe eines Skalpells abgetrennt. Das so zurechtgeschnittene Hirn wurde nun mit der caudalen Schnittfläche mittels Sekundenkleber auf einen vorgekühlten Block geklebt und in einer Schale eingespannt, die mit gekühltem, carbogenisiertem ACSF gefüllt war. Mit einem Vibratom (Campden Instruments, 752M Vibroslice) wurden nun vier 400 µm Schnitte im Bereich des Hippokampus gemacht. Diese Hirnschnitte wurden nun in der Mittellinie mit einem Skalpell geteilt und zügig in eine mit carbogenisiertem ACSF gefüllte Inkubationskammer gegeben. Darin können die

Hirnschnitte einige Stunden überleben. Die Schnitte mussten nach der Präparation mindestens eine Stunde ruhen, um den Stress des Präparationstraumas abklingen zu lassen.

2.3.4 Reagenzien

N-Ethylmaleinimid (NEM) fixiert den Redoxzustand der Zellen. NEM ist membranpermeabel und alkyliert die Thiol-Gruppen am roGFP, sodass dieses nicht mehr oxidiert oder reduziert werden kann. Es beeinflusst dabei nicht die Fluoreszenzmessungen (weder an roGFP gebunden noch frei in den Zellen) und es wirkt sehr schnell, sodass externe Einflüsse während der Behandlung zu vernachlässigen sind. Mit externer Gabe von geeigneten reduzierenden/oxidierenden Agenzien können allerdings die Zellen in weiteren Schritten oxidiert bzw. reduziert werden, was jedoch nur absichtlich erfolgen kann. Spontane Reaktionen mit zelleigenen Stoffen sind ausgeschlossen (Fujikawa et al. 2016). Eingesetzt wurde NEM in einer Konzentration von 50 mM.

Diamid (DA) ($(CH_3)_2NCON{=}NCON(CH_3)_2$) oxidiert Thiolgruppen und greift in das Redoxgleichgewicht von Zellen ein. So wird Glutathion von GSH zu GSSG oxidiert, was durch roGFP mit seinen eigenen Thiolgruppen widergespiegelt wird. Dabei stört Diamid die Zellfunktion nicht und es kann reversibel verdrängt werden (Kosower et al. 1969), was für die Kalibrierung wichtig ist. Diamid wurde in den Konzentrationen 1 mM, 5 mM und 10 mM eingesetzt. Wasserstoffperoxid (H_2O_2) hat dieselbe Funktion wie Diamid, wirkt allerdings stärker oxidierend. Im Gegenzug kann es in zu hoher Konzentration die Zellen zerstören, daher wurde es in einer Konzentration von 1 mM verwendet.

Dithiothreitol (DTT) (Clelands Reagenz, $HSCH_2CH(OH)CH(OH)CH_2SH$) ist ein Agens, welches Disulfidbrücken reduziert und damit in das Redoxgleichgewicht von Zellen eingreift. Dementsprechend wirkt es genau umgekehrt zu DA und kann den Redoxzustand der Zelle in die Nähe vollständiger Reduktion bringen (Fujikawa et al. 2016). Eingesetzt wurde DTT in einer Konzentration von 20 mM.

Artifizielle zerebrospinale Flüssigkeit (ACSF) (NaCl 130 mM, KCl 3,5 mM, NaH_2PO_4 1,25 mM, $NaHCO_3$ 24 mM, $CaCl_2$ 1,2 mM, $MgSO_4$ 1,2 mM, Glukose 10 mM) ist eine

Pufferlösung, um vitale Hirnschnitte für eine begrenzte Zeit zu versorgen und in physiologischer Umgebung am Leben zu erhalten. Dies erfordert zudem das Gasgemisch Carbogen (95% O_2, 5% CO_2) zur adäquaten Versorgung von Zellen in Lösungen mit Sauerstoff und zur Stabilisierung des pH-Wertes (Bicarbonat/CO_2 Puffersystem).

Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS) (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 12 mM Gesamt-Phosphat) ist eine Pufferlösung, die in der Biochemie zur Verdünnung von Substanzen bei Behandlung von Zellkulturen oder Gewebeschnitten verwendet wird, aber auch zur Spülung nach einer Gewebe-/Zell-Behandlung.

Paraformaldehyd (PFA 4%, gelöst in PBS) wird zur Fixierung von Geweben verwendet. Die behandelten Zellen reagieren nicht weiter.

2.3.5 Durchführung der optischen Messungen

In Kombination mit roGFP1c ist die 2-Photonen-Fluoreszenzmikroskopie das Verfahren der Wahl, um ratiometrische Bilder der Hirnschnitte aufzunehmen. Es hat im Vergleich zu älteren Verfahren, in denen das Zellgewebe durch nur ein Photon angeregt wurde, signifikante Vorteile. Ein Vorteil ist die Möglichkeit wiederholter optischer Schnittdarstellung bis in mehrere hundert Mikrometer Tiefe (bis zu einem Millimeter) bei sehr hoher axialer und lateraler Auflösung, ohne die Gewebe zu zerstören (Denk et al. 1994).

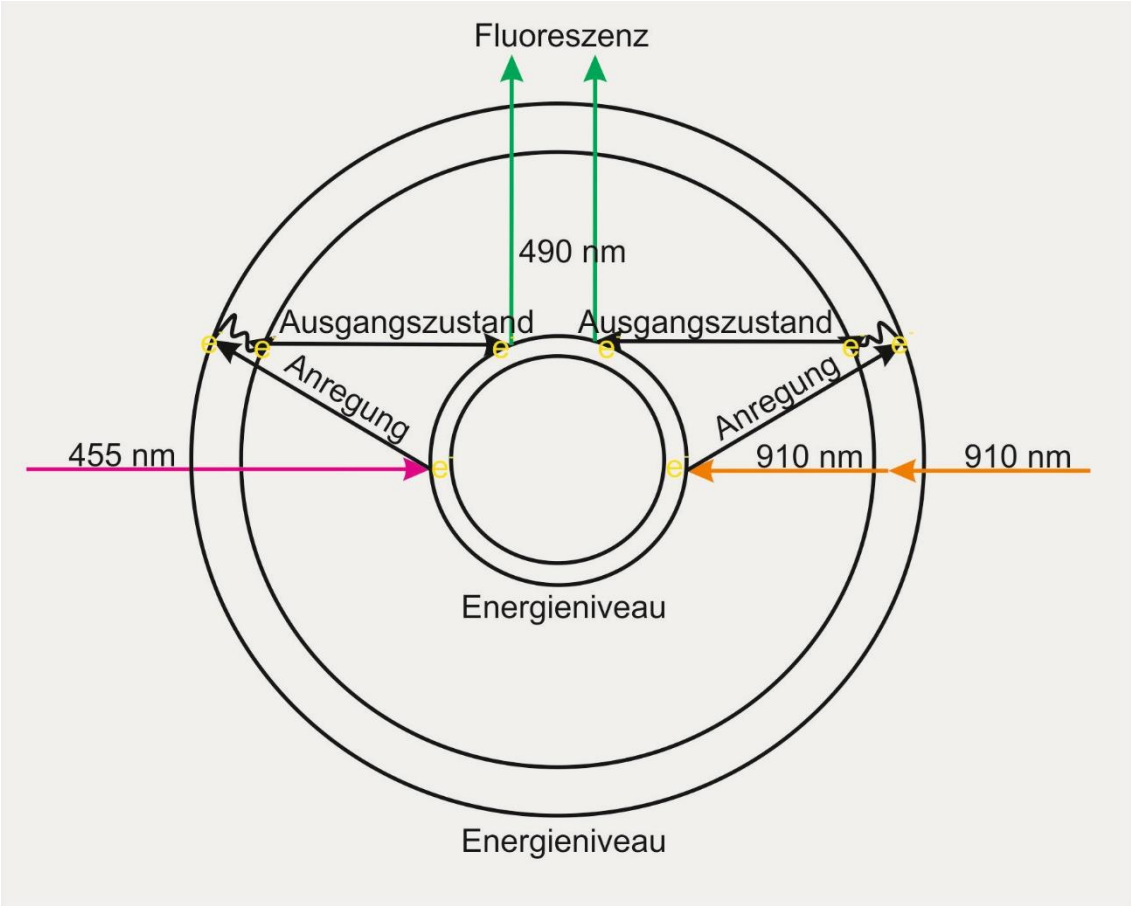


Abbildung 2: 2-Photonen-Fluoreszenzmikroskopie Schema

Schematischer Vergleich der Anregung eines Elektrons (e^-) mit einem (kurzwellig), bzw. zwei Photonen (langwellig) und der resultierenden Fluoreszenz.

Wenn ein Photon mit der richtigen Wellenlänge auf ein entsprechendes Elektron trifft, so regt es das Elektron an und hebt es auf höheres Energieniveau. Jedes Molekül hat seine Elektronen in einer Konfiguration auf Energieniveaus, die im Grundzustand ihr energetisches Minimum aufweisen. Wird nun Energie hinzugefügt, die ein Elektron auf ein Niveau hebt das nicht dem energetischen Minimum entspricht, dann kehrt dieses unter Abgabe eines Photons auf sein Ausgangsniveau zurück. Bei Fluoreszenzlicht hat das abgestrahlte Photon eine größere Wellenlänge als das anregende Photon. Diese Differenz, bzw. der damit verbundene Energieverlust, wird als Stokes-shift oder Rotverschiebung bezeichnet. Für das Anheben spezifischer Elektronen um ein Energieniveau wird eine ebenso spezifische Wellenlänge des Photons benötigt. Da vergleichsweise viel Energie benötigt wird, braucht es zumeist kurzwelliges Licht, um Fluoreszenz zu provozieren. Da kurzwelliges Licht allerdings eine hohe Absorption und Streuung in Gewebe zeigt, kann damit keine hohe Eindringtiefe erreicht werden. Außerdem schädigt energiereiche,

kurzwellige Strahlung das Zielgewebe und seine Umgebung. Um dieses Problem zu umgehen, müssen zwei langwellige Photonen, die in der Summe die benötigte Energie aufbringen, gleichzeitig auf das Elektron treffen. Dieser Ansatz wird bei der 2-Photonenmikroskopie genutzt, wo die Anregungswellenlänge dann in etwa doppelt so groß ist wie bei der Anregung mit einem Photon. In der Folge können die eingangs erwähnten Vorteile genutzt werden (Denk et al. 1994; Diaspro et al. 2006).

Der roGFP1c-Redoxsensor hat Thiol-Gruppen an der Seitenkette His[148] integriert, die oxidiert/reduziert werden können und dadurch jeweils die Fluoreszenzantwort verändern. Zudem hat roGFP1c zwei Absorptionsmaxima (400 nm und 490 nm), die relativ weit auseinander liegen, was exzitations-ratiometrische Messungen möglich macht (Hanson et al. 2004).

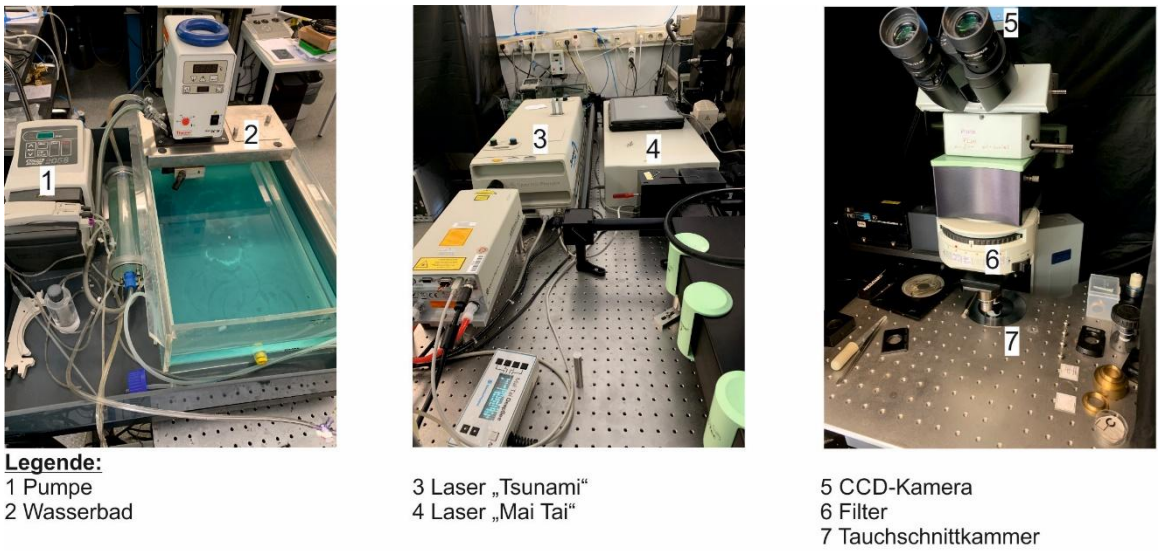


Abbildung 3: Aufbau 2-Photonen-Mikroskop

Nach der Präparation wurden die 400 µm Schnitte im Wasserbad (2) in einer Inkubationskammer (ACSF) mit Carbogen begast. Die Pumpe (1) hat das ACSF zwischen der Inkubationskammer und der Messkammer (7) zirkulieren lassen. Die beiden Laser waren für simultane Messungen mit 740 nm (3) und 910 nm (4) konfiguriert. Mit der Kamera (5) wurden Bilder der Schnitte in der Messkammer gemacht, wobei je nach Wellenlänge der passende Filter eingestellt wurde.

Zur Durchführung der Messungen wurde immer nach dem gleichen Protokoll vorgegangen. In der einstündigen Ruhephase der Hirnschnitte wurden die beiden Laser optimal justiert. Die Intensität der Laser wurde auf 4,6 Watt festgelegt und der jeweilige Laserstrahl optimal im Strahlengang zentriert. Der Laser „MaiTai“ wurde auf eine Wellenlänge von 910 nm und der Laser „Tsunami“ auf 740 nm eingestellt. Anschließend erfolgte eine Kontrollaufnahme

mit fluoreszierenden Kügelchen (Beads). Dafür wurden im Abstand von ca. 2-3 Sekunden je ein Bild mit 740 nm und eines mit 910 nm Anregungswellenlänge aufgenommen. Diese und alle anderen Aufnahmen wurden unter vollständiger Abdunkelung des Laserlabors durchgeführt. Die Auswertung dieser Aufnahme zeigte, ob das Justieren des Lasers erfolgreich war und reproduzierbare Messungen erreicht werden konnten. Bei zu großen Abweichungen der ermittelten Durchschnittswerte mussten die Messwerte der im Folgenden gemessenen Schnitte verworfen werden.

Die Schnitte konnten nun aus dem carbogenisierten ACSF entnommen und in die Messkammer überführt werden. Hier zirkulierte auf 40°C erwärmtes, carbogenisiertes ACSF und die Hirnschnitte wurden von der „Harfe“ (U-förmiger Metallrahmen, der mit drei Nylonfäden bespannt ist) fixiert. Mit dem Zeiss- Objektiv (fünffache Vergrößerung) wurde dann ein Areal von Interesse gesucht und auf das Olympus-Objektiv (zwanzigfache Vergrößerung) gewechselt. Sobald die richtige Ebene in der Z-Achse eingestellt war, wurden die Shutter der beiden Laser geöffnet und die Suche der Zellen mit Echtzeitbildern im ImspectorPro-Programm (Einstellung: Snapshot) fortgesetzt. Mithilfe eines Joysticks konnte der Tisch mit dem Hirnschnitt in der X-, Y- und Z-Achse bewegt werden (Abb. 3). Um gleichbleibende Bedingungen zu schaffen und weitgehend intakte Zellstrukturen zu messen, lag die Tiefe für die Aufnahmen bei 50 µm. Näher an der Oberfläche waren die Zellen häufig durch das Schneiden zerstört. Es sind pro Maus je zwei frühe (d.h. mehr rostrale) und zwei späte (mehr caudalere) hippokampale Schnitte verwendet worden.

Bei den frühen Schnitten wurden Bilder von in der Regel sechs Hirnarealen gemacht, wobei der Fokus auf dem motorischen Kortex lag. Bei den späteren Schnitten wurden Bilder von bis zu vierzehn Arealen gemacht. Zu diesen Arealen gehörte der Hippokampus selbst (CA1, CA3, Gyrus Dentatus unteres/oberes Blatt und Subiculum) sowie einige Kortexareale (Retrosplenialer agranulärer Kortex (RSA), somatosensorischer Kortex, visueller Kortex, auditorischer Kortex, entorhinaler Kortex (Ect)). Die Qualität (Signal/Rauschverhältnis) der Bilder hängt stark vom jeweiligen Hirnareal ab, da roGFP1c nicht überall gleichmäßig gut exprimiert wird. Zum Beispiel ist es schwieriger in Areal CA3 verwendbare Zellen zu finden, während die Pyramidenzellen in CA1 sehr stark roGFP1c exprimieren und dementsprechend gut darstellbar sind.

Neben diesen Aufnahmen, die den Ist-Zustand widerspiegeln, wurden zur Auswertung auch Aufnahmen von Hirnschnitten mit maximaler Oxidation/Reduktion benötigt. Für diese Kalibrierung, die den Antwortbereich der Zellen ermitteln sollte, wurden die Hirnschnitte mit H_2O_2 und DTT behandelt. H_2O_2 oxidiert die Zellen so weit wie möglich und DTT reduziert diese so weit wie möglich. Zur Oxidation wurde ein Hirnschnitt sieben Minuten mit zirkulierendem H_2O_2 (5 mM) behandelt, um direkt im Anschluss ein Bild aufzunehmen.

Für die anschließende Reduktion wurde das H_2O_2 25 Minuten ausgewaschen und anschließend der Hirnschnitt mit DTT (10 mM) für sieben Minuten behandelt. Es war wichtig nun genau die gleiche Zellschicht wieder zu finden, von der zuvor ein Bild erstellt wurde, um die Zellen im direkten Vergleich zu sehen (Abb. 3). Nachdem so zwei Bilder vom CA1 Areal eines Hirnschnittes gemacht wurden, wurde dieser verworfen. Zur Kalibrierung musste dieses Vorgehen bei mindestens drei verschiedenen Mäusen angewendet werden. Dabei ergab sich ein Antwortbereich für die ratiometrischen Grauwerte, der bei DTT-vermittelter Reduktion 408,42 ± 63,30 (n=78 analysierte Zellen) und bei H_2O_2- vermittelter Oxidation 915,47 ± 106,41 (n=76 analysierte Zellen) betrug.

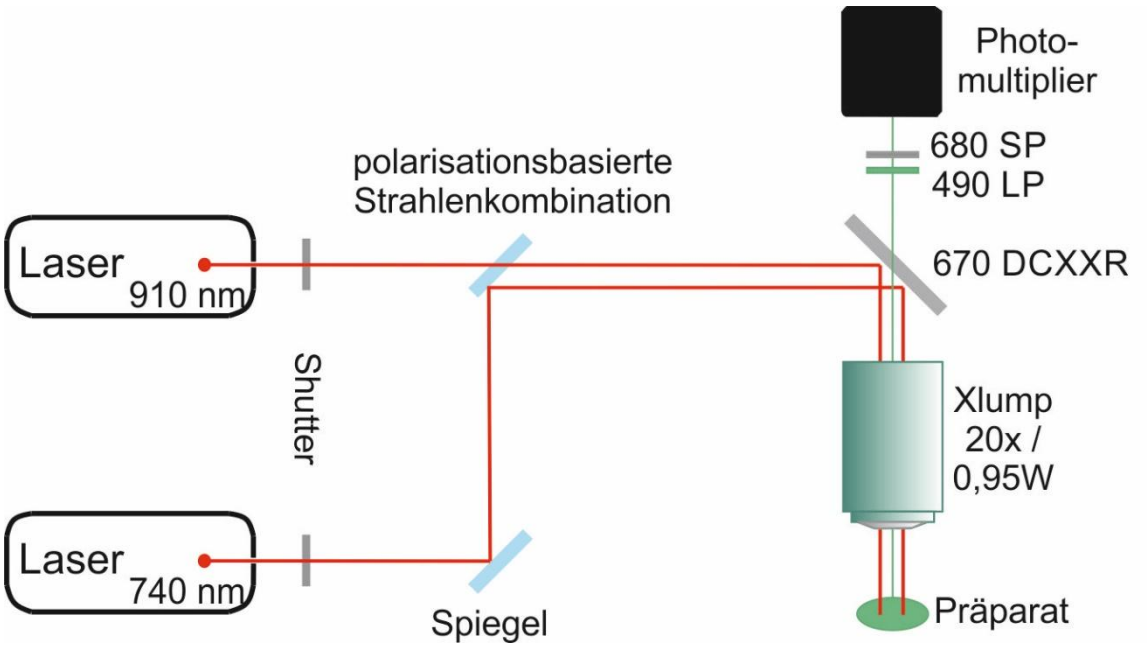


Abbildung 4: 2-Photonenmikroskopie schematischer Aufbau

Die beiden Laser werden mittels Spiegeln und polarisationsbasierter Strahlenkombination alternierend durch das Objektiv auf die gleiche Gewebestelle gelenkt. Mit diesem Aufbau und den verwendeten Filtern lassen sich in kürzesten Zeitabständen Bilder derselben Zellen mit unterschiedlicher Wellenlänge aufnehmen.

Geräte:

- Zwei-Photonen-Laser:
    - MaiTai eHP DS
    - Millennia Prime gepumpter Tsunami
    - Vor jedem Gebrauch Tsunami Pumpleistung auf 4,6 Watt einstellen und beide Laser-Strahlengänge fein-justieren

- Objektive:
    - Zeiss, Epiplan, 5x/0,13, ∞/-
    - Olympus, XLUMPlanFl, 20x/0,95W, ∞/0

- Filter:
    - Dichroit BS 670 + 680 SP + 490 LP

- Software:
    - ImspectorPro:
        - Einstellungen zur Suche der Zellen:
            - Instrument Mode: Single-Beam, Measurement Mode: Einzelbild (Snapshot), Bildgröße (Size): 300x300µm, Pixel: 499x499, Scan-Frequenz (Frequency): 800Hz, Zeilen-Mittelung (Line Average): 1, PMT1: 65, Intensität beider Laser: 3%
        - Einstellungen zur Aufnahme der Zellen:
            - Instrument Mode: Single-Beam, Measurement Mode: Zwei-Laser Betrieb (Dual Laser), Size: 300x300, Pixel: 999x999, Frequency:800Hz, Line Average:2, PMT1: 65, Intensität beider Laser: 4%
        - Einstellungen zur Aufnahme der Beads Kontrollaufnahme:
            - Instrument Mode: Single-Beam, Measurement Mode: Dual Laser, Size: 150x150µm, Pixel: 499x499, Frequency:800Hz, Line Average: 2, PMT1: 60, Intensität beider Laser: 0,25%

2.4 Auswertung

Die Auswertung der aufgenommenen Bildpaare erfolgte über das Computerprogramm „Metamorph Offline 7.5.6.0“. Mit der Funktion „Basic Filters“ wurde auf die Rohbilder zunächst ein Medianfilter angewandt (Parameter: Filter width: 3 Pixels, Filter height: 3 Pixels, Sub-sample ratio: 1). Dies war notwendig, um die Autofluoreszenz im Hintergrund der Schnitte zu eliminieren. Zur Berechnung der ratiometrischen Bilder wurden die beiden bearbeiteten Bilder mit der Funktion „*Arithmetic*“ und der Operation „*Divide*“ (Parameter: Numerator: 1000, Denominator: 1) durch einander dividiert. Dabei wurde immer das Bild, welches mit 740 nm Ausgangswellenlänge aufgenommen wurde, durch das Bild geteilt, welches mit 910 nm Ausgangswellenlänge aufgenommen wurde. Anschließend wurde, zur besseren Erkennbarkeit der Zellen, im ratiometrischen Bild „*pseudocolour*“ ausgewählt (Abb. 5). Außerdem wurde aus den beiden Rohbildern eines Bildpaares ein „*Color Combine*“-Bild der Zellen erstellt, um die Erkennbarkeit potentiell verwendbarer Zellen zu verfeinern.

Die so erhaltenen ratiometrischen Bilder konnten nun verwendet werden, um verschiedenen Zellen einen Grauwert zuzuordnen. Dieser Grauwert beschreibt die relative Oxidation der jeweiligen Zelle und kann im Kontext der Kalibrierung genutzt werden, um verschiedene Hirnareale bezüglich ihres Redoxstatus zu vergleichen (Abb. 6). Der in der Kalibrierung ermittelte Antwortbereich der Grauwerte erstreckt sich von 408,42 bis 915,47. Alle höheren und niedrigeren Werte sind deswegen potenzielle Artefakte (z. B. Zellen mit eingeschränkter Vitalität) und wurden daher bei der Auswertung nicht berücksichtigt. Aufgrund des sigmoidalen Kurvenverlaufs der Reduktions/Oxidationskurve wurden zudem alle Zellen ausgeschlossen, die weniger als 5% relative Oxidation oder mehr als 95% relative Oxidation aufwiesen, da in diesem Antwortbereich die zuverlässige Unterscheidbarkeit der relativen Oxidationsstufen zu ungenau ist. Demnach sind nur die ratiometrischen Werte von 421 bis 867 zu verwenden (Abb. 11, Abb. 12).

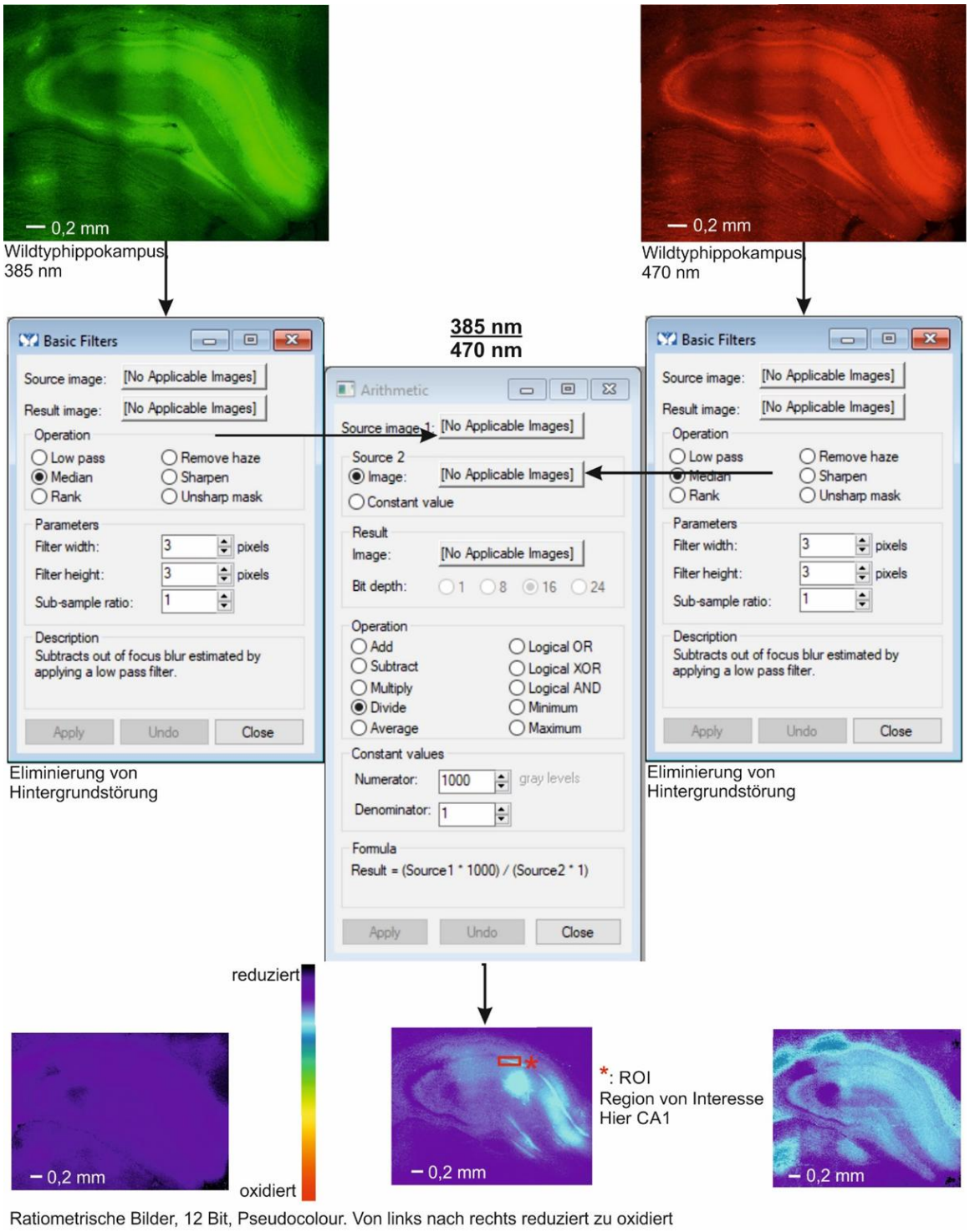


Abbildung 5: Auswertung mit dem Programm Metamorph am Beispiel 45 µm Schnitte

Am Beispiel der 45 µm Schnitte ist der Programmablauf zu Erstellung ratiometrischer Bilder zu sehen. Dieses Prinzip wurde für 45 µm, 150 µm und 400 µm Schnitte verwendet. Bei 400 µm dicken Schnitten werden allerdings einzelne Zellen und keine Areale betrachtet.

Diese ratiometrischen Werte konnten nun verwendet werden, um mithilfe der veränderten Nernst-Gleichung die relative Oxidationsstufe und das Redoxpotential der jeweiligen Zellen zu errechnen.

$$OxD_{roGFP1} = \frac{R - R_{red}}{\frac{F910_{ox}}{F910_{red}} \cdot [R_{ox} - R] + [R - R_{red}]}$$

Formel 1: Berechnung der relativen Oxidationslevel

Die ratiometrischen Rohdaten eingesetzt in diese Gleichung ermöglichen einen Vergleich der Zellen in Bezug auf ihre relative Oxidation.

$$E_{roGFP1} = E^{0'}_{roGFP1} - \frac{RT}{2F} \ln\left(\frac{1 - OxD_{roGFP1}}{OxD_{roGFP1}}\right)$$

Formel 2: Gleichung für das Redoxpotential

Die relativen Oxidationsstufen eingesetzt in diese Gleichung ermöglichen einen Vergleich des jeweils im Zytosol vorliegenden Thiol-Redoxpotentials der einzelnen Neurone. R = universelle Gaskonstante, T = absolute Temperatur (Kelvin), F = Faraday-Konstante

3 Ergebnisse

Das Ziel dieser Arbeit besteht in der Kartierung des Redoxzustands in den verschiedenen Arealen des Gehirns. Diese Kartierung wurde vergleichend bei gesunden Mäusen und in einem Mausmodell für das Rett-Syndrom (*Mecp2*$^{-/y}$, *Mecp2*$^{-/+}$) durchgeführt, um in weiterführenden Arbeiten mögliche Therapieansätze für das Rett-Syndrom, basierend auf dem Redoxungleichgewicht der Patienten, zu entwickeln.

Um hier aussagekräftige Daten zu generieren, wurden Mäuse in den verschiedensten Lebensabschnitten untersucht. Dabei wurde zwischen den Geschlechtern, dem Genotyp und dem Alter unterschieden. So ergeben sich sieben Versuchsgruppen, die untereinander zu vergleichen sind. Zum einen je eine Gruppe junger (p51–60 (postnatal 51-60)) und älterer Mäuse (p96–175). Diese werden jeweils unterteilt in Männchen und Weibchen und dann weiter in Wildtyp und knockout (männlich) bzw. heterozygot (weiblich). Nach dieser Unterteilung müssten sich theoretisch 8 Gruppen ergeben, da die männlichen Knockout-Mäuse allerdings selten älter als p55 werden fehlt diese Gruppe.

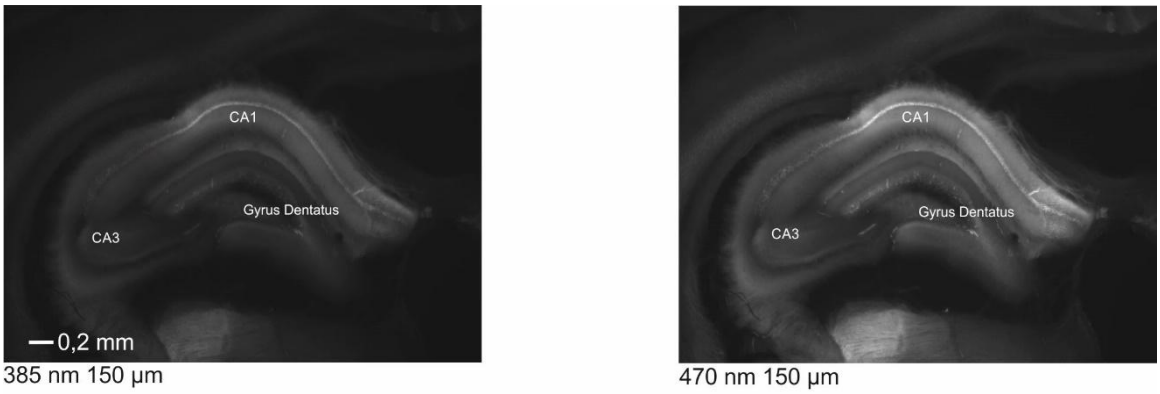
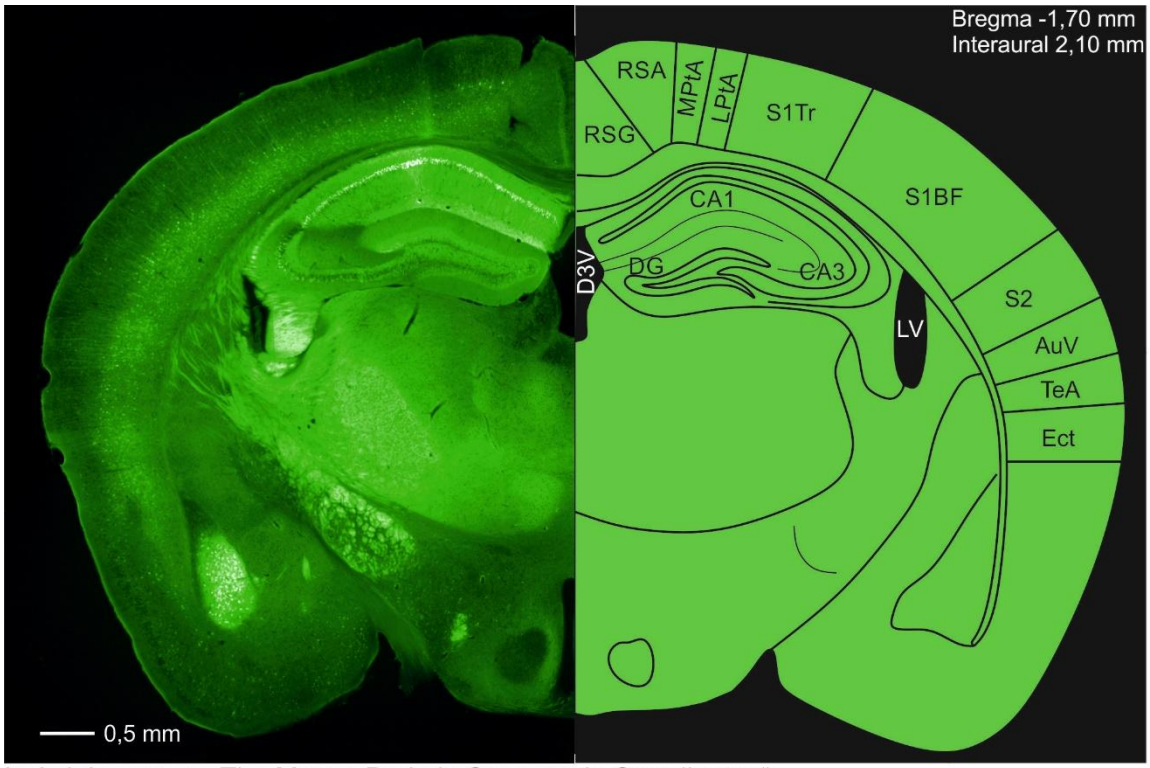


Abbildung 6: Großansicht Rohbilder Hippokampus am Beispiel von 150 µm Schnitten

Unveränderte Rohbilder, bevor Filter angewendet und Farben für „Color Combines“ hinzugefügt wurden. Die starke Exprimierung von roGFPc im Bereich der CA1 Region ist gut zu erkennen. Neben der Schnittdicke ist unter den jeweiligen Bildern zudem die genutzte Anregungswellenlänge angegeben.

Um verwertbare Ergebnisse zu erzielen, sind zu jeder Versuchsgruppe wenigstens die Daten von drei verschiedenen Mäusen erhoben worden. In jeder Gruppe wurden jeweils die gleichen Areale untersucht (Abb. 7), wobei vor allem der Hippokampus und der Kortex von besonderem Interesse waren. Beim Hippokampus waren dies die Areale CA1, CA3, Gyrus Dentatus (oberes und unteres Blatt) und Subiculum. Außerdem wurden der visuelle (V1, V2L, V2ML, V2MM), der auditorische (Au1, AuD, AuV), der somatosensorische (S1, S1BF, S1HL, S1Tr, S2) und der motorische Kortex (M1, M2) sowie die Areale RSA und Ect untersucht.



In Anlehnung an „The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates“:

RSG: retrosplenial granular cortex,
RSA: retrosplenial agranular cortex,
MPtA: medial parietal association cortex,
LPtA: lateral parietal association cortex,
S1Tr: primary somatosensory cortex, trunk region,
S1BF: primary somatosensory cortex, barrel field,
S2: secondary somatosensory cortex,
Auv: secondary auditory cortex, ventral area,
TeA: temporal association cortex,
Ect: ectorhinal cortex,
DG: dentate gyrus,
CA1: Cornu Ammonis 1,
CA3: cornu ammonis 3,
D3V dorsal third ventricle,
LV: lateral ventricle

Abbildung 7: Orientierung in Hirnschnitten

Die linke Bildhälfte ist zusammengesetzt aus Einzelbildern fixierter Schnitte, die jeweils einen Teil des Ganzen zeigen. Die rechte Bildhälfte ist schematisch ergänzt. Zur Orientierung wurde die Beschriftung analog zu „The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates“ gewählt (Paxinos und Franklin 2001).

Von jeder Maus wurden nach Möglichkeit vier akute 400 µm Schnitte mit dem 2-Photonenmikroskop untersucht. Je zwei frühe (rostrale) hippokampale (Abb. 8) und zwei späte (caudale) hippokampale Schnitte (Abb. 9). Die resultierenden ratiometrischen Bilder enthielten zahlreiche Zellen, die jeweils auf ihre Intaktheit bewertet wurden und anschließend je einen ratiometrischen Wert der Redoxbaseline geliefert haben (Abb. 10). Auf diese Weise wurde die Redoxbalance für eine Gesamtheit von 10045 verwendbaren Zellen ausgewertet.

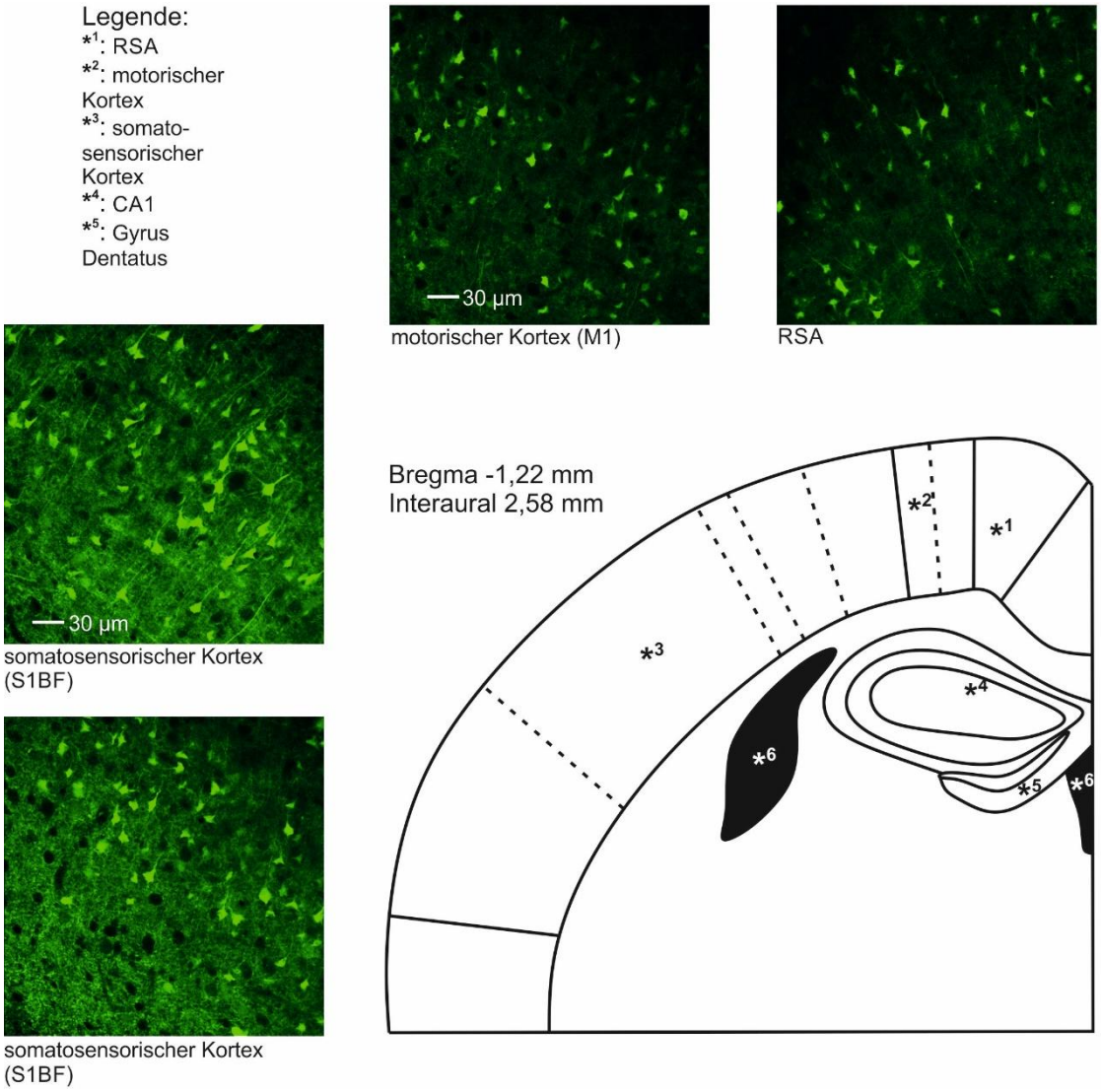


Abbildung 8: Mehr rostral gelegene „frühe" Hirnschnitte

In „frühen" Schnitten können andere Areale befundet werden als in „Späten" (mehr caudal gelegenen Schnitten). So finden sich hier vor allem der motorische Kortex, der somatosensorische Kortex, RSA und meist auch CA1 und der Gyrus Dentatus. Skalierungsbalken in diesem und folgenden Diagrammen gelten jeweils für alle Teilbilder.

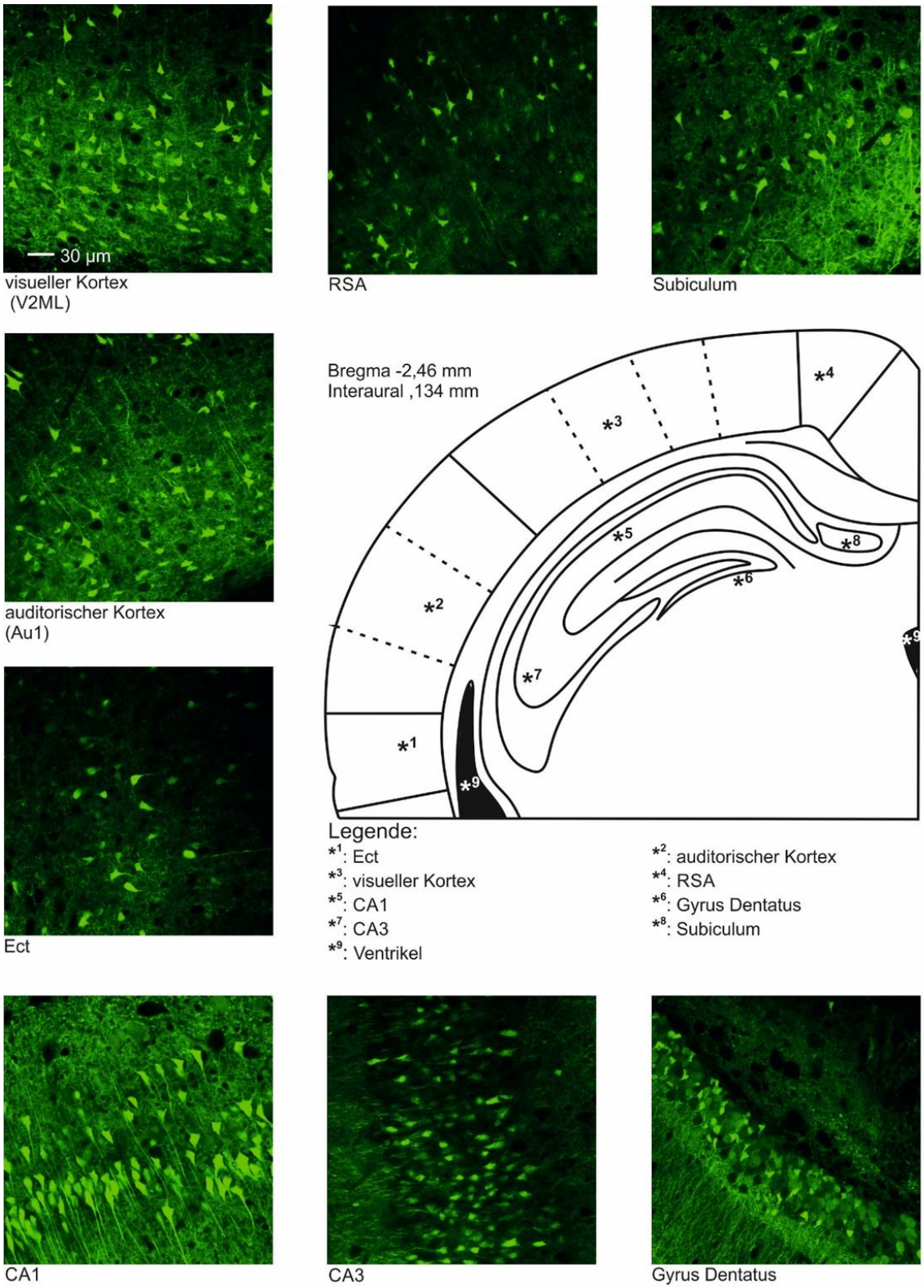


Abbildung 9: „späte“ (mehr caudal gelegene) Hirnschnitte

In mehr caudal gelegenen Schnitten finden sich vor allem der visuelle Kortex, der auditorische Kortex, CA1, CA3, Gyrus Dentatus, RSA, Subiculum und meist auch Ect.

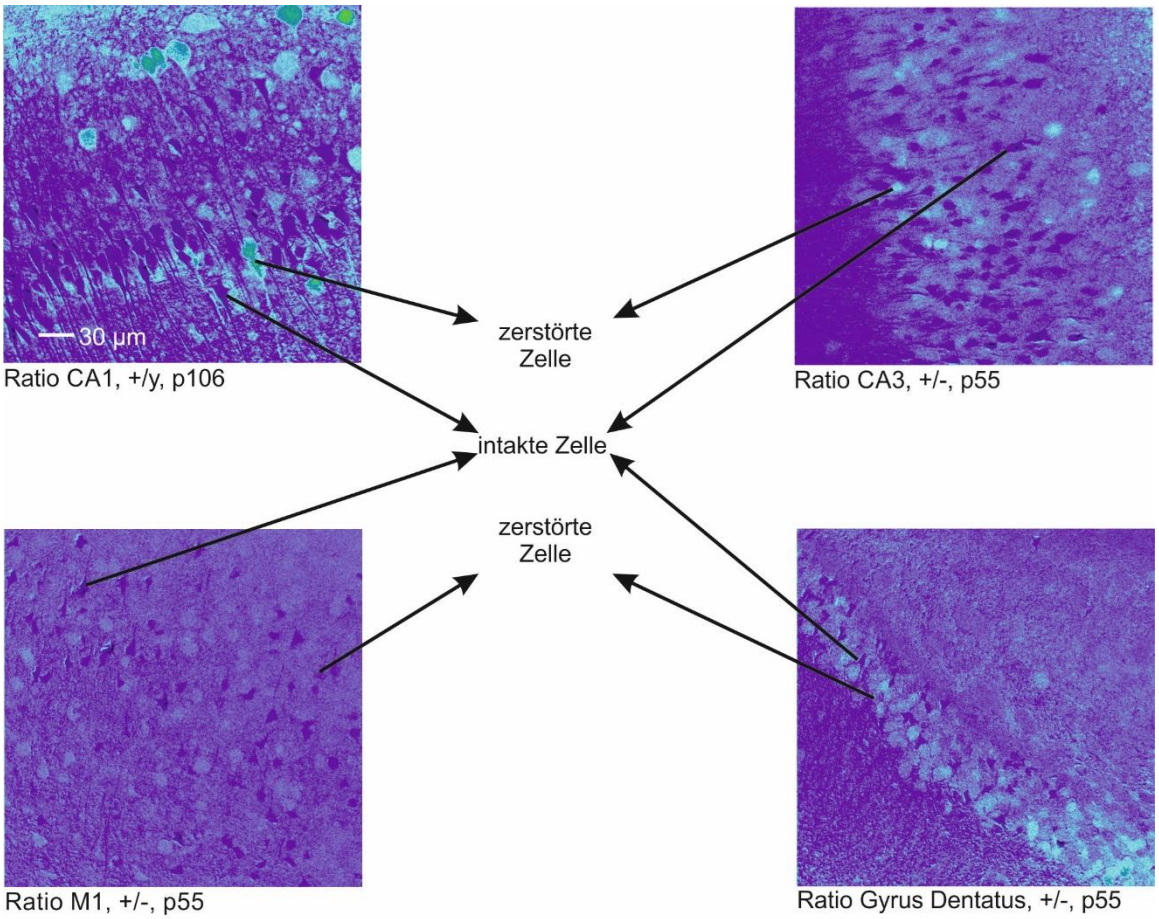


Abbildung 10: Bildbeispiele einiger Areale zur Verwertbarkeit von Zellen

Das roGFP1c wird unterschiedlich in den verschiedenen Arealen exprimiert. Daher sind die Zellen in CA1 am deutlichsten und in CA3 weniger klar abzugrenzen. Je dunkler eine Zelle, desto reduzierter ist ihr Zytosol. Sehr helle Zellen sind dementsprechend mit hoher Wahrscheinlichkeit zerstört und sollten daher nicht ausgewertet werden. Ihre Redoxwerte liegen auch weit außerhalb des Antwortbereiches. Begründet durch das jeweilige Ausmaß der roGFP1c Expression variiert die Anzahl der Zellen somit stark von Areal zu Areal.

3.1 Kalibrierung

Um die relative Oxidationsstufe berechnen zu können, mussten zuerst die ratiometrischen Grenzwerte für die Zellen, bezüglich maximaler Oxidation und Reduktion, festgestellt werden. Zu diesem Zweck wurde eine Kalibrierung mit DTT und H_2O_2 an drei Wildtyp-Mäusen (p87, p89 und p89) durchgeführt. Dabei wurden nur Zellen des Areals CA1 des Hippokampus betrachtet, da hier roGFP1c am stärksten exprimiert wird und damit die Zellen sehr deutlich zu erkennen waren. Dies ist essentiell, da nach der Gabe des jeweiligen Redoxmodulators dieselbe Zellschicht wie zuvor bewertet werden sollte. Nach Möglichkeit wurde zudem versucht immer die exakt gleichen Zellen, nach Gabe von H_2O_2 und nach

DTT, zu vergleichen (Abb. 11, Abb. 12). Bei n=76 untersuchten Zellen für H_2O_2 und n=78 Zellen für DTT ergab sich ein Antwortbereich für die ratiometrischen Grauwerte von vollständig reduziert 408,42 ±63,3 bis maximal oxidiert 915,47 ±106,41.

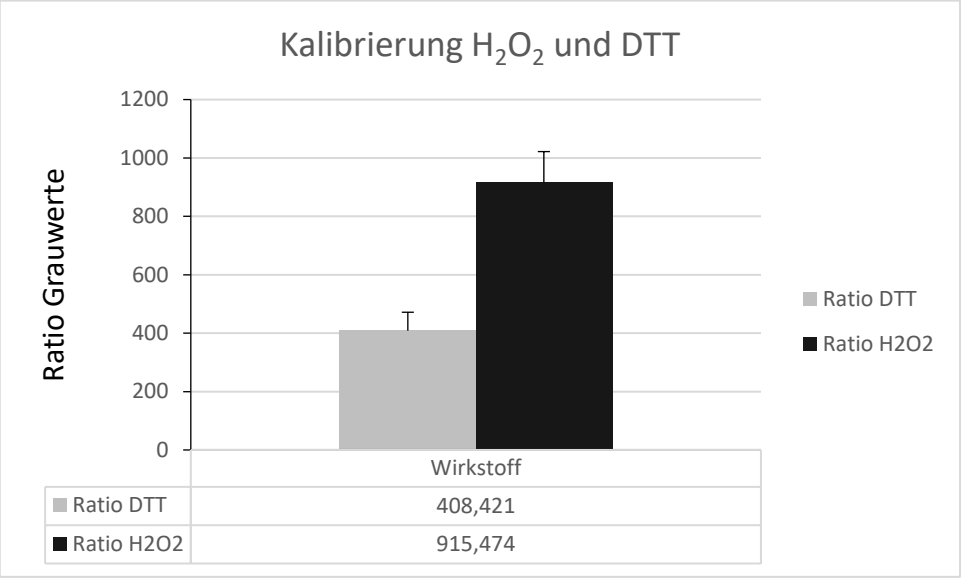


Abbildung 11: Kalibrierung

Werte der roGFP1c Kalibrierung, die den möglichen ratiometrischen Antwortbereich darstellen und für die Berechnung der relativen Oxidationslevel benötigt werden. Aufgetragen sind Mittelwerte, die Fehlerbalken repräsentieren die zugehörige Standardabweichung.

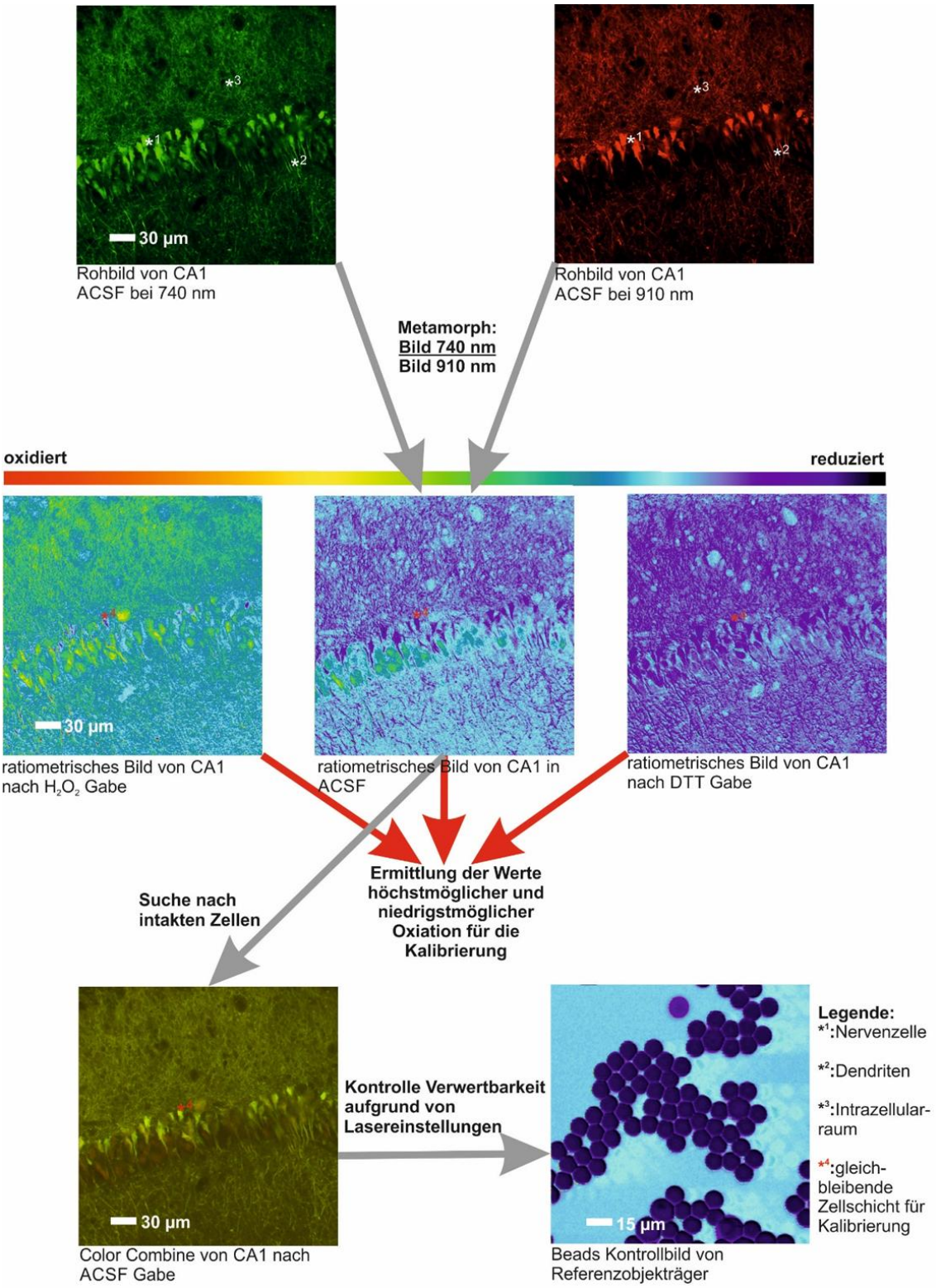


Abbildung 12: Kalibrierung, Verwertbarkeit, Auswertung

Der Weg vom Rohbild zur verwertbaren Zelle in einem ratiometrischen Bild, kontrolliert durch ein Color Combine der grün und rot gefärbten Rohbilder sowie ein Beads Kontrollbild. Der Vergleich der ratiometrischen Bilder der Kalibrierung zeigt, dass je höher oxidiert (H_2O_2), desto heller erscheinen die Zellen und umgekehrt (DTT). In der Auswertung ergibt sich aus diesen Bildern der ratiometrische Antwortbereich, der sich von maximal oxidiert zu reduziert erstreckt.

Um einen zuverlässigen Antwortbereich festzulegen, wurden nur die Daten derjenigen Zellen verwendet, bei denen die Werte über 5% und unter 95% des gesamten Antwortbereichs liegen. Diese Maßnahme grenzt die zu verwendenden Daten auf Ratio-Grauwerte von 421 bis 867 ein. Damit soll verhindert werden, dass einzelne pathologisch niedrige oder hohe Werte die tatsächlichen Verhältnisse verfälschen. So ist es zum Beispiel möglich, dass auch Zellen gemessen wurden die nicht mehr ausreichend vital waren. Dies würde zu einem überhöhten ratiometrischen Wert führen, der aber nicht die tatsächliche physiologische Situation widerspiegelt.

Der Redoxantwortbereich ist allerdings nicht nur als Rahmen für die erhobenen Daten wichtig. Zusätzlich werden die beiden Grenzwerte (Rox (Redoxantwortbereich Grenzwert maximal oxidiert): 408 und Rred (Redoxantwortbereich Grenzwert maximal reduziert): 916) zur Berechnung der relativen Oxidationsstufe benötigt. Neben den Grenzwerten und den ratiometrischen Grauwerten der einzelnen Zellen, wird außerdem der Quotient aus F910ox durch F910red benötigt. Hierfür wurden die Rohbilder der Aufnahmen der Kalibrierung verwendet. Mit dem Mai-Tai-Laser wurden Aufnahmen mit der Wellenlänge 910 nm von denselben Zellen nach Zugabe des Oxidations- bzw. Reduktionsmittels aufgenommen. Damit konnte das Verhältnis der Grauwerte der einzelnen Zellen nach Behandlung mit H_2O_2 zu den Grauwerten derselben Zelle nach DTT-Gabe errechnet werden. Bei n=79 Zellen ergab sich ein durchschnittlicher Wert von F910ox/F910red=0,497±0,126, der als Instrument-Faktor sämtliche optischen Gegebenheiten des genutzten 2-Photonenmikroskops beinhaltet.

3.2 Relative Oxidationslevel und Redoxpotentiale im Vergleich der Genotypen und Geschlechter

In die entsprechende Gleichung (Formel 1, Seite 25) eingesetzt liefern die ratiometrischen Grauwerte die relative Oxidationsstufe der jeweiligen Neurone. Die gesammelten Daten wurden so in den jeweiligen Gruppen zusammengefasst, Mittelwerte gebildet und die zugehörigen Standardabweichungen ermittelt. In Säulendiagramme übertragen lassen sich so die verschiedenen Untergruppen leicht miteinander vergleichen und oft statistisch

signifikante, Genotyp-bedingte Unterschiede identifizieren. Dabei sind nach Analyse mittels 2-seitigem, ungepaartem T-Test $p<0,05$ (signifikant), $p<0,01$ (sehr signifikant) und $p<0,001$ (höchst signifikant) zu unterscheiden. Im Folgenden wird dies in den Diagrammen durch * (signifikant), ** (sehr signifikant) und *** (höchst signifikant) markiert, im beschreibenden Text vereinfachend aber nur von signifikanten Unterschieden gesprochen. Das spezifische Signifikanzniveau kann den Diagrammen entnommen werden. Die Anzahl der Messwerte n ist in der Basis der jeweiligen Säulen der Diagramme zu finden. Für multiple Vergleiche, z. B. der verschiedenen Hirnregionen untereinander, kam eine Varianzanalyse zum Einsatz. Da unabhängige Gruppen verglichen wurden, die nicht normal verteilt sind, wurde der Kruskal-Wallis-Test gefolgt vom multiplen Vergleich mittels Dunn's posthoc Test durchgeführt. Es wurde im Hippokampus gegen das Referenzareal CA1 des jeweiligen Genotyps und der jeweiligen Altersgruppe verglichen. Im Kortex diente der visuelle Kortex als Referenzareal, wobei auch hier zusätzlich alle Kortexareale gegen CA1 verglichen wurden. Die beiden Areale wurden ausgewählt, da sie jeweils die niedrigste relative Oxidation aufwiesen. In den folgenden Abschnitten wird abkürzend von Varianzanalyse gesprochen. Die jeweils verwendeten Testverfahren sind in der Legende der entsprechenden Abbildungen angegeben.

Aus den Werten der relativen Oxidationsstufen der jeweiligen Zellen kann, eingesetzt in die abgewandelte Nernst Gleichung (Formel 2, Seite 25), das tatsächliche Thiol-Redoxpotential der einzelnen Zellen berechnet werden (Hanson et al. 2004). Aufgrund dieser Abhängigkeit folgt, dass je höher die relative Oxidationsstufe ist, desto höher ist auch das entsprechende Redoxpotential. Umgekehrt heißt das, dass je niedriger die relative Oxidationsstufe, desto niedriger ist das jeweilige Redoxpotential. Also sind in den verschiedenen Mausgruppen die Unterschiede und Gemeinsamkeiten ihrer relativen Oxidationsstufen analog auch bei den entsprechenden Redoxpotentialen zu erkennen. Das Standard-Redoxpotential von roGFP1c beträgt $E^{0'}_{roGFP1c}$=-291 mV. Basierend auf den relativen Oxidationsstufen ergeben sich in den verschiedenen Arealen durchschnittliche Redoxpotentiale von ca. -270 mV bis ca. -300 mV.

Die erste Versuchsreihe widmet sich den Redoxbedingungen des Hippokampus. Das folgende Diagramm zu Abb.13 vergleicht die verschiedenen Hippokampusareale CA1, CA3, Gyrus Dentatus und Subiculum von männlichen Wildtyp- und Knockoutmäusen im Alter von 51-60 Tagen.

Im Vergleich der Hippokampusregionen untereinander zeigt sich zunächst für beide Genotypen, dass der Gyrus Dentatus jeweils knapp höhere Oxidationsstufen als die CA3 Region aufweist, aber deutlich höhere als das Subiculum. Die CA1 Region wiederum liegt von den Oxidationsstufen am niedrigsten und noch knapp unter denen vom Subiculum (Abb. 13). Nach Varianzanalyse beider Genotypen gegen das jeweilige Referenzareal CA1 zeigen sich hier entsprechend signifikante Unterschiede bei CA3 und beim Gyrus Dentatus.

Genotypisch bedingte, signifikante Unterschiede ($p<0,05$) finden sich in den Arealen CA3 und Gyrus Dentatus. In der CA3 Region sind die Neurone der Wildtypen stärker oxidiert als die der *Mecp2*$^{-/y}$ Knockoutmäuse. Im Gyrus Dentatus verhält es sich allerdings genau umgekehrt, denn hier weisen die *Mecp2*$^{-/y}$ Männchen oxidiertere Redoxbedingungen auf. In der CA1 Region und dem Subiculum zeigen sich keine genotypisch-bedingten Unterschiede.

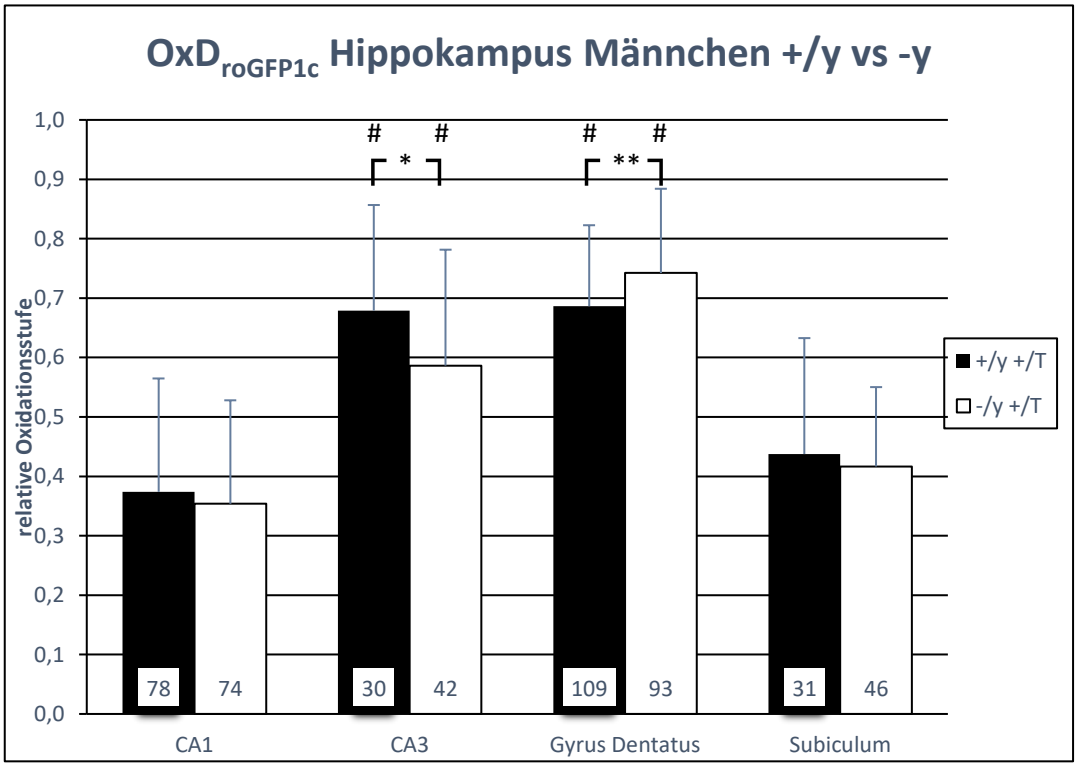


Abbildung 13: Relative Oxidationsstufen der männlichen Wildtyp- und Knockoutmäuse im Hippokampus, p51-60.

Statistisch signifikante Unterschiede der Hirnareale untereinander sind durch die Sternchen und Rauten markiert (Genotyp-bedingte Unterschiede nach T-Test: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; Regionsspezifische Unterschiede durch Rangsummentest nach Kruskal-Wallis gefolgt vom multiplen Vergleich mittels Dunn's posthoc Test gegen den Referenzwert von CA1: #).

Die Auswertung der Redoxpotentiale zeigt entsprechende Verhältnisse (Abb. 14). Mit Ausnahme des Gyrus Dentatus und CA3 liegen keine signifikanten ($p<0,05$) Unterschiede zwischen den Genotypen und bei der Varianzanalyse vor.

Im Vergleich der Hippokampusregionen innerhalb der Genotypen liegen in der CA1 Region und dem Subiculum sehr negative Redoxpotentiale vor, während sie bei CA3 und dem Gyrus Dentatus deutlich positiver sind. Bei den Knockoutmäusen ist das Redoxpotential etwas negativer als bei den Wildtypen, wobei hier der Gyrus Dentatus jedoch die Ausnahme bildet (Abb. 14).

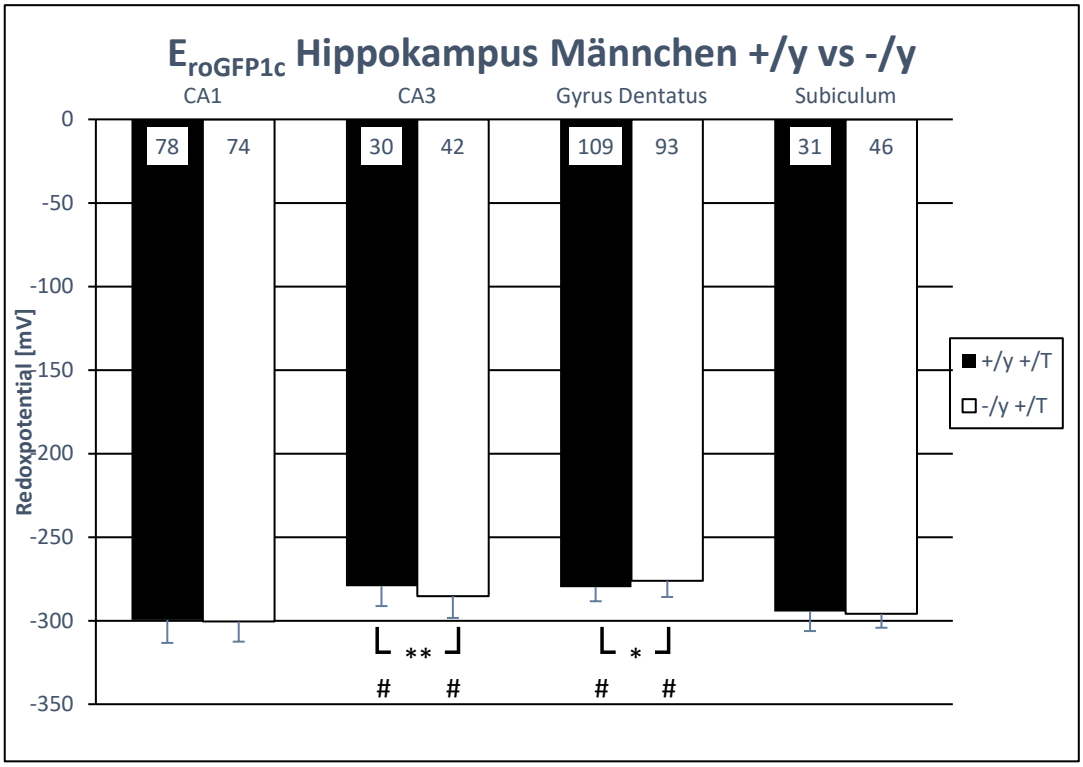


Abbildung 14: Redoxpotential [mV] der männlichen Wildtyp- und Knockoutmäuse im Hippokampus, p51-60.
Statistisch signifikante Unterschiede der Hirnareale untereinander sind durch die Sternchen und Rauten markiert (Genotyp-bedingte Unterschiede nach T-Test: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; Regionsspezifische Unterschiede durch Rangsummentest nach Kruskal-Wallis gefolgt vom multiplen Vergleich mittels Dunn's posthoc Test gegen den Referenzwert von CA1: #).

Entsprechende vergleichende Untersuchungen des Hippokampus wurden auch an weiblichen Tieren durchgeführt. Hierbei kamen allerdings zwei verschiedene Altersgruppen zum Einsatz (p51-60 und p96-175).

Abbildung 15 zeigt ein Diagramm, welches die Hippokampusareale CA1, CA3, Gyrus Dentatus und Subiculum von weiblichen Wildtypen und heterozygoten Rett-Mäusen (*Mecp2*$^{+/-}$) der Altersgruppe p51-60 vergleicht. Nur in den Arealen CA3 und Subiculum finden sich signifikante genotypische Unterschiede ($p<0,05$) in den relativen Oxidationsstufen, wobei hier die Oxidationsstufen der Wildtypen höher sind als die der heterozygoten Mäuse. Ansonsten lässt sich im Vergleich auch ein gewisser Trend zwischen den Hirnregionen erkennen. Der Gyrus Dentatus, CA3 und Subiculum zeigen bei den Wildtypen ähnlich hohe Werte, während CA1 deutlich weniger oxidiert erscheint. Die heterozygoten Tiere zeigen zwischen den Arealen ein ähnliches Muster, mit der Ausnahme, dass die CA3-Werte auf ähnlichem Level wie beim Subiculum sind. Die Varianzanalyse gegen das Referenzareal CA1 zeigt Genotyp übergreifend signifikante Unterschiede aller Areale gegenüber CA1 (Abb. 15).

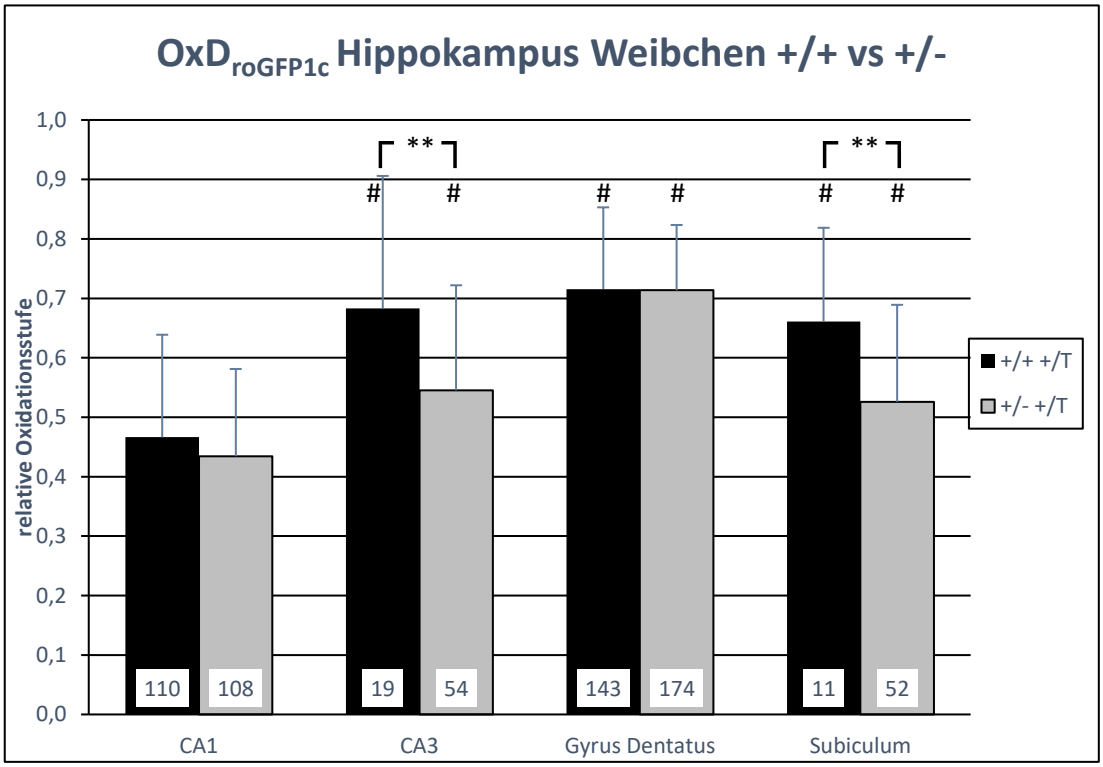


Abbildung 15: Relative Oxidationsstufen der weiblichen Wildtypen und heterozygoten Mäuse im Hippokampus, p51-60.
Statistisch signifikante Unterschiede der Hirnareale untereinander sind durch die Sternchen und Rauten markiert (Genotyp-bedingte Unterschiede nach T-Test: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; Regionsspezifische Unterschiede durch Rangsummentest nach Kruskal-Wallis gefolgt vom multiplen Vergleich mittels Dunn's posthoc Test gegen den Referenzwert von CA1: #).

Bei den Redoxpotentialen liegen in dieser Altersgruppe (p51-60) nur in den Arealen CA3 und Subiculum signifikante ($p<0,05$) Unterschiede zwischen den Genotypen vor. Im

Vergleich der Hirnregionen weist CA1 das niedrigste Redoxpotential auf, während es bei den anderen drei Arealen auch nach Varianzanalyse signifikant höher ist. Bei den heterozygoten Mäusen ist das Redoxpotential generell etwas negativer als bei den Wildtypen (Abb. 16).

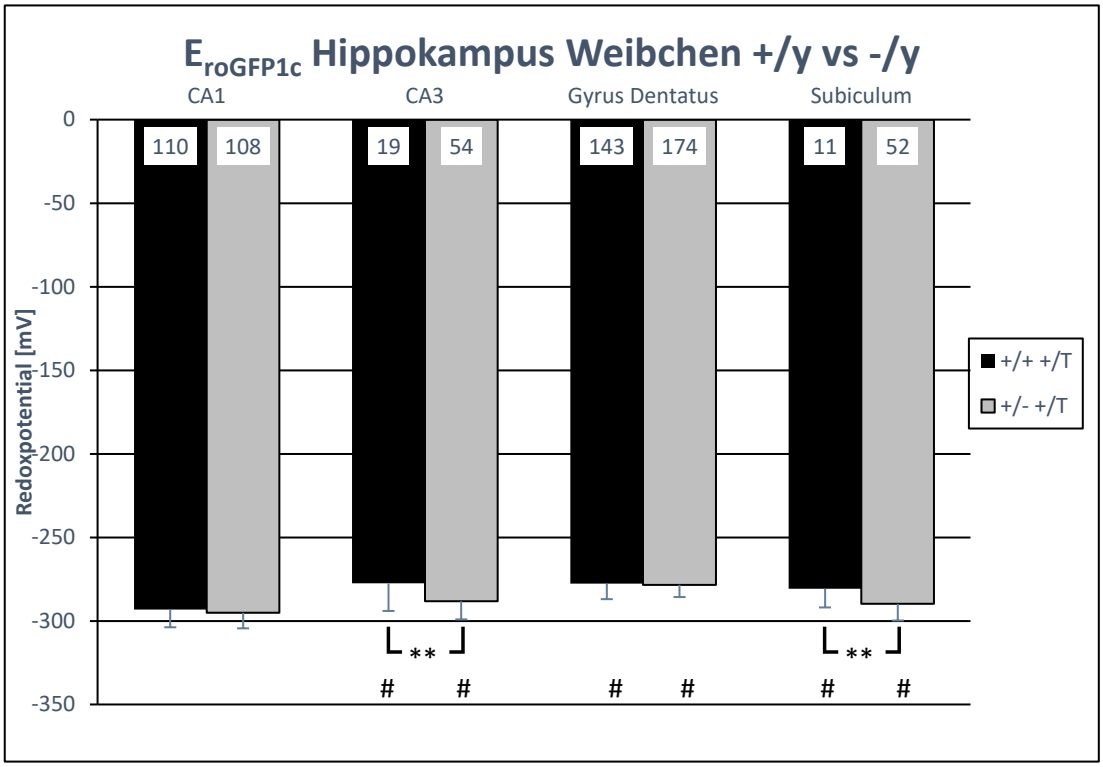


Abbildung 16: Redoxpotential [mV] der weiblichen Wildtypen und heterozygoten Mäuse im Hippokampus, p51-60.
Statistisch signifikante Unterschiede der Hirnareale untereinander sind durch die Sternchen und Rauten markiert (Genotyp-bedingte Unterschiede nach T-Test: * $p < 0{,}05$, ** $p < 0{,}01$, *** $p < 0{,}001$; Regionsspezifische Unterschiede durch Rangsummentest nach Kruskal-Wallis gefolgt vom multiplen Vergleich mittels Dunn's posthoc Test gegen den Referenzwert von CA1: #).

Die nachfolgende Abbildung 17 dient dem Vergleich der unterschiedlichen Hippokampusareale CA1, CA3, Gyrus Dentatus und Subiculum von weiblichen Wildtypen und heterozygoten Mäusen in der Altersgruppe p96-175. In den Arealen CA3 und Gyrus Dentatus finden sich für die Genotypen signifikante Unterschiede ($p<0{,}05$). Die Neurone der heterozygoten Mäuse sind in allen 4 Arealen stärker oxidiert als die der Wildtypen. Der Gyrus Dentatus ist insgesamt am stärksten oxidiert, dicht gefolgt von CA3. CA1 ist am niedrigsten oxidiert und Subiculum etwas höher. Im Zusammenhang mit der Varianzanalyse der Areale gegen die Referenz CA1 sind diese Unterschiede aller 3 Areale beider Genotypen signifikant (Abb. 17).

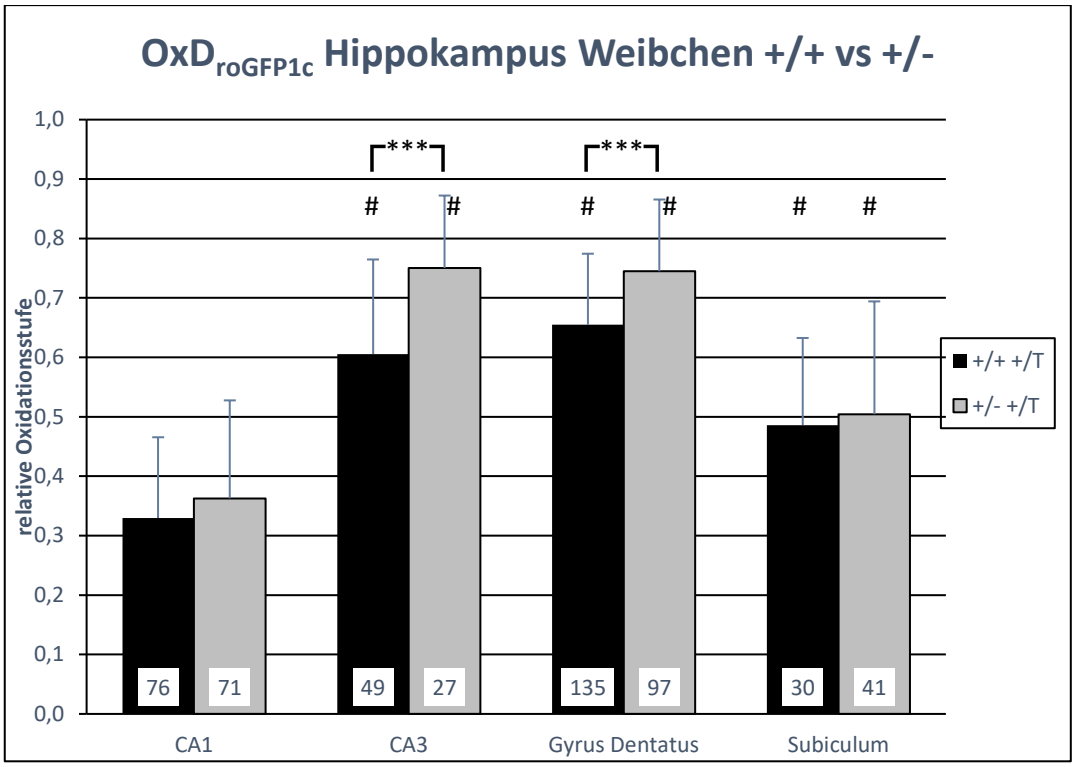


Abbildung 17: Relative Oxidationsstufen der weiblichen Wildtypen und heterozygoten Mäuse im Hippokampus, p96-175.
Statistisch signifikante Unterschiede der Hirnareale untereinander sind durch die Sternchen und Rauten markiert (Genotyp-bedingte Unterschiede nach T-Test: * $p < 0{,}05$, ** $p < 0{,}01$, *** $p < 0{,}001$; Regionsspezifische Unterschiede durch Rangsummentest nach Kruskal-Wallis gefolgt vom multiplen Vergleich mittels Dunn's posthoc Test gegen den Referenzwert von CA1: #).

Die daraus abgeleiteten Redoxpotentiale aus Abbildung 18 zeigen, dass mit Ausnahme von CA3 und des Gyrus Dentatus keine signifikanten ($p<0{,}05$) Unterschiede zwischen den Genotypen in dieser Altersstufe vorliegen. Bei CA1 und dem Subiculum liegen sehr niedrige Redoxpotentiale vor, während sie bei CA3 und dem Gyrus Dentatus höher sind. Trotz des auch recht niedrigen Redoxpotentials im Subiculum sind nach Varianzanalyse alle 3 Areale Genotyp übergreifend mit signifikant höheren Redoxpotentialen versehen als die Referenz CA1. Bei den heterozygoten Mäusen ist das Redoxpotential etwas höher als bei den Wildtypen (Abb. 18).

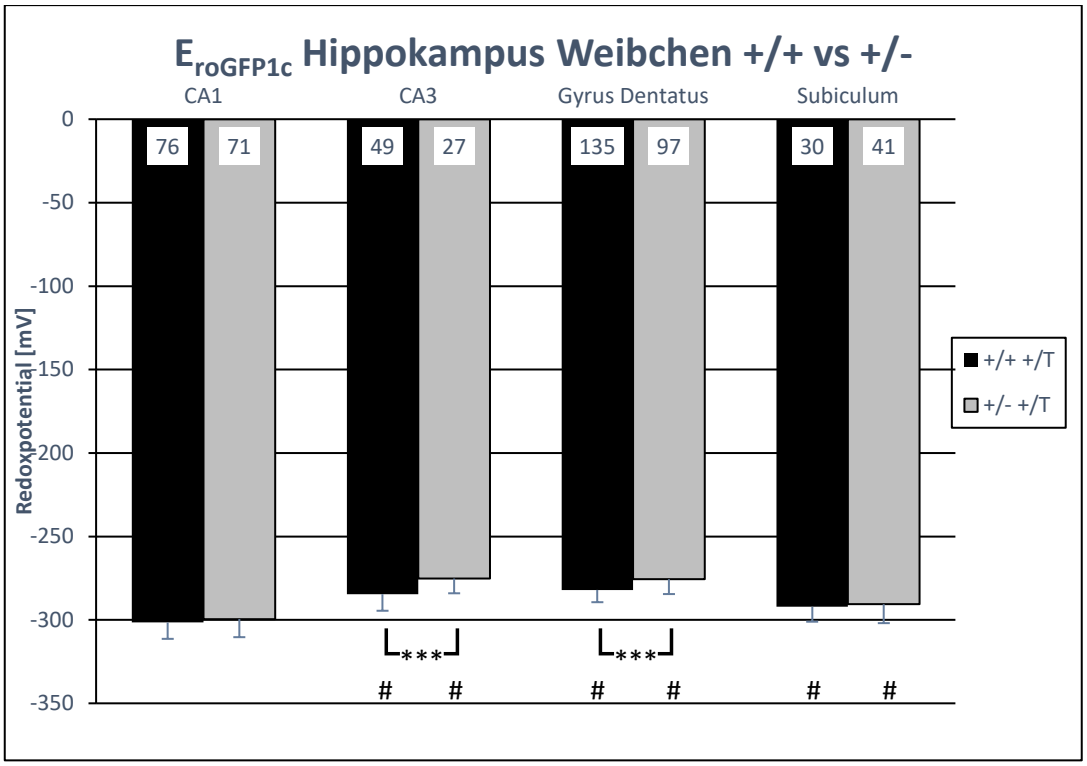


Abbildung 18: Redoxpotential [mV] der weiblichen Wildtypen und heterozygoten Mäuse im Hippokampus, p96-175.
Statistisch signifikante Unterschiede der Hirnareale untereinander sind durch die Sternchen und Rauten markiert (Genotyp-bedingte Unterschiede nach T-Test: * $p < 0{,}05$, ** $p < 0{,}01$, *** $p < 0{,}001$; Regionsspezifische Unterschiede durch Rangsummentest nach Kruskal-Wallis gefolgt vom multiplen Vergleich mittels Dunn's posthoc Test gegen den Referenzwert von CA1: #).

Nach der erfolgten Bewertung der Hippokampusformation wurden nun die Redoxbedingungen in verschiedenen kortikalen Arealen beleuchtet. Von Interesse waren dabei vor allem der visuelle, der auditorische, der somatosensorische und der motorische Kortex sowie die Areale RSA (retrosplenialer agranulärer Kortex) und Ect (entorhinaler Kortex). In Abbildung 19 werden diese Areale von männlichen Wildtyp- und Knockoutmäusen im Alter von p51-60 verglichen. Der visuelle und motorische Kortex sowie das Areal RSA zeigen signifikante ($p<0{,}05$) Unterschiede zwischen den Genotypen. Im motorischen Kortex sind die Neurone der Knockoutmäuse stärker oxidiert als die der Wildtypen. Beim visuellen Kortex und RSA verhält es sich genau umgekehrt (Abb. 19). Mittels Varianzanalyse gegen das Referenzareal visueller Kortex zeigt sich hier nur beim motorischen Kortex der Knockoutmäuse ein signifikanter Unterschied in der Oxidationsstufe.

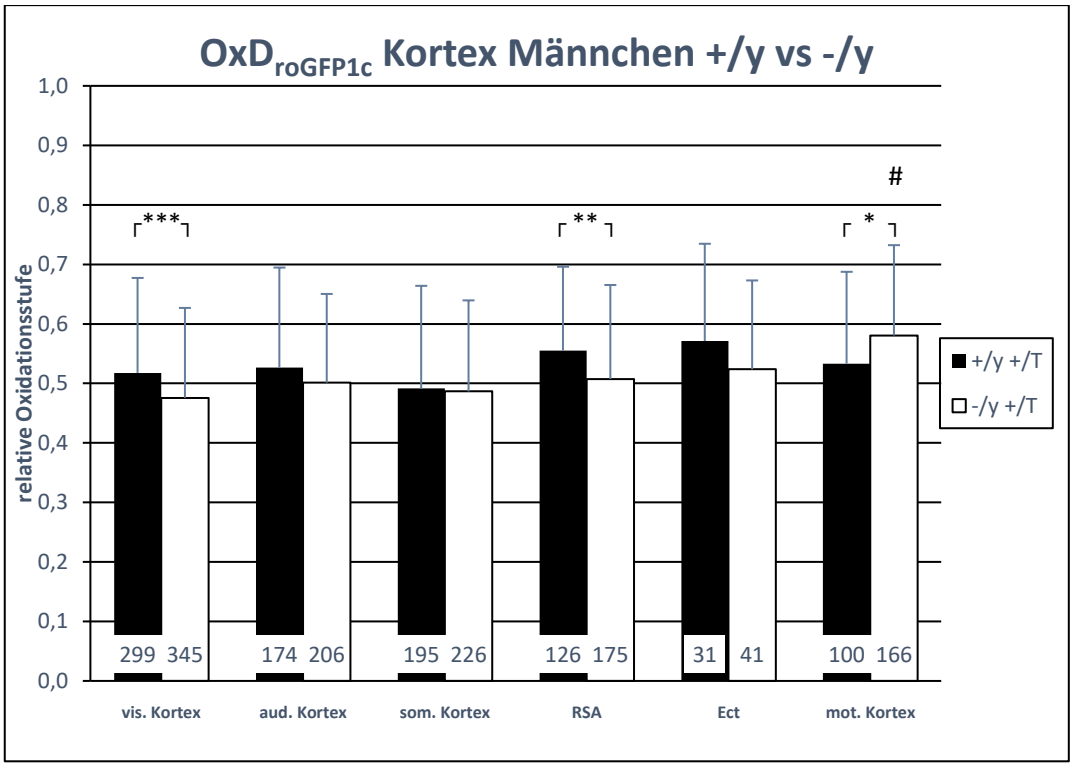


Abbildung 19: Relative Oxidationsstufen der männlichen Wildtyp- und Knockoutmäuse im Kortex, p51-60.
Statistisch signifikante Unterschiede der Hirnareale untereinander sind durch die Sternchen und Rauten markiert (Genotyp-bedingte Unterschiede nach T-Test: * $p < 0{,}05$, ** $p < 0{,}01$, *** $p < 0{,}001$; Regionsspezifische Unterschiede durch Rangsummentest nach Kruskal-Wallis gefolgt vom multiplen Vergleich mittels Dunn's posthoc Test gegen den Referenzwert des visuellen Kortex: #).

Entsprechend fallen nur im visuellen Kortex, RSA und im motorischen Kortex signifikante ($p<0{,}05$) Unterschiede der Redoxpotentiale zwischen den Genotypen auf, welche in Abbildung 20 dargestellt sind. Allerdings unterscheiden sich die Redoxpotentiale in ihren Werten insgesamt wenig. Bei den Knockoutmäusen ist das Redoxpotential etwas negativer als bei den Wildtypen. Nur im motorischen Kortex findet sich eine oxidiertere Redoxbalance bei den männlichen Knockoutmäusen als bei den Wildtypmäusen (Abb. 20). Wie bei den relativen Oxidationsstufen liegt auch hier nur bei den Knockoutmäusen im motorischen Kortex ein signifikanter Unterschied nach Varianzanalyse vor.

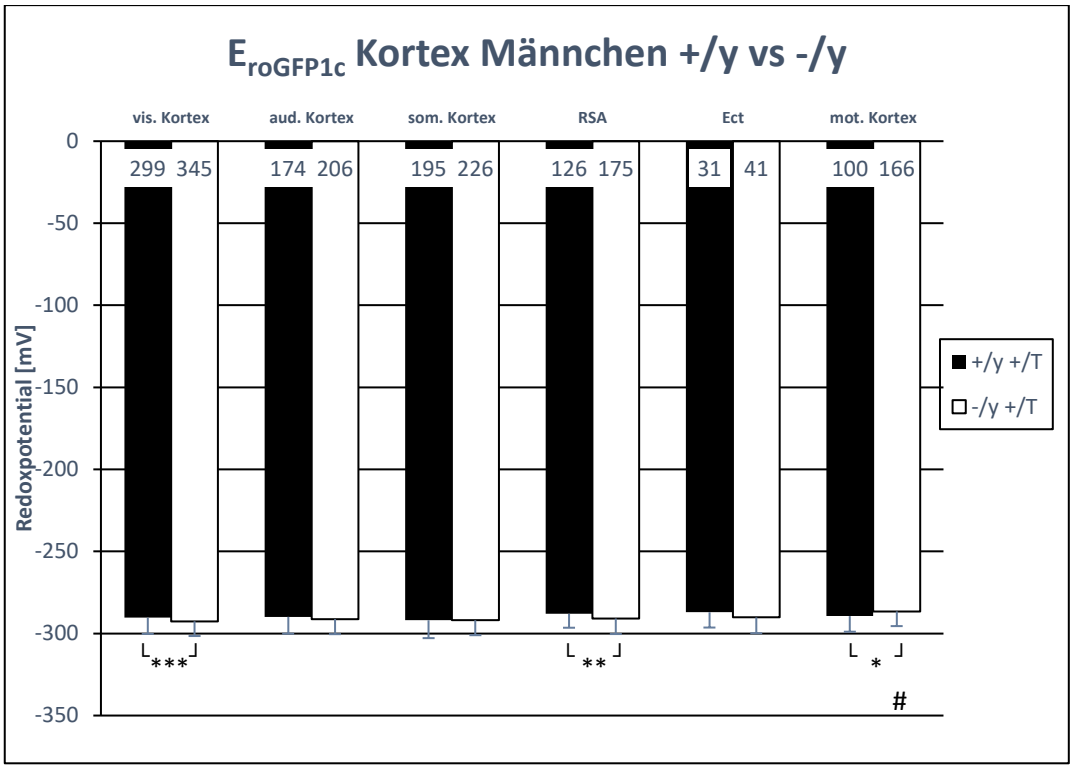


Abbildung 20: Redoxpotential [mV] der männlichen Wildtyp- und Knockoutmäuse im Kortex, p51-60. Statistisch signifikante Unterschiede der Hirnareale untereinander sind durch die Sternchen und Rauten markiert (Genotyp-bedingte Unterschiede nach T-Test: * $p < 0{,}05$, ** $p < 0{,}01$, *** $p < 0{,}001$; Regionsspezifische Unterschiede durch Rangsummentest nach Kruskal-Wallis gefolgt vom multiplen Vergleich mittels Dunn's posthoc Test gegen den Referenzwert des visuellen Kortex: #).

Bei der kortikalen Analyse in den weiblichen Tieren wurden erneut jeweils jüngere und ältere Tiere, d.h. die Altersgruppen p51-60 und p96-175 untersucht. Hierbei wurden der visuelle, auditorische, somatosensorische und der motorische Kortex sowie die Areale RSA und Ect verglichen.

So zeigten sich in jüngeren Tieren signifikante Unterschiede ($p<0{,}05$) zwischen den Wildtypen und heterozygoten Mäusen im auditorischen, somatosensorischen und motorischen Kortex sowie im Areal Ect. Bei allen dreien sind die Zellen der Wildtypen stärker oxidiert als die der heterozygoten Tiere. Dasselbe ist auch im Vergleich der anderen Hirnareale zu erkennen. Nur im Areal RSA sind die Zellen der heterozygoten Tiere minimal höher oxidiert (Abb. 21). Nach Durchführung der Varianzanalyse gegen das jeweilige Referenzareal visueller Kortex ergeben sich bei den Wildtypen signifikante Unterschiede im auditorischen und motorischen Kortex sowie im Areal Ect. Die heterozygoten Mäuse wiesen nur im Areal Ect signifikante Unterschiede auf.

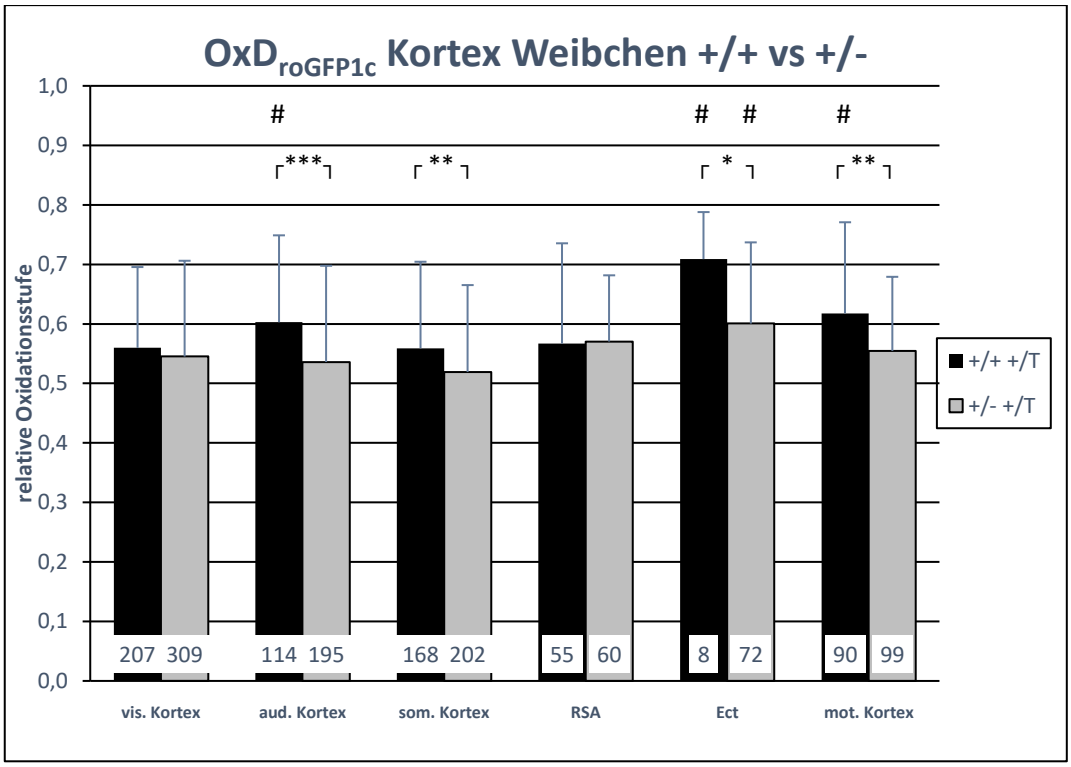


Abbildung 21: Relative Oxidationsstufen der weiblichen Wildtypen und heterozygoten Mäuse im Kortex, p51-60.
Statistisch signifikante Unterschiede der Hirnareale untereinander sind durch die Sternchen und Rauten markiert (Genotyp-bedingte Unterschiede nach T-Test: * $p < 0{,}05$, ** $p < 0{,}01$, *** $p < 0{,}001$; Regionsspezifische Unterschiede durch Rangsummentest nach Kruskal-Wallis gefolgt vom multiplen Vergleich mittels Dunn's posthoc Test gegen den Referenzwert des visuellen Kortex: #).

Daraus ergeben sich für Abbildung 22 bezüglich der Redoxpotentiale im auditorischen, somatosensorischen Kortex, Ect und im motorischen Kortex signifikante ($p<0{,}05$) Unterschiede zwischen den Genotypen. Allerdings unterscheiden sich die Redoxpotentiale in ihren Werten insgesamt wenig. Bei den heterozygoten Mäusen ist das Redoxpotential etwas negativer als bei den Wildtypen (Abb. 22). Die Durchführung der Varianzanalyse gegen das jeweilige Referenzareal visueller Kortex zeigen bei den Wildtypen signifikante Unterschiede im auditorischen und motorischen Kortex sowie im Areal Ect. Die heterozygoten Mäuse wiesen nur im Areal Ect signifikante Unterschiede auf.

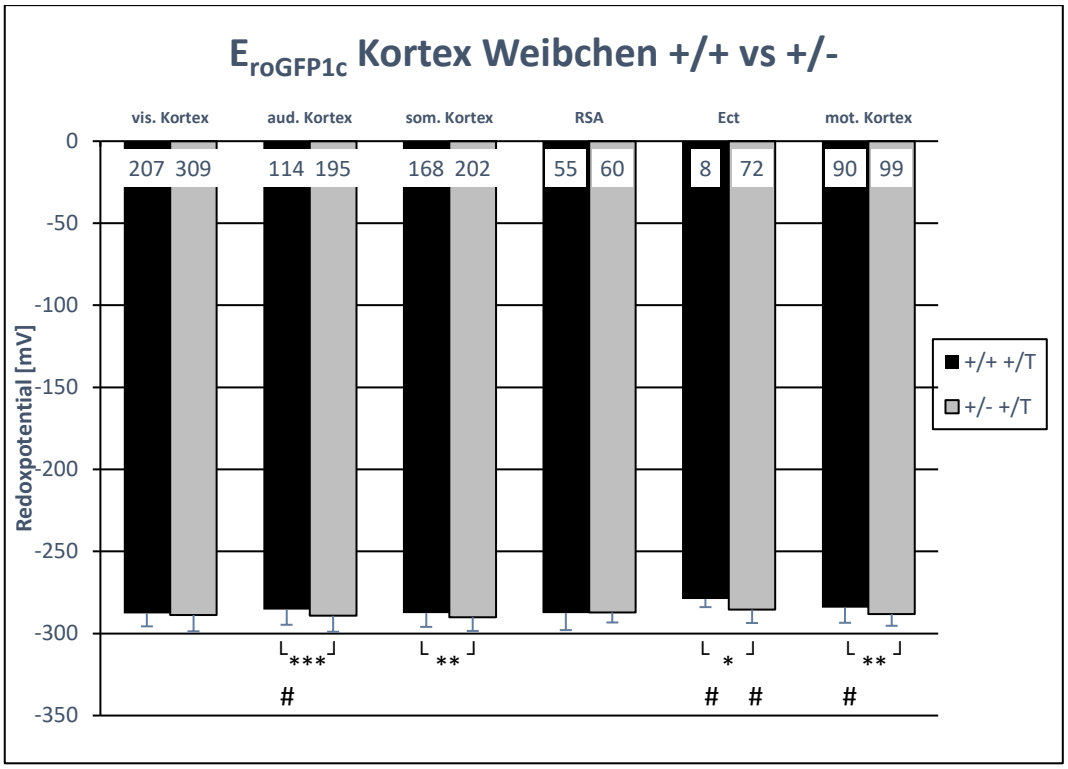


Abbildung 22: Redoxpotential [mV] der weiblichen Wildtypen und heterozygoten Mäuse im Kortex, p51-60.
Statistisch signifikante Unterschiede der Hirnareale untereinander sind durch die Sternchen und Rauten markiert (Genotyp-bedingte Unterschiede nach T-Test: * $p < 0{,}05$, ** $p < 0{,}01$, *** $p < 0{,}001$; Regionsspezifische Unterschiede durch Rangsummentest nach Kruskal-Wallis gefolgt vom multiplen Vergleich mittels Dunn's posthoc Test gegen den Referenzwert des visuellen Kortex: #).

Die Ergebnisse der relativen Oxidationsstufen der älteren Weibchen im Alter von p96-175 sind in Abbildung 23 aufgezeigt. Hier finden sich in allen Hirnarealen signifikante ($p<0{,}05$) Unterschiede zwischen den Genotypen. Die Neurone der heterozygoten Tiere sind alle deutlich stärker oxidiert als die der Wildtypen. Gegen das Referenzareal visueller Kortex des jeweiligen Genotyps durchgeführte Varianzanalyse zeigt hingegen nur in den Arealen RSA und Ect signifikante Unterschiede, wobei RSA bei den Wildtypen diesen Unterschied nicht aufweist (Abb. 23).

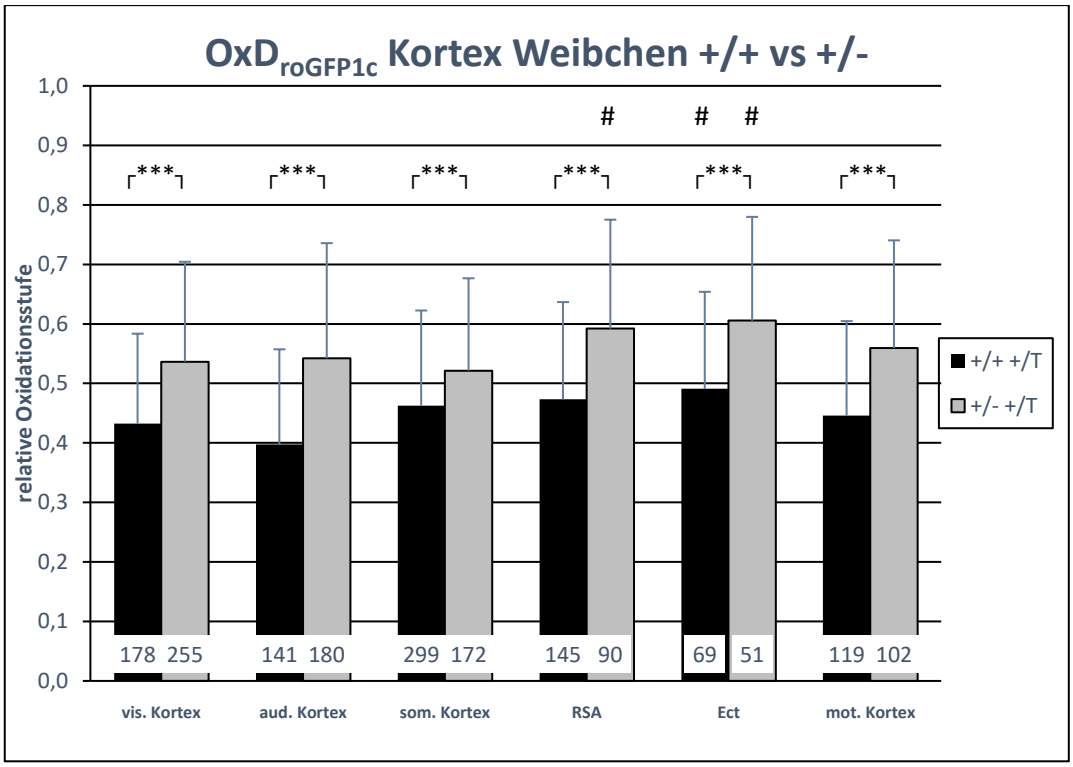


Abbildung 23: relative Oxidationsstufen der weiblichen Wildtypen und heterozygoten Mäuse im Kortex, p96-175.
Statistisch signifikante Unterschiede der Hirnareale untereinander sind durch die Sternchen und Rauten markiert (Genotyp-bedingte Unterschiede nach T-Test: * $p < 0{,}05$, ** $p < 0{,}01$, *** $p < 0{,}001$; Regionsspezifische Unterschiede durch Rangsummentest nach Kruskal-Wallis gefolgt vom multiplen Vergleich mittels Dunn's posthoc Test gegen den Referenzwert des visuellen Kortex: #).

Die entsprechenden Redoxpotentiale in Abbildung 24 zeigen signifikante ($p<0{,}05$) Unterschiede zwischen den Genotypen in allen Kortexarealen. Das Redoxpotential der heterozygoten Mäuse ist deutlich höher als es bei den Wildtypen ist. Die Varianzanalyse zeigt hier wie auch bei den relativen Oxidationsstufen signifikante Unterschiede im Areal RSA und Ect der heterozygoten Mäuse. Bei den Wildtypen nur im Areal Ect (Abb. 24).

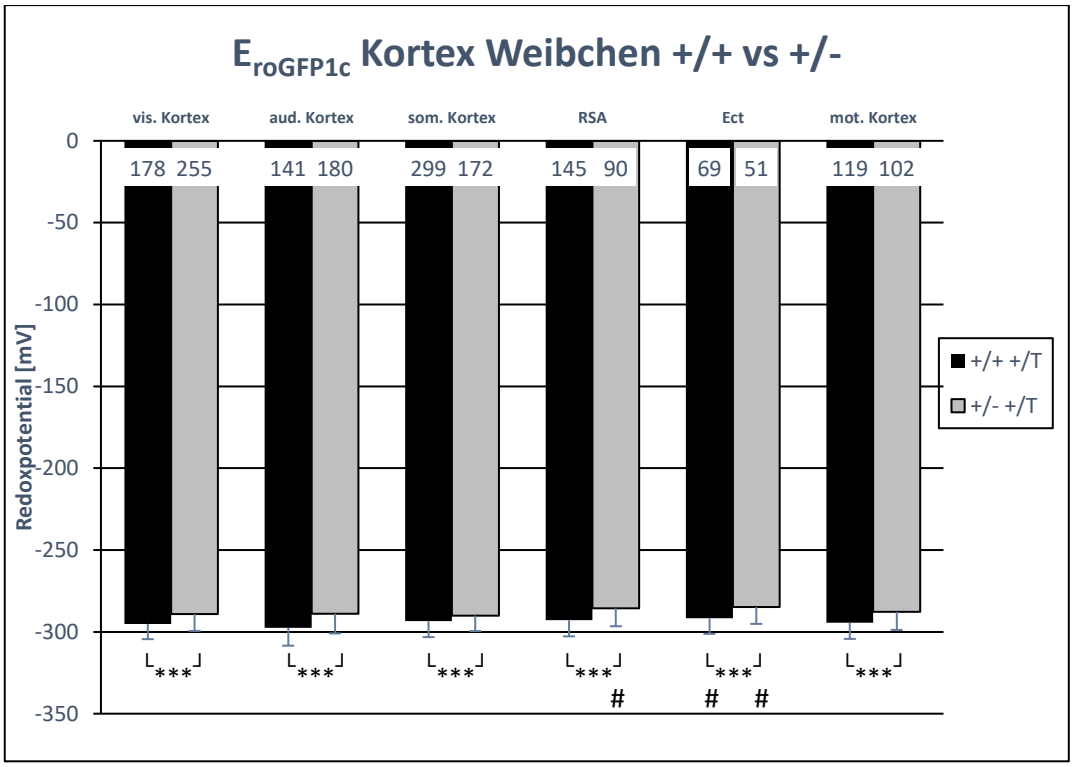


Abbildung 24: Redoxpotential [mV] der weiblichen Wildtypen und heterozygoten Mäuse im Kortex, p96-175.
Statistisch signifikante Unterschiede der Hirnareale untereinander sind durch die Sternchen und Rauten markiert (Genotyp-bedingte Unterschiede nach T-Test: * $p < 0{,}05$, ** $p < 0{,}01$, *** $p < 0{,}001$; Regionsspezifische Unterschiede durch Rangsummentest nach Kruskal-Wallis gefolgt vom multiplen Vergleich mittels Dunn's posthoc Test gegen den Referenzwert des visuellen Kortex: #).

3.3 Relative Oxidationslevel im Altersvergleich

Weiterführend muss auch die zeitliche Entwicklung der zellulären Redoxbalance in den einzelnen Untergruppen im Rahmen der Reifung/Alterung berücksichtigt werden. So ist sowohl bei den Wildtyp Männchen (Abbildung 25) als auch bei den Wildtyp Weibchen (Abbildung 26) klar zu beobachten, dass die relative Oxidationsstufe bei jüngeren Tieren in nahezu allen Hirnarealen höher ist als in den älteren Tieren.

Konkret sind somit mit Ausnahme von CA1, Gyrus Dentatus und Ect, die näherungsweise demselben Trend folgen, die relativen Oxidationsstufen der Areale bei jungen Männchen signifikant ($p<0{,}05$) höher als bei alten Männchen. Die Varianzanalyse wurde hier bei allen Arealen eines Genotyps gegen das Referenzareal CA1 durchgeführt. Es zeigt sich bei beiden Genotypen das gleiche Bild. Nur im Subiculum finden sich keine signifikanten Unterschiede (Abb. 25).

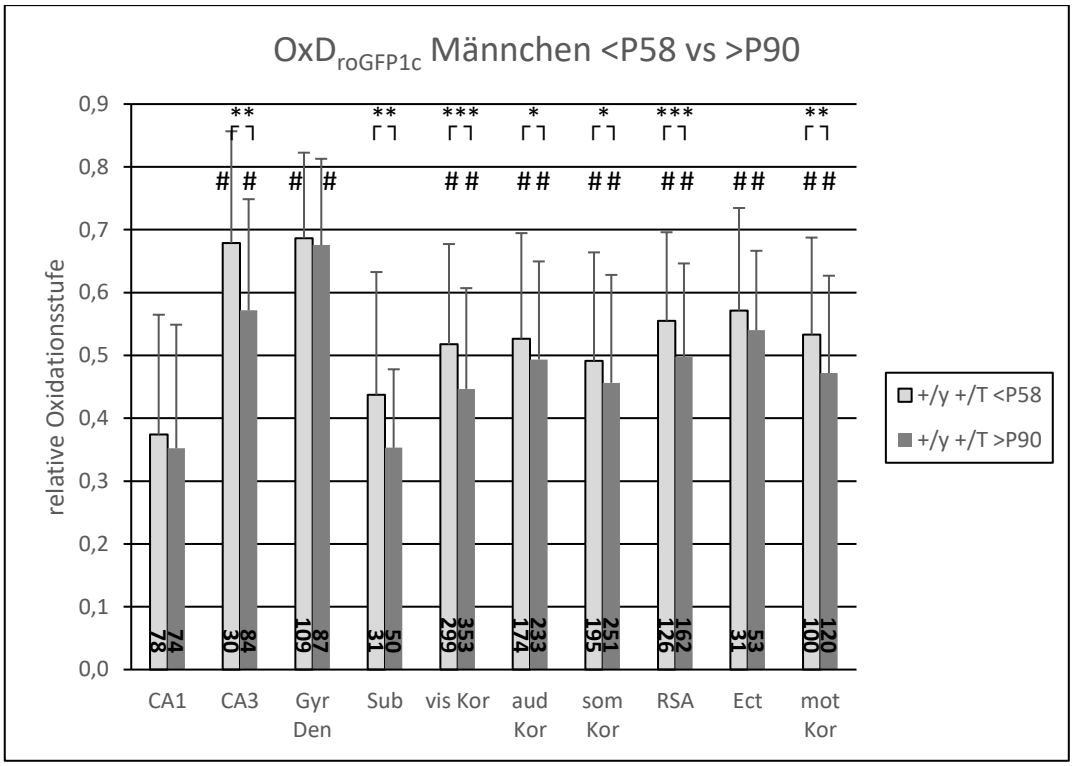


Abbildung 25: Relative Oxidationsstufen der männlichen Wildtypen p51-60 versus p96-175.
Statistisch signifikante Unterschiede der Hirnareale untereinander sind durch die Sternchen und Rauten markiert (Altersbedingte Unterschiede nach T-Test: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; Regionsbedingte Unterschiede durch Rangsummentest nach Kruskal-Wallis gefolgt vom multiplen Vergleich mittels Dunn's posthoc Test gegen den Referenzwert von CA1: #). (Areale: CA1, CA3, Gyrus Dentatus, Subiculum, visueller Kortex, auditorischer Kortex, somatosensorischer Kortex, RSA, Ect, motorischer Kortex).

In den weiblichen Wildtyptieren sind mit Ausnahme von CA3, das näherungsweise demselben Trend folgt, die relativen Oxidationsstufen der Hirnareale bei jungen Weibchen signifikant ($p<0,05$) höher als bei älteren Weibchen (Abb. 26). Für die Varianzanalyse gilt hier, dass gegen CA1 als Referenz alle Areale Genotyp übergreifend signifikante Unterschiede aufweisen.

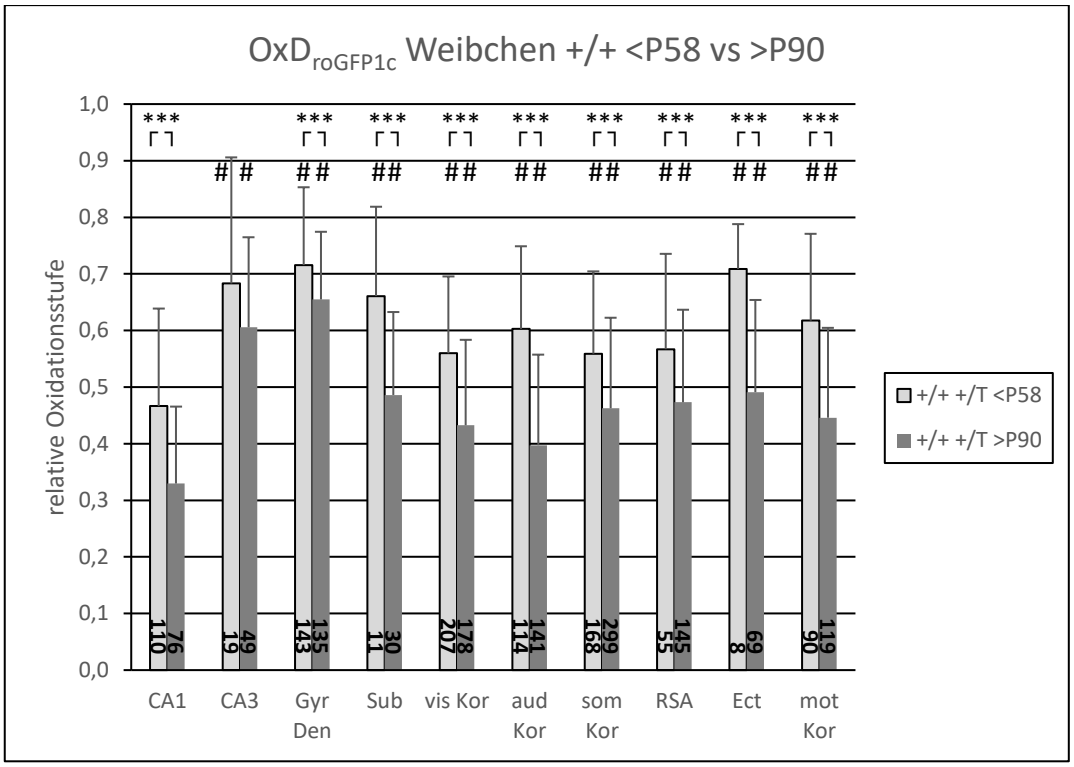


Abbildung 26: Relative Oxidationsstufen der weiblichen Wildtypen p51-60 versus p96-175.
Statistisch signifikante Unterschiede der Hirnareale untereinander sind durch die Sternchen und Rauten markiert (Altersbedingte Unterschiede nach T-Test: * $p < 0{,}05$, ** $p < 0{,}01$, *** $p < 0{,}001$; Regionsbedingte Unterschiede durch Rangsummentest nach Kruskal-Wallis gefolgt vom multiplen Vergleich mittels Dunn's posthoc Test gegen den Referenzwert von CA1: #). (Areale: CA1, CA3, Gyrus Dentatus, Subiculum, visueller Kortex, auditorischer Kortex, somatosensorischer Kortex, RSA, Ect, motorischer Kortex).

Interessanterweise ist dieser Trend zu weniger oxidierten Redoxbedingungen mit steigendem Alter bei heterozygoten Mecp2+/- Weibchen nicht zu beobachten. Hier sind die Werte sehr konstant, wobei einerseits die jüngeren Tiere in CA1, Subiculum und dem visuellen Kortex stärkere Oxidationsstufen aufweisen und andererseits die älteren in den anderen Arealen stärker oxidierte Verhältnisse zeigen. Signifikante Unterschiede ($p<0{,}05$) zwischen den korrespondierenden Altersgruppen finden sich nur in den Arealen CA1, CA3 und dem Gyrus Dentatus, wobei CA3 mit sehr viel stärkerem Unterschied zwischen den Altersgruppen hervorsticht. Die Varianzanalyse zeigt wie bei den weiblichen Wildtypen in allen Arealen beider Genotypen signifikante Unterschiede gegen CA1.

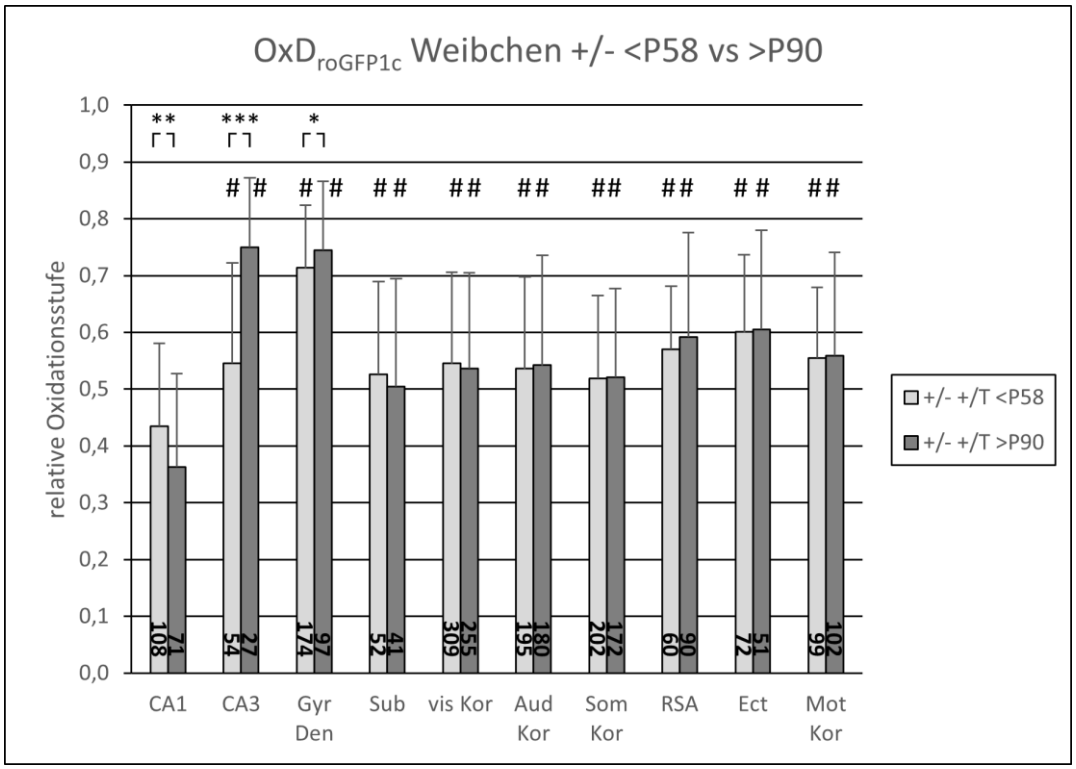


Abbildung 27: Relative Oxidationsstufen der heterozygoten Weibchen p51-60 versus p96-175. Statistisch signifikante Unterschiede der Hirnareale untereinander sind durch die Sternchen und Rauten markiert (Altersbedingte Unterschiede nach T-Test: * $p < 0{,}05$, ** $p < 0{,}01$, *** $p < 0{,}001$; Regionsbedingte Unterschiede durch Rangsummentest nach Kruskal-Wallis gefolgt vom multiplen Vergleich mittels Dunn's posthoc Test gegen den Referenzwert von CA1: #). (Areale: CA1, CA3, Gyrus Dentatus, Subiculum, visueller Kortex, auditorischer Kortex, somatosensorischer Kortex, RSA, Ect, motorischer Kortex).

Eine Aussage in Bezug auf männliche Knockoutmäuse im Alter jenseits von p58 ist mit Hinblick auf ihre kurze Lebenserwartung nicht möglich.

3.4 Alternative Methoden

Es wurden mehrere, technische Ansätze verfolgt, um verwertbare Ergebnisse und eine Quantifizierung der Redoxbalance erzielen zu können. So wurden die Hirnschnitte in verschiedenen Schichtdicken mit unterschiedlichen Behandlungen bzw. Messmethoden untersucht. Einige Vorgehensweisen führten nicht zum Ziel. Diese werden im Folgenden beschrieben.

Untersucht wurden z. B. 45 µm Kryoschnitte. Hier wurde das Areal CA1 identifiziert und anschließend je ein Bild mit der Wellenlänge 385 nm und 470 nm aufgezeichnet. Die

Auswertung dieser Bilder erfolgte analog zur Auswertung der akuten 400 µm Schnitte mit dem Programm Metamorph. Allerdings waren die Ergebnisse nicht wie erwartet. Aufgrund der Behandlung mit DA, DTT und NEM sollte ein großer Unterschied in den ratiometrischen Messwerten zu erkennen sein, der allerdings nicht in angemessener Weise zu sehen war. Im Besonderen schien DA nicht den gewünschten Effekt zu haben.

Aus diesem Grund wurde die Behandlung mit DA sowohl mit Konzentrationen von 1 mM, 5 mM und 10 mM durchgeführt. Alternativ wurde DA durch H_2O_2 ersetzt. Es zeigte sich, dass die ratiometrischen Redoxwerte bei DA 10 mM und H_2O_2 höher (stärker oxidiert) waren als bei 5 mM oder nur 1 mM. Allerdings nicht so hoch wie es sie sein sollten und nicht weit genug vom Ist-Redoxzustand (Behandlung mit NEM) entfernt. Zudem schien H_2O_2 die Schnitte anzugreifen. Die Überlegung war daher, dass der Ist-Zustand nicht korrekt festgehalten wurde und die mit NEM behandelten Schnitte vor der Fixierung weiter oxidiert waren.

Zur Vermeidung dieses Problems führten wir von da an alle Schritte von der Dekapitation an unter einer Argon-Schutzatmosphäre durch, um den Einfluss von Umgebungs-Sauerstoff zu eliminieren. Obwohl dies einen messbaren Effekt hatte, wichen die Redoxwerte immer noch zu stark von den Erwartungen ab. Dies deutete darauf hin, dass das Problem nicht bei der Präparation oder Behandlung des Gewebes lag. Also wurden Bilder der Hirnschnitte mit zwanzigfacher Vergrößerung mit dem 2-Photonen-Laser gemacht. Mit dieser Vergrößerung und der Möglichkeit durch verschiedene Ebenen der Schnitte zu zoomen, wurde sichtbar, dass in den 45 µm Kryoschnitten keine intakten Zellen mehr vorhanden waren. Vor diesem Hintergrund ergaben die zuvor erhaltenen Messwerte Sinn, da es kein geschlossenes Zellsystem gab, das noch einen physiologischen Redoxzustand hätte widerspiegeln können.

Allerdings hatte sich gezeigt, dass durch die Behandlungen dennoch Teile der untersuchten Areale oxidiert, bzw. reduziert werden können. Die Vermutung liegt nahe, dass es sich bei diesen Teilen um Zellorganellen handelt, die bei der Zerstörung der Zellen intakt geblieben sind oder es fragmentierte zelluläre Vesikel sind. Unterstützt wird diese Vermutung durch die Bilder des 2-Photonen-Lasers, auf denen genau dort kleine fluoreszierende Flecken erkennbar sind, wo die Zellen hätten sein sollen.

Die Frage war nun, wieso die Zellen nicht unversehrt waren. Entweder wurden sie beim Prozess des Einfrierens oder beim Auftauen zerstört. In der Konsequenz wurde das Protokoll dahingehend geändert, dass das Einfrieren schonender durchgeführt wurde. In flüssigem Stickstoff vorgekühltes Isopentan wurde in eine Schale gegeben, in der die Hemisphären für eine Minute vorgefroren wurden. Anschließend wurden sie zwei Minuten in Isopentan, das in flüssigem Stickstoff vollständig heruntergekühlt wurde, tiefgefroren. Trotz dieser Protokolländerungen zeigte sich jedoch im Nachhinein, dass die Zellen trotzdem zerstört waren.

Also wurde ein noch schonenderes Einfrieren ausprobiert. Zu diesem Zweck wurde Isopentan in einem 10 ml Becherglas in einem Trockeneis-Eis-Gemisch heruntergekühlt und die Hemisphären darin für drei Minuten gefroren. Auch dieses Vorgehen führte nicht zum Erfolg. Die Vorgehensweise mit tiefgefrorenen Gehirnen und 45 µm Schnitten am Kryotom wurde daher als nicht brauchbar verworfen.

Im Folgenden wurden Versuche mit 150 µm dicken, akuten Schnitten durchgeführt. Die Idee dahinter war, die Zellen bis zum Schritt der Fixierung am Leben zu erhalten. So wurden die Behandlungsschritte analog zu den 45 µm Schnitten durchgeführt. Der Unterschied lag darin, dass die jeweiligen Schnitte (als Ganzes) in Bäder gegeben wurden, in denen der jeweilige Wirkstoff (DA, DTT, NEM) in ACSF gelöst wurde. Die Kühlung der Schnitte erfolgte analog zum Behandlungsprotokoll für die Kryoschnitte.

Jedoch wurden alle Lösungen bis zur Fixierung mit NEM mit Carbogen begast. Ein anderer Ansatz war es, die Lösungen bis zur Fixierungslösung im Wasserbad auf 40°C zu erhitzen. Außerdem wurde auch hier DA in Konzentrationen von 1 mM, 5 mM und 10 mM verwendet. Wiederum waren die erhaltenen Auswertungs-Ergebnisse nicht aussagekräftig, so dass auch dieser Ansatz verworfen wurde.

Zielführend war damit also letztlich nur die Analyse auf Einzelzellebene an vitalen, akuten 400 µm dicken Hirnschnitten.

4 Diskussion

Im Vorfeld dieser Arbeit wurden verschiedenste Untersuchungen zum Rett-Syndrom durchgeführt. Mausmodelle wurden kreiert, Ursachenforschung betrieben und Therapieansätze formuliert. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde ein Redoxungleichgewicht im ZNS der Patienten als eine der wahrscheinlichen Ursachen der Krankheitssymptome identifiziert oder das dieses zumindest zu deren Entstehung beiträgt. Der Defekt im *Mecp2*-Gen führt zu einer gestörten Expression des MECP2-Proteins und damit zu mitochondrialen Fehlfunktionen sowie einer erhöhten ROS-Produktion.

4.1 Einfluss von ROS

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) spielen in vielen physiologischen Prozessen eine wichtige Rolle (Schieber und Chandel 2014). Sie modulieren die Funktion vieler Proteine und Enzyme. Als Beispiel sei H_2O_2 genannt, welches vor allem Thiol-Gruppen an Proteinen oxidiert und so ihre Konfiguration und Funktion verändern kann. Dem entgegen steht Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH) als Reduktionsmittel, das an denselben Thiol-Gruppen ansetzt. In den Zellen ist Glutathion (GSH/GSSG) ein wichtiges Redoxpuffer-System mit besagten Thiol-Gruppen, sodass eine Änderung in dessen Puffergleichgewicht die Redoxbalance widerspiegelt (Meyer et al. 2007). Der von uns verwendete Redoxindikator roGFP1c wird ebenfalls an Thiol-Gruppen reduziert/oxidiert, sodass man direkte Einsicht in das (sub)zelluläre Gleichgewicht bekommt (Hanson et al. 2004).

ROS können förderlich für die Gesundheit der Zellen sein, wenn sie diese in relativ geringen Mengen stimulieren und provozieren, was die Abwehr der Zellen verstärkt. Dieser Sachverhalt wird auch als Mitohormesis bezeichnet (Ristow 2014; Yun und Finkel 2014) und kann sogar die Lebensdauer von Zellen verlängern. So wurde z. B. bei einer leichten Entkopplung der Atmungskette mit resultierendem Protonenleck, entgegen den eigentlichen

Erwartungen, eine geringere oxidative Belastung festgestellt, was bei den untersuchten Zellen zu einer längeren Lebensdauer führte (Mishmar et al. 2003). Dabei wirken die ROS als Signalmoleküle und fördern im Nukleus die Expression von Proteinen, die Stress kompensieren und die Mitochondrien unterstützen. Außerdem wird angenommen, dass physiologisch erhöhte ROS in Reaktion zu einer verbesserten Immunantwort, Stammzellenerneuerung, Proliferation und Differenzierung der Zellen führen (Schieber und Chandel 2014).

Wenn dauerhafte Belastung mit ROS die Zellen dazu stimuliert, dass sie vermehrt Proteine transkribieren, die zum einen die Belastung reduzieren und zum anderen die Zellen resistenter gegen Stress und Angriffe machen, dann passt dies zu den Ergebnissen dieser Arbeit. Die jungen Wildtypmäuse zeigen höhere oxidierte zytosolische Redoxbedingungen als die Älteren. Letztere wurden möglicherweise durch lang andauernden Stimulus resistenter und die relative Oxidation der Zellen ist niedriger. Wenn dem so ist, dann könnte für eine normale kognitive Entwicklung eine Abnahme der relativen Oxidation notwendig sein. Die Rett-Mäuse beider Geschlechter zeigen in jungem Alter kaum Unterschiede zu den jeweiligen Wildtypen, da sich die Rett-Symptomatik erst auf Dauer durch die ausbleibende Anpassung an den oxidativen Stress einstellen könnte.

Die älteren heterozygoten Rett-Mäuse haben ähnlich hohe Oxidations-Level wie in der Jugend. Ursächlich könnte eine zu hohe ROS-Produktion sein, die zu Schäden an der Struktur von Proteinen und Enzymen führt. Diese müssten sich dann allerdings akkumulieren und entweder den Vorgang an sich verstärken oder aber den Krankheitsverlauf beschleunigen. Dies ist jedoch nicht nachzuweisen, bzw. ist die relative Oxidation im Alter bis p175 nicht höher, sondern stagnierend. Untersuchungen des Zusammenhangs zwischen ROS und dem normalen Prozess des Alterns haben gezeigt, dass ROS-bedingte Schäden 70% aller DNA-Stränge betreffen müssten, damit eine Veränderung der Gesamtfunktion eintritt (Fayet et al. 2002; Durham et al. 2005). Heteroplasmie und andauernde Reparaturvorgänge wirken dem beim Menschen jahrzehntelang entgegen. Ungerichtete Vervielfältigung und der reguläre Abbau von mitochondrialer DNA (auch beschädigter Stränge) können einen frühen Defekt beheben oder seine Wirkung signifikant verzögern (Khrapko 2011).

Dies führt zu einem anderen Erklärungsansatz, in dem ROS, die bekannterweise in die Signaltransduktion eingebunden sind, zu einer Zellantwort führen, die wiederum die Zell-Funktion stört, ohne durch Oxidation Proteine zu zerstören oder zumindest deren Dysregulation/Dysfunktion zu provozieren. Diese Prozesse finden ohnehin auch dauerhaft im physiologischen Milieu statt. In der Konsequenz könnte die Kombination beider Probleme zu einer Überforderung und letztlich pathologischen Antwort der Zellen führen. Zu Anfang der Krankheit ist die zytosolische Belastung durch ROS (relative Oxidation) normal und der Organismus entwickelt sich ebenfalls normal. An dem Punkt in der Entwicklung, an dem die Zellen eine Reduktion erwarten würden entweder durch verringerte ROS-Produktion oder durch bessere zellendogene Pufferung, gibt die dauerhaft erhöhte, relative Oxidation falsche Signale für die Entwicklung. Diese verzögert sich nun und ein Plateau stellt sich ein. Weil der Gendefekt sehr unterschiedlich ausgeprägt sein kann, finden eventuell zeitweilig Kompensationen der erhöhten Oxidation statt. Das erlaubt dann zumindest phasenweise eine weitere Entwicklung. Allerdings sind auch längere Stagnation und beschleunigte Verschlechterung des Zustandes möglich.

Wie zuvor erwähnt, kommt es beim Rett-Syndrom zu einem zytosolischen Redoxungleichgewicht. Das Ziel dieser Arbeit war es die verschiedenen Areale des Hippokampus und des Kortex auf ihren Redoxstatus zu untersuchen. Dafür musste eine Quantifizierung der Redoxbaseline unter Ruhebedingungen von Wildtypmäusen und *Mecp2*-Knockoutmäusen bzw. heterozygoten Mäusen in unterschiedlichen Altersgruppen und nach Geschlechtern getrennt vorgenommen werden. Zuerst wurden sagittale 45 µm Kryoschnitte des Hippokampus angefertigt, um an diesen mit fünffacher Vergrößerung verschiedene Hippokampus- und Kortexareale zu untersuchen.

4.2 Verfahren und Analyse

In Versuchen anderer Arbeitsgruppen wurden bereits Hirnareale mittels eines Kryo-Verfahrens auf Redoxveränderungen untersucht. Als Biosensor wurde „mito-Grx1-roGFP2“ verwendet und der aktuell vorliegende zelluläre Redoxstatus wurde nach dem Einfrieren mit NEM und PFA konserviert. Das Gewebe wurde bei -80°C schockgefroren

und zum Gewinnen der Kryoschnitte wieder auf -20°C erwärmt. Das Forschungsteam hat mit ihrem Protokoll verwertbare Ergebnisse erzielen können (Fujikawa et al. 2016).

Trotz mehrfacher Anpassung unseres Protokolls, war es uns nicht möglich mit unserem zytosolischen roGFP1 Redox Sensor brauchbare Resultate mit dieser Technik zu erzielen. Bei Betrachtung der Schnitte unter dem 2-Photonen-Mikroskop wurde ersichtlich, dass die Zellen nicht intakt gehalten werden konnten. Die Zellwände waren entweder beim Einfrieren oder beim Auftauen/Behandeln geplatzt. Das roGFP1c aus dem Zytosol war überall im Gewebe verteilt bzw. ging verloren, weil es bei Behandlung der Schnitte ausgespült wurde und konnte die Vorgänge im Inneren der Zellen nicht mehr widerspiegeln. Aus diesem Grund wurde dieser Ansatz nicht weiter verfolgt. Stattdessen mussten zwangsläufig intakte, lebende Zellen untersucht werden. Der Lösungsansatz bestand in akuten Hirnschnitten von 150 µm bzw. 400 µm Schichtdicke, wobei sich 150 µm Schnitte als zu dünn herausstellten. Erst die 400 µm dicken Schnitte führten zum Ziel. Im Folgenden werden die damit gewonnenen Ergebnisse diskutiert.

Es wurden die Redoxmodulatoren DTT und H_2O_2 für die Kalibrierung verwendet, um den Antwortbereich von maximal oxidiert zu maximal reduziert der roGFP exprimierenden Zellen zu erhalten. Bei den Messungen zur Redoxbaseline wurde hingegen darauf geachtet, jeden unnatürlichen Einfluss auf den Redoxstatus der Zellen zu vermeiden. Die Mäuse wurden vor der Präparation eine Stunde lang in abgedunkelten Käfigen im Labor gehalten und dann zügig durch entsprechend autorisierte Mitarbeiter betäubt und präpariert, um Stress und dessen Einfluss auf den Redoxstatus zu vermeiden. Alle folgenden Schritte wurden so schnell, schonend und sorgfältig wie möglich durchgeführt. So wurden die Schnitte nach der Präparation mit dem Vibratom eine Stunde in erwärmten, mit Carbogen begastem ACSF ruhen gelassen, damit sie sich vom Präparationstrauma erholen konnten. Das roGFP1c als Redoxsensor in den Zellen wurde anschließend mit dem 2-Photonen-Mikroskope angeregt und es wurden Bilder der physiologischen Redoxbaseline der Wildtypzellen bzw. von den pathophysiologischen Redoxzuständen der *Mecp2*$^{-/y}$-Mäuse sowie der *Mecp2*$^{-/+}$-Mäuse, aufgenommen.

Basierend auf früheren Ergebnissen und dem Phänotyp der männlichen Knockoutmäuse war zu erwarten, dass die Zellen der Knockoutmäuse oxidierter sind als die der männlichen

Wildtypen (Großer et al. 2012). Dies ist jedoch nicht grundsätzlich der Fall. Bei den Tieren, deren Alter zwischen p51 und p60 liegt, ist es tendenziell eher umgekehrt. Die Wildtypen sind hier stärker oxidiert. Ausnahmen bilden nur der Gyrus Dentatus des Hippokampus und der motorische Kortex, bei denen die Zellen der Knockoutmäuse höher oxidiert sind. In den Versuchen von Großer und Kollegen (Großer et al. 2012) wurden allerdings keine spezifischen Hirnareale in unterschiedlichen Altersstrukturen untersucht, sondern primäre Zellkulturen von hippokampalen Neuronen neonataler Mäuse, sodass keine direkte Vergleichbarkeit vorliegt.

4.3 Einordnung der Ergebnisse in den Kontext des Rett-Syndroms

Vergleicht man nun mittels 2-seitigem, ungepaartem T-Test die männlichen Wildtypen bezogen auf ihr Alter, so ist festzustellen, dass bei den jungen Wildtypen die Zellen in allen korrespondierenden Arealen signifikant höher oxidiert sind als es bei den älteren der Fall ist. Nur in den Arealen CA1, Gyrus Dentatus und Ect zeigt sich lediglich ein Trend, während die anderen Areale mindestens signifikante Unterschiede zeigen. Daraus lässt sich folgern, dass die Zellen der jüngeren Tiere einem größeren oxidativen Stress ausgeliefert sind, als die älteren Tiere bzw. diese Stress besser abpuffern können. Das in den Arealen CA1, Gyrus Dentatus und Ect keine signifikanten Unterschiede bestehen, könnte bedeuten, dass diese grundsätzlich stärkere Aktivität aufweisen und daher dauerhaft unter erhöhtem oxidativem Stress stehen. Weiterführend wäre es interessant zu untersuchen, ob diese Areale und der motorische Kortex mitverantwortlich für den Phänotyp der Erkrankung sind.

Das gleiche Resultat zeigt sich im Vergleich weiblicher Wildtypen p51-60 und p96-175, wobei hier in allen Arealen, außer CA3, höchst signifikante Unterschiede bestehen. Dies unterstützt die vorher aufgestellte Theorie, dass im mittleren Alter die relative Oxidation der Neurone geringer ist und damit weniger oxidativer Stress auf die Neurone wirkt. Bei den Weibchen zeigt der Vergleich Wildtyp zu heterozygoten Tieren sowohl bei den jüngeren als auch bei den älteren analoge Ergebnisse zu den männlichen Mäusen. Der Unterschied besteht darin, dass die heterozygoten Mäuse älter als 90 Tage werden und mit den älteren Wildtypen verglichen werden können. Hier zeigt sich, wie zuvor erwähnt, dass die Neurone der heterozygoten Mäuse höher oxidiert sind als die der Wildtypen. Was man aufgrund der

Altersstruktur bei Männchen allerdings nicht sehen kann, ist, dass die heterozygoten Tiere jung und alt ähnliche, relative Oxidationsstufen aufweisen. Der sich im Alter entwickelnde Unterschied zwischen Wildtypen und kranken Tieren liegt also wahrscheinlich nicht an einer tatsächlichen weiteren Erhöhung der relativen Oxidation der heterozygoten bzw. Knockoutmäuse, sondern eher an deren Unfähigkeit, den oxidativen Stress zu puffern oder zu kompensieren. Die kranken Tiere scheinen, im Verlauf ihres Lebens einem immer gleich hohen Maß an oxidativem Stress ausgesetzt zu sein.

Übertragen auf den Verlauf der Krankheit beim Menschen, bei dem zu Anfang eine normale Entwicklung der Patienten beobachtet werden kann, könnte diese dauerhafte Belastung durch oxidativen Stress ursächlich für die später einsetzende Entwicklungsstörung sein. Zu Beginn kann der Organismus mit dem starken Stress umgehen und weitestgehend normal agieren. Diese Fähigkeit scheint jedoch zeitlich begrenzt zu sein. Dieser Trend ist zwar nicht in jeder Gruppe, in jedem Areal im direkten Vergleich zu erkennen, gruppenübergreifend aber offensichtlich. Dies deckt sich mit Thesen, die besagen, dass es wahrscheinlicher ist, dass die Stabilität der Hirnfunktionen beim Rett-Syndrom beeinträchtigt ist und nicht die Entwicklung der Gehirnstruktur. Mensch und Maus haben beide sehr unterschiedliche Entwicklungszyklen, die auch ein zeitlich stark versetztes Einsetzen der Symptome bedingen sollten. Da es bei den Symptomen allerdings zu einer vergleichbaren Verzögerung kommt, kann man eher auf Probleme bei der Aufrechterhaltung der Funktion des Gehirns schließen (Guy et al. 2011).

Nun müssen die einzelnen Areale und ihre Beteiligung bzw. Bedeutung für den Krankheitsverlauf beurteilt werden. Als erstes kann festgehalten werden, dass in den Bereichen des Hippokampus größere Unterschiede zwischen den vier untersuchten Arealen vorliegen und die sechs Areale im Kortex eher auf einem ähnlichen Level liegen. Dabei werden jeweils nur die einzelnen Untergruppen (z. B. +/y, +/T, <P58) mit ihren je zehn Arealen verglichen. Hier fällt der Bereich CA1 auf, der meist eine relative Oxidationsstufe unter 40% aufweist (nur bei jungen Weibchen knapp über 40%) und damit am wenigsten von allen Arealen oxidiert ist. Dies kann verschiedene Gründe haben. Zum einen besteht die Möglichkeit, dass hier eine besonders gute Pufferung für ROS und RNS vorliegt, sodass wenig oxidativer Stress auftreten kann. Andererseits könnte dieses Ergebnis auch unabhängig von physiologischen Vorgängen sein. Im Areal CA1 wird roGFP1c am stärksten exprimiert, was auch in den Rohbildern sehr gut zu sehen war, da die Zellen sehr

kontrastreich und gut zu erkennen waren. Damit einher gingen besonders niedrige ratiometrische Werte in der Auswertung. Umgekehrt gilt für die Areale CA3 und Gyrus Dentatus, dass hier eine vergleichsweise schlechte Expression von roGFP1c vorliegt. Analog waren die Zellen in den Rohbildern dieser Areale eher hell, unscharf, mit weniger Kontrast. Hier lagen eher hohe (relative Oxidationsstufe von ca. 60%-70%) ratiometrische Werte vor. Diese beiden Areale sind untergruppen-übergreifend die mit den höchsten Werten. Daraus ergibt sich die Frage ob die roGFP Expression einen Einfluss auf die ratiometrischen Werte ausüben könnte und ob CA1 und CA3 sowie der Gyrus Dentatus physiologisch nicht so weit auseinander liegen, wie es scheint. Damit kann aber nicht sicher ausgeschlossen werden, dass CA3 oder der Gyrus Dentatus größerem oxidativen Stress ausgesetzt sind. Welche der beiden Ansätze zutreffen, müsste weiterführend untersucht werden. Den Vergleich der Untergruppen untereinander beeinflusst die unterschiedliche Expression von roGFP1c aber nicht, da immer nur die jeweiligen Areale untereinander verglichen werden. Für die Interpretation der Varianzanalyse darf diese Möglichkeit allerdings nicht unberücksichtigt gelassen werden. Im Kortex schwankt die relative Oxidationsstufe grob um 50%, je nachdem welche Untergruppe betrachtet wird. Allerdings kann kein Areal benannt werden, welches besonders hoch oder niedrig im Vergleich zu den anderen wäre. Die relativ niedrigste Oxidation weist allerdings der visuelle Kortex auf.

Wagener und Kollegen haben im Vorfeld unserer Versuche bereits einige Hirnschnitte in Bezug auf ihre relative Oxidation untersucht. Es lassen sich größere Abweichungen zwischen einzelnen Hirnarealen feststellen. So ermittelten sie, dass bei Wildtypen (roGFP1c positiv) im Areal CA1 eine relative Oxidation von 25,7% ± 3,8% (n=49) vorliegt (Wagener et al. 2016). Im Vergleich dazu hatten wir bei jungen Wildtypen einen Wert von 37,4% ± 19% (n=78) und bei alten Wildtypen einen Wert von 35% ± 20% (n=74) festgestellt. Ähnliche Unterschiede ergaben sich für den Gyrus Dentatus, CA3 und den Kortex (von Wagener et al. undifferenziert betrachtet). Eine Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse könnte die Aufnahmetechnik der Bilder und die Auswahl der Regionen von Interesse (ROI) sein. Die von ihnen aufgenommenen Bilder waren mit CCD-Kamera in geringer Vergrößerung aufgenommen worden. Damit wurden in der Auswertung keine einzelnen Zellen bewertet, sondern teils ganze Gewebe-Areale mit vielen verschiedenen Zellen und deren Zwischenräumen. Hingegen waren unsere Bilder mit dem 2-Photonenmikroskop erstellt worden und einzelne Zellsomata wurden bewertet. Das Messareal lag nicht im Bereich der

Dendriten, dem Interzellularraum oder anderer Gewebe. Nur die Oxidationslevel des Zytosols von Nervenzellen wurden erhoben.

Kommen wir nun zu der Einordung einzelner Hirn-Areale in den Kontext der Erkrankung. Aus den Unterschieden, auch auf das Alter bezogen, kann gezielt nach lokalen Ursachen für den Krankheitsverlauf gesucht werden. Es wurde bereits festgestellt, dass im Rett-Syndrom keine Neurodegeneration vorliegt (Armstrong et al. 1995) und dass trotz mitochondrialer Fehlfunktionen die Atmungskette und ATP-Produktion im Großen und Ganzen intakt sind (Can et al. 2019). Bedingt durch den Gendefekt sind allerdings in den meisten Komponenten Fehlfunktionen zu finden, die letztlich zu einer erhöhten mitochondrialen Respiration (Kriaucionis et al. 2006; Großer et al. 2012), erhöhtem O_2-Verbrauch und verringerter ATP-Produktion führen (Jin et al. 2015). All dies führt zu einer erhöhten oxidativen Belastung im Zytosol (De Filippis et al. 2015; Valenti et al. 2017; Can et al. 2019) und trägt somit potenziell zur Schadenskaskade bei, die zur gestörten Entwicklung und zum Fortschreiten der Krankheit führt. Diese Vorgänge sind nicht nur im Rett-Syndrom relevant. Oxidativer Schaden in Nervenzellen führt im Alter zu verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen. Beispielsweise führt ein Redoxungleichgewicht im muskarinisch-cholinergen System des Hippokampus und Striatum zu einer verringerten Anzahl von Membranrezeptoren, die eine weniger effiziente Signaltransduktion bedingt und damit zu kognitiven und motorischen Einschränkungen führt (Joseph und Roth 1992a; 1992b). Dementsprechend kann auch die Forschung zu Alzheimer, Parkinson und ähnlichen Erkrankungen von unseren Ergebnissen profitieren.

Für zukünftige Untersuchungen wäre in diesem Zusammenhang vor allem der motorische Kortex und der Gyrus Dentatus interessant. Hier war im Vergleich der Genotypen eine höhere zytosolische Oxidation der Zellen von männlichen Rett-Mäusen zu beobachten. CA3, visueller Kortex und RSA zeigen zwar auch signifikante Unterschiede, diese sind aber mit höherer Oxidation der Wildtypen in diesen Arealen verbunden. Im Hippokampus ist CA3 ist ebenso interessant, da sich bei *Mecp2*$^{-/+}$ und *Mecp2*$^{-/y}$-Mäusen das Verhältnis genau umgekehrt darstellt. Hier sind die jungen Wildtypen signifikant stärker oxidiert. Dasselbe gilt für das Areal Subiculum, wobei dort bei Männchen kein signifikanter Unterschied erkennbar ist. Im Alter dreht sich der Unterschied bei CA3 ins Gegenteil und die Neuronen bei heterozygoten Mäusen sind signifikant stärker oxidiert. Im Kortex ist dieser Trend bei weiblichen Tieren generell zu finden. Eine extreme Wandlung davon, dass der junge,

weibliche Wildtyp signifikant stärker oxidiert ist als junge, heterozygote Mäuse, zu signifikant stärker oxidierten älteren, heterozygoten Mäusen findet sich in den Arealen auditorischer Kortex, somatosensorischer Kortex, Ect und motorischer Kortex. Die sonstigen Areale halten sich im Rahmen des zuvor beschriebenen unauffällig. Zumindest in dem Sinne, dass z. B. im Vergleich junger Wildtyp-Weibchen zu alten zwar signifikante Unterschiede festzustellen sind, aber diese in allen Arealen gleichmäßig.

Für multiple Vergleiche, z. B. der verschiedenen Hirnregionen untereinander, kam eine Varianzanalyse zum Einsatz. Im Hippokampus wiesen praktisch alle Areale, aller Untergruppen im Vergleich signifikante Unterschiede zu CA1 auf. Die einzige Ausnahme stellte bei jungen und alten, männlichen Wildtypmäusen und Knockoutmäusen das Areal Subiculum dar. Dies könnte bedeuten, dass hier der Gendefekt weniger Einfluss hat. Im Kortex ist interessant, dass bei Vergleich der Areale bei Knockoutmäusen nur der motorische Kortex einen signifikanten Unterschied aufweist. Dies könnte die vorher aufgestellte Theorie, dass der motorische Kortex besonders betroffen ist, stützen. Bei alten, männlichen und jungen sowie alten weiblichen Wildtypen weist jeweils Ect einen signifikanten Unterschied auf, sodass auch dieses Areal weiterer Untersuchung bedarf. Vereinzelt zeigen andere Kortex Areale signifikante Unterschiede zur Referenz, die allerdings keinen größeren Zusammenhang vermuten lassen. Dies wären der auditorische Kortex (p51-60, *Mecp2*$^{+/+}$ und p96-175, *Mecp2*$^{+/y}$), RSA (p96-175, *Mecp2*$^{+/y}$ und p96-175, *Mecp2*$^{+/-}$) und motorischer Kortex (p51-60, *Mecp2*$^{+/+}$). Vergleicht man alle Areale der jeweiligen Untergruppen gegen CA1, so ergibt dies in jedem Areal einen signifikanten Unterschied. Nur im Subiculum der jungen Wildtyp- und Knockoutmäuse findet sich kein signifikanter Unterschied, wie bereits im Vergleich des Hippokampus allein beschrieben. Ursächlich ist das vergleichsweise niedrige relative Oxidationslevel in CA1. An dieser Stelle muss erneut auf die unterschiedliche Exprimierung von roGFP1c in den verschiedenen Arealen hingewiesen werden, die Einfluss auf das berechnete Oxidationslevel haben könnte und Vergleiche verschiedener Areale ungenau werden lassen könnte. In der Folge wäre es wünschenswert die Exprimierung von roGFP1c im Mausmodell gleichmäßiger gestalten zu können, sodass auch Vergleiche unterschiedlicher Areale präziser würden. Im besten Fall führt eine genaue Lokalisierung des meistgestressten Bereichs zu einer gezielten Therapie, die nur dort ansetzt, wo auch Therapie nötig ist. Dies erhöht die Erfolgsaussichten und sollte mögliche Nebenwirkungen reduzieren.

4.4 Resümee

Es lässt sich abschließend festhalten, dass die angewendete Methodik vielversprechende Ergebnisse geliefert hat. Es lassen sich präzise und reproduzierbare Messungen des Redoxzustands des Zytosols einzelner Neurone in akuten, intakten Gewebeschnitten durchführen. Bei der Redoxkartierung wurde der Fokus auf bestimmte Hirnareale und Altersgruppen gelegt. In künftigen Untersuchungen können andere Bereiche und weiter differenzierte Altersstrukturen im Fokus liegen, um einen umfassenderen Einblick in die Entwicklung und den Krankheitsverlauf des Rett-Syndroms zu erhalten. Aus unseren Erfahrungen können zudem eventuelle Verbesserungen im Versuchsaufbau resultieren. So wäre es wünschenswert Laser zu benutzen, die noch präziser eingestellt werden können und konstant mit immer gleicher Leistung, Fokus und Intensität arbeiten. Auch ein Mausmodell mit breiter gefächerter gleich-intensiver Exprimierung von roGFP1c wäre bei künftigen Vergleichen hilfreich. Die Kontrollaufnahmen mit den fluoreszierenden Beads haben gezeigt, dass die Laser-Stabilität ein Schwachpunkt in unserem Versuchsaufbau gewesen sein könnte. Wegen Unregelmäßigkeiten in der Auswertung einiger dieser „Beads-Bilder“ mussten die Ergebnisse einiger Mäuse verworfen werden. Basierend auf unseren Ergebnissen wären im Folgenden besonders der motorische Kortex und die Areale des Hippokampus als Ziele weiterer Forschung attraktiv. Hier waren die größten Auffälligkeiten und Abweichungen zwischen Wildtyp und Rett-Mäusen festzustellen. Unsere Ergebnisse lassen sich so interpretieren, dass die Erkrankung nicht primär durch Zellschädigung - bedingt durch ROS - verursacht wird, sondern dass die ROS über veränderte Signaltransduktion und in der Konsequenz gestörte Zellkommunikation zur Symptomatik und zum weiteren Krankheitsverlauf beitragen. Hier wäre eine weiterführende Untersuchung der betroffenen Signalwege und der beteiligten molekularen Angriffspunkte sinnvoll. Eine genaue Kenntnis der beteiligten (sub)zellulären Targets und Areale im Zeitverlauf sollte uns einer gezielten Therapie näherbringen, die genau dort ansetzt, wo und wann sie gebraucht wird und dabei mögliche Nebenwirkungen reduzieren.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Diese Arbeit zielt darauf ab, den Redoxstatus der Nervenzellen im Gehirn, in verschiedenen Altersstufen, Geschlechtern und im Rett-Syndrom zu kartieren. Dafür wurden vergleichend *Mecp2*-Knockout-Mäuse und Wildtypen verwendet. Beide waren außerdem für roGFP1c transgen. Das roGFP besitzt zwei Absorbtionsmaxima, die ratiometrische Messungen ermöglichen. Außerdem ist die Oxidation/Reduktion dieses Sensors reversibel, sodass dynamische Veränderungen erfasst werden können. So konnten mit einem 2-Photonen-Mikroskop ratiometrische Bilder lebender Gewebe erstellt werden. Das ROS-Gleichgewicht hat erwiesenermaßen Einfluss auf den Krankheitsverlauf des Rett-Syndroms, und nun ist es uns möglich, die Veränderungen dieses Gleichgewichts im Verlauf zu dokumentieren.

So wurde ersichtlich, dass junge Wildtypmäuse beider Geschlechter ein stärker oxidiertes Zytosol in Nervenzellen aufweisen als alte Mäuse. Ältere heterozygote Tiere und KO-Mäuse hatten im Vergleich zu ihren gleichalten Wildtypen zwar stärker oxidierte Neurone, aber nicht stärker oxidiert als junge Wildtypen. Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass die Erkrankung nicht auf Zellschäden durch exzessive ROS-Bildung zurückzuführen ist, da in diesem Fall ein progressiver Verlauf und eine beständige Zunahme der relativen Oxidation zu finden sein müsste. Wahrscheinlicher ist, dass durch die beständig gleichbleibend hohe oxidative Belastung mit ROS die Signaltransduktion gestört ist. In der Konsequenz sind die Zellkommunikation und regelgerechte Entwicklung gestört. Dies passt zu dem Phänotyp der Erkrankung, bei der zu Beginn eine normale Entwicklung zu beobachten ist und entsprechend bei jungen Wildtypen und KOs sehr ähnliche Oxidationslevel festzustellen sind. Die anschließende Entwicklungsstörung mit jahrelanger Plateauphase passt zu der anhaltenden hohen relativen Oxidation des Zytosols. Einzelne Areale, wie der motorische Kortex, Gyrus Dentatus und CA3, zeigen bei den Rett-Mäusen signifikantere Unterschiede als andere Areale, was dafür spricht, dass die vorliegenden Redoxentgleisungen auch durchaus Hirnareal-spezifische Ausprägung haben. Hier kann in weiterführenden Forschungen angesetzt werden. Es wäre interessant zu erforschen, welche biochemischen und physiologischen Vorgänge im Detail für diese Abweichungen verantwortlich sind.

Weiterführend können bisher unbeachtete Areale in die Analysen einfließen, um sie sowohl im Zusammenhang mit dem Rett-Syndrom als auch mit anderen neurodegenerativen Erkrankungen betrachten zu können. Die 2-Photonen-Mikroskopie im Zusammenspiel mit zytosolisch exprimiertem roGFP und akuten Hirnschnitten bieten perspektivisch ein erhebliches Potenzial. Die exakte Lokalisation der am stärksten betroffenen Hirnareale und Neurone kann zu neuen Behandlungsansätzen führen und eventuelle Nebenwirkungen reduzieren, da gezieltere therapeutische Ansätze angewendet werden können. Die zeitliche Komponente dürfte in diesem Zusammenhang ebenfalls essentiell sein. Es sollte weder zu früh noch zu spät in das Redoxgleichgewicht eingegriffen werden. Dementsprechend sind wahrscheinlich noch enger gefasste Altersgruppen zu betrachten, die sich vor allem auch bis ins hohe Alter der Mäuse erstrecken sollten.

6 Literaturverzeichnis

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

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

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

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

Can K, Menzfeld C, Rinne L, Rehling P, Kügler S, Golubiani G, Dudek J, Müller M (2019): Neuronal redox-imbalance in Rett Syndrome affects mitochondria as well as cytosol, and is accompanied by intensified mitochondrial O_2 consumption and ROS release. Front Physiol 10, 479

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

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

Clarke A, Gardner-Medwin D, Richardson J, McGann A, Bonham JR, Carpenter KH, Bhattacharya S, Haggerty D, Fleetwood JA, Aynsley-Green A (1990): Abnormalities of carbohydrate metabolism and of OCT gene function in the Rett syndrome. Brain Dev 12, 119-124

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

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

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

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

Denk W, Delaney KR, Gelperin A, Kleinfeld D, Strowbridge BW, Tank DW, Yuste R (1994): Anatomical and functional imaging of neurons using 2-photon laser scanning microscopy. J Neurosci Methods 54, 151-162

Diaspro A, Bianchini P, Vicidomini G, Faretta M, Ramoino P, Usai C (2006): Multi-photon excitation microscopy. Biomed Eng Online 5, 36

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

Durham SE, Bonilla E, Samuels DC, DiMauro S, Chinnery PF (2005): Mitochondrial DNA copy number threshold in mtDNA depletion myopathy. Neurology 65, 453-455

Eeg-Olofsson O, al-Zuhair AG, Teebi AS, Daoud AS, Zaki M, Besisso MS, Al-Essa MM (1990): Rett syndrome: a mitochondrial disease? J Child Neurol 5, 210-214

Fayet G, Jansson M, Sternberg D, Moslemi AR, Blondy P, Lombes A, Fardeau M, Oldfors A (2002): Ageing muscle: clonal expansions of mitochondrial DNA point mutations and deletions cause focal impairment of mitochondrial function. Neuromuscul Disord 12, 484-493

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

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

Fridovich I (1997): Superoxide anion radical (O2-.), superoxide dismutases, and related matters. J Biol Chem 272, 18515-18517

Fujikawa Y, Roma LP, Sobotta MC, Rose AJ, Diaz MB, Locatelli G, Breckwoldt MO, Misgeld T, Kerschensteiner M, Herzig S et al. (2016): Mouse redox histology using genetically encoded probes. Sci Signal 9, rs1

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

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

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

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

Haas RH, Nasirian F, Hua X, Nakano K, Hennessy M (1995b): Oxidative metabolism in Rett syndrome: 2. Biochemical and molecular studies. Neuropediatrics 26, 95-99

Hagberg B, Berg M, Steffenburg U (2001): Three decades of sociomedical experiences from West Swedish Rett females 4-60 years of age. Brain Dev 23 Suppl 1, S28-31

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

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

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, Archer HL, Ravine D, Kerr A, de Klerk N, Christodoulou J, Bailey ME, Laurvick C, Leonard H (2005): p.R270X MECP2 mutation and mortality in Rett syndrome. Eur J Hum Genet 13, 1235-1238

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

Joseph JA, Roth GS (1992a): Loss of muscarinic regulation of striatal dopamine function in senescence. Neurochem Int 20 Suppl, 237S-240S

Joseph JA, Roth GS (1992b): Cholinergic systems in aging: the role of oxidative stress. Clin Neuropharmacol 15 Suppl 1 Pt A, 508A-509A

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

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

Kerr AM, Armstrong DD, Prescott RJ, Doyle D, Kearney DL (1997): Rett syndrome: analysis of deaths in the British survey. Eur Child Adolesc Psychiatry 6 Suppl 1, 71-74

Khrapko K (2011): The timing of mitochondrial DNA mutations in aging. Nat Genet 43, 726-727

Kosower NS, Kosower EM, Wertheim B, Correa WS (1969): Diamide, a new reagent for the intracellular oxidation of glutathione to the disulfide. Biochem Biophys Res Commun 37, 593-596

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

Matsuishi T, Urabe F, Percy AK, Komori H, Yamashita Y, Schultz RS, Ohtani Y, Kuriya N, Kato H (1994): Abnormal carbohydrate metabolism in cerebrospinal fluid in Rett syndrome. J Child Neurol 9, 26-30

Meyer AJ, Brach T, Marty L, Kreye S, Rouhier N, Jacquot JP, Hell R (2007): Redox-sensitive GFP in *Arabidopsis thaliana* is a quantitative biosensor for the redox potential of the cellular glutathione redox buffer. Plant J 52, 973-986

Mishmar D, Ruiz-Pesini E, Golik P, Macaulay V, Clark AG, Hosseini S, Brandon M, Easley K, Chen E, Brown MD et al. (2003): Natural selection shaped regional mtDNA variation in humans. Proc Natl Acad Sci U S A 100, 171-176

Paxinos G, Franklin KBJ: The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates; in: Ed. by Academic press, 525 B Street, Suite 1900, San Diego, California 92101-4495, USA 2001, 350

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

Pryor WA (1986): Oxy-radicals and related species: their formation, lifetimes, and reactions. Annu Rev Physiol 48, 657-667

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

Ristow M (2014): Unraveling the truth about antioxidants: mitohormesis explains ROS-induced health benefits. Nat Med 20, 709-711

Schieber M, Chandel NS (2014): ROS function in redox signaling and oxidative stress. Curr Biol 24, R453-462

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, 236-239

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

Stettner GM, Huppke P, Gärtner J, Richter DW, Dutschmann M (2008): Disturbances of breathing in Rett syndrome: Results from patients and animal models. Adv Exp Med Biol 605, 503-507

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

Villemagne PM, Naidu S, Villemagne VL, Yaster M, Wagner HN, Jr., Harris JC, Moser HW, Johnston MV, Dannals RF, Wong DF (2002): Brain glucose metabolism in Rett Syndrome. Pediatr Neurol 27, 117-122

Wagener KC, Kolbrink B, Dietrich K, Kizina KM, Terwitte LS, Kempkes B, Bao G, Müller M (2016): Redox-indicator mice stably expressing genetically-encoded neuronal roGFP: Versatile tools to decipher subcellular redox dynamics in neuropathophysiology. Antioxid Redox Signal 25, 41-58

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

Yun J, Finkel T (2014): Mitohormesis. Cell Metab 19, 757-766

Danksagung

Ich möchte mich bei der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Michael Müller bedanken. Ihre Unterstützung und andauernde Hilfsbereitschaft hat diese Dissertation erst möglich gemacht. In immer freundlicher Atmosphäre war die Erarbeitung des Themas eine Freude.

Besonders bedanken möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Michael Müller. Er hat mir von Beginn an mit Rat und Tat zu Seite gestanden und hatte immer ein offenes Ohr für mich. Sowohl während der Durchführung der Versuche, als auch später beim Verfassen der Dissertation hat seine motivierende Art und fachliche Unterstützung zum Ergebnis maßgeblich beigetragen. Ohne ihn wäre eine Fertigstellung dieser Arbeit nicht möglich gewesen.