

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

Mitochondriale Redoxhomöostase in hippocampalen Neuronen MeCP2- defizienter Mäuse

INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von

Karina Festerling

aus

Halberstadt

Göttingen 2019

Dekan: Prof. Dr. med. W. Brück

Betreuungsausschuss

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

Ko-Betreuer/in: Prof. Dr. med. P. Huppke

Prüfungskommission

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

Ko-Referent/in: Prof. Dr. med. P. Huppke

Drittreferent/in: Prof. Dr. med. M. Oppermann

Datum der mündlichen Prüfung: 08.10.2019

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Mitochondriale Redoxhomöostase in hippocampalen Neuronen MeCP2-defizienter Mäuse" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den 03.06.2019

.....

(Unterschrift)

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	III
Tabellenverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung	1
1.1 Molekulargenetischer Hintergrund des RTT	2
1.2 Auswirkungen des <i>MECP2</i> -Gendefekts auf die Mitochondrien.....	4
1.3 Mitochondrien und ihre Rolle als ROS-Produzenten	5
1.4 Oxidativer Stress im RTT	8
2 Ziel der Studie.....	10
3 Material und Methoden	12
3.1 Genotypisierung der Versuchstiere.....	12
3.1.1 Isolation genomischer DNA aus Schwanzbiopsien	12
3.1.2 Polymerasekettenreaktion.....	12
3.1.3 PCR-Protokoll.....	13
3.1.4 Primer	13
3.1.5 Agarose-Gelelektrophorese	14
3.2 Das RTT-Maus-Modell	14
3.3 Präparation und Kultivierung des Hippocampus	15
3.4 Zellkulturmedien und Lösungen	16
3.5 Virale Transduktion der Zellkulturen	17
3.6 Pharmaka und Chemikalien	18
3.7 Molekularer und technischer Hintergrund der Redoxmessungen.....	19
3.8 Kalibrierung des Redoxsensors roGFP1	22
3.9 Molekularer und technischer Hintergrund der Calciummessung	25
3.10 Kalibrierung des Farbstoffs Fura-2.....	26
3.11 Statistik	27
4 Ergebnisse	28
4.1 Transmitter-induzierte mitochondriale Redoxänderungen	28
4.2 Transmitter-induzierte zytosolische Calciumänderung	34
4.3 <i>Mecp2</i> -Redoxindikator-Mäuse	38
5 Diskussion.....	40
5.1 Mitochondriales Redoxruhegleichgewicht in <i>Mecp2</i> ^{-/-} - und WT-Neuronen	41

5.2	Transmitter-induzierte Redoxantworten von <i>Mecp2^{-y}</i> - und WT-Mitochondrien	42
5.3	Vergleich mitochondrialer und zytosolischer Redoxantworten.....	43
6	Zusammenfassung	51
7	Literaturverzeichnis	53

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: <i>MECP2</i> -Struktur	3
Abbildung 2: Funktion von MeCP2.....	4
Abbildung 3: ROS-induzierter Progress der Erkrankung	7
Abbildung 4: PCR-Analyse.....	14
Abbildung 5: Hippocampales Neuron mit mitochondrialer Expression von roGFP1	18
Abbildung 6: Darstellung von roGFP1 mit seinem Chromophor	20
Abbildung 7: Aufbau des Fluoreszenzmikroskops	22
Abbildung 8: Darstellung einer roGFP1-Kalibrierung.....	23
Abbildung 9: Emission bei F 470 nm	23
Abbildung 10: Darstellung von Fura-2-AM, Fura-2 und Fura-2-Ca ²⁺ -Chelatkomplex	25
Abbildung 11: RoGFP1-Ratio durch Glutamat moduliert	29
Abbildung 12: RoGFP1-Ratio durch 5-HT moduliert	31
Abbildung 13: RoGFP1-Ratio durch Dopamin moduliert	32
Abbildung 14: RoGFP1-Ratio-Änderung nach Applikation von Norepinephrin	33
Abbildung 15: Darstellung der Änderung $\Delta R/R_0$ und der Redoxpotentiale ΔE_{roGFP1} aller Neurotransmitter.....	34
Abbildung 17: Zytosolische Calciumkonzentration nach Serotonin-Gabe	36
Abbildung 18: Zytosolische Calciumkonzentration nach Dopamin-Gabe.....	36
Abbildung 19: Zytosolische Calciumkonzentration nach Norepinephrin-Gabe	37
Abbildung 20: Zusammenfassende Darstellung der Calciumantworten aller Transmitter	38
Abbildung 21: <i>Mecp2</i> -Redoxindikatormaus	39

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: PCR-Reagenzien und Volumina	13
Tabelle 2: Programmzyklen im Thermocycler.....	13
Tabelle 3: Verwendete Substanzen und deren Hersteller.....	17
Tabelle 4: Komponenten und Konzentrationen der Fura-2-Eichlösungen.....	19
Tabelle 5: Zusammenfassung der roGFP1-Kalibrierungswerte.....	23
Tabelle 6: RoGFP1 Emission bei 470 nm Anregungswellenlänge	24
Tabelle 7: Zusammenfassung der Fura-2-Kalibrierung	26
Tabelle 8: Redoxruhegleichgewicht von WT- und <i>Mecp2^{-/-}</i> -Mitochondrien.....	28
Tabelle 9: Initiale reduzierende Verschiebung der Glutamat-Redoxantwort.....	29
Tabelle 10: Oxidative Verschiebung der Glutamat-Redoxantwort.....	30
Tabelle 11: Serotonin-induzierte Redoxantwort	31
Tabelle 12: Dopamin-induzierte Redoxantwort.....	32
Tabelle 13: Norepinephrin-induzierte Redoxantworten.....	33

Abkürzungsverzeichnis

5-HT	5-Hydroxytryptamin, Serotonin
AAV-6	Adeno-assoziiertes Virus-6
ACSF	artifizielle Cerebrospinalflüssigkeit
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BAPTA	1,2-bis(o-aminophenoxy)ethan-N,N,N',N'-Tetraessigsäure, Calciumpuffer
CaCl ₂	Calciumchlorid
CCD-Kamera	<i>charge-coupled-device</i> -Kamera
CpG	Cytosin-Phosphat-Guanin
CREB1	<i>cAMP response element binding protein 1</i>
DIV	<i>days in vitro</i> , Tage nach Anlegen der Zellkultur
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	1,4-Dithiothreitol
$E^{0'}_{roGFP1}$	Standardredoxpotential des roGFP1
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
E_{roGFP1}	roGFP1 Redoxpotential
$F_{380_{max}}$	Fluoreszenz-Intensität bei einer Anregung von 380 nm bei übersättigter Calciumkonzentration
$F_{380_{max}}/F_{380_{min}}$	Quotient aus den gemessenen Fluoreszenz-Intensitäten bei einer Anregung von 380 nm unter Calciumsättigung und unter calciumfreier Umgebung
$F_{380_{min}}$	Fluoreszenz-Intensität bei einer Anregung von 380 nm in calciumfreier Umgebung
$F_{470_{ox}}$	Fluoreszenz-Intensität bei einer Anregung von 470 nm unter maximaler Oxidation
$F_{470_{ox}}/F_{470_{red}}$	Quotient aus den Fluoreszenz -Intensitäten bei einer Anregung von

	470 nm unter maximaler Oxidation und Reduktion
F 470 _{red}	Fluoreszenz-Intensität bei einer Anregung von 470 nm unter maximaler Reduktion
FAD	Flavinadenindinukleotid
FADH ₂	reduziertes Flavinadenindinukleotid
FCS	<i>fetal calf serum</i> , fetales Kälberserum
FMN	Flavinmononukleotid
Fura-2	2-[6-[bis(carboxymethyl)amino]-5-[2-[2-[bis(carboxymethyl)amino]-5-methylphenoxy]ethoxy]-1-benzofuran-2-yl]-1,3-oxazole-5-Carbonsäure
Fura-2-AM	5-Oxazolecarbonsäure, 2-(6-(bis(2-((acetyloxy)methoxy)-2-oxoethyl)amino)-5-(2-(bis(2-((acetyloxy)methoxy)-2-oxoethyl)amino)-5-methylphenoxy)ethoxy)-2-benzofuranyl)-, (acetyloxy)Methylester
GSH	Glutathion, γ -L-Glutamyl-L-cysteinylglycin
GSSG	Glutathiondisulfid
HAT	Histon-Acetyltransferase
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
HDAC	Histon-Acetyldehydrogenase
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl)-Ethansulfonsäure, pH-Puffersubstanz
HO ₂ [·]	Hydroperoxyl-Radikal
KCl	Kaliumchlorid
K _d	Dissoziationskonstante
<i>Mecp2</i>	<i>methyl-CpG-binding-protein 2</i> , nicht-humanes Gen
<i>MECP2</i>	<i>methyl-CpG-binding-protein 2</i> , humanes Gen
MECP2	<i>methyl-CpG-binding-protein 2</i> , humanes Protein
MeCP2	<i>methyl-CpG-binding-protein 2</i> , nicht-humanes Protein
<i>Mecp2</i> ^{-/-}	Maus-Modell des Rett-Syndroms, männliche <i>Mecp2-Knockout</i> -Maus
<i>MEM</i>	<i>minimal essential medium</i>
MgCl ₂	Magnesiumchlorid

MgSO ₄	Magnesiumsulfat
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NADH	reduziertes Nicotinamidadenindinukleotid
NaH ₂ PO ₄	Natriumhydrogenphosphat
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
OxD _{roGFP1}	relativer Oxidationszustand
PCR	Polymerasekettenreaktion
PD	<i>postnatal day</i> , Tag nach der Geburt
R _{max}	entspricht R _{ox}
R _{min}	entspricht R _{red}
roGFP1	<i>reduction/oxidation sensitive green fluorescent protein 1</i>
roGFP1m	mitochondrial exprimiertes roGFP1
roGFP1c	zytosolisch exprimiertes roGFP1
ROS	<i>reactive oxygen species</i> / reaktive Sauerstoffverbindungen
R _{ox}	maximal oxidiertes Zustand
Rpm	Umdrehungen pro Minute
R _{red}	maximal reduzierter Zustand
RTT	Rett-Syndrom
SDS	Natriumlaurylsulfat, anionisches denaturierendes Tensid
Sin3A	gepaartes amphipathisches Helixprotein, Corepressor
SOD	Superoxiddismutase
SOD2	mitochondriale Isoform der Superoxiddismutase
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
Tris	2-Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol
Trx(SH) ₂	Thioredoxin mit freien Thiol-Gruppen
TrxS ₂	Thioredoxin
WT	genetischer Wildtyp
ΔR/R ₀	relative Änderung des Redoxruhegleichgewichts bezogen auf Ausgangsniveau
ΔΨ _m	mitochondriales Membranpotential

1 Einleitung

Das Rett-Syndrom (RTT; MIM312750) ist eine neurologische Entwicklungsstörung, die fast ausschließlich bei Mädchen mit einer Inzidenz von 1:10000 bis 1:15000 auftritt (Hagberg 1985). 1966 wurde sie zum ersten Mal von Dr. Andreas Rett beschrieben (Rett 1966), doch dauerte es noch weitere 17 Jahre bis die Erkrankung in den medizinischen Fokus gelangte. Erst durch die Arbeit von Dr. Bengt Hagberg, einem schwedischen Neurologen, der in englischer Sprache von 35 weiblichen Fällen, die ähnliche neurologische Auffälligkeiten, wie A. Rett sie beschrieben hat, berichtete (Hagberg et al. 1983), bekam die Erkrankung weltweite Aufmerksamkeit. Zu dieser Zeit wurden außerdem in einem anderen Wissenschaftszweig, der Molekularbiologie, wichtige Zusammenhänge zwischen Gen-Expression und DNA-Methylierung erkannt, die entscheidend für das weitere Vorgehen in der RTT-Forschung waren. Diese Forschungsergebnisse zeigten nämlich, dass es an Cytosin-Phosphat-Guanin-Inseln (CpG-Inseln) zu Methylierungen kommen kann, die die Transkription der DNA inhibieren. Dabei wurden zwei Mechanismen aufgefunden. Der erste betrifft CpG-Inseln innerhalb der Promotoren von Genen. Sind diese methyliert, können sequenzspezifische Transkriptionsfaktoren nicht mehr binden, und es kommt zur Inhibition. Der zweite Mechanismus bezieht Proteine (Methyl-CpG-bindende Proteine) mit ein, die an methylierter DNA binden und die Chromatinstruktur derart verändern, dass keine Transkription stattfinden kann. Diese Erkenntnisse sind für das Verständnis des Rett-Syndroms von entscheidender Relevanz gewesen. Doch wie sieht die Klinik des Rett-Syndroms eigentlich aus?

Beim klassischen RTT entwickeln sich die Mädchen in den ersten sechs bis 18. Lebensmonaten scheinbar normal, bis es zur Regression kommt (Chahrour und Zoghbi 2007). Wichtige Entwicklungsschritte, wie Gehen oder Sprechen einiger Worte, können bereits erlernt worden sein. Als typisches Kennzeichen gilt das Händewringen, eine Art Waschbewegung der Hände. Ein weiteres frühzeitiges Erkennungsmerkmal ist die Mikrozephalie. Diese wird im zweiten Lebensjahr auffällig. Damit verbunden sind motorische Einschränkungen, Ataxie, Hypotonus der Muskulatur und Gewichtsverlust. Autistische Merkmale sind ebenfalls vorhanden. Dazu zählen Hypersensitivität gegenüber Tönen und Geräuschen, ein ausdrucksloses Gesicht, mangelnder Auge-zu-

Auge-Kontakt und emotionaler Rückzug (Nomura 2005). Von Bedeutung sind außerdem die respiratorischen Störungen der Patientinnen. Diese reichen von Hyperventilation bis hin zu Apnoen. Die meisten Mädchen leiden an Luftanhalten, Luftschlucken und forciertem Ausstoßen von Luft und Speichel. Zusätzlich treten epileptische Krampfanfälle auf. Dabei treten sowohl fokale als auch generalisierte Anfälle, wie der *Grand mal*-Anfall auf (Steffenburg et al. 2001, Jian et al. 2006). Die Patienten sind oftmals schon im Jugendalter an den Rollstuhl gebunden, und obwohl die Erkrankung bereits zu schweren Symptomen im Kindesalter führt, erreicht sie trotz allem ein Plateau. Die Betroffenen können heute ein Alter von 60-70 Jahren erreichen.

1.1 Molekulargenetischer Hintergrund des RTT

Grund für die neurologischen Entwicklungsdefizite des klassischen Rett-Syndroms, ist zu 95% eine Mutation im Methyl-CpG-bindenden-Protein 2 (*MECP2*) Gen, welches sich auf dem X-Chromosom (Xq28; zwischen *LICAM* und *RCP/GCP* Loci) befindet (Amir et al. 1999). Die Mutation entsteht meistens *de novo* vor allem in der paternalen Keimbahn (Girard et al. 2001). Dabei ist oftmals eine Cytosin (C)- statt Thymin (T)-Transition am CpG-Dinukleotid zu finden (Wan et al. 1999, Trappe et al. 2001). Einige Fälle sind beschrieben worden, in denen auch männliche Nachkommen an RTT erkrankten (Jan et al. 1999). Bei normalem Karyotyp der männlichen Neugeborenen, bedingt die *MECP2*-Mutation, die zum klassischen RTT-Phänotyp bei Mädchen führt, neonatale Enzephalopathie und frühzeitigen Tod innerhalb des ersten Lebensjahres. Bei einem Klinefelter-Karyotyp (XXY) entwickelt sich ein klassischer RTT-Phänotyp oder ein somatisches Mosaikmuster (Maiwald et al. 2002, Budden et al. 2005, Masuyama et al. 2005, Dayer et al. 2007). Etwa 5% der Erkrankten entwickeln ein atypisches Rett-Syndrom. Bei diesen konnten Mutationen in den Genen für *Cyclin-dependent Kinase-like 5* (*CDKL5*; Serin/Threonin Protein Kinase 9, *STK9*) (Tao et al. 2004, Weaving et al. 2004), *forkhead box G1* (*FOXG1*) (Ariani et al. 2008), *Netrin G1* (Archer et al. 2006) oder anderen nachgewiesen werden. Neueren Studien zufolge wird jedoch die Zugehörigkeit von *CDLK5* zur Gruppe der atypischen RTT-Mutationen stark diskutiert (Fehr et al. 2013).

Mutationen im *MECP2*-Gen können *missense*-, *nonsense*- und *frameshift*-Mutationen beinhalten. Das Gen unterliegt der X-Chromosom-Inaktivierung (XCI, *Imprinting*), wodurch es zu einem mosaikähnlichen Expressionsmuster kommt, da in der einen Hälfte aller Zellen das maternale X-Chromosom aktiviert ist und in der anderen Hälfte

das paternale X-Chromosom. MeCP2 kann, durch Interaktion mit DNA und Repressor-Komplexen, Gene inaktivieren. Lange glaubte man, dass dies die einzige Funktion sei, doch wie zweifelsfrei im Mausmodell nachgewiesen werden konnte, hat MeCP2 auch eine aktivierende Funktion auf die Genexpression (Chahrour et al. 2008).

Das *MECP2*-Gen umfasst 4 Exons, von denen das vierte, mit über 8,5 kb das Größte ist (Coy et al. 1999). Es kodiert für das MECP2-Protein, welches im gesamten Organismus, aber vor allem im Gehirn vorkommt und von dem zwei Isoformen (MECP2-e1 und MECP2-e2) existieren, die durch alternatives *splicing* entstehen (Abb.1) (Young et al. 2005).

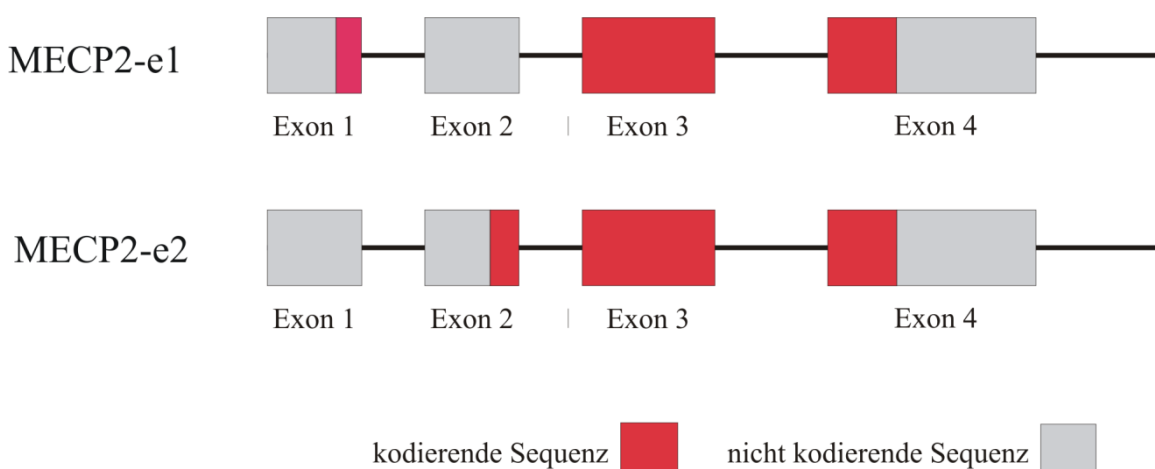


Abbildung 1: *MECP2*-Struktur

Durch alternatives *splicing* werden die Exone 2 (MECP2-e1) oder 1 (MECP2-e2) entfernt.

Das Protein ist aus drei Domänen aufgebaut: der Methyl-CpG-bindenden Domäne, der Transkription Repressor Domäne (TRD) und einer C-terminalen Domäne. Zusätzlich enthält es zwei Kernlokalisierungssignale. Wenn es zur Inhibition der Transkription kommen soll, rekrutiert MeCP2 mit seiner Transkription Repressor Domäne die Corepressoren SIN3A und Histon-Deacetylase (HDAC) 1 und 2. Durch die Deacetylierung der Histone entwickelt sich eine größere Affinität zum negativ geladenen Phosphation des DNA Gerüsts, wodurch ein kondensiertes Chromatin entsteht. Den Transkriptionsfaktoren ist es dadurch unmöglich an der DNA zu binden und die Transkription zu induzieren. Wenn das Gen transkribiert werden soll, binden Coaktivatoren und der Transkriptionsfaktor *cAMP response element binding Protein 1* (CREB1) (Abb.2) (Chahrour et al. 2008). An CREB1 bindet wiederum die Histon-Acetyltransferase (HAT), die das Histon wieder acetyliert. Die Affinität zum Phosphat

sinkt, die Chromatinstruktur wird wieder aufgelockert, und das Gen kann abgelesen werden.

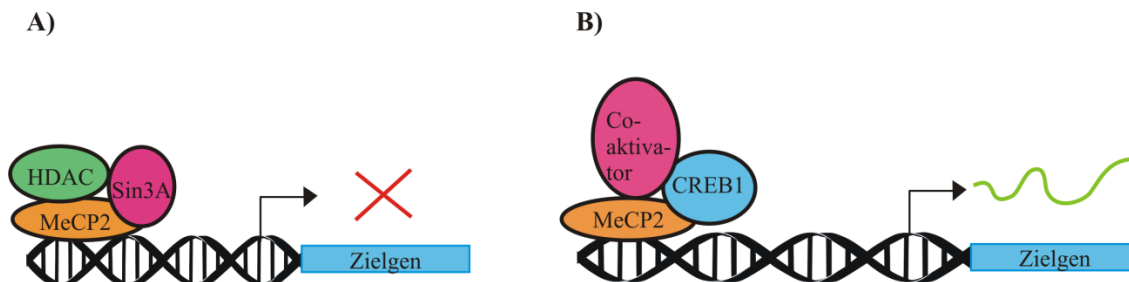


Abbildung 2: Funktion von MeCP2

A) MeCP2-TRD rekrutiert die Corepressoren SIN3A und HDAC. Es kommt zur Inhibition der Transkription, durch Veränderung der Chromatinstruktur und konsekutivem Nichtbinden von Transkriptionsfaktoren an der DNA.

B) Bei induzierter Transkription binden an MeCP2 Coaktivatoren und CREB1, wodurch das Chromatin dekondensiert und abgelesen werden kann.

1.2 Auswirkungen des *MECP2*-Gendefekts auf die Mitochondrien

Unter den nukleären Genen, die durch MeCP2 reguliert sind, befinden sich unter anderem Gene, die für mitochondriale Proteine kodieren. Diese kamen in den Fokus, als man elektronenmikroskopisch morphologische Veränderungen der Mitochondrien festgestellt hat. In Patientengewebe (Muskel, Gehirn) fanden sich geschwollene vakuolisierte Mitochondrien, granuläre Einschlüsse und Membranveränderungen (Ruch et al. 1989, Eeg-Olofsson et al. 1990, Cornford et al. 1994). Dies führte zu der Vermutung, dass ggf. auch eine metabolische Störung der Mitochondrien vorliegen könnte. Untersuchungen zeigten, dass die Defekte sowohl auf genetischer als auch auf Proteinebene vorliegen. In MeCP2-null-Mäusen sind die Gene, die für die Komplexe I (NADH-Dehydrogenase) und III (Cytochrom-c-Oxidoreduktase) der Atmungskette kodieren, missreguliert (Kriaucionis et al. 2006). Ebenso konnte in Muskelzellen und Neuronen von RTT-Patienten *postmortem* durch biochemische Untersuchungen geringere Mengen der Komplexe II (Succinat-Dehydrogenase) und III der Atmungskette sichergestellt werden (Coker und Melnyk 1991).

Zudem weisen aktuelle Studien der Arbeitsgruppe um Prof. M. Müller darauf hin, dass eine Mutation im *Mecp2*-Gen zu einer erhöhten Stoffwechselaktivität der Mitochondrien führt. Unter anderem ist dies darin begründet, dass auch nach Blockade der ATP-Synthase durch Oligomycin, die eigentlich dazu führt, dass der Elektronentransport der Atmungskette zum Erliegen kommt, ein erhöhter O₂ Verbrauch in *Mecp2*^{-y}-Hippocampi gemessen werden konnte. Dies deutet darauf hin, dass es einen

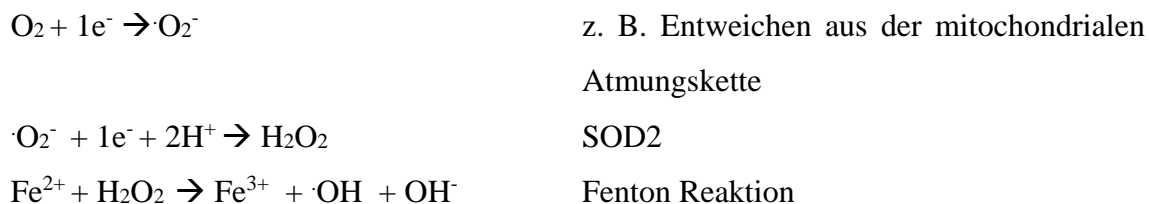
Protonen-Leckstrom über die innere Mitochondrienmembran in die Matrix gibt, wie er bereits 2006 von Kriaucionis und Kollegen vermutet wurde (Kriaucionis et al. 2006). Es ist anzunehmen, dass die Mitochondrien versuchen, den Protonengradienten weiterhin aufrechtzuerhalten, indem sie vermehrt Protonen in den Intermembranraum pumpen und dabei folglich mehr O₂ verbrauchen. Das Membranpotential ($\Delta\Psi_m$) scheint dennoch nicht vollständig aufrecht gehalten werden zu können, was Messungen an isolierten Mitochondrien von *Mecp2*^{-/-}-Hippocampi mit Rhodamin123 (Rh123), einem Fluoreszenzmarker, zeigten (Großer et al. 2012). Die Membran der Mitochondrien scheint demnach vordepolarisiert zu sein. Verminderte ATP-Spiegel im Hippocampus MeCP2-defizienter Mäuse, die aus einer herabgesetzten Funktionalität der Atmungskette resultieren, konnten dennoch nicht ermittelt werden (Fischer et al. 2009). In neonatalen *Mecp2*^{-/-}-Hippocampi konnten jedoch, mit dem ATP spezifischen, genetisch kodierten Fluoreszenzsensor Ateam 1.03, erhöhte ATP Level und ein erhöhter ATP-Umsatz nachgewiesen werden (Toloe et al. 2014). Somit deuten der erhöhte O₂ Verbrauch, das Vorliegen einer vordepolarisierten inneren Membran und der erhöhte ATP-Umsatz, zumindest in neonatalen Mäusen, auf einen gesteigerten Stoffwechsel der Mitochondrien von *Mecp2*^{-/-}-Mäusen hin.

1.3 Mitochondrien und ihre Rolle als ROS-Produzenten

Bekannt ist, dass Mitochondrien, als „Kraftwerke der Zelle“ einen erheblichen Teil (ca. 90%) reaktiver Sauerstoffradikale (ROS, *reactive oxygen species*) und Superoxide ($\cdot\text{O}_2^-$) generieren. Im Prozess der oxidativen Phosphorylierung werden NADH und FADH₂ kontrolliert oxidiert, um einen Protonengradienten entlang der inneren Mitochondrienmembran und damit ein Membranpotential ($\Delta\Psi$) aufzubauen, welches benötigt wird, um ADP, durch die ATP-Synthetase, zu phosphorylieren (Mitchell 1961). Hierbei entstehen Superoxide durch Verlust von Elektronen in der Elektronentransportkette der Komplexe I bis IV der Atmungskette. Als Hauptursprungsorte gelten dabei die Komplexe I (Kushnareva et al. 2002) und III (Chen et al. 2003, Brand 2010).

Superoxide ($\cdot\text{O}_2^-$) sind sehr instabile Verbindungen, weswegen sie bestrebt sind, ihr ungepaartes Elektron mit anderen chemischen Verbindungen reagieren zu lassen, um durch die Aufnahme eines weiteren Elektrons chemisch stabil zu werden. Diese Superoxide sind natürlicherweise höchst impermeabel für Doppelmembranen. In den Mitochondrien werden sie sofort durch das Enzym Superoxiddismutase 2 (SOD2;

mitochondriale Isoform) zu weniger reaktivem Wasserstoffperoxid (H_2O_2) umgewandelt. H_2O_2 kann die mitochondriale Membran verlassen und in verschiedenen Kompartimenten, in Anwesenheit von Fe^{2+} , zur Bildung von Hydroxyl-Radikalen ($\cdot\text{OH}$) und Hydroxyd-Anionen (OH^-) beitragen (Fenton Reaktion) (Dean et al. 1997). Hydroxyl-Radikale sind extrem reaktiv. Ihre Halbwertszeit beträgt weniger als 1 ns, da sie sofort mit den umliegenden Molekülen reagieren.



Die entstandenen ROS sind in der Lage, eine Vielzahl von Zellbausteinen oxidativ zu verändern. In Mitochondrien oxidieren sie Proteine, Lipide, Kohlenhydrate und Nucleinsäuren, wodurch sie zum Alterungsprozess, zur Ätiologie und Pathogenese chronischer Erkrankungen beitragen (Lenaz 1998, DiMauro und Schon 2003, Balaban et al. 2005, Chan 2006, Lenaz et al. 2006, McFarland et al. 2007, Zeviani und Carelli 2007, Reeve et al. 2008). Sie interagieren mit Bestandteilen der Mitochondrienmembran und führen dort zu Defekten, wodurch es zu einem unkontrollierten Austausch von Ionen über die innere Membran kommen kann. Membrangebundene Polypeptide der Atmungskette werden in ihrer Funktion des Elektronentransports beeinträchtigt, was zu einem weiteren Ansteigen von ROS führt (Ozawa 1997, Lenaz et al. 1999). Die mitochondrialen Dysfunktionen und der dadurch weiter geförderte oxidative Stress begünstigen die Entwicklung eines Kreislaufs, der zusätzlich durch ROS-induzierte Mutationen, angetrieben wird (Müller und Can 2014). Auswirkungen auf das neuronale Netzwerk entstehen z. B., indem generiertes H_2O_2 die neuronale Erregbarkeit (Pellmar 1987), die basale synaptische Transmission (Avshalumov und Rice 2002) und Langzeitpotenzierung (Pellmar 1995, Huddleston et al. 2008) beeinflusst.

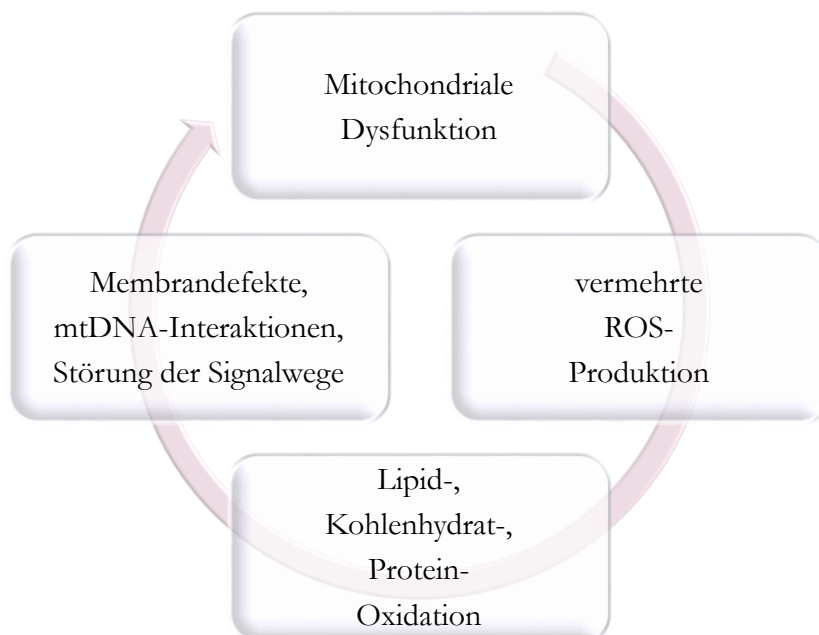
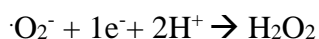


Abbildung 3: ROS-induzierter Progress der Erkrankung

Mitochondriale Dysfunktionen resultieren in einer gesteigerten Produktion von ROS, die ihrerseits zu Oxidationen in den Substanzklassen der Lipide, Kohlenhydrate und Proteine führen. Konsekutiv entstandene Membrandefekte, Mutationen und gestörte Signalwege bedingen weitere mitochondriale Dysfunktionen.

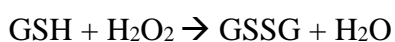
Es ist daher verständlich, dass es zelleigene Mechanismen geben muss, die ROS abfangen und abbauen. In der Mitochondrienmatrix spielen dabei vor allem die Isoformen der SOD (SOD2; SOD[Mn]) (Weisiger und Fridovich 1973), Glutathionperoxidase (Mari et al. 2009), Peroxiredoxin III (Chae et al. 1999) und Katalase (Cat) (Bai und Cederbaum 2001) eine Rolle. Peroxiredoxine benötigen andere Dithiol-Proteine, wie z. B. Thioredoxin (TrxS₂), um H₂O₂ abzubauen, so wie Glutathionperoxidase Glutathion benötigt. Weitere protektive nichtenzymatische Moleküle sind α -Tocopherol (Vitamin E) (Brigelius-Flohé und Traber 1999), Ascorbinsäure (Vitamin C) (Buettner 1993), Betacarotin, Harnsäure und Melatonin (Milton und Sweeney 2012).



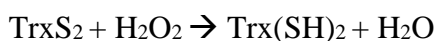
SOD



Katalase



Glutathionperoxidase



Peroxiredoxin III

Wieviele ROS jedoch produziert werden, ist von der Stoffwechselaktivität der Mitochondrien abhängig (Boveris und Chance 1973). Da diese im RTT erhöht zu sein

scheint, wird auch mehr ROS in den Zellen vermutet, da mehr Elektronen auf ihrem Weg durch die Elektronentransportkette verloren gehen. Dies würde bedeuten, dass die Neurone erhöhtem oxidativen Stress ausgeliefert sind, der Grund für die neurologischen Defizite im RTT sein könnte (Sierra et al. 2001, Müller und Can 2014).

1.4 Oxidativer Stress im RTT

Ein veränderter Redoxstatus, sowohl zytosolisch als auch mitochondrial, konnte bereits durch die Arbeitsgruppe um M. Müller an organotypischen hippocampalen Schnittkulturen von adulten und neonatalen *Mecp2*^{-/-}-Mäusen bewiesen werden. Durch optische Messungen der NADH und FAD Autofluoreszenz wurde gezeigt, dass die Hippocampi auf Gewebeebene in *Mecp2*^{-/-}-Mäusen oxidiert sind, als in Wildtyp-Mäusen (Großer et al. 2012). Zudem fanden andere Arbeitsgruppen heraus, dass isolierte Mitochondrien des gesamten Gehirns vermehrt H₂O₂ freisetzen (De Filippis et al. 2015). Weiterhin konnten in Blutproben von RTT-Patienten eine reduzierte Aktivität des protektiven Enzyms SOD (Sierra et al. 2001) und erniedrigte Tocopherol-Spiegel (Formichi et al. 1998) nachgewiesen werden. Andere Marker für oxidativen Stress, wie freies Eisen in Plasma und Erythrozyten und Enzyme der Lipid- und Proteinoxidation waren in Blutproben von RTT-Patienten ebenfalls erhöht (Sierra et al. 2001, De Felice et al. 2009). All diese Fakten sprechen für eine erhöhte oxidative Last im RTT, die weiter untersucht werden muss.

Um die physiologischen Gegebenheiten im RTT und die Ausmaße der oxidativen zellulären Schädigung weiter nachvollziehen zu können, untersuchte unsere Arbeitsgruppe organotypische hippocampale Schnittkulturen sowie primäre Zellkulturen auf Redoxänderungen, unter Zuhilfenahme des redoxsensitiven Proteins roGFP1 (Reduktion-Oxidation sensitives grün fluoreszierendes Protein 1). Dieses erwies sich als besonders geeignet für dynamische und semiquantitative optische Messungen, da es als funktioneller Thiol-Sensor den Redoxstatus der Zelle, ebenso wie andere redoxsensitive Proteine, z. B. Glutathion, schnell und reversibel widerspiegelt.

Analysen unserer Arbeitsgruppe auf Zell- und Gewebeebene zeigten außerdem, dass hippocampale *Mecp2*^{-/-}-Neurone stärker auf induzierte Hypoxie durch Sauerstoffentzug (95% N₂/CO₂) und provozierten oxidativen Stress durch Wasserstoffperoxid (H₂O₂) reagieren (Fischer et al. 2009, Kron und Müller 2010, Großer et al. 2012). Es konnte interessanterweise herausgearbeitet werden, dass die SOD, ein protektives Enzym, einen

weniger starken Einfluss auf die Redoxhomöostase in *Mecp2^{-y}*-Neuronen hat. Dies zeigte sich nach Redoxprovokation, unter blockierter SOD durch Natriumdiethyldithiocarbamat (DEDTC), in einer weniger starken Oxidation in *Mecp2^{-y}*-Neuronen (Can 2016). Sowohl Zytosol als auch Mitochondrien sind dabei gezielt untersucht worden. Weiterhin konnte in roGFP1-transduzierten hippocampalen Zellkulturen durch physiologische Stimulation der Neurone mit den im RTT veränderten Neurotransmittern Glutamat (Hamberger et al. 1992, Lappalainen und Riikonen 1996), Dopamin (Riederer et al. 1985, Brucke et al. 1987, Wenk et al. 1991), Serotonin (Riederer et al. 1986) und Norepinephrin (Segawa 1997, Wenk 1997) gezeigt werden, dass *Mecp2^{-y}*-Neurone deutlich stärker oxidiert werden als WT-Neurone (Can 2016).

2 Ziel der Studie

Aufbauend auf vorangegangenen Studien, die dem Zweck der Erforschung der Pathologie des RTT, insbesondere mit Hinblick auf neuronale Schäden durch oxidativen Stress dienen, ist die Funktion der Mitochondrien und ihre Bedeutung, als wichtige Donatoren reaktiver Sauerstoffspezies, im Gesamtkontext der zellulären Redoximbalance genauer zu untersuchen. Wie bereits erwähnt wurde, reagieren die Hippocampi von *Mecp2^{-y}*-Mäusen stärker auf provozierte Redoxänderungen, wie z. B. schwere Hypoxie, H₂O₂ und physiologische Stimulation durch Neurotransmitter, als WT-Hippocampi. Fraglich ist, ob mitochondrial generierte ROS für diese überhöhten zytosolischen Redoxantworten verantwortlich sind. Zu diesem Zweck wurden dynamische, semiquantitative Untersuchungen des Redoxgrundniveaus und des mitochondrialen Redoxverhaltens in neonatalen *Mecp2^{-y}*- und Wildtyp-Neuronen *in vitro* durchgeführt. Als physiologisch relevante Stimuli sind die Neurotransmitter Glutamat, Serotonin, Dopamin und Norepinephrin verwendet worden, da diese Transmittersysteme im RTT verändert sind und signifikanten Einfluss auf die neuronalen Netzwerke ausüben. Das Zellkompartiment, welches durch den genetisch kodierten Redoxsensor roGFP1_m gezielt untersucht werden kann, umfasst die Bereiche der inneren Mitochondrienmembran und der Matrix. RoGFP1 ermöglicht es uns semiquantitative Analysen durchzuführen, die Aufschluss über mitochondriale Dysfunktion geben sollen. Ferner sollte überprüft werden, ob ein Calcium-vermittelter Mechanismus, den Redoxantworten möglicherweise zugrunde liegt.

Zu diesem Zweck wurden hippocampale Zellkulturen angefertigt und mit einem Adeno-assoziierten Virus (AAV-6), mit der Zielsequenz Cytochrom-c-Oxidase der inneren Mitochondrienmembran transduziert. Für die Analyse der Mitochondrien wurden dissoziierte Zellkulturen ausgewählt, da in dieser Präparation zuverlässig einzelne Zellen gemessen werden können und sekundäre Effekte, die im Gewebe auftreten würden, weitestgehend vermieden werden. Somit erlaubt die mitochondriale roGFP1-Expression erstmalig eine semiquantitative Analyse der Redoxgrundsituation und des Redoxverhaltens der mitochondrialen Matrix einzelner Neurone.

Für die Experimente wurden ausschließlich männliche Zuchtmäuse verwendet, da ihre Gonosomen hemizygot vererbt werden und dadurch sichergestellt werden kann, dass

alle männlichen Nachkommen MeCP2 vollständig exprimieren (*Mecp2*^{+*y*}; WT), oder aber ein komplettes Fehlen von MeCP2 vorliegt (*Mecp2*^{-*y*}; *Knockout*). Der RTT-Phänotyp bildet sich ausschließlich beim Vorliegen eines *Mecp2*^{-*y*}-Genotyps vollends aus.

Besondere Aufmerksamkeit erhielten die folgenden Aspekte:

- Unterschiede im basalen Redoxruhegleichgewicht zwischen neonatalen *Mecp2*^{-*y*}- und Wildtyp-Neuronen
- Genotypische Änderungen des Redoxgleichgewichts nach Redoxprovokation durch die applizierten Neurotransmitter
- Untersuchung des Einflusses von Calciumionen auf die mitochondriale ROS-Generierung

3 Material und Methoden

3.1 Genotypisierung der Versuchstiere

3.1.1 Isolation genomischer DNA aus Schwanzbiopsien

Das 1-3 mm große Probenmaterial wird mit 300 µl Lysepuffer (0,05 M Tris pH 8, 0,1 M NaCl, 1% SDS, 0,001 M EDTA in H₂O) und 10 µl Proteinase K für mindestens vier Stunden im Thermomixer bei 55°C und 300 rpm lysiert. Nach dem Entfernen überschüssiger Gewebe- und Fellreste beginnt die eigentliche Aufarbeitung der DNA. Die Fällung der DNA erfolgt mit Isopropanol. Die Probe wird 10 min bei 13500 rpm zentrifugiert und der Überstand wird entfernt. Das verbliebene DNA Pellet wird mit reinem Ethanol gewaschen. Nach dem Trocknen bei 37°C, wird die DNA in 100 µl sterilem Wasser gelöst und bei 4°C gelagert. Alle Chemikalien für die PCR sind von der Firma Roth, andernfalls wird darauf hingewiesen.

3.1.2 Polymerasekettenreaktion

Die PCR ist eine der wichtigsten Methoden im Laboralltag (Saiki et al. 1988). Sie dient der Genotypisierung der für die Experimente genutzten Zuchtmäuse (*Mecp2^{-y}*, *Mecp2^{+y}*). Die isolierte genomische DNA wird durch hohe Temperatur aus ihrer doppelsträngigen Form in Einzelstränge gebracht (Denaturierung). Die Temperatur richtet sich dabei nach dem Guanin-Cytosin (GC)-Gehalt der DNA, da GC-Basenpaare drei Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden und diese eine höhere Energie benötigen, um voneinander getrennt zu werden. Dann erfolgt die Anlagerung (Hybridisierung) der Oligonukleotidprimer jeweils am 3'-Ende des Matrizenstranges. Dafür muss die Temperatur, entsprechend der Länge der Sequenz und des Primers, angepasst werden. Sie liegt ca. 5-10°C unterhalb der Schmelztemperatur des Primers. Die Abkühlung erfolgt schnell, damit sich die DNA-Matrizen nicht wieder zusammenlagern. Eine hitzestabile Taq-Polymerase aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* (Taq) verbindet die im Überschuss vorhandenen Desoxynukleotidtriphosphate (dNTP) mit dem Matrizenstrang in Richtung 5'-Ende (Elongation) (siehe Tab 1). Dieser Zyklus wird 35 Mal wiederholt, um eine ausreichend große Menge amplifizierter DNA für die anschließende Gelelektrophorese zu bekommen. Die Menge an PCR Produkt wächst exponentiell. Alle Zyklen finden im Thermocycler statt (siehe Tab.2).

3.1.3 PCR-Protokoll

Tabelle 1: PCR-Reagenzien und Volumina

Reagenzien	Volumina
DNA	1 μ l
Wasser <small>dest.</small>	9,3 μ l
5x Taq-Puffer (Promega)	4 μ l
MgCl ₂ (Promega)	2 μ l
dNTPs (Peqlab)	1 μ l
KO-vorwärts-Primer	1 μ l (10 pmol/ μ l)
WT-vorwärts-Primer	0,8 μ l (10 pmol/ μ l)
Rückwärts-Primer	0,8 μ l (10 pmol/ μ l)
GoTaq-Polymerase (Promega)	0,1 μ l (5 U/ μ l)

Tabelle 2: Programmzyklen im Thermocycler

1)	95 °C	2 min	Initialdenaturierung	
2)	95 °C	30 s	Denaturierung	} x 35
3)	64 °C	30 s	Primerhybridisierung	
4)	72 °C	40 s	Elongation	
5)	72 °C	7 min	letzte Elongation	
6)	8 °C	∞	Kühlung	

3.1.4 Primer

Sequenzen der, für die *Mecp2*-Genotypisierung verwendeten Primer (Metabion International AG) in 5'-3' Richtung.

KO-vorwärts-Primer CCA TGC GAT AAG CTT GAT GA

WT-vorwärts-Primer GAC CCC TTG GGA CTG AAG TT

Rückwärts-Primer CCA CCC TCC AGT TTG GTT TA

3.1.5 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine molekularbiologische Methode, um Nukleinsäurestränge ihrer Größe nach zu trennen und um ihre Massen anhand von Strängen bekannter Größe zu bestimmen. Das Agarose-Gel besteht aus einer 1,2% igen Agarose - Tris (0,89 M) - Borsäure (0,89 M) - EDTA (0,02 M) - Lösung (TBE), der zusätzlich Roti®GelStain (5 µl in 100 ml Agarose), ein Fluoreszenzfarbstoff zur DNA Markierung, zugesetzt wird. Nach dem Abkühlen werden die Proben (10 µl) und zusätzlich eine 100 Bp-DNA-Leiter (5 µl), als Referenz aufgetragen. Alle Chemikalien sind von der Firma Roth. Der zu amplifizierende Bereich umfasst für *Mecp2*^{+/-} 411 Bp und für *Mecp2*^{-/-} 458 Bp. Entsprechend der unterschiedlichen Länge und somit der Anzahl negativ geladener Teilchen, wandern die DNA Moleküle verschieden weit im elektrischen Feld in Richtung Kathode. Daher ist es möglich, sie anhand des entstandenen fluoreszierenden Bandenmusters, im UV-Licht voneinander zu unterscheiden.

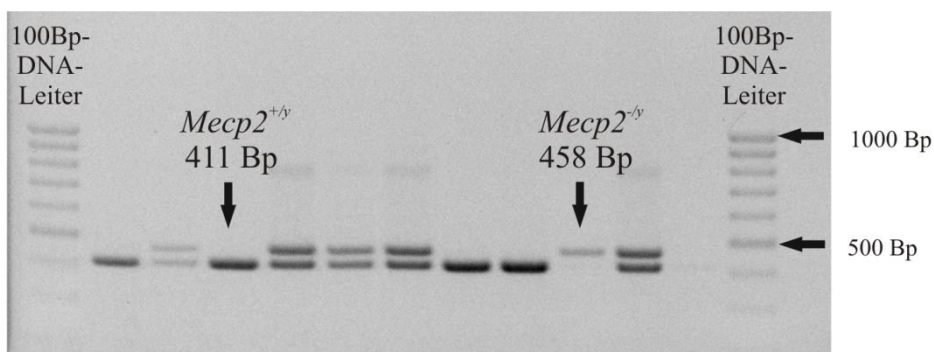


Abbildung 4: PCR-Analyse

Auswertung genomischer DNA von *Mecp2*^{-/-} (458 Bp) und *Mecp2*^{+/-} (411 Bp) Neuronen unter Verwendung einer 100 Bp-DNA-Leiter.

3.2 Das RTT-Maus-Modell

MECP2 spielt eine wichtige Rolle in der neurologischen Entwicklung des Gehirns und der Synapsen sowie koordinativer und sensorischer Funktionen. Physiologische Prozesse, wie Atmung, Regulation des Körpergewichts und Wachstum, werden ebenfalls durch dieses Protein beeinflusst. Tests an *Mecp2*-null-Mäusen zeigten, dass ein Fehlen des Gens zu einem in Phasen unterteilten Verlauf einer neurologischen Entwicklungsstörung führt, die dem Symptomkomplex des RTT entspricht (Guy et al. 2001, Calfa et al. 2011).

Für die vorliegende Arbeit wurden *Mecp2*-Knockout-Mäuse aus der „Bird Linie“ *Mecp2*^{tm1.1Bird} verwendet. Die mit dem Cre-loxP Verfahren erzeugten weiblichen Tiere

weisen ein Fehlen der Exons drei und vier des *Mecp2*-Gens auf (Guy et al. 2001). Für die Zucht werden diese mit männlichen C57BL/6J Wildtypmäusen verpaart. Da *Mecp2* auf dem X-Chromosom lokalisiert ist, bildet sich bei männlichen hemizygoten Nachkommen (*Mecp2*^{-y}) ein fulminantes Erscheinungsbild der Erkrankung aus. Bei weiblichen heterozygoten Nachkommen (*Mecp2*^{+/-}) entwickelt sich ein milderer Phänotyp (Guy et al. 2011), da die Chromosomeninaktivierung zufällig erfolgt. Aufgrund dessen wurden für diese Arbeit ausschließlich männliche Tiere (*Mecp2*^{-y}; WT) verwendet. Die weiblichen heterozygoten Tiere, die zur Verpaarung genutzt wurden, sind zum Teil aus eigener Zucht oder von *Jackson Laboratories* (Bar Harbor, Me.) gekauft worden. Alle Versuche wurden an neonatalen Tieren PD 1-5 durchgeführt.

3.3 Präparation und Kultivierung des Hippocampus

Um einzelne Neurone gezielt auf ihren Redoxstatus und ihr Redoxverhalten hin zu untersuchen und um sekundäre Effekte auszuschließen, wurden dissoziierte Zellkulturen aus *Mecp2*^{-y}- und Wildtyp-Hippocampi hergestellt.

Nach der Dekapitation, wird das Gehirn isoliert und in eine Petrischale mit gekühlter HBSS+20% FCS (*Hank's Balanced Salt Solution*, fetales Kälberserum, 4°C) überführt. Weitere Petrischalen stehen für die Präparation auf Eis bereit. Unter der Stereolupe wird der Hippocampus isoliert. Das Gewebe wird von Glia und anderen kortikalen Geweben gereinigt. Die beiden Enden der Hippocampi werden ebenfalls abgetrennt und der verbliebene Rest in acht bis zehn gleichmäßig große Stücke geschnitten. Diese werden in ein gekühltes 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Alle folgenden Arbeiten finden auf Eis statt. Das Gewebe wird mit ca. 10 ml HBSS+20% FCS zwei Mal gespült und anschließend drei Mal mit 10 ml HBSS um das Serum zu entfernen. Als nächstes soll der Zellverband gelockert werden. Hierzu wird eine Digestionslösung benötigt, die direkt in das Zentrifugenröhrchen filtriert (Filterpore 0,20 µm) wird. Das Gewebe wird mit der Flüssigkeit für 10 min bei 37°C inkubiert (5% CO₂). Es erfolgen jeweils drei Spülgänge mit kalter HBSS+20% FCS und HBSS, beginnend mit der serumhaltigen HBSS, um die Wirkung des Trypsins zu beenden. Das anschließende Waschen mit HBSS sorgt dafür, dass möglichst viel FCS wieder entfernt wird. Durch die Dissoziationslösung werden die Zellen voneinander gelöst und vereinzelt. Als Hilfsmittel werden Pasteurpipetten mit verschiedenen großen Öffnungen benötigt. Anschließend werden die Zellen bei 4°C und 1500 rpm für 10 min zentrifugiert. Nach dem Entfernen des Überstands, wird kaltes Ausplattierungsmedium zugefügt. Die

Deckgläschen werden jeweils mit 30.000-40.000 Zellen beschichtet. Damit die Zellen am Deckgläschen anhaften, werden die Deckgläschen mit einer Lösung aus Matrigel (BD Biosciences, -20°C) und einem Ausplattierungsmedium im Inkubator vorbehandelt. Anschließend wird die Lösung durch die Zellsuspension ersetzt und für eine Stunde inkubiert. Danach wird weiteres Ausplattierungsmedium, mit einer Temperatur von 37°C, zugefügt. Die Zellen verbleiben mindestens 24 h im Inkubator, um sich zu entwickeln. Danach wird das Ausplattierungsmedium durch 37°C warmes Wachstumsmedium ersetzt und im weiteren Verlauf alle zwei bis drei Tage erneuert (ca. 50%).

3.4 Zellkulturmedien und Lösungen

Für die Zellkultur werden verschiedene Medien und Lösungen benötigt, die unter sterilen Bedingungen hergestellt, filtriert (Pore 0,2 µm) und bei 4°C gelagert werden. Das Ausplattierungsmedium enthält *Minimum Essential Medium* (MEM), 10% FCS, 5 mg/ml Glucose, 0,2 mg/ml NaHCO₃, 0,1 mg/ml Transferrin, 2 mM L-Glutamin und 25 µg/ml Insulin. Das Wachstumsmedium enthält MEM, 5 mg/ml Glucose, 0,2 mg/ml NaHCO₃, 0,1 mg/ml Transferrin, 5% FCS, 0,5 mM L-Glutamin, 20 µl/ml B27 50x Supplement, 2 µM CytArabin (Ara C) und 100 µg/ml Penicillin-Streptomycin. *Hank's Balanced Salt Solution* (HBSS) enthält *Hank's Powder* 9,5 g gelöst mit NaHCO₃ 0,35 g/L und 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-Ethansulfonsäure (HEPES) 2,38 g/L in deionisiertem Wasser. Der pH-Wert ist auf pH 7,3-7,4 eingestellt. Die Digestionslösung enthält als Hauptkomponenten NaCl 137 mM, KCl 5 mM, Na₂HPO₄ 7 mM und HEPES 25 mM. Zusätzliche Komponenten sind Trypsin 0,5 g/100ml und DNase 0,05 g/100ml. Die Dissoziationslösung enthält HBSS, 12 mM MgSO₄ und DNase 0,05g/100ml.

Tabelle 3: Verwendete Substanzen und deren Hersteller

Substanzen	Hersteller
B27 50x Supplement	Invitrogen
CytArabin	Sigma-Aldrich
DNase	Sigma-Aldrich
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom
Glucose	Merck
<i>Hank's Powder</i>	Sigma-Aldrich
HEPES	Invitrogen
Insulin	Sigma-Aldrich
L-Glutamin	Invitrogen
MgSO ₄	Merck
<i>Minimal Essential Medium (MEM)</i>	Invitrogen
NaHCO ₃	Roth
NaHPO ₄	Roth
Penicillin-Streptomycin	Biochrom
Transferrin	Calbiochem
Trypsin	Sigma-Aldrich

3.5 Virale Transduktion der Zellkulturen

Die Daten unserer Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass die roGFP1-Expression durch Virustransduktion, unter Verwendung eines Adeno-assoziierten Virus, deutlich bessere Ergebnisse, mit einer Transduktionsrate von 15 %, erzielt hat, als die vorher verwendete Methode mit dem zellunspezifischem Lipofectamin 2000, bei der nur ca. 2-3 % der Neurone transduziert wurden (Can 2016). Der verwendete virale Vektor AAV-6 ist durch seinen Synapsin-1 Promotor zellspezifisch, was dazu führt, dass roGFP1 ausschließlich in Neuronen exprimiert wird. Die verwendete Zielsequenz ist die Cytochrom-c-Oxidase der inneren Mitochondrienmembran. Die virale Transduktion der Zellkulturen erfolgte am zweiten Tag *in vitro* (DIV 2). Dazu wird zunächst das Ausplattierungsmedium durch wachstumsförderndes Nährmedium von 37 °C getauscht und anschließend mit 2,5 µl des AAV-6 Vektors (1:50 Verdünnung in PBS, unverdünnter Titer $1,3 \times 10^8$ Partikel/µl) versetzt. Ein zufriedenstellendes Ergebnis des Expressionsmusters ist nach sechs bis sieben Tagen erreicht.

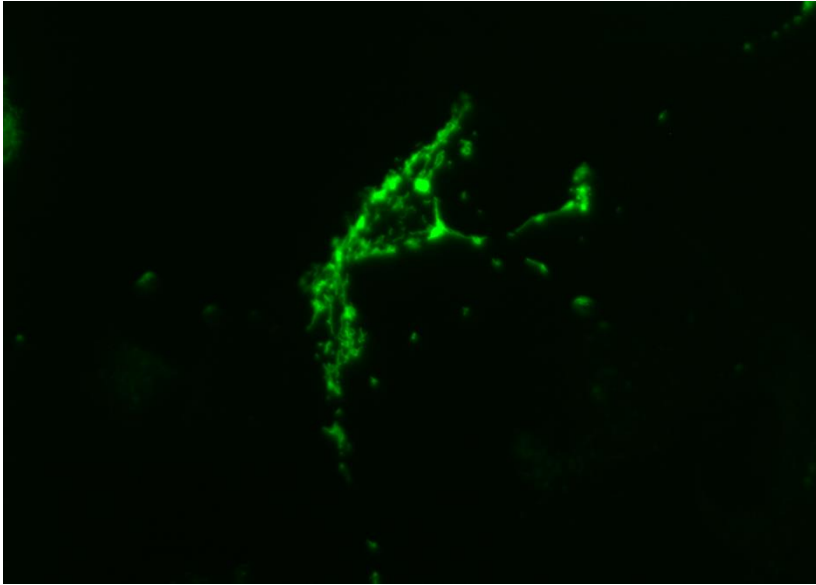


Abbildung 5: Hippocampales Neuron mit mitochondrialer Expression von roGFP1
 Neuronenspezifische Expression von roGFP1, welches aufgrund der Zielsequenz der Cytochrom-c-Oxidase ausschließlich in der inneren Mitochondrienmembran exprimiert wird. Die zentrale Aussparung entspricht dem Bereich des Zellkerns. Die Mitochondrien lagern sich um diesen Bereich und im Bereich der Axone in *Clustern* an. Die Abbildung hat einer Größe von 148x112 μm .

3.6 Pharmaka und Chemikalien

Alle Chemikalien stammen von der Firma Sigma Aldrich, andernfalls wird darauf hingewiesen. Zum Erhalt der Zellen während der optischen Experimente, wird artifizielle Cerebrospinalflüssigkeit (ACSF), bestehend aus (in mM) 130 NaCl, 3.5 KCl, 1.25 NaH_2O_4 , 24 NaHCO_3 , 1.2 CaCl_2 , 1.2 MgSO_4 und 10 Dextrose eingesetzt. Während der Messungen werden die Zellen von 31-33°C warmen ACSF umspült. Durch Begasung der Lösung mit Carbogen (95% O_2 , 5% CO_2), wird ein physiologischer pH-Wert von 7,4 beibehalten. Glutamat (5 mM Stammlösung in H_2O , gelagert bei -20 °C), Norepinephrin, Serotonin und Dopamin werden, der benötigten Konzentration entsprechend, erst kurz vor Versuchsbeginn in ACSF gelöst. Für die Kalibrierung des Redoxsensors wurden H_2O_2 (30% ige Stammlösung in H_2O), als Oxidans, in der Gebrauchskonzentration 5 mM und 1,4-Dithiothreitol (DTT), als Reduktans, in der Konzentration 10 mM verwendet. Fura-2-AM (Molecular Probes), wurde in Dimethylsulfoxid (DMSO) und Pluronic® F-127 im Verhältnis 9:1, zur Optimierung der Zellbeladung gelöst; diese Stammlösung beträgt die Konzentration 1 mM. Zur Farbstoffbeladung der Zellkulturen sind pro Deckgläschen 5 μM Fura-2-AM appliziert worden. Die Fura-2-Eichlösungen enthalten entsprechend ihrer Ca^{2+} Konzentration KCl,

HEPES, 1,2-bis(o-aminophenoxy)ethan-N,N,N',N'-Tetraessigsäure (BAPTA), MgCl₂ und CaCl₂ in unterschiedlichen Mengen (siehe Tab. 4).

Tabelle 4: Komponenten und Konzentrationen der Fura-2-Eichlösungen

Komponenten [mM]	0 M [Ca²⁺]	300 nM [Ca²⁺]	10 mM [Ca²⁺]
KCl	130	130	130
HEPES	10	10	10
BAPTA	10	4	-
MgCl ₂	1	1	1
CaCl ₂	-	3	10

Der pH-Wert der Eichlösungen wurde auf 7,2 eingestellt. 100 µM Fura-2-AM wurden für die Eichung verwendet.

3.7 Molekularer und technischer Hintergrund der Redoxmessungen

Um den Redoxstatus einer Zelle fluorometrisch bestimmen zu können, ist es notwendig, einen Redoxsensor in die Zelle einzubringen. Das von der Qualle *Aequorea Victoria* abstammende, grün fluoreszierende Protein (Wildtyp-GFP, wtGFP), bildet die Grundlage für diese, in der Forschung weitverbreiteten und modifizierten Sensoren. Das ursprüngliche wtGFP ist ein 27 KDa schweres Protein, das aus einer 238 Bp langen Aminosäurekette besteht (Prasher et al. 1992). Es hat zwei diskrete Anregungsmaxima im Wellenlängenbereich von $\lambda_1=395$ nm und $\lambda_2=475$ nm.

Das von uns genutzte modifizierte redoxsensitive GFP (roGFP1), ist an den Aminosäurepositionen C48S, S147C und Q204C gentechnisch verändert worden. Charakteristisch für dieses Molekül ist, dass es abhängig davon, welcher Redoxstatus im untersuchten Kompartiment vorliegt, Disulfidbrücken schnell und reversibel zwischen Cysteinen ausbilden kann. Das Prinzip entspricht dem des in allen Zellen reichlich vorkommenden Glutathions.

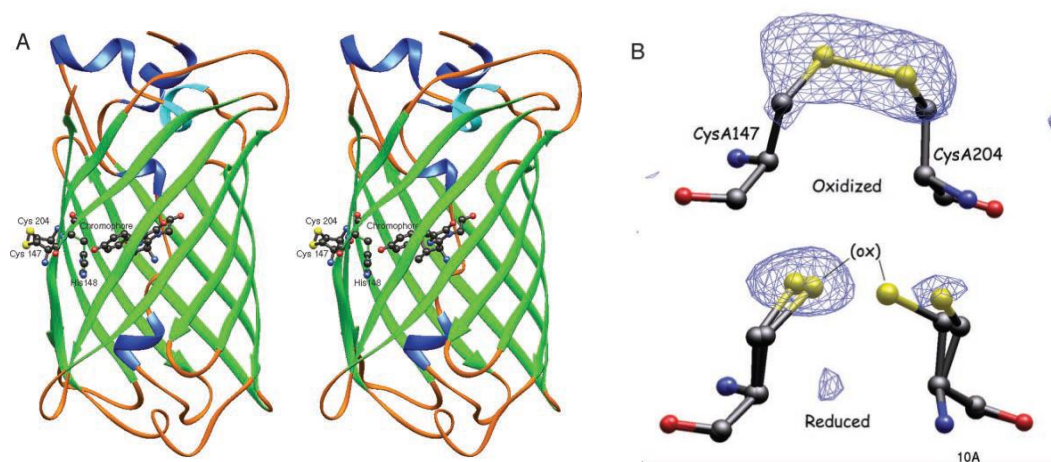


Abbildung 6: Darstellung von roGFP1 mit seinem Chromophor

A) GFP wird durch seine funktionellen Cystein-Substituenten an den Stellen 147 und 204 zum redoxsensitiven GFP1 (roGFP1). Der Einbau der Cysteine nahe des Chromophors gewährleistet die nötigen Strukturveränderungen, die die spektralen Eigenschaften bedingen;

B) Darstellung der Cysteine mit den Aufenthaltswahrscheinlichkeiten ihrer Elektronen, als Kugel-Stub-Modell; *blau-* Stickstoff, *rot-* Sauerstoff, *gelb-* Schwefel, *grau-* Kohlenstoff. Diese Abbildung wurde im Original im *Journal of Biological Chemistry* veröffentlicht. Hanson GT, Aggeler R, Oglesbee D, Cannon M, Capaldi RA, Tsien RY, and Remington SJ. *Investigating mitochondrial redox potential with redox-sensitive green fluorescent protein indicators. J Biol Chem* 279: 13044-13053, 2004, Fig. 2. Key structural features of roGFP2.

Die spektralen Eigenschaften des roGFP resultieren aus Protonenumlagerung (*excited-state proton transfer*, ESPT) im Chromophor, welches durch Ringbildung der drei Aminosäuren S65/Y66/G67 entsteht. Die Phenolgruppe des Tyrosins (Y66) kann protoniert (neutrale A-Form) oder deprotoniert (anionische B-Form) werden. Die neutrale A-Form (protoniert) korrespondiert mit dem Anregungsmaximum $\lambda_1=395$ nm und wird durch Disulfidbrücken zwischen S147C und Q204C stabilisiert. In einem reduzierten Milieu bilden sich keine Disulfidbrücken aus, wodurch die anionische Form des Chromophors, also die deprotonierte Form, stabilisiert wird. Das Absorptionsmaximum der B-Form liegt bei $\lambda_2=475$ nm.

Diese redoxabhängige Interkonversion erlaubt Echtzeitmessungen *in vitro*. Da sich roGFP1 wie andere redoxensitive Proteine, z. B. Glutathion, verhält, wird der aktuelle Redoxstatus und damit die Menge an produzierten ROS in den Mitochondrien, quantitativ verlässlich nachgewiesen. Die Besonderheit, dass nur ein Emissionsmaximum ($\lambda=509$ nm), bei dualer, entgegengesetzter Exzitation besteht, ermöglicht ratiometrisches Messen. Fehlerquellen, wie Schwankungen in der Farbstoffkonzentration, *Photobleaching* oder Unterschiede im Zelldurchmesser können dadurch vernachlässigt werden (Hanson et al. 2004).

Das hier verwendete fluoreszenzmikroskopische Messsystem besteht aus einer Xenon Lichtquelle (Polychrom II; Till Photonics) und einer CCD-Kamera (Imago QE, PCO Imaging, 62% Quanteneffizienz bei 500 nm), die an dem Mikroskop (Axioskop I, Zeiss) montiert ist. Auf dem Objektisch befindet sich die Messkammer, die kontinuierlich mit ACSF, mit einer Flussrate von 4,5 ml/min, gespült wird. Beobachtet werden die Zellen durch ein 60x0.9 NA Wasserimmersionsobjektiv (LUMPlanFl; Olympus). Der Anregungslichtstrahl geht durch einen Anregungsfilter (492 SP) und wird am Strahlenteiler (DC 495 LP) um 90° umgelenkt, damit er von oben senkrecht auf die Zellen trifft. Der Anregungsfilter lässt nur Licht mit einer Wellenlänge $\lambda < 492$ nm hindurch, welches dann am Strahlenteiler umgelenkt wird. Der Emissionsfilter (BP 525/50) verhindert, dass ggf. zurückgestreute Anteile des Anregungslichts auf die Kamera treffen. Die optischen Versuche erfolgen unter einer Abdeckung, um weiteren ungewollten Lichteinfall weitestgehend zu minimieren.

Die Kamera wird mit einer Bildrate von 0,1 Hz und einem 4x4 *binning* (Zusammenfassen benachbarter Bildelemente/Pixel) eingestellt. Die Belichtungsdauer beträgt 100 ms bei 395 nm und 150 ms bei 470 nm.

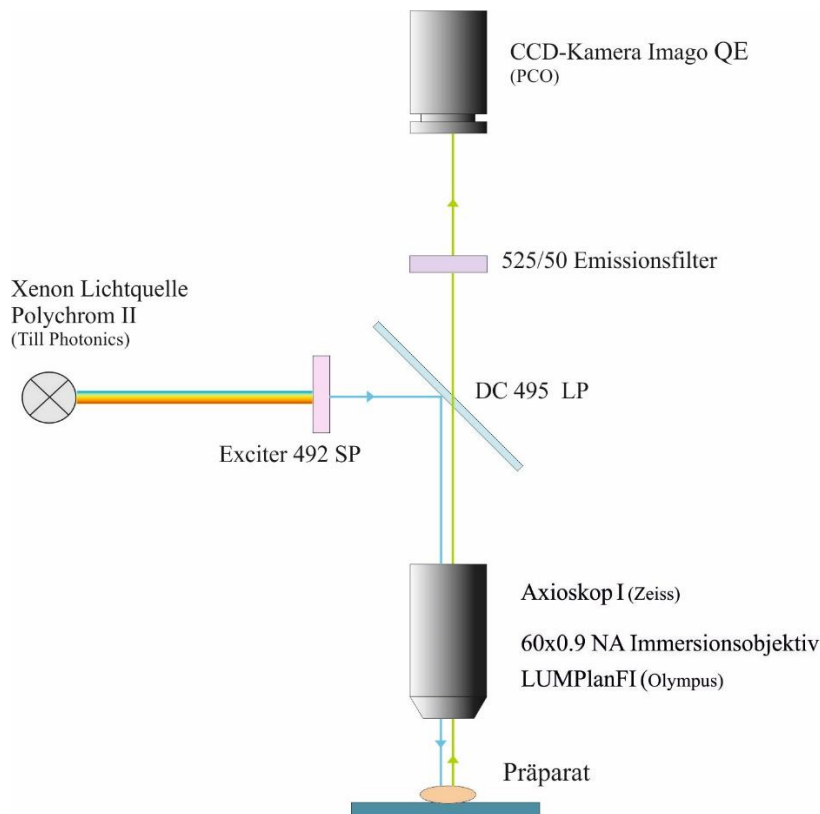


Abbildung 7: Aufbau des Fluoreszenzmikroskops

Dargestellt ist der schematische Aufbau des Fluoreszenzmikroskops mit der Xenon-Lichtquelle (Polychrom II), die den Lichtstrahl auf den Anregungsfilter (492 SP) richtet, welcher nur Strahlen $\lambda < 492$ nm durchlässt. Dieses Licht gelangt über den Strahlenteiler (DC 495 LP) durch das Objektiv (LUMPlanFI) auf das Präparat. Das Emissionslicht wird durch Objektiv, Strahlenteiler (DC 495 LP) und Emissionsfilter auf die CCD-Kamera gelenkt.

Um die registrierte Fluoreszenz zu quantifizieren, wird das Programm TILLvisION (Version 4.0.1; TILL Photonics) benutzt. In die eindeutig roGFP1 exprimierenden Neurone werden manuell markierte Regionen (ROI, *regions of interest*, $\sim 40 \times 60 \mu\text{m}$) gelegt. Aus den Fluoreszenz-Emissionen (F) dieser Regionen, die durch die Anregung mit den Wellenlängen $\lambda_1 = 395$ nm und $\lambda_2 = 475$ nm entstehen, wird deren Verhältnis (Ratio) (F_{395} / F_{475}) berechnet.

3.8 Kalibrierung des Redoxsensors roGFP1

Um den gesamten Arbeitsbereich des Redoxsensors zu kalibrieren, wurde dieser maximal oxidiert (R_{ox} , 5 mM H_2O_2 , 5 min) und maximal reduziert (R_{red} , 10 mM DTT, 5 min) (Hanson et al. 2004, Meyer und Dick 2010, Funke et al. 2011).

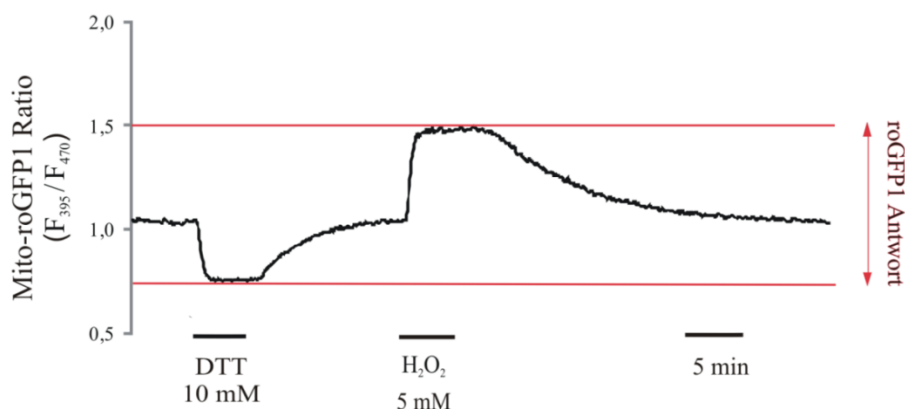


Abbildung 8: Darstellung einer roGFP1-Kalibrierung

Minimale Oxidation bzw. volle Reduktion wurden mit einer 10 mM DTT Lösung erreicht. Die roGFP1-Fluoreszenz-Ratio ist minimal gering. Der Zustand maximaler Oxidation wurde mit einer 5 mM H₂O₂ Lösung erreicht. Die roGFP1-Fluoreszenz-Ratio ist dabei maximal hoch. Aus der Spanne geringer roGFP1-Ratio bei 0% Oxidation und hoher roGFP1-Ratio bei 100% Oxidation, errechnet sich der mögliche Antwortbereich des roGFP1.

Tabelle 5: Zusammenfassung der roGFP1-Kalibrierungswerte

	DTT 10 mM (n=10)			H ₂ O ₂ 5 mM (n=11)		
	<i>Baseline</i>	R_{red}	$\Delta R/R_0$	<i>Baseline</i>	R_{ox}	$\Delta R/R_0$
Mw	1,24	0,81	-0,32	1,15	1,64	0,44
SD	0,27	0,04	0,13	0,17	0,26	0,16

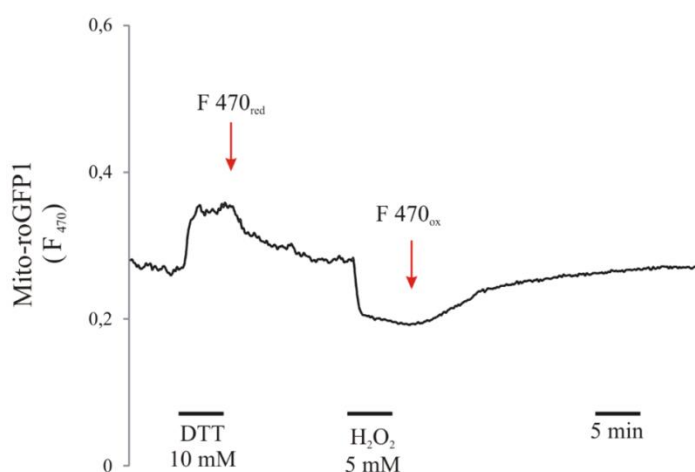


Abbildung 9: Emission bei F 470 nm

Das Diagramm zeigt die gemessene Fluoreszenz-Emission bei einer Anregungswellenlänge von 470 nm. Unter der Verwendung von DTT (10 mM) kommt es zu einer verstärkten Emission, wohingegen es unter H₂O₂ (5mM) zu einer verringerten Emission kommt. Beide Pharmaka wurden 5 min appliziert.

Tabelle 6: RoGFP1 Emission bei 470 nm Anregungswellenlänge

n=10	F 470 _{ox}	F 470 _{red}	F470 _{ox} / F470 _{red}
Mw	0,28	0,54	0,56
SD	0,12	0,3	0,12

Aus den Werten der Kalibrierung kann der relative Oxidationszustand OxD_{roGFP1} einer beliebigen Zelle berechnet werden. R entspricht dabei dem ratiometrischen Wert dieser Zelle zu einem bestimmten Zeitpunkt. R_{red} und R_{ox} entsprechen den Maximalwerten des Antwortbereichs von roGFP1 aus der Kalibrierung. Der *Instrument Factor* (Meyer & Dick, 2010) $F470_{ox} / F470_{red}$ berechnet sich aus den erreichten Intensitäten bei maximaler Oxidation und Reduktion bei 470 nm. Er spiegelt die Setup spezifischen, technischen Gegebenheiten, wie Intensität der Lichtquelle, Transmission durch Glasfaser und Objektiv und die Filtercharakteristik wider. Basierend auf diesen Messgrößen lässt sich so die relative Oxidation des roGFP-Sensors (OxD_{roGFP1}) bestimmen.

$$OxD_{roGFP1} = \frac{R - R_{red}}{\frac{F 470_{ox}}{F 470_{red}} (R_{ox} - R) + (R - R_{red})}$$

Um die semiquantitative Aussage des relativen Oxidationswerts in eine quantitative Aussage umzuwandeln, muss OxD_{roGFP1} in die Nernst Gleichung eingesetzt werden. Das dadurch berechnete zugehörige Redoxpotential E_{roGFP1} des roGFP1m-Redoxpaares bedeutet eine echte Quantifizierung des Vermögens Elektronen in einer chemischen Reaktion abzugeben und dadurch oxidiert zu werden. Das Standardredoxpotential für roGFP1 ($E^{0'}_{roGFP1}$) beträgt -291 mV (Hanson et al. 2004).

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

$R=8,31447 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ (allgemeine Gaskonstante)

T=Temperatur in K

F=96485,34 C / mol (Faraday Konstante)

3.9 Molekularer und technischer Hintergrund der Calciummessung

Fura-2 (Pentakaliumsalz, Invitrogen) ist ein synthetischer Fluoreszenzfarbstoff, der zum Nachweis freier Ca^{2+} -Ionen verwendet wird. Seine vier negativ geladenen Carboxylgruppen können ein Ca^{2+} -Ion komplexieren. Der Farbstoff wird als unpolarer, calciuminsensitiver Fura-2-Ester (Fura-2-AM, Acetoxymethyl-Ester) in die Zelle geschleust. Anschließend spalten unspezifische Esterasen die fünf Acetoxymethylgruppen ab, wodurch Fura-2 calciumsensitiv wird und die Zelle- trotz seines ausgedehnten aromatischen Systems- nicht mehr verlassen kann. In der Zelle bildet Fura-2 einen Chelatkomplex mit freien Ca^{2+} -Ionen. Bei 340 nm lässt er sich in seiner Calcium komplexierten Form und bei 380 nm in seiner freien Form anregen. Die Emissionsmaxima beider Formen liegen bei 510 nm. Fura-2 zeichnet sich im Vergleich zu anderen Fluoreszenzfarbstoffen durch eine bessere Selektivität gegenüber Magnesium und anderen bivalenten Metallionen aus (Grynkiewicz et al. 1985).

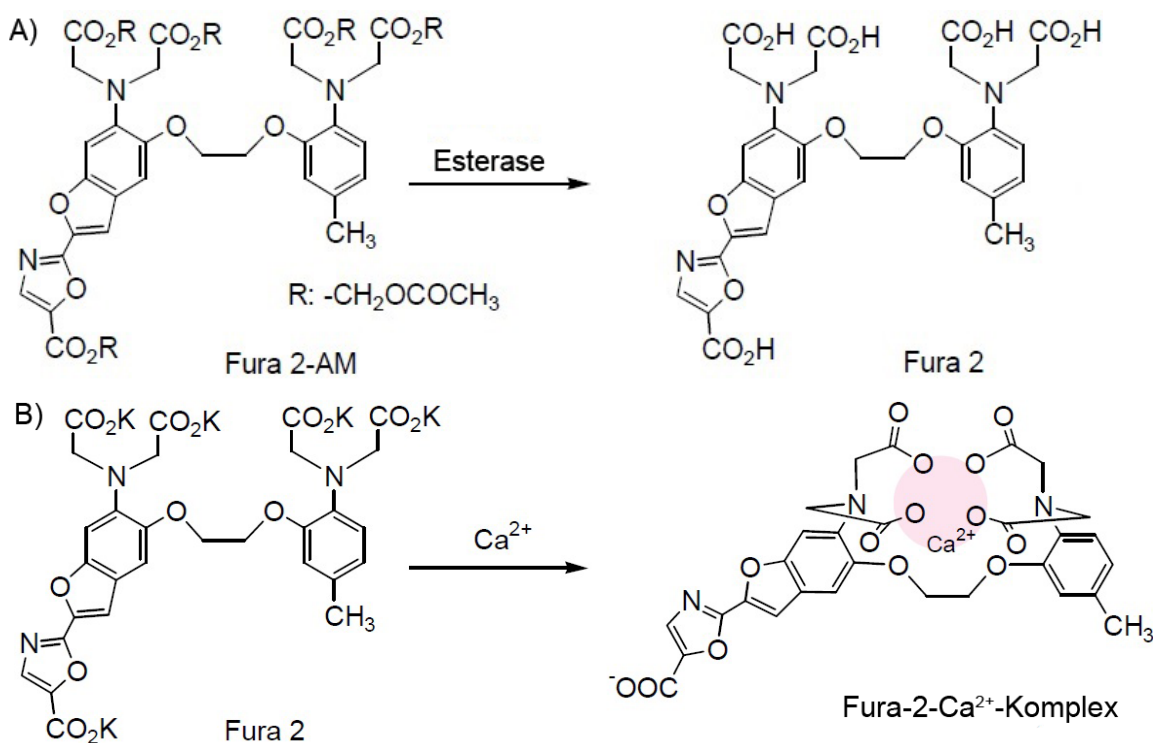


Abbildung 10: Darstellung von Fura-2-AM, Fura-2 und Fura-2- Ca^{2+} -Chelatkomplex

A) Fura-2-AM wird in die Zelle geschleust und von unspezifischen Esterasen zu Fura-2 gespalten.

B) Fura-2 kann die Zelle nicht mehr verlassen und bildet in Anwesenheit von Calcium Chelatkomplexe aus.

Da sich der Farbstoff- ebenso wie roGFP- exzitations-ratiometrisch verhält, kann nach entsprechender Kalibrierung, anhand zweier Wellenlängen die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration $[\text{Ca}^{2+}]_i$ berechnet werden. Den technischen Gegebenheiten in unserem

Labor entsprechend, wurden die Wellenlängen $\lambda_1=345$ nm und $\lambda_2=380$ nm verwendet. Alle Ca^{2+} -Messungen wurden an demselben Mikroskop und unter den gleichen Bedingungen (ACSF, Temperatur, Flussrate, pH-Wert), wie die Redoxmessungen durchgeführt. Die Bildrate der CCD-Kamera beträgt 0,1 Hz mit einem 4x4 *binning*. Es wurde ein Fura-2 spezifischer Filtersatz (Strahlenteiler BS 409; Emissionsfilter 510/84) verwendet. Die Belichtungszeiten (45 ms bei 345 nm, 35 ms bei 380 nm) wurden ebenso angepasst.

Die hippocampalen Neurone wurden mit einer 5 μM Fura-2-AM Lösung im Inkubator (37°C, 5% CO_2) beladen. Für ein zufriedenstellendes Ergebnis beträgt die Beladungszeit 30 min. Die zu messenden Zellen sollen möglichst frei von Gliazellen sein, um eine fehlerhafte Anregung und Emission zu vermeiden. Zum Teil wurden mehrere Transmitter nacheinander an einer Zelle getestet, da sich die Ratio oftmals, nach entsprechender Auswaschzeit, dem Ruhegleichgewicht wieder annäherte.

3.10 Kalibrierung des Farbstoffs Fura-2

Die Fluoreszenz des chemischen Farbstoffs Fura-2 ist *in vitro* kalibriert worden (Neher, Müller und Ballanyi 2003). Die Fura-2-Eichlösungen (siehe Tab. 4), 100 μM Fura-2 enthaltend, mit den Konzentrationen 0 M Ca^{2+} , 300 nM Ca^{2+} und 10 mM Ca^{2+} , wurden zur Bestimmung der Kalibrierungskonstanten R_{\min} , R_{\max} und des *Instrument Factors* $F_{380_{\max}}$ / $F_{380_{\min}}$ eingesetzt. Für die optische Messung wurde ein 63 x 1,0 VisIR Objektiv (W-Plan-Apochromat, Zeiss), wegen einer besseren UV-Transmission, verwendet.

Tabelle 7: Zusammenfassung der Fura-2-Kalibrierung

	R_{\min}	R_{\max}	$F_{380_{\max}}$	$F_{380_{\min}}$	$F_{380_{\max}} / F_{380_{\min}}$
Mw	0,22	1,81	2,62	0,43	6,07

Die genannten Werte sind unter Berücksichtigung der Hintergrundstrahlung korrigiert worden.

Die Umrechnung der ratiometrischen Werte in tatsächliche Ca^{2+} -Konzentrationen, erfolgt mit Hilfe der Dissoziationskonstante K_d . Diese liegt laut Ion Optix bei 225 nM (<http://www.ionoptix.com/wp-content/uploads/2014/07/Calcium-Calibration.pdf>) und entspricht in etwa der, von Gryniewicz und Kollegen vorgeschlagenen ($K_d=224$ nM in 100 mM KCL, 37°C, pH=7,08) (Gryniewicz et al. 1985). In unserem Fall wurde mit

$K_d = 225$ nM gerechnet. Sf_2 / Sb_2 bezieht die Setup spezifischen Gegebenheiten in die Berechnung mit ein (*Instrument Factor*) und entspricht den Intensitäten der Fluoreszenz-Emission bei 380 nm ($Sf_2 / Sb_2 = F_{380_{\min}} / F_{380_{\max}}$).

$$[Ca^{2+}] = K_d \times \frac{R - R_{\min}}{R_{\max} - R} \times \frac{Sf_2}{Sb_2}$$

3.11 Statistik

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

4 Ergebnisse

Gemäß der Fragestellung, ob die Mitochondrien, Quelle der ROS und somit Ursache für den oxidativen Stress der Neurone in MeCP2-defizienten Mäusen sind, wurde ein Versuchskonzept erstellt, das mit Hilfe eines fluoreszierenden, redoxsensitiven Proteins, ROS-bedingte subzelluläre Redoxveränderungen detektieren und semiquantitativ messen soll. Die Neurone wurden als einzelne Zellen in primären Zellkulturen gemessen. Das umgebende Milieu ist dabei den natürlichen Gegebenheiten im Gehirn nachempfunden. Appliziert wurden die Neurotransmitter Glutamat, Norepinephrin, Dopamin und Serotonin. Die, durch Stimulation der Neurone, generierten Redoxantworten, wurden in Abhängigkeit von den Transmittern untersucht. Mit dem gleichen Versuchsmodell wurde der intrazelluläre Calciumgehalt der Neurone gemessen, um zu verstehen, ob zytosolisches Calcium, als sekundärer Botenstoff (*Second Messenger*) bei der Generierung von mitochondrialem ROS eine Rolle spielen könnte. Der zytosolische Calciumgehalt wurde mit Fura-2 fluorometrisch bestimmt. Damit die Ergebnisse der optischen Messungen verlässlich sind, wurden zuvor der Sensor (roGFP1) und der Farbstoff (Fura-2) kalibriert (siehe 2.8 und 2.10).

4.1 Transmitter-induzierte mitochondriale Redoxänderungen

Das mitochondriale Redoxgleichgewicht der Wildtypen hippocampaler Neurone liegt unter Ruhebedingungen bei $1,12 \pm 0,13$ (n=83). Dies entspricht einer relativen Oxidationsstufe (OxD_{roGFP1}) von $0,5 \pm 0,17$ und einem berechneten Redoxpotential E_{roGFP1} von -291,1 mV. Da das Standardredoxpotential für roGFP1 $E_0'_{roGFP1}$ und das berechnete Redoxpotential E_{roGFP1} den gleichen Wert haben, liegt roGFP1 zu 50 % oxidiert und 50 % reduziert in der mitochondrialen Matrix vor. Es existieren nahezu identische Werte für die mitochondriale Redoxbalance in hippocampalen *Mecp2*^{-/-}-Neuronen ($1,12 \pm 0,14$, n=43).

Tabelle 8: Redoxruhegleichgewicht von WT- und *Mecp2*^{-/-}-Mitochondrien

	Wildtyp (n=83)			<i>Mecp2</i> ^{-/-} (n=43)		
	<i>Baseline</i>	OxD_{roGFP1}	E_{roGFP1}	<i>Baseline</i>	OxD_{roGFP1}	E_{roGFP1}
Mw	1,12	0,5	-291,1 mV	1,12	0,5	-290,9 mV
SD	0,13	0,17	10,1 mV	0,14	0,18	11,4 mV

Wie in vorangegangenen Arbeiten gezeigt wurde, reagieren *Mecp2*^{-/-}-Hippocampi mit einer deutlich stärkeren Redoxverschiebung auf Redoxstimulationen, wie H₂O₂ oder schwerer Hypoxie, als WT-Hippocampi. Um zu quantifizieren inwieweit es zu möglichen überhöhten Reaktionen, auch auf physiologische Reize, auf subzellulärer Ebenen der *Mecp2*^{-/-}-Neurone kommt, wurden verschiedenen Neurotransmitter, zur Steigerung der neuronalen Aktivität eingesetzt. Die Applikation von Glutamat (50 μ M, 5 min) induziert ein charakteristisches, biphasisches Antwortmuster. Die Mitochondrien beider Genotypen reagieren nach ungefähr drei Minuten mit einer initialen reduzierenden Verschiebung. Diese besteht für fünf bis sieben Minuten. Die darauffolgende oxidative Verschiebung übersteigt das Redoxruhegleichgewicht nur gering. In den meisten Zellen erreichen die Mitochondrien ihr Redoxruhegleichgewicht wieder nach ungefähr 25-30 min.

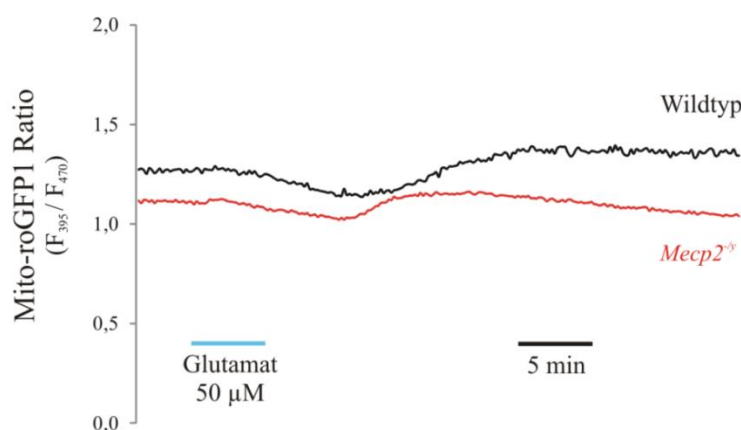


Abbildung 11: RoGFP1-Ratio durch Glutamat moduliert

Charakteristische roGFP1-Redoxänderung, bestehend aus einer reduzierenden Verschiebung und der darauf folgenden oxidativen Verschiebung.

Die initiale reduzierende Verschiebung ($\Delta R/R_0$) beträgt in WT-Neuronen $-0,07 \pm 0,05$ (n=22). Die entsprechende Änderung des Redoxpotentials ΔE_{roGFP1} ist $-5,61 \pm 4,03$ mV. In *Mecp2*^{-/-}-Neuronen ist der Wert nahezu identisch ($-0,07 \pm 0,04$, n=9) (siehe Tab. 9).

Tabelle 9: Initiale reduzierende Verschiebung der Glutamat-Redoxantwort

	Wildtyp (n=22)		<i>Mecp2</i> ^{-/-} (n=9)	
	$\Delta R/R_0$	ΔE_{roGFP1}	$\Delta R/R_0$	ΔE_{roGFP1}
Mw	-0,07	-5,61 mV	-0,07	-5,59 mV
SD	0,05	4,03	0,04	2,83

Die darauf folgende oxidative Verschiebung ($\Delta R/R_0$) beträgt in WT-Neuronen $0,07 \pm 0,05$ (n=19), das entspricht einer Änderung des Redoxpotentials ΔE_{roGFP1} um $5,5 \pm 4,25$ mV. Die positive Änderung ($\Delta R/R_0$) in *Mecp2^{-/-}*-Neuronen beträgt $0,05 \pm 0,04$ (n=5). Demnach existieren auch hier wieder nahezu identische Werte im Redoxpotential der *Mecp2^{-/-}*-Neurone ($4,55 \pm 3,0$ mV, n=5).

Tabelle 10: Oxidative Verschiebung der Glutamat-Redoxantwort

	Wildtyp (n=19)		<i>Mecp2^{-/-}</i> (n=5)	
	$\Delta R/R_0$	ΔE_{roGFP1}	$\Delta R/R_0$	ΔE_{roGFP1}
Mw	0,07	5,5 mV	0,05	4,55 mV
SD	0,05	4,25	0,04	3,0

Von insgesamt 26 gemessenen WT-Neuronen, reagierten auf Glutamat 84,6% (22 Zellen) mit einer initialen reduzierenden Verschiebung und 73,1% (19 Zellen) mit einer oxidativen Verschiebung. Von den 13 gemessenen *Mecp2^{-/-}*-Neuronen reagierten 69,2% (9 Zellen) mit einer reduzierenden Verschiebung und nur 38,5% (5 Zellen) mit einer oxidativen Verschiebung. Einige Neurone (WT n=3, *Mecp2^{-/-}* n=3) zeigten ein fortwährendes Ansteigen in der roGFP1-Ratio ohne Plateauphase, sodass angenommen werden konnte, dass sie ihre Zellfunktion nicht mehr aufrecht halten konnten, folglich wurden diese Zellen nicht in die Berechnung mit einbezogen.

Die roGFP1-Redoxänderung nach Applikation von Serotonin (5-HT, 100 μ M, 10min), ist in WT-Neuronen nur verschwindend gering (siehe Tab. 11). In *Mecp2^{-/-}*-Neuronen ist sie durch einen schwachen Anstieg in Richtung Oxidation gekennzeichnet, der ungefähr mit einer Latenz von 8 min beginnt. In *Mecp2^{-/-}*-Neuronen beträgt die Änderung $0,17 \pm 0,14$ (n=7). Das Redoxpotential ΔE_{roGFP1} entspricht $13,74 \pm 10,25$ mV. Die Redoxänderung ist in *Mecp2^{-/-}*-Neuronen signifikant höher (p=0,001) als in WT-Neuronen ($0,03 \pm 0,04$, n=17).

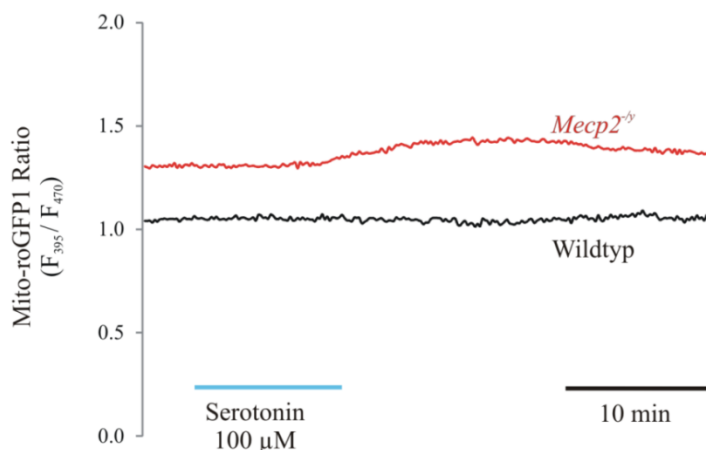


Abbildung 12: RoGFP1-Ratio durch 5-HT moduliert

Unter 5-HT-Gabe zeigt das WT-Neuron keine offensichtliche oxidative Verschiebung, wohingegen das *Mecp2*^{-/-}-Neuron, mit einer Latenz von ca. 8 min, einen leichten oxidativen Anstieg zeigt ($p=0,001$), der dann langsam wieder abklingt.

Tabelle 11: Serotonin-induzierte Redoxantwort

	Wildtyp (n=17)		<i>Mecp2</i> ^{-/-} (n=7)	
	$\Delta R/R_0$	ΔE_{roGFP1}	$\Delta R/R_0$	ΔE_{roGFP1}
Mw	0,03	2,9 mV	0,17	13,74 mV
SD	0,04	3,27	0,14	10,25

Die roGFP1-Redoxänderungen auf Dopamin-Gabe (500 μ M, 3 min) zeigen in allen gemessenen Neuronen, sowohl innerhalb als auch zwischen den Genotypen, ein sehr einheitliches Antwortmuster. Es besteht aus einem steilen Anstieg, ca. ein bis zwei Minuten nach Beginn der Applikation in der roGFP1-Ratio und einem steilen Abfallen dieser nach Beendigung der Dopamin-Gabe. In der Auswaschphase erreichen die Neurone ihr vorheriges Redoxruhegleichgewicht wieder.

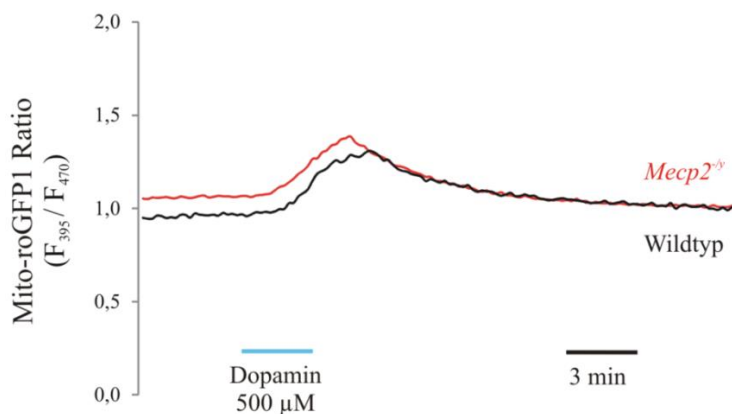


Abbildung 13: RoGFP1-Ratio durch Dopamin moduliert

Charakteristisches roGFP1 Antwortmuster induziert durch den Transmitter Dopamin, bestehend aus zügiger Oxidation der roGFP1-Ratio, mit Beginn der Applikation und raschem Abfall, nach Beendigung der Dopamin-Gabe.

Die positive Änderung $\Delta R/R_0$ beträgt in den WT-Neuronen $0,11 \pm 0,08$ ($n=17$). Das Redoxpotential ΔE_{roGFP1} steigt demnach um $10,7 \pm 10,0$ mV. Verglichen mit den *Mecp2*^{-/-}-Neuronen, ergeben sich keine signifikanten Unterschiede ($0,11 \pm 0,09$, $n=9$) (siehe Tab. 12).

Tabelle 12: Dopamin-induzierte Redoxantwort

	Wildtyp (n=17)		<i>Mecp2</i> ^{-/-} (n=9)	
	$\Delta R/R_0$	ΔE_{roGFP1}	$\Delta R/R_0$	ΔE_{roGFP1}
Mw	0,11	10,7 mV	0,11	8,02 mV
SD	0,08	10,0	0,09	5,74

Die optischen Messungen mit Norepinephrin wurden mit zwei unterschiedlichen Konzentrationen (200 μ M und 500 μ M, jeweils 3 min) durchgeführt. Die roGFP1-Redoxänderungen sind zwischen den Genotypen, bei beiden Konzentrationen nur äußerst schwach ausgebildet (siehe Abb. 13). Die durch Norepinephrin 200 μ M ausgelöste Änderung war in WT-Neuronen praktisch kaum sichtbar. Nahezu identische Werte existieren für die *Mecp2*^{-/-}-Neurone (siehe Tab. 13). Die durch Norepinephrin 500 μ M ausgelöste positive Änderung beträgt WT-Neuronen $0,04 \pm 0,02$ ($n=9$), dementsprechend beträgt die Änderung des Redoxpotentials ΔE_{roGFP1} $3,18 \pm 2,37$ mV. Auch hier gibt es fast keine Unterschiede in der roGFP1-Redoxänderung in *Mecp2*^{-/-}-Neuronen ($0,03 \pm 0,02$, $n=6$) (siehe Tab.13).

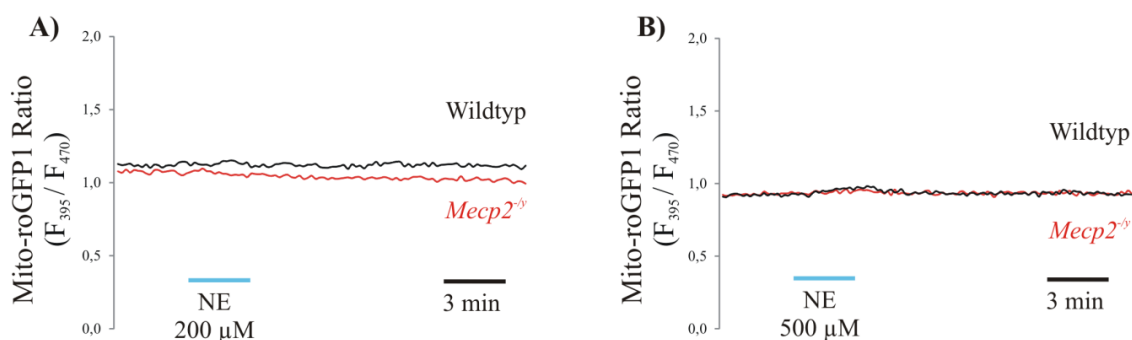


Abbildung 14: RoGFP1-Ratio-Änderung nach Applikation von Norepinephrin

A) Applikationen von 200 μM Norepinephrin zeigen bei beiden Genotypen keine offensichtlichen Redoxantworten.

B) Applikation von 500 μM Norepinephrin zeigen bei beiden Genotypen nur eine geringfügige Verschiebung in Richtung Oxidation. Das Grundniveau wird in der Auswaschphase bei beiden Genotypen wieder erreicht.

Tabelle 13: Norepinephrin-induzierte Redoxantworten

	NE 200 μM				NE 500 μM			
	WT (n=9)		<i>Mecp2</i> ^{-/-} (n=5)		WT (n=9)		<i>Mecp2</i> ^{-/-} (n=6)	
	$\Delta R/R_0$	ΔE_{roGFP1}	$\Delta R/R_0$	ΔE_{roGFP1}	$\Delta R/R_0$	ΔE_{roGFP1}	$\Delta R/R_0$	ΔE_{roGFP1}
Mw	-0,002	-0,19 mV	-0,012	-0,95 mV	0,04	3,18 mV	0,03	2,74 mV
SD	0,01	0,92	0,01	1,1	0,02	2,37	0,02	1,7

Zusammenfassend zeigten sich, entgegen unseren Erwartungen, keine eindeutigen Unterschiede zwischen WT- und *Mecp2*^{-/-}-Neuronen im mitochondrialen Redoxruhegleichgewicht. Ebenso sind die Redoxänderungen nach physiologischer Stimulation durch die Neurotransmitter nahezu gleich. Lediglich bei Stimulation durch Serotonin konnte ein signifikanter Unterschied zwischen WT- und *Mecp2*^{-/-}-Neuronen, bezüglich der Änderung des Redoxgleichgewichts $\Delta R/R_0$ ($p=0,001$) und der Änderung der Redoxpotentiale ΔE_{roGFP1} ($p<0,001$) nachgewiesen werden (siehe Abb. 15).

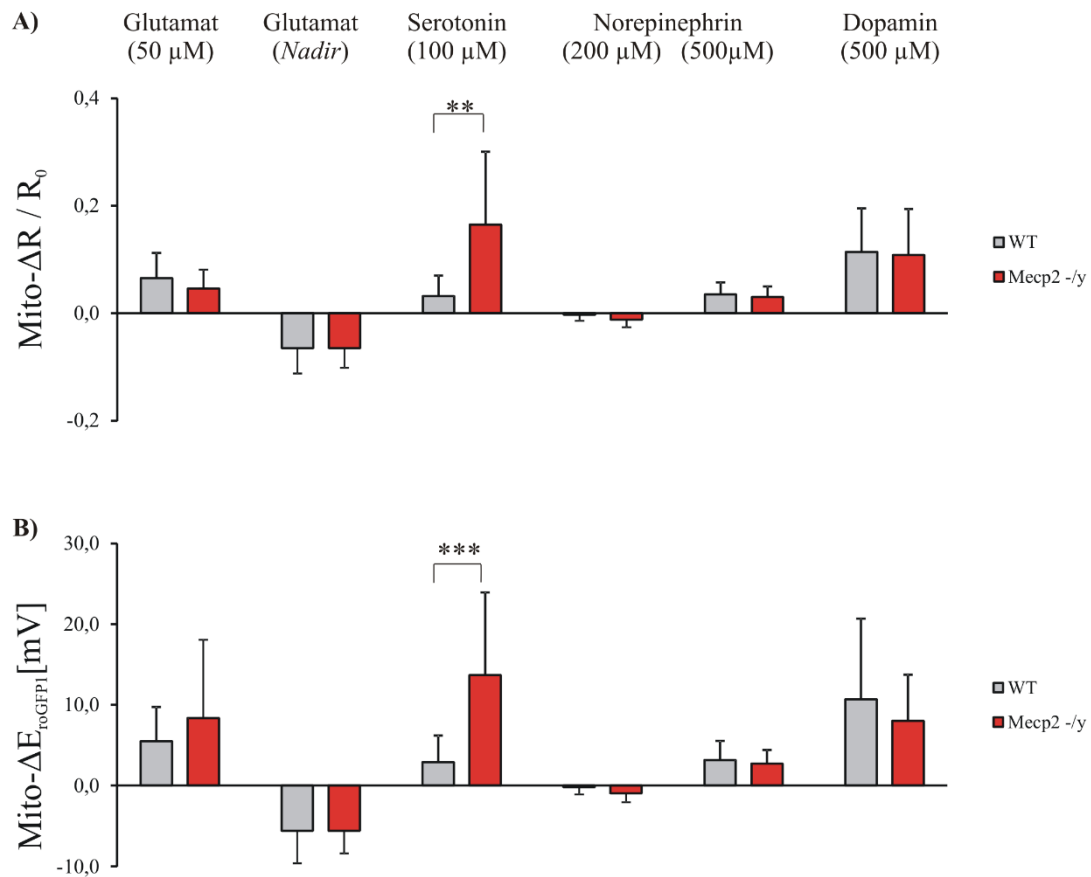


Abbildung 15: Darstellung der Änderung $\Delta R/R_0$ und der Redoxpotentiale ΔE_{roGFP1} aller Neurotransmitter

A) Prozentuale Auftragung der Änderung des Redoxstatus, induziert durch die jeweiligen Neurotransmitter. Genotypische Unterschiede treten nur nach Serotonin Applikation ($p=0,001$) auf.

B) Entsprechend sind bei zusammenfassender Betrachtung der entsprechenden Redoxpotentiale auch nur bei Serotonin genotypische Unterschiede zu beobachten ($p<0,001$). WT-Neurone sind grau und *Mecp2*^{-/y}-Neurone sind rot dargestellt.

4.2 Transmitter-induzierte zytosolische Calciumänderung

Calcium fungiert intrazellulär einerseits als *Second Messenger* und ist somit ein wichtiger Parameter in der Signaltransduktion, auf der anderen Seite kann es aber bei zu hohen intrazellulären Konzentrationen zur Zellschädigung bis hin zum Zelltod kommen. Mit dem synthetischen Farbstoff Fura-2 wurde untersucht, ob die Neurotransmitter Glutamat, Serotonin, Norepinephrin und Dopamin zu Änderungen des zytosolischen Calciums $[Ca^{2+}]_i$ führen, um so einen möglichen Zusammenhang mit den zuvor bestimmten Redoxantworten zu untersuchen. Wegen der spektralen Überlappung von roGFP1 und Fura-2 konnten die Redoxänderungen nicht zeitgleich mit den Calciumänderungen gemessen werden. Zum Abgleich der beiden Messgrößen wurden identische Messprotokolle wie bei den Redoxmessungen verwendet. Im Rahmen dieser

fluorometrischen Ca^{2+} -Messungen wurde die mittlere zytosolische Ruhekonzentration $[\text{Ca}^{2+}]_i$ bestimmt. In WT-Neuronen beträgt sie $67,2 \pm 44,9$ nM ($n=111$). In *Mecp2*^{-/-}-Zellen war die Konzentration $[\text{Ca}^{2+}]_i$ mit $86,2 \pm 61,8$ nM ($n=50$) signifikant ($p < 0,05$) höher. Im Folgenden soll auf die jeweiligen Transmitter-induzierten Änderungen $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ genauer eingegangen werden.

Glutamat (50 μM ; 5 min) hat von allen getesteten Neurotransmittern am stärksten Einfluss auf die zelluläre Calciumkonzentration gezeigt. Unmittelbar nach dem Beginn der Applikation (ca. 1 min), steigt das zytosolische Calcium $[\text{Ca}^{2+}]_i$ sehr stark an. Es bildet sich eine Plateauphase, die ungefähr 1-2 min nach Beendigung der Glutamat-Gabe wieder steil abfällt. In der Auswaschphase wird das Grundniveau wieder erreicht (siehe Abb.17). Die Änderung der Calciumkonzentration $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ beträgt in WT-Neuronen im Mittel $298,1 \pm 245,2$ nM ($n=28$) und in *Mecp2*^{-/-}-Neuronen $451,5 \pm 560,9$ nM ($n=28$). Damit liegt kein genotypischer Unterschied vor, jedoch zeigt sich ein Trend ($p=0,08$).

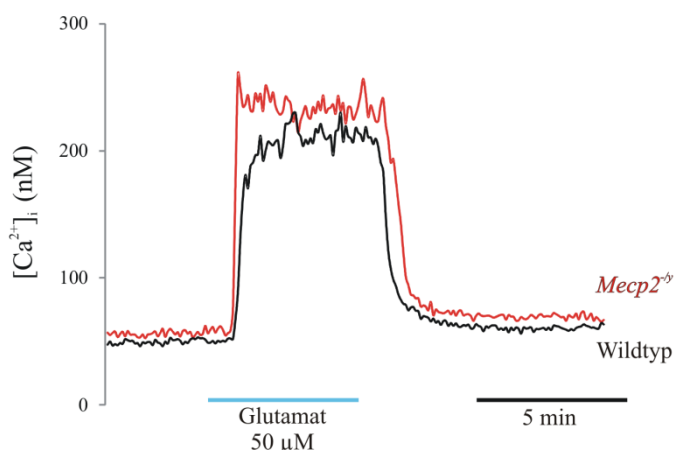


Abbildung 16: Zytosolische Calciumkonzentrationen nach Glutamat-Gabe

Beide Neurone, WT (schwarz) und *Mecp2*^{-/-} (rot), antworten auf Glutamat unmittelbar mit einem sehr steilen Anstieg des zellulären Calciums, gefolgt von einer Plateauphase. In der Auswaschphase fällt $[\text{Ca}^{2+}]_i$ rasch wieder ab und beide Neurone erlangen ihr Grundniveau wieder.

Serotonin (100 μM , 10 min) bewirkte nur einen moderaten Anstieg des $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in WT-Neuronen, der erst mit einer deutlichen Latenz von 8-10 min eintritt. In *Mecp2*^{-/-}-Neuronen ist der Anstieg stärker ausgeprägt, jedoch beginnt dieser zunächst mäßig steigend, mit einer Latenz von 6 min. Nach 10 min, ab Beginn der Applikation von Serotonin, zeigte sich in *Mecp2*^{-/-}-Neuronen ein deutlicher weiterer Anstieg des $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Trotz des Auswaschens von Serotonin, wird das Calciumausgangsniveau von beiden Genotypen nicht wieder erreicht. Der mittlere Anstieg der Calciumkonzentration

$\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ beträgt in den WT-Neuronen $19,2 \pm 23,8$ nM ($n=32$). In *Mecp2*^{-/-}-Neuronen ist $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ signifikant höher ($40,8 \pm 39,4$ nM, $n=32$, $p < 0,01$).

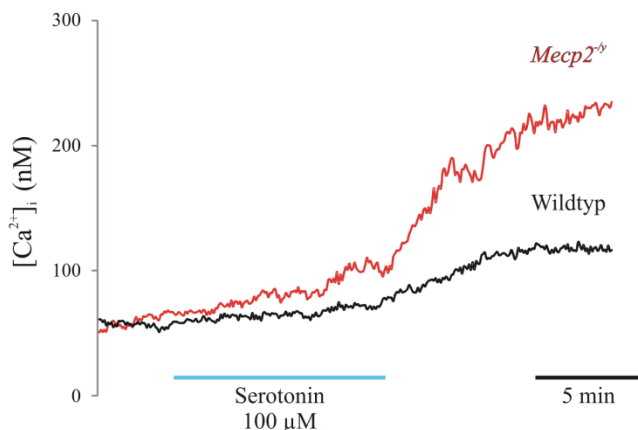


Abbildung 17: Zytosolische Calciumkonzentration nach Serotonin-Gabe

Mecp2^{-/-}-Neurone (rot) reagieren früher und mit einem stärkeren $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$, als WT Neurone ($p < 0,01$). Das Calciumruhegleichgewicht wird in beiden Genotypen, nach dem Auswaschen von Serotonin, nicht wieder erreicht.

Dopamin führt zu einem moderaten, jedoch steilen Anstieg des $[\text{Ca}^{2+}]_i$, der mit einer Latenz von 1-2 min eintritt. Zunächst bildet sich eine Plateauphase aus, welche ungefähr für 4-5 min bestehen bleibt und dann langsam abgebaut wird. Ungefähr 7-8 min nach Beginn der Applikation haben die Neurone nahezu wieder ihr Ausgangsgleichgewicht erreicht. Dies findet in WT- und *Mecp2*^{-/-}-Neuronen gleichermaßen statt. Die mittlere Änderung der Calciumkonzentration $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ in WT-Neuronen beträgt $19,7 \pm 16,5$ nM ($n=30$). Nahezu identische Werte sind in *Mecp2*^{-/-}-Neuronen aufgetreten ($22,3 \pm 17,5$ nM, $n=17$).

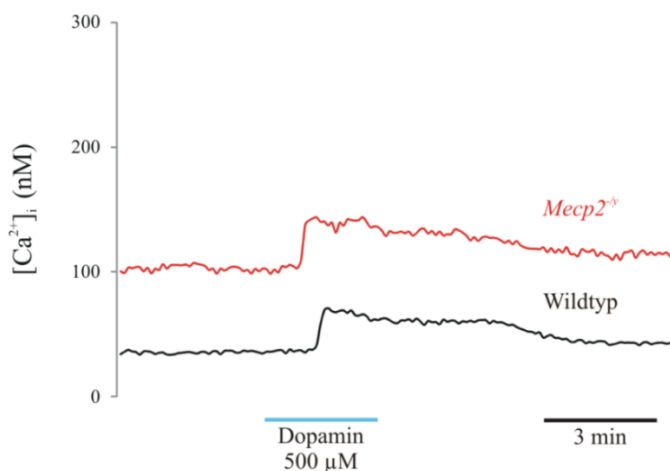


Abbildung 18: Zytosolische Calciumkonzentration nach Dopamin-Gabe

Das $[\text{Ca}^{2+}]_i$ steigt in beiden Genotypen rasch an und bildet eine Plateauphase von ca. 5 min aus. Das Grundniveau wird ca. 7-8 min nach Auswaschen des Transmitters wieder erreicht.

Norepinephrin wurde für die Calciummessungen nur in der höheren Konzentration (500 μM , 3 min) verwendet. In beiden Genotypen war ein geringer Anstieg des $[\text{Ca}^{2+}]_i$, gefolgt von einer langen Plateauphase, zu beobachten. Die Änderung ist bei beiden Genotypen nur sehr gering. Ein Calciumausgangsgleichgewicht wurde in der Auswaschphase weitestgehend wieder erreicht. $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ beträgt in WT-Neuronen $21,4 \pm 13,5$ nM (n=48) und ist somit signifikant höher als die $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ in *Mecp2*^{-/-}-Neuronen ($11,7 \pm 5,7$ nM, n=10, p<0,05).

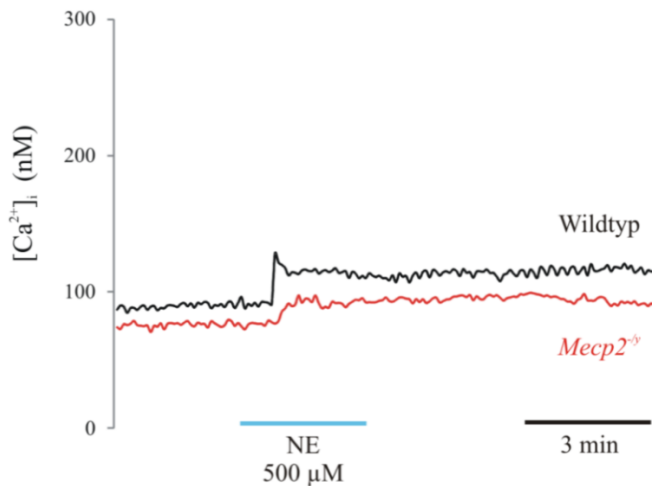


Abbildung 19: Zytosolische Calciumkonzentration nach Norepinephrin-Gabe

Die Zellen, Wildtyp (schwarz) und *Mecp2*^{-/-} (rot), reagieren sofort mit einem Anstieg der zytosolischen Calciumkonzentration, gefolgt von einer Plateauphase. Die Änderung ist in WT-Neuronen höher, als in *Mecp2*^{-/-}-Neuronen (p<0,05).

Zusammenfassend zeigt sich, dass alle getesteten Neurotransmitter Einfluss auf die zytosolische Calciumkonzentration haben. Besonders ausgeprägt stellte sich dies für Glutamat dar. Zwar waren die genotypischen Unterschiede nicht signifikant, aber ein Trend war zu erkennen (p=0,08). Die Transmitter Serotonin (p<0,01) und Norepinephrin (p<0,05) führten ebenfalls zu signifikanten genotypischen Unterschieden der $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$.

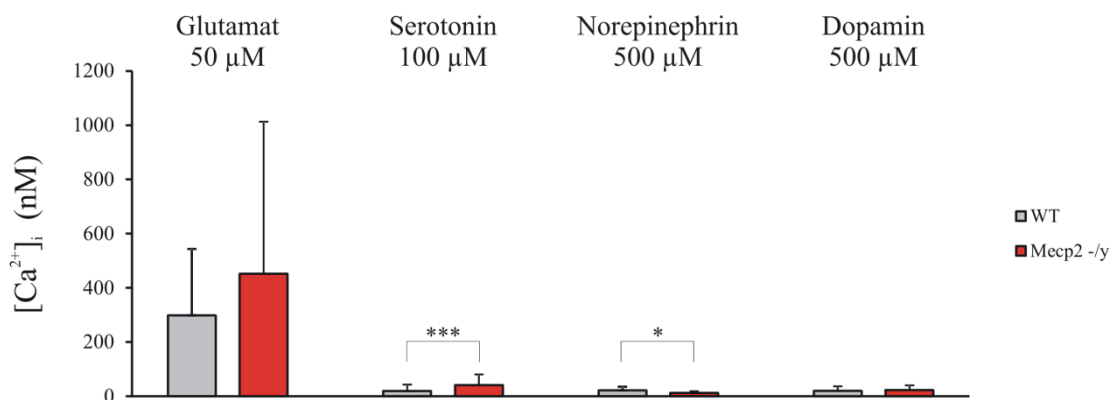


Abbildung 20: Zusammenfassende Darstellung der Calciumantworten aller Transmitter

In beiden Zellpopulationen (WT, grau; *Mecp2*^{-y}, rot) ruft Glutamat die deutlichsten Reaktionen hervor. Statistisch signifikante, genotypische Unterschiede finden sich ausschließlich in den Serotonin- ($p < 0,01$) und Norepinephrin- ($p < 0,05$) induzierten Calciumantworten.

4.3 *Mecp2*-Redoxindikator-Mäuse

Für die Erstellung von Zellkulturen können ausschließlich die Neurone neonataler Mäuse verwendet werden. Die mit dem optischen Sensor roGFP1 untersuchten physiologischen Prozesse sind folglich diejenigen, die im neonatalen Neuron stattfinden. Aussagen über die Redoxbedingungen und Redoxantworten in adulten Neuronen können mit dieser Methode jedoch nicht getroffen werden. Daher ist es für unsere Arbeitsgruppe ein Anliegen gewesen, eine Mauslinie mit einer stabilen roGFP1 Expression *in vivo* zu etablieren und diese in die *Mecp2*-Linie einzukreuzen, damit es möglich ist, zelluläre Redoxveränderungen auch in adulten Tieren mit einer fortgeschrittenen Symptomatik zu untersuchen.

In der Zusammenarbeit mit dem Max-Planck-Institut für Experimentelle Medizin Göttingen gelang es transgene Mauslinien mit neuronaler roGFP1 Expression sowohl im Zytosol (roGFP1c) als auch in den Mitochondrien (roGFP1m) zu generieren. Um diese Mauslinien zu erhalten, wird das roGFP1 DNA Konstrukt, welches einen *Thy1.2* Promotor für die ausschließlich neuronale Expression enthält (Caroni 1997), in den Vorkern einer befruchteten Eizelle (Zygote) eines C57BL/6N-Weibchens mikroinjiziert und anschließend einem scheinträchtigen Ammentier eingepflanzt. Die daraus hervorgegangenen transgenen Nachkommen werden dann mit einer C57BL/6J-Wildtypmaus verpaart. Das so generierte Maus-Modell C57BL/6-TG (*Thy1.2*-roGFP1m) ist umfassend durch unsere Arbeitsgruppe charakterisiert worden (Wagner et al. 2016).

Da die roGFP1 Expression zufriedenstellend im gesamten Gehirn stattfindet, wurde diese Mauslinie in die *Mecp2*^{-y}-Mauslinie eingekreuzt (*C57BL/6-Mecp2*^{tml1.1Bird}, TG(*Thyl.2-roGFP1m*)) (Can et al. 2016). Damit können nun Redoxmessungen auf Gewebeebene an Mäusen in jedem Entwicklungs- und Krankheitsstadium durchgeführt werden. Ebenso können die verschiedenen Hirnregionen untereinander verglichen werden, um weitergehende Analysen zu Redoxveränderungen im RTT treffen zu können.

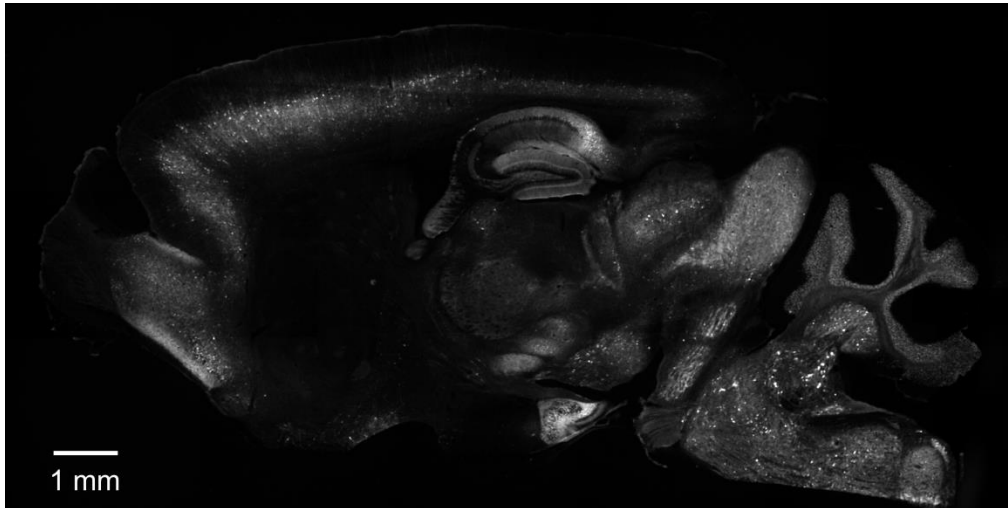


Abbildung 21: *Mecp2*-Redoxindikatoremaus

Fixierter Gehirnschnitt (30 μm Dicke) einer 43 Tage alten *Mecp2*^{-y}-Maus mit neuronenspezifischer roGFP1-Expression und mitochondrialer Zielsequenz. Dieses Bild wurde aus zahlreichen Einzelbildern zusammengesetzt.

5 Diskussion

Seit der Entdeckung des Defekts im nukleären *MECP2*-Gen als Ursache des Rett-Syndroms (Amir 1999) gelangen heute immer mehr die Mitochondrien in das wissenschaftliche Interesse, wenn es darum geht, die zellphysiologischen Auswirkungen der *MECP2*-Defizienz zu verstehen. Studien, die morphologische Veränderungen der Mitochondrien (Eeg-Olofsson et al. 1988, Ruch et al. 1989, Eeg-Olofsson et al. 1990), Veränderungen im Proteinstatus, wie z. B. einer hochregulierten Expression der Komplexe I-IV der Atmungskette (Kriaucionis et al. 2006, Gibson et al. 2010), oder eine veränderte Enzymaktivität, wie z. B. eine reduzierte Aktivität der SOD2 (Sierra et al. 2001) nachgewiesen haben, bestätigen deutlich erkennbare mitochondriale Dysfunktionen. Da es weiterhin Hinweise auf eine erhöhte oxidative Last im RTT gibt (Formichi et al. 1998, Sierra et al. 2001, De Felice et al. 2009, De Felice et al. 2012, Großer et al. 2012) und Mitochondrien als „Kraftwerke der Zelle“ erheblich zur Produktion von zellulären ROS beitragen, ist es sinnvoll, den oxidativen Zustand der Neurone, insbesondere der Mitochondrien, und die Veränderung dessen nach physiologischer Stimulation genauer zu untersuchen. ROS, die zu neuronalen Schäden und synaptischer Regression führen, können dann möglicherweise auf Grund neuer Therapiekonzepte behandelt werden. Die Zugehörigkeit vom RTT zu den Mitochondriopathien könnte außerdem auf dieser Grundlage erneut diskutiert werden.

Der Gedanke, dass Mitochondrien eine entscheidende Schlüsselrolle im Krankheitsprozess übernehmen, wird ebenfalls bei den verbreiteten neurodegenerativen Erkrankungen Alzheimer, Parkinson, Chorea Huntington und amyotrophe Lateralsklerose diskutiert. In diesen Erkrankungen, die durch einen progredienten Verlust von Neuronen gekennzeichnet sind, gibt es Zusammenhänge zwischen mitochondrialen Dysfunktionen, oxidativem Stress und dem Progress der Neurodegeneration. Noch bevor es zur Ausbildung einer pathologischen Klinik kommt, sind bei diesen Erkrankungen bereits zelluläre Schäden durch Oxidation vorhanden (Nunomura et al. 2001, Reddy et al. 2004). Entscheidender Unterscheid zu RTT ist jedoch, dass eine ausgeprägte Neurodegeneration nicht nachzuweisen ist (Armstrong et al. 1995, Belichenko et al. 1997).

Um einen Zusammenhang zwischen neuronalen Schäden und mitochondrial generierten ROS darstellen zu können, wurde ein Versuchskonzept entwickelt, das unter Verwendung eines redoxsensitiven Proteins, welches sich zuverlässig in den Mitochondrien exprimieren lässt, erstmalig quantitative, subzelluläre Messungen des Redoxstatus in Echtzeit erlaubt. Bisherige Untersuchungen der Arbeitsgruppe von Michael Müller an organotypischen, hippocampalen Hirnschnitten (*slice cultures*) von MeCP2-defizienten Neuronen zeigten Unterschiede im relativen Oxidationszustand für das Zytosol und die Mitochondrien (Can 2016, Großer et al. 2012). In WT-Tieren sind die Mitochondrien, verglichen mit dem Zytosol stärker oxidiert. In *Mecp2*^{-/-}-Mäusen hingegen ist das Zytosol stärker oxidiert als die Mitochondrien. Vergleicht man den Redoxruhezustand der Genotypen untereinander zeigt sich, dass das Zytosol der *Mecp2*^{-/-}-Mäuse mehr in Richtung Oxidation verschoben ist, als das der WT-Mäuse. An die Experimente wurden semiquantitative, fluorometrische Messungen an Zellkulturen angegliedert, die die oxidative Grundsituation des Zytosols und die Redoxänderungen, nach physiologisch relevanter Stimulation durch die Neurotransmitter Glutamat, Serotonin, Dopamin und Norepinephrin erfassten (Can 2016). Die Ergebnisse dieser vorangegangenen Messungen an roGFP1c exprimierenden *Mecp2*^{-/-}-Zellkulturen sollen in dieser Arbeit mit denen der roGFP1m exprimierenden *Mecp2*^{-/-}-Zellkulturen verglichen werden. Dabei soll herausgearbeitet werden, ob die Mitochondrien, als ursächlich für die ROS-Generierung und die ROS-bedingten Schäden und Dysfunktionen im neuronalen Netzwerk in Frage kommen können. Weiterhin soll geklärt werden, ob Calcium als universeller *second messenger* in der Signalweiterleitung der jeweiligen Transmitter und der Induktion der resultierenden Redoxänderungen von zentraler Bedeutung ist.

5.1 Mitochondriales Redoxruhegleichgewicht in *Mecp2*^{-/-}- und WT-Neuronen

Aus den organotypischen Hirnschnitten geht hervor, dass das mitochondriale Redoxruhegleichgewicht zwischen WT- und *Mecp2*^{-/-}-Neuronen nicht signifikant verändert ist (Can 2016). Das erlaubt jedoch nur eine eingeschränkte Beurteilung der Funktionalität der Mitochondrien. Die Anlage einer dissoziierten Zellkultur ermöglicht es, die Mitochondrien genauer zu detektieren. Die Berechnung der Fluoreszenz-Ratio erfolgte dabei ausschließlich aufgrund, der zuvor in *Clustern (regions of interest)* markierten Mitochondrien. Dadurch entsteht ein zeitlich und quantitativ konkretes Abbild des Redoxstatus des mitochondrialen Zellkompartiments. Einflüsse von

umliegenden Zellen können durch die Vereinzelung der Neurone weitestgehend ausgeschlossen werden, auch wenn synaptische Kontakte erhalten bleiben. Diffusionsbarrieren und eventuelle Pufferfunktionen, sowie ROS-Produktion durch Mikroglia (Lull und Block 2010), oder andere Zellen in der unmittelbaren Nachbarschaft, haben so praktisch keine Auswirkungen auf die Messungen. Die Ergebnisse, der vorangegangenen Studien an organotypischen, hippocampalen Schnittkulturen unterliegen möglicherweise derartigen Wechselwirkungen. Daher stellt der Gewebeverband ein physiologischeres Abbild der zellulären Realität dar, als einzelne Neurone.

5.2 Transmitter-induzierte Redoxantworten von *Mecp2*^{-/-}- und WT-Mitochondrien

Bei transientser Applikation der Neurotransmitter konnten zwischen *Mecp2*^{-/-}- und WT-Mitochondrien nur geringe genotypische Unterschiede in der Verschiebung des Redoxgleichgewichts beobachtet werden. Auf die Applikation der Transmitter Dopamin, Glutamat und Serotonin folgten zwar bei beiden Genotypen deutliche oxidierende Redoxantworten. Von diesen löste jedoch lediglich Serotonin eine signifikante, größere Änderung des relativen Oxidationszustandes in *Mecp2*^{-/-}-Neuronen, gegenüber WT-Neuronen aus (siehe Kap. 4.1). Auffällig ist eine relativ lange Verzögerung (8 min) bis zum Auftreten der Redoxänderungen, sodass keine genaue Aussage darüber getroffen werden kann, ob die entstanden ROS nicht möglicherweise zunächst im Zytosol generiert worden und dann erst sekundär in die Mitochondrien gelangt sind.

Einen Trend hin zu stärker oder überreagierenden *Mecp2*^{-/-}-Mitochondrien war nicht generell vorhanden. Auf Dopamin reagierten die WT-Mitochondrien mit einer stärkeren oxidativen Verschiebung. Norepinephrin löste bei beiden Genotypen nur eine kaum erkennbare Reaktion aus. Glutamat hingegen rief Reaktionen mit einem deutlichen, biphasischen Verlauf hervor. Nach initialer Reduktion folgte ein sekundärer Anstieg (Oxidation). Dabei besteht lediglich ein Trend zu einer verstärkten Reaktion der *Mecp2*^{-/-}-Mitochondrien gegenüber WT-Mitochondrien. Diese Redoxantworten bestätigen deshalb nur eine generelle Beeinflussung der Mitochondrien durch die verwendeten physiologischen Stimuli.

Übersteigerte Reaktionen von *Mecp2*^{-/-}-Neuronen, die mit einer Überproduktion von ROS einhergehen, sind also nicht aufgetreten. Daher ist diesbezüglich eine primär, von den Mitochondrien ausgehende oxidative Last, im RTT schwer zu untermauern. Es muss jedoch darauf hingewiesen werden, dass roGFP1 ausschließlich in der Matrix exprimiert wird. Die ROS, die durch das Entweichen der Elektronen aus der Atmungskette entstehen können nur dann detektiert werden, wenn sie in die Matrix gelangen und dort mit molekularem Sauerstoff reagieren. Die Elektronen entweichen jedoch in beide Richtungen (Brand 2010), also auch in den Intermembranraum und können dort ebenfalls ROS generieren, die dann über die äußere Mitochondrienmembran in das Zytosol gelangen.

Die in der Zusammenarbeit der Arbeitsgruppen von Michael Müller und Peter Rehling, aus dem Institut für Zellbiochemie der Uni Göttingen, entstandene Studie an isolierten Mitochondrien zeigt, dass der Sauerstoffverbrauch der Mitochondrien von kortikalen und hippocampalen *Mecp2*^{-/-}-Neuronen verglichen mit WT-Neuronen, unter Vorhandensein von ADP und Succinat, einem Komplex II Substrat, erhöht ist (Can et al. 2019). Die höhere Stoffwechselaktivität der Mitochondrien zeigt sich auch darin, dass sie mehr ROS generieren und freisetzen. In isolierten Mitochondrien des *Mecp2*^{-/-}-Hippocampus und Cortex wurden mit dem oxidationssensitiven Farbstoff 2,7-Dichlorodihydrofluoresceindiacetat (H₂DCFDA) eine höhere Konzentration von ROS detektiert. Das könnte darauf hinweisen, dass mehr ROS über die innere Membran abgegeben werden als bisher vermutet wurde. Das Potential der Mitochondrien ROS zu generieren, erfordert somit den Einsatz von mitochondrial und zytosolisch exprimiertem roGFP.

5.3 Vergleich mitochondrialer und zytosolischer Redoxantworten

Vorangegangene Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe an roGFP1c transduzierten *Mecp2*^{-/-}-Zellkulturen zeigten keine Unterschiede in der Redoxgrundsituation zwischen den Genotypen, jedoch deutlichere Reaktionen des *Mecp2*^{-/-}-Zytosols gegenüber dem WT-Zytosol, nach Transmitterapplikation. Auffällig ist, dass alle Neurotransmitter zu einer enormen oxidativen Verschiebung im Zytosol der *Mecp2*^{-/-}-Neurone führten, wohingegen die WT-Neurone nur sehr geringe Reaktionen zeigten. Besonders interessant ist, dass auf Glutamat, Serotonin und Norepinephrin ein kontinuierlicher Anstieg der roGFP1-Ratio in immer höher oxidierte Bereiche folgte, der vermutlich mit einer Beeinträchtigung der zellulären Vitalität gleichzusetzen ist. Alle Transmitter-

induzierten Reaktionen des Zytosols unterschieden sich signifikant zwischen WT- und *Mecp2*^{-y}-Neuronen (Can 2016).

Die Mitochondrien beider Genotypen reagierten überwiegend mit deutlichen Transmitter-induzierten Redoxantworten. Diese verliefen jedoch weitaus milder, als die Reaktionen des Zytosols (Can 2016). Es kam nur vereinzelt zu scheinbar fortschreitender Oxidation, die v. a. bei Glutamat und Serotonin beobachtet wurde. Der Großteil der Zellen regenerierte sich und kehrte in sein ursprüngliches mitochondriales roGFP1-Gleichgewicht wieder zurück. Dies lässt vermuten, dass die mitochondriale Matrix besser gegen transient auftretende ROS-Belastungen geschützt ist, als das Zytosol. Dieser Mechanismus scheint auch noch in beeinträchtigten Neuronen ausreichend zu funktionieren. Der enormen zytosolischen Reaktion liegt womöglich ein Mechanismus zugrunde, der auf die Mitochondrien einen weniger nachhaltigen Effekt hat. In den folgenden Abschnitten sollen daher die Transmitterreaktionen genauer betrachtet werden.

Serotonin (5-Hydroxytryptamin, 5-HT), ein biogenes Amin, wird zu ca. 95% in den enterochromaffinen Zellen des Gastrointestinaltrakts synthetisiert (Gershon und Tack 2007). Nur 5 % werden im ZNS, in den Neuronen der *Raphe* Kerne des Hirnstammes, produziert. Hauptvorkommen im menschlichen Körper sind der Gastrointestinaltrakt, Thrombozyten und das ZNS (Berger et al. 2009). 5-HT wirkt an den, in der Zellmembran verankerten, größtenteils G-Protein gekoppelten 5-HT Rezeptoren, von denen im menschlichen Gewebe derzeit 14 bekannt sind. Diese Rezeptoren werden in sieben Familien, mit vereinzelt Untergruppen (5-HT_{1A-F}, 5-HT_{2A-C}, 5-HT₃, 5-HT₄, 5-HT_{5A-B}, 5-HT₆, 5-HT₇) eingeteilt. Durch Aktivierung der Rezeptoren werden Bewusstsein, Verhalten und physiologische Prozesse wie Blutgerinnung, Stimmung, Schlaf, Energiehaushalt, Geweberegeneration, gastrointestinale Funktionen, ebenso wie Immunität beeinflusst (Meneses 1999, Baganz und Blakely 2013). Störungen im 5-HT System sind sowohl mit Erkrankungen wie Depression (Coppin et al. 1974, Artigas et al. 1996), M. Alzheimer (Tohgi et al. 1992, Kepe et al. 2006), chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (Bishop et al. 1987, El-Salhy et al. 1997, Coates et al. 2004) als auch genetischen Erkrankungen wie dem Prader-Willi Syndrom oder dem plötzlichen Kindstod assoziiert (Saito et al. 1999, Weese-Mayer et al. 2003, Waters 2010).

Im RTT sind verminderte 5-HT-Konzentrationen in verschiedenen Gehirnregionen und im *Liquor cerebrospinalis* sowohl in Menschen als auch in *Mecp2^{-y}*-Mäusen nachgewiesen worden (Riederer et al. 1986, Jellinger 2003). Dies wird durch eine Hochregulation des 5-HT_{5B} Rezeptors in *Mecp2^{-y}*-Mäusen untermauert (Vogelgesang et al. 2017). Weiterhin ist bewiesen worden, dass 5-HT eine stark antioxidative Wirkung hat und kleine Änderungen im 5-HT Haushalt die Intensität des oxidativen Stresses im Gehirn signifikant verringern (Munoz-Castaneda et al. 2006). Behandlungen mit 5-HT Agonisten an 5-HT_{1A} oder 5-HT₇ Rezeptoren verbessern die Atmungssituation und das Verhalten der Mäuse nachweislich (Abdala et al. 2010, Abdala et al. 2014, De Filippis et al. 2014). Valenti und Kollegen fanden heraus, dass eine beeinträchtigte oxidative Phosphorylierung, mit konsekutiv reduzierter ATP Bereitstellung im Gehirn, durch LP-211, einem potenten 5-HT₇-Agonisten, in heterozygoten Weibchen zweier etablierter RTT-Maus-Modelle (MeCP2-308 und MeCP2-Bird Maus), positiv beeinflusst werden kann (Valenti et al. 2017). Dadurch wird Serotonin zu einem wichtigen Parameter möglicher Therapiekonzepte und bedarf eingehender Untersuchungen.

In der vorliegenden Studie ist die Wirkung von 5-HT auf den Redoxstatus der Mitochondrien untersucht worden. Beobachtet werden konnte, dass es zu einer milden oxidativen Verschiebung durch 5-HT in der roGFP1m-Ratio kommt. Dieser Anstieg tritt mit einer Latenz von ca. 8 min auf. In der Auswaschphase erreichen die Mitochondrien, mit einer gewissen Latenz, ihr *Baseline* Niveau wieder. Vergleicht man die Antworten des Zytosols und der Mitochondrien miteinander wird deutlich, dass es zytosolisch relativ zügig zu einer deutlichen Redoxantwort kommt (Can 2016). Als mögliche Erklärungen für die verspätete Redoxantwort der Mitochondrien kommen in Betracht, erstens, dass primär zytosolisch gebildete ROS sekundär und damit verzögert in die Mitochondrien diffundieren, zweitens dass die antioxidativen Komponenten im Mitochondrium zunächst einen besseren Schutz darstellen, drittens reagiert 5-HT v. a. über G-Protein vermittelte Signalwege, die möglicherweise keinen direkten Einfluss auf die Mitochondrien haben. Bis auf den 5-HT₃ Rezeptor sind alle anderen Rezeptoren G-Protein gekoppelt. Dieser ist ein ligandengesteuerter Ionenkanal, der für Na⁺ und K⁺ permeabel ist. Die signifikanten sowohl genotypischen als auch auf die Kompartimente bezogenen Änderungen belegen die antioxidativer Wirkung des 5-HT auf subzellulärer Ebene jedoch nicht, denn dann wäre eine reduzierende Verschiebung zu erwarten gewesen, was jedoch zu keiner Zeit aufgetreten ist.

Dopaminerge Neurone befinden sich im ZNS im Wesentlichen innerhalb von vier Verarbeitungspfaden. Dazu gehören erstens das nigrostriatale System, was v. a. für Bewegungssteuerung von Bedeutung ist, zweitens das mesolimbische System, welches als Belohnungszentrum gilt, drittens das mesocortikale System, das für exekutive Funktionen und Motivation relevant ist und viertens das tuberoinfundibuläre System, welches die Freisetzung von Prolactin hemmt. Dopamin entfaltet seine Wirkung an der Postsynapse über Dopamin Rezeptoren, die auf Grund unterschiedlicher Signalwege und Wirkungen in eine D₁/D₅Gruppe (D₁ ähnliche Gruppe) und eine D₂/D₃/D₄ Gruppe (D₂ ähnliche Gruppe) eingeteilt werden. Die Rezeptoren der D₁ ähnlichen Gruppe wirken aktivierend über eine cAMP Erhöhung, während die D₂ Rezeptoren über eine cAMP Erniedrigung hemmend auf die Zelle wirken (Jackson und Westlind-Danielsson 1994).

Im Hippocampus sind Rezeptoren beider Populationen exprimiert (Boyson et al. 1986). Die gleichzeitige Stimulation von D₁ und D₂ Rezeptoren induziert eine intrazelluläre Calciumfreisetzung, die Phospholipase C vermittelt ist (Lee et al. 2004). Interessant ist der Effekt auf hippocampale *Mecp2*^{-/-}-Neurone, da Calcium als *second messenger* wichtige Funktionen wie Regulation der Transmitterexozytose und Aktivierung von Calcium-abhängigen Protein-Kinasen C (PKC) in der Zelle übernimmt (Ha et al. 2012). In den Präsynapsen dopaminerger Neurone wird Dopamin über einen Dopamin Transporter (DAT), einem Na⁺-Symporter, in die Zelle aufgenommen. In neurodegenerativen Erkrankungen wirken erhöhte intrazelluläre Dopamin-Konzentrationen, über einen bisher noch unklaren Mechanismus, toxisch auf die Zellen. Bisher werden verschiedene Prozesse wie oxidativer Stress (Slivka und Cohen 1985, Hastings und Zigmond 1994), Apoptose (Masserano et al. 1996, Simantov et al. 1996, Offen et al. 1997) und das Eingreifen von Dopamin in die Atmungskette diskutiert. Dopamin kann von intakten isolierten Mitochondrien aufgenommen werden und in ihnen akkumulieren (Brenner-Lavie et al. 2008). Durch die lokale Präsenz kann es mit dem Komplex I der Atmungskette interagieren (Ben-Shachar et al. 2004), was zu einem Zusammenbruch des $\Delta\Psi_m$ führt (Brenner-Lavie et al. 2008). Eine höhere Dosis Dopamin bewirkt eine stärkere Beeinträchtigung der Mitochondrien, dennoch hat Dopamin erwiesenermaßen keine Auswirkung auf das Zellsterben, wie an SH-SY5Y Neuroblasten (Modifizierte menschliche Zelllinie; abstammend vom Neuroblastom) gezeigt wurde (Brenner-Lavie et al. 2008). Mehrere Studien bezüglich der $\cdot\text{O}_2^-$ Generierung, durch Komplex I Inhibition, liefern unterschiedliche Ergebnisse. Brenner-

Lavie und Kollegen konnten keine Superoxide in Anwesenheit von Dopamin detektieren (Brenner-Lavie et al. 2008). Andere Studien zeigten, dass Superoxide an gebundenem FMN, einer prosthetischen Gruppe des Komplex I (Kusmaul und Hirst 2006) und an der inaktiven D-Form, die dem durch Rotenon oder Piericidin inhibierten Komplex I entspricht, produziert werden (Vinogradov und Grivennikova 2005).

Da diese Untersuchungen an intakten Mitochondrien durchgeführt wurden und bekannt ist, dass in RTT-Patienten veränderte Spiegel von endogenem Dopamin und seinen Metaboliten (Homovanillinsäure, 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure) im ZNS vorliegen (Riederer et al. 1985, Brucke et al. 1987, Wenk et al. 1991, Wenk 1995), sollte in dieser Arbeit die Wirkung von Dopamin, auf hippocampale *Mecp2^{fl/y}*-Neurone genauer betrachtet werden.

In den hier durchgeführten optischen Messungen findet unmittelbar mit dem Einwaschen von Dopamin ein moderater $[Ca^{2+}]_i$ Anstieg statt, wohingegen das Regenerieren auf ein ursprüngliches Niveau jedoch um ein Vielfaches länger dauert. Anders verhält es sich bei den Redoxverschiebungen, die zwar auch mit einem zügigen, steilen Anstieg in Richtung Oxidation sowohl im Zytosol als auch in den Mitochondrien beginnen, aber einen ebenso starken Abfall nach Beendigung der Dopamin-Gabe zeigen, was zu der Annahme führt, dass Calcium offenbar keinen direkten Einfluss auf die ROS-Produktion der beiden Kompartimente hat. Dennoch beginnen der Dopamin-vermittelte $[Ca^{2+}]_i$ Anstieg und die zytosolischen und mitochondrialen Redoxänderungen unmittelbar, weswegen es von Bedeutung wäre, die Redoxmessungen auch in Ca^{2+} -freier Umgebung durchzuführen, um dennoch einen möglichen Zusammenhang dieser beiden Parameter auszuschließen.

Glutamat ist der stärkste exzitatorische Transmitter des menschlichen Nervensystems. Er bewirkt über verschiedene Rezeptoren ein Einströmen von Kationen (K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+}) in die Zelle und führt so zu einer Depolarisation der Zellmembran. Zu den ionotropen Glutamat Rezeptoren gehören N-methyl-D-Aspartat Rezeptoren (NMDAR), α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure Rezeptoren (AMPA) und Kainat Rezeptoren. Die metabotropen G-Protein gekoppelten Glutamat Rezeptoren 1-8 (mGluR 1-8) werden in drei Gruppen unterteilt, die alle eine unterschiedliche Affinität zu Glutamat besitzen (Meldrum 2000). Gruppe I Rezeptoren (mGluR-1; -5) bewirken

über Phospholipase C und G_q-Proteine eine Freisetzung von Ca²⁺-Ionen aus dem endoplasmatischen Retikulum in das Zytoplasma (Sladeczek et al. 1985, Masu et al. 1991). Die Gruppe II und III Rezeptoren (mGluR-2; -3; mGluR-4, -6, -7, -8) wirken negativ, über inhibitorische G_i-Proteine, auf die Adenylatcyclase und verhindern somit die Bildung von cAMP aus ATP (Niswender und Conn 2010).

Bekannt ist, dass Glutamat einen potentiell schädigenden Einfluss auf das Nervensystem, v. a. während epileptischer Krampfanfälle, cerebraler Ischämie oder traumatischen Hirnverletzungen (Rothman 1985) hat. Der Mechanismus dieser Rezeptor vermittelten Neuro- oder Exzitotoxizität, benannt nach Olney (Olney 1986), ist noch nicht abschließend geklärt. Setzt man jedoch neuronalem Gewebe hohe Dosen von Glutamat, über einen gewissen Zeitraum aus, sind dendrosomatotoxische Zellschwellung, Degeneration der Zellorganellen und Pyknisierung des Zellkerns, mit anschließender Phagozytose durch Makrophagen, zu beobachten (Choi 1992). Dennoch ist Glutamat sehr wichtig für die neuronale Differenzierung, Migration und das Überleben eines sich entwickelnden Gehirns (Ikonomidou et al. 1999). In RTT-Patienten liegt Glutamat, als einziger Neurotransmitter im *Liquor cerebrospinalis*, signifikant erhöht vor (Hamberger et al. 1992).

Wie bereits erwähnt wurde, scheint Glutamats Neurotoxizität vor allem zytosolisch Auswirkungen zu haben. Can konnte zeigen, dass es im *Mecp2^{-y}*-Zytosol zu drastischen oxidativen Verschiebungen kommt, die potentiell die zelluläre Vitalität gefährden. Selbst WT-Neurone reagierten mit kontinuierlicher Bildung von ROS, jedoch weitaus geringer, als *Mecp2^{-y}*-Neurone (Can 2016). Initial zeigte sich im Zytosol eine reduzierende Verschiebung, die auch in den Mitochondrien beobachtet werden konnte. Hier ist der Hauptunterschied v. a. der, dass es in den Mitochondrien nicht zu einem sekundären drastischen oxidativen Anstieg kommt. Der, nur milde Anstieg in der roGFP1-Ratio und das Erreichen des Redoxgrundniveaus in der Auswaschphase, scheinen ein Ausdruck mitochondrialer Kompensationsmechanismen zu sein. Warum Glutamat als einziger, der von uns getesteten Neurotransmitter, initial zu einer reduzierenden Verschiebung führt, bleibt unklar. Auch die Messungen des intrazellulären [Ca²⁺]_i Einstroms unter Glutamat-Gabe, liefern diesbezüglich keine Erklärung. Der Glutamat-induzierte [Ca²⁺]_i Einstrom war rapide und sehr stark, mit einer anschließenden Plateauphase, die auch rasch wieder abfiel, sobald Glutamat

ausgewaschen wurde (siehe Kap. 4.2). Die roGFP1-Redoxänderung dagegen ist biphasisch und dauert insgesamt länger, als die Calciumänderung.

Da der sekundäre Anstieg in der roGFP1-Ratio, in *Mecp2^{-/-}*- und WT-Mitochondrien schwächer ausgeprägt war als im Zytosol, entsteht die Vermutung, dass zytosolische Proteine viel stärker durch einen Glutamat-induzierten $[Ca^{2+}]_i$ Einstrom beeinflusst werden, als mitochondriale. Für die überschießenden zytosolischen Redoxantworten sind wahrscheinlich die Enzyme Xanthin Oxidase (XO) und NADPH (Nicotinamidadenindinucleotidphosphat) Oxidase (NOX) verantwortlich. NOX ist ein bakterizid wirkender membrangebundener Enzymkomplex, der molekulares O_2 zu $\cdot O_2^-$ reduziert. Can bewies, dass nach irreversibler Blockade der NOX durch Diphenyleneiodonium Chlorid (DPI) keine ROS-Produktion, auch nach Gabe von Glutamat, in beiden Genotypen stattfand (Can 2016). Das Enzym XO ist wichtig für den Purinstoffwechsel. Es oxidiert Xanthin und Hypoxanthin zu Harnsäure, wobei auch $\cdot O_2^-$ und $2H^+$ entstehen. Wird das Enzym mit Allopurinol blockiert, sind keine roGFP1c-Antworten nach Glutamat-Gabe in hippocampalen Neuronen beider Genotypen mehr sichtbar (Can 2016). Damit ist bewiesen, dass beide Enzyme eine wichtige Rolle in der zytosolischen ROS-Produktion spielen. Dies wird zusätzlich durch einen fehlenden Anstieg des roGFP1-Signals in WT-Neuronen, in Ca^{2+} freier Umgebung untermauert (Can 2016). Dennoch scheint der Mechanismus nicht vollständig geklärt zu sein, denn neueste Untersuchungen von Kovac und Kollegen fanden eine aktive NOX auch in Ca^{2+} -freier Umgebung (Kovac et al. 2014).

Das Stresshormon Norepinephrin, oder Noradrenalin gehört in die Klasse der Katecholamine. Es wird zentral im *Nucleus caeruleus* des Hirnstamms und peripher im Nebennierenmark synthetisiert. Es ist ein wichtiger Neurotransmitter, der Einfluss auf Atmung, Bewusstsein, Bewegung, Schmerz und paradoxen Schlaf (REM, *rapid eye movement sleep*) hat. Im *Liquor cerebrospinalis* von RTT-Patienten, ebenso wie in RTT-Maus-Modellen, ist die Konzentration von Norepinephrin erniedrigt (Zoghbi et al. 1985, Zoghbi 1988, Santos et al. 2010, Panayotis et al. 2011). Dieser Mangel in *Mecp2^{-/-}*-Mäusen resultiert scheinbar aus einer Mindereexpression der Enzyme Tyrosin-Hydroxylase und Dopamin- β -Hydroxylase in Neuronen des *Locus caeruleus*, die die Umwandlungen von L-Tyrosin in L-Dihydroxyphenylalanin (L-DOPA) und von Dopamin zu Norepinephrin katalysieren (Zhang et al. 2010).

Zu der Wirkung von Norepinephrin im ZNS ist nur wenig bekannt. Man weiß, dass es an $\alpha 1$ -, $\alpha 2$ - oder β -Adrenorezeptoren bindet und über G_q -, G_i - oder G_s -Proteine entsprechende intrazelluläre Signalkaskaden aktiviert. Laut Literatur kann an β -Adrenorezeptor gebundenes Norepinephrin, durch cAMP vermittelte Phosphorylierung von L-Typ Ca^{2+} Kanälen, zu einem $[Ca^{2+}]_i$ Anstieg führen (Ghosh et al. 2017). Dies konnte ebenso in Pyramiden Zellen der CA1 Region des Hippocampus beobachtet werden (Hoogland und Saggau 2004). Einen direkten Zusammenhang von Norepinephrin und oxidativem Stress durch Autooxidation ist derzeit aber nur bei Kardiomyozyten belegt (Neri et al. 2007). Daher ist es wichtig, die Wirkung von Norepinephrin auf den Redoxstatus von WT- und *Mecp2*^{-/-}-Neuronen des Hippocampus zu untersuchen.

In den Experimenten wurde Norepinephrin in zwei unterschiedlichen Konzentrationen (200 μ M und 500 μ M) verwendet. Es zeigte sich bei 500 μ M, bei beiden Genotypen, ein Abfall des roGFP1m-Signals in Richtung Reduktion. Bei 200 μ M sind die Veränderungen in der roGFP1m-Ratio kaum detektierbar. Insgesamt sind die roGFP1m-Signaländerungen nur sehr gering. Dennoch ist von besonderer Bedeutung, dass es im Zytosol zu einer komplett gegensätzlichen Reaktion kommt. Dort wurden für beide Norepinephrin-Konzentrationen, eine starke, dauerhafte oxidative Verschiebung nachgewiesen. Dies ist aber nur bei *Mecp2*^{-/-}-Neuronen der Fall. Die WT-Neurone reagierten nur geringfügig auf eine Behandlung mit Norepinephrin (Can 2016).

Da es während der Norepinephrin-Applikation zu einem $[Ca^{2+}]_i$ Anstieg kommt, aber mitochondrial nur minimale Veränderungen im roGFP1-Signal detektiert wurden, scheint die ROS-Produktion primär nicht Ca^{2+} -vermittelt zu sein. Bei den zytosolischen Redoxänderungen durch Norepinephrin ist Ca^{2+} womöglich von wichtigerer Bedeutung, da die ROS-Produktion sehr ausgeprägt ist. Wie bereits an anderer Stelle beschrieben, werden hier durch Calcium womöglich NOX und XO aktiviert.

6 Zusammenfassung

Diese Arbeit sollte sich mit der Fragestellung auseinandersetzen, ob mitochondrial generierte ROS die mögliche Ursache von neuronalen Dysfunktionen im RTT sind. Die in vorangegangenen Studien gesammelten Daten lassen darauf schließen, dass oxidativer Stress bedeutend für den Krankheitsprogress ist. Da Mitochondrien als „Kraftwerke der Zelle“ wesentlich zu der Produktion von ROS beitragen, sind hier mögliche erhöhte ROS-Spiegel in MeCP2-defizienten Neuronen auch unter physiologischer Stimulation zu suchen gewesen. Aus den Ergebnissen geht hervor, dass die Mitochondrien, wegen ihrer insgesamt vergleichsweise schwachen Redoxantworten nur bedingt verantwortlich, für ROS-induzierten Zell-Stress im RTT sein können.

Mittels des fluoreszierenden Redoxindikators roGFP1, ist erstmalig im RTT der Oxidationszustand der Mitochondrien zuverlässig dynamisch und semiquantitativ gemessen worden. Das ermittelte Redoxruhegleichgewicht und dessen Änderung, nach physiologisch relevanter Stimulation, durch die Neurotransmitter Glutamat, Dopamin, Serotonin und Norepinephrin, bilden das Redoxgleichgewicht und die somit potentiell eingeschränkten Funktionen der Zelle ab.

Eindrücklich konnte gezeigt werden, dass Neurotransmitter einen Einfluss auf den Redoxzustand der Mitochondrien haben. Generell fällt auf, dass die oxidativen Ereignisse in Mitochondrien, bei identischen Behandlungs- und Messprotokollen, schwächer ausgeprägt sind als im Zytosol. Dies ist auf mehrere Faktoren zurückzuführen. Erstens bildet das Vorhandensein einer Phospholipid Doppelmembran, von der die Mitochondrien umgeben sind, eine zusätzliche, schützende Barriere. Doppelmembranen sind natürlicherweise höchst impermeabel für Superoxide. H_2O_2 Moleküle jedoch, die aus der SOD katalysierten Reaktion hervorgehen, sind membrangängig. Sie können sowohl in die Mitochondrien als auch aus ihnen heraus diffundieren. Da sie den eigentlichen Ursprungsort der Superoxide verlassen können, entstehen so möglicherweise falsche Rückschlüsse. Wird außerdem davon ausgegangen, dass die, auf ihrem Weg durch die Elektronentransportkette der Komplexe I-IV der Atmungskette, entweichende Elektronen in Form von Superoxiden v. a. in den Intermembranraum abgegeben werden, ist folglich auch ein geringes roGFP1m-Signal zu erwarten. Dieses vermittelt den Anschein, ROS würden weniger mitochondrial als

zytosolisch produziert werden. Möglicherweise ist der ROS-Anteil, der in den Intermembranraum entweicht, größer als angenommen. Ein weiterer Grund für geringere mitochondriale Redoxantworten könnte auf besser ausgebildete mitochondriale Redox-Puffersysteme der Matrix, v. a. Glutathionperoxidase, Superoxiddismutase, Peroxiredoxin III und Katalase zurückzuführen sein. Diesbezüglich müssten weitere, detaillierte Untersuchungen der mitochondrialen Redoxhomöostase in WT-Neuronen und MeCP2-defizienten Neuronen erfolgen und hier dann idealerweise auch der Intermembranraum mit einbezogen werden.

Für die Zukunft ist es zudem wichtig, Informationen zur zellulären Redoxbalance aus Tieren verschiedener Altersstufen sowie verschiedener Krankheitsstadien zu sammeln, da Veränderungen in ATP-Produktion und Umsatz sowie der ROS-Produktion bisher noch nicht aufschlussreich genug waren. Um dies zu ermöglichen, wurde bereits eine transgene *Mecp2*^{-y}-Redoxindikatormaus generiert und in die Rett-Mauslinie eingekreuzt. In diesem neuartigen Maus-Modell könnten nun fluororespiratorische Messungen durchgeführt werden, die ein konkreteres Abbild der subzellulären Redoxhomöostase sowohl zytosolisch als auch mitochondrial in verschiedenen Gehirnregionen darstellen. So würden detaillierte mechanistische Einblicke in die subzelluläre Redoxbalance und deren Beitrag zur Krankheitsprogression im RTT ermöglicht.

7 Literaturverzeichnis

Abdala AP, Dutschmann M, Bissonnette JM, Paton JF (2010): Correction of respiratory disorders in a mouse model of Rett syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 18208-18213

Abdala AP, Liou DT, Garg SK, Knopp SJ, Paton JF, Bissonnette JM (2014): Effect of Sarizotan, a 5-HT_{1a} and D₂-like receptor agonist, on respiration in three mouse models of Rett syndrome. *Am J Respir Cell Mol Biol* 50, 1031-1039

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

Archer HL, Evans JC, Millar DS, Thompson PW, Kerr AM, Leonard H, Christodoulou J, Ravine D, Lazarou L, Grove L et al. (2006): NTNG1 mutations are a rare cause of Rett syndrome. *Am J Med Genet A* 140, 691-694

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

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

Artigas F, Bel N, Casanovas JM, Romero L (1996): Adaptive changes of the serotonergic system after antidepressant treatments. *Adv Exp Med Biol* 398, 51-59

Avshalumov MV, Rice ME (2002): NMDA receptor activation mediates hydrogen peroxide-induced pathophysiology in rat hippocampal slices. *J Neurophysiol* 87, 2896-2903

Baganz NL, Blakely RD (2013): A dialogue between the immune system and brain, spoken in the language of serotonin. *ACS Chem Neurosci* 4, 48-63

Bai J, Cederbaum AI (2001): Mitochondrial catalase and oxidative injury. *Biol Signals Recept* 10, 189-199

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

Belichenko PV, Hagberg B, Dahlstrom A (1997): Morphological study of neocortical areas in Rett syndrome. *Acta Neuropathol* 93, 50-61

Ben-Shachar D, Zuk R, Gazawi H, Ljubuncic P (2004): Dopamine toxicity involves mitochondrial complex I inhibition: implications to dopamine-related neuropsychiatric disorders. *Biochem Pharmacol* 67, 1965-1974

Berger M, Gray JA, Roth BL (2009): The expanded biology of serotonin. *Annu Rev Med* 60, 355-366

Bishop AE, Pietroletti R, Taat CW, Brummelkamp WH, Polak JM (1987): Increased populations of endocrine cells in Crohn's ileitis. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 410, 391-396

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

Boyson SJ, McGonigle P, Molinoff PB (1986): Quantitative autoradiographic localization of the D1 and D2 subtypes of dopamine receptors in rat brain. *J Neurosci* 6, 3177-3188

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

Brenner-Lavie H, Klein E, Zuk R, Gazawi H, Ljubuncic P, Ben-Shachar D (2008): Dopamine modulates mitochondrial function in viable SH-SY5Y cells possibly via its interaction with complex I: relevance to dopamine pathology in schizophrenia. *Biochim Biophys Acta* 1777, 173-185

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

Brucke T, Sofic E, Killian W, Rett A, Riederer P (1987): Reduced concentrations and increased metabolism of biogenic amines in a single case of Rett-syndrome: a postmortem brain study. *J Neural Transm* 68, 315-324

Budden SS, Dorsey HC, Steiner RD (2005): Clinical profile of a male with Rett syndrome. *Brain Dev* 27 Suppl 1, S69-S71

Buettner GR (1993): The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, alpha-tocopherol, and ascorbate. *Arch Biochem Biophys* 300, 535-543

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

Can K, Redox imbalance and oxidative stress in *Mecp2* deficient neurons. Dissertation Universität Göttingen 2016

Can K, Wagener KC, Kolbrink B, Dietrich K, Kempkes B, Müller M Deciphering oxidative stress in Rett Syndrome with genetically-encoded redox sensors. Society for Neuroscience, Annual Meeting, San Diego 2016, 493.03 493.03,

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

- Caroni P (1997): Overexpression of growth-associated proteins in the neurons of adult transgenic mice. *J Neurosci Methods* 71, 3-9
- Chae HZ, Kim HJ, Kang SW, Rhee SG (1999): Characterization of three isoforms of mammalian peroxiredoxin that reduce peroxides in the presence of thioredoxin. *Diabetes Res Clin Pract* 45, 101-112
- 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
- Chan DC (2006): Mitochondria: dynamic organelles in disease, aging, and development. *Cell* 125, 1241-1252
- Chen Q, Vazquez EJ, Moghaddas S, Hoppel CL, Lesnefsky EJ (2003): Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. *J Biol Chem* 278, 36027-36031
- Choi DW (1992): Excitotoxic cell death. *J Neurobiol* 23, 1261-1276
- Coates MD, Mahoney CR, Linden DR, Sampson JE, Chen J, Blaszyk H, Crowell MD, Sharkey KA, Gershon MD, Mawe GM et al. (2004): Molecular defects in mucosal serotonin content and decreased serotonin reuptake transporter in ulcerative colitis and irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 126, 1657-1664
- Coker SB, Melnyk AR (1991): Rett syndrome and mitochondrial enzyme deficiencies. *J Child Neurol* 6, 164-166
- Coppen A, Brooksbank BW, Eccleston E, Peet M, White SG (1974): Tryptophan metabolism in depressive illness. *Psychol Med* 4, 164-173
- 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
- Coy JF, Sedlacek Z, Bachner D, Delius H, Poustka A (1999): A complex pattern of evolutionary conservation and alternative polyadenylation within the long 3'-untranslated region of the methyl-CpG-binding protein 2 gene (MeCP2) suggests a regulatory role in gene expression. *Hum Mol Genet* 8, 1253-1262
- Dayer AG, Bottani A, Bouchardy I, Fluss J, Antonarakis SE, Haenggeli CA, Morris MA (2007): MECP2 mutant allele in a boy with Rett syndrome and his unaffected heterozygous mother. *Brain Dev* 29, 47-50
- De Felice C, Signorini C, Leoncini S, Pecorelli A, Durand T, Valacchi G, Ciccoli L, Hayek J (2012): The role of oxidative stress in Rett syndrome: an overview. *Ann N Y Acad Sci* 1259, 121-135

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

De Filippis B, Nativio P, Fabbri A, Ricceri L, Adriani W, Lacivita E, Leopoldo M, Passarelli F, Fuso A, Laviola G (2014): Pharmacological stimulation of the brain serotonin receptor 7 as a novel therapeutic approach for Rett syndrome. *Neuropsychopharmacology* 39, 2506-2518

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

Dean RT, Fu S, Stocker R, Davies MJ (1997): Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem J* 324 1-18

DiMauro S, Schon EA (2003): Mitochondrial respiratory-chain diseases. *N Engl J Med* 348, 2656-2668

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

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

El-Salhy M, Danielsson A, Stenling R, Grimelius L (1997): Colonic endocrine cells in inflammatory bowel disease. *J Intern Med* 242, 413-419

Fehr S, Wilson M, Downs J, Williams S, Murgia A, Sartori S, Vecchi M, Ho G, Polli R, Psoni S et al. (2013): The CDKL5 disorder is an independent clinical entity associated with early-onset encephalopathy. *Eur J Hum Genet* 21, 266-273

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

Funke F, Gerich FJ, Müller M (2011): Dynamic, semi-quantitative imaging of intracellular ROS levels and redox status in rat hippocampal neurons. *Neuroimage* 54, 2590-2602

Gershon MD, Tack J (2007): The serotonin signaling system: from basic understanding to drug development for functional GI disorders. *Gastroenterology* 132, 397-414

Ghosh A, Carew SJ, Chen X, Yuan Q (2017): The Role of L-type Calcium Channels in Olfactory Learning and Its Modulation by Norepinephrine. *Front Cell Neurosci* 11, 394

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

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

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

Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY (1985): A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 260, 3440-3450

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

Ha CM, Park D, Han JK, Jang JI, Park JY, Hwang EM, Seok H, Chang S (2012): Calcyon forms a novel ternary complex with dopamine D1 receptor through PSD-95 protein and plays a role in dopamine receptor internalization. *J Biol Chem* 287, 31813-31822

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

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

Hamberger A, Gillberg C, Palm A, Hagberg B (1992): Elevated CSF glutamate in Rett syndrome. *Neuropediatrics* 23, 212-213

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

Hastings TG, Zigmond MJ (1994): Identification of catechol-protein conjugates in neostriatal slices incubated with [3H]dopamine: impact of ascorbic acid and glutathione. *J Neurochem* 63, 1126-1132

Hoogland TM, Saggau P (2004): Facilitation of L-type Ca²⁺ channels in dendritic spines by activation of beta2 adrenergic receptors. *J Neurosci* 24, 8416-8427

Huddleston AT, Tang W, Takeshima H, Hamilton SL, Klann E (2008): Superoxide-Induced Potentiation in the Hippocampus Requires Activation of Ryanodine Receptor Type 3 and ERK. *J Neurophysiol* 99, 1565-1571

Ikonomidou C, Bosch F, Miksa M, Bittigau P, Vockler J, Dikranian K, Tenkova TI, Stefovskaja V, Turski L, Olney JW (1999): Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Science* 283, 70-74

Jackson DM, Westlind-Danielsson A (1994): Dopamine receptors: molecular biology, biochemistry and behavioural aspects. *Pharmacol Ther* 64, 291-370

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

Jellinger KA (2003): Rett Syndrome -- an update. *J Neural Transm (Vienna)* 110, 681-701

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

Kepe V, Barrio JR, Huang SC, Ercoli L, Siddarth P, Shoghi-Jadid K, Cole GM, Satyamurthy N, Cummings JL, Small GW et al. (2006): Serotonin 1A receptors in the living brain of Alzheimer's disease patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 702-707

Kovac S, Domijan AM, Walker MC, Abramov AY (2014): Seizure activity results in calcium- and mitochondria-independent ROS production via NADPH and xanthine oxidase activation. *Cell Death Dis* 5, e1442

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

Kron M, Müller M (2010): Impaired hippocampal Ca²⁺ homeostasis and concomitant K⁺ channel dysfunction in a mouse model of Rett syndrome during anoxia. *Neuroscience* 171, 300-315

Kushnareva Y, Murphy AN, Andreyev A (2002): Complex I-mediated reactive oxygen species generation: modulation by cytochrome c and NAD(P)⁺ oxidation-reduction state. *Biochem J* 368, 545-553

Kussmaul L, Hirst J (2006): The mechanism of superoxide production by NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) from bovine heart mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 7607-7612

Lappalainen R, Riikonen RS (1996): High levels of cerebrospinal fluid glutamate in Rett syndrome. *Pediatr Neurol* 15, 213-216

Lee SP, So CH, Rashid AJ, Varghese G, Cheng R, Lanca AJ, O'Dowd BF, George SR (2004): Dopamine D1 and D2 receptor Co-activation generates a novel phospholipase C-mediated calcium signal. *J Biol Chem* 279, 35671-35678

Lenaz G (1998): Role of mitochondria in oxidative stress and ageing. *Biochim Biophys Acta* 1366, 53-67

Lenaz G, Bovina C, Formiggini G, Parenti Castelli G (1999): Mitochondria, oxidative stress, and antioxidant defences. *Acta Biochim Pol* 46, 1-21

Lenaz G, Baracca A, Fato R, Genova ML, Solaini G (2006): New insights into structure and function of mitochondria and their role in aging and disease. *Antioxid Redox Signal* 8, 417-437

Lull ME, Block ML (2010): Microglial activation and chronic neurodegeneration. *Neurotherapeutics* 7, 354-365

Maiwald R, Bonte A, Jung H, Bitter P, Storm Z, Laccone F, Herkenrath P (2002): De novo MECP2 mutation in a 46,XX male patient with Rett syndrome. *Neurogenetics* 4, 107-108

Mari M, Morales A, Colell A, Garcia-Ruiz C, Fernandez-Checa JC (2009): Mitochondrial glutathione, a key survival antioxidant. *Antioxid Redox Signal* 11, 2685-2700

Masserano JM, Gong L, Kulaga H, Baker I, Wyatt RJ (1996): Dopamine induces apoptotic cell death of a catecholaminergic cell line derived from the central nervous system. *Mol Pharmacol* 50, 1309-1315

Masu M, Tanabe Y, Tsuchida K, Shigemoto R, Nakanishi S (1991): Sequence and expression of a metabotropic glutamate receptor. *Nature* 349, 760-765

Masuyama T, Matsuo M, Jing JJ, Tabara Y, Kitsuki K, Yamagata H, Kan Y, Miki T, Ishii K, Kondo I (2005): Classic Rett syndrome in a boy with R133C mutation of MECP2. *Brain Dev* 27, 439-442

McFarland R, Taylor RW, Turnbull DM (2007): Mitochondrial disease--its impact, etiology, and pathology. *Curr Top Dev Biol* 77, 113-155

Meldrum BS (2000): Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. *J Nutr* 130, 1007S-1015S

Meneses A (1999): 5-HT system and cognition. *Neurosci Biobehav Rev* 23, 1111-1125

Meyer AJ, Dick TP (2010): Fluorescent protein-based redox probes. *Antioxid Redox Signal* 13, 621-650

Milton VJ, Sweeney ST (2012): Oxidative stress in synapse development and function. *Dev Neurobiol* 72, 100-110

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

Müller M, Ballanyi K (2003): Dynamic recording of cell death in the in vitro dorsal vagal nucleus of rats in response to metabolic arrest. *J Neurophysiol* 89, 551-561

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

Munoz-Castaneda JR, Montilla P, Padillo FJ, Bujalance I, Munoz MC, Muntane J, Tunez I (2006): Role of serotonin in cerebral oxidative stress in rats. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 66, 1-6

Neher E: Combined fura-2 and patch-clamp measurements in rat peritoneal mast cells. In: Sellin L, Libelius R, Thesleff S (Hrsg.): *Neuromuscular Junction*. Elsevier 1989, 65-76

Neri M, Cerretani D, Fiaschi AI, Laghi PF, Lazzerini PE, Maffione AB, Micheli L, Bruni G, Nencini C, Giorgi G et al. (2007): Correlation between cardiac oxidative stress and myocardial pathology due to acute and chronic norepinephrine administration in rats. *J Cell Mol Med* 11, 156-170

Niswender CM, Conn PJ (2010): Metabotropic glutamate receptors: physiology, pharmacology, and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 50, 295-322

Nomura Y (2005): Early behavior characteristics and sleep disturbance in Rett syndrome. *Brain Dev* 27 Suppl 1, S35-S42

Nunomura A, Perry G, Aliev G, Hirai K, Takeda A, Balraj EK, Jones PK, Ghanbari H, Wataya T, Shimohama S et al. (2001): Oxidative damage is the earliest event in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 60, 759-767

Offen D, Ziv I, Barzilai A, Gorodin S, Glater E, Hochman A, Melamed E (1997): Dopamine-melanin induces apoptosis in PC12 cells; possible implications for the etiology of Parkinson's disease. *Neurochem Int* 31, 207-216

Olney JW (1986): Inciting excitotoxic cytochrome among central neurons. *Adv Exp Med Biol* 203, 631-645

Ozawa T (1997): Genetic and functional changes in mitochondria associated with aging. *Physiol Rev* 77, 425-464

Panayotis N, Ghata A, Villard L, Roux JC (2011): Biogenic amines and their metabolites are differentially affected in the Mecp2-deficient mouse brain. *BMC Neurosci* 12, 47

Pellmar TC (1987): Peroxide alters neuronal excitability in the CA1 region of guinea-pig hippocampus in vitro. *Neuroscience* 23, 447-456

Pellmar TC (1995): Use of brain slices in the study of free-radical actions. *J Neurosci Methods* 59, 93-98

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

- Reddy PH, McWeeney S, Park BS, Manczak M, Gutala RV, Partovi D, Jung Y, Yau V, Searles R, Mori M et al. (2004): Gene expression profiles of transcripts in amyloid precursor protein transgenic mice: up-regulation of mitochondrial metabolism and apoptotic genes is an early cellular change in Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet* 13, 1225-1240
- Reeve AK, Krishnan KJ, Turnbull DM (2008): Age related mitochondrial degenerative disorders in humans. *Biotechnol J* 3, 750-756
- Rett A (1966): Über ein eigenartiges hirnatrophisches Syndrom bei Hyperammonämie im Kindesalter. *Wien Med Wochenschr* 116, 723-726
- Riederer P, Weiser M, Wichart I, Schmidt B, Killian W, Rett A (1986): Preliminary brain autopsy findings in prodromal Rett syndrome. *Am J Med Genet Suppl* 1, 305-315
- Riederer P, Brucke T, Sofic E, Kienzl E, Schneckner K, Schay V, Kruzik P, Killian W, Rett A (1985): Neurochemical aspects of the Rett syndrome. *Brain Dev* 7, 351-360
- Rothman SM (1985): The neurotoxicity of excitatory amino acids is produced by passive chloride influx. *J Neurosci* 5, 1483-1489
- Ruch A, Kurczynski TW, Velasco ME (1989): Mitochondrial alterations in Rett syndrome. *Pediatr Neurol* 5, 320-323
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-491
- Saito Y, Ito M, Ozawa Y, Obonai T, Kobayashi Y, Washizawa K, Ohson Y, Takami T, Oku K, Takashima S (1999): Changes of neurotransmitters in the brainstem of patients with respiratory-pattern disorders during childhood. *Neuropediatrics* 30, 133-140
- Santos M, Summavielle T, Teixeira-Castro A, Silva-Fernandes A, Duarte-Silva S, Marques F, Martins L, Dierssen M, Oliveira P, Sousa N et al. (2010): Monoamine deficits in the brain of methyl-CpG binding protein 2 null mice suggest the involvement of the cerebral cortex in early stages of Rett syndrome. *Neuroscience* 170, 453-467
- Segawa M (1997): Pathophysiology of Rett syndrome from the standpoint of early catecholamine disturbance. *Eur Child Adolesc Psychiatry* 6 Suppl 1, 56-60
- 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
- Simantov R, Blinder E, Ratovitski T, Tauber M, Gabbay M, Porat S (1996): Dopamine-induced apoptosis in human neuronal cells: inhibition by nucleic acids antisense to the dopamine transporter. *Neuroscience* 74, 39-50
- Sladeczek F, Pin JP, Recasens M, Bockaert J, Weiss S (1985): Glutamate stimulates inositol phosphate formation in striatal neurones. *Nature* 317, 717-719

Slivka A, Cohen G (1985): Hydroxyl radical attack on dopamine. *J Biol Chem* 260, 15466-15472

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

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

Tohgi H, Abe T, Takahashi S, Kimura M, Takahashi J, Kikuchi T (1992): Concentrations of serotonin and its related substances in the cerebrospinal fluid in patients with Alzheimer type dementia. *Neurosci Lett* 141, 9-12

Toloe J, Mollajew R, Kügler S, Mironov SL (2014): Metabolic differences in hippocampal 'Rett' neurons revealed by ATP imaging. *Mol Cell Neurosci* 59C, 47-56

Trappe R, Laccone F, Cobilanschi J, Meins M, Huppke P, Hanefeld F, Engel W (2001): MECP2 mutations in sporadic cases of Rett syndrome are almost exclusively of paternal origin. *Am J Hum Genet* 68, 1093-1101

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

Vinogradov AD, Grivennikova VG (2005): Generation of superoxide-radical by the NADH:ubiquinone oxidoreductase of heart mitochondria. *Biochemistry (Mosc)* 70, 120-127

Vogelgesang S, Niebert S, Renner U, Mobius W, Hulsmann S, Manzke T, Niebert M (2017): Analysis of the Serotonergic System in a Mouse Model of Rett Syndrome Reveals Unusual Upregulation of Serotonin Receptor 5b. *Front Mol Neurosci* 10, 61

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

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

Waters K (2010): Serotonin in the sudden infant death syndrome. *Drug News Perspect* 23, 537-548

Weaving LS, Christodoulou J, Williamson SL, Friend KL, McKenzie OL, Archer H, Evans J, Clarke A, Pelka GJ, Tam PP et al. (2004): Mutations of CDKL5 cause a severe

neurodevelopmental disorder with infantile spasms and mental retardation. *Am J Hum Genet* 75, 1079-1093

Weese-Mayer DE, Berry-Kravis EM, Maher BS, Silvestri JM, Curran ME, Marazita ML (2003): Sudden infant death syndrome: association with a promoter polymorphism of the serotonin transporter gene. *Am J Med Genet A* 117A, 268-274

Weisiger RA, Fridovich I (1973): Mitochondrial superoxide simutase. Site of synthesis and intramitochondrial localization. *J Biol Chem* 248, 4793-4796

Wenk GL (1995): Alterations in dopaminergic function in Rett syndrome. *Neuropediatrics* 26, 123-125

Wenk GL (1997): Rett syndrome: neurobiological changes underlying specific symptoms. *Prog Neurobiol* 51, 383-391

Wenk GL, Naidu S, Casanova MF, Kitt CA, Moser H (1991): Altered neurochemical markers in Rett's syndrome. *Neurology* 41, 1753-1756

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

Zeviani M, Carelli V (2007): Mitochondrial disorders. *Curr Opin Neurol* 20, 564-571

Zhang X, Su J, Rojas A, Jiang C (2010): Pontine norepinephrine defects in *Mecp2*-null mice involve deficient expression of dopamine beta-hydroxylase but not a loss of catecholaminergic neurons. *Biochem Biophys Res Commun* 394, 285-290

Zoghbi H (1988): Genetic aspects of Rett syndrome. *J Child Neurol* 3 Suppl, S76-78

Zoghbi HY, Percy AK, Glaze DG, Butler IJ, Riccardi VM (1985): Reduction of biogenic amine levels in the Rett syndrome. *N Engl J Med* 313, 921-924

Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Michael Müller für ihre Unterstützung und Hilfsbereitschaft in allen Dingen bedanken.

Besonderer Dank gilt dabei meinem Doktorvater Prof. Dr. Michael Müller, der es mir ermöglicht hat, dieses interessante Thema bearbeiten zu können, der außerdem immer wieder Zeit gefunden hat, mich bei meiner Arbeit zu unterstützen, und mit mir anregende Diskussionen geführt hat.

Weiterhin möchte ich Belinda Kempkes danken, die mit ihrem koordinativen Geschick in Sachen Labormanagement für einen lückenlosen Versuchsablauf gesorgt hat.

Ebenso möchte ich Karolina Can danken, die mir die Kultivierung der hippocampalen Zellkultur beigebracht hat.

Lebenslauf

Ich, Karina Festerling, wurde am 19.12.1985 in Halberstadt, Sachsen-Anhalt, als einziges Kind von Gaby Isolde Festerling und Frank Festerling geboren. Nachdem ich in den Jahren von 2006 bis 2009 eine Ausbildung zur Physiotherapeutin absolviert hatte, entschied ich mich, die Allgemeine Hochschulreife zu erlangen, um meinem, durch die Ausbildung geweckten Interesse an einem Studium der Humanmedizin näher zu kommen. Im September 2009 begann ich am Bayernkolleg in Schweinfurt, mein Abitur nachzuholen. Meine schulische Laufbahn beendete ich erfolgreich im Juni 2012. Kurz darauf, am 10.07.2012, wurde mein Sohn, Tim Fröhlich, in Marburg geboren.

Zum Sommersemester 2014 wurde ich an der Georg-August-Universität zu Göttingen immatrikuliert. Den ersten Abschnitt der ärztlichen Prüfung legte ich im März 2016 ab. Im April 2016 begann ich die Arbeit an meiner Dissertation bei Prof. Dr. rer. nat. Michael Müller im Institut für Neuro- und Sinnesphysiologie im Zentrum Physiologie und Pathophysiologie der medizinischen Fakultät der Universität Göttingen.

Tagungsbeiträge

Can K, Festerling K, Kügler S, Müller M (2017): Neuronal redox imbalance in Rett Syndrome: a key player in neuronal network dysfunction and altered neurotransmitter responsiveness? Society for Neuroscience Abstracts, 370.04.

Can K, Festerling K, Tolö J, Kügler S, Müller M (2017): Neuronal redox imbalance in Rett Syndrome: a key player in neuronal network dysfunction and altered neurotransmitter responsiveness? Proceedings of the 12th Göttingen Meeting of the German Neuroscience Society, T10-3C.