

Aus dem *Institut für Klinische Neuroimmunologie* (Direktoren: Prof. Dr. Reinhard Hohlfeld, Prof. Dr. Martin Kerschensteiner) der Ludwig-Maximilians-Universität München

und

dem *Institut für Neuronale Zellbiologie* (Direktor: Prof. Dr. Thomas Misgeld) der Technischen Universität München

Ex vivo Messung des mitochondrialen Redoxstatus

unter physiologischen und pathologischen Bedingungen

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Franz Michael Josef Pfister

aus

München

2014

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. Martin Kerschensteiner

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Heidi L. Estner
Priv. Doz. Dr. Andreas Bender

Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:

Dekan: Herr Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser,
FACR, FRCR

Mündliche Prüfung: 16 . 10 . 2014

Die vorliegende Arbeit wurde von September 2009 bis November 2012 am *Institut für Klinische Neuroimmunologie* der Ludwig-Maximilians-Universität München sowie am *Institut für Neuronale Zellbiologie* der Technischen Universität München durchgeführt. Die Arbeit wurde von Herrn Prof. Dr. med. Martin Kerschensteiner (LMU) und Herrn Prof. Dr. med. Thomas Misgeld (TUM) betreut.

Aus dem Promotionsprojekt ging folgende Originalarbeit hervor:

Breckwoldt, M. O.; Pfister, F.; Bradley, P. M.; Marinković, P.; Williams, P. R.; Brill, M. S.; Plomer, B.; Schmalz, A.; St. Clair, D. K.; Naumann, R.; Griesbeck, O.; Schwarzländer, M.; Godinho, L.; Bareyre, F. M.; Dick, T. P.; Kerschensteiner, M.; Misgeld, T.

Multi-parametric optical analysis of mitochondrial redox signals during neuronal physiology and pathology *in vivo*

Nature Medicine, 2014 – in Druck (NMED-NT59831C)

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	6
1.1 REAKTIVE SAUERSTOFFSPEZIES (ROS)	6
1.1.1 KLASSIFIKATION DER ROS	6
1.1.2 QUELLE DER ROS	6
1.1.3 ROS-HOMÖOSTASE	8
1.2 MITOCHONDRIEN	9
1.2.1 MITOCHONDRIALE FUNKTION	9
1.2.2 MITOCHONDRIALES GENOM	9
1.2.3 MITOCHONDRIALE DYSFUNKTION UND PATHOLOGIE	9
1.2.4 ROS & NEURONALE SCHÄDIGUNG	10
1.3 AMYOTROPHE LATERALSKLEROSE (ALS)	11
1.3.1 EPIDEMIOLOGIE	11
1.3.2 MOLEKULARGENETIK	12
1.3.3 PATHOGENESE	12
1.3.4 KLINIK UND VERLAUF	13
1.3.5 DIAGNOSE	14
1.3.6 THERAPIE	15
1.3.7 PROGNOSE	16
1.3.8 MAUSMODELLE	16
1.4 BIOMOLEKULARE REDOX-SENSOREN UND RATIOMETRISCHE MESSVERFAHREN	17
2. ZIELE DER ARBEIT	20
2.1 CHARAKTERISIERUNG DER SENSOREXPRESSSION IN <i>Thy1-Grx1-roGFP2</i>-MAUSLINIEN	20
2.2 KALIBRIERUNG DES SENSORPROTEINS <i>Grx1-roGFP2</i>	20
2.3 UNTERSUCHUNG DES MITOCHONDRIALEN REDOXSTATUS UNTER PHYSIOLOGISCHEN BEDINGUNGEN	20
2.4 UNTERSUCHUNG DES MITOCHONDRIALEN REDOXSTATUS UNTER PATHOLOGISCHEN BEDINGUNGEN	20
3. MATERIAL	21
3.1 MAUSEXPERIMENTE	21
3.2 FÄRBUNGEN	21
3.3 CHEMIKALIEN, LÖSUNGEN UND KITS	22
3.4 VERBRAUCHSMATERIAL	23
3.5 GERÄTE	24
3.6 MIKROSKOPIE	25
3.7 SOFTWARE	25
4. METHODEN	27
4.1 ZUCHT TRANSGENER <i>MITOROS</i>-MÄUSE	27
4.1.1 GENERIERUNG DER <i>MITOROS</i> -MAUSLINIEN	27
4.1.2 KREUZUNG DER LINIE <i>MITOROS</i> 920 MIT SOD1 ^{G93A}	27
4.2 CHARAKTERISIERUNG DER <i>GRX1-roGFP2</i>-PROTEINEXPRESSSION IN <i>MITOROS</i>-MAUSLINIEN	28
4.2.1 GEWEBEAUFBEREITUNG	28
4.2.2 HISTOLOGIE	28
4.2.3 FÄRBUNG	29
4.2.4 KONFOKALE MIKROSKOPIE	30
4.2.5 VERWENDETE SOFTWARE	31
4.3 KALIBRIERUNG DES SENSORPROTEINS <i>GRX1-roGFP2</i> IN <i>MITOROS</i>-MÄUSEN	31
4.3.1 EXPLANTAT-PRÄPARATION	32
4.3.2 AUSSTATTUNG DES MESSPLATZES	33
4.3.3 EXPERIMENTE DOSIS-ANTWORT-KURVE	34
4.4 UNTERSUCHUNG DES MITOCHONDRIALEN REDOXSTATUS UNTER PHYSIOLOGISCHEN BEDINGUNGEN	35

4.5 UNTERSUCHUNG DES MITOCHONDRIALEN REDOXSTATUS UNTER PATHOLOGISCHEN BEDINGUNGEN	36
4.6 QUANTITATIVE UND STATISTISCHE ANALYSE	36
4.6.1 MESSUNG DES REDOXSTATUS	36
4.6.2 MESSUNG DES SHAPE-FACTORS	37
4.6.3 BERECHNUNG VON STANDARDABWEICHUNG, STANDARDFEHLER, SIGNIFIKANZNIVEAU UND P-WERT	37
4.6.4 GRAPHISCHE DARSTELLUNG DER DATEN	38
4.7 BILDBEARBEITUNG DER AUFGENOMMENEN PRIMÄRDATEN-BILDER	38
4.8 PROTOKOLLE	39
5. ERGEBNISSE	41
5.1 CHARAKTERISIERUNG DER <i>GRX1-roGFP2</i>-EXPRESSION IN <i>MITOROS</i>-MAUSLINIEN	41
5.2 KALIBRIERUNG DES SENSORPROTEINS <i>GRX1-roGFP2</i>	49
5.3 UNTERSUCHUNG DES MITOCHONDRIALEN REDOXSTATUS UNTER PHYSIOLOGISCHEN BEDINGUNGEN	50
5.3.1 REDOXSTATUS IN MITOCHONDRIEN NEUROMUSKULÄRER ENDPLATTEN	50
5.3.2 REDOXSTATUS IN MITOCHONDRIEN DER INTERKOSTALNERVAXONE	50
5.3.3 KONTRAKTIONEN	51
5.4 UNTERSUCHUNG DES MITOCHONDRIALEN REDOXSTATUS UNTER PATHOLOGISCHEN BEDINGUNGEN AN <i>MITOROS</i> x <i>SOD1</i>^{G93A}-MÄUSEN	53
6. DISKUSSION	56
6.1 EX VIVO/IN VIVO MESSUNG DES MITOCHONDRIALEN REDOXSTATUS	58
6.2 VERÄNDERUNGEN DES MITOCHONDRIALEN REDOXSTATUS UNTER PHYSIOLOGISCHEN BEDINGUNGEN	60
6.3 VERÄNDERUNGEN DES MITOCHONDRIALEN REDOXSTATUS UNTER PATHOLOGISCHEN BEDINGUNGEN	64
6.4 AUSBLICK	65
7. ZUSAMMENFASSUNG	67
8. LITERATURVERZEICHNIS	70
9. VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN	81
10. DANKSAGUNG	85
11. LEBENSLAUF	87

1. Einleitung

1.1 Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)

1.1.1 Klassifikation der ROS

Der Begriff „Reaktive Sauerstoffspezies“ (*engl.* ROS = reactive oxygen species) bezeichnet eine Gruppe chemischer Moleküle, die bei der inkompletten Reduktion von Sauerstoff entstehen. Zu ihnen zählen die sogenannten „Reaktiven Sauerstoffintermediate“ (ROI = reactive oxygen intermediates) wie das Superoxid-Anion (O_2^-), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und das Hydroxyl-Radikal ($\cdot OH$). Die Gruppe der ROS wird vervollständigt durch Ozon (O_3) und Singulett Sauerstoff (1O_2). Aufgrund des Vorkommens ungepaarter Valenzelektronen sind sie chemisch hochreaktiv^{1,2}.

1.1.2 Quelle der ROS

Im Organismus gibt es drei wesentliche Quellen für reaktive Sauerstoffspezies. Die mitochondriale oxidative Phosphorylierung (OXPHOS) im Rahmen der mitochondrialen Atmungskette stellt bei der Mehrzahl eukaryoter Zelltypen die quantitativ wichtigste dar¹. Bei diesem Prozess passieren Elektronen die innere Mitochondrienmembran und werden durch Komplex I und III der Atmungskette direkt auf molekularen Sauerstoff transferiert. Hierbei entsteht das hochreaktive Superoxid (O_2^-), das zum größten Teil direkt im Anschluss von MnSOD (*engl.* manganese superoxide dismutase, siehe Abb. 1.1.1) in der Mitochondrienmatrix und Cu,ZnSOD (*engl.* copper zinc superoxide dismutase, siehe Abb. 1.1.1) im mitochondrialen Intermembranraum zu H_2O_2 umgewandelt wird. Die Enzyme Katalase, Thioredoxin-Peroxidase und Glutathion-Peroxidase sorgen für die Verstoffwechselung von H_2O_2 in seine Bestandteile H_2O und O_2 ^{3,4}. Ein bis zwei Prozent des Superoxids (O_2^-) jedoch werden durch Lecks in der mitochondrialen Atmungskette frei, welche deswegen nicht abgebaut werden können^{1,5}.

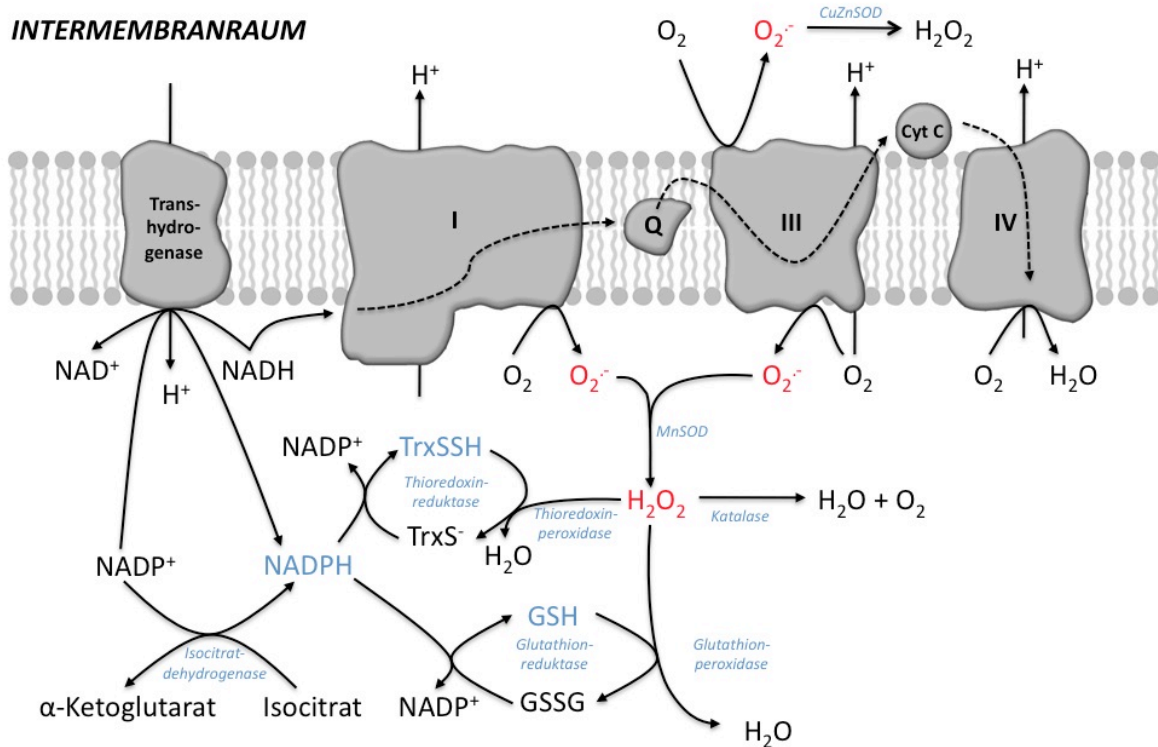


Abb. 1.1.1 Die Abbildung zeigt schematisch die wichtigsten Schritte der mitochondrialen Atmungskette und ROS-Produktion durch Komplex I und III. Ferner illustriert sie die Verstoffwechselung des entstehenden Superoxid-Anions O₂^{•-} durch Cu₂ZnSOD sowie MnSOD zu H₂O₂ sowie dessen Abbau durch die Enzyme Katalase, Thioredoxin-Peroxidase und Glutathion-Peroxidase. (Abbildung modifiziert nach Kowaltowski et al. 2009⁵)

Neben der ROS-Freisetzung im Rahmen der mitochondrialen oxidativen Phosphorylierung werden ROS auch im Endoplasmatischen Retikulum durch das Flavoenzym Ero1 sezerniert¹. Die Sekretion erhöht sich beim Überschuss an ungefalteten Proteinen sowie beim intrazellulären Ca²⁺-Anstieg¹.

Die dritte wesentliche ROS-Produktionsquelle sind sieben NADPH-Oxidasen (NOXs). NOXs werden durch rezeptorvermittelte Stimulation aktiviert, wie z.B. NOX2 in Phagozyten durch Aktivierung von Rezeptoren für Fcγ-Antikörper oder in aktivierten neutrophilen Granulozyten durch Aktivierung von Rezeptoren für Integrine und lösliche Agonisten wie TNF, Formylpeptide, Komplement C5a, Wachstumsfaktoren und Makrophagen-Entzündungsprotein¹. Auch konnte gezeigt werden, dass adulte hippocampale Stamm- und Progenitorzellen über NOX2 H₂O₂ produzieren, um

intrazelluläre Wachstumssignalwege zu aktivieren, über welche wiederum die natürliche Zellproliferation gefördert wird⁶.

Weitere ROS-Quellen sind γ -Strahlung, welche $\cdot\text{OH}$ produziert, sowie UV-Licht, welches $^1\text{O}_2$ erzeugen kann. Zigarettenrauch und Umweltschadstoffe enthalten ROS und andere organische Radikale. Einige Autakoide wie z.B. Dopamin durchlaufen eine Autooxidation, bei der sie ROS erzeugen¹.

1.1.3 ROS-Homöostase

Besonders interessant ist die Doppelrolle der reaktiven Sauerstoffspezies im Organismus. Einerseits fungieren sie in biomolekularen Pfaden als Signalmoleküle, die sich insbesondere durch ihre chemische Reaktionsfähigkeit, eine bestimmte Halbwerts- und somit Funktionszeit sowie Lipidlöslichkeit auszeichnen und so von anderen Signalmolekülen unterscheiden^{2,7}. Andererseits kann ein Überschuss an ROS toxisch sein. ROS sind in der Lage, Lipide, Proteine und DNA direkt zu oxidieren und so Zellen und Gewebe zu schädigen und zu zerstören⁸. Dieses biologische Paradoxon erfordert komplexe Mechanismen, die eine ROS-Homöostase gewährleisten, da ein Ungleichgewicht zwischen ROS-Produktion und antioxidanter Abwehr, welche Zellen vor toxischen Effekten schützt, zahlreiche Erkrankungen bedingen kann⁹. Oxidativer Stress spielt eine wichtige Schlüsselrolle in Alterungsprozessen und bei der Pathogenese vieler neurologischer, kardiovaskulärer und inflammatorischer Krankheiten¹⁰⁻¹³.

In Säugetieren wird die ROS-spezifische Antwort durch den Transkriptionsfaktor FOXO, das Tumorsuppressorgen p53, das Onkogen c-Myc sowie den die mitochondriale Biogenese stimulierenden PRAR-coactivator-1 (PGC-1) kontrolliert. Beispielsweise verhindert p53 durch die Regulierung von GPX1 und Sestrinen eine Toxizität bei vermehrter H_2O_2 -Akkumulation².

1.2 Mitochondrien

Mitochondrien kommen in den meisten eukaryoten Zellen zu hunderten bis tausenden vor¹⁴. Im Allgemeinen wird angenommen, dass ihr Ursprung in der endosymbiotischen Assoziation von oxidativen Bakterien und glykolytischen proto-eukaryotischen Zellen liegt. Diese sog. Endosymbiontentheorie wird u.a. durch die Tatsache gestützt, dass Mitochondrien eine Doppelmembran besitzen und über eine eigene DNA (mtDNA) mit bakteriellen Eigenschaften verfügen¹⁵.

1.2.1 Mitochondriale Funktion

Die wichtigste Funktion der Mitochondrien im menschlichen Organismus ist die Bereitstellung von Energie in Form von ATP. Dieses wird im Rahmen der oxidativen Phosphorylierung (OXPHOS) der Atmungskette gewonnen¹⁶. Ferner finden in Mitochondrien verschiedene Stoffwechselwege (wie z.B. Zitratzyklus, β -Oxidation) statt¹⁷, sie sind an Signalwegen der Apoptose beteiligt^{18,19}, stellen einen wichtigen Faktor bei der zellulären Calcium-Homöostase²⁰ dar und synthetisieren überlebenswichtige Eisen-Schwefel-Cluster, die u.a. von vielen Enzymen der Atmungskette benötigt werden²¹.

1.2.2 Mitochondriales Genom

Die mitochondriale DNA besteht aus 16.569 Basenpaaren und 37 Genen. Sie kodiert für 13 Polypeptide der Atmungskette sowie rRNAs und tRNAs, die für die intramitochondriale Proteinsynthese notwendig sind¹¹. Die mitochondriale DNA wird ausschließlich maternal vererbt, da die mtDNA des Spermiums nach der Befruchtung in der Zygote nicht mehr persistiert^{11,22}.

1.2.3 Mitochondriale Dysfunktion und Pathologie

Die mitochondriale DNA macht etwa 1% der gesamten zellulären DNA aus; Mutationen kommen aber wesentlich häufiger bei der mitochondrialen DNA als bei der zellulären DNA vor. Da den Mitochondrien eine wichtige Rolle im oxidativen Stoffwechsel praktisch aller Gewebe zukommt²³, können Mutationen der mitochondrialen DNA eine

große Zahl von Erkrankungen hervorrufen. Durch Funktionsstörungen der Mitochondrien entstehen sogenannte Mitochondriopathien wie z.B. das MELAS-Syndrom, die Leber'sche Opticusatrophie oder das Kearns-Sayre-Syndrom hervorgerufen werden. Bei Mitochondriopathien kann es zu einer Beteiligung mehrerer Organsysteme kommen, wie z.B. dem Herz-Kreislauf-System (z.B. in Form von Kardiomyopathien), dem endokrinen System (z.B. durch Manifestation eines Diabetes mellitus) oder dem Blutbildungssystem (z.B. Entwicklung einer Anämie oder Panzytopenie). Ferner kommt einer mitochondrialen Funktionsstörung auch Bedeutung in der Entstehung von neurodegenerativen Erkrankungen¹¹ (z.B. Morbus Parkinson^{12,24}, Morbus Alzheimer²⁵, Amyotrophe Lateralsklerose²⁶ oder der Chorea Huntington²⁷⁻²⁹) zu.

1.2.4 ROS & neuronale Schädigung

Die mitochondriale Atmungskette ist die wesentliche Quelle reaktiver Sauerstoffspezies in eukaryoten Zellen (s.o.). Gleichzeitig sind Mitochondrien besonders empfindlich gegenüber oxidativem Stress, da dieser mtDNA-Mutationen verursachen kann³⁰. Durch diese in Folge von Mutationen bedingten Enzymdysfunktionen kommt es zu einer Zunahme der mitochondrialen ROS-Produktion und somit zu einer weiteren Schädigung des Mitochondrions³¹.

In Hinblick auf die entscheidende Funktion von Mitochondrien bei bioenergetischen Prozessen, Calcium-Pufferung und Apoptose³², hat ein solcher „Circulus vitiosus“ verheerende Folgen für die gesamte Zelle¹¹. Neuronen scheinen mit ihrem hohen Energiebedarf und ihrer komplexen Morphologie besonders anfällig für solche schädigende Ereignisse zu sein. Tatsächlich spielt die mitochondriale Schädigung durch mtDNA-Mutationen und oxidativen Stress eine tragende Rolle bei akuter neuronaler Schädigung wie z.B. nach traumatischen oder inflammatorischen Läsionen³³⁻³⁵, aber auch bei chronischen neurodegenerativen Erkrankungen wie z.B. der Amyotrophen Lateralsklerose (ALS), Morbus Alzheimer oder Morbus Parkinson^{11,12,24,36-38}.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Redoxstatus sowie morphologische mitochondriale Veränderungen unter pathologischen Bedingungen untersucht. Hierfür verwendeten wir ein Mausmodell der ALS, die SOD1^{G93A}-Maus. Daher wird im Folgenden das Krankheitsbild der Amyotrophen Lateralsklerose besprochen.

1.3 Amyotrophe Lateralsklerose (ALS)

Die ALS ist eine seltene degenerative Erkrankung, die sowohl die ersten motorischen Neurone der motorischen Hirnrinde (motorischer Kortex) als auch die als zweite motorische Neurone bezeichneten Vorderhornzellen des Rückenmarks betrifft. Der französische Neurologe Jean-Martin Charcot beschrieb 1874 erstmals die klinischen Zeichen der ALS³⁹. Die Erkrankung kann sowohl zu spastischen Symptomen (in Folge der Schädigung des 1. Motoneurons) als auch zu atrophischen Paresen (in Folge einer Schädigung des 2. Motoneurons) führen. Pathologisch ist die ALS durch eine Degeneration der Vorderhörner, der kaudalen motorischen Hirnnervenkerne und der motorischen Hirnrinde charakterisiert⁴⁰. Man unterscheidet zwischen einer familiären (FALS) und einer sporadischen (SALS) Form der ALS. Die Ätiologie und genaue Pathogenese der ALS sind bis heute nicht komplett verstanden. Die ALS ist durch einen progredienten, klinischen Verlauf mit schlechter, infauster Prognose gekennzeichnet.

1.3.1 Epidemiologie

Epidemiologische Studien werden durch verschiedene Faktoren erschwert. Beispielsweise gestaltet es sich schwierig, einen spezifischen Krankheitsbeginn festzulegen, da die Zeitspanne zwischen pathologischen Veränderungen und ersten klinischen Symptomen variabel lang sein kann⁴¹. Populationsbezogene epidemiologische Studien zeigen, dass die Inzidenz der ALS in Europa etwa 2,16 pro 100.000 Einwohner pro Jahr beträgt⁴². Auch wenn die ALS eine Erkrankung ist, die weltweit auftritt, ist eine genaue Inzidenz nicht bekannt. Sie variiert stark zwischen verschiedenen ethnischen Gruppen⁴³. Die sporadische Form der Erkrankung tritt bei Männern häufiger auf als bei Frauen (3,0 vs. 2,4 pro 100.000 Einwohner pro Jahr), bei der familiären Form ist die Inzidenz bei beiden Geschlechtern etwa gleich⁴¹. Der Erkrankungsgipfel für die sporadische Variante der Erkrankung liegt bei 58-63 Jahren, der für die familiäre Variante der Erkrankung liegt zwischen 47 und 52 Jahren⁴⁴. Die ALS ist mit einer Punktprävalenz von 4,91 pro 100.000 Einwohnern⁴³ die häufigste motorische Systemkrankheit⁴⁵.

1.3.2 Molekulargenetik

Die familiäre Form der ALS (FALS) macht etwa 5-10% aller ALS-Fälle aus. Die FALS folgt einem autosomal dominanten Vererbungsmuster⁴⁶. Die restlichen 90-95% aller ALS-Fälle werden als sporadische Form der ALS (SALS) zusammengefasst. Bis jetzt wurden 13 Genloci identifiziert^{47,48}. Von diesen ist bekannt, dass Mutationen in *SOD1* (kodiert für Kupfer/Zink Ionen-bindende Superoxid-Dismutase), *TARDBP* (*TDP-43*, kodiert für TAR DNA Bindungsprotein), *FUS* (kodiert für Fusion beim Sarkom), *ANG* (kodiert für Angiogenin, Ribonuclease, RNase A Familie, 5) und *OPTN* (kodiert für Optineurin) einen klinischen Phänotyp verursachen⁴¹.

In 20% der Fälle der FALS und 3% der SALS werden *SOD1*-Mutationen entdeckt^{49,50}. Andere Mutationen kommen seltener vor: *TDP-43*⁴⁶ und *FUS*^{51,52}, zwei multifunktionale Proteine, die an Mechanismen der Genexpression und -regulation beteiligt sind, findet man in etwa 5% der FALS-Fälle, *ANG*-Mutationen nur in etwa 1%.

1.3.3 Pathogenese

Die pathophysiologischen Mechanismen bei der Entwicklung der ALS sind multifaktoriell und unterliegen der komplexen Interaktion verschiedener genetischer und molekularer Signalwege^{53,54}. Bis heute sind sie nicht komplett verstanden. Eine Assoziation mit zahlreichen Umweltfaktoren wird diskutiert, darunter exzessives Sporttreiben⁵⁵ (eine retrospektive Studie von Fußballspielern in der italienischen Profiligen zeigte ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer ALS⁵⁶), aktiver Dienst beim Militär (eine Studie unter US-amerikanischen Soldaten zeigte ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer ALS⁵⁷) oder Zigarettenrauchen⁵⁸. Die Überfunktion der *SOD1* bei der *SOD1*-Mutation scheint oft eine Funktionsverstärkung des Enzyms mit Freisetzung freier Sauerstoffradikale zu verursachen, welche zur Zellschädigung und zum Zelltod führt^{59,60} (weitere Mechanismen der Schädigung durch *SOD1*-Überexpression siehe Abb. 1.3.1). Ein weiterer pathogenetisch relevanter Faktor ist die durch Glutamat vermittelte Exzitotoxizität (exzessive Aktivierung postsynaptischer Glutamatrezeptoren). Diese bedingt eine Aktivierung von Calcium-abhängigen enzymatischen Signalwegen und die Freisetzung freier Radikale, welche zum neuronalen Schaden führen können⁶¹⁻⁶³. Ferner scheinen mitochondriale Strukturdefekte, Funktionsstörungen der Na⁺/K⁺-Pumpe sowie

Störungen des axonalen Transports eine Rolle bei der Pathogenese der ALS zu spielen⁶⁴⁻

66.

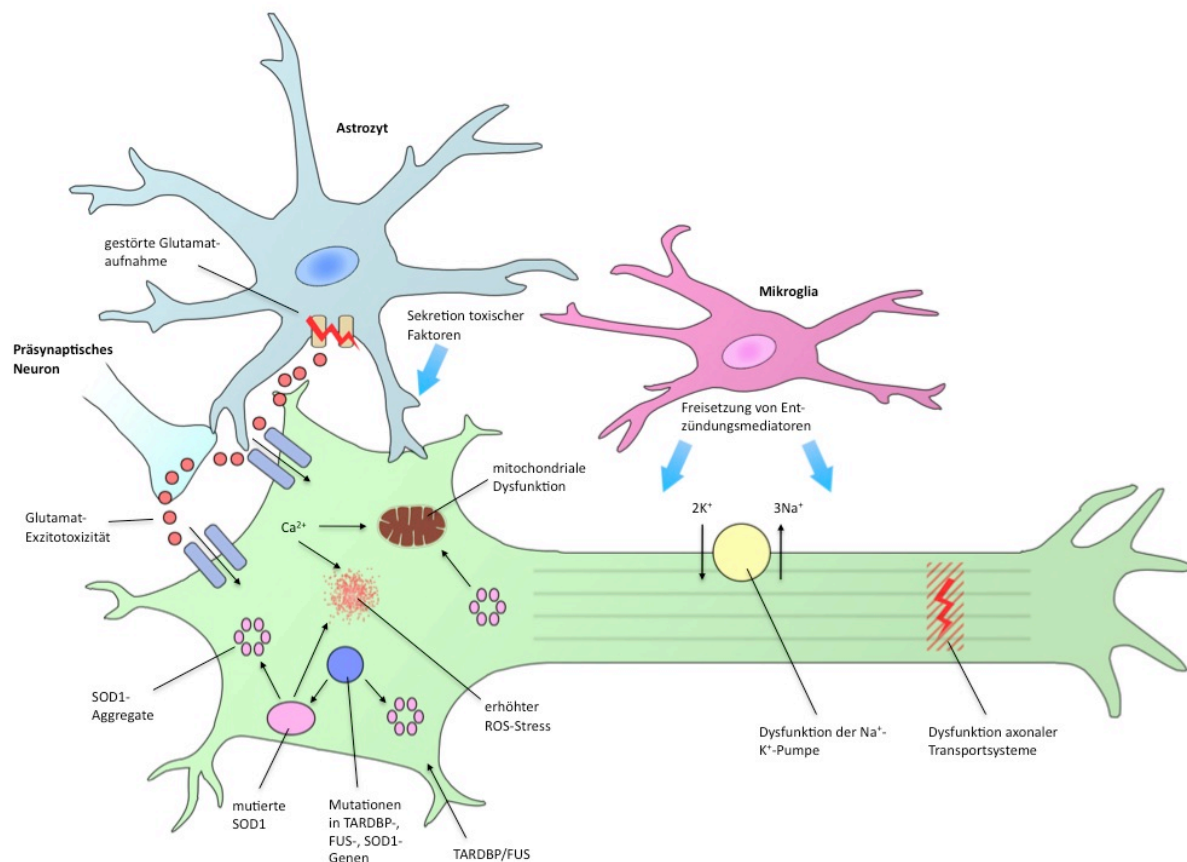


Abb. 1.3.1 Die *SOD1*-Mutation beeinträchtigt diverse Zellfunktionen. Die Toxizität der mutierten Superoxid Dismutase (*SOD1*) ist multifaktoriell und wirkt über viele, miteinander verknüpfte Pfade. Innerhalb des Motoneurons beeinträchtigt die mutierte *SOD1* den DNA/RNA Metabolismus, Mitochondrien (Abnahme der ATP-Produktion und der Calcium Pufferung, verstärkte Freisetzung freien Calciums), Neurofilamente und axonalen Transport, die Funktion des Endoplasmatischen Retikulums (ER), den Golgi-Apparat und Proteasomen (Abbildung verändert nach Kiernan et al. 2011⁴¹)

1.3.4 Klinik und Verlauf

Kennzeichen der ALS ist die Beeinträchtigung sowohl des ersten als auch des zweiten Motoneurons⁶⁷. Die klinischen Zeichen sind anfänglich oft sehr variabel, je nach Lokalisation der Schädigung der motorischen Bahn (bulbär, zervikal, thorakal, lumbal) kommt es zur Funktionseinschränkung der oberen oder unteren Extremitäten, der von Hirnnerven versorgten (bulbären) Muskulatur sowie der Rumpfmuskulatur⁶⁸. Die Schädigung des ersten Motoneurons hat spastische Paresen zur Folge. Der erhöhte Muskeltonus führt u.a. zu einem spastischen, verlangsamten und unsicherem Gangbild. Die Beteiligung von motorischen Hirnnervenkernen kann zu bulbären Symptomen (z.B.

Schluckstörung, Zungenatrophie, Dysarthrie) führen. Atrophische, schlaffe Paresen sind Folge einer Schädigung des zweiten Motoneurons. Ferner sind aufgrund der erhöhten Erregbarkeit typischerweise Faszikulationen und schmerzhafte Muskelkrämpfe (Crampi) der Extremitätenmuskeln zu beobachten⁶⁹.



Abb. 1.3.2 Linksbetonte Zungenatrophie (links) und Atrophie der kleinen Handmuskulatur (Interossei-Muskeln) (rechts) bei einer ALS-Patientin

Die fortschreitende Muskelschwäche ist die Hauptbeschwerde der Patienten. Anfänglich zeigt sich diese typischerweise unilateral und nur in einem Segment. Im Krankheitsverlauf kommt es zur zunehmenden Schwäche und Ausbreitung auf andere Segmente. Eine Beteiligung der Atemmuskulatur führt zu Belastungsdyspnoe, Orthopnoe und Hypoventilation mit daraus resultierender Hyperkapnie und frühmorgendlichen Kopfschmerzen⁷⁰. Die Progredienz der Dyspnoe bis hin zur Ruhedyspnoe gilt als Beginn der terminalen Phase der Erkrankung⁴¹.

1.3.5 Diagnose

Da es keinen eindeutigen diagnostischen Test für die ALS gibt, stützt sich die Diagnosefindung der ALS derzeit hauptsächlich auf die Beurteilung der Symptome, welche durch die Schädigung des ersten und zweiten Motoneurons verursacht werden. Entsprechende Differentialdiagnosen müssen ausgeschlossen werden. Hierfür stehen die 1998 revidierten *El-Escorial*-Kriterien⁷¹ zur Verfügung. Diese gewichten die klinischen Zeichen der Schädigung der beiden Motoneurone und die betroffenen Regionen, um einen bestimmten Grad der Diagnosesicherheit zu erreichen. Trotz der Spezifität der *El-Escorial*-Kriterien weisen sie insbesondere bei der Diagnosefindung in

sehr frühen Stadien eine sehr geringe Sensitivität auf⁷². Es gibt zahlreiche Bestrebungen, Tests mit hoher Sensitivität zu entwickeln. Momentan befinden sich die *Awaji*-Kriterien in klinischer Prüfung. Diese zielen auf eine Gleichwertigkeit elektrodiagnostischer und klinischer Befunde ab⁷³.

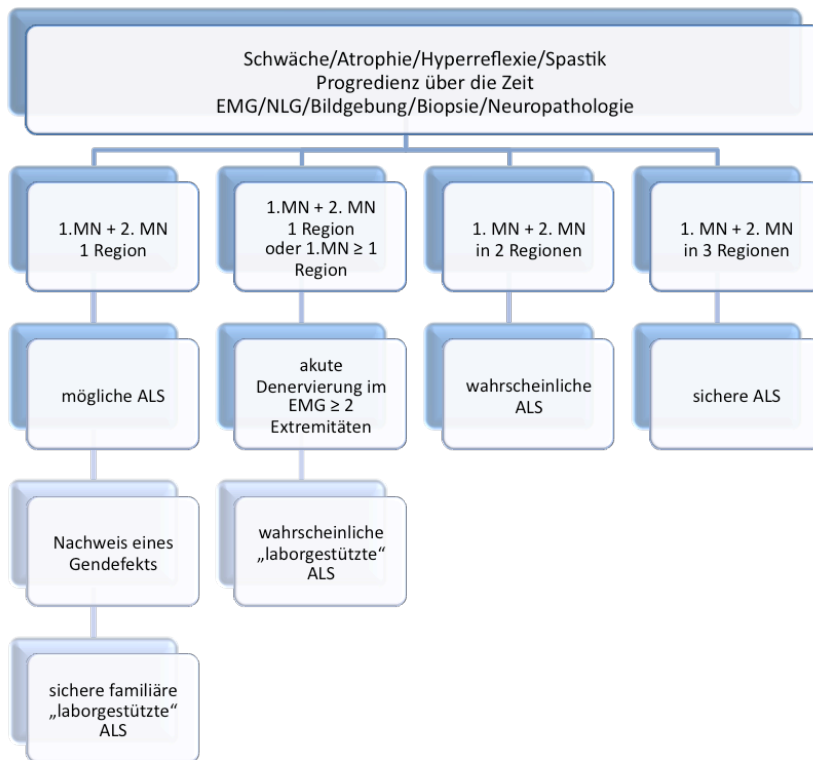


Abb. 1.3.3 Diagnosestellung nach den „El-Escorial-Kriterien“

In der technischen Zusatzdiagnostik ist die Durchführung eines Elektromyogramms (EMG) obligat. In dieser Untersuchung kann der generalisierte Befall des zweiten Motoneurons nachgewiesen werden⁷⁴. Wesentlich in der Diagnosefindung der ALS ist der differentialdiagnostische Ausschluss anderer Erkrankungen mit ähnlichen Symptomen. Aus diesem Grunde sind eine Laboruntersuchung (im Hinblick auf eine Myasthenie oder Myopathie), eine Elektroneurografie sowie eine MRT-Bildgebung des Schädels und gegebenenfalls des Rückenmarks zwingend erforderlich⁶⁹.

1.3.6 Therapie

Neuroprotektive Therapieansätze nutzen den Glutamat-Antagonisten Riluzol, um den Untergang motorischer Nervenzellen zu hemmen⁷⁵. In randomisiert-kontrollierten Studien konnte das Überleben um 3-6 Monate verlängert werden⁷⁵⁻⁷⁷. Riluzol ist das einzige bisher bekannte Therapeutikum bei der ALS mit lebensverlängernder

Wirkung⁷⁸. Symptomatische Therapieansätze stehen bei der ALS nach wie vor im Vordergrund der Behandlungsstrategie. Zu zahlreichen Optionen zählen unter anderem Physiotherapie, Sprachtherapie, psychologische Betreuung sowie supportive medikamentöse Therapie bei Symptomverschlechterung (z.B. Morphin, Baclofen, SSRIs, u.v.m.) sowie gegebenenfalls eine Heimbeatmung⁷⁰.

1.3.7 Prognose

Die Prognose der Amyotrophen Lateralsklerose ist insgesamt schlecht und hängt vom Subtyp ab⁴¹. Patienten mit initial bulbärer Symptomatik haben die schlechteste Prognose (mittleres Überleben 2 bis 2,5 Jahre). Das mediane Überleben der übrigen ALS-Fälle beträgt 3-5 Jahre. Lediglich bei etwa 10-15% ist das Überleben im Mittel länger (> 10 Jahre).

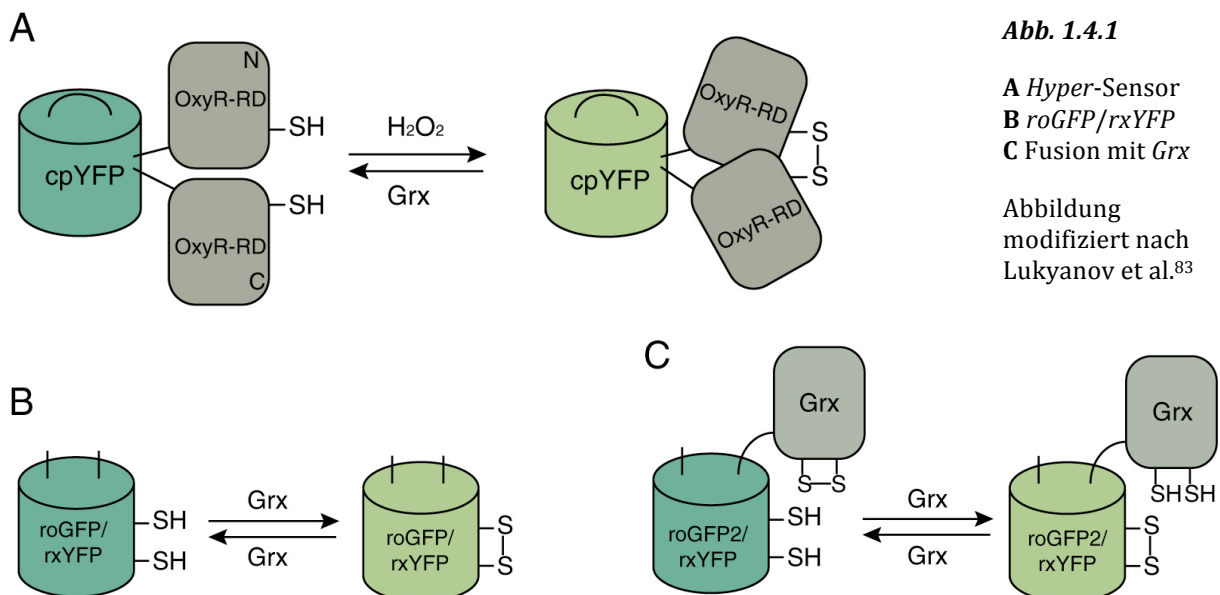
1.3.8 Mausmodelle

Mäuse mit Mutationen der *SOD1* sind das am häufigsten verwendete transgene Tiermodell in der ALS-Forschung. Da sie aber auf dem therapeutischen Sektor bisher noch keinen Durchbruch ermöglicht haben, wird fortlaufend an der Entwicklung neuer Tiermodelle geforscht. Die kürzliche Entdeckung der Mutationen in Genen, die für *TDP-43* und *FUS* kodieren (siehe Absatz Molekulargenetik), haben dazu geführt, neue Mausmodelle mit diesen Mutationen zu entwickeln. Momentan sind allerdings noch keine derartigen Mausmodelle verfügbar⁷⁹. Aus diesem Grund bleibt das Mausmodell mit einer Überexpression der mutierten *SOD1*, zu denen die Variante *SOD1^{G93A}* zählt, das aktuell beste Modell, um die Pathogenese der ALS zu erforschen⁷⁹.

1.4 Biomolekulare Redox-Sensoren und ratiometrische Messverfahren

Voraussetzung für das Verständnis der Pathogenese vieler Erkrankungen ist die Untersuchung des Redox-Systems. Bis vor kurzem war die dynamische Analyse der Redox-Prozesse in lebenden Zellen nicht möglich, da passende Redox-Biosensoren nicht verfügbar waren¹⁰. Der Einsatz herkömmlicher Sensoren wie Redox-sensitiver GFPs (*engl. reduction-oxidation sensitive green fluorescent proteins, roGFPs*) war durch Spezifitätsprobleme und ihre nur sehr langsame Kinetik limitiert¹⁰. RoGFPs haben zwei fluoreszente Exzitationsmaxima bei ungefähr 400 und 490nm⁸⁰, deren Intensität sich in Abhängigkeit des Redoxstatus verändert. Aus den beiden Messwerten lässt sich ein Quotient berechnen, der Aufschluss über den Redoxstatus gibt. Bei dieser Methode handelt es sich um ein ratiometrisches Messverfahren (λ -Ratiometrie)⁸⁰.

Herkömmliche Messungen, welche auf der Intensität von fluoreszenten Signalen basieren, werden leicht durch die optischen Eigenschaften der beim Experiment verwendeten Flüssigkeit, die Konzentration des Fluoreszenzfarbstoffs und andere experimentelle oder instrumentelle Faktoren beeinflusst (z.B. Messplatz, Lichtquelle, Bleichen, Expressionslevel)⁸¹. Die λ -Ratiometrie, bei der nach dem Messen zweier Emissionsmaxima eine Intensitätsratio berechnet wird, vermeidet die meisten dieser Interferenzen⁸².



Innerhalb der letzten Jahre seit ihrer Einführung haben genetisch kodierte fluoreszente Indikatoren (*engl. genetically encoded redox indicators, GERIs*) wie *HyPer*, redox-

sensitive gelbe Fluoreszenzproteine (*rxYFP*) und neue redox-sensitive GFPs (*roGFPs*) ein enormes Interesse geweckt, da sie das dynamische Monitoring von Redox-Veränderungen *in vivo* ermöglichen⁸⁴. Redoxsensoren, die auf Fluoreszenzproteinen basieren, sind spezifisch für bestimmte Redoxpaare und bieten die Möglichkeit der Transgenese und des feinen subzellulären Targetings⁸³. Der H₂O₂-Sensor *HyPer* auf der einen Seite besteht aus einem gelben Fluoreszenzprotein (*cpYFP*), das in die regulatorische Domäne des prokaryoten H₂O₂-Sensor-Proteins *OxyR-RD* integriert wurde⁸⁵ (siehe Abbildung 1.4.1A). *RxYFP* und *roGFPs* auf der anderen Seite enthalten Paare von Cystein-Residuen, durch welche der aktuelle GSH/GSSG-Redoxstatus widerspiegelt wird. Der Redoxstatus von Cystein äquilibriert mit der GSH/GSSG-Ratio mit Hilfe von Thiol-Disulfid-Austausch-Enzymen. Intrazellulär wird die Äquilibration mit der GSH/GSSG-Ratio durch das Austausch-Enzym Glutaredoxin (*Grx*) katalysiert und geht nur langsam von statten⁸³ (siehe Abbildung 1.4.1B). Durch Fusion von *rxYFP* und *roGFP2* mit *Grx* konnte eine sehr schnelle Äquilibration der Redox-GEFIs erreicht werden – unabhängig vom natürlichen *Grx*-Vorkommen (siehe Abbildung 1.4.1C).

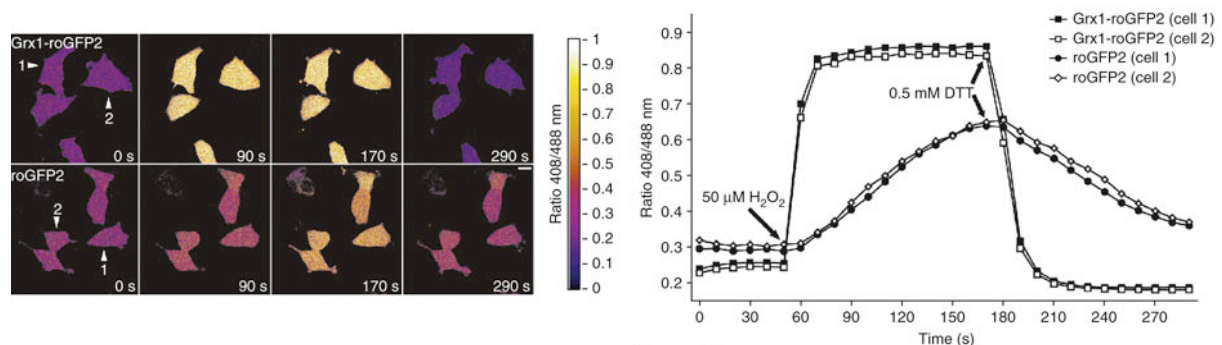


Abb. 1.4.2 HeLa Zellen mit *Grx1-roGFP2*-Exprimierung wurden mit 408/488nm Lasern angeregt, die Emissionsratio wurde berechnet. Nach 50s exogene Zugabe von 50μm H₂O₂, später Zugabe von 0.5mM DTT (aus Gutscher et al. 2008¹⁰)

Die Fusion des *roGFP2* mit Glutaredoxin-1 (*Grx-1*) bietet zwei wesentliche Vorteile: Zum einen eine spezifische Sensorantwort auf den Glutathion-Redoxstatus sowie zum anderen eine schnellere zeitliche Auflösung (siehe Abb. 1.4.2 im Vergleich zu *roGFP2*, welches bei gleichzeitiger H₂O₂-Applikation mit deutlicher Latenz reagiert, steigt die *Grx1-roGFP2*-Ratio unmittelbar an).

Für die modellspezifische Auswahl des richtigen Biosensors ist es wichtig, deren Funktionsweise und speziellen Eigenschaften zu kennen und zu verstehen. Die größte

Herausforderung bei der Arbeit mit dem *HyPer*-Sensor als auch dem *rxYFP*-Sensor ist deren pH-Sensitivität. Aus diesem Grund müssen adäquate Kontrollen verwendet werden, um potentielle pH-abhängige Schwankungen zu erfassen^{83,86,87}. Während die pH-Sensitivität beim *HyPer*- und *rxYFP*-Sensor eine adäquate Kontrolle des pHs notwendig macht, bietet das Arbeiten mit *roGFP*-Sensoren diesbezüglich einen klaren Vorteil: *RoGFPs* sind nicht pH-abhängig⁸⁸. Ferner gibt es neue *roGFP*-Varianten, die die *roGFP*-Funktionalität weiter verbesserten. Beispielsweise konvertiert der Austausch von *Grx* durch die *Orp1*-Peroxidase – ein H_2O_2 -Sensorprotein – in Fusion mit dem redoxsensitiven grünen Fluoreszenzprotein 2 (*roGFP2*) den Sensor in den H_2O_2 -Sensor *roGFP2-Orp1*^{83,89}. *RoGFP2-Orp1* (und auch *HyPer*) sind Sensoren, welche spezifisch Wasserstoffperoxid (H_2O_2) detektieren, während *rxYFP*, *roGFP1/2* und das in unseren Versuchen genutzte *Grx1-roGFP2* spezifisch den Redoxstatus des oxidierten/reduzierten Glutathion-Redox-Paars *GSSG/GSH* messen (E_{GSH})^{83,90,91}.

Ferner sei bei der Arbeit mit Redoxsensoren noch auf weitere potentielle Effekte auf das Versuchssystem hingewiesen. *HyPer* beispielsweise hat eine sehr hohe Reaktionsgeschwindigkeit mit Wasserstoffperoxid ($10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) und führt zur Reduktion von H_2O_2 ⁹². Daraus könnte man folgern, dass *HyPer* eine antioxidante Aktivität aufweist, welche allerdings abhängig von der Reduktionsaktivität von *Grx* und *Trx* ist. Während die Oxidation von *HyPer* in Sekunden von statten geht, dauert die Reduktion mehrere Minuten^{85,92,93}. Insofern kann *HyPer* nicht als effektives Antioxidans eingeschätzt werden⁸³. Auf der anderen Seite stellt die Überexpression von *Grx1-roGFP2* zusätzliche *Grx*-Aktivität zur Verfügung, welche einen Effekt auf Thiole und andere Proteine haben könnte. Weitere Studien könnten zum Ziel haben, diese Effekte näher zu beleuchten.

2. Ziele der Arbeit

2.1 Charakterisierung der Sensorexpression in *Thy1-Grx1-roGFP2*-Mauslinien

Mittels konfokaler Mikroskopie wollten wir eine histologische Charakterisierung des Expressionsmusters des fluoreszenten *Grx1-roGFP2*-Sensorproteins in drei verschiedenen Mauslinien (*Thy1-Grx1-roGFP2-Mauslinien im Folgenden „MitoROS-Mäuse“ genannt*) durchführen. Hierfür sollten Schnitte von Gehirn, Rückenmark, Retina und Muskel hergestellt und gegengefärbt werden.

2.2 Kalibrierung des Sensorproteins *Grx1-roGFP2*

Mittels eines Nerv-Muskel-Explantats wollten wir *ex vivo* den mitochondrialen Glutathion-Redoxstatus in *mitoROS*-Mauslinien quantifizieren. Die Anforderungen an den Sensor waren Spezifität für ROS, gute zeitliche und räumliche Auflösung, sowie Stabilität, Reliabilität und Validität der Messungen. Eine Kalibrierung des Sensorproteins mit Erstellung einer Dosis-Antwort-Kurve sollte die Funktion des Sensors in den *mitoROS*-Mauslinien bestätigen und dokumentieren.

2.3 Untersuchung des mitochondrialen Redoxstatus unter physiologischen Bedingungen

Bei den Untersuchungen der Physiologie wollten wir den mitochondrialen Redoxstatus in Abhängigkeit von Dynamik und Lokalisation der Mitochondrien in unterschiedlichen Nervenzellpopulationen messen.

2.4 Untersuchung des mitochondrialen Redoxstatus unter pathologischen Bedingungen

Pathologische Veränderungen des mitochondrialen Redoxstatus wollten wir im Tiermodell der ALS untersuchen. Dazu kreuzten wir *mitoROS*- mit *SOD1^{G93A}-Mäusen*. Besonderes Augenmerk lag hierbei auf der Messung des mitochondrialen Redoxstatus und dessen Relation zu morphologischen Veränderungen der Mitochondrien.

3. Material

Das in der Arbeit verwendete Material (Chemikalien, Geräte, Verbrauchsmaterial etc.) sowie die eingesetzten Mausstämmen sind in den nachfolgenden Tabellen zusammengefasst.

3.1 Mausexperimente

Um selektiv den Grx1-roGFP2-Redoxsensor in neuronalen Mitochondrien zu exprimieren, nutzten wir eine modifizierte Version des Thy1-Promotors. Die Konstrukte wurden gemäß Standardprozeduren kloniert⁹⁴ und die Parentalgeneration wurde durch Pronuklearinjektion generiert. Wir haben insgesamt 11 Mauslinien auf die Expression des fluoreszenten Sensorproteins Grx1-roGFP2 untersucht, von denen drei (Linien 676, 690, 920) näher charakterisiert wurden. SOD^{G93A}-Mäuse (Tg(SOD1*G93A)1Gur/J; The Jackson Laboratory)⁹⁵ wurden mit Thy1-mito-Grx1-roGFP2 Tieren gekreuzt. Wir nutzten männliche und weibliche Tiere für unsere Experimente. Alle Experimente mit Tieren erfüllten institutionelle Richtlinien und wurden vom Tierversuchskomitee der Regierung von Oberbayern genehmigt.

3.2 Färbungen

Material	Spezifikation	Bestell-Nr.	Bezugsquelle
Phalloidin 647	Alexa Fluor® 647 Phalloidin	A22287	Molecular Probes®, Custom Laboratory Services, Invitrogen Corporation, Grand Island, NY 14072 USA http://www.invitrogen.com/
Bungarotoxin 594	α -Bungarotoxin, Alexa Fluor® 594 Conjugate	B-13423	Molecular Probes®, Custom Laboratory Services, Invitrogen Corporation, Grand Island, NY 14072 USA http://www.invitrogen.com/
Neurotrace 640/660	NeuroTrace® 640/660 deep-red fluorescent Nissl stain - solution in DMSO	N-21483	Molecular Probes®, Custom Laboratory Services, Invitrogen Corporation, Grand Island, NY 14072 USA http://www.invitrogen.com/

3.3 Chemikalien, Lösungen und Kits

Material	Spezifikation	Bestell-Nr.	Bezugsquelle
Agarose	Agarose 500g	840004	Biozym Scientific GmbH, 31840 Hessisch Oldendorf, Deutschland http://www.biozym.com/
Agarose-Lösung 2%			<i>siehe Protokoll</i>
DTT	Electran, 1,4-Dithiothreitol, molecular biology grade, 5g	AMREM109- 5	VWR® International LLC, Pennsylvania, USA http://www.vwr.com/
Ethanol	Vergällt 70%, 5l	64-17-5	CLN GmbH, 85416 Niederhummel, Deutschland http://www.cln-freising.de/
NaCl	Natriumchlorid, SigmaUltra, min. 99.5%	S7653-1KG	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, 82024 Taufkirchen, Deutschland http://www.sigmaaldrich.com/
Na ₂ HPO ₄	Natriumdihydrogenphosphat- Monohydrat	1063461000	Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Deutschland http://www.merck.de
NaOH	Natronlauge, BioXtra, ≥98%	S8045-500G	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, 82024 Taufkirchen, Deutschland http://www.sigmaaldrich.com/
Natural Ringer			<i>Siehe Protokoll</i>
Paraformaldehyd	Paraformaldehyd, kristallin, 1kg	P6148-1KG	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, 82024 Taufkirchen, Deutschland http://www.sigmaaldrich.com/
PBS			<i>Siehe Protokoll</i>
PFA-Lösung 4%	Paraformaldehyd 4%		<i>Nach Protokoll hergestellt</i>
Phosphatpuffer	PB 0.2M		Im Hause hergestellt, Institut für Klinische Neuroimmunologie, LMU, München, Deutschland
Tissue-Tek	Tissue-Tek® O.C.T™ Compound	4583	Sakura Finetek Europe B.V., The Netherlands http://www.sakuraeu.com/
Triton	Triton® X-100, SigmaUltra	X100-100ML	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, 82024 Taufkirchen, Deutschland http://www.sigmaaldrich.com/
Vectashield	VECTASHIELD® Mounting Medium, 10ml	H-1000	Vector Labs, Burlingame, CA 94010 http://www.vectorlabs.com

Wasserstoffperoxid	Hydrogen peroxide solution 30%, puriss., stabilized, 0,5l	18312- 500ML	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, 82024 Taufkirchen, Deutschland http://www.sigmaaldrich.com/
Wasserstoffperoxid	Hydrogen peroxide solution 30%, puriss., stabilized, 1l	18312-1L	Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, 82024 Taufkirchen, Deutschland http://www.sigmaaldrich.com/

3.4 Verbrauchsmaterial

Material	Spezifikation	Bestell-Nr.	Bezugsquelle
Alufolie			
Deckgläser	Menzel-Gläser, 24 x 24mm, 24 x 32mm, 24 x 50mm, 100 Deckgläser	BB024024A1 BB022032A1 BB024050A1	Gerhard Menzel GmbH, 38116 Braunschweig, Deutschland http://www.menzel.de/
Falcon Röhrchen	BD Falcon 15ml, 50ml	352096 352070	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ USA 07417 http://www.bdbiosciences.com/
Nagellack	LACURA Beauty 12ml		Premium Cosmetics, GmbH, 73054 Eislingen, Deutschland http://premium-cosmetics.com/
Objektträger	Menzel-Gläser, Größen 76 x 26mm, 50 Stück	AG00000112E	Gerhard Menzel GmbH, 38116 Braunschweig, Deutschland http://www.menzel.de/
Petrischalen	Cell Culture Disk 100mm x 20mm Style	430293	Corning Inc., Corning, NY 14831, USA http://www.corning.com/
Pipettenspitzen	epT.I.P.S.10/200/1000 µl		Eppendorf, Hamburg, Deutschland http://www.eppendorf.com/
Präparierbesteck	Pinzetten, Scheren		Fine Science Tools GmbH, 69121 Heidelberg, Deutschland http://www.finescience.de/
Schutzhandschuhe	Peha-soft satin L	942726	Paul Hartmann AG, 89522 Heidenheim, Deutschland http://de.hartmann.info/
Sekundenkleber	UHU Sekunden Alleskleber geruchsfrei EASY, 3g	474-742629	UHU GmbH & Co. KG, 77815 Bühl/Baden, Deutschland http://www.uhu.com/
Slygard-Schalen			Im Hause hergestellt, Institut für Neuronale Zellbiologie, TUM,

			München, Deutschland
Zellkultur Platten	Multiwell, 6-Loch, 24-Loch	353504	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ USA 07417 http://www.bdbiosciences.com/

3.5 Geräte

Material	Spezifikation	Bestell-Nr.	Bezugsquelle
Becherglas	250ml Schott Duran		DURAN Group GmbH, 97877 Wertheim/Main, Deutschland http://www.duran-group.com
Heizplatte / Magnetrührer	Heidolph MR 3001 K	5041010000	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, 93309 Kelheim, Deutschland http://www.heidolph.com/
Kryostat	Cryo3® 100/115 V, 50/60 Hz - Basic	5800	Sakura Finetek Europe B.V., The Netherlands http://www.sakuraeu.com/
Pipetten	10, 100, 200, 1000 µl		Eppendorf, Hamburg, Deutschland http://www.eppendorf.com/
Rührfisch	Magnetrührstäbchen Standard-Satz	6-1999	neoLab, 69123 Heidelberg, Deutschland http://www.neolab.de/
Rüttler	Vortex Genie 2	SI-0256	Scientific Industries Inc., Bohemia, NY 11716 USA http://www.scientificindustries.com/
Shaker	PMR-30 Compact Fixed- Angle Platform Rocker	444-0341DE (VWR)	Grant Instruments, Hillsborough, NJ 08844 USA http://www.grantinstruments.com/
Thermometer	Standard Thermometer Celsius	2-9800	neoLab, 69123 Heidelberg, Deutschland http://www.neolab.de/
Vibratom	Vibratome 1000 Plus Sectioning System	064026	The Vibratome Company, St. Louis, MO 63134 USA http://www.vibratome.com/
Zentrifuge	Centrifuge 5415 R	5426000.018	Eppendorf, Hamburg, Deutschland http://www.eppendorf.com/

3.6 Mikroskopie

Material	Spezifikation	Bestell-Nr.	Bezugsquelle
Konfokales Mikroskop	FluoView FV1000 Confocal Microscope		Olympus Life and Material Science Europa GmbH, 20034 Hamburg, Deutschland http://www.olympus.de/
Dissektionsmikroskop	Zoom stereo microscope SZ51	N1197800	Olympus Life and Material Science Europa GmbH, 20034 Hamburg, Deutschland http://www.olympus.de/
Weitfeldmikroskop	BX51WI, Research system microscope, BX2WI series	038628	Olympus Life and Material Science Europa GmbH, 20034 Hamburg, Deutschland http://www.olympus.de/
Wasserobjektiv 20x	UMPLFL20xW/0.50	037588	Olympus Life and Material Science Europa GmbH, 20034 Hamburg, Deutschland http://www.olympus.de/
Wasserobjektiv 100x	LUMPLFL100xW/1.00	037595	Olympus Life and Material Science Europa GmbH, 20034 Hamburg, Deutschland http://www.olympus.de/
Polychromator	Polychrome V monochromator		TILL Photonics GmbH, 82166 Gräfelfing, Deutschland http://www.till-photonics.com/
Kamera	Sensicam qe, cooled digital 12 bit CCD camera system		pco. Imaging AG, 93309 Kelheim, Deutschland http://www.pco.de/

3.7 Software

Material	Spezifikation	Bestell-Nr.	Bezugsquelle
Adobe Photoshop CS5		B003FSSLVY	San Jose, Kalifornien, USA http://www.adobe.com/
Fiji			General Public License http://fiji.sc/
Graphpad Prism v5.0			GraphPad Software, Inc.m, La Jolla, CA 92037 USA http://www.graphpad.com/

			scientific-software/prism/
Tillvision	Tillvision Software		TILL Photonics GmbH, 82166 Gräfelfing, Deutschland http://www.till-photonics.com/
Word & PowerPoint	Microsoft Office 2008 Mac Home and Student	B0010QTCKM	http://www.microsoft.com/
Olympus Fluoview Software			Olympus Life and Material Science Europa GmbH, 20034 Hamburg, Deutschland http://www.olympus.de/

4. Methoden

4.1 Zucht transgener *mitoROS*-Mäuse

4.1.1 Generierung der *mitoROS*-Mauslinien

Um Mitochondrien selektiv zu kennzeichnen, nutzten wir den bereits etablierten neuronalen Promotor *Thy1*⁹⁶, um eine Expression des *Grx1-roGFP2*¹⁰ Sensormoleküls in allen neuronalen Mitochondrien zu erreichen. Das Konstrukt *mito-Grx1-roGFP2* wurde in *Thy-1* (9188bp) zwischen Exon II₆₂₀₅ und Exon IV₆₂₄₄ eingefügt. Die Klonierung wurde von F. Bareyre und M. Breckwoldt am *Institut für Klinische Neuroimmunologie* (LMU, München) durchgeführt. Die Pronuklearinjektion des Konstrukts in C57/BL6-Mäuse erfolgte am MPI in Dresden durch R. Naumann (*Transgenic Core Facility*). Es wurden elf *mitoROS* Mauslinien angesetzt, von denen drei vollständig charakterisiert wurden (676, 690, 920). Das Screening der gezüchteten Mauslinien wurde von T. Misgeld, M. Kerschensteiner und M. Schumacher (*Institut für Klinische Neuroimmunologie*; LMU, München) durchgeführt.

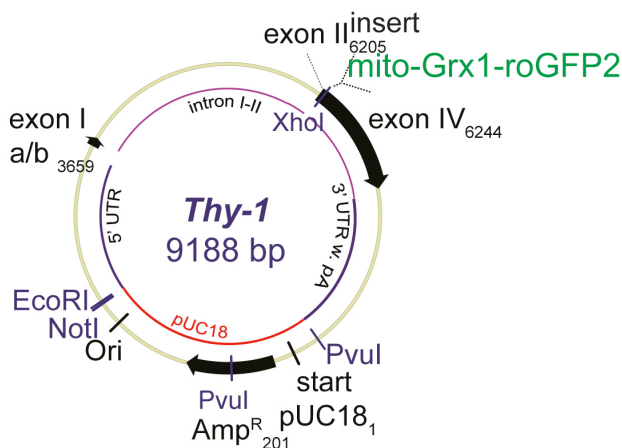


Abb. 4.1.1 Insertion des Konstrukts *mito-Grx1-roGFP2* zwischen Exon II₆₂₀₅ und Exon IV₆₂₄₄ (Abbildung erstellt von T. Misgeld, *Institut für Neuronale Zellbiologie*, TU, München)

4.1.2 Kreuzung der Linie *mitoROS* 920 mit *SOD1*^{G93A}

Tiere mit *SOD1*^{G93A}-Überexpression (Tg(*SOD1**G93A)1Gur/J; The Jackson Laboratory)⁹⁵ wurden mit *mitoROS*-Mäusen der Linie 920 gekreuzt. Nach PCR-Identifikation der Genotypen [*mitoROS*^{+/-} x *SOD1*^{G93A} tg/wt] und [*mitoROS*^{+/-} x *SOD1*^{G93A} wt/wt] wurden die Versuchstiere in die Gruppen „Erkrankte Tiere“ sowie „Kontrollen“ eingeteilt.

4.2 Charakterisierung der Grx1-roGFP2-Proteinexpression in *mitoROS*-Mauslinien

Wir haben die *Grx1-roGFP2*-Genexpression in verschiedenen Geweben der *mitoROS* Mauslinien 676, 690 und 920 mittels konfokaler Mikroskopie histologisch charakterisiert. Die histologischen Präparate der Linie 690 wurden zusätzlich mit der Nissl-Färbung NeuroTrace 640/660 gegengefärbt.

4.2.1 Gewebeaufbereitung

Gewebe von *mitoROS*-Mäusen wurde über transkardiale Perfusion mit 4% Paraformaldehyd (in Phosphat-gepufferter Saline, PBS) fixiert. Dazu wurde die Maus mit Isofluran betäubt und auf einer Styroporunterlage mit Pins an allen vier Extremitäten fixiert. Der Thorax der Maus (Sternum und Rippen) wurde ohne das anteilige Segment der Wirbelsäule frei präpariert und separat für 24h in 4% PFA, im Anschluss in PBS-Azid konserviert.

Eine Infusionsspritze wurde in den linken Ventrikel gelegt. Der rechte Vorhof wurde mit einem Skalpell eröffnet. In das linke Herz wurde über die Infusionsspritze bis zur Entfärbung der Leber PBS und im Anschluss etwa 20ml 4% PFA injiziert. Daraufhin wurde das fixierte Gewebe von der Haut befreit, gewaschen und in einem Röhrchen („Falcon-Tube“) in 4% PFA konserviert.

Das Gehirn wurde von der Schädelkalotte getrennt und im Ganzen freipräpariert. Ebenso wurden die Augen inkl. dem N. opticus konserviert. Die Medulla spinalis wurde in ihrem zervikalen Bereich unter Erhaltung der Hinterwurzelganglia (*engl.* Dorsal Root Ganglion; DRG) sorgfältig von den Wirbelkörpern getrennt.

4.2.2 Histologie

Für die histologische Charakterisierung wurden in Abhängigkeit vom untersuchten Gewebe drei verschiedene Protokolle verwendet.

Vibratomschnitte: Am Vibratom wurden Sagittal- und Koronarschnitte des Gehirns angefertigt. Für die Sagittalschnitte wurde eine gesamte Hemisphäre verwendet, für die

Koronarschnitte ein Gewebekblock aus dem Hippocampusbereich. Die Gewebe wurden mittels vorher erwärmter (120s, Mikrowelle bei 600W), flüssiger 2%iger Agarose in einer entsprechend großen Plastikmulde platziert und durch Erkalten der Agarose dort fixiert. Der Agarose-Gewebe-Block wurde mit Sekundenkleber auf der Vibratom-Schneideplattform befestigt. Anschließend wurden 100µm dicke Koronar-, sowie 200µm dicke Sagittalschnitte angefertigt und mithilfe des Mediums Vectashield auf einem Objektträger aufgebracht. Dieses schützt die Fluoreszenz des Präparats vor Bleichen.

Kryostatschnitte: Am Kryostat wurden Sagittalschnitte der Retina sowie Transversalschnitte des zervikalen Rückenmarks inkl. der DRGs angefertigt. Nach Kryoprotektion in Sucrose-Lösung wurde das Gewebe unter Verwendung von Trockeneis gefroren. Das entsprechende Gewebe wurde auf dem Kryostat-Schneidesockel platziert und mit O.C.T. (visköse Flüssigkeit für die Anfertigung von Kryostatschnitten zur Gewebefixierung im Sockel) bedeckt. Anschließend wurde der Block in einer Metallschüssel, welche sich in einer Box voll Trockeneis befand und Isopentan enthielt, schockgefroren. Von der Retina wurden 25µm dicke, vom Rückenmark inkl. DRGs 30µm dicke Schnitte angefertigt. Diese wurden im Anschluss auf einem Objektträger fixiert.

M. trianglularis sterni (MTS)-Präparation: Nach PBS-Azid-Konservierung des Mausthorax (ohne anteilige Wirbelsäule und Organe; s.o.) wurde der MTS von der Innenseite des Rippenbogens mit Hilfe einer spitzen Kanüle abgelöst. Nach der Färbeprozedur wurde der Muskel auf einem Objektträger fixiert. Als Medium wurde Vectashield verwendet.

4.2.3 Färbung

Schnitte verschiedener Gewebe der *mitoROS*-Linie 690 wurden mit der Nisslfärbung Neurotrace 640/660 gegengefärbt. Die MTS-Präparate wurden mit einem fluoreszenzmarkierten Bungarotoxin 594 gefärbt, um nikotinerge Acetylcholinrezeptoren der postsynaptischen Membran sichtbar zu machen. Zusätzlich wurde Phalloidin 635 verwendet, um die Aktinfilamente des Muskels darzustellen.

Die Färbungen wurden nach folgenden Protokollen durchgeführt:

Protokoll Phalloidin 647

1. Spülung der Schnitte in PBS 3x 5min (Shaker)
2. Färbung der Schnitte in Phalloidin (Verdünnung 1:50 in PBS)
3. über Nacht im Shaker bei 4°C
4. Spülung der Schnitte in PBS mindestens 3-4 mal, jeweils 5min
5. Fixierung auf Objektträger (Coverslip mit Vectashield)
6. Fixierung des Deckglases mit Hilfe eines Magneten auf einer Metallplatte

Protokoll Bungarotoxin 594

1. Spülung der Schnitte in PBS 3x 5min (Shaker)
2. Färbung der Schnitte in Bungarotoxin (Verdünnung 1:20 in PBS)
3. über Nacht im Shaker bei 4°C
4. Spülung der Schnitte in PBS mindestens 3-4 mal, jeweils 5min
5. Fixierung auf Objektträger (Coverslip mit Vectashield)
6. Fixierung des Deckglases mit Hilfe eines Magneten auf einer Metallplatte

Protokoll Neurotrace 640/660

1. Spülung der Schnitte in PBS 3x 5min (Shaker)
2. Färbung der Schnitte in Neurotrace (Verdünnung 1:500 in 1% Triton-X100/PBS)
3. für 2-3h im Shaker
4. Spülung der Schnitte in PBS mindestens 3-4 mal, jeweils 5min
5. Fixierung auf Objektträger (Coverslip mit Vectashield)

4.2.4 Konfokale Mikroskopie

Konfokale Bilder/Bildstapel wurden an einem Olympus FV1000 Confocal Microscopy System aufgenommen. Dieses ist ausgestattet mit einem x20/0.8 N.A. und einem x60/1.42 N.A. Öl-Immersionsobjektiv.

Die verschiedenen Präparate wurden folgendermaßen dokumentiert:

Objekt (Schnitt)	Färbung(en)	Objektiv
Retina (sag.)	*	x10
Retina (flatmount)		x10/ 20/60
Rückenmark inkl. DRG	*	x10
Gehirn (sagittal)	*	x4
Gehirn (koronar)	*	x4
Kortex (sagittal)	*	x10
Cerebellum (sagittal)	*	x10
Hippocampus (sagittal)	*	x10
MTS	BTX + Phalloidin	x20
Synapsen	BTX + Phalloidin	x60

* Gegenfärbung der Linie mitoROS 690 mit Neurotrace 640/660

4.2.5 Verwendete Software

Olympus Software: Steuerung des FV1000 Confocal Microscopy System, automatisches Stitching

Fiji/ImageJ: Bildbearbeitung; y-Projektion von Stacks

Photoshop CS5: Image-Processing, manuelles Stitching

4.3 Kalibrierung des Sensorproteins Grx1-roGFP2 in *mitoROS*-Mäusen

Experimente zur Kalibrierung des Sensorproteins wurden mittels eines Weitfeldmikroskops durchgeführt. Der Thorax der Maus wurde ohne intrathorakale Organe und anteilige Wirbelsäule explantiert, um anschließend den auf der Innenseite des Thorax lokalisierten M. triangularis sterni mikroskopisch zu untersuchen. Dieser sehr dünne Muskel bietet den Vorteil, dass einzelne Muskelfasern leichter zu visualisieren sind. Auch ist es möglich, sehr oberflächliche neuromuskuläre Endplatten zu erfassen. Der Fokus bei den in dieser Arbeit vorgestellten Experimenten lag hauptsächlich auf der Visualisierung der Mitochondrien in Interkostalnerven und

motorischen Endplatten. Für die Experimente wurden *mitoROS*-Mäuse der Linien 690 und 920 verwendet.

4.3.1 Explantat-Präparation

Die Mäuse wurden mit einer Überdosis des Inhalationsnarkotikums Isofluran (etwa 1,5ml) getötet. Im Anschluss wurde das Thoraxexplantat entnommen. Diese Technik ist in Kerschensteiner et al. 2008⁹⁷ detailliert beschrieben.

Nach einem thorakalen Längs-Hautschnitt (kranial der apikalen Seite des Sternums bis kaudal bis zur Mitte des Abdomens) wurde durch Querschnitte der Haut auf Höhe der Klavikula sowie des Diaphragmas die Haut zur Seite geklappt. Es folgte eine Abpräparation der parietal gelegenen, das Sternum und den Thorax bedeckenden Muskeln. Anschließend wurde das Diaphragma mit einer spitzen Pinzette punktiert, um einen künstlichen Pneumothorax zu erzeugen und eine feine Abpräparation des nun gespannten Diaphragmas zu ermöglichen. Ferner wurden die das Herz fixierenden Bänder durchschnitten und der Thymus abpräpariert. Im nächsten Schritt wurden beidseits entlang der 5. oder 6. Rippe bis zur Columna vertebralis die Interkostalmuskeln durchtrennt. Schließlich wurde der Thorax durch beidseitige Schnitte paravertebral und einen Schnitt oberhalb der beiden ersten Rippen und des Sternums entnommen. Im nächsten Schritt wurde das Explantat in eine mit oxygenierter (95% O₂, 5% CO₂) Ringerlösung gefüllte Petrischale gelegt, um unter einem Präparationsmikroskop mit entsprechender Beleuchtung eine Feinpräparation der Sternummuskulatur und Entfernung nicht benötigter Gewebeanteile zu ermöglichen. Im letzten Schritt wurde das Explantat in eine kleine (ebenso mit oxygenierter Ringerlösung gefüllte) Petrischale mit Strygard-Gelboden gelegt. Ziel der Vorgehensweise war es, das Explantat mit Hilfe acht bis zehn kleiner Pins möglichst flach (wichtige Voraussetzung für späteres Imaging der Synapsen und Interkostalnerven) auf dem Gelboden zu fixieren. Es hat sich die Befestigung des Sternums mit zwei Pins, die Befestigung der Rippen 1 und 5 beidseits am äußeren Ende des zum Trapez aufgespannten Explantats mit insgesamt vier Pins bewährt. Ferner empfahl es sich, das Präparat noch weiter zu ebnen, indem man die verbleibenden Pins mittels Hebelmechanismus neben die Rippen eins (dort infracostal) und fünf (dort supracostal) steckte. Anschließend wurden die Rippen durch Biegen der Pins nach kranial bzw.

kaudal weiter auseinandergespreizt, um somit eine Auffächerung des Muskels zu bewirken.

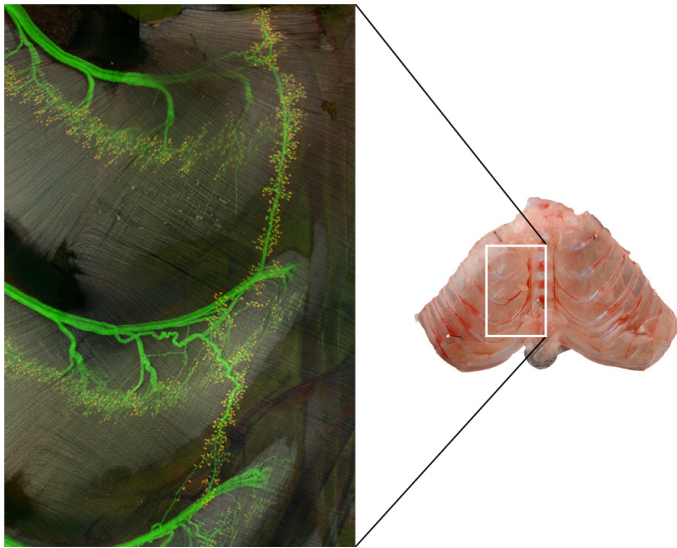


Abb. 4.3.1 Aus der Maus explantiertes MTS-Präparat & fluoreszenzmikroskopische Darstellung der Interkostalnerven sowie des motorischen Endplattenbandes (modifiziert aus Kerschensteiner et al. 2008⁹⁷)

Die Visualisierung des mitochondrialen Redoxstatus war bis zu vier Stunden möglich, bevor der Muskel anfang, spontan zu kontrahieren und Messungen erschwert wurden.

4.3.2 Ausstattung des Messplatzes

Alle Experimente wurden an einem Weitfeldmikroskop (BX51WI, Olympus) durchgeführt. Dieses war ausgestattet mit zwei Wasser-Immersionsobjektiven (x20 und x100), einem Filterrad mit Shutter, einem Polychromator und einer gekühlten CCD-Kamera, gesteuert mit der Software „Tillvision“. Es wurde ein dichroitischer Filter (D/F 500 DCXR ET 525/36) verwendet. Die Bilder wurden bei Belichtungszeiten von 150ms für 408nm und 30ms für 488nm Exzitationslicht aufgenommen.

Eine angepasste Mulde mit Heizring und Thermometer gewährleistete eine fixierte Position der Petrischale auf dem Objektisch sowie eine konstante Temperatur des Explantats zwischen 34°C und 37°C. Das Präparat war umgeben von Natural-Ringer-Lösung (NR), oxygeniert mit 95% O₂ und 5% CO₂, welche über ein Zu- und Abflusssystem (Aquariumpumpe) ständig erneuert wurde.

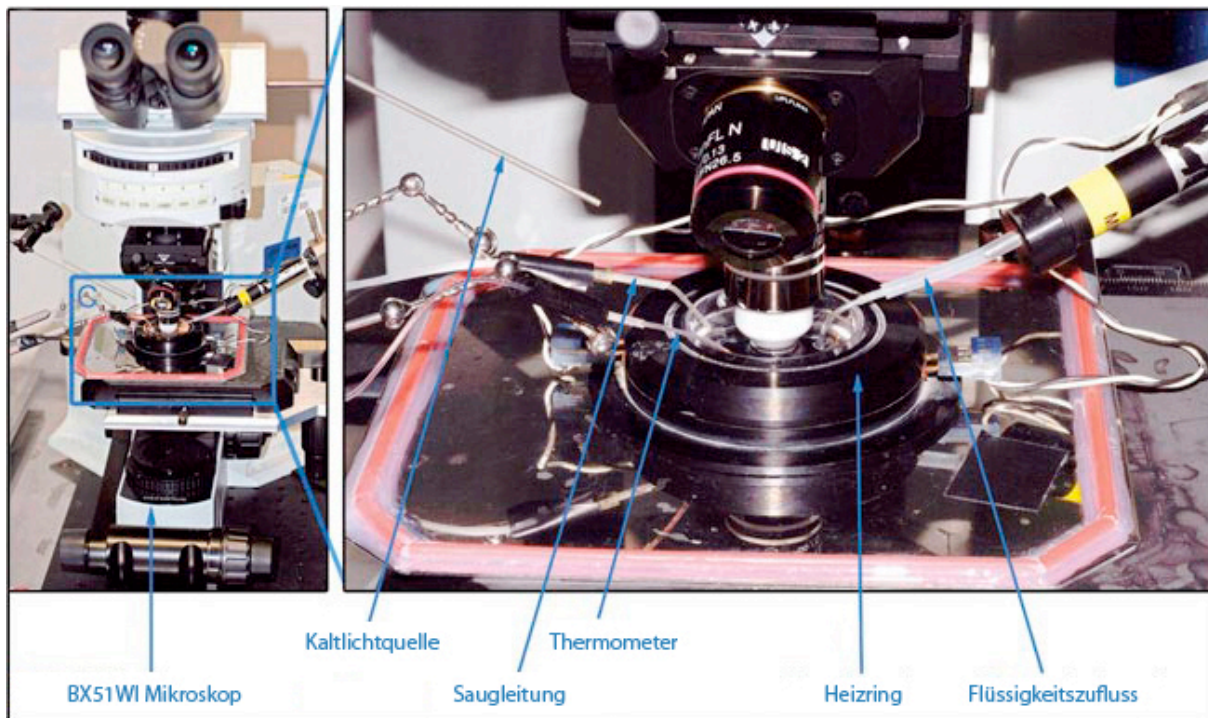


Abb. 4.3.2 Ausstattung des Messplatzes für *ex-vivo*-Experimente; links Olympus BX51WI Mikroskop; rechts Objektisch mit Heizring, Thermometer und Zu-/Abflusssystem (mod. aus Kerschensteiner et al. 2008⁹⁷)

4.3.3 Experimente Dosis-Antwort-Kurve

Nach Anfertigung des Präparats wurde dieses zunächst bis 60min nach Präparationsbeginn in oxygenierter Natural-Ringer-Lösung (NR) aufbewahrt, um sich von potentiell oxidativen Stress durch die Präparation zu erholen. In der Zwischenzeit wurde eine Verdünnungsreihe von H_2O_2 hergestellt (siehe Protokoll S. 40). Zum Schutze des H_2O_2 vor UV-Licht wurden die Bechergläser mit den Verdünnungslösungen in Alufolie verpackt. Zusätzlich wurde eine $500\mu M$ Dithiothreitol(DTT)-Lösung hergestellt.

Versuchsablauf: Zur Messung der Dosis-Antwort-Kurve wurden exogen sowohl oxidierende (H_2O_2 in verschiedenen Verdünnungen) als auch reduzierende (DTT) Substanzen in die Petrischale appliziert und konsekutiv der Redoxstatus in einer oder mehrerer Synapsen des motorischen Endplattenbandes des MTS gemessen. Als Basiswert diente eine Messung in Natural Ringer, einer Lösung, welche ein physiologisches Milieu simulieren soll.

Aufgrund der unterschiedlich guten Penetration des H_2O_2 in das Gewebe war es wichtig, ausschließlich Synapsen zu visualisieren, welche sich oberflächlich befanden. Pro Messstufe wurden zwischen einer und etwa zehn Synapsen gemessen. Bei allen Messungen wurde in jedem Kanal – sowohl 408nm- als auch 488nm-Wellenlänge – ein Bild (im folgenden *Frame*) gemessen.

Bei 60min nach Präparationsbeginn wurde die erste Messung des Redoxstatus in NR durchgeführt. Anschließend wurde der Sensor mit 500 μM DTT reduziert und weitere Messungen durchgeführt. Im 5min-Abstand wurde jeweils H_2O_2 in aufsteigender Konzentration appliziert (6,25 μM , 12,5 μM , 25 μM , 50 μM , 100 μM , 200 μM , 400 μM und 800 μM) und jeweils eine Messung pro Synapse vorgenommen. Am Ende des Experiments wurde der Sensor noch einmal mit 500 μM DTT reduziert.

In späteren Experimenten wurden zum Teil manche H_2O_2 -Stufen ausgelassen, um gezielt mehr Werte für bestimmte Stufen zu generieren. Die Grundreduktion des Sensors durch anfängliche 500 μM DTT-Applikation wurde bei allen Experimenten durchgeführt.

4.4 Untersuchung des mitochondrialen Redoxstatus unter physiologischen Bedingungen

Bei dieser Versuchsreihe ging es um die Untersuchung physiologischer Vorgänge. Hierfür wurden Mitochondrien in neuromuskulären Endplatten des MTS sowie der Interkostalnerven II bis IV beidseits untersucht. Das Medium zur Simulation eines physiologischen Zustandes war bei (1) und (2) Natural-Ringer-Lösung.

Versuchsablauf: Das Präparat wurde wie in 4.3.1 beschrieben angefertigt.

(1) Ab dem Zeitpunkt 60min nach Präparationsbeginn wurden etwa zehn bis zwanzig Synapsen des neuromuskulären Endplattenbandes wie im Dosis-Antwort-Versuch mit Einzelbildern (je ein Bild 408/488nm Exzitation) visualisiert. Die oberflächliche Lage der Synapsen war (anders als im Dosis-Antwort-Versuch) bei diesem Experiment nicht zwingend erforderlich, da exogen keine Substanzen zugeführt wurden.

(2) Anschließend wurden Mitochondrien in Interkostalnerven untersucht. Um später einen Zusammenhang zwischen sich bewegenden Mitochondrien und dem Redoxstatus

herstellen zu können, wurden etwa 300s lange Filme mit einer Bildrate zwischen 1 und 3 Hz von Mitochondrien in Interkostalnerven aufgenommen.

(3) Um der Frage nachzugehen, ob physiologische Phänomene in reduziertem oder oxidiertem Milieu seltener oder häufiger auftreten, wurde das Präparat mit 200mM DTT und 50mM H₂O₂ behandelt. Es wurden etwa 300s lange Filme mit einer Bildrate zwischen 1 und 3 Hz aufgenommen und das Auftreten physiologischer Phänomene (Kontraktionen) in Relation zum Produkt aus Einzelbildern und aufgenommener Bildfläche berechnet. Dieser Experimentschritt wurde in Zusammenarbeit mit M. Breckwoldt durchgeführt.

4.5 Untersuchung des mitochondrialen Redoxstatus unter pathologischen Bedingungen

Erkrankte Tiere (*mitoROS*^{+/-} x *SOD1*^{G93A} tg/wt) sowie Kontrollen (*mitoROS*^{+/-} x *SOD1*^{G93A} wt/wt) aus gleichen Würfen wurden jeweils an zwei verschiedenen Zeitpunkten (90 Tage und 135 Tage postnatal) untersucht.

Versuchsablauf: Der Fokus des Imaging lag auf Mitochondrien im Interkostalnerven. Da bei den Versuchen weniger die Dynamik der Mitochondrien, mehr jedoch die Morphologie und der Redoxstatus von Interesse waren, wurden keine Filme, sondern lediglich Einzelaufnahmen gemacht. Dies hatte den Vorteil, dass pro Experiment bis zu 60 Bilder aufgenommen und ausgewertet werden konnten.

4.6 Quantitative und statistische Analyse

4.6.1 Messung des Redoxstatus

Fiji: Notwendige Voraussetzung für die Messung des Redoxstatus war immer ein Bildpaar 408/488nm. Dieses wurde in die Software Fiji importiert. In jedem Bild wurden je eine Region of interest (ROI) für eine Hintergrundsfläche (BG) sowie für ein zu messendes Mitochondrion (in der Synapse ein Mitochondrienverband) definiert. Mittlere Intensitätswerte dieser beiden ROIs wurden sowohl im 408nm als auch im 488nm Kanal gemessen (insgesamt vier Messwerte: I^{408nm} , I^{488nm} , BG^{408nm} , BG^{488nm}). Das Ergebnis dieser Messung wurde in die Software Microsoft Office Excel 2008 geladen.

Excel 2008: Nach Abzug des Hintergrundwertes in beiden Kanälen 408nm und 488nm

$$\Delta I^{408nm} = I^{408nm} - BG^{408nm}$$

sowie

$$\Delta I^{488nm} = I^{488nm} - BG^{488nm}$$

wurde im nächsten Schritt die Ratio des Redoxstatus berechnet. Hierfür wurde der Quotient der beiden Werte I^{408nm} und I^{488nm} kalkuliert.

$$R_0 = \Delta I^{408nm} / \Delta I^{488nm}$$

Anschließend wurden die Messergebnisse normalisiert, indem die Ratio R_0 durch den durchschnittlichen DTT-Ratiowert $R_{DTT}=0,29$ geteilt wurde.

$$R_N = R_0 / R_{DTT}$$

4.6.2 Messung des Shape-Factors

Fiji: Um die Morphologie der untersuchten Mitochondrien in Interkostalnerven zu beschreiben, wurde in Fiji sowohl die Länge als auch die Breite eines Mitochondrions gemessen.

Excel 2008: Der Shape-Factor ist ein Maß, welches die Morphologie eines einzelnen Mitochondrions quantifiziert. Er ist der Quotient aus Länge und Breite eines Mitochondrions.

$$SF_M = \text{length}_M / \text{width}_M$$

Per definitionem gibt es keinen Shape-Factor < 1 .

4.6.3 Berechnung von Standardabweichung, Standardfehler, Signifikanzniveau und p-Wert

Die Ergebnisse wurden in Excel 2008 mithilfe zweiseitiger t-Tests auf statistische Signifikanz untersucht. P-Werte < 0.05 wurden als statistisch signifikant angesehen und in den Graphen entsprechend gekennzeichnet. Die Graphen zeigen die Abweichungsfunktion \pm S.E.M. (standard error of the mean), welcher als Quotient der Standardabweichung σ und der Wurzel der Stichprobengröße n kalkuliert wurde. Dieser ist in den Diagrammen als Abweichungsfunktion angegeben.

4.6.4 Graphische Darstellung der Daten

Excel 2008/Graph Pad PRISM 5: Für die graphische Darstellung wurden Punkt- und Balkendiagramme in Microsoft Office Excel Office 2008 erstellt. Die Trendlinie der Dosis-Antwort-Kurve wurde in Graph Pad Prism 5 unter der Annahme einer sigmoidalen Dosis-Antwort-Sättigungs-Kinetik berechnet.

Für die Darstellung der Daten aus SOD1^{G93A}-Experimenten wurde das Feld zwischen Ordinate (R_N) und Abszisse (SF) in vier Quadranten geteilt, um somit vier Gruppen zu bilden (beginnend rechts unten, gegen den Uhrzeigersinn).

(I) R_N physiologisch – SF physiologisch

(II) R_N physiologisch – SF pathologisch

(III) R_N pathologisch – SF pathologisch

(IV) R_N pathologisch – SF physiologisch

Berechnung der Grenzwerte: → Grenzwert für SF (=Definition von verkürzten Mitochondrien) [mean-SF (oxidierte Mitochondrien p90 & p135) + 2σ]: SF = 3.38;
→ Grenzwert für Redoxstatus (=Definition von oxidierten Mitochondrien) [mean- R_N (Kontrolle) + 2σ]: R_N = 1.60

4.7 Bildbearbeitung der aufgenommenen Primärdaten-Bilder

Fiji/Adobe Photoshop CS5: Um farbkodierte Bilder zu erstellen, welche den Redoxstatus einzelner Mitochondrien in Synapsen und Interkostalnervaxonen darstellen, wurde in Fiji die „Pseudocolor“-Funktion verwendet. Hierfür wurde die ROI mit einer Threshold-Maske versehen, in ein binäres (1/0) Bild umgewandelt und dann mit der Bildfläche multipliziert, bevor anschließend die beiden Kanäle 408/488 dividiert wurden. Ebenso wurde in Fiji eine Skala entwickelt, welche ROS-Level von 1-3 in Farben kodiert (tools/calibration bar). Dunkelblau ist dabei ein maximal reduzierter, weiß ein maximal oxidiertes Zustand des Redoxstatus. Die Bilder wurden anschließend in Adobe Photoshop CS5 weiter bearbeitet.

Adobe Photoshop CS5: Großformatige konfokale Bilder wurden mit Adobe Photoshop zusammengefügt („Stitching“). Ferner wurden die Bilder entsprechend angefärbt.

Phalloidin erscheint in lila, Bungarotoxin in rot, Neurotrace ebenfalls in rot und die Expression von *Grx1-roGFP2* in grün bzw. weiß.

4.8 Protokolle

Agarose 2%

1. Lösen von 2g Agarose in 100ml PBS
2. Erhitzen in der Mikrowelle bis zum einmaligen Aufkochen (600W, ca. 3min)
3. dann Abkühlen lassen

PFA 4%

1. 8% PFA in dH₂O
2. Erhitzen auf 55°C, max. 60°C, mit Rührfisch
3. wenn trüb, ~500µl 1M NaOH hinzufügen
4. weitere 10min mit Rührfisch rühren
5. Filtrieren
6. 500ml PFA mit 500 ml 0.2 M PB mischen
7. pH adjustieren (7.2 – 7.8)

PBS 1x

1. Für 1l PBS 10x (pH 7,2/7,4)
 - a. 2,6g NaH₂PO₄ (M=137.99 g/mol)
 - b. 14,4g Na₂HPO₄x2H₂O (M=177,99g/mol)
 - c. 87,5g NaClgelöst in dH₂O
2. Verdünnung auf 1x PBS: 100ml 10x PBS + 900ml H₂O dest.

Natural Ringer 1x

1. Für 1l Natural Ringer 10x
 - a. 21.84g NaHCO₃ (M=84.01 g/mol)

b. 14,4g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ($M=138\text{g/mol}$)

c. 1,86g KCl ($M=74,56\text{g/mol}$)

d. 73,05g NaCl ($M=58,44\text{g/mol}$)

gelöst in dH_2O

2. Verdünnung auf 1x PBS: 100ml 10x Natural Ringer + 900ml H_2O dest.

DTT 500 μM

1. Auf der Feinwaage 3,85mg DTT wiegen

2. Verdünnung des DTT in 50ml NR

H_2O_2 -Verdünnungen

1. Herstellung einer 8mM Stocklösung durch Verdünnung von 82 μl 30% Wasserstoffperoxid auf 100ml NR

2. Herstellung einer Verdünnungsreihe:

a. 800 μM H_2O_2 Lösung: 10ml Stock 8mM in 90ml NR

b. 400 μM H_2O_2 Lösung: 50ml 800 μM H_2O_2 in 50ml NR

c. 200 μM H_2O_2 Lösung: 50ml 400 μM H_2O_2 in 50ml NR

d. 100 μM H_2O_2 Lösung: 50ml 200 μM H_2O_2 in 50ml NR

e. 50 μM H_2O_2 Lösung: 50ml 100 μM H_2O_2 in 50ml NR

f. 25 μM H_2O_2 Lösung: 50ml 50 μM H_2O_2 in 50ml NR

g. 12,5 μM H_2O_2 Lösung: 50ml 25 μM H_2O_2 in 50ml NR

h. 6,25 μM H_2O_2 Lösung: 50ml 12,5 μM H_2O_2 in 50ml NR

5. Ergebnisse

5.1 Charakterisierung der *Grx1-roGFP2*-Expression in *mitoROS*-Mauslinien

Insgesamt züchteten wir 11 Mauslinien mit verschiedenen Expressionsmustern, von denen 7 für Experimente genutzt wurden. Wir bezeichnen die Mauslinien mit dem Konstrukt *Thy1-mitoGrx1-roGFP2* als “*mitoROS*-Mäuse”. Die Expression des Sensorproteins wurde in den Linien 676, 690 und 920 charakterisiert. In den Experimenten dieser Arbeit wurden die Mauslinien 690 und 920 verwendet, da bei diesen in ~80-90% der axonalen Neurone das Sensormolekül *Grx1-roGFP2* exprimiert ist.

Line	Rückenmark		Retina			Kortex	Cerebellum			Hippocampus				Expressions- level
	MN	DRG	RG	AC	BC		GC	MF	PC	DG	CA1	CA2	CA3	
Thy1-mito-Grx1-roGFP2 Linien														
920	+	subset	subset	+	subset	+	-	-	+	+	+	+	+	hell
676	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	hell
690	+	subset	+	+	-	subset	+	-	-	+	+	-	+	sehr hell

Abb. 5.1.1 *Grx1-roGFP2*-Expression in verschiedenen Geweben der verwendeten Mauslinien 920, 676 und 690; +: Expression in den meisten Zellen; **Subset**: Expression in <80% der Zellen AC: Amakrinzellen; BC: Bipolarzellen; CA: Cornu Ammonis; DG: Gyrus dentatus; DRG: Hinterwurzelganglion; GC: Körnerzellen; MF: Moosfasern; MN: Motorneurone; PC: Purkinjezellen; RG: Retinale Ganglionzellen; Abbildung modifiziert nach Breckwoldt et al. ⁹⁸

Jede Bilderreihe zeigt einen Sagittalschnitt durch den Kortex, vergrößerte Aufnahmen der Kortexschichten, des Cerebellums, des Hippocampus und der Retina sowie einen Transversalschnitt des Rückenmarks. Ferner wurde eine Übersichtsaufnahme des MTS samt motorischem Endplattenband sowie eine einzelne Synapse aufgenommen. Nachfolgend wird beispielhaft für jede Region ein Bild einer der untersuchten Linien gezeigt.

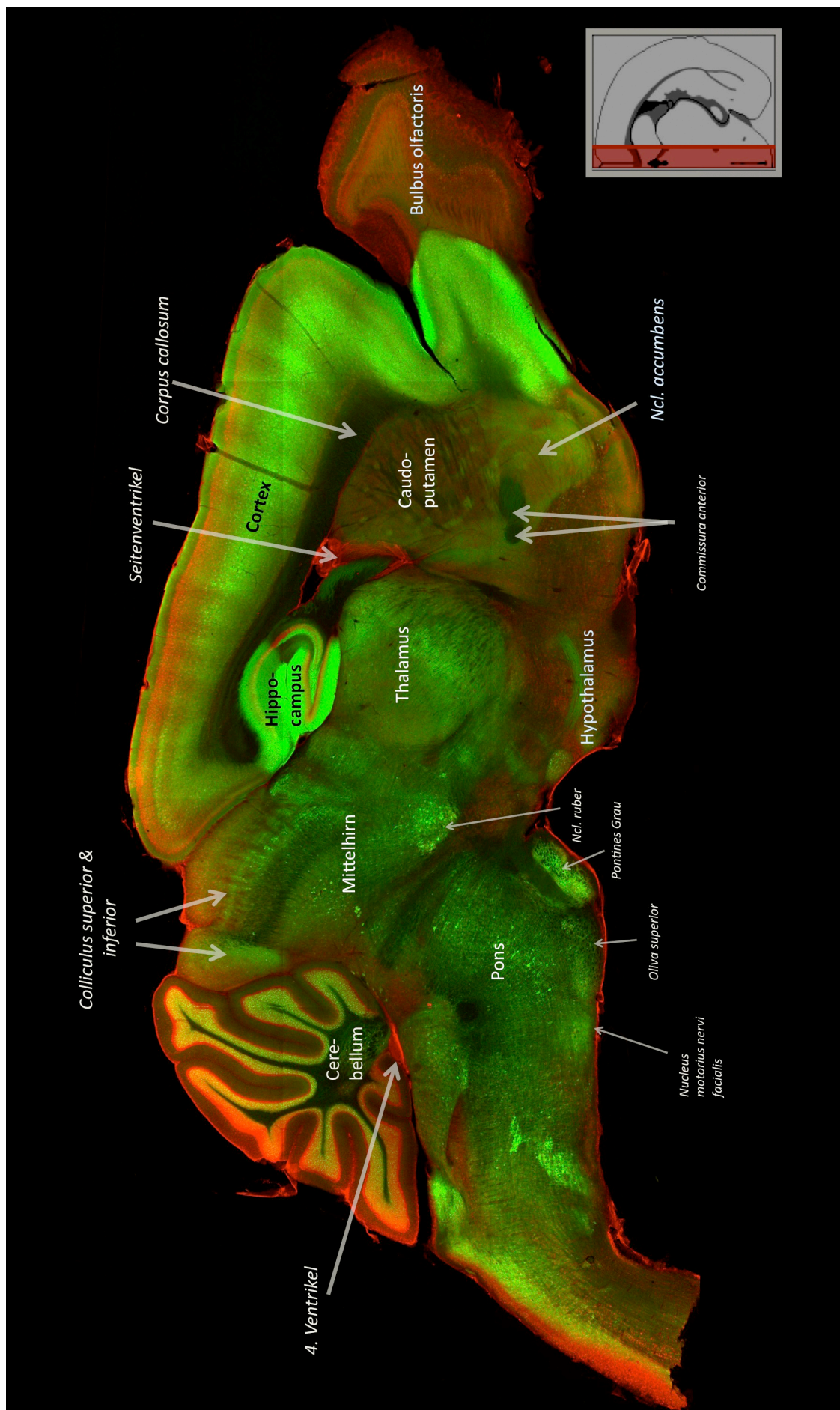


Abb. 5.1.2 Zusammengesetztes konfokales Bild eines Sagittalschnittes eines Gehirns der *mitoROS* Linie 690 – Gegenfärbung mit Neurotrace 640/660 (rot), Expression *Grx1-roGFP2* in grün

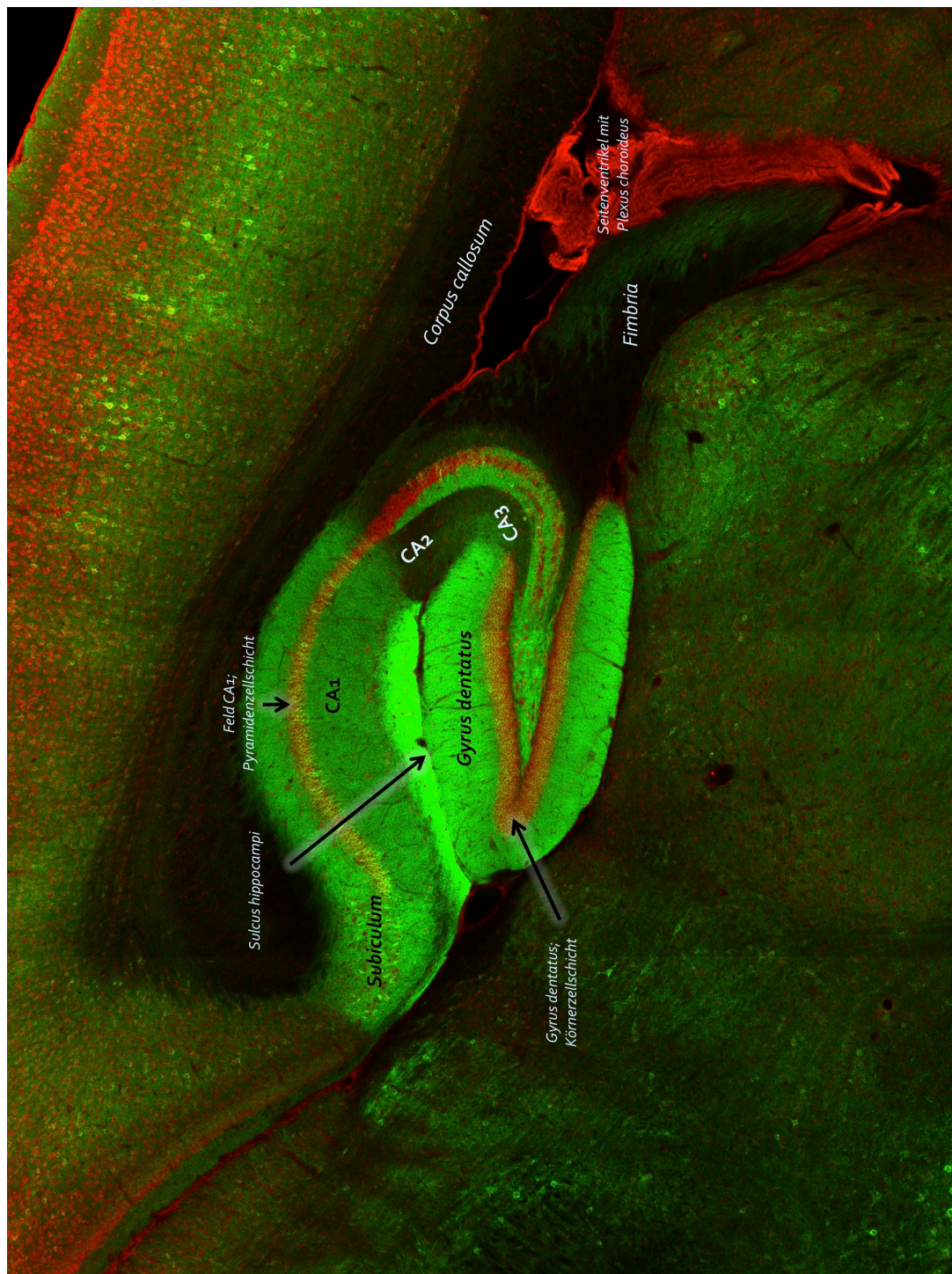


Abb. 5.1.1.3 Konfokales Bild eines Sagittalschnittes eines Gehirns der *mitoROS* Linie 690, Vergrößerung des Hippocampus – Gegenfärbung mit Neurotrace 640/660 (rot), Expression *Grx1-roGFP2* in grün

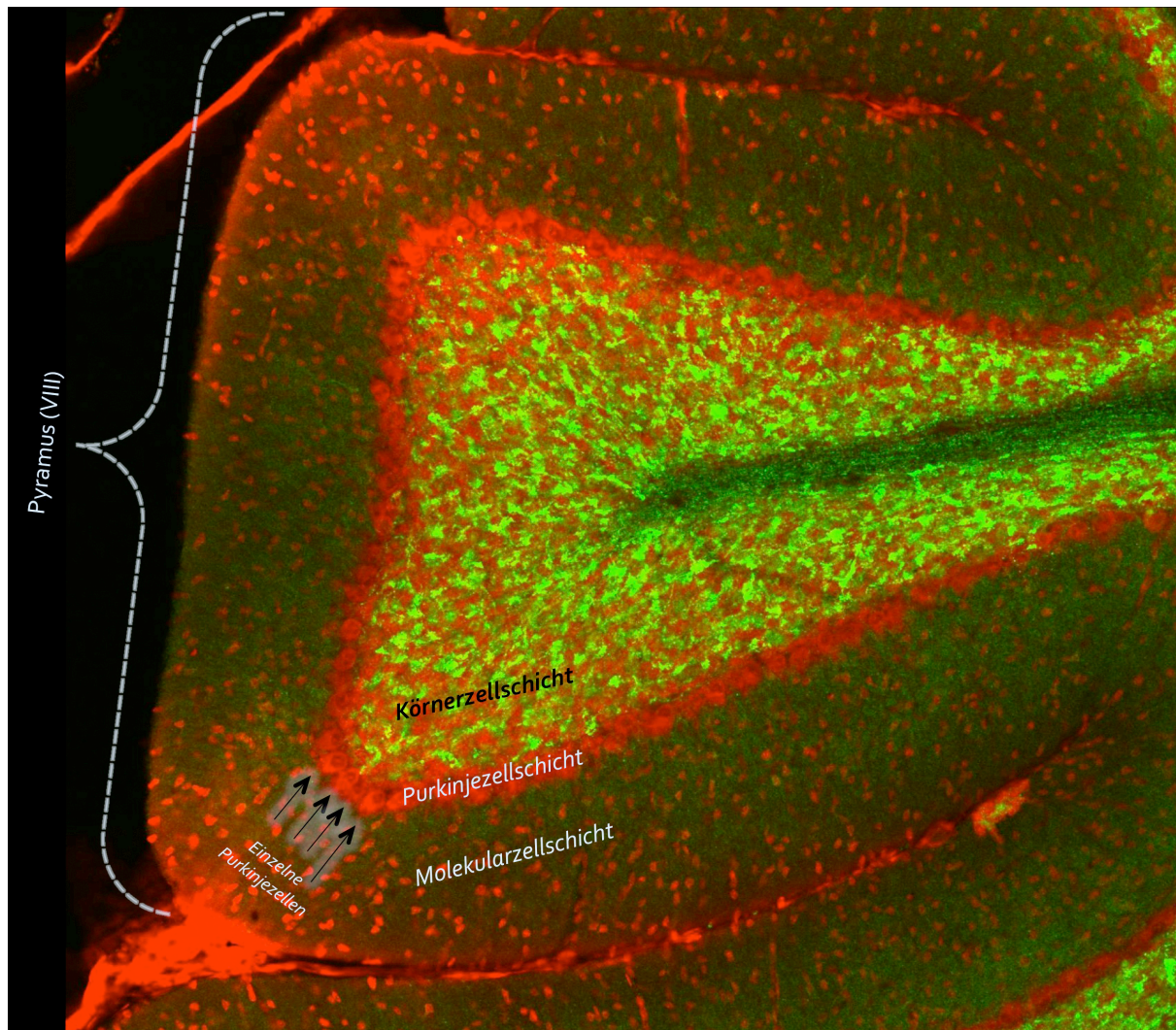


Abb. 5.1.4 Konfokales Bild eines Sagittalschnittes eines Gehirns der *mitoROS* Linie 690, Vergrößerung des Cerebellums – Gegenfärbung mit Neurotrace 640/660 (rot), Expression *Grx1-roGFP2* in grün

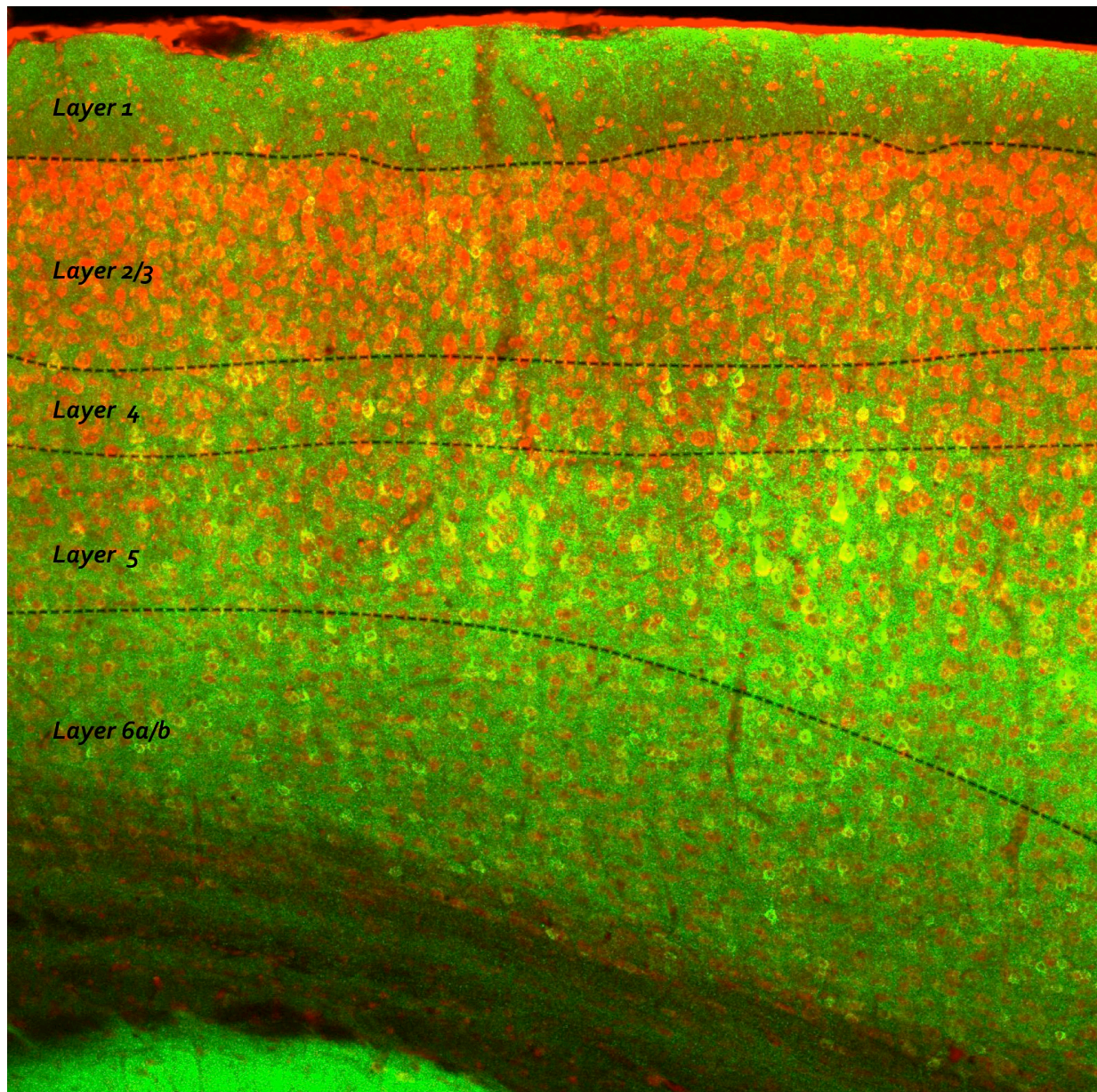


Abb. 5.1.5 Konfokales Bild eines Sagittalschnittes eines Gehirns der *mitoROS* Linie 690, Vergrößerung der Kortexschichten – Gegenfärbung mit Neurotrace 640/660 (rot), Expression *Grx1-roGFP2* in grün

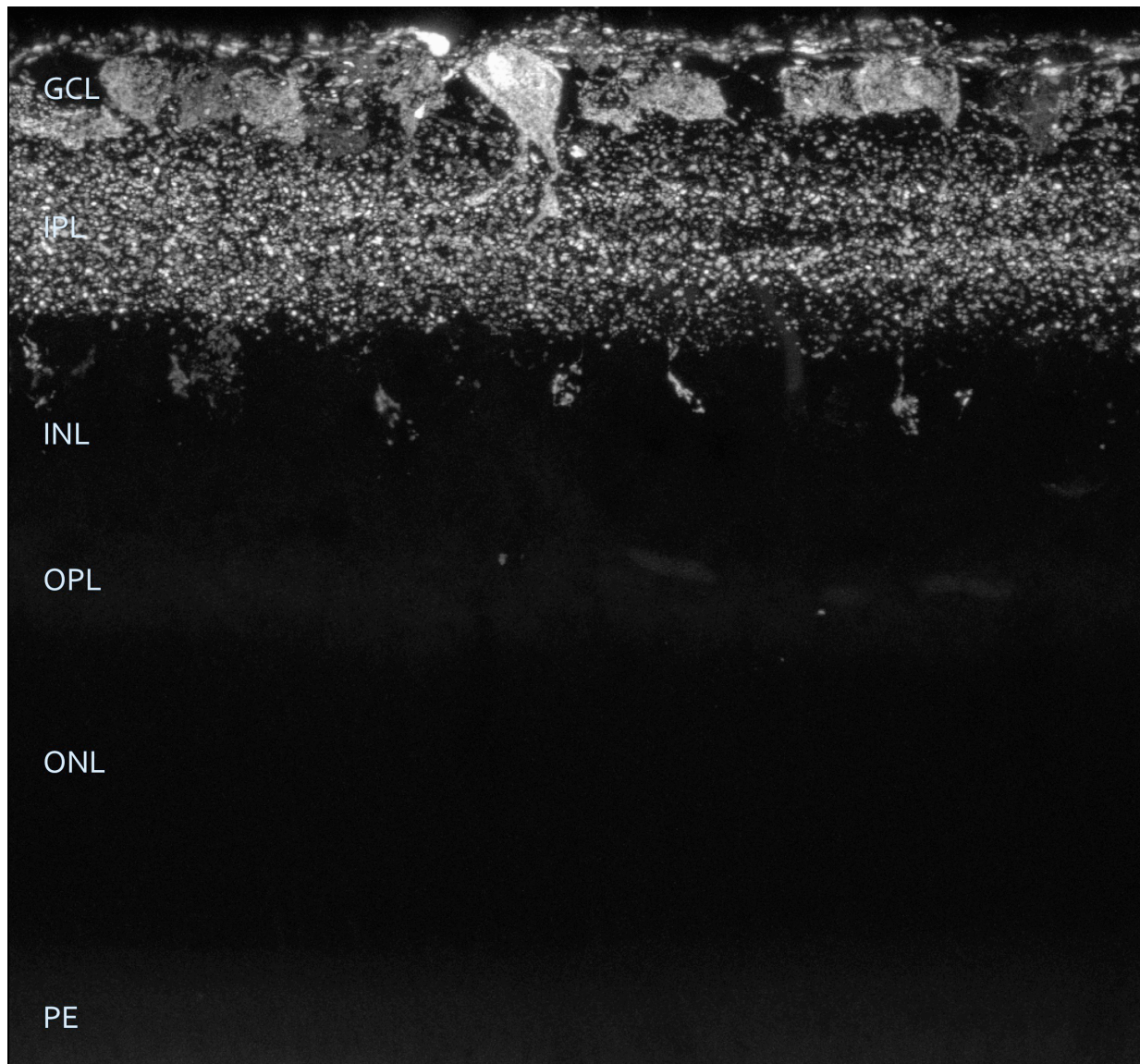


Abb. 5.1.6 Konfokales Bild eines Sagittalschnitts der Retina der *mitoROS* Linie 690 – Expression *Grx1-roGFP2* in weiß; *GCL* Ganglionzellschicht; *IPL* Innere plexiforme Schicht; *INL* Innere nukleäre Schicht; *OPL* Äußere plexiforme Schicht; *ONL* Äußere Nukleäre Schicht; *PE* Pigmentepithel

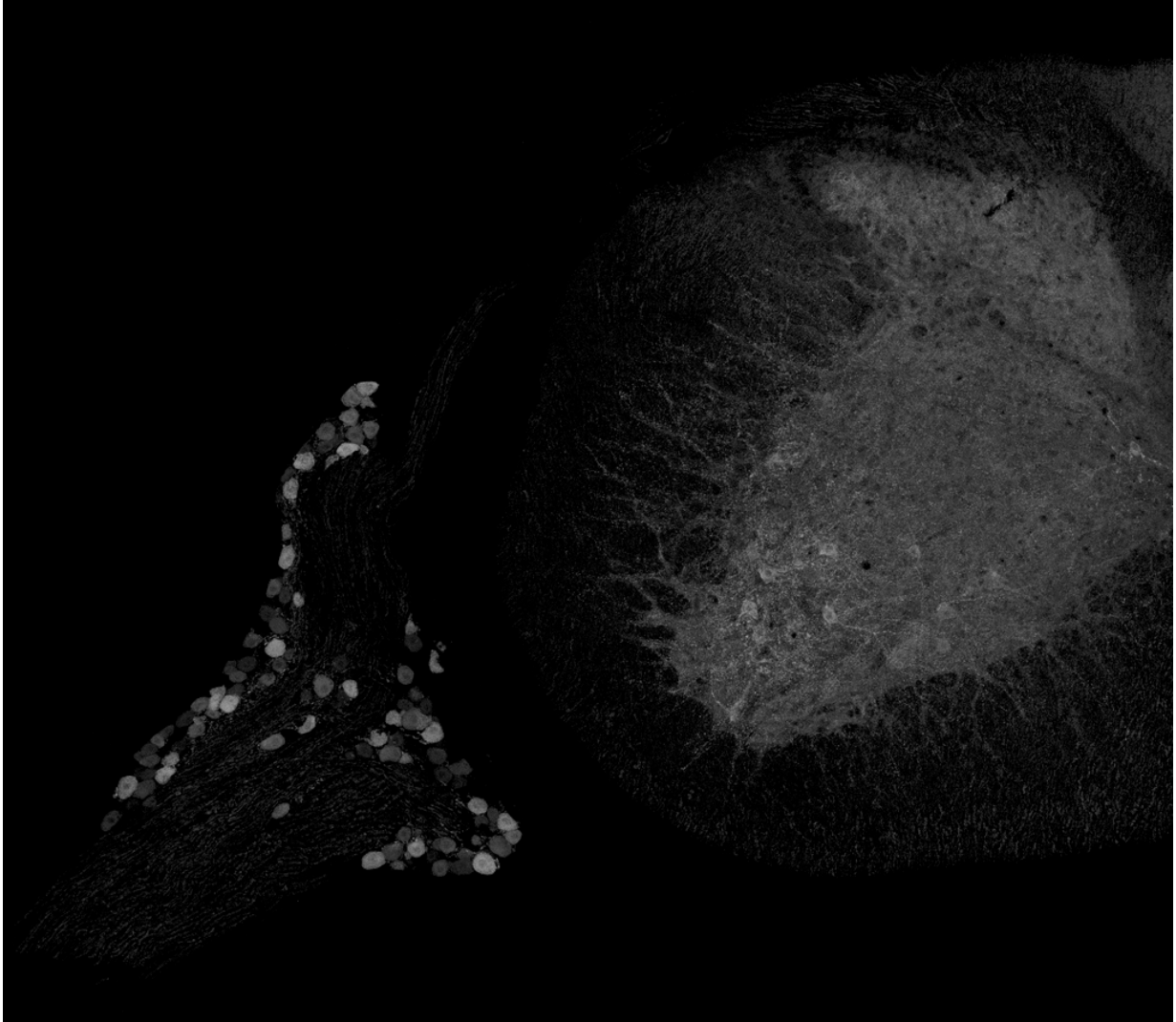


Abb. 5.1.7 Konfokales Bild eines Transversalschnitts des zervikalen Rückenmarks mit Anschnitt eines Dorsal Root Ganglions (DRG) eines Tieres der *mitoROS* Linie 920 – Expression *Grx1-roGFP2* in weiß

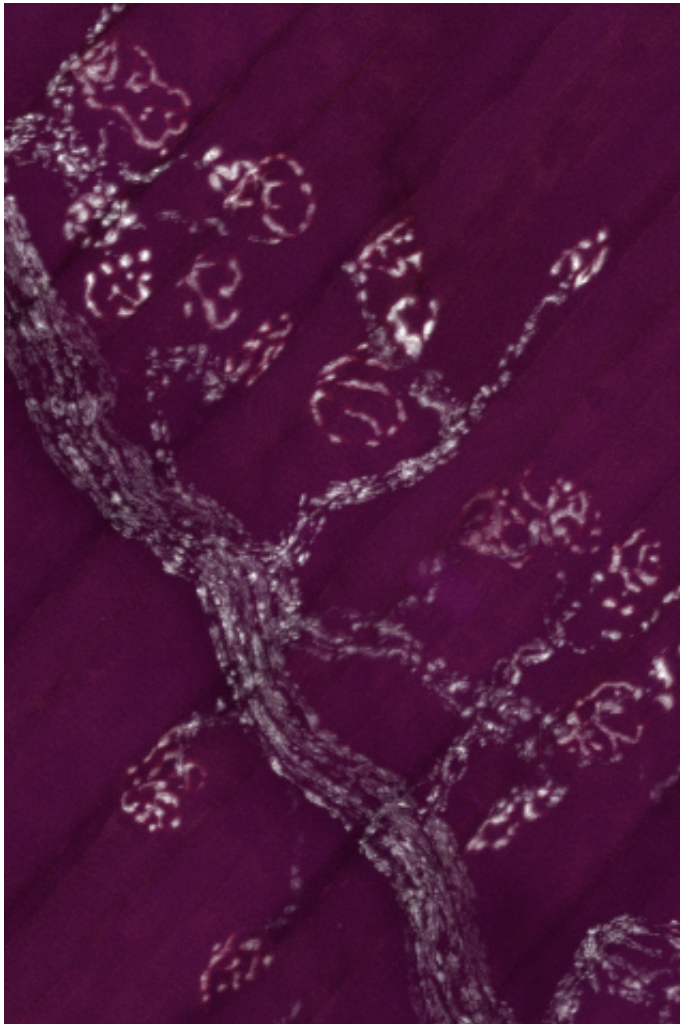


Abb. 5.1.8 Konfokales Bild eines Präparates des *M. triangularis sterni* der *mitoROS* Linie 690 – Gegenfärbung der Aktinfilamente der Muskelfasern mit Phalloidin 635 (lila) und der nikotinergen Acetylcholinrezeptoren der postsynaptischen Membran mit Bungarotoxin 594 (rot); *Grx1-roGFP2* in weiß

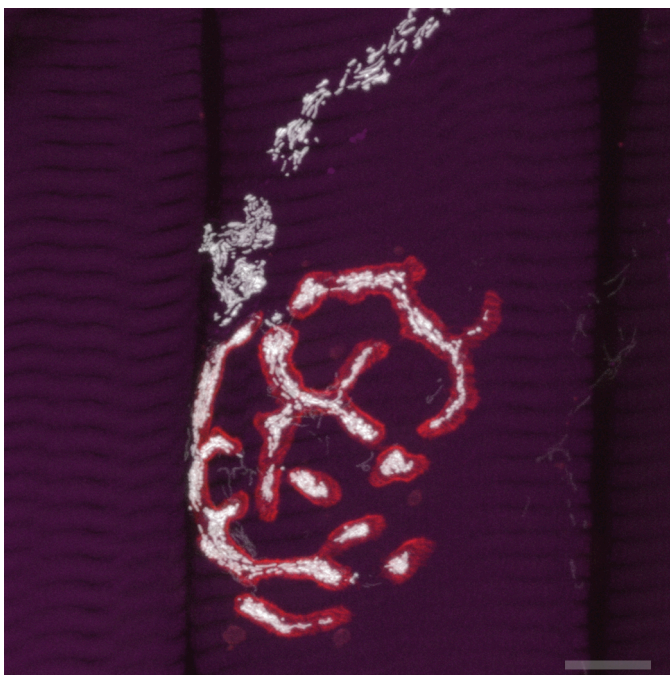


Abb. 5.1.9 Konfokales Bild eines Präparates des *M. triangularis sterni* der *mitoROS* Linie 920, Vergrößerung einer neuromuskulären Endplatte – Gegenfärbung der Aktinfilamente der Muskelfasern mit Phalloidin 635 (lila) und der nikotinergen Acetylcholinrezeptoren der postsynaptischen Membran mit Bungarotoxin 594 (rot); *Grx1-roGFP2* in weiß

5.2 Kalibrierung des Sensorproteins Grx1-roGFP2

Für die Dosis-Antwort-Kurve wurden pro Stufe jeweils mindestens 15 Synapsen aus mindestens 3 verschiedenen Tieren gemessen. Es ergab sich ein mittlerer maximaler DTT-Reduktionswert von $R_{\text{DTT}}=0,29$. Eine maximale Oxidation des Sensors war bei diesem experimentellen Aufbau nach Applikation von 400-800 μM H_2O_2 zu beobachten.

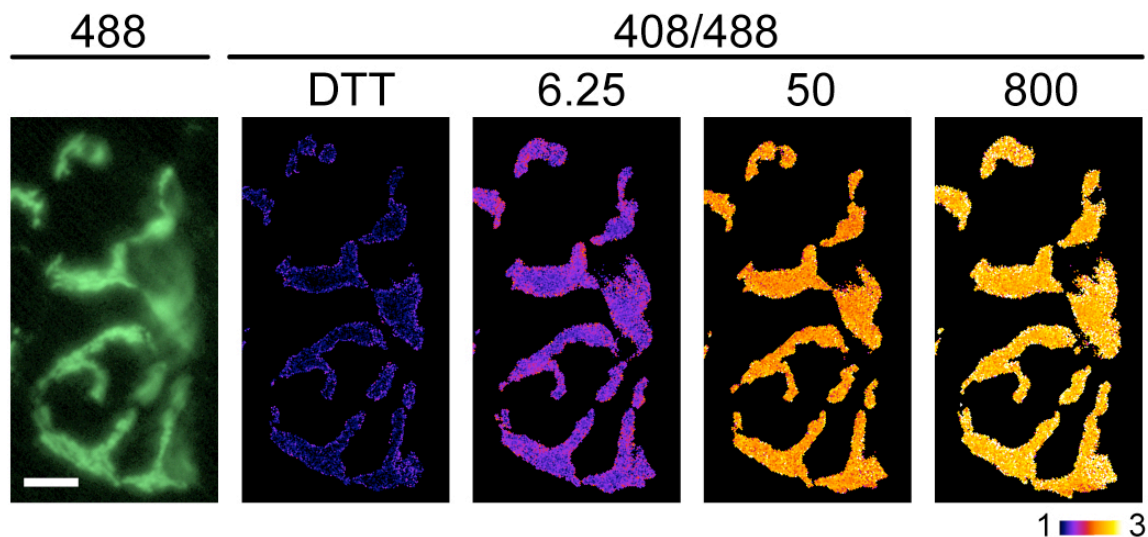


Abb. 5.2.1 Farbkodierte Darstellung der Redoxstatus-Änderung in immer derselben Synapse nach exogener Applikation von DTT und H_2O_2 (blau = max. reduziert; weiß = max. oxidiert); wie veröffentlicht in Breckwoldt et al. ⁹⁸

Nach Zusammenstellung aller Daten ließ sich eine Dosis-Antwort-Kurve in sigmoidaler Form darstellen.

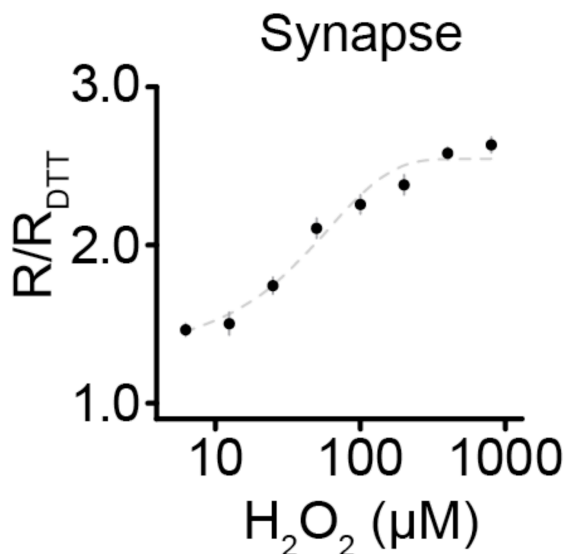


Abb. 5.2.2 Darstellung der Dosis-Antwort-Kurve bei der Messung in neuromuskulären Endplatten (Abszisse: Konzentrationen der exogen applizierten Substanzen; Ordinate: R_N); $n=14$ Synapsen (4 Mäuse); (Hinweis: SEM oft nicht sichtbar, da kleiner als Messpunkte); wie veröffentlicht in Breckwoldt et al. ⁹⁸

5.3 Untersuchung des mitochondrialen Redoxstatus unter physiologischen Bedingungen

5.3.1 Redoxstatus in Mitochondrien neuromuskulärer Endplatten

Das Redoxstatus von Mitochondrien in neuromuskulären Endplatten (im Folgenden gibt n die Anzahl der neuromuskulären Endplatten an) wurde in Natural Ringer gemessen, um ein physiologisches Milieu zu simulieren. Es betrug im Mittel

$$R_N(\text{NMJ}) = 1,46 \text{ (SD=0,12; SEM=0,022; } n=30 \text{ Synapsen)}$$

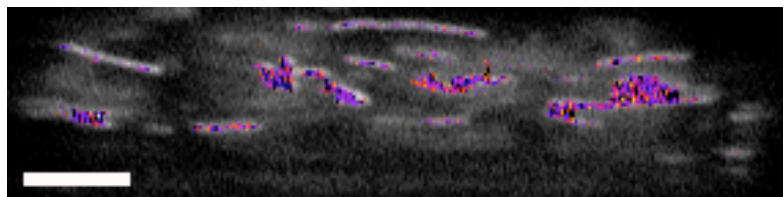
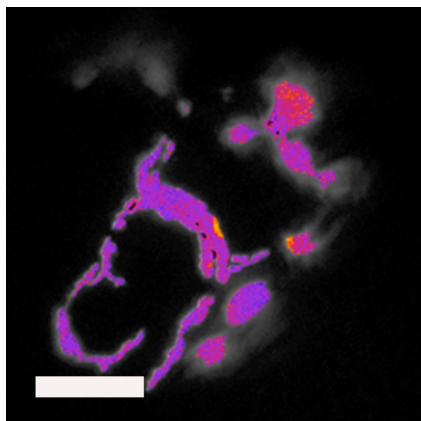


Abb. 5.3.1 Visualisierung des Redoxstatus in Mitochondrien einer (a) neuromuskulären Endplatte sowie (b) eines Interkostalnervaxons; die grauen Werte im Hintergrund veranschaulichen die Mitochondrienmorphologie (a) in der neuromuskulären Endplatte bzw. (b) im Interkostalnerven; wie veröffentlicht in Breckwoldt et al. ⁹⁸

5.3.2 Redoxstatus in Mitochondrien der Interkostalnervaxone

In Interkostalnerven wurden sowohl Redoxstatus von ruhenden, als auch sich antero- bzw. retrograd bewegendes Mitochondrien gemessen. Für jede Gruppe wurden 3 Tiere gemessen. n gibt die Anzahl der gemessenen Mitochondrien an.

$$R_N(\text{ICN}_{\text{resting}}) = 1,33 \text{ (SD=0,16; SEM=0,014; } n=126 \text{ Synapsen, 3 Tiere)}$$

$$R_N(\text{ICN}_{\text{moving}}) = 1,36 \text{ (SD=0,17; SEM=0,015; } n=132 \text{ Synapsen, 3 Tiere)}$$

$$\rightarrow R_N(\text{ICN}_{\text{antero}}) = 1,36 \text{ (SD=0,17; SEM=0,018; } n=88 \text{ Synapsen, 3 Tiere)}$$

$$\rightarrow R_N(\text{ICN}_{\text{retro}}) = 1,36 \text{ (SD=0,18; SEM=0,026; } n=44 \text{ Synapsen, 3 Tiere)}$$

Der Unterschied zwischen $R_N(\text{ICN}_{\text{resting}})$ und $R_N(\text{ICN}_{\text{moving}})$ sowie zwischen $R_N(\text{ICN}_{\text{antero}})$ und $R_N(\text{ICN}_{\text{retro}})$ war nicht signifikant. Der Unterschied zwischen $R_N(\text{NMJ})$ und $R_N(\text{ICN}_{\text{resting}})$ war hoch signifikant.

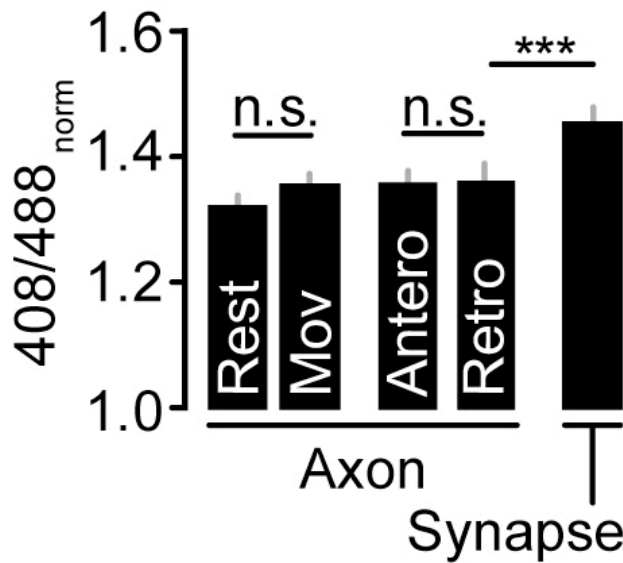


Abb. 5.3.2 normalisierter Redoxstatus R_N der Mitochondrien in Interkostalnervaxonen sowie in neuromuskulären Endplatten

Abszisse: I) Axon – ruhende Mitochondrien; II) Axon – sich bewegende Mitochondrien; III) Axon – anterograd transportierte Mitochondrien; IV) Axon – retrograd transportierte Mitochondrien; V) Mitochondrien in neuromuskulären Endplatten; *Ordinate:* R_N ; wie veröffentlicht in Breckwoldt et al. ⁹⁸

5.3.3 Kontraktionen

Hinweis: Die Experimente in diesem Abschnitt wurden in Kollaboration mit M. Breckwoldt durchgeführt. Während der Untersuchung physiologischer Veränderungen in Triangularisexplantaten wurde beobachtet, wie einige Mitochondrien eine morphologische Veränderung erleben, bei der es zu einer Dickenzunahme sowie zu einer Längenabnahme kommt (siehe Abbildung). Diese Art der Kontraktion dauert etwa 50-200s, bevor die ursprüngliche Morphologie des Mitochondrions wieder erreicht wird. Mit Hilfe der SF-Messung setzten wir die Formveränderung in Relation zur Änderung des Redoxstatus. Die Kontraktionsfrequenz pro Mitochondrion betrug im Mittel $0,6 \pm 0,1$ -mal pro Stunde bei insgesamt 594 beobachteten Mitochondrien (14 Aufnahmen, 3 Mäuse).

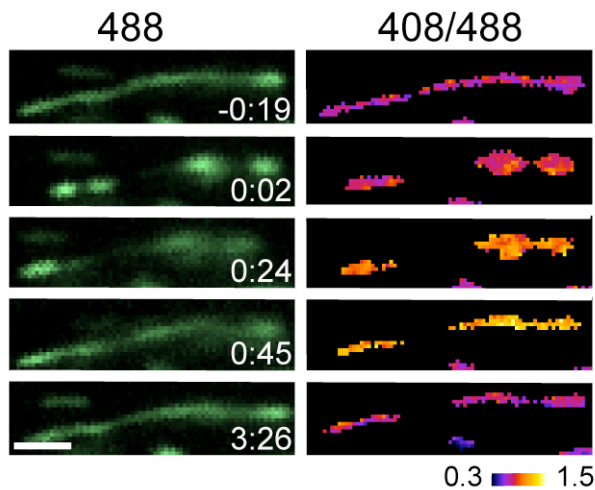


Abb. 5.3.3 Kontraktion eines ICN-Mitochondrions; rechts farbkodierte Darstellung mit Veränderung des Redoxstatus; wie veröffentlicht in Breckwoldt et al. ⁹⁸

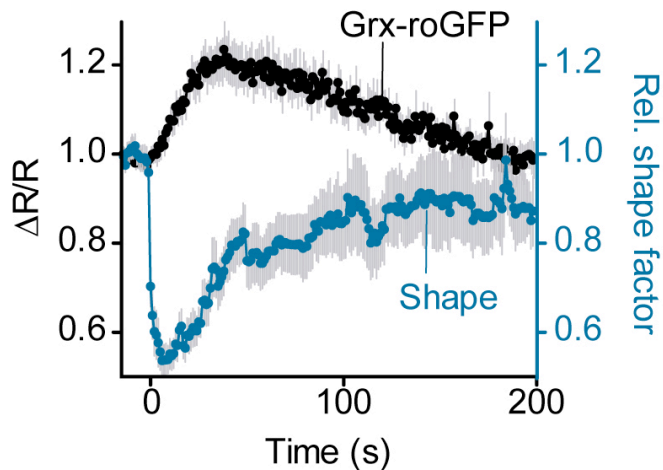


Abb. 5.3.4 Graphische Darstellung der Kontraktion eines Mitochondrions; n=9 Kontraktionen, 5 Mäuse

Abszisse: Zeit in s; Ordinate: schwarz: R_N ; blau: Relativer Shape-Factor (zum Ausgangswert); wie veröffentlicht in Breckwoldt et al. ⁹⁸

Aufgrund des Zusammenhangs zwischen Redoxstatus und Kontraktion wurde durch exogene Applikation von DTT und 50mM H_2O_2 versucht, die Kontraktionsfrequenz zu beeinflussen (jeweils drei Experimente für DTT, NR und H_2O_2). Im Vergleich zu NR fanden in 200mM DTT 0,54- und in 50mM H_2O_2 2,29-mal so viele Kontraktionen statt.

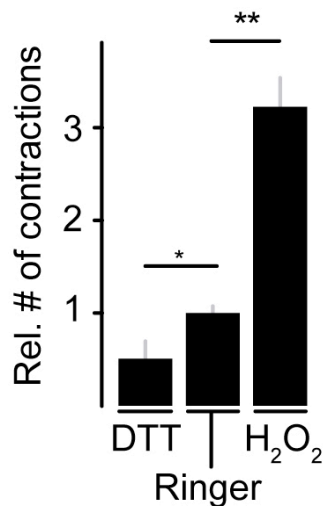


Abb. 5.3.5 Relative Anzahl an Kontraktionen bei exogener Zufuhr verschiedener Medien (200mM DTT; NR; 50mM H₂O₂); n=13 Aufnahmen, 3 Mäuse pro Gruppe; die Anzahl an Kontraktionen wurde normalisiert in Bezug zur Kontraktionsfrequenz in Natural Ringer-Lösung; wie veröffentlicht in Breckwoldt et al. ⁹⁸

5.4 Untersuchung des mitochondrialen Redoxstatus unter pathologischen Bedingungen an *mitoROS* x *SOD1*^{G93A}-Mäusen

Um der Frage des Zusammenhangs zwischen mitochondrialer Oxidation, Formveränderung und mitochondrialer Pathologie nachzugehen, wurde in Experimenten der Kreuzung *mitoROS* x *SOD1*^{G93A} der Redoxstatus in Mitochondrien von Interkostalnerven in zwei Gruppen zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten nach Geburt (p90 und p135) untersucht. Zum Zeitpunkt p90 ist der Phänotyp der Pathologie erfahrungsgemäß noch nicht ausgeprägt, es kann lediglich ein Motoneuronverlust nachgewiesen werden⁹⁹, während zum Zeitpunkt p135 der Phänotyp der Pathologie eindeutig nachvollziehbar ist¹⁰⁰.

- | | | |
|----------|---|-----------|
| (1) p90 | <i>mitoROS</i> ^{+/-} x <i>SOD1</i> ^{G93A} tg/wt | |
| (2) p90 | <i>mitoROS</i> ^{+/-} x <i>SOD1</i> ^{G93A} wt/wt | Kontrolle |
| (3) p135 | <i>mitoROS</i> ^{+/-} x <i>SOD1</i> ^{G93A} tg/wt | |
| (4) p135 | <i>mitoROS</i> ^{+/-} x <i>SOD1</i> ^{G93A} wt/wt | Kontrolle |

Es wurde beobachtet, dass mit der Progression der Krankheit die Form der Mitochondrien rundlicher wurde (SF nahm ab). Gleichzeitig ließ sich ein Anstieg des Redoxstatus beobachten (R_N stieg an). Die beiden Kontrollgruppen zeigten untereinander wie erwartet keinen Unterschied und wurden deswegen in den Diagrammen zusammengefasst.

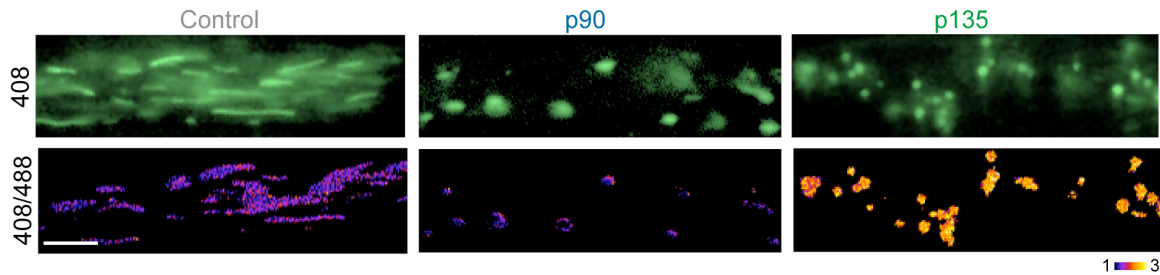


Abb. 5.4.1 Die Abbildung zeigt die Progression der Krankheit in ICN-Mitochondrien aus 3 verschiedenen Tieren: *links* – Kontrolle; *Mitte* – p90 SOD1^{G93A}; *rechts* – p135 SOD1^{G93A}; wie veröffentlicht in Breckwoldt et al. ⁹⁸

Es wurde der mitochondriale Shape-Factor in Relation zum Redoxstatus gesetzt. Die Auswertung der vier Gruppen wurde sowohl auf Mitochondrien- als auch auf Axonebene durchgeführt. Das Diagrammfeld wurde in vier Quadranten geteilt (siehe Methoden).

Es war zu beobachten, dass die Morphologie von Mitochondrien innerhalb eines Axons relativ homogen war, wir fanden kein „Salz-und-Pfeffer“-Bild (heterogenes Bild) vor. Diese Annahme wird von der Darstellung auf Axonebene (Abb. 5.4.3) gestützt.

Kontrollen: Bei den Kontrollen (p90 und p135) lag der durchschnittliche Shape-Factor bei $SF(ctrl) = 7,24$ ($SD=3,81$; $SEM=0,240$; $n=252$ Mitochondrien, 3 Tiere) und der durchschnittliche Redoxstatus bei $R_N(ctrl) = 1,28$ ($SD=0,16$; $SEM=0,010$; $n=252$ Mitochondrien, 3 Tiere). In (I) befanden sich 86% der Mitochondrien, in (II) 12%, in (III) 0% und in (IV) 2%.

ALS-Tiere: Bei den kranken Tieren lag bei p90 der durchschnittliche Shape-Factor bei $SF(p90) = 4,07$ ($SD=2,40$; $SEM=0,150$; $n=255$ Mitochondrien, 3 Tiere) und der durchschnittliche Redoxstatus bei $R_N(p90) = 1,27$ ($SD=0,36$; $SEM=0,022$; $n=255$ Mitochondrien, 3 Tiere). In (I) befanden sich 47% der Mitochondrien, in (II) 36%, in (III) 8% und in (IV) 8%.

Bei p135 lag der durchschnittliche Shape-Factor bei $SF(p135) = 3,24$ ($SD=2,54$; $SEM=0,153$; $n=276$ Mitochondrien, 3 Tiere) und der durchschnittliche Redoxstatus bei $R_N(p135) = 1,36$ ($SD=0,35$; $SEM=0,021$; $n=276$ Mitochondrien, 3 Tiere). In (I) befanden sich 29% der Mitochondrien, in (II) 46%, in (III) 21% und in (IV) 4%.

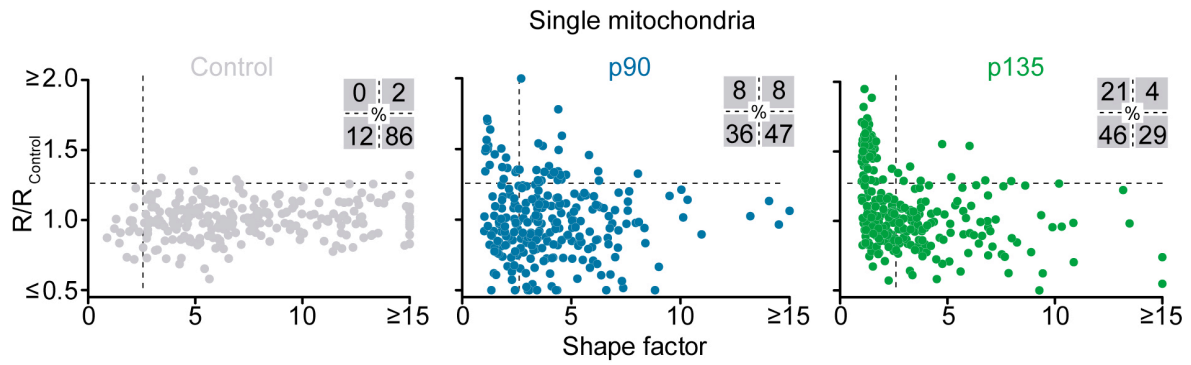


Abb. 5.4.2 Einzelmitochondrienebene: Shape-Factor vs. Redoxstatus R_N in Kontrollen (grau) und ALS-Tieren (farbig, p90 blau, p135 grün);

graue Quadrate: prozentuale Verteilung der Gruppen in den vier Quadranten; Abszisse: mitochondrialer Shape-Factor; Ordinate: R_N ; wie veröffentlicht in Breckwoldt et al. ⁹⁸

Hinweis: Bezeichnung der Quadranten $\begin{array}{c|c} \text{III} & \text{IV} \\ \hline \text{II} & \text{I} \end{array}$

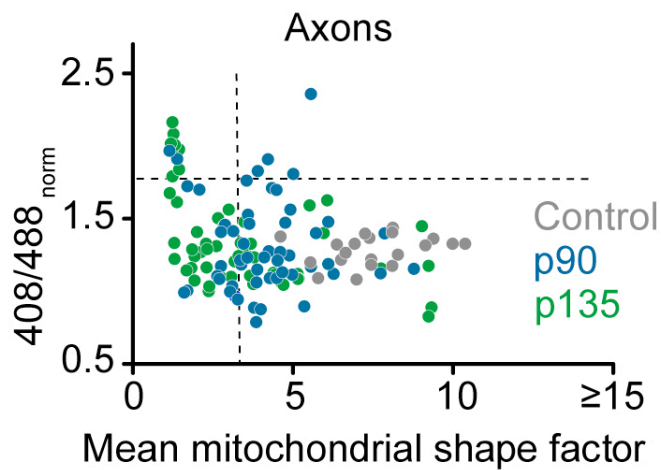


Abb. 5.4.3 Axonebene: Shape-Factor vs. Redoxstatus in Kontrollen (grau) und ALS-Tieren (farbig, p90 blau, p135 grün)

Abszisse: mitochondrialer Shape-Factor; Ordinate: R_N ; wie veröffentlicht in Breckwoldt et al. ⁹⁸

6. Diskussion

Die neuronale Funktionsfähigkeit und die interneuronale Informationsübertragung werden im Zytosol eines Neurons durch zahlreiche komplexe Signalwege reguliert. Diese Prozesse sind abhängig vom zeitlichen Profil, dem räumlichen Verteilungsmuster sowie der Konzentration der verschiedenen beteiligten Mediatoren. Eine Störung dieser Signalwege äußert sich als neuronale Dysfunktion und verursacht eine neurologische Symptomatik bzw. Erkrankung. Einen der wichtigsten Mediatoren dieser Signalwegsysteme stellt der Second Messenger Calcium dar. Um intrazelluläres Calcium zu detektieren und zu quantifizieren, stehen bereits *in vivo* etablierte sog. „genetically encoded calcium indicators“ (GECIs) zur Verfügung¹⁰¹. Neben Calcium fungieren auch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) als wichtige Signalüberträger. Mehr und mehr wird ihre Rolle in physiologischen und pathologischen Prozessen klarer, nicht zuletzt aufgrund der Fortschritte und Einsatzmöglichkeiten neuer sog. „genetically encoded redox indicators“ (GERIs). Vor der Verfügbarkeit der ersten GERIs war das dynamische Monitoring des Redoxstatus nicht möglich⁸³. Während intrazelluläre Färbungen unspezifisch waren, konnten extrazelluläre Färbungen lediglich gemittelte Signale vieler verschiedener Zellen erfassen⁸³. GERIs erlauben erstmals Messungen auf Einzelzellebene und überdies – aufgrund ihrer Proteinstruktur – sogar in verschiedenen intrazellulären Kompartimenten wie beispielsweise Mitochondrien, dem Zellkern, dem Zytoplasma oder dem Endoplasmatischen Retikulum. Sie ermöglichen somit einen Informationsgewinn über physiologische und pathologische Prozesse in Echtzeit.

Der H₂O₂-Sensor *HyPer* wurde erfolgreich in zahlreichen Studien eingesetzt, die die H₂O₂-Produktion als Antwort auf EGF^{102,103}, PDGF⁹³, NGF⁸⁵, elektrischer Hochfrequenz-Stimulation von Neuronen¹⁰⁴, Insulin¹⁰⁵ und anderen Stimuli nachweisen. Die direkte Adressierung von *HyPer* an Organellen ermöglichte die Messung von H₂O₂-Veränderungen in Mitochondrien^{85,106-109} und Peroxisomen^{106,110,111}. Ferner kann der *HyPer*-Sensor an spezifische Proteine der zytoplasmatischen Seite der Plasmamembran, Endosomen oder der Membran des Endoplasmatischen Retikulums gebunden werden, um dort lokale H₂O₂-Produktion und die Aktivierung von Tyrosin-Kinase-Rezeptoren wie EGFR oder PDGFR zu visualisieren⁸³. Niethammer et al.¹¹² untersuchten die Bedeutung von H₂O₂ bei der Wundheilung im Zebrafisch mithilfe des *HyPer*-Sensors. Am

Wundrand konnte ein sich ins gesunde Gewebe ausbreitender H_2O_2 -Gradient nachgewiesen werden. Dieser wird von der dualen Oxidase (Duox) generiert, erreicht nach zwanzig Minuten sein Maximum und sorgt für die schnelle Rekrutierung von Leukozyten. In dieser Studie konnte somit das erste Mal die Bedeutung von H_2O_2 als Signalüberträger auf Leukozyten im Gewebe gezeigt werden. Ferner ist die ROS-Produktion ein wichtiger Regulator der Geweberegeneration, beispielsweise für den *Wnt/ β -Catenin*-Signalweg¹¹³. Später wird der H_2O_2 -Gradient durch das Enzym Myeloperoxidase wieder abgebaut¹¹⁴. Die *HyPer*-Proteinstruktur macht den Sensor leicht durch biologische Membranen diffundabel, was Probleme bei der genauen Lokalisierung der H_2O_2 -Quelle erschwert⁸³. Ferner ist der Einsatz des *HyPer*-Sensors durch die starke pH-Abhängigkeit^{87,115-117} limitiert. Diese bedarf adäquater Kontrollen, beispielsweise mit BCECF-AM⁸⁵.

Mit der Entwicklung von redox-sensitiven GFPs (*roGFPs*) durch Tsien et al.¹¹⁸ war es möglich, die selektive Vulnerabilität von neuronalen Subtypen bei neurodegenerativen Erkrankungen nachzuweisen. Guzman et al.¹² untersuchten den Verlust dopaminerger Neurone in der Substantia nigra, für den weitestgehend mitochondrialer oxidativer Stress verantwortlich gemacht wird. Um in dieser Arbeit oxidativen Stress zu quantifizieren, generierten die Wissenschaftler transgene Mäuse mit einem *roGFP2*-Konstrukt, welches einen Tyrosinhydroxylase-Promotor und eine mitochondriale Matrix-targeting-Sequenz enthielt. Um die Bandbreite zwischen „voll reduziert“ und „voll oxidiert“ zu bestimmen, wurden die Chemikalien DTT und Aldrithiol verwendet. Ebenso mit einem *roGFP2*-Konstrukt, welches über Pyruvate Dehydrogenase MTS (engl. mitochondria or matrix targeting signal) in *Drosophila*-Fliegen exprimiert wurde, arbeitete eine Forschergruppe aus Pittsburgh, USA. Liu et al.¹¹⁹ veröffentlichten ihre Studie über Redox-Sensing bei der Pathogenese degenerativer und mitochondrialer Erkrankungen. Um den Sensor zu reduzieren, nutzten die Wissenschaftler DTT, eine Oxidation wurde mit H_2O_2 erzielt. Um Veränderungen des Redoxstatus in pathologischen Situationen zu untersuchen, wurden einerseits Kreuzungen mit dem Neurodegenerations-Modell *ATPalpha* (kodiert für die katalytische Untereinheit der Na^+/K^+ -ATPase) verwendet. Andererseits konnte im Enzephalomyopathie-Krankheitsmodell ATP6 ein veränderter Redoxstatus gezeigt werden.

Allerdings waren die Visualisierungsmöglichkeiten der GERIs erster Generation aufgrund der Spektraleigenschaften, Antwortkinetiken und chemischen Spezifität für *in-*

in vivo-Studien in Säugetieren bisher nicht ausreichend. *RoGFPs* sind zwar weniger empfindlich gegenüber Änderungen des pHs⁸⁸ als *cpYFP*-basierte Redox-Sensoren, verfügen allerdings nur über eine langsame Antwortkinetik und sind nicht spezifisch für ein bestimmtes Redox-Equilibrium, da sie vom endogenen Glutaredoxin-Vorkommen abhängig sind⁸⁴. Um diese Limitationen zu umgehen, wurde in der hier vorliegenden Dissertationsschrift der von Gutscher et al.¹⁰ weiterentwickelte *roGFP2*-Redox-Sensor *Grx1-roGFP2* verwendet; seine Vorteile bestehen einerseits in der Beschleunigung der *roGFP2*-Antwort und andererseits in der Unabhängigkeit von endogenen Enzymaktivitäten. Ferner ist *Grx1-roGFP2* im Vergleich zu *cpYFP*-basierten Redoxsensoren weitestgehend unempfindlich gegenüber Änderungen des pHs. Sowohl der E_{GSH} -spezifische Sensor *Grx1-roGFP2* als auch der H_2O_2 -spezifische Sensor *roGFP2-Orp1* wurden in einer Studie der Gruppe um Tobias Dick (Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg) jeweils im Mitochondrion und im Zytosol exprimiert, um in *Drosophila*-Fliegen Redoxveränderungen *in vivo* zu erfassen⁷.

6.1 Ex vivo/in vivo Messung des mitochondrialen Redoxstatus

Die Expression des ROS-Sensormoleküls *Grx1-roGFP2* in neuronalen Mitochondrien ermöglicht es uns, *ex vivo* sowie *in vivo* über die Messung des Equilibriums E_{GSH} von oxidiertem (GSSG) und reduziertem Glutathion (GSH)¹⁰

1. Veränderungen des mitochondrialen Redoxstatus in Echtzeit zu detektieren und zu quantifizieren,
2. auch auf Einzelmitochondrien-Ebene Messungen durchzuführen,
3. konsekutiv eine Relation zwischen momentanem Redoxstatus und Mitochondrienmorphologie (Shape Factor) herzustellen und
4. wichtige Voraussetzungen für die Untersuchung pathogenetischer Vorgänge bei neurodegenerativen Erkrankungen zu schaffen.

Nach der histologischen Charakterisierung des Expressionsmusters des Sensormoleküls *Grx1-roGFP2* in den verschiedenen Mauslinien ging es bei den nachfolgenden Experimenten zum einen um die Untersuchung physiologischer Prozesse, zum anderen um das Verständnis pathologischer Vorgänge (am Beispiel der ALS). Die Funktionsfähigkeit des Sensormoleküls *Grx1-roGFP2* in den von uns gezüchteten

mitoROS-Mäusen wurde sowohl *ex vivo* (in einem Präparatmodell des *M. triangularis sterni*) als auch *in vivo* (für Messungen in Mitochondrien spinaler Neurone; durchgeführt von Michael Breckwoldt am *Institut für Neuronale Zellbiologie*; TU, München) getestet. Die Versuchsanordnung erwies sich als stabil; die Reproduzierbarkeit der Versuchsergebnisse wurde durch das mindestens dreimalige Wiederholen aller Versuche in allen Versuchsgruppen bestätigt. Bei den in dieser Arbeit vorgestellten *ex-vivo*-Experimenten war die Stabilität der Messungen und Versuchsbedingungen für mindestens vier Stunden (maximal getestete Versuchsdauer) gewährleistet. Physiologische und pathologische Phänomene wurden einheitlich 1 Stunde nach Präparationsbeginn untersucht.

Bei den Experimenten traten initial Schwierigkeiten auf, die folgendermaßen behoben wurden:

(1) Anfänglich kam es bei den Versuchen sowohl zu Drift-Artefakten (während der Aufnahme eines 5-minütigen Filmes wich die ROI aus dem Aufnahmebereich der Kamera) als auch zur Instabilität des Präparates durch Zuckungen einzelner Muskelfasern. Dem Drift konnte durch eine feste Fixierung der Slygard-Petrischale im Heizring und Vermeiden des Überlaufens von NR aus der Slygard-Petrischale entgegengewirkt werden. Der nun deutlich reduzierte Drift konnte im Nachhinein mit einem Alignierungs-Plugin (Stack-Reg) der Software Fiji ausgeglichen werden. Das Problem der Instabilität des *M.-triangularis-sterni*-Präparats bei den Messungen (bedingt durch spontane Kontraktionen der Muskeln des Präparats) konnte einerseits durch gute Pin-Fixierung des Präparats auf der Gelboden-Unterfläche, andererseits durch sorgfältige Abpräparation der parietal gelegenen Muskeln beseitigt werden.

(2) Durch lange Expositionsdauer oder hohe Intensität der Fluoreszenz kam es in den untersuchten Arealen zu Bleich-Phänomenen (*engl.* Bleaching); d.h. das fluoreszente Sensormolekül verlor an Fluoreszenzintensität während der Messung. Diese erschwerten initial die Untersuchung derselben Synapse oder desselben Areals im Interkostalnerven, da die Messwerte näher an die Werte des Hintergrundsignals rückten. Obwohl es sich um ein ratiometrisches Messverfahren handelt, welches derartige Artefakte weitgehend vermeiden kann, kam es insbesondere bei Mauslinien mit geringerer Fluoreszenzintensität und bei Einsatz hoher Licht-/Laserintensitäten zur Verfälschung der Werte, da das Bleaching beide Kanäle (408/488nm) betragsmäßig

gleich betraf und somit nach Abzug des Hintergrundwertes in Einzelfällen zu einer signifikanten Veränderung der Ratio führte. Dieses Problem ließ sich recht einfach lösen, indem wir zum einen die Lichtintensität und Belichtungsdauer in beiden Kanälen um denselben Faktor verringerten. Zum anderen haben wir versucht, soweit es die interessierende Fragestellung zuließ, anstelle von Videos Einzelbildaufnahmen anzufertigen, um die Zeit der Lichtexposition so gering wie möglich zu halten. Das Bleaching spielte dann nur noch eine vernachlässigbare Rolle und die Reliabilität sowie Validität der Messungen waren somit gewährleistet.

(3) Bei der exogenen Applikation von H_2O_2 im Rahmen der Dosis-Antwort-Kurve-Experimente war die gleichmäßig tiefe Penetration der Chemikalie ins Gewebe schlecht steuerbar. Je oberflächlicher eine Synapse des motorischen Endplattenbandes lag, umso stärker war die oxidierende Wirkung der Substanz und somit auch die Ratio entsprechend höher. Um Fehlmessungen zu vermeiden, wurden deswegen bei den Dosis-Antwort-Kurve-Experimenten nur oberflächliche Synapsen gemessen. Bei der Untersuchung der Physiologie in Synapsen ohne exogene H_2O_2 -Applikation war keine Selektion oberflächlicher Synapsen erforderlich.

6.2 Veränderungen des mitochondrialen Redoxstatus unter physiologischen Bedingungen

Der intrazelluläre Transport von Zellorganellen entlang eines Axons ist wesentlich für die Funktion und die Aufrechterhaltung eines Neurons. Anterograder Transport versorgt die distale Synapse mit Proteinen, Lipiden und Mitochondrien, um den lokalen Energiebedarf zu decken. Retrograder Transport gewährleistet den Abtransport fehlgefalteter oder aggregierter Proteine vom Axon ins Soma¹²⁰. In der Literatur wird die Frage kontrovers diskutiert, inwieweit sich der Redoxstatus in retrograd und anterograd transportierten Mitochondrien unterscheidet^{121,122}. *In-vitro*-Messungen der Membranpotentiale in neuronalen Mitochondrien ergaben uneinheitliche Ergebnisse. In der Fachliteratur wurden einerseits Arbeiten über erhöhte Potentiale in retrograd transportierten Mitochondrien, welche durch eine höhere Stoffwechselaktivität erklärt wurden¹²², diskutiert. In einer anderen Arbeit konnte kein Potentialunterschied zwischen anterograd und retrograd transportierten Mitochondrien gezeigt werden¹²¹. In unseren Experimenten zeigte sich bei Untersuchungen in einer großen Zahl von

Mitochondrien im Mittel kein signifikanter Unterschied des Redoxstatus in retrograd bzw. anterograd transportierten Mitochondrien. Ebenso konnten wir keinen signifikanten Unterschied des Redoxstatus in sich bewegenden vs. ruhenden Mitochondrien messen. Beim Vergleich des Redoxstatus in Axonen und Synapsen konnten wir einen hochsignifikanten Unterschied quantifizieren, aus dem sich eine im Vergleich zum Axon erhöhte Stoffwechselaktivität in der motorischen Endplatte vermuten lässt. Ferner entdeckten wir bei unseren Untersuchungen physiologischer Prozesse neuronaler Mitochondrien – ohne exogene Applikation bestimmter Chemikalien – einen spontanen Anstieg des Redoxlevels in einzelnen Mitochondrien. Zusätzlich ließ sich zum deutlichen Spontananstieg des mitochondrialen Redoxstatus eine zeitlich korrelierte Formveränderung des entsprechenden Mitochondriums beobachten. Dieses Phänomen, das wir als „spontane mitochondriale Kontraktion“ beschrieben, zeigte sich als Verkürzung des Mitochondriums binnen Sekunden und ließ sich als Verringerung des Shape-Factors quantifizieren. Sogenannte „*Superoxide Flashes*“ (mSOF) wurden in der Literatur bereits zuvor als frühe mitochondriale Signale für durch oxidativen Stress induzierte Apoptose beschrieben¹²³⁻¹²⁶. Bei diesem Vorgang kommt es zur spontanen Freisetzung von Superoxid. Superoxide flashes treten zufällig sowie zeitlich und örtlich unabhängig auf und folgen dem Alles-oder-Nichts-Prinzip¹²⁵. Es wird vermutet, dass das Auftreten von Superoxide Flashes einen nützlichen Biomarker für zahlreiche ROS-vermittelte Krankheiten darstellt¹²⁵.

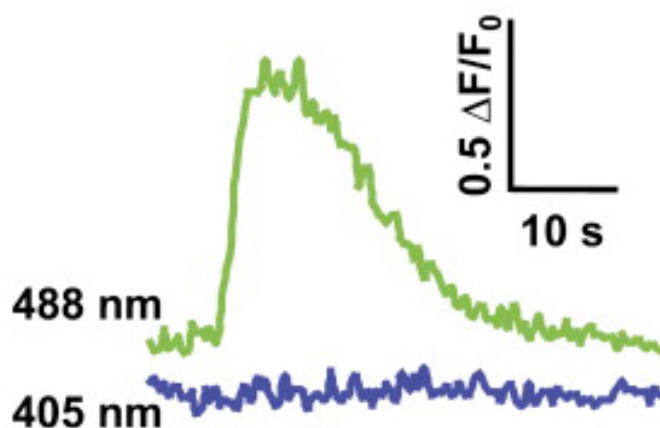


Abb. 6.2.1 Redox-Verlauf eines Superoxide Flash (Abb. 6.1 aus Wang et al., 2008¹²⁵)

In einer neueren Studie wurde gezeigt, dass Superoxide Flashes durch die temporäre Öffnung der *mitochondrial Permeability Transition Pore* (mPTP) zustande kommen¹²⁷. Diese mPTP-Öffnung wird über das gleichzeitige Eindringen von Ca^{2+} über den Ca^{2+} -Uniporter (mCU – verantwortlich für die größte Ca^{2+} -Aufnahme ins Mitochondrium¹²⁸)

und eine basale ROS-Erhöhung synergistisch reguliert. Der Superoxide Flash ist demnach ein Detektor des koinzidenten Auftretens von mitochondrialen Ca^{2+} - und ROS-Signalen¹²⁹. In einer weiterführenden Arbeit von Schwarzländer et al. wird die Annahme getroffen, dass es sich bei den Superoxide Flashes tatsächlich um pH-Flashes handelt, bedingt durch die Alkalisierung der mitochondrialen Matrix und gemessen durch die pH-Abhängigkeit des cpYFP¹³⁰. PH-Schwankungen können als Signale in einzelnen Mitochondrien fungieren und am dynamischen Remodelling der Atmungskette und dem Wiederaufbau des elektrochemischen Gradienten teilnehmen¹³⁰. Eventuell könnte auch den in unseren Experimenten beobachteten spontanen mitochondrialen Kontraktionen, welche mit einem ROS-Anstieg einhergehen, eine Rolle bei der Äquilibration einer etwaigen Dysbalance der Redoxregulation zukommen. Um die mögliche Rolle von H_2O_2 , Ca^{2+} und pH-Veränderungen bei der Entstehung dieser morphologischen Phänomene zu untersuchen, wurde in Folgeexperimenten (durchgeführt von mit M. Breckwoldt; veröffentlicht in Nature Medicine⁹⁸) zu Beginn der Kontraktion mithilfe von *TMRM* zunächst der Abfall des Membranpotentials dokumentiert (siehe Abb. 6.2.). Später konnten wir mithilfe von *rAAV-mito-SypHer* eine plötzliche Alkalisierung messen, welche von einer langsamen Azidifizierung der Matrix gefolgt wurde (siehe Abb. 6.2.). Messungen mit R-GECO1 ergaben eine weitestgehende Stabilität der Ca^{2+} -Werte im Verlauf der Kontraktionen (siehe Abb. 6.2.).

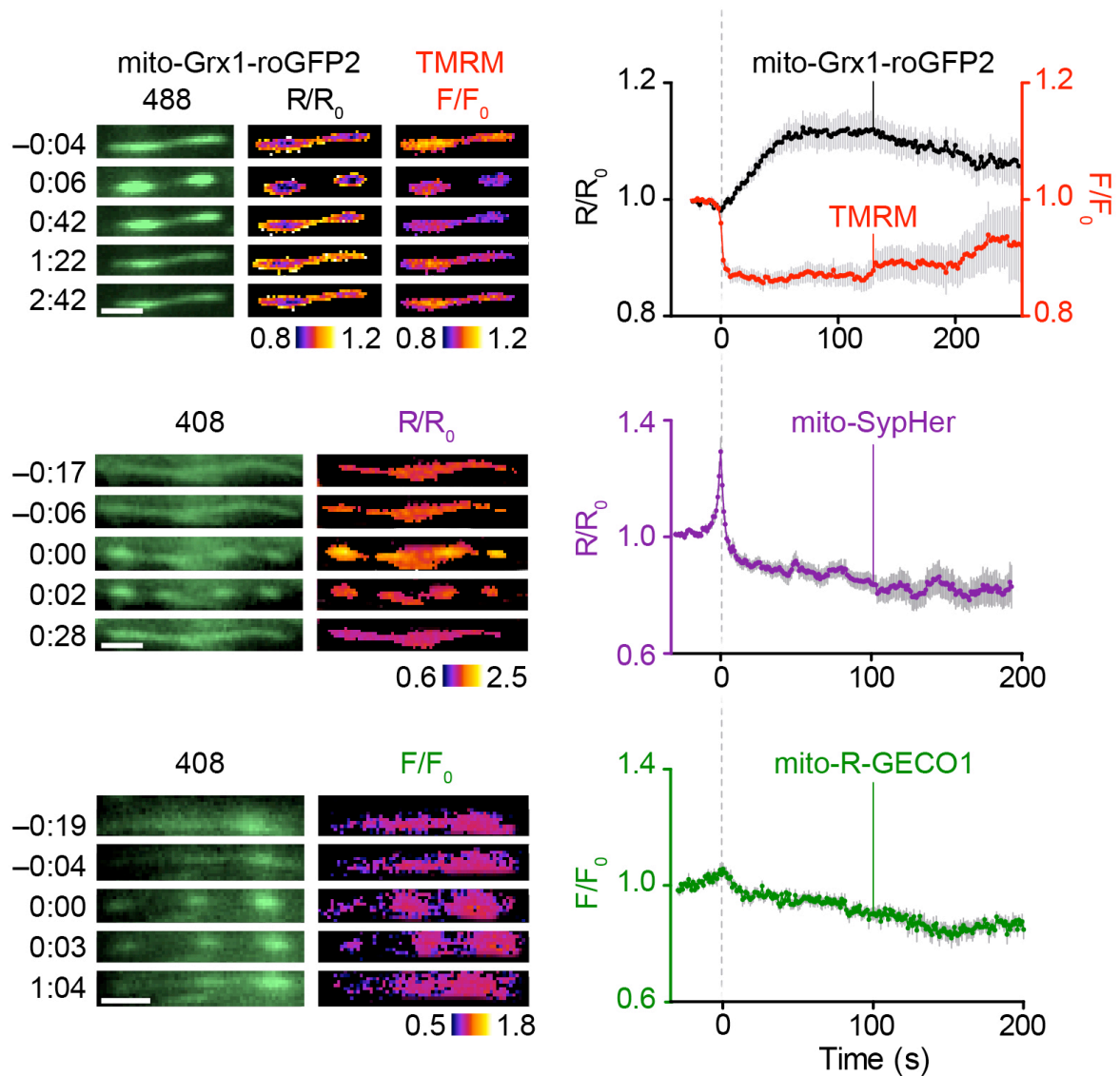


Abb. 6.2.2 Verlauf während einer Kontraktion: oben Messung des Membranpotentials mittels TMRM; mittig Messung des pHs mittels SypHer; unten Messung des intrazellulären Calciums mittels R-GECO1 (veröffentlicht in Breckwoldt et al.⁹⁸)

Um die molekularen Mechanismen hinter diesen Veränderungen besser zu verstehen, wurde in Kooperation mit M. Breckwoldt (s.o.) in pharmakologischen Experimenten die Bedeutung der pro-oxidativen Veränderungen als Grundlage für Kontraktionen untersucht. Der Komplex-I-Inhibitor Rotenon senkte die Frequenz der Kontraktionen dosisabhängig, wohingegen die Inhibition des Ca^{2+} -Uniporters durch Ru-360 die Kontraktionsfrequenz nicht signifikant senkte. Überdies ließ sich die Frequenz durch die Zugabe von oxidierenden (H_2O_2) bzw. reduzierenden (DTT) Substanzen signifikant steigern bzw. senken. Diese Ergebnisse legen nahe, dass mitochondriale Kontraktionen eine Stressreaktion darstellen. Diese Formveränderung ist primär reversibel; in physiologischen Situationen bildet sie sich nach Erholung vom oxidativen Stress wieder zurück. Bei Entkopplung oder Fehlfunktion der Redox-Regulation kommt es jedoch zu

einem weiteren Anstieg des oxidativen Stresses. Dieser bewirkt schließlich – in Abhängigkeit seines Ausmaßes – eine irreversible Degeneration des Mitochondriums, welche sich in seiner rundlichen Form widerspiegelt.

6.3 Veränderungen des mitochondrialen Redoxstatus unter pathologischen Bedingungen

Die vermutete Relation zwischen neurodegenerativen Prozessen (wie z.B. bei der ALS) und irreversibler mitochondrialer Schädigung durch oxidativen Stress wird durch unsere Untersuchungen pathologischer Situationen gestützt. Mitochondrien waren und sind Gegenstand zahlreicher Studien in der Erforschung der Pathogenese der ALS. Sie spielen eine wesentliche Rolle bei der Redox-Regulation und sind auf der anderen Seite sehr empfindlich gegenüber oxidativem Stress^{131,132}. Bereits in früheren Studien konnte ein erhöhtes Vorkommen von ROS im Liquor von ALS-Patienten¹³³ sowie H₂O₂ in SOD1-Mäusen¹³⁴ beobachtet werden. Tatsächlich werden in Rückenmarksneuronen von ALS-Patienten degenerierte Mitochondrien gefunden^{64,135}. Bei unseren Versuchen mit *mitoROS*-Mäusen, welche wir mit Mäusen der SOD1^{G93A}-Mutante kreuzten, konnten wir beobachten, dass die Krankheit – wie erwartet¹³⁶ – nach etwa 3-4 Monaten ausbrach und sich über einen Zeitraum von etwa 1-2 Monaten progredient entwickelte. Mit dem Fortschreiten der Erkrankung beobachteten wir eine erhöhte mitochondriale Kontraktionsfrequenz (gemessen von M. Breckwoldt) sowie zunehmende mitochondriale Oxidation – einhergehend mit einer Abrundung der Mitochondrien in der präterminalen Phase. In der Terminalphase der Erkrankung waren Mitochondrien irreversibel geschädigt, oxidiert und abgerundet. Die degenerierten Mitochondrien zeigten die Tendenz, sich in Clustern zu gruppieren. Bereits zuvor wurden degenerierte oder abnormale Mitochondrien in Mausmodellen^{137,138}, neuronalen Zellkulturen^{139,140} und ALS-Patienten^{140,141} beschrieben. Das zeitliche Profil des Redoxstatus und der Formveränderung spricht dafür, dass sich Mitochondrien zunächst verkürzen, bevor anschließend der oxidative Stress zunimmt und die Mitochondrien endgültig degenerieren. Dies wiederum legt den Schluss nahe, dass der oxidative Stress zumindest in der frühen Phase der Erkrankung nicht die alleinige Ursache für die Formveränderung und schließlich Degeneration der Mitochondrien darstellt; beispielsweise könnte an diesem Prozess intrazelluläres Calcium beteiligt sein. Ferner war zu beobachten, dass die Morphologie von Mitochondrien innerhalb eines Axons

relativ homogen war, wir fanden kein „Salz-und-Pfeffer“-Bild vor. Diesem homogenen Schädigungsmuster zufolge nehmen wir an, dass die Pathologie auf Axonebene stattfindet.

6.4 Ausblick

Mit der in meiner Arbeit vorgestellten Methodik ist es nun erstmals möglich, mit Hilfe des ROS-Biosensors *Grx1-roGFP2* sowohl *ex vivo* als auch *in vivo* den mitochondrialen Redoxstatus in Neuronen zu detektieren und zu quantifizieren. Wir haben dies in neuromuskulären Endplatten, Interkostalnerven und spinalen Neuronen untersucht und nachgewiesen. Ferner sind die von uns generierten *mitoROS*-Mäuse geeignet, um pathophysiologische Mechanismen in Krankheitsmodellen eines neuronalen Schadens (z.B. Tiermodell der Multiplen Sklerose oder Rückenmarks-Verletzungs-Modell) zu untersuchen. So wurden *mitoROS*-Mäuse bereits bei Untersuchungen in einem Modell der Rückenmarks-Verletzung (Experimente durchgeführt von M. Breckwoldt) eingesetzt. Interessant bleibt die Frage nach der Untersuchung weiterer ROS-Spezies mit Hilfe neuer Redox-Paare, um die genauen molekularen Mechanismen bei physiologischen und pathologischen Vorgängen genauer zu verstehen. Während cpYFP-Sensoren wie *HyPer* oder *rxYFP* spezifisch H_2O_2 messen, ermöglichen die roGFP-Varianten eine Messung des Redoxstatus des oxidierten/reduzierten Glutathion-Redox-Paars *GSSG/GSH* (E_{GSH}). Um andere reaktive Sauerstoffspezies zu erfassen, müssen weitere Sensorsysteme entwickelt werden. Momentan ist beispielsweise noch kein Superoxid(O_2^-)-spezifischer Sensor verfügbar, doch es gibt bereits vielversprechende Ansätze, beispielsweise die Verwendung von SoxR¹⁴² oder Aconitase¹⁴³⁻¹⁴⁵. Diese Proteine enthalten FeS-Cluster, welche die primären Ziele von Superoxid sind⁸³. Ferner ist die Erforschung von reaktiven Stickstoffspezies (*engl. RNS, reactive nitrogen species*) z.B. bei der Pathogenese der ALS von großer Bedeutung¹⁴⁶. Hierfür steht neuerdings der Sensor *pnGFP* für die selektive Messung von Peroxynitrit zur Verfügung¹⁴⁷. Wegweisend in der Erforschung reaktiver Sauerstoffspezies war auch die Erstbeschreibung des physiologischen Redoxsensors *Lyn*, eine *Src Family Kinase* (SFK), und damit die Beantwortung der Frage, wie vom Organismus ROS detektiert werden können¹⁴⁸. Mitochondrien spielen eine Schlüsselrolle als Regulatoren bioenergetischer Prozesse sowie der ROS- und Ca^{2+} -Homöostase, da sie das zytoplasmatische Vorkommen von

Ca^{2+} , ATP und ROS regulieren. Deren Signalwege sind über verschiedene Rückkopplungsmechanismen verbunden¹⁴⁹. Sollte durch verschiedene Stimuli dieses Gleichgewicht ins Wanken geraten und keine neue Homöostase erreicht werden, wird kein ATP mehr produziert, wohingegen die intrazellulären Ca^{2+} - und ROS-Level ansteigen, welche zur Zerstörung des Axons beitragen¹⁵⁰. Insbesondere die Entschlüsselung der Signalwege und Interaktionen zwischen Ca^{2+} und ROS im Zytosol eines Neurons sowie die Wechselwirkungen mit anderen Mediatoren könnten zum besseren Verständnis neurodegenerativer Prozesse beitragen. Die tiefer gehende Erforschung der Bedeutung dieser Ca^{2+} - und ROS-Signalwege wird zukünftig zweifelsohne eine große Rolle bei der Entwicklung neuer Therapiestrategien neurodegenerativer Erkrankungen darstellen¹⁵⁰.

7. Zusammenfassung

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS, sog. reactive oxygen species) wie beispielsweise Superoxid (O_2^-) oder Wasserstoffperoxid (H_2O_2) sind wichtige Signalmoleküle und spielen beispielsweise bei Entzündungsprozessen und der Wirtsabwehr eine tragende Rolle^{1,151}. Allerdings kann eine überschießende Bildung von ROS toxisch wirken, da sie in der Lage sind, Lipide, Proteine und DNA direkt zu oxidieren und so Zellen bzw. Gewebe zu schädigen und zu zerstören⁸. Neuronen scheinen mit ihrem hohen Energiebedarf und ihrer komplexen Morphologie besonders anfällig für solche schädigende Ereignisse zu sein. Es gibt Hinweise darauf, dass die durch oxidativen Stress verursachte mitochondriale Schädigung eine wichtige Rolle bei akuter neuronaler Schädigung wie z.B. nach traumatischen oder inflammatorischen Läsionen³³⁻³⁵, aber auch bei chronischen neurodegenerativen Erkrankungen wie z.B. der Amyotrophen Lateralsklerose (ALS), Morbus Alzheimer oder Morbus Parkinson spielt^{11,12,24,36-38}.

Bisher gab es keine Möglichkeit, *in vivo* die Bedeutung der ROS in der Pathophysiologie der mitochondrialen Schädigung in Neuronen zu untersuchen. Aus diesem Grund war es ein wesentliches Ziel dieser Arbeit, eine transgene Mauslinie namens *mitoROS* zu generieren, die das redox-sensitive fluoreszente Protein *Grx1-roGFP2*¹⁰ in neuronalen Mitochondrien exprimiert. Dieses haben wir über den neuronspezifischen *Thy1*-Promotor in das mitochondriale Genom eingefügt⁹⁶ und mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie die histologischen Expressionsmuster in verschiedenen neuronalen Geweben charakterisiert. Der ratiometrische Sensor *Grx1-roGFP2* erlaubt es, in Echtzeit („live“) (1) den mitochondrialen Redoxstatus und gleichzeitig (2) morphologische mitochondriale Veränderungen (Shape Factor) zu überwachen und aufzuzeichnen, wodurch es möglich ist, beide Parameter in direkte Korrelation zueinander zu setzen. Die Untersuchungen wurden unter physiologischen sowie pathologischen (*SOD1*-Mutante *G93A*) Bedingungen durchgeführt.

In unseren Studien mit *mitoROS*-Mäusen unter physiologischen Verhältnissen untersuchten wir mit Hilfe eines Weitfeldmikroskops Mitochondrien in neuromuskulären Endplatten des *M. triangluaris sterni*, welcher aufgrund seiner Lage (Innenseite des Brustkorbs) und speziellen Eigenschaften (dünn aufgrund nur weniger Muskelfasern, gut präparierbar, gute Darstellbarkeit neuromuskulärer Endplatten)

besonders gut zur Visualisierung motorischer Synapsen geeignet ist. Darüber hinaus wurden auch Mitochondrien in Interkostalnerven untersucht. Bezüglich des Redoxstatus zeigte sich kein Unterschied zwischen sich bewegendem und ruhenden Mitochondrien in Interkostalnerven. Zusätzlich wiesen antero- bzw. retrograd bewegende Mitochondrien keinen Redoxstatusunterschied auf. Interessanterweise konnten wir einen hochsignifikanten Unterschied zwischen dem Redoxstatus in Mitochondrien neuromuskulärer Endplatten und Interkostalnerven messen, welchen wir als evtl. höhere Stoffwechselaktivität in motorischen Synapsen interpretierten.

Ferner entdeckten wir – ohne exogene Applikation bestimmter Chemikalien – ein morphologisches Phänomen, das wir als „spontane mitochondriale Kontraktion“ beschrieben; diese zeigte sich als Verkürzung des Mitochondrions (Shape-Factor-Abnahme), welche mit einem zeitlich korrelierten, deutlichen Spontananstieg des mitochondrialen Redoxstatus einherging. Um einen möglichen kausalen und zeitlichen Zusammenhang zwischen ROS-Anstieg und Kontraktion zu untersuchen, wurde in Folgeexperimenten (durchgeführt von M. Breckwoldt) zunächst exogen H_2O_2 appliziert; dies führte zu einem signifikant häufigeren Auftreten des Phänomens im Vergleich zu NR- und DTT-Milieu. Ferner wurde in Rückenmarksverletzungs-Studien, in denen sich eine Erhöhung des Redoxstatus sowie eine Abrundung der degenerierten Mitochondrien zeigte, eine Zunahme der Frequenz der mitochondrialen Kontraktionen gemessen. Ähnlich verhielten sich Mitochondrien auch in einer Kreuzung unserer *mitoROS*-Mäuse mit Mäusen, die als Krankheitsmodell der Amyotrophen Lateralsklerose (ALS) eingesetzt werden (mutierte $\text{SOD1}^{\text{G93A}}$). In der Frühphase der Erkrankung fand sich eine diskrete, aber signifikante mitochondriale Abrundung und Redoxstaterhöhung im Vergleich zur Kontrolle. Mit der Progredienz der Erkrankung nahm die Kontraktionsfrequenz zu bis die oxidierten Mitochondrien letztendlich eine irreversible Abrundung aufwiesen. Aufgrund dieser beobachteten Veränderungen im zeitlichen Verlauf liegt der Schluss nahe, dass (a) ROS eine wichtige pathophysiologische Rolle der mitochondrialen Schädigung im ALS-Modell spielen und (b) noch weitere Faktoren bzw. Signalwege (in Betracht kommt z.B. eine Veränderung im Ca^{2+} -Stoffwechsel) eine Bedeutung haben. Wir gehen davon aus, dass die Formveränderung im Sinne einer Kontraktion primär reversibel ist und sich in physiologischen Situationen nach Erholung von oxidativem Stress wieder zurückbildet. Bei Entkopplung oder Fehlfunktion der Redox-Regulation kommt es jedoch zu einem weiteren Anstieg des oxidativen Stresses,

welcher schließlich eine irreversible Degeneration des Mitochondrions bewirkt, welche sich in seiner rundlichen Form widerspiegelt.

Zusammenfassend ist es uns im Rahmen dieses Projekts erstmals gelungen, zuverlässige *Reporter-Mäuse* des mitochondrialen Redoxstatus zu generieren. Nach erfolgreicher Kalibrierung des Sensorproteins *Grx1-roGFP2* und Versuchen unter physiologischen und pathologischen Bedingungen bietet die Mauslinie *mitoROS* zahlreiche Einsatzmöglichkeiten für *in vivo*- und *ex vivo*-Untersuchungen. Dieses Modell erlaubt es, Veränderungen des mitochondrialen Redoxstatus und der Mitochondrienmorphologie zu erfassen und kann damit zu einem besseren Verständnis der komplexen Pathophysiologie verschiedener neurologischer Erkrankungen (beispielsweise neuroinflammatorischer Erkrankungen wie Multipler Sklerose oder weiterer neurodegenerativer Erkrankungen wie der Alzheimer-Demenz) beitragen. So wurden *mitoROS*-Mäuse bereits bei Untersuchungen in einem Modell der Rückenmarksverletzung (Experimente durchgeführt von M. Breckwoldt) eingesetzt.

8. Literaturverzeichnis

1. Nathan, C. & Ding, A. SnapShot: Reactive Oxygen Intermediates (ROI). *Cell* **140**, 951-951 e952 (2010).
2. D'Autreaux, B. & Toledano, M.B. ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nature reviews. Molecular cell biology* **8**, 813-824 (2007).
3. Holmgren, A. Antioxidant function of thioredoxin and glutaredoxin systems. *Antioxidants & redox signaling* **2**, 811-820 (2000).
4. Nordberg, J. & Arner, E.S. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free radical biology & medicine* **31**, 1287-1312 (2001).
5. Kowaltowski, A.J., de Souza-Pinto, N.C., Castilho, R.F. & Vercesi, A.E. Mitochondria and reactive oxygen species. *Free radical biology & medicine* **47**, 333-343 (2009).
6. Dickinson, B.C., Peltier, J., Stone, D., Schaffer, D.V. & Chang, C.J. Nox2 redox signaling maintains essential cell populations in the brain. *Nature chemical biology* **7**, 106-112 (2011).
7. Albrecht, S.C., Barata, A.G., Grosshans, J., Teleman, A.A. & Dick, T.P. In vivo mapping of hydrogen peroxide and oxidized glutathione reveals chemical and regional specificity of redox homeostasis. *Cell metabolism* **14**, 819-829 (2011).
8. Thannickal, V.J. & Fanburg, B.L. Reactive oxygen species in cell signaling. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* **279**, L1005-1028 (2000).
9. Auten, R.L. & Davis, J.M. Oxygen toxicity and reactive oxygen species: the devil is in the details. *Pediatric research* **66**, 121-127 (2009).
10. Gutscher, M., *et al.* Real-time imaging of the intracellular glutathione redox potential. *Nature methods* **5**, 553-559 (2008).
11. Lin, M.T. & Beal, M.F. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature* **443**, 787-795 (2006).
12. Guzman, J.N., *et al.* Oxidant stress evoked by pacemaking in dopaminergic neurons is attenuated by DJ-1. *Nature* **468**, 696-700 (2010).
13. Guarente, L. Mitochondria--a nexus for aging, calorie restriction, and sirtuins? *Cell* **132**, 171-176 (2008).
14. Maechler, P. & Wollheim, C.B. Mitochondrial function in normal and diabetic beta-cells. *Nature* **414**, 807-812 (2001).

15. Gray, M.W., Burger, G. & Lang, B.F. Mitochondrial evolution. *Science* **283**, 1476-1481 (1999).
16. Wallace, D.C. Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science* **283**, 1482-1488 (1999).
17. Madeira, V.M. Overview of mitochondrial bioenergetics. *Methods Mol Biol* **810**, 1-6 (2012).
18. Martinou, J.C. & Youle, R.J. Mitochondria in apoptosis: Bcl-2 family members and mitochondrial dynamics. *Developmental cell* **21**, 92-101 (2011).
19. Green, D.R. Apoptotic pathways: the roads to ruin. *Cell* **94**, 695-698 (1998).
20. Mammucari, C., Patron, M., Granatiero, V. & Rizzuto, R. Molecules and roles of mitochondrial calcium signaling. *Biofactors* **37**, 219-227 (2011).
21. Lill, R., *et al.* The essential role of mitochondria in the biogenesis of cellular iron-sulfur proteins. *Biological chemistry* **380**, 1157-1166 (1999).
22. Taylor, R.W., *et al.* Genotypes from patients indicate no paternal mitochondrial DNA contribution. *Annals of neurology* **54**, 521-524 (2003).
23. Zeviani, M. & Di Donato, S. Mitochondrial disorders. *Brain : a journal of neurology* **127**, 2153-2172 (2004).
24. Bender, A., *et al.* High levels of mitochondrial DNA deletions in substantia nigra neurons in aging and Parkinson disease. *Nature genetics* **38**, 515-517 (2006).
25. Kosenko, E.A., Solomadin, I.N., Reddy, V.P., Aliev, G. & Kaminsky, Y.G. Pathogenesis of Alzheimer Disease: Role of Oxidative Stress, Amyloid Beta Peptides, Systemic Ammonia and Erythrocyte Energy Metabolism. *CNS & neurological disorders drug targets* (2013).
26. D'Amico, E., Factor-Litvak, P., Santella, R.M. & Mitsumoto, H. Clinical perspective on oxidative stress in sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Free radical biology & medicine* **65C**, 509-527 (2013).
27. Siddiqui, A., *et al.* Mitochondrial DNA damage Is associated with reduced mitochondrial bioenergetics in Huntington's disease. *Free Radical Biology and Medicine* **53**, 1478-1488 (2012).
28. Ribeiro, M., *et al.* Glutathione redox cycle dysregulation in Huntington's disease knock-in striatal cells. *Free Radical Biology and Medicine* **53**, 1857-1867 (2012).
29. Sorolla, M.A., *et al.* Protein oxidation in Huntington disease. *Biofactors* **38**, 173-185 (2012).
30. Richter, C., Park, J.W. & Ames, B.N. Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **85**, 6465-6467 (1988).

31. Zorov, D.B., Filburn, C.R., Klotz, L.O., Zweier, J.L. & Sollott, S.J. Reactive oxygen species (ROS)-induced ROS release: a new phenomenon accompanying induction of the mitochondrial permeability transition in cardiac myocytes. *The Journal of experimental medicine* **192**, 1001-1014 (2000).
32. Nunnari, J. & Suomalainen, A. Mitochondria: in sickness and in health. *Cell* **148**, 1145-1159 (2012).
33. Nikic, I., *et al.* A reversible form of axon damage in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Nature medicine* **17**, 495-499 (2011).
34. Mahad, D.J., *et al.* Mitochondrial changes within axons in multiple sclerosis. *Brain : a journal of neurology* **132**, 1161-1174 (2009).
35. Sullivan, P.G., Krishnamurthy, S., Patel, S.P., Pandya, J.D. & Rabchevsky, A.G. Temporal characterization of mitochondrial bioenergetics after spinal cord injury. *Journal of neurotrauma* **24**, 991-999 (2007).
36. Lassmann, H. Mechanisms of neurodegeneration shared between multiple sclerosis and Alzheimer's disease. *J Neural Transm* **118**, 747-752 (2011).
37. Schon, E.A. & Przedborski, S. Mitochondria: the next (neurode)generation. *Neuron* **70**, 1033-1053 (2011).
38. Abou-Sleiman, P.M., Muqit, M.M. & Wood, N.W. Expanding insights of mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Nature reviews. Neuroscience* **7**, 207-219 (2006).
39. Rowland, L.P. & Shneider, N.A. Amyotrophic lateral sclerosis. *The New England journal of medicine* **344**, 1688-1700 (2001).
40. Brandt, T. *Therapie und Verlauf neurologischer Erkrankungen*, (Kohlhammer, Stuttgart, 2007).
41. Kiernan, M.C., *et al.* Amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet* **377**, 942-955 (2011).
42. Logroscino, G., *et al.* Incidence of amyotrophic lateral sclerosis in Europe. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* **81**, 385-390 (2010).
43. Abhinav, K., *et al.* Amyotrophic lateral sclerosis in South-East England: a population-based study. The South-East England register for amyotrophic lateral sclerosis (SEALS Registry). *Neuroepidemiology* **29**, 44-48 (2007).
44. Cronin, S., Hardiman, O. & Traynor, B.J. Ethnic variation in the incidence of ALS: a systematic review. *Neurology* **68**, 1002-1007 (2007).
45. Mumenthaler, M. & Mattle, H. *Neurologie : 226 Tabellen*, (Thieme, Stuttgart {[u.a.], 2008).
46. Sreedharan, J., *et al.* TDP-43 mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Science* **319**, 1668-1672 (2008).

47. Maruyama, H., *et al.* Mutations of optineurin in amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* **465**, 223-226 (2010).
48. Beleza-Meireles, A. & Al-Chalabi, A. Genetic studies of amyotrophic lateral sclerosis: controversies and perspectives. *Amyotrophic lateral sclerosis : official publication of the World Federation of Neurology Research Group on Motor Neuron Diseases* **10**, 1-14 (2009).
49. Rosen, D.R., *et al.* Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* **362**, 59-62 (1993).
50. Shaw, C.E., *et al.* Familial amyotrophic lateral sclerosis. Molecular pathology of a patient with a SOD1 mutation. *Neurology* **49**, 1612-1616 (1997).
51. Kwiatkowski, T.J., Jr., *et al.* Mutations in the FUS/TLS gene on chromosome 16 cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science* **323**, 1205-1208 (2009).
52. Vance, C., *et al.* Mutations in FUS, an RNA processing protein, cause familial amyotrophic lateral sclerosis type 6. *Science* **323**, 1208-1211 (2009).
53. Vucic, S. & Kiernan, M.C. Pathophysiology of neurodegeneration in familial amyotrophic lateral sclerosis. *Current molecular medicine* **9**, 255-272 (2009).
54. Pasinelli, P. & Brown, R.H. Molecular biology of amyotrophic lateral sclerosis: insights from genetics. *Nature reviews. Neuroscience* **7**, 710-723 (2006).
55. Harwood, C.A., McDermott, C.J. & Shaw, P.J. Physical activity as an exogenous risk factor in motor neuron disease (MND): a review of the evidence. *Amyotrophic lateral sclerosis : official publication of the World Federation of Neurology Research Group on Motor Neuron Diseases* **10**, 191-204 (2009).
56. Chio, A., Benzi, G., Dossena, M., Mutani, R. & Mora, G. Severely increased risk of amyotrophic lateral sclerosis among Italian professional football players. *Brain : a journal of neurology* **128**, 472-476 (2005).
57. Kasarskis, E.J., *et al.* Clinical aspects of ALS in Gulf War veterans. *Amyotrophic lateral sclerosis : official publication of the World Federation of Neurology Research Group on Motor Neuron Diseases* **10**, 35-41 (2009).
58. Gallo, V., *et al.* Smoking and risk for amyotrophic lateral sclerosis: analysis of the EPIC cohort. *Annals of neurology* **65**, 378-385 (2009).
59. Bruijn, L.I., Miller, T.M. & Cleveland, D.W. Unraveling the mechanisms involved in motor neuron degeneration in ALS. *Annual review of neuroscience* **27**, 723-749 (2004).
60. Liu, R., Althaus, J.S., Ellerbrock, B.R., Becker, D.A. & Gurney, M.E. Enhanced oxygen radical production in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Annals of neurology* **44**, 763-770 (1998).

61. Meldrum, B. & Garthwaite, J. Excitatory amino acid neurotoxicity and neurodegenerative disease. *Trends in pharmacological sciences* **11**, 379-387 (1990).
62. Regan, R.F., Panter, S.S., Witz, A., Tilly, J.L. & Giffard, R.G. Ultrastructure of excitotoxic neuronal death in murine cortical culture. *Brain research* **705**, 188-198 (1995).
63. Hensley, K., *et al.* On the relation of oxidative stress to neuroinflammation: lessons learned from the G93A-SOD1 mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Antioxidants & redox signaling* **8**, 2075-2087 (2006).
64. Wiedemann, F.R., Manfredi, G., Mawrin, C., Beal, M.F. & Schon, E.A. Mitochondrial DNA and respiratory chain function in spinal cords of ALS patients. *Journal of neurochemistry* **80**, 616-625 (2002).
65. Ellis, D.Z., Rabe, J. & Sweadner, K.J. Global loss of Na,K-ATPase and its nitric oxide-mediated regulation in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **23**, 43-51 (2003).
66. Sasaki, S. & Iwata, M. Impairment of fast axonal transport in the proximal axons of anterior horn neurons in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* **47**, 535-540 (1996).
67. Talbot, K. Motor neuron disease: the bare essentials. *Practical neurology* **9**, 303-309 (2009).
68. Ferguson, T.A. & Elman, L.B. Clinical presentation and diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. *NeuroRehabilitation* **22**, 409-416 (2007).
69. Silani, V., *et al.* The diagnosis of Amyotrophic lateral sclerosis in 2010. *Archives italiennes de biologie* **149**, 5-27 (2011).
70. Leigh, P.N., *et al.* The management of motor neurone disease. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* **74 Suppl 4**, iv32-iv47 (2003).
71. Brooks, B.R. El Escorial World Federation of Neurology criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. Subcommittee on Motor Neuron Diseases/Amyotrophic Lateral Sclerosis of the World Federation of Neurology Research Group on Neuromuscular Diseases and the El Escorial "Clinical limits of amyotrophic lateral sclerosis" workshop contributors. *Journal of the neurological sciences* **124 Suppl**, 96-107 (1994).
72. Traynor, B.J., *et al.* Clinical features of amyotrophic lateral sclerosis according to the El Escorial and Airlie House diagnostic criteria: A population-based study. *Archives of neurology* **57**, 1171-1176 (2000).
73. Carvalho, M.D. & Swash, M. Awaji diagnostic algorithm increases sensitivity of El Escorial criteria for ALS diagnosis. *Amyotrophic lateral sclerosis : official publication of the World Federation of Neurology Research Group on Motor Neuron Diseases* **10**, 53-57 (2009).

74. Körner S, D.R., Petri S. Diagnostik der amyotrophen Lateralsklerose. *Journal für Neurologie Neurochirurgie und Psychiatrie* **12**, 5 (2011).
75. Bensimon, G., Lacomblez, L. & Meininger, V. A controlled trial of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. ALS/Riluzole Study Group. *The New England journal of medicine* **330**, 585-591 (1994).
76. Lacomblez, L., Bensimon, G., Leigh, P.N., Guillet, P. & Meininger, V. Dose-ranging study of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. Amyotrophic Lateral Sclerosis/Riluzole Study Group II. *Lancet* **347**, 1425-1431 (1996).
77. Miller, R.G., Mitchell, J.D., Lyon, M. & Moore, D.H. Riluzole for amyotrophic lateral sclerosis (ALS)/motor neuron disease (MND). *Cochrane Database Syst Rev*, CD001447 (2007).
78. Wijesekera, L.C. & Leigh, P.N. Amyotrophic lateral sclerosis. *Orphanet journal of rare diseases* **4**, 3 (2009).
79. Van Den Bosch, L. Genetic rodent models of amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of biomedicine & biotechnology* **2011**, 348765 (2011).
80. Hanson, G.T., *et al.* Investigating mitochondrial redox potential with redox-sensitive green fluorescent protein indicators. *The Journal of biological chemistry* **279**, 13044-13053 (2004).
81. Peng, X., *et al.* Fluorescence ratiometry and fluorescence lifetime imaging: using a single molecular sensor for dual mode imaging of cellular viscosity. *Journal of the American Chemical Society* **133**, 6626-6635 (2011).
82. Demchenko, A.P. The concept of lambda-ratiometry in fluorescence sensing and imaging. *Journal of fluorescence* **20**, 1099-1128 (2010).
83. Lukyanov, K.A. & Belousov, V.V. Genetically encoded fluorescent redox sensors. *Biochimica et biophysica acta* (2013).
84. Meyer, A.J. & Dick, T.P. Fluorescent protein-based redox probes. *Antioxidants & redox signaling* **13**, 621-650 (2010).
85. Belousov, V.V., *et al.* Genetically encoded fluorescent indicator for intracellular hydrogen peroxide. *Nature methods* **3**, 281-286 (2006).
86. Choi, W.G., Swanson, S.J. & Gilroy, S. High-resolution imaging of Ca²⁺, redox status, ROS and pH using GFP biosensors. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **70**, 118-128 (2012).
87. Schwarzlander, M., Logan, D.C., Fricker, M.D. & Sweetlove, L.J. The circularly permuted yellow fluorescent protein cpYFP that has been used as a superoxide probe is highly responsive to pH but not superoxide in mitochondria: implications for the existence of superoxide 'flashes'. *The Biochemical journal* **437**, 381-387 (2011).

88. Roma, L.P., *et al.* Dynamic measurements of mitochondrial hydrogen peroxide concentration and glutathione redox state in rat pancreatic beta-cells using ratiometric fluorescent proteins: confounding effects of pH with HyPer but not roGFP1. *The Biochemical journal* **441**, 971-978 (2012).
89. Barata, A.G. & Dick, T.P. In vivo imaging of H₂O₂ production in *Drosophila*. *Methods in enzymology* **526**, 61-82 (2013).
90. Maulucci, G., *et al.* High-resolution imaging of redox signaling in live cells through an oxidation-sensitive yellow fluorescent protein. *Science signaling* **1**, pl3 (2008).
91. Morgan, B., Sobotta, M.C. & Dick, T.P. Measuring E(GSH) and H₂O₂ with roGFP2-based redox probes. *Free radical biology & medicine* **51**, 1943-1951 (2011).
92. Bilan, D.S., *et al.* HyPer-3: a genetically encoded H₂O₂ probe with improved performance for ratiometric and fluorescence lifetime imaging. *ACS chemical biology* **8**, 535-542 (2013).
93. Markvicheva, K.N., *et al.* A genetically encoded sensor for H₂O₂ with expanded dynamic range. *Bioorganic & medicinal chemistry* **19**, 1079-1084 (2011).
94. Marinkovic, P., Godinho, L. & Misgeld, T. Generation and screening of mice with transgenic neuronal labeling controlled by Thy1 regulatory elements. in *Imaging in Neuroscience and Development* (Yuste, R., Konnerth A., 2011).
95. Gurney, M.E., *et al.* Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science* **264**, 1772-1775 (1994).
96. Feng, G., *et al.* Imaging neuronal subsets in transgenic mice expressing multiple spectral variants of GFP. *Neuron* **28**, 41-51 (2000).
97. Kerschensteiner, M., Reuter, M.S., Lichtman, J.W. & Misgeld, T. Ex vivo imaging of motor axon dynamics in murine triangularis sterni explants. *Nature protocols* **3**, 1645-1653 (2008).
98. Breckwoldt, M.O., *et al.* Multi-parametric optical analysis of mitochondrial redox signals during neuronal physiology and pathology in vivo. *Nature medicine* **in print**(2014).
99. Hegedus, J., Putman, C.T. & Gordon, T. Time course of preferential motor unit loss in the SOD1 G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiology of disease* **28**, 154-164 (2007).
100. Henriques, A., Pitzer, C. & Schneider, A. Characterization of a novel SOD-1(G93A) transgenic mouse line with very decelerated disease development. *PloS one* **5**, e15445 (2010).
101. Grienberger, C. & Konnerth, A. Imaging calcium in neurons. *Neuron* **73**, 862-885 (2012).
102. Markvicheva, K.N., Bogdanova, E.A., Staroverov, D.B., Lukyanov, S. & Belousov, V.V. Imaging of intracellular hydrogen peroxide production with HyPer upon

- stimulation of HeLa cells with epidermal growth factor. *Methods Mol Biol* **476**, 79-86 (2008).
103. Miller, E.W., Dickinson, B.C. & Chang, C.J. Aquaporin-3 mediates hydrogen peroxide uptake to regulate downstream intracellular signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 15681-15686 (2010).
 104. Riquelme, D., *et al.* High-frequency field stimulation of primary neurons enhances ryanodine receptor-mediated Ca²⁺ release and generates hydrogen peroxide, which jointly stimulate NF-kappaB activity. *Antioxidants & redox signaling* **14**, 1245-1259 (2011).
 105. Espinosa, A., Garcia, A., Hartel, S., Hidalgo, C. & Jaimovich, E. NADPH oxidase and hydrogen peroxide mediate insulin-induced calcium increase in skeletal muscle cells. *The Journal of biological chemistry* **284**, 2568-2575 (2009).
 106. Malinouski, M., Zhou, Y., Belousov, V.V., Hatfield, D.L. & Gladyshev, V.N. Hydrogen peroxide probes directed to different cellular compartments. *PloS one* **6**, e14564 (2011).
 107. Wu, R.F., Ma, Z., Liu, Z. & Terada, L.S. Nox4-derived H₂O₂ mediates endoplasmic reticulum signaling through local Ras activation. *Molecular and cellular biology* **30**, 3553-3568 (2010).
 108. Jiang, J., *et al.* Are mitochondrial reactive oxygen species required for autophagy? *Biochemical and biophysical research communications* **412**, 55-60 (2011).
 109. Ungvari, Z., *et al.* Resveratrol attenuates mitochondrial oxidative stress in coronary arterial endothelial cells. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* **297**, H1876-1881 (2009).
 110. Costa, A., *et al.* H₂O₂ in plant peroxisomes: an in vivo analysis uncovers a Ca(2+)-dependent scavenging system. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **62**, 760-772 (2010).
 111. Elsner, M., Gehrmann, W. & Lenzen, S. Peroxisome-generated hydrogen peroxide as important mediator of lipotoxicity in insulin-producing cells. *Diabetes* **60**, 200-208 (2011).
 112. Niethammer, P., Grabher, C., Look, A.T. & Mitchison, T.J. A tissue-scale gradient of hydrogen peroxide mediates rapid wound detection in zebrafish. *Nature* **459**, 996-999 (2009).
 113. Love, N.R., *et al.* Amputation-induced reactive oxygen species are required for successful *Xenopus* tadpole tail regeneration. *Nature cell biology* **15**, 222-228 (2013).
 114. Pase, L., *et al.* Neutrophil-delivered myeloperoxidase dampens the hydrogen peroxide burst after tissue wounding in zebrafish. *Current biology : CB* **22**, 1818-1824 (2012).

115. Romagnoli, S., *et al.* Dynamic response of liquid-filled catheter systems for measurement of blood pressure: precision of measurements and reliability of the Pressure Recording Analytical Method with different disposable systems. *Journal of critical care* **26**, 415-422 (2011).
116. Poburko, D., Santo-Domingo, J. & Demaurex, N. Dynamic regulation of the mitochondrial proton gradient during cytosolic calcium elevations. *The Journal of biological chemistry* **286**, 11672-11684 (2011).
117. Santo-Domingo, J. & Demaurex, N. Perspectives on: SGP symposium on mitochondrial physiology and medicine: the renaissance of mitochondrial pH. *The Journal of general physiology* **139**, 415-423 (2012).
118. Dooley, C.T., *et al.* Imaging dynamic redox changes in mammalian cells with green fluorescent protein indicators. *The Journal of biological chemistry* **279**, 22284-22293 (2004).
119. Liu, Z., Celotto, A.M., Romero, G., Wipf, P. & Palladino, M.J. Genetically encoded redox sensor identifies the role of ROS in degenerative and mitochondrial disease pathogenesis. *Neurobiology of disease* **45**, 362-368 (2012).
120. Millecamps, S. & Julien, J.P. Axonal transport deficits and neurodegenerative diseases. *Nature reviews. Neuroscience* **14**, 161-176 (2013).
121. Verburg, J. & Hollenbeck, P.J. Mitochondrial membrane potential in axons increases with local nerve growth factor or semaphorin signaling. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **28**, 8306-8315 (2008).
122. Miller, K.E. & Sheetz, M.P. Axonal mitochondrial transport and potential are correlated. *Journal of cell science* **117**, 2791-2804 (2004).
123. Ma, Q., *et al.* Superoxide flashes: early mitochondrial signals for oxidative stress-induced apoptosis. *The Journal of biological chemistry* **286**, 27573-27581 (2011).
124. Mantel, C., Messina-Graham, S.V. & Broxmeyer, H.E. Superoxide flashes, reactive oxygen species, and the mitochondrial permeability transition pore: potential implications for hematopoietic stem cell function. *Current opinion in hematology* **18**, 208-213 (2011).
125. Wang, W., *et al.* Superoxide flashes in single mitochondria. *Cell* **134**, 279-290 (2008).
126. Wei, L., *et al.* Mitochondrial superoxide flashes: metabolic biomarkers of skeletal muscle activity and disease. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **25**, 3068-3078 (2011).
127. Wang, X., *et al.* Superoxide flashes: elemental events of mitochondrial ROS signaling in the heart. *Journal of molecular and cellular cardiology* **52**, 940-948 (2012).

128. Santo-Domingo, J. & Demaurex, N. Calcium uptake mechanisms of mitochondria. *Biochimica et biophysica acta* **1797**, 907-912 (2010).
129. Hou, T., *et al.* Synergistic triggering of superoxide flashes by mitochondrial Ca²⁺ uniport and basal reactive oxygen species elevation. *The Journal of biological chemistry* **288**, 4602-4612 (2013).
130. Schwarzlander, M., *et al.* Mitochondrial 'flashes': a radical concept rephined. *Trends in cell biology* **22**, 503-508 (2012).
131. Beal, M.F. Aging, energy, and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Annals of neurology* **38**, 357-366 (1995).
132. Bogdanov, M., *et al.* Increased oxidative damage to DNA in ALS patients. *Free radical biology & medicine* **29**, 652-658 (2000).
133. Tohgi, H., *et al.* Increase in oxidized NO products and reduction in oxidized glutathione in cerebrospinal fluid from patients with sporadic form of amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroscience Letters* **260**, 204-206 (1999).
134. Liu, D., Wen, J., Liu, J. & Li, L. The roles of free radicals in amyotrophic lateral sclerosis: reactive oxygen species and elevated oxidation of protein, DNA, and membrane phospholipids. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **13**, 2318-2328 (1999).
135. Borthwick, G.M., Johnson, M.A., Ince, P.G., Shaw, P.J. & Turnbull, D.M. Mitochondrial enzyme activity in amyotrophic lateral sclerosis: implications for the role of mitochondria in neuronal cell death. *Annals of neurology* **46**, 787-790 (1999).
136. Turner, B.J. & Talbot, K. Transgenics, toxicity and therapeutics in rodent models of mutant SOD1-mediated familial ALS. *Progress in neurobiology* **85**, 94-134 (2008).
137. Kong, J. & Xu, Z. Massive mitochondrial degeneration in motor neurons triggers the onset of amyotrophic lateral sclerosis in mice expressing a mutant SOD1. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **18**, 3241-3250 (1998).
138. Wong, P.C., *et al.* An adverse property of a familial ALS-linked SOD1 mutation causes motor neuron disease characterized by vacuolar degeneration of mitochondria. *Neuron* **14**, 1105-1116 (1995).
139. Menzies, F.M., *et al.* Mitochondrial dysfunction in a cell culture model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Brain : a journal of neurology* **125**, 1522-1533 (2002).
140. Carri, M.T., *et al.* Expression of a Cu,Zn superoxide dismutase typical of familial amyotrophic lateral sclerosis induces mitochondrial alteration and increase of cytosolic Ca²⁺ concentration in transfected neuroblastoma SH-SY5Y cells. *FEBS letters* **414**, 365-368 (1997).

141. Siklos, L., *et al.* Ultrastructural evidence for altered calcium in motor nerve terminals in amyotrophic lateral sclerosis. *Annals of neurology* **39**, 203-216 (1996).
142. Fujikawa, M., Kobayashi, K. & Kozawa, T. Direct oxidation of the [2Fe-2S] cluster in SoxR protein by superoxide: distinct differential sensitivity to superoxide-mediated signal transduction. *The Journal of biological chemistry* **287**, 35702-35708 (2012).
143. Gardner, P.R. Superoxide-driven aconitase FE-S center cycling. *Bioscience reports* **17**, 33-42 (1997).
144. Gardner, P.R., Raineri, I., Epstein, L.B. & White, C.W. Superoxide radical and iron modulate aconitase activity in mammalian cells. *The Journal of biological chemistry* **270**, 13399-13405 (1995).
145. Gardner, P.R. & Fridovich, I. Inactivation-reactivation of aconitase in *Escherichia coli*. A sensitive measure of superoxide radical. *The Journal of biological chemistry* **267**, 8757-8763 (1992).
146. Parakh, S., Spencer, D.M., Halloran, M.A., Soo, K.Y. & Atkin, J.D. Redox regulation in amyotrophic lateral sclerosis. *Oxidative medicine and cellular longevity* **2013**, 408681 (2013).
147. Chen, Z.J., Ren, W., Wright, Q.E. & Ai, H.W. Genetically Encoded Fluorescent Probe for the Selective Detection of Peroxynitrite. *Journal of the American Chemical Society* **135**, 14940-14943 (2013).
148. Yoo, S.K., Starnes, T.W., Deng, Q. & Huttenlocher, A. Lyn is a redox sensor that mediates leukocyte wound attraction in vivo. *Nature* **480**, 109-112 (2011).
149. Brookes, P.S., Yoon, Y., Robotham, J.L., Anders, M.W. & Sheu, S.S. Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *American journal of physiology. Cell physiology* **287**, C817-833 (2004).
150. Court, F.A. & Coleman, M.P. Mitochondria as a central sensor for axonal degenerative stimuli. *Trends in neurosciences* **35**, 364-372 (2012).
151. Droge, W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological reviews* **82**, 47-95 (2002).

9. Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
ANG	Angiogenin
BTX	Bungarotoxin
BG	<i>engl.</i> Background (Hintergrund)
Ca ²⁺	Calcium
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
cpYFP	<i>engl.</i> Circularly permuted yellow fluorescent protein (kreisförmig permutiertes gelbes Fluoreszenzprotein)
Cu,ZnSOD	Kupfer-Zink-Superoxiddismutase
ctrl	<i>engl.</i> control (Kontrolle)
DTT	Dithiothreitol
DNA	<i>engl.</i> Desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DRG	<i>engl.</i> Dorsal Root Ganglion (Hinterwurzelganglion)
EAE	<i>engl.</i> Experimental autoimmune encephalomyelitis (Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis)
EMG	Elektromyographie
FALS	Familiäre Form der ALS
GECI	<i>engl.</i> genetically encoded calcium indicators (genetisch kodierte Calcium-Sensoren)
GERI	<i>engl.</i> genetically encoded redox indicators (genetisch kodierte Redox-Sensoren)
GFP	<i>engl.</i> Green fluorescent protein (grünes Fluoreszenzprotein)

GRX	Glutaredoxin
GSH	Glutathion in reduziertem Zustand
GSSG	Glutathion in oxidiertem Zustand
HeLa	menschliche Zellen eines Zervixkarzinoms der Patientin Henrietta Lacks
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
ICN	<i>engl.</i> Intercostal nerve (Interkostalnerv)
K ⁺	Kalium
MELAS	<i>engl.</i> M itochondrial e ncephalomyopathy, l actic a cidosis & s troke-like episodes (Mitochondriale Enzephalomyopathie, Laktatazidose und Schlaganfall-ähnliche Episoden)
MN	Motoneuron
MnSOD	<i>engl.</i> Manganese Superoxide Dismutase
mtDNA	mitochondriale DNA
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	Multiple Sklerose
MTS	Musculus triangularis sterni
n	Anzahl
Na ⁺	Natrium
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NMJ	<i>engl.</i> Neuromuscular junction (neuromuskuläre Endplatte)
NOX	NADPH-Oxidase
NR	<i>engl.</i> Natural Ringer (natürliche Ringer-Lösung)
¹ O ₂	Singulett Sauerstoff

·OH	Hydroxyl-Radikal
O ₂	Sauerstoff
O ₂ ⁻	Superoxid-Anion
O ₃	Ozon
OXPHOS	Oxidative Phosphorylierung
PBS	<i>engl.</i> Phosphate buffered saline (phosphatgepufferte Salzlösung)
PCR	<i>engl.</i> Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PFA	Paraformaldehyd
R	Ratio
ROI	(1) <i>engl.</i> Region of interest (interessierende Region) (2) <i>engl.</i> Reactive oxygen intermediates (reaktive Sauerstoffintermediate)
roGFP	<i>engl.</i> reduction-oxidation sensitive green fluorescent protein (redoxsensitives grünes Fluoreszenzprotein)
RNA	<i>engl.</i> Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
ROS	<i>engl.</i> Reactive oxygen species (reaktive Sauerstoffspezies)
SALS	Sporadische Form der ALS
SD	<i>engl.</i> Standard deviation (Standardabweichung)
S.E.M.	<i>engl.</i> Standard error of the mean (Standardfehler)
SF	<i>engl.</i> Shape Factor
SOD	Superoxiddismutase
SSRI	<i>engl.</i> Selective serotonin reuptake inhibitor (Selektiver Serotonin-Wiederaufnahme-Hemmer)

TARDBP	TAR DNA-Bindungsprotein 43
Thy-1	Thy mozyten Differenzierungs-Antigen 1
YFP	<i>engl.</i> Yellow fluorescent protein (gelbes Fluoreszenzprotein)

10. Danksagung

In erster Linie möchte ich mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. med. Martin Kerschensteiner für die Überlassung des Themas, die hervorragende wissenschaftliche und persönliche Betreuung und Ausbildung während aller Phasen dieser Arbeit sowie die uneingeschränkt inspirative Begleitung und Förderung dieser Arbeit bedanken.

Gleichermaßen danke ich Herrn Prof. Dr. med. Thomas Misgeld vom Institut für Neuronale Zellbiologie (TU, München) für die exzellente wissenschaftliche Betreuung und Ausbildung im Rahmen sämtlicher experimenteller Arbeiten an der TU München.

Herrn Prof. Dr. med. Reinhard Hohlfeld und Prof. Dr. med. Arthur Konnerth danke ich ebenso für die Bereitstellung der optimalen Arbeitsmöglichkeiten und das wissenschaftliche Umfeld am Institut für Klinische Neuroimmunologie (LMU, München) und am Institut für Neuronale Zellbiologie (TU, München).

Ferner möchte ich mich bedanken bei:

Herrn Dr. med. Michael Breckwoldt für die hervorragende wissenschaftliche Zusammenarbeit im Projekt „Multi-parametric optical analysis of mitochondrial redox signals during neuronal physiology and pathology in vivo“;

Herrn PD Dr. Tobias Dick, Leiter der Arbeitsgruppe *Redoxregulation* am Deutschen Krebsforschungszentrum Heidelberg, für die ausgezeichnete wissenschaftliche Kooperation;

Frau Dr. Monika Brill und Herrn Dr. Petar Marinkovic für die Unterstützung beim Erlernen der wissenschaftlichen Methoden;

Herrn Dr. Petar Marinkovic, Frau Geraldine Heitmann und Frau Anja Schmalz für die Durchführung der PCR-Genotypisierungen;

Allen Mitgliedern am Institut für Klinische Neuroimmunologie (LMU, München) sowie des Lehrstuhls für Biomolekulare Sensoren am Institut für Neuronale Zellbiologie (TU, München) für die hilfreichen Ratschläge und die durchwegs positive und stimulierende Arbeitsatmosphäre;

Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern für die stets liebevolle Unterstützung während der gesamten Zeit meines Studiums und meiner Dissertation.