UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Neuroimmunologie und Multiple Sklerose, Zentrum für Molekulare Neurobiologie Hamburg

Direktor: Prof. Dr. med. Manuel Friese

Untersuchungen zum Einfluss des Trpv4-Ionenkanals auf eine entzündungsgebundene Neurodegeneration des ZNS

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

> vorgelegt von: Karsten Heidermann aus Marl

> > Hamburg 2018

Angenommen von der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 27.03.2019

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Manuel Friese

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: PD Dr. Axel Neu

Inhaltsverzeichnis

1	Einl	Einleitung		
	1.1	Erkenntnisse zur Ätiologie der MS	5	
	1.2	Pathophysiologie der MS	6	
	1.2.1	Entzündung	6	
	1.2.2	Neurodegeneration	9	
	1.2.3	Oxidative und mitochondriale Schädigung	13	
	1.3	Peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 α (PGC-1 α)	15	
	1.4	Transient receptor potential cation channel subfamily vanilloid Typ 4 (TRPV	'4) 17	
	1.5	Zielsetzung	21	
2	Mat	erial und Methoden	23	
	2.1	Lösungen und Medien	23	
	2.2	Versuchstiere	23	
	2.3	Genotypisierung	24	
	2.4	Tierexperiment: Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis	26	
	2.5	Neuronale Zellkultur	27	
	2.6	Quantitative <i>Real-Time</i> PCR	29	
	2.7	Immunzytochemie	31	
	2.8	Statistik	32	
3 Ergebnisse				
	3.1	Klinische Untersuchung bei Trpv4-Defizienz im EAE-Mausmodell	33	
	3.1.1	Klinischer Versuchsverlauf der EAE	33	
	3.1.2	Initiales Erkrankungsniveau bei Trpv4-Defizienz	35	
	3.2	<i>In vitro</i> Untersuchungen zur Beeinflussung von <i>Pgc-1</i> α durch Trpv4	37	
	3.2.1	Immunzytochemische Färbung von Trpv4 in kultivierten, hippocampalen Neuronen	37	
	3.2.2	mRNA Expressionsverhalten von <i>Trpv4</i> zu <i>Pgc-1</i> α in Neuronenkultur	39 11	
_	5.2.5			
4	Disł	cussion	43	
	4.1	Die neuronale Trpv4-Expression und ihr Einfluss auf $Pgc-1\alpha$	43	
	4.1.1	Trpv4 Interaktion mit Pgc-1α	46	
	4.2	<i>in vivo</i> Experiment: Einfluss von Trpv4 auf die EAE	50	
5	Zus	ammenfassung	54	
	5.1	Zusammenfassung in englischer Sprache	55	
6	Abk	ürzungsverzeichnis	56	

7	Literaturverzeichnis	60
8	Danksagung	76
9	Lebenslauf	77
10	Eidesstattliche Erklärung	78

1 Einleitung

Die Multiple Sklerose (MS) ist eine entzündliche, demyelinisierende und neurodegenerative Erkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS), bei der erkrankte Personen zentral-neurologische Funktionsverluste jedweder Form erleiden können (Thompson et al. 2018). Etwa 85% aller Patienten erleben, entweder nach einem anfänglich schubförmig remittierenden Verlauf oder primär ab Erkrankungsbeginn (10-15%), eine irreversible Persistenz und Progression ihrer Ausfälle (Browne et al. 2014). Weltweit ist die MS die häufigste, atraumatische Ursache für neuronale Behinderungen bei jungen Erwachsenen (Browne et al. 2014). Die Lebenserwartung erkrankter Personen ist geringfügig reduziert (Goodin et al. 2012; Dippel et al. 2015). Die MS ist bisher nicht heilbar und macht eine lebenslange, immunmodulatorische Therapie nötig, die den eigentlichen Erkrankungsverlauf und die Akkumulation neuronaler Schäden aber nicht aufhalten kann (Ontaneda et al. 2017). Neuroprotektive oder reparative Medikamente sind nicht vorhanden. So führt die MS zu einer enormen, individuellen Bürde. Die Gesamtheit der Erkrankungen stellt aber auch der Gesellschaft eine herausfordernde Aufgabe. In Deutschland sind derzeitig etwa 230.000 Personen bei steigender Prävalenz erkrankt (Petersen et al. 2014; Holstiege et al. 2017). Die Behandlung ist kostenintensiv und es kommt häufig zu einer frühzeitigen Berentung oder gar Pflegebedürftigkeit, was zusätzliche hohe, indirekte Krankheitskosten hervorruft (Flachenecker et al. 2017).

1.1 Erkenntnisse zur Ätiologie der MS

Die MS-Ätiologie ist derzeitig nur unvollständig verstanden. Es konnten bisher genetische Variationen (Beecham et al. 2013), sowie exogene Umwelteinflüsse identifiziert werden (Ramagopalan et al. 2010), die Assoziationen mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko zeigen. Die bisher identifizierten, genetischen Risiken betreffen dabei fast ausschließlich das Immunsystem (Sawcer et al. 2007; Sawcer et al. 2011; Beecham et al. 2013) und zeigen nur geringe Überschneidungen mit anderen klassisch neurodegenerativen Erkrankungen (Lambert et al. 2013). Allerdings konnte bisher nur für eine kleine Anzahl an so identifizierten

Genvarianten ein pathophysiologischer Zusammenhang erbracht werden (Dendrou et al. 2015). Zusammenfassend scheinen viele dieser Faktoren die Immuntoleranz gegenüber körpereigenen Antigenen zu beeinflussen und das Repertoire sowie die Funktion von T-Lymphozyten zu verändern, was die Empfänglichkeit für ein ZNS gerichtetes, autoreaktives Verhalten erhöht (Friese et al. 2008; Lundström et al. 2013; Dendrou et al. 2015). Zudem liegt die Konkordanzrate von eineiigen Zwillingen für eine MS-Erkrankung bei nur circa 15-25% (Ramagopalan et al. 2008; Hemmer et al. 2015) und bisher detektierte, genetische Risikovarianten können nur etwa 30% des Gesamterkrankungsrisiko erklären (Beecham et al. 2013). Epidemiologische Studien identifizierten zusätzlich zur genetischen Prägung, risikosteigernde Umweltfaktoren, denn das Immunsystem wird überwiegend durch nicht erbliche, exogene Einflüsse geprägt (Brodin et al. 2015). Eine hohe Bandbreite unterschiedlicher exogener Risikofaktoren (Ramagopalan et al. 2010), sowie zugehörige Mechanismen (Münz et al. 2009; Harkiolaki et al. 2009), sind beschrieben. In einer systematischen Übersichtsbewertung (Belbasis et al. 2015), zeigten aber von den insgesamt beschriebenen Faktoren, das Zigarettenrauchen und eine stattgehabte Epstein-Barr-Virus Infektion die stichhaltigste, da über kritische Meta-Analysen hinweg vorhandene, Assoziation mit einen erhöhten Erkrankungsrisiko. Zusammenfassend deutet also Vieles darauf hin, dass sich das MS-Erkrankungsrisiko aus einer Wechselwirkung zwischen genetischer Prädisposition des Immunsystems und exogenen Umwelteinflüssen, die auf dieses einwirken, entwickelt.

1.2 Pathophysiologie der MS

1.2.1 Entzündung

In der MS-Pathophysiologie haben neben der immunologisch-geprägten Entzündung, die in den bisherigen ätiologischen Erkenntnissen große Bedeutung findet, neurodegenerative Prozesse eine eminente Bedeutung (Friese et al. 2014). Ab Erstbeschreibung wurde die MS histopathologisch als eine primär infiltrierende und demyelinisierende Entzündung wahrgenommen (Lassmann 2018). Vermehrt entstand aber ein Bewusstsein, dass diese Wahrnehmung den Facettenreichtum der Erkrankung nicht abbilden kann, da antientzündliche Medikamente nur leidlichen Langzeiterfolg brachten und unabhängig von unmittelbaren Entzündungsvorgängen, neurodegenerative Prozesse nachgewiesen wurden (Compston & Coles 2008; Stys et al. 2012; Ontaneda et al. 2017). So ist derzeitig davon auszugehen, dass durchgängig eine komplexe Wechselwirkung zwischen Entzündung und Neurodegeneration besteht, sich aber die Ausprägung beider Prozesse grundlegend über den Verlauf verändert (Mahad et al. 2015). Vereinfacht ausgedrückt, scheint zu Erkrankungsbeginn dabei die Entzündung und im späteren Verlauf die Neurodegeneration zu dominieren. Die Gründe für die Verlaufsveränderung sind noch unvollständig verstanden. Auch wenn beide Prozesse nicht vollständig voneinander getrennt zu betrachten sind, werden zum Verständnis im Weiteren zunächst die Erkenntnisse zu den entzündlichen, immunologischen Abläufen in einem Überblick beschrieben und anschließend die Veränderung des Entzündungsprozesses herausgearbeitet. Anknüpfungspunkte an den neurodegenerativen Prozess werden dabei stets aufgezeigt, aber umfassend in den darauffolgenden Kapiteln beleuchtet.

Ausgehend von den ersten, histologischen Beobachtungen entwickelte sich das Konzept einer aus der Peripherie ins ZNS infiltrierenden und T-lymphozytär getragenen Entzündung (Hauser et al. 1986). Maßgeblich wurde diese Auffassung mitgeprägt durch die Verwendung von Tiermodellen der experimentellen, autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) (Baxter 2007). Je nach Induktionsart, EAE-Unterformen unterschieden können mehrere werden. welche unterschiedliche Limitationen in der Abbildung der humanen MS-Pathogenese aufweisen (Friese et al. 2006; Schuh et al. 2014). Dennoch waren Arbeiten mit der EAE wichtige Grundlage derzeitig zugelassener Therapeutika (Friese et al. 2006; Wiendl & Hohlfeld 2009). Wird mit einem Peptid des Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG_{35-55}) immunisiert. entsteht eine demyelinisierende Enzephalomyelitis (Stromnes & Goverman 2006). Hierbei infiltrieren, durch die Immunisierung autoaggressiv gewordene, Lymphozyten vornehmlich des cluster of differentiation 4 (CD4⁺) das ZNS (Zamvil & Steinman 1990). Dies ist derzeitig, die noch am häufigsten verwandte EAE-Methode (Schuh et al. 2014).

Auch in der MS kommt es zu einer ins ZNS infiltrierenden Entzündung (Hauser et al. 1986). Unter Zusammenbruch der Bluthirnschranke (BHS) (Hochmeister et al. 2006), bilden sich demyelinisierende Läsionen an multiplen ZNS-Foci, die mit

Immunzellen durchsetzt sind (Lucchinetti et al. 2000). Bei genauer Betrachtung wird die initiale aktive Schädigung durch Phagozyten geprägt (Barnett & Prineas 2004; Marik et al. 2007; Henderson et al. 2009), es treten hierbei ZNSortsständige Mikroglia, sowie infiltrierende Monozyten auf (Zrzavy et al. 2017). Hinweise bestehen, dass insbesondere die Mikroglia an der sehr frühen Schädigungsinitierung beteiligt sein könnten (Barnett & Prineas 2004; Giannetti et al. 2015; Zrzavy et al. 2017). Die anfänglich nur geringe Zahl an Lymphozyten, steigert sich mit fortschreitender Läsionsformation massiv (Henderson et al. 2009). Besonders CD8⁺ T-Zellen dringen in das Gewebe ein und bilden von da an den dominierenden Immunzelltypus (Frischer et al. 2009). Die akute Entzündung führt zu heftigen Schädigungen und kann direkte, axonale Transsektionen auslösen (Kornek et al. 2000). Im variablen Ausmaß überleben aber die Axone. Eine Kompensation des Myelinverlusts durch Remyelinisierung tritt ein (Prineas et al. 1993; Lassmann et al. 1997), ist aber häufig unvollständig (Duncan et al. 2017) und so formt sich reaktiv eine astrozytär herbeigeführte, sklerotische Narbe (Popescu & Lucchinetti 2012). CD4⁺ T-Zellen, B-Zellen, Plasmazellen (Frischer et al. 2009) und dendritische Zellen (Serafini et al. 2006) sind ebenfalls am Entzündungsprozess beteiligt, aber in geringerer Zahl, was ihre Relevanz für die komplexe Immunreaktion nicht mindert (Hauser et al. 2008). Sie treten betont an den Grenzen des Hirnparenchyms auf (Frischer et al. 2009) und können hier zur Entzündungschronifizierung beitragen (Magliozzi et al. 2006; Howell et al. 2011). Neben der zellulären Immunreaktion, ist eine Beteiligung löslicher, immunologisch wirksamer Faktoren hoch wahrscheinlich (Friese 2016; Lassmann 2018; Elliott et al. 2012; Vidaurre et al. 2014; Blauth et al. 2015). Vergleichsweise wenig verstanden ist die Bedeutung der ebenfalls immunkompetenten Astrozyten, die aufgrund ihrer Barrierefunktion entlang der BHS auch für die periphere Immunzellinfiltration entscheidend sind (Sofroniew 2015). Außerdem können sie zu einer chronischen ZNS-Entzündung beitragen (Mayo et al. 2014), aber ebenso reparativ wirken und Schäden kompensieren (Anderson et al. 2016).

Bezeichnend für die entzündliche Verlaufsveränderung, sind die Loslösung aus einem lokalisierten läsionären Auftreten (Frischer et al. 2015) sowie einem Chronifizierungsprozess unter Zunahme der ZNS-ortsständigen Immunreaktion (Kutzelnigg et al. 2005; Frischer et al. 2009). Generell unterscheiden sich Läsionen nach Lokalisierung, Aktivität und Schädigungsmuster (Popescu & Lucchinetti 2012). Im Verlauf werden die akut-aktiven Läsionen selten und langsam-aktive bis inaktive Läsionen, als Endstadium einer ehemals aktiven Läsion, treten vermehrt auf (Frischer et al. 2015). Es verringert sich also die heftige, aber lokal begrenzte Schädigung. Die gesamte Pathologie tritt folglich insgesamt globaler, diffuser (Kutzelnigg et al. 2005) und teilweise sogar milder (Frischer et al. 2009) auf. Dennoch ist eine kontinuierlich fortschreitende Neurodegeneration (De Stefano et al. 2010; Kuhle et al. 2011) und eine Akkumulation neurodegenerativer Schäden festzustellen, so dass Hirnsubstanzverluste zu diesen Zeitpunkt sehr deutlich sichtbar werden (Fisher et al. 2008; Tallantyre et al. 2010). Die Chronifizierung des entzündlichen Geschehens lässt sich hierneben, in einem Teil der Patienten, durch ein Auftreten von meningealen Immunzellaggregaten erkennen (Magliozzi et al. 2006; Androdias et al. 2010; Howell et al. 2011). Diese zeigen Charakteristika eines tertiär lymphoiden Gewebes (Pikor et al. 2015), was sich typischerweise bei chronischen Entzündungen, auch in anderen Organsystemen, entwickelt (Buckley et al. 2015). Fulminantere Verläufe bei Auftreten solcher Aggregate wurden beschrieben (Magliozzi et al. 2006; Androdias et al. 2010). Klinisch treten zumeist in diesen späten Verlaufszeitpunkten, bleibende neurologische Behinderungen auf (Scalfari et al. 2014). Als Zusammenfassung der dargelegten Abläufe, wird angenommen, dass die chronifizierte, vermehrt ZNS-ortsständige und global verteilte Entzündung, aber auch die Akkumulationen einzelner neuronaler Schäden über die Zeit, gemeinsam das ZNS-Milieu fortwährend derangieren, so dass Kompensationsmechanismen überfordert werden (Compston & Coles 2008; Dendrou et al. 2015). Weshalb die neurodegenerativen Prozesse einen klareren Bezug zu den bleibenden, neurologischen Ausfällen haben, wird im folgenden Kapitel beschrieben.

1.2.2 Neurodegeneration

Da ein ZNS-Gewebe, wenn es einmal zerstört ist, generell nicht regeneriert werden kann, ist die Schlussfolgerung, dass die ablaufende Neurodegeneration in der MS, die Hauptursache für die Langzeitbehinderung ist, konzeptionell naheliegend. Diese Vorstellung, wird auch durch Studien gestützt. *Post mortem* (p.m.) durchgeführte Histologien von schwer behinderten MS-Patienten zeigen massivste neuronale Verluste, die mit dem Behinderungsausmaß korrelierten

(Bjartmar et al. 2000; Tallantyre et al. 2010). In vivo ist die Abbildung der Neurodegeneration schwieriger, hier gilt die Zunahme der Hirnatrophie als Parameter für diesen Prozess (Miller et al. 2002; Barkhof et al. 2009). Sie tritt ab Erkrankungsbeginn kontinuierlich auf (De Stefano et al. 2003; Fisher et al. 2008; De Stefano et al. 2010) und umfassende Korrelationen zwischen dieser Atrophiezunahme und dem klinischem Behinderungsgrad bestehen (De Stefano et al. 2003; Chen et al. 2004; Fisniku et al. 2008; Fisher et al. 2008; Bonati et al. 2011; Hasan et al. 2011; Filippi et al. 2013; Schlaeger et al. 2014). Solche deutlichen Zusammenhänge konnten nicht für die entzündlichen Prozesse gefunden werden (Chard et al. 2003; Scalfari et al. 2014). So hat die Anzahl der entzündlichen Schübe keinen Einfluss auf die Langzeitbehinderung (Scalfari et al. 2014), wie auch die bisher verfügbaren anti-entzündlichen Therapeutika nur minimale beziehungsweise (bzw.) noch unklare Auswirkungen auf diese haben (Shirani et al. 2012; Haghikia et al. 2013; Ontaneda et al. 2017). Auch die erstmalig erzielte Reduktion der Behinderungsprogression bei primär progressiv Erkrankten durch Ocrelizumab (Montalban et al. 2017), scheint insbesondere dadurch erklärt (Calabresi 2018), dass entzündlich aktive Verläufe jüngerer und kürzer erkrankter Patienten abgemildert werden, wohingegen die restliche Versuchskohorte wenig profitierte. Obwohl sich also, wie in Kapitel 1.2.1 dargelegt, Entzündung und Neurodegeneration stets wechselseitig beeinflussen, scheint der neurodegenerative Prozess den Entzündlichen, in der Bedeutung für die letztliche Kausalität der klinischen Behinderung zu übertreffen. Da derzeitig keine neuroprotektiven oder reparativen Therapeutika vorhanden sind (Ontaneda et al. 2017), besteht dementsprechend ein hoher Bedarf, die Mechanismen der Neurodegeneration weiter zu untersuchen. Mit vorliegender Arbeit werden hierhingehende Versuche unternommen. Um die aufgestellten Arbeitshypothesen nachzuvollziehen, wird hierauf hinleitend das Auftreten der Neurodegeneration und ihre bereits bekannten Pathomechanismen im Folgenden dargelegt.

Die Neurodegeneration betrifft Axone, Synapsen sowie Somata (Popescu & Lucchinetti 2012; Jürgens et al. 2016). Alle ZNS Bereiche können potentiell betroffen sein (Bjartmar et al. 2000; Peterson et al. 2001; Hasan et al. 2011; Schlaeger et al. 2014), auch scheinbar normal erscheinendes Parenchym (Jürgens et al. 2016), die sogenannte *normal-appearing white matter* bzw. *grey matter* (NAWM bzw NAGM). Dabei übertrifft der axonale und synaptische

Untergang den der Zellsomata (Bjartmar et al. 2003; Magliozzi et al. 2010; Jürgens et al. 2016). Neurodegenerative Prozesse sind ab Erkrankungsbeginn vorhanden (De Stefano et al. 2003; Filippi et al. 2003; Calabrese & Gallo 2009; Lucchinetti et al. 2011; Jürgens et al. 2016; Oberwahrenbrock et al. 2013) und teilweise bereits vor klinischer Manifestation nachweisbar (Rojas et al. 2015; Knier et al. 2016). Wiederholend sei erwähnt, dass neurodegnerative Schäden akkumulieren und über den Verlauf umfangreiche Atrophien sichtbar werden (Fisher et al. 2008; Tallantyre et al. 2010). Allgemein sind Bereiche mit Energiemangel, aufgrund der relativen passagerem Minderperfusion, Prädilektionsstellen für Läsionen und der darin stattfindenden Neurodegeneration (Holland et al. 2012; Haider et al. 2016). Dabei erscheint die initiale Schädigungslokalisation zufällig, eine mögliche Regeneration aber an die relative Minderperfusion geknüpft zu sein (Haider et al. 2016).

Diese Intoleranz gegenüber passageren Energieschwankungen steht im Einklang mit identifizierten, neurodegenerativen Pathomechanismen, von denen viele in der Beeinträchtigung des neuronalen Energiehaushalts münden (Campbell & Mahad 2018). Ein weiterer Endpunkt der Mechanismen ist eine toxisch gesteigerte, intraneuronale Kalzium(Ca²⁺)-Konzentration (Friese et al. 2014). Insgesamt sind bisher mehrere Pathomechanismen beschrieben. Über sie wird folgend ein Überblick gegeben. Als häufige Folge der primären Demyelinisierung, die in der weißen wie auch grauen Substanz (WM bzw. GM) auftritt (Lucchinetti et al. 2011), kommt es zu direkten axonalen Transsektionen (Trapp et al. 1998). Die Durchtrennung eines Axons, kann zu einer fortgeleiteten Degeneration des restlichen Axons (Evangelou et al. 2000; Ciccarelli et al. 2003) bis hin zum Soma (Haider et al. 2016), und damit zu Substanzverlusten in entfernten, nicht direkt beteiligten aber axonal verbundenen Hirnarealen führen (Dziedzic et al. 2010; Kolasinski et al. 2012). Dieser Prozess wird als Wallersche Degeneration bezeichnet (Chitnis et al. 2007; Dziedzic et al. 2010). Innerhalb der demyelinisierenden Läsionen sind apoptotische Zellen zahlreich (Peterson et al. 2001; Barnett & Prineas 2004). Ein Vorgang, der letztlich auch eine gemeinsame Endstrecke der folgend aufgeführten, neurodegenerativen Mechanismen bildet (Offen et al. 2000; Aktas et al. 2005). Trotz Demyelinisierung überleben die Neurone in großer Zahl und verbleiben chronisch demyelinisiert (Popescu et al. 2011). Ohne die schützende Myelinhülle wirken toxische Metabolite der

entzündlichen Umgebung sowie Neurotransmitter unmittelbarer und aufgrund des herabgesetzten glialen Abbaus (Srinivasan et al. 2005) verlängert auf die Neurone ein (Trapp & Stys 2009). Hieraus kann sich eine Überaktivierung von Rezeptoren ergeben, was zu toxischen intrazellulären Kaskaden führt, die oftmals in einer deutlich erhöhten intrazellulärem Ca²⁺-Konzentration münden (Ouardouz, Coderre, Basak, et al. 2009; Ouardouz, Coderre, Zamponi, et al. 2009). Klassisches Beispiel hierfür ist die exzitotoxische Glutamatwirkung (Lipton & Rosenberg 1994; Stirling & Stys 2010).

Ganz generell fehlt nach der Demyelinisierung die trophische und strukturelle Unterstützung der Oligodendrozyten (Fünfschilling et al. 2012; Y. Lee et al. 2012). Ein entscheidender Verlust stellt dabei die energiesparende, saltatorische Reizleitung entlang des Axons dar, welche vermutlich kompensatorisch durch eine kontinuierliche Reizleitung ersetzt wird (Foster et al. 1980; Moll et al. 1991; Waxman 2006). Hierbei kommt es zu einer Redistribution unterschiedlicher Ionenkanäle entlang des Axons (Friese et al. 2014), was zwar anfänglich die neuro-axonale Integrität erhält, aber eine Vielzahl an schädigenden Prozessen Die Ionenkanäle führen zu einem hohen Kationeninflux, initiiert. der energieaufwendig ausgeglichen werden muss (Trapp & Stys 2009; Paling et al. 2013). Das hierfür hauptverantwortliche Enzym, die Na⁺/K⁺-ATPase, teils selbst geschädigt (Young et al. 2008), kann aufgrund der gestiegenen Anforderung und des mitochondrialen Schadens (siehe Kap. 1.2.3) nicht mehr ausreichend mit Energie versorgt werden. Folglich kann das elektrische Äquilibrium brechen und mit ihm die neuronale Funktion verloren gehen (Trapp & Stys 2009). Insgesamt werden eine Reihe von Ionenkanälen redistributiert (Craner, Newcombe, et al. 2004; Kornek et al. 2001; Gadjanski et al. 2009; Friese et al. 2007; Vergo et al. 2011; Schattling et al. 2012). Auch ein verwandter, des in der vorliegenden Arbeit untersuchten Ionenkanals (siehe Kapitel 1.4; TRPV4), der transient receptor potential cation channel subfamily melastatin Typ 4 (TRPM4), wird umverteilt (Schattling et al. 2012). Im Rahmen des Redistributionsprozesses, kann das Axon teils durch spezifische Mechanismen der jeweiligen Kanäle geschädigt werden (Schattling et al. 2012). Gemein haben viele der umverteilten Kanäle, dass sie zu erhöhten, intrazellulären Ca²⁺-Konzentrationen führen (Friese et al. 2014). Zusammengefasst wird dies entweder direkt, durch mitunter vorhandene Ca2+-Permeabilität (Kornek et al. 2001; Gadjanski et al. 2009), oder indirekt ausgelöst (Waxman 2006). Eindrücklich verdeutlicht eine solch indirekte Steigerung, die Lokalisierung redistributierter Na⁺-Kanäle mit dem Na⁺/Ca²⁺-Austauscher (NCX) et al. 2004; Craner, Newcombe, et al. 2004). (Craner, Hains, Die redistributionsbedingte, erhöhte Na⁺ Konzentration im Axon führt dann vermutlich konsekutiv zu einer Richtungsänderung des NCX und erhöht so die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration. Der Ca²⁺-Konzentrationsanstieg bildet die Endstrecke der dysfunktionalen lonenkanalveränderungen (Friese et al. 2014) und es ist einer der schädlichsten, intraneuronalen Zustände überhaupt (Mattson 2007). Nachhaltig erhöhte Ca2+-Konzentrationen lösen zahlreiche degenerative Prozesse aus, wie die Aktivitätssteigerung degradierender Enzyme, Untergang von Transportfilamenten und ein Versagen der mitochondrial lokalisierten, oxidativen Phosphorylierung (OXPHOS) in der Atmungskette (Mattson 2007; Stirling & Stys 2010). Insgesamt entwickelt sich also eine Dysfunktionalität der neuronalen Ionenkanäle. Sie führt zusammenfassend zu toxischen Ca²⁺-Konzentration und einem derangierten Verhältnis aus Energiebedarf und Energieangebot (Trapp & Stys 2009; Friese et al. 2014). Die Energiedefizienz ist so stark ausgeprägt, dass Vergleiche zu einer histotoxischen Hypoxie gezogen wurden (Trapp & Stys 2009; Haider et al. 2016). Dies drückt den prekären Zustand des Energiehaushalts im MS Gewebe aus. Das aber der Mangel insgesamt so hoch ist, liegt, neben dem gestiegenen Bedarf, auch an parallel stattfindenden Schädigungen der energieproduzierenden Mitochondrien, welche sich besonders durch ein starkes Auftreten oxidativer Substanzen im MS-Gewebe ereignen (Campbell & Mahad 2018). Mitochondriale Schäden sind dabei umso entscheidender, da sie selbst die oxidative Belastung weiter amplifizieren (Lassmann & van Horssen 2016).

1.2.3 Oxidative und mitochondriale Schädigung

Im MS-Gewebe ist die oxidative Belastung insgesamt stärker ausgeprägt, als bei anderen vergleichbaren ZNS-Entzündungen (Fischer et al. 2013). Zu Beginn setzen vorwiegend Immunzellen oxidativ reaktive Substanzen, wie etwa reaktive Sauerstoffspezies (ROS), frei (Fischer et al. 2012). Die hoch reaktiven Moleküle oxidieren Proteine, Lipide und Gene, und zerstören so physiologische Funktionen, was teils zur unmittelbaren Apoptose führt (Haider et al. 2011; Fischer et al. 2013). Auch wenn chronisch aktive Immunzellen weiter die oxidative Belastung fördern, amplifizieren im späteren Verlauf zunehmend hinzutretende Faktoren, den oxidativen Stress (Mahad et al. 2015). Im Besonderen sind dies die ZNS-Eisenakkumulation und die mitochondriale Schädigung (Lassmann & van Horssen 2016). Generell akkumuliert mit dem Alterungsprozess Eisen im ZNS (Stephenson et al. 2014). Bei der MS wird dann, aus untergehenden Zellen gespeichertes Eisen in hochreaktiver, divalenter Form extrazellulär freigesetzt, woraufhin unmittelbar oxidative Radikale entstehen (Hametner et al. 2013). Da insbesondere Oligodendrozyten Eisen speichern, potenzieren Demyelinisierung und die Alterung des Patienten, gemeinsam die oxidative Belastung (Hametner et al. 2013; Haider et al. 2014; Mahad et al. 2015). Ebenso schädliche Synergien weist die Beeinträchtigung der Mitochondrien auf. Bereits sehr früh und in der EAE als erste Schädigung überhaupt, können Mitochondrien strukturelle Schäden durch oxidativen Stress erleiden (Qi et al. 2006; Nikić et al. 2011). Besonders die Atmungskette, der Produktionsort des Adenosintriphosphats (ATP) wird geschädigt und zeigt daraufhin nur noch eine sogenannte respiratorisch, defizitäre Aktivität (Mahad et al. 2008; Mahad et al. 2009). Aber auch indirekte Schäden bedingen die Aktivitätsminderung. Nukleäre, mitochondriale Gene werden reduziert exprimiert (Dutta et al. 2006), weshalb Komplexe der Atmungskette (Broadwater et al. 2011) und zentrale mitochondriale Transkriptionsfaktoren bzw. Co-Aktivatoren reduziert gebildet werden (Witte et al. 2013). Außerdem mutiert die mitochondriale DNA (mtDNA) der Neurone (Lu et al. 2000). Sie besitzt aufgrund ihres prokaryotischen Ursprungs keine schützenden Histone, und ist somit anfällig für Oxidation (Witte et al. 2014). Da der axonale Transport von Mitochondrien ebenfalls umfassend beeinträchtigt wird, können vorgeschädigte Mitochondrien nicht ausreichend durch Gesunde aufgefrischt werden (Kim et al. 2010; Sorbara et al. 2014). Zusätzlich werden aber vor dem Hintergrund des gestiegenen Energiebedarfs bei axonaler Ionenkanaldysfunktion, Mitochondrien reaktiv in die, häufig noch entzündlich aktiven und damit oxidativ-belasteten, Läsionsareale verlagert (Mahad et al. 2015). Schon unter physiologischen Bedingungen setzen Mitochondrien als OXPHOS-Nebenprodukt reaktive Substanzen frei (Wallace et al. 2010). Treten Schäden an der Atmungskette auf, potenziert sich diese Freisetzung um ein Vielfaches (Murphy 2009), daher entsteht durch die Translokation ein circulus aus ROS-induzierter Schädigung und Freisetzung (Mahad et al. 2015). Mehr noch, einmal eingetretene Mutationen der mtDNA bleiben bestehen und expandieren innerhalb eines Neurons (Campbell et al.

2010). Über Dekaden hinweg entwickelt sich so eine mehrheitlich vorgeschädigte, respiratorisch defizitäre Mitochondrienpopulation. All diese direkten und indirekten Schädigungen in der MS reduzieren die Funktionalität der Mitochondrien massiv. In der progressiven Erkrankungsphase ist dies vermutlich eine Hauptursache des neuronalen Untergangs (Campbell & Mahad 2018). Noch einmal zusammengefasst kann festgehalten werden: Die oxidative Schädigung tritt in den frühen Läsionen, aber auch im progressiven Erkrankungsverlauf auf. Sie ist eng verwoben mit der mitochondrialen Schädigung, welche sich fortschreitend ansammelt und einen Energiemangel verursacht. Betrachtet man die Eigenart von Neuronen, so fällt auf, dass diese aber grade gegenüber zwei Zuständen sehr anfällig sind: 1. Energiemangel und 2. oxidativem Stress. Erstes kann das elektrische Äquilibrium und die synaptische Transmission versagen lassen (Howarth et al. 2012). Letzteres ist so prekär, weil Neurone nur begrenzte antioxidative Kapazitäten ausbilden (Lassmann & van Horssen 2016). Könnte man also durch eine pharmakologische Intervention auf beide Zustände einwirken, ist denkbar, dass dies einen positiven Einfluss auf die entzündungsgebundene Neurodegeneration der MS nehmen könnte. Versuche, welche die mitochondriale Biogenese in MS oder EAE stärken, sind derzeitig noch nicht vorhanden (Ontaneda et al. 2017). Antioxidative Bestrebungen gestalteten sich schwierig und konnten bei Versuchserfolgen nie sicher auf intraneuronale, antioxidative Wirkungen zurückgeführt werden, da stets immunmodulatorische Nebeneffekte auftraten bzw. nicht ausgeschlossen werden konnten (Chora et al. 2007; Johnson et al. 2010; Linker et al. 2011; Friese et al. 2014).

1.3 Peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 α (PGC-1 α)

Das Mitochondrium besitzt seine eigene mtDNA, welche aber nur für einen Bruchteil mitochondrialer Proteine kodiert (Scarpulla 2008). Die mtDNA-Expression wird darüber hinaus durch nukleär kodierte Polymerasen und Transkriptionsfaktoren bewerkstelligt. Um also funktionierende Mitochondrien zu bilden, besteht ein zwingender Bedarf, sowohl nukleär-gerichtete als auch mtDNAbindende Transkriptionsfaktoren aufeinander abzustimmen. Bei dieser Koordination der nukleo-mitochondrialen Transkription (Scarpulla 2008) sind Transkriptions-Coaktivatoren der peroxisome proliferator-activated receptor γ *coactivator*-1 (PGC-1) Familie, welche aus PGC-1 α , PGC-1 β und PRC besteht, elementar (Lin et al. 2005). Sie steigern die Aktivität von multiplen, nukleären und mtDNA gerichteten Transkriptionsfaktoren, welche wiederum die Bildung unzähliger Proteine, der mitochondrialen Biogenese und antioxidativen Abwehr kontrollieren. So regulieren PGC-1 Proteine indirekt, aber entscheidend, ein komplexes Netzwerk der respiratiorischen Zellfunktion. Als erster Subtyp wurde PGC-1 α von Puigsever et al. 1998 identifiziert und ist derzeitig der am umfassendsten untersuchte Typus (Puigserver et al. 1998; Hasegawa et al. 2016). In nicht neuronalen Zellen wird seine Expression sehr divers durch posttranslationale und transkriptionelle Regulation gesteuert (Lin et al. 2005). Über die genaue neuronale Regulation ist aber aktuell noch wenig bekannt (Hasegawa et al. 2016). Seine genetische Depletion bedingt neurodegenerative Symptome (Lin et al. 2004) und über die letzte Dekade wuchs die Zahl an Assoziationen, die PGC-1 α in Verbindung mit dem neurodegenerativen Erkrankungsspektrum brachten (Cui et al. 2006; St-Pierre et al. 2006; Shin et al. 2011; Ryan et al. 2013; Lv et al. 2018). Interessanterweise wurden auch erste Studien im Kontext der MS unternommen (Witte et al. 2013; Nijland et al. 2014). Im Kortex wird PGC-1 α am stärksten innerhalb von Pyramidalneuronen der Layer II-VI ausgebildet (Witte et al. 2013). Hierbei zeigt sich in der NAGM von MS-Patienten mit progressiven Verläufen eine, im Vergleich zur Kontrollgruppe, reduzierte PGC-1 α Expression, welche zeitgleich mit dem dort vorhandenen Neuronenverlust korreliert (Witte et al. 2013). Die Ursache für die Expressionsminderung ist ungeklärt. In der WM wird PGC-1 α nur schwach intraaxonal exprimiert und zeigt eine vorwiegend gliale Expression, welche sich innerhalb akuter Läsionen noch weiter steigert (Nijland et al. 2014). In vitro Versuche ließen bei Nijland et al. erste Vermutungen zu, dass eine astrozytäre Pgc-1 α Überexpression, protektiv für umgebende Zellen sein könnte.

An vielen Stellen zeigt PGC-1 α also Anknüpfungspunkte zur MS-Pathogenese. Für andere neurodegenerative Erkrankungen wurde seine Relevanz bereits aufgezeigt. Seine Integration und herausragende Stellung im regulatorischen Netzwerk der mitochondrialen und respiratorischen Genexpression, machen es aber schwer PGC-1 α selbst zu beeinflussen. Interessanterweise gelang Ye et al. 2012 im Fettgewebe aber genau dies. Sie zeigten, dass ein Ionenkanal, der transient receptor potential cation channel subfamily vanilloid Typ 4 (TRPV4), Pgc-1 α negativ reguliert und dass Trpv4 hierbei pharmakologisch beeinflussbar ist (Ye et al. 2012).

1.4 Transient receptor potential cation channel subfamily vanilloid Typ 4 (TRPV4)

TRPV4 ist ein nicht-selektiver Kationenkanal, der zunehmend als polymodaler, ionotroper Rezeptor wahrgenommen wird (Kumar et al. 2018). Er gehört zu den transient receptor potential (TRP) Kationenkanälen, einer Gruppe von ubiquitär exprimierten Ionenkanälen, die vorrangig für ihre Transduktion sensorischer Reize bekannt sind (Damann et al. 2008; Talavera et al. 2008) und auch an pathologischen ZNS Prozessen beteiligt sind (Morelli et al. 2013). Für den Vertreter Melastatin-Typ 4 (TRPM4) wurde, wie in Kapitel 1.2.2 aufgeführt, ein unmittelbarer Beitrag zur MS-Neurodegeneration beschrieben (Schattling et al. 2012). TRPV4 folgt dem typischen Aufbau der TRP-Kanäle (Shigematsu et al. 2010). So tetramerisiert er aus vier Monomeren zu einem funktionellen Ionenkanal. Jedes Monomer ist dabei aus sechs Transmembran- α -Helices zusammengesetzt, sowie einem NH2- und COOH-Terminus. Die Erstbeschreibung erfolgte im Jahr 2000, damals noch unter anderem Namen (Liedtke et al. 2000). Das humane TRPV4-Gen wird an Stelle 12q24.1 kodiert (Delany et al. 2001). Von zwei funktionalen Splicevarianten (TRPV4 A und TRPV4 D) wird TRPV4 A als die kanonische Isoform angesehen (Vázquez & Valverde 2006) und in dieser Arbeit durchgängig mit der Abkürzung TRPV4 betitelt. TRPV4 kann durch ein breites Spektrum chemischer (endogene, synthetische und pflanzliche Liganden) aber physikalischer Stimuli (mechanische, osmotische, auch pH-Wert und temperaturabhängige Reize) aktiviert werden (Garcia-Elias et al. 2014). Kommt es zu einer Aktivierung, stellt sich unter physiologischen Bedingungen ein transienter Influx an Ca²⁺-Ionen ein (Watanabe et al. 2003; Kumar et al. 2018). Es bestehen bereits agonistisch und antagonistisch wirkende pharmakologische Substanzen, die sich derzeitig aber noch im präklinischen Stadium befinden (Thorneloe et al. 2008; Thorneloe et al. 2012). TRPV4 wird umfassend im menschlichen Körper ausgebildet und zeigt dabei eine sehr variable zelluläre Expression, mit teils sogar subzellulären Unterschieden (Shibasaki et al. 2015). Aufgrund dieser

Expressionseigenschaft ist die letztlich physiologische Funktion sehr unterschiedlich und jeweils abhängig vom zellulären Umfeld. Im Folgenden wird insbesondere die Funktion und die Beteiligung an pathologischen Prozessen im Nervensystem dargestellt, auf ein detailliertes Eingehen anderer Organsysteme soll hier verzichtet werden (für weitere Information siehe White et al. 2016).

Von der Erstbeschreibung durch Liedtke et al. (2000) ausgehend, wurde TRPV4 initial als Osmosensor, lokalisiert im ZNS, wahrgenommen. Darauf folgten Beschreibungen im PNS (Alessandri-Haber et al. 2004) und erst über die letzte Dekade eine zunehmende Exploration seiner ZNS-Expression. Dies gestaltete sich mitunter schwierig und brachte teils widersprüchliche Aussagen zur zellulären Expression hervor (Shibasaki et al. 2007; Benfenati et al. 2007). Derzeitig kann aber als gesichert angesehen werden, dass TRPV4 im ZNS in neuronalen (Shibasaki et al. 2007; Li et al. 2013), astrozytären (Benfenati et al. 2007; Butenko et al. 2012; Shibasaki et al. 2014; Ciura et al. 2018), mikroglialen (Konno et al. 2012) aber auch epithelialen Zellen (Marrelli et al. 2007; Narita et al. 2015) exprimiert wird. Hirnareale in denen TRPV4 bisher identifiziert werden konnte, sind: Kortex, Hippocampus, Thalamus, Cerebellum, Rückenmark (J. Lee et al. 2012; J. Lee & Choe 2014; Güler et al. 2002) und in den zirkumventrikulären Organen (Liedtke & Friedman 2003). Dabei scheint der TRPV4-Kanal zusammengefasst wichtige Aufgaben in der Abstimmung entscheidender homöostatischer Prozesse des ZNS zu erfüllen (Kumar et al. 2018). So kontrolliert er das Gleichgewicht des Hirnvolumens auf relevante Weise, denn er ist mit Barrierefunktionen entlang der Übergänge zu extrazellulären Flüssigkeitsräumen assoziiert (Narita et al. 2015) und ist Bestandteil der Osmoregulation auf zellulärer (Benfenati et al. 2011) und systemischer Ebene (Liedtke & Friedman 2003; Mizuno et al. 2003; Ciura et al. 2018). Darüber hinaus wirkt er an der bedarfsgerechten Adaptation der zerebralen Perfusion mit (Dunn et al. 2013). Er ist involviert in die Modulierung der neuronalen Erregbarkeit (Shibasaki et al. 2007; Shibasaki et al. 2014; Hong et al. 2016) und scheint an der Aktivierung ZNSortständiger Immunzellen beteiligt zu sein (Konno et al. 2012; Shi et al. 2013). Außerdem wird TRPV4 für die Nozizeption (Alessandri-Haber et al. 2006) und Thermosensation benötigt (H. Lee et al. 2005), und partizipiert an der zentralen Körpertemperaturregulation (Vizin et al. 2015).

Neben diesen physiologischen, teils Homöostase-erhaltenden Aufgaben, ist TRPV4 im Nervensystem auch an pathologischen Prozessen beteiligt und bisher konnte eine Teilhabe an neurodegenerativen Vorgängen, sowie entzündlichen Prozessen nach Gewebeschädigung identifiziert werden (White et al. 2016). Die Erforschung TRPV4-assoziierter Pathomechanismen des ZNS befindet sich allerdings noch in der Frühphase, da einige Zusammenhänge bisher nicht repliziert wurden und Übertragungen tierexperimenteller Ergebnisse in den humanen Organismus ebenfalls noch nicht erfolgt sind. Bei detaillierterer Betrachtung, bezieht sich die derzeitige Studienlage von TRPV4 im Kontext neurodegenerativer Prozesse vornehmlich, aber nicht vollständig, auf Hypoxieinduzierte Schädigungen (Butenko et al. 2012; Li et al. 2013; Jie et al. 2015; Jie et al. 2016). Hierbei scheint die Ausprägung solcher Schädigungen durch TRPV4 mitbestimmt. Nach Ischämien zeigt der Kanal eine erhöhte Aktivität. Hierdurch werden intrinsisch, degenerative Signalkaskaden angeregt, welche vornehmlich in eine glutamaterge Exzitotoxizität münden (Li et al. 2013; Jie et al. 2016). Zeitgleich verstärkt TRPV4 bei einem Zustand nach Hirnischämie das sekundäre Hirnödem (Jie et al. 2015). Während der konsekutiv zur Hypoxie auftretenden Gliose, zeigt TRPV4 in reaktiven Astrozyten eine deutlich erhöhte Aktivität (Butenko et al. 2012). Ob diese Aktivitätssteigerung primär schädigend wirkt, ist noch ungeklärt. Auch hereditäre Mutationen des humanen TRPV4-Gens, die vornehmlich eine gesteigerte Aktivität (gain-of-function Mutation) auslösen, bergen neurotoxisches Potential (White et al. 2016). Sie lösen heterogene Degenerationen peripherer Neurone aus und können Überschneidungen mit Knochendysplasien aufweisen (Deng et al. 2010; Nilius & Voets 2013). Interessanterweise bestehen erste Hinweise, dass noch weitere Assoziationen zu neurodegenerativen Erkrankungen vorliegen. So wurde TRPV4 mit der Pathogenese des Morbus Alzheimer (Zhang et al. 2013; Bai & Lipski 2014), der Amyothropen Lateralsklerose (J. Lee et al. 2012) und mit neuronalen Degenerationserkrankungen der Retina (Taylor et al. 2017) in Verbindung gebracht. Als intrazellulär gerichteter Transduktor entzündlicher Umgebungsreize, imponierte TRPV4 bei der Aktivierung zentralnervöser Mikrogliazellen (Konno et al. 2012; Shi et al. 2013) und Astrozyten (Bai & Lipski 2010), wie auch bei der peripheren Nozizeption im Rahmen einer neurogenen Entzündung (Vergnolle et al. 2010). Es wird vermutet, dass dabei insbesondere die Fähigkeit von TRPV4 bedeutsam ist, auf entzündliche

Umgebungsreize wie Wärme, ödematöse Schwellung, niedriger pH oder freigesetzte entzündliche Metabolite zu reagieren (Vergnolle et al. 2010; Kumar et al. 2018). TRPV4 ist also umfangreich im ZNS exprimiert und übernimmt vielfältige Funktionen der ZNS Homöostase-Regulation. Kommt es zu pathologischen Konditionen kann er neurotoxisch wirken, wie auch entzündliche Zustände in eine Zelle forttragen oder möglicherweise immunologische Zellen direkt aktivieren. Wie in der Überleitung zu diesem Kapitel bereits kurz angedeutet, steht darüber hinaus die Expression von Pgc-1 α im murinen Fettgewebe unter der Regulation von Trpv4 (Ye et al. 2012). Durch genetische *Trpv4*-Depletion oder pharmakologische Blockade, führten Ye et al. (2012) eine robuste Pgc-1 α Expressionssteigerung herbei. Dieser folgten eine umfassende Veränderung im Metabolismus der Versuchstiere. Es zeigte sich eine vermehrte Thermogenese sowie erhöhte Widerstandfähigkeit gegenüber diätetisch-induzierter Adipositas. Interessanterweise wurde ebenso eine Vielzahl an pro-inflammatorischen Genen in diesem Gewebe durch Trpv4 reguliert. Somit war durch die Trpv4 Einschränkung, die bei Adipositas vorherrschende Fettgewebsentzündung abgemildert, was mit einer konsekutiv reduzierten Insulinresistenz assoziiert war. Weiter zeigten Castellani et al., dass körperliche Aktivität im viszeralen Fettgewebe die Trpv4 Expression senkt und reziprok die Pgc-1 α Expression steigert (Castellani et al. 2014). Hier war das Fettgewebe gegenüber einem zusätzlichen, akuten Entzündungsreiz widerstandfähiger.

Es besteht also die begründete Annahme, dass TRPV4 im Kontext einer Entzündung des ZNS, Einfluss auf ablaufende, zentrale Pathomechanismen dieses Zustandes nehmen könnte. Untersuchungen von TRPV4 innerhalb eines solchen Gewebezustands, könnten somit neue Erkenntnisse liefern, die potentiell auch auf die MS übertragbar wären. Aufgrund der Bedeutung der MS-assoziierten, neurodegenerativen Vorgänge und ihrer bisher nicht vorhanden Therapierbarkeit (Ontaneda et al. 2017), sind potentiell neuroprotektive Moleküle, wie das PGC-1 α , von besonderem Interesse. Bestünde also auch im Neuron eine Beziehung zwischen TRPV4 und PGC-1 α , könnte durch pharmakologische Blockade des membranständigen Ionenkanals, die neuronale Bildung von PGC-1 α gesteigert werden. Da PGC-1 α nachweislich ein Molekül ist, dass die antioxidative Kapazität und die mitochondriale Biogenese der Zelle fördert (Lin et al. 2005), könnte es bei vermehrter Expression, diesen zwei elementaren Schädigungsmechanismen der MS-Neurodegeneration entgegenwirken. Man könnte also durch eine PGC-1α Expressionssteigerung via einer TRPV4 Aktivitätsreduktion, eine neuroprotektive Wirkung im Rahmen der MS-Pathogenese erzielen. Ferner wies TRPV4 im Rahmen anderer ZNS-Pathologien bereits mehrfach direkt neurotoxische Schädigungsmechanismen auf, die auch während einer ZNS-Entzündung relevant sind (siehe Verweise Kap.1.4, S.19-20). Daher stellt TRPV4 per se ein Molekül dar, dessen Erforschung in diesem Kontext interessante neue Einblicke liefern könnte.

1.5 Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit ist, zu untersuchen, ob Trpv4 eine Schädigung im Rahmen einer EAE vermittelt und inwiefern von einer intraneuronalen, transkriptionellen Regulation von *Pgc-1* α seitens Trpv4 ausgegangen werden kann. Dieses Ziel soll sowohl durch tierexperimentelle, als auch *in vitro* Untersuchungen verfolgt werden. Durch den Vergleich von EAE-Erkrankungsverläufen zwischen *Trpv4*^{-/-}- und WT-Tieren, soll eine mögliche Trpv4-Einwirkung auf die entzündungsgebundene Neurodegeneration *in vivo* aufgedeckt werden.

Ausgehend von den Studienergebnissen im Fettgewebe, wurde die Hypothese entwickelt, dass Trpv4 die $Pgc-1\alpha$ -Transkription im Neuron negativ regulieren könnte. Um diese These einer negativen Regulation der $Pgc-1\alpha$ -Transkription durch Trpv4 aufs Neuron zu übertragen, sollen neuronale Kulturen Expressionsanalysen unterzogen werden.

Um die noch unvollständige Kenntnis zur neurozellulären Expression zu erweitern, soll die Trpv4-Expression auf Proteinebene mittels immunzytochemischer Färbung in Neuronenkulturen des Hippocampus nachgewiesen werden. Weiter soll die *Trpv4* Genexpression an unterschiedlichen Zeitpunkten der Kultivierung in Bezug zur *Pgc-1* α Transkription gesetzt werden, um eventuelle Beeinflussungen durch Trpv4 darzustellen. Zusätzlich soll überprüft werden, inwiefern eine fehlende *Trpv4*-Genexpression in kultivierten Neuronen, die *Pgc-1* α Transkription beeinflusst. Bestünde eine negative Regulation seitens Trpv4, so führte eine vollständige *Trpv4*-Gendepletion, zu einer Steigerung der Pgc-1 α -Transkription.

Würden obige Zusammenhänge nachgewiesen, so könnte dies übergeordnet als ein Hinweis verstanden werden, dass Trpv4 die antioxidative Abwehr und den Energiemetabolismus im Neuron beeinflusst. Dies würde dann Trpv4 als eine potentielle pharmakologische Zielstruktur im Rahmen einer neuroprotektiven MS-Therapie ausweisen.

2 Material und Methoden

2.1 Lösungen und Medien

Generell verwendete Lösungen oder Medien sind im Folgenden aufgelistet. Methodenspezifische Materialen sind in den jeweiligen Abschnitten aufgeführt.

- Neuronen-Medium	0,1%	Gentamycin/Amphotericir	(GA-1000,	Lonza,	
	CC446	50HH)			
-	- 1% L-Glutamin (Lonza, #PT-4505HH)				
-	2% ne	eural survival factor – 1	(NSF-1, Lon	za, CC-	
	4459⊦	IH)			
	in Pri	mary Neuron Growth Me	dium (PNGM	, Lonza,	
	#CC-4	461)			
Blockier-Lösung	10% n	ormalem Eselserum (NDS	, Chemikon, #	S30)	
	0,2%	Trition X-100 (Roth, #3051.	2)		
	in Pho	sphat Buffered Saline			
	(PBS,	phosphatgepufferte Salzl	ösung, PAN	Biotech,	

#P04-36500)

2.2 Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten Wildtyp C57BL/6J des Jackson Laboratory, USA. Die C57BL/6J Mauslinie wurde wahlweise direkt als Wildtyp-Kontrollgruppe verwendet oder diente als Hintergrundlinie für den Embryotransfer der $Trpv4^{-/-}$ Tiere (MGI:5544606) (Liedtke & Friedman 2003), welche von Herrn Professor Freichel (Universität Heidelberg) zur Verfügung gestellt wurden. Nach dem Embryotransfer wurde eine homozygote Zucht von $Trpv4^{-/-}$ Tieren durchgeführt. Die Züchtung und Haltung der Tiere bis zur Versuchsdurchführung erfolgte in der Versuchstierhaltung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf (UKE).

Eine Genehmigung der Tierexperimente erfolgte durch die Hamburger Behörde für Familie, Soziales, Gesundheit und Verbraucherschutz, unter der Tierversuchsantragsnummer 22/13. Die Mäuse wurden zu Gruppen bis maximal 5 Tieren in individuell belüfteten Käfigen 1284L (Tecniplast, Blueline IVC System) gehalten.

Die Autorisierung zur Arbeit mit Mäusen wurde erlangt durch eine erfolgreiche Teilnahme am Kurs "Tierexperimentelles Arbeiten mit der Maus" der medizinischen Fakultät der Universität Hamburg. Zur Durchführung einer EAE erfolgte eine Ausnahmegenehmigung obiger Behörde.

2.3 Genotypisierung

Zur Untersuchung des Genotyps wurde *desoxyribonucleid acid* (DNA, Desoxyribonukleinsäure) aus Schwanzbiospien von 3 Wochen alten Tieren gewonnen. Das Gewebe wurde in 50 μ L Quick ExtractTM Lysepuffer (Biozym, #QE 09050) inkubiert, 6 Minuten (min) auf 65 ° Celsius (°C) erwärmt und für 2 min bei 92 °C gekocht, um anschließend auf Eis verwahrt zu werden. Die Genotypisierung zur Bestimmung des *Trpv4* Genstatus setzte sich aus 2 Polymerase-Kettenreaktionen (polymerase chain reaction, PCR) zusammen, welche nachfolgend dargestellt werden.

Die erste PCR detektierte ein 236 Basenpaar (bp) Amplikon, das in WT Tieren wie auch in heterozygoten Trpv4^{+/-} Tieren vorzufinden ist. Zur Durchführung der Kettenreaktion wurden pro Sample 17,7 µL H₂O, 2,5 µL an 10 × DreamTag[™] Puffer (Thermo Scientific, #B65), 0,5 µL an Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTPs, 10 mM, Invitrogen, #109297-018), 0,3 µL DreamTag[™] Polymerase (5 U / μ L, Thermo Scientific, #EP0702), je 1 μ L der beiden verwendeten Primer (10 μ M, siehe unten) und je 2 µL des Gewebe-Lysates gemischt. Die Primer wurden von der Firma Biomers synthetisiert. Der Sense-Strang Primer setzte sich aus folgender Sequenz zusammen: 5'-AGGGCGATAAGCATGTTCAACAGG-3'. Der Primer des Antisense Stranges besaß folgende Sequenz: 5'-TGCACCAACATGAAAGGTCTGTGACG-3'.

Zur Durchführung der PCR wurden die Proben im ersten Zyklus für 3 min auf 95 °C erhitzt. Hieran schlossen sich 40 Zyklen folgender Temperaturabfolgen an:

Erhitzung der Proben für 30 Sekunden (sec) auf 95 °C, für 1 min auf 66 °C mit einer Temperaturreduktion von 0,5 °C pro Zyklus und für 30 sec auf 72 °C. An diese Zyklen schloss sich ein 3 minütiger Zyklus bei 72 °C an.

Die zweite PCR detektierte ein $1,1 \times 10^3$ bp Amplikon, welches in Trpv4^{+/-} und Trpv4^{-/-} Tieren vorzufinden ist. In dieser PCR wurden zur Durchführung pro Sample 16,3 µL H₂O, 2,5 µL 10 × Hot StartTM PCR Buffer (Thermo Scientific, #EP0603), 1,5 µL an MgCl₂ (25mM, Thermo Scientific, #EP0603), 0,5 µL an dNTPs (10 mM, siehe oben), 0,2 µL Maxima Hot StartTM Taq Polymerase (Thermo Scientific, #EP0603), je 1 µL der beiden Primer (10 µM, siehe unten) und je 2 µL des Gewebe-Lysates gemischt. Für diese PCR wurde zum einen der Sense-Primer 5'-CATGAAATCTGACCTCTTGTCCCC-3' und zum anderen der Antisense-Primer 5'-TTGTGTACTGTCTGCACACCAGGC-3' verwendet.

Die zweite PCR begann mit einem ersten Zyklus von 5 min bei einer Temperatur von 95 °C. Hieran schlossen sich 35 Zyklen folgender Temperaturabfolgen an: Erhitzung der Proben für 30 sec auf 94 °C, für 1 min auf 63 °C und für 1 min auf 72 °C. Die Reaktion schloss ab mit einem Zyklus von 10 min bei einer Temperatur von 72 °C.

Nach Beendigung der Reaktion wurden alle Proben beider Kettenreaktionen bis zum Auftragen aufs Gel bei 4 °C beziehungsweise auf Eis verwahrt. Die gesamten PCR-Produkte wurden mit dem Flex Cycler der Firma Analytik Jena durchgeführt. Zur Detektion der Amplikongröße, wurden die PCR-Produkte per Elektrophorese in einem mit Roti[™]-Safe (1:2000 Roth, #3865.1) versehenem, 1,5% Agarose-Gel (Invitrogen, #16-500-500) aufgetrennt und im UV-Transluminator (Peqlab) sichtbar gemacht. Um die Größe ablesen zu können wurde stets eine 100 bp DNA Ladder (Biolabs, #N3231L) verwendet.

Das geschilderte PCR-Protokoll wurde von Liedtke (Liedtke & Friedman, 2003) etabliert, allerdings in leicht abgewandelter Form durchgeführt. Als technische Assistenz halfen bei Ausführung der PCR-Reaktion Frau Nina Kursawe, Frau Sabine Wehrmann, Frau Simone Bauer und Herr Michael Moles.

2.4 Tierexperiment: Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis

Für den Versuch der EAE wurden 9 Wochen alte Tiere verwendet. Die Gesamtanzahl der Tiere, sowie die jeweilige Anzahl an Tieren mit gleichem Geschlecht wurde zwischen den Versuchsgruppen bestmöglich angeglichen (Tabelle 1).

	Trpv4 ^{-/−}	WT
Tierzahl	11	16
Alter	9 Wochen	9 Wochen
Männlich/Weiblich	4/7	8/8
Erkrankt	11	13
Inzidenz	100%	81,25%
Geopfert bzw. verstorben	2	4

 Tabelle 1 | Versuchsgruppen beider Genotypen im Tiermodell. Aufgeführt sind die zentralen Merkmale

 beider Versuchsgruppen und Eckdaten des Versuchsverlaufs

Zur Induktion der EAE wurde den Tieren, unter kurzzeitiger Narkose mit einem 80% CO₂, 20% O₂ Gasgemisch, subcutan auf beide Flanken verteilt insgesamt 200 µg des Peptids 35-55 des Myelin-Oligodendrozyten-Glykoproteins (MOG₃₅₋₅₅) (NeoMPS, #MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK-NH₂) injiziert. Das injizierte MOG₃₅₋₅₅ wurde in einer 1:1 Emulsion mit kompletten Freudschen Adjuvans, welches eine Konzentration von 4 mg/ml an *Mycobacterium tuberculosis* (H37Ra, Difico, #231141) beinhaltete, gespritzt. Am selben Tag der Injektion dieses Gemisches, sowie 48 h darauf wurde den Tieren intravenös 200 ng Pertussistoxin (PTX, Calbiochem, #516560) gelöst in 100 µL 0,1 M Dublecco's Phosphat Buffered Saline (PBS, phosphatgepufferte Salzlösung, PAN Biotech, #P04-36500) appliziert. Beginnend mit der Injektion, wurde der Gesundheitsstatus der Tiere täglich überwacht und mit einsetzen erster Symptome zusätzliches, leicht zugängliches Weichfutter angeboten.

Die Bewertung der Erkrankungsschwere erfolgte täglich mittels Gewichtskontrolle und einem klinischen Scoring. Der klinische EAE-Wert umschloss eine Skala von 0 – 5 mit Abstufen von 0,5 Punkten. Anhand des Gangbildes sowie eines Grit-Tests (Fortbewegung an einem umgedrehten Käfiggitter) wurde der Score vergeben: 0 = keine Krankheitssymptome; 0,5 = einsetzende Parese des Schwanzes; 1 = klare Schwanzparese mit keiner, bis sehr leichter Parese der Hinterbeine und noch unauffälligem Gangbild; 1,5 = leichte Paresen der Hinterbeine, imponierend durch paralleles Versetzen dieser im Grit-Test und leichtes Watscheln im Gangbild; 2 = Paresen der Hinterbeine. Hintere Pfoten verlieren im Grit-Test den Kontakt, welcher aber wiederhergestellt werden kann. Im Gangbild imponiert auffälliges Watscheln; 2,5 = deutliche Parese der Hinterbeine. Kontaktverlust im Grit-Test kann nicht wieder rückgängig gemacht werden, hinzu kommt deutliches Watscheln; 3 = hochgradige Parese der Hinterbeine mit Monoplegie eines Beines; 3,5 = Paraplegie der Hinterbeine; 4 = Paraplegie der Hinterbeine mit hinzutretenden Paresen der vorderen Extremität; 5 = prämorbid oder tot.

Krankheitsbeginn wurde mit einsetzen erster Symptome, also einem klinischen EAE-Wert von 0,5 gewertet. Ein Tier wurden geopfert, soweit sie folgende Symptome aufzeigten: > 20% Gewichtsverlust vom Ausgangsgewicht; klinischer EAE-Wert \geq 4; deutliche Zeichen körperlicher Auszehrung (z.B. gebeugter Rücken, stumpfes Fell) sowie bei Nahrungs- oder Flüssigkeitsverweigerung von \geq 24h.

2.5 Neuronale Zellkultur

Zur Herstellung von primären, hippocampalen Neuronen-Kulturen aus der Maus, wurde schwangeren Mäusen die Embryonen an der embryonalen Theiler Stage 24 (16. Schwangerschaftstag) entnommen. Die verwendeten Muttertiere für Kulturen mit einem Wildtyp Genotyp (im Weitern als WT-Kulturen bezeichnet) entstammten der C57BL/6J Linie (Kap. 2.2). Für *Trpv4^{-/-}* Neuronen-Kulturen (im Weiteren als KO-Kulturen betitelt) wurden homozygot *Trpv4^{-/-}* Elterntiere miteinander verpaart. Zur Sicherung des elterlichen Genotyps wurde dieser mittels PCR zweimalig kontrolliert. Darüber hinaus wurde pro Muttertier eine abstammende und zufällig

ausgewählte Kultur mittels qRT-PCR auf Expression von *Trpv4* mRNA untersucht. Eine Expression konnte in keinem Fall festgestellt werden (Kap. 3.2.2).

Die Muttertiere wurden nach vorangehender Narkose mit einem 80% CO₂, 20% O₂ Gasgemisch, mittels reinem CO₂ getötet. Nach Präparation aus dem Mutterleib, wurden die Embryonen in *Hanks Balanced Salt Solution* (HBSS, Invitrogen, #14170088) auf Eis verwahrt. Die eigentliche Präparation der Hippocampi aus dem embryonalem Gehirn erfolgte unter einem binokularen Mikroskop. Hierzu wurde die Schädeldecke eröffnet und das gesamte Gehirn aus dem Schädel entnommen. Anschließend wurden beide Hemisphären vom Mittelhirn getrennt und die Meningen von ventral nach dorsal vom Hirn abgezogen. Daraufhin wurde von medial der Hippocampus herausgetrennt und bis zur weiteren Verwendung wieder in eisgekühlten HBSS verwahrt.

Die Hippocampi aller Embryonen einer Muttermaus wurden für alle Versuche gepoolt. Als eine biologische Einheit wurde das Muttertier betrachtet. Für die Verwendung in Expressionsanalysen wurde für mögliche. technische Ungleichheiten in der Kultivierung korrigiert. Hierzu wurde pro Kultivierungszeitraum (Days in vitro, DIV) eine technische Wiederholung von je 3 Wells (eigenständige Einheit auf einer Kulturplatte) ausgesät. Nach Analyse wurden diese Triplikate wieder auf die Muttermaus zusammengeführt.

Nach Abschluss der Präparation aller Hippocampi wurde das HBSS abgenommen und die Hippocampi in 1 ml 0,05% Trypsin/EDTA Lösung (Life technologies, #25300-054) für 6 min bei 37 °C unter gelegentlichem, leichtem Schwenken inkubiert. Zum Stopp der enzymatischen Reaktion wurde nach Ablauf der Inkubation die 0,05% Trypsin/EDTA Lösung abgenommen und durch 5 ml serumhaltiges DMEM/F12 (Life technologies, #21331-020) ersetzt. Dieses wurde nur für wenige Sekunden auf dem Gewebe belassen und direkt wieder abgenommen. Der Serumanteil der DMEM/F12 Lösung betrug 10% an fetalem Kalbserum (FCS, Biochrom AG, #S0115). Um die serumhaltige DMEM/F12 Lösung vor bakteriellem Befall zu schützen, beinhaltete sie 1% eines Penicillin/Streptomycin Gemisches (Invitrogen, #15140122).

Nach Stopp der enzymatischen Reaktion des Trypsins, folgte die Dissoziation der Zellen aus dem Gewebe ins HBSS. Hierzu wurden die Hippocampi vorerst in 1 ml HBSS einmalig mit einer 1000µl Pipette auf und ab pipettiert. Letztendlich erfolgte

die komplette Lösung durch mehrmaliges Pipettieren mit einer 100 µl Pipettenspitze in 2 ml Volumen. Die Auszählung der Zellzahl erfolgte nach vorheriger Tryptanblau-Färbung zerstörter Zellen mit in einer Neubauerzählkammer.

Für alle Versuche wurden die Zellen mit einer Dichte von 40×10^3 Zellen/cm² ausgesät. Zellen für die Immunzytochemie (Kap. 2.7) wurden auf Poly-D-Lysin (PDL, Sigma, #P7886) beschichtete Glasplättchen im 24-well Format (Greiner Bio One, 665181) ausplattiert, während Zellen für die Expressionsanalysen (Kap. 2.6) in 12-Well Format Kulturplatten (Greiner Bio One, #665180) kultiviert wurden. Um obige Zelldichte zu erlangen wurde das vorliegende Zellsuspensat mit dem eigentlichen Kulturmedium Primary Neuron Growth Medium (PNGM, Lonza, #CC-4461) verdünnt und anschließend in die wells der Kulturplatten gegeben. Das komplette PNGM wurden nach Herstellerangaben durch folgende Zusätze komplettiert: 1% L-Glutamine (Lonza, #PT-4505HH), 0,1% GA-1000 (Gentamycin/Amphotericin, Lonza, #CC4460HH) und 2% NSF-1 (neural survival factor-1, Lonza, # CC-4459HH).

Zur ausreichenden Ernährung der Zellen wurden die Wells mit dem kompletten PNGM auf ein Gesamtvolumen von 1,5 ml im 24-well Format und 2 ml im 12-well Format aufgefüllt. Nach der Aussaht wurden die Zellen zum Wachstum im Inkubator bei 37 °C, 5% CO₂ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 98% kultiviert. Um Wachstum glialer Zellen zu unterbinden wurde 4 Tage nach Kultivierungsbeginn die Zellen mit 5 µM Arabinosylcytosine (AraC, Sigma Aldrich, #C1768-100mg) behandelt und anschließend bis zur Verwendung unter obigen Bedingungen verwahrt.

2.6 Quantitative Real-Time PCR

Die Gewinnung der *messenger* Ribonukleinsäure (*messenger ribonucleic acid*, mRNA) aus neuronalen Zellkulturen erfolgte mittels des RNeasy Mini Kit (Quaigen, #74106). Alle Schritte erfolgten nach Angaben des Herstellers. Zentrale Schritte bis zur Aufreinigung im Quiagen Kit werden nachfolgend kurz dargestellt. Die Lyse der Zellen erfolgte direkt im Well der Kulturplatten (Kap. 2.5). Hierfür wurde zuerst das Kulturmedium abgesaugt, um dann die Zellen dreimal mit kaltem PBS zu waschen. Nach den Waschschritten wurde der Lyse-Puffer des RNeasy

Mini Kits auf die Zellen gegeben. Beim Aufreinigen mehrerer *Wells* wurde sequentiell gearbeitet. Waren alle Zellen mit Lyse-Puffer bedeckt, so wurden die Zellen mit einem Gummistempel einer Spritze (Braun, #9161406V) vom Boden geschabt. Der Boden des Wells wurde dann mit dem Zell-Lysat mehrmals abgespült, welches anschließend in ein RNA-freies Eppendorf Tube (Sarstedt, #72.706.400) überführt und bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis verwahrt wurde. Zur Unterstützung des Lyse-Prozesses wurde das Lysat fünfmal mit einer 30 Gauge Nadel aspiriert. Hieran schloss sich das Protokoll des Quiagen RNeasy Mini Kits an. Die im Protokoll als optional angegeben Schritte wurden durchgeführt.

Die Quantivizierung und Qualitätsprüfung der extrahierten RNA wurde mittels des NanoDrop Nd-1000 (Peqlab) durchgeführt. Falls keine direkte Umschreibung in komplementärere DNA (complementary deoxyribonucleic acid, cDNA) erfolgte, wurde die RNA bei -80 °C aufbewahrt

Zur Synthese von cDNA wurden je 200 ng an mRNA verwendet. Die Synthese erfolgte mittels des cDNA Synthese Kits (Thermo Scientific, #K1632). Es wurde das Hersteller Protokoll befolgt. Zur quantitativen Real-Time PCR (qRT-PCR) wurden die einzelnen Proben 1:5 mit H₂O verdünnt. Die Edukte der PCR waren jeweils 5 µL 2 × TaqMan[™] Gene Expression Master Mix (Life technologies, #4369016), 2,5 μL H₂O, 0,5 μL des jeweiligen TaqMan[™] Gene Expression Assay (siehe unten) und jeweils 2 µL der verdünnten Probe. Es wurden folgende TaqMan[™] Gene Expression Assays der Firma Life Technologies verwendet: Mm00499032 m1 (Maus Trpv4, Probe), 00447181 m1 (Maus PGC-1α, Probe) und 00446971 m1 (Maus Tbp, Referenz). Die Sensitivität von Mm00499032 m1 zur Detektion eines KO von wurde mittels gesichert Trpv4-deletierten Gewebeproben erfolgreich überprüft. Die Analyse der gRT-PCR Reaktionen erfolgte mit einem ABI Prism 7900HT Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems). Die relative Expression wurde mittels der Δ Ct Methode ermittelt. Wurde zur Analyse einer Fragestellung mehrere qRT-PCR Platten verwendet, wurde darauf geachtet auf einer Platte stets alle Bedingungen zu vertreten um für gegebenenfalls auftretende Platteneffekte zu korrigieren.

2.7 Immunzytochemie

Die Kultivierung der Zellen erfolgte nach den Angaben in Kapitel 2.5. Die Neuronen-Kulturen wurden an DIV14 fixiert. Hierzu wurde zuerst das Kultivierungsmedium abgesaugt, die Zellen einmalig mit PBS gewaschen und anschließend in 4% Paraformaldehyd (PFA, Sigma Aldrich, #0335.3) für 15 min bei Raumtemperatur (RT) fixiert. Im Anschluss folgten 3 Waschschritte mit PBS für je 5 min. Nach Abschluss der Fixation wurden die Zellen mit den primären Antikörpern Anti-TRPV4 (1:100, Alamone Labs, #ACC-034) und Anti-*microtubule associated protein* 2 (MAP2) (1:500, Abcam, #ab11267) in 10% normalem Eselserum (NDS, Chemikon, #S30) und 0,2% Trition X-100 (Roth, #3051.2) in PBS über Nacht bei einer Temperatur von 4 °C inkubiert. Zur Durchführung der Prä-Adsorptionskontrolle wurde, gemäß den Herstellerangaben, pro 1 µg Antikörper ein 1 µg Peptid (CDGHQQGYAPKWRAEDAPL, korrespondierend zu den Aminosäuren 853-871, Alamone Labs, #ACC-034) eingesetzt.

Am darauffolgenden Tag wurden die nicht gebundenen, primären Antikörper in drei Waschschritten zu je 5min mit PBS entfernt. Die Präparate wurden dann mit einer 10% NDS-Lösung in PBS für 15 min bei RT blockiert. Nach Ablauf der 15 min wurde die Blockierungslösung abgenommen und die Zellen ohne weiteres Waschen für 1h bei RT mit in PBS gelösten sekundären Antikörpern inkubiert. Als sekundäre Antikörper wurden Alexa488-gekoppelte Eselantikörper die Kaninchen-Jackson, lqG erkennen (1:600, #711-486-144) und Cy3-gekoppelte Ziegenantikörper die Maus-IgG erkennen (1:600, Jackson, #127-255-160) verwendet. Während der Inkubation wurden die Präparate vor Lichteinstrahlung geschützt.

Im Anschluss an die Inkubation mit den sekundären Antikörpern erfolgten erneut drei fünfminütige Waschschritte mit PBS. Die Zellen wurden dann mit ihren Coverslips auf Objektträgern (Marenfeld, #0810000) mittels Immumount (Thermo Scientific, #9990402) eingedeckt und bis zur mikroskopischen Auswertung bei 4 °C verwahrt. Zur Analyse wurde das konfocale Laser-Scanning Mikroskop Imager M2, LSM 700 der Firma Zeiss verwendet.

2.8 Statistik

Auf statistische Signifikanz wurde mittels t-Test, Mann-Whitney-U Test oder einer einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) mit entsprechendem post-hoc Test geprüft. Zur statistischen Analyse wurden die Werte mittels natürlichem Logarithmus transformiert. P < 0,05 (*) wurde als signifikant, P < 0,01 (**) als hochsignifikant angesehen. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programmen GraphPad Prism 5 und Microsoft Excel 2010.

3 Ergebnisse

Im ersten experimentellen Teil der Arbeit wurde untersucht, ob ein Fehlen des *Trpv4*-Gens zu einem milderen Verlauf eines etablierten MS-Tiermodells, der EAE (Baxter 2007), führt. Hierzu wurden *Trpv4*-defiziente Mäuse mit WT Mäusen in eben diesem Modell verglichen.

Im Anschluss wurde dann innerhalb von neuronalen Kulturen das Expressionsverhalten von Trpv4 und dessen Bezug zu Pgc-1 α exploriert. Um der These einer möglichen, durch Trpv4 bedingten Beeinflussung von Pgc-1 α näher zu kommen, wurde untersucht ob eine fehlende *Trpv4*-Expression zur vermehrten Ausbildung von *Pgc-1\alpha* führt.

3.1 Klinische Untersuchung bei *Trpv4-*Defizienz im EAE-Mausmodell

3.1.1 Klinischer Versuchsverlauf der EAE

Um zu untersuchen ob der TRPV4-Ionenkanal bedeutend für die Pathophysiologie der MS sein könnte, wurden $Trpv4^{-/-}$ -Tiere mit ihren nicht transgenen Wurfgeschwistern mit dem Peptid MOG₃₅₋₅₅ (siehe Kap. 1.2.1) immunisiert. Die hierdurch ausgelöste Erkrankung wurde für einen Zeitraum von 40 Tagen täglich in ihrem Verlauf analysiert. Hierzu wurden der Grad der klinischen Behinderung (klinischer EAE-Wert) und die prozentuelle Gewichtsveränderung zum Ausgangsgewicht als Parameter festgehalten.



Abb. 1 | *Trpv4^{-/-}* **Tiere zeigen nur in der Tendenz eine unterschiedliche Erkrankungsschwere zu Beginn der EAE. (a)** Klinischer Behinderungsgrad und (b) prozentuale Gewichtsveränderung zum Ausgangsgewicht über eine Versuchsdauer von 40 Tagen nach Immunisierung mit MOG₃₅₋₅₅. Aufgezeigt sind Gruppen von *Trpv4^{-/-}* (n = 11) und WT (n = 16) Mäusen. Die dargestellten Werte entsprechen den Mittelwerten \pm Standardfehler. Zur statistischen Analyse wurde ein Mann-Whitney-U Test verwendet.

Der typische Kurvenverlauf der Kontrollgruppe zeigt eine regelrechte Induktion der EAE durch die verwendete Immunisierung an (Abb. 1). Unterschiede mit einer statistischen Signifikanz konnten zwischen den Versuchsgruppen weder beim klinischen EAE-Wert (Abb. 1a) noch in der prozentualen Gewichtsveränderung zum Ausgangsgewicht (Abb. 1b) detektiert werden. Auch die maximale Erkrankungsschwere, sowie der kumulative EAE-Wert unterscheiden sich nicht zwischen transgenen und Wildtyp-Tieren (Abb. 2a, b).

Bei genauerer Betrachtung fällt auf, dass der Kurvenanstieg in der Gruppe der *Trpv4*^{-/-}-Tiere während der ersten Versuchshälfte flacher ist, als der Anstieg in der WT-Kontrollgruppe (Abb. 1a). Ein scharf abgegrenzter Scheitelpunkt im Kurvenverlauf des klinischen EAE-Werts ist bei den *Trpv4*^{-/-}-Tieren nicht zu erkennen. Im weiteren Verlauf gleichen sich beide Gruppen wieder an. Auch die Entwicklung des Körpergewichts über den Erkrankungsverlauf, zeigt einen weniger rapiden Abfall in den *Trpv4*^{-/-}-Tieren als in den WT-Tieren (Abb. 1b).



Abb. 2 | Kein Unterschied im Ausmaß der klinischen Behinderung zwischen *Trpv4^{-/-}-* und WT-Tieren (a) Mittlerer maximaler klinischer EAE-Wert und (b) mittlerer aufaddierter EAE-Wert über den Versuchsverlauf von 40 Tagen. Trpv4^{-/-} (n = 11) und WT (n = 16). Die dargestellten Werte entsprechen den Mittelwerten ± Standardfehler. Die statistische Analyse wurde mittels t-Test durchgeführt

3.1.2 Initiales Erkrankungsniveau bei Trpv4-Defizienz

Um den im Verlauf angedeuteten milderen Erkrankungsbeginn weiter zu extrapolieren, wurde der Zeitraum zwischen Immunisierung und Auftreten von ersten sowie deutlich paretischen Symptomen aufgetragen und zwischen beiden Versuchsgruppen verglichen (Abb. 3)

а



Abb. 3 | Verzögerter Erkrankungsverlauf bei *Trpv4^{-/-}* Tieren während der ersten Versuchshälfte Zeitraum in Tagen nach Immunisierung mit MOG₃₅₋₅₅.(a) Bis zur Ausbildung von deutlichen klinischen Symptomen (EAE-Wert ≥ 2; entsprechend einer Parese der Hinterbeine) (b) Bis zum Auftreten erster klinischer Symptome. (EAE-Wert ≥ 0,5; detaillierte Bewertungskriterien sind Kap. 2.4 zu entnehmen) Die dargestellten Werte entsprechen den Mittelwerten ± Standardfehler. Die statistische Analyse wurde mittels t-Test durchgeführt. Statistisch signifikante Unterschiede wurden durch Sternchen gekennzeichnet; * P < 0.05

So erreichten die Trpv4^{-/-}-Tiere nach der Immunisierung einen EAE-Wert ≥ 2 , welches einer Parese der Hinterbeine entspricht (siehe für klinisches Scoring, Kap. 2.4), im Mittel 6,63 \pm 2,46 Tage (p = 0,0126) später als die Kontrollgruppe (Abb. 3a). Das Auftreten von ersten Symptomen, entsprechend einem EAE-Wert \geq 0,5, zeigte einen tendenziellen Unterschied (p=0,0781) ohne statistische Signifikanz zu erreichen (Abb. 3b).
3.2 *In vitro* Untersuchungen zur Beeinflussung von *Pgc-* 1α durch Trpv4

Um den möglichen Einfluss des TRPV4-Ionenkanals am neuronalen Untergang in der MS-Erkrankung weiter nachzuvollziehen und insbesondere zu untersuchen ob er an der Beeinflussung des neuronalen Energiemetabolismus via PGC-1a beteiligt sein könnte, wurden im zweiten experimentellen Teil in *in vitro* Versuche als durchgeführt. Hierzu wurden Neuronenkulturen Untersuchungsobjekt verwendet, die eine neuronale Ausdifferenzierung aufweisen und nur mit geringem Gliazellwachstum einhergehen. Die verwendeten bis keinem Kulturen entstammten den Hippocampi muriner Embryonen.

3.2.1 Immunzytochemische Färbung von Trpv4 in kultivierten, hippocampalen Neuronen

Abb. 4 zeigt eine immunzytochemische Färbung von *in vitro* kultivierten, hippocampalen Neuronen an DIV14. Aufgezeigt sind Färbungen gegenüber dem Neuronenmarker Map2 und dem Trpv4 Protein, sowie eine Überlagerung dieser beiden Färbungen. Gefärbt wurden Zellen, die *Trpv4^{-/-}*- und WT-Tieren entnommen wurden. Die Spalte mit der Kontrollfärbung zeigt eine Immunzytochemie, bei der ein spezifischer Peptidausschnitt des Trpv4-Proteins, welcher zur Antikörper-Generierung herangezogen wurde, während des Färbeprozess beigefügt wurde.

Zu Erkennen ist eine durchweg erfolgte Färbung gegenüber Map2, soweit ein entsprechender Antikörper angewendet wurde (Spalte 2 und 3). Die Peptidkontrolle des Trpv4-Antikörpers zeigte kein Signal (Spalte 1). Bei Verwendung des Trpv4-Antikörpers wurde ein vergleichbares Signal in den WT-Neuronen und Trpv4^{-/-}-Neuronen detektiert. Die Intensität der Färbung in beiden Versuchsgruppen war insgesamt schwach und es konnte kein Unterschied zwischen den Gruppen gefunden werden. Somit war der Proteinnachweis in Form durchgeführten Färbung nicht sicher zu erbringen. Andere, für der immunzytochemische Untersuchungen geeignete Antikörper standen zum Versuchszeitpunkt leider nicht zur Verfügung, weshalb im Weiteren (siehe Kap. 3.2.2) das mRNA Expressionsverhalten untersucht wurde.

37



Abb. 4 | Immunzytochemische Färbung von TRPV4 in kultivierten, hippocampalen Neuronen an DIV14. Repräsentative immunzytochemische Färbung mit Antikörpern gegen Trpv4 und Map2. In allen Bedingungen zeigt sich eine vergleichbare Map2 Färbung. Die Kontrolle des Antikörpers erfolgte durch Präsentation eines spezifischen Peptides als Präadsorptionskontrolle. In der Färbung von WT Zellen wie auch *Trpv4^{-/-}* Zellen konnte in der Färbung gegen Trpv4 ein in der Intensität vergleichbares Signal detektiert werden. Maßstabsbalken: 10μm.

Die morphologische Ausdifferenzierung der Dissoziationskulturen wird Abb. 5 anhand exemplarisch in repräsentativer, mikroskopischer Phasenkontrastaufnahmen an konsekutiven Kultivierungszeitpunkten aufgezeigt und soll an dieser Stelle der Vollständigkeitshalber die erfolgreiche Kultivierung der neuronalen Zellen aufzeigen. Zu erkennen ist eine vornehmliche axonale Reifung an frühen Kultivierungszeitpunkten (DIV3), der sich eine immer umfangreichere Dendritogenese anschließt (DIV7 bis DIV21). Somit ist die



Abb. 5 | Dissoziationskulturen embryonaler Hippocampi der Maus an konsekutiven Kultivierungszeitpunkten. Mikroskopische Phasenkontrast-Aufnahme an Kultivierungstag 3, 7, 14 und 21 (DIV3-21). Gezeigt wird ein repräsentativer Ausschnitt. Maßstabsbalken: 50µm.

umfangreichste Dichte an Dendriten an DIV21 vorhanden, der maximalen Kultivierungsdauer aller Versuche.

3.2.2 mRNA Expressionsverhalten von *Trpv4* zu *Pgc-1* α in Neuronenkultur

Da eine Expression von TRPV4 in zentralen (Kauer & Gibson 2009; J. Lee & Choe 2014) und peripheren Neuronen (Alessandri-Haber et al. 2003) bereits publiziert worden ist, wurde weiter untersucht, ob mRNA von *Trpv4*, als Vorstufe zur Proteinbildung, in den primären Neuronenkulturen vorkommt und wie sich hierzu im Vergleich die *Pgc-1* α -Expression darstellt.

Trpv4-mRNA war zu jedem Zeitpunkt der Kultivierung in den hippocampalen Neuronen zu detektieren (Abb. 6a). In *Trpv4*^{-/-} Kulturen konnte keine *Trpv4*-mRNA gefunden werden, was als nicht detektierbar (n.d.) in Abb. 6a gekennzeichnet



Abb. 6 | Entgegengesetztes Expressionsverhalten der mRNA von *Trpv4* und *Pgc-1a* über die Kultivierungsdauer in hippocampalen WT Kulturen der Maus. Expression von (a) *Trpv4* und (b) *Pgc-1a* mRNA zu den Kultivierungszeitpunkten DIV3, 7, 14 und 21 innerhalb neuronaler WT Kulturen. In *Trpv4^{-/-}*-Kulturen konnten keine mRNA Transkripte von *Trpv4* nachgewiesen werden (n.d.). Die untersuchten Kulturen entstammten murinen Embryonen und wurden unter den in Kap. 2.5 beschriebenen Bedingungen kultiviert. Die ermittelten qRT-PCR Transkripte wurden auf die Transkripte der endogenen Kontrolle *Tbp* relativiert. An jedem Zeitpunkt wurden Kulturen von Embryonen untersucht die 3 unterschiedlichen Muttertieren (n = 3) entstammten. Die Gesamtzahl an Muttertieren betrug n = 6. Angegeben sind Mittelwerte ± Standardfehler. Die statistische Analyse erfolgte mittels einfaktorieller ANOVA und Bonferroni Post-Hoc Test. Statistisch signifikante Unterschiede wurden durch Sternchen gekennzeichnet; * P < 0,05 und ** P < 0,01

wurde. Die höchste mRNA Expression konnte zu Beginn der Kultivierung an DIV3 festgestellt werden. Die Menge des Transkripts nahm mit steigender Kultivierungsdauer signifikant ab, so dass zum Zeitpunkt der vollständigen Ausreifung (DIV21) die geringste Menge des *Trpv4*-Transkripts nachgewiesen wurde (Abb. 6a). Ein zum *Trpv4* entgegengesetztes Expressionsverhalten, zeigt der Nachweis von *Pgc-1* α . Die geringste Expression von *Pgc-1* α findet sich an DIV3, die Höchste an DIV21. Die Unterschiede sind signifikant (Abb. 6b). Über den gesamten Untersuchungszeitraum ist *Pgc-1* α -mRNA zu detektieren.

3.2.3 *Pgc-1* α mRNA Expression in kultivierten Neuronen bei *Trpv4*-Defizienz

Um einen Anhalt zu erarbeiten ob diese entgegengesetzte Korrelation durch eine Einflussnahme des Ionenkanals auf den Transkriptions-Coaktivator bedingt sein könnte, wurde untersucht ob eine komplette *Trpv4*-Defizienz einen quantitativen Einfluss auf die Transkription von *Pgc-1* α hat.

Hierzu wurden kultivierte, hippocampale Neurone von WT-Mäusen, mit denen von *Trpv4*^{-/-}-Mäusen in ihrer mRNA-Expression von *Pgc-1* α verglichen. Als Zeitpunkt wurden DIV7 und DIV14 ausgewählt. Sie boten die Option eine Zwischenstufe abzubilden, in der nach Abb. 6 sowohl eine hohe *Trpv4* mRNA-Expression vorliegt als auch eine Dendritenbildung erfolgt ist und die Kulturen somit elementare, neuronale Ausdifferenzierungen (Axon und Dendrit) aufweisen (Abb. 5). Eine Expression von *Pgc-1* α wurde auch in *Trpv4*^{-/-}-Neuronen gefunden. Einen quantitativen Unterschied in der Expression von *Pgc-1* α zwischen Neuronen aus WT- und *Trpv4*^{-/-}-Mäusen konnte an keinem der untersuchten Zeitpunkte (DIV7 und DIV14) festgestellt werden (Abb. 7).



Abb. 7 | Expression von *Pgc-1a* in WT und *Trpv4^{-/-}*Neuronen-Kulturen. Expression von *Pgc-1a* mRNA in primären, hippocampalen Kulturen von WT (n = 5) und *Trpv4^{-/-}* (n = 4) Mäusen. Die untersuchten Kulturen entstammten murinen Embryonen und wurden unter den in Kapitel 2.5 beschriebenen Bedingungen kultiviert. Die ermittelten qRT-PCR Transkripte wurden auf die Transkripte der endogenen Kontrolle *Tbp* relativiert. Die Fallzahl n bezieht sich auf das Muttertier. An jedem Zeitpunkt wurden Kulturen von mindestens n = 3 unterschiedlichen Muttertieren je Genotyp untersucht. Angegeben sind Mittelwerte ± Standardfehler. Die statistische Analyse erfolgte mittels t-Tests.

4 Diskussion

Dieses Kapitel gliedert sich in zwei Abschnitte. Zuerst soll auf die *in vitro* Versuche eingegangen werden. Sie beschäftigen sich mit der neuronalen *Trpv4* Expression und einer möglichen Interaktion mit *Pgc-1a*. Es werden die Ergebnisse interpretiert und mögliche Ableitungen für eine gesamtneuronale Expression diskutiert. Da diese Überlegungen für die weitere Erörterung des EAE-Krankheitsverlaufs von Bedeutung sind, ist die Reihenfolge der Ergebnisdiskussion hierin begründet. Im Anschluss an die *in vitro* Versuche, werden also dann die EAE-Ergebnisse im zweiten Abschnitt dieses Kapitels diskutiert.

4.1 Die neuronale Trpv4-Expression und ihr Einfluss auf *Pgc-1* α

Die immunzytochemische Färbung aus Kapitel 3.2.1 (Abb. 4), kann wie folgt verstanden werden. Die regelrechte Färbung des Neuronenmarkers zeigt einen erfolgreichen Färbeprozess an. Es scheint eine Funktionalität des Antiköpers sowie eine hohe Affinität gegenüber dem in der Kontrolle zugefügten Trpv4-Pepitd zu bestehen, was durch das fehlende Signal in der Präadsorptionskontrolle deutlich wird. Da der hier verwendete Antikörper gegen eine Peptidsequenz gerichtet ist (siehe Kap.2.7), deren Genabschnitt in einem Bereich nach der Gendeletion des KO lokalisiert ist (Liedtke & Friedman 2003; Benfenati et al. 2007; White et al. 2016), erscheint es unwahrscheinlich, dass eine Bindung mit einem residualen Proteinfragment im KO die Ursache des vergleichbar intensiven Signals in der Trpv4^{-/-}-Färbung und die WT-Färbung ist (Abb. 4). Somit ist insgesamt von einer unspezifischen Bindung des Antikörpers auszugehen. Die vorliegende Färbung kann keinen sicheren Proteinnachweis des Trpv4-Ionenkanals in kultivierten, embryonalen Neuronen des Hippocampus an DIV14 erbringen. Ein ähnliches Resultat wurde durch Shibasaki et al. veröffentlicht (Shibasaki et al. 2007). Hier konnte ebenfalls kein immunzytochemischer Proteinnachweis in hippocampalen Neuronen erbracht werden, aber dennoch eine Funktionalität des Trpv4-Ionenkanals in diesen Neuronen nachgewiesen werden. Anders als bei Shibasaki et al. wurden hier embryonale Neuronenkulturen

verwendet. Die hier durchgeführte Färbung an DIV14, versucht den Ergebnissen 3.2.2 *Trpv4*-mRNA Kapitel (höhere Expression zu frühen aus Kultivierungszeitpunkten) folge zu leisten. So wurde die Möglichkeit untersucht, ob an früheren Kultivierungszeitpunkten passend zur höheren mRNA-Expression (Kapitel 3.2.2, Abb. 6a) auch eine höhere Proteinexpression stattfindet und diese hierdurch detektierbar wird. Der Zeitpunkt DIV14 bot dabei die Option eine Zwischenstufe abzubilden, in der sowohl eine umfangreiche Dendritenbildung erfolgt ist, die Reifung der Kulturen aber noch nicht vollständig abgeschlossen ist (Abb. 5).

Trotz der hier nicht erfolgreichen Trpv4-Färbung, ist von einer funktionalen Trpv4-Expression in ZNS-Neuronen auszugehen. Elektrophysiologische Untersuchungen (Shibasaki et al. 2007; Hong et al. 2016) und Trpv4-Assoziationen mit pathologischen Prozessen (Li et al. 2013; Jie et al. 2016; Hong et al. 2016) bilden hierbei eine fundierte Grundlage für diese Annahme. Weiter scheint die Trpv4-Expression während der Zellreifung einer genauen Regulation zu unterliegen, was die funktionelle Bedeutung von Trpv4 nochmals unterstreicht (Shibasaki et al. 2015). Wie Shibasaki et al. (2007) bisher am prägnantesten innerhalb hippocampaler Neurone zeigten, ist in diesen Neuronen eine Trpv4-typische, elektrophysiologische Reaktion auf vorbekannte Stimuli nachweisbar. Dabei depolarisiert Trpv4 temperaturabhängig das Ruhemembranpotential des Neurons, steht in Interaktion mit ionotropen Glutamatrezeptoren und ist hierdurch ein Regulator der neuronalen Aktivität. In Bezug auf die Immunzytochemie konnte in dieser Studie von Shibasaki et al. (2007), wie bereits erwähnt, kein Proteinnachweis durch eine Immunmarkierung erbracht werden. Dabei waren weder ein zu der hier vorliegenden Arbeit identischer Antikörper (siehe Kapitel 2.7), noch ein durch die Verfasser der Studie selbst synthetisierter Antikörper erfolgreich.

Die Schwierigkeit des immunzytochemischen Trpv4-Proteinnachweis lässt sich darüber hinaus, also neben der vorliegenden Arbeit und bereits geschilderter Problematik, auch der weiteren Literatur entnehmen. Für einen längeren Zeitraum führte diese Schwierigkeit zu unterschiedlichen Aussagen, welcher ZNS-Zelltyp den Ionenkanal exprimiert. Mehrere Arbeiten (Benfenati et al. 2007; Bai & Lipski 2010; Benfenati et al. 2011) ordneten so die Trpv4-Expression vornehmlich den Astrozyten zu. Detektiert wurde hierbei eine betonte Ausprägung in Astrozyten

44

superfizialer Kortexschichten, mit nur punktförmiger neuronaler Expression in tieferen Hirnschichten (Benfenati et al. 2007). Auch im Hippocampus wurde eine vornehmlich astrozytäre Expression ohne neuronale Färbung beschrieben (Bai & Lipski 2010). Eine andere Studie beschreibt entgegengesetzt, eine zwischen Neuron und Astrozyt vergleichbare basale Trpv4-Expression innerhalb des Hippocampus (Butenko et al. 2012). Eine Überprüfung der Spezifität des verwendeten Trpv4-Antikörpers durch KO-Kontrollen wurde in keiner der aufgezählten Studien durchgeführt.

Erst die Verwendung anderer Methoden, welche die Immunzytochemie ergänzten, lieferten genauere Expressionsangaben. Dies sei kurz dargestellt, da es das Diffizile am Trpv4 Nachweis verdeutlicht. Die Studie von Shibasaki et al. (2007) sicherte mittels elektrophysiologischer Ableitungen und in situ Hybridisierung die Ionenkanal-Expression. Dabei zeigte sich in nur circa sechzig Prozent der kultivierten Neurone eine Expression, so dass von einer anteiligen Ausbildung in hippocampalen Neuronen ausgegangen wurde. Auch die astrozytäre Expression innerhalb des Hippocampus musste ebenfalls spezifiziert werden. Mittels Kombination aus in situ Hybridisierung und Immunzytochemie kam man zu dem Ergebnis, dass nur ein Subtyp der Astrozyten in diesem Hirnareal Trpv4 ausbildet (Shibasaki et al. 2014). Bei aller Schwierigkeit, konnten immunhistochemische Gewebsanalysen des gesamten ZNS letztendlich eine weitreichende neuronale Expression des Trpv4-Proteins aufzeigen. Im Hippocampus, Kortex, Thalamus, Basalganglien, Cerebellum und Rückenmark wurde sie festgestellt (J. Lee & Choe 2014). Jedoch zeigte sich eine teils nur schwache Expression, wobei altersabhängige Unterschiede auffielen. In jung-erwachsenen Tieren war die Expression gering, nahm aber mit höherem Alter in fast allen Hirnarealen zu (J. Lee & Choe 2014). J. Lee & Choe (2014) verwandten hierbei einen direkten Antikörper, der mittels einer Peroxidasereaktion im Schnittgewebe die Trpv4-Expression kenntlich machte. Für eine Immunzytochemie stand der Antikörper nicht zur Verfügung.

Zusammenfassend kann angenommen werden, dass eine umfassende neuronale Expression im ZNS vorliegt. Die basale neuronale Expression des Ionenkanals aber wahrscheinlich niedrig ist, was voraussichtlich ein Hauptgrund für den Proteinnachweis darstellt. schwierigen Ferner ist in Bezug auf den immunzytochemischen Nachweis davon auszugehen, dass die Detektionsschwelle des verwendeten Antikörpers zu gering ist, um diese niedrige Expression korrekt zu detektieren und einen regelrechten Nachweis zu erbringen. Auch wenn die Charakterisierung der neuronalen Trpv4 Funktion erst teilweise erfolgt ist, ist ausgehend von den Untersuchungen im Hippocampus anzunehmen, dass Trpv4 auch in anderen Hirnbereichen eine neuronale Funktionalität erfüllt. Weitere Arbeiten müssen hierzu aber noch geleistet werden. Wahrscheinlich erscheint, dass sich die Aufgabe des Trpv4 Ionenkanals innerhalb unterschiedlicher Hirnareale unterscheidet und damit auch eine unterschiedliche zelluläre Ausprägung aufweist. Also keine einheitlich zentralnervöse Funktion besteht, sondern diese sehr variabel ist. Möglicherweise ist die Funktion auch altersabhängig gewichtet. Die niedrige Expression in jungen Tieren (J. Lee & Choe 2014), könnte eine zusätzliche Erklärung für die erfolglose Färbung in der Kultur darstellen, da die entnommenen Zellen sehr jungen Tieren (Embryonen) entstammten. Möglicherweise ist dieser Entnahmezeitpunkt zu früh und einer ausreichenden funktionalen Anlage vorgegriffen. Dissoziierte, embryonale Kulturen sind zwar ein etabliertes Zellkulturmodell für Neuronen (Dotti et al. 1988; Goslin & Banker 1989) und andere TRP-Kanäle zeigten hierin bereits eine funktionale Expression (Greka et al. 2003; Schattling et al. 2012), dennoch erscheint die *Trpv4* Expression altersabhängig zuzunehmen (J. Lee & Choe 2014) und die Integration in die Zellmembran abhängig von der Zellreifung reguliert zu werden (Shibasaki et al. 2015). Beides wirft die Möglichkeit auf, dass neuronale Zellkulturen, deren Zellen älteren Tieren entnommen wurden, besser geeignet sein könnten zur Untersuchung des Trpv4-Ionenkanals.

4.1.1 Trpv4 Interaktion mit Pgc-1α

Neben der Trpv4 Proteinausbildung, wurde hier in dieser Arbeit auch die *Trpv4*-Genexpression untersucht. Interessanterweise zeigte sich von DIV3 bis DIV21 eine kontinuierliche Reduktion der *Trpv4*-mRNA Expression (Abb. 6a) in dissoziierten, hippocampalen Neuronen. Eine solche Abnahme ist bisher noch nicht publiziert worden. Parallel zum sinkenden *Trpv4*-mRNA Vorkommen, steigt dazu entgegengesetzt die *Pgc-1* α -mRNA Expression (Abb. 6b). Dieses Ergebnis macht eine negative Regulation von *Pgc-1* α durch Trpv4 möglich, wie sie durch Ye et.al im Fettgewebe beschrieben wurde (Ye et al. 2012). Allerdings ist es auch möglich, dass mit fortschreitender neuronaler Reifung, ein Großteil der Integration des lonenkanals in die Zellmembran abgeschlossen ist und nur noch eine basale Trpv4 Transkription stattfindet, um eine stetige Regeneration zu gewährleisten. Jedoch ist die Halbwertszeit des Ionenkanals derzeitig noch unbekannt und obige These rein konzeptionell denkbar. Außerdem scheint sich die Ausbildung von Trpv4 im PNS von der hier gefundenen zu unterscheiden. Innerhalb von kultivierten Neuronen des Spinalganglions (PNS) steigert sich die mRNA Expression von Trpv4 zwischen DIV0 und DIV6 (Jang et al. 2012). Auf dieses Ergebnis aufbauend, wurde hierbei gezeigt, dass Trpv4 in den peripheren Neuronen eine durch neurotrophe Faktoren induzierte Neuritogenese vermitteln könnte (Jang et al. 2012). Die hier vorliegende Arbeit könnte somit nochmals einen Unterschied in der zentralnervösen und peripher neuronalen Trpv4-Expression unterstreichen. Dieser Unterschied steht im Einklang zu den Erkenntnissen über die hereditären TRPV4 Mutationen (Nilius & Voets 2013). Sie haben bei ubiquitärer Mutationsausbildung rein einen peripher, neurodegenerativen Phänotyp ohne zentralnervöse Ausfälle (White et al. 2016). Dies legt die Vermutung nahe, dass sich die Funktion von TRPV4 im ZNS und PNS unterscheidet. Die Ergebnisse aus Kapitel 3.2.2 könnten darauf hinweisen, dass sich dieser Unterschied bereits früh auf die Transkription niederschlägt.

Zurückkommend auf die identifizierte $Pgc-1\alpha$ -Expressionssteigerung, ist auch denkbar, dass sich diese unabhängig von Trpv4 ereignet. Unterstrichen wird dies durch die Ergebnisse aus Kapitel 3.2.3. (Abb. 7). Durch eine genetische Trpv4-Defizienz wird innerhalb kultivierter, hippocampaler Neurone keine Veränderung in der Pgc-1 α Transkription im Vergleich zum WT hervorgerufen. Dies macht eine Einflussnahme seitens Trpv4 auf die neuronale Transkription von $Pgc-1\alpha$ unwahrscheinlich. Möglicherweise wird aber das hippocampale $Pgc-1\alpha$ nur untergeordnet transkriptionell reguliert oder eine Änderung der Transkription entsteht erst nach Stimulation bzw. Blockade der Trpv4-Aktivität. Es ist bekannt, dass Pgc-1 α ebenso umfassend posttranslational reguliert wird (Lin et al. 2005). Auch im Neuron konnte dies bereits gezeigt werden (Hasegawa et al. 2016). Unabhängig von transkriptionellen Veränderungen, wurde Pgc-1 α durch eine Necdin-Überexpression stabilisiert und seine ubiquitin-abhängige, proteasomale Degradierung verzögert. Folglich war die mitochondriale Biogenese entscheidend gestärkt und das Ausmaß an Neurodegeneration in einem in vivo Model des Morbus Parkinson reduziert (Hasegawa et al. 2016). Nichtsdestotrotz sinkt die

PGC-1α Expression im Rahmen der MS (Witte et al. 2013). Im Kortex von erkrankten Personen mit progressiven Erkrankungsverläufen, wird die mRNA- und das PGC-1α-Protein insgesamt reduziert exprimiert und das vornehmlich in den Pyramidalneuronen der Layer II-VI. Die Ursache hierfür ist unklar. Generell ist zu bedenken, das PGC-1 α eine herausragende Stellung im regulatorischen Netzwerk der mitochondrialen und respiratorischen Genexpression innehat (Scarpulla 2008). In Anbetracht dieser zentralen Position, kann von einer ausbalancierten und durch mehrere Instanzen rückversicherte Regulation des PGC-1a Moleküls selbst, ausgegangen werden. Falls dies der Fall sein sollte, könnte erst eine PGC-1α-Regulators pathologische Stimulation eines transkriptionelle Veränderungen demaskieren. Möglicherweise stellt die MS-Gewebsentzündung einen solchen Stimulus für eine transkriptionelle Herabregulation des PGC-1 α dar Überaktivierung und TRPV4 könnte, durch eine aufgrund der MS-Gewebsentzündung, regulatorisch auf das neuronale PGC-1 α einwirken. Im experimentellen Setting, könnte durch exogene Applikation von Antagonisten bzw. Agonisten (White et al. 2016) eine Stimulation simuliert werden, die einem pathologischen Gewebszustand ähnlich ist. Auch in der Arbeit von Ye et al. 2012, die die Trpv4-Pgc-1 α Interaktion erstmalig in Adipozyten beschrieb, zeigte sich im Fettgewebe erst dann ein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen, nachdem die Versuchstiere einer hochkalorischen Diät, mit konsekutiver Fettgewebsentzündung, ausgesetzt waren. Ebenso konnten basale Unterschiede in der mRNA Transkription, durch spezifische Blockade von Trpv4 weiter extrapoliert werden (Ye et al. 2012). Im in vivo Experiment der EAE wurde eine Gewebsentzündung des ZNS herbeigeführt, und die Wirkung einer Trpv4-Defizienz studiert (siehe im Weiteren, Kap. 4.2). Spezifische Untersuchungen auf zellulärer Ebene, in denen ein Zellstress induziert oder spezifische Agonisten bzw. Antagonisten auf die kultivierten Zellen appliziert wurden, sind hier noch nicht durchgeführt worden. Solche Versuche stellen interessante, weitergehende Untersuchungen dar, da sie mögliche langfristig angelegte Kompensationen einer kompletten Gendefizienz umgehen, und zusätzliche Rückschlüsse auf die Trpv4-Interaktion zulassen würden.

Dieses Ergebnis und die Literatur zusammenfassend, erscheint es unwahrscheinlich, dass Trpv4 Pgc-1 α in hippocampalen Neuronen auf gleiche Weise transkriptionell reguliert, wie es dies in Adipozyten vollführt. In Anbetracht

der ubiquitären Expression von Trpv4 über den gesamten Körper hinweg, und mit Blick auf seine Vielfältigen, aber dabei stets vom zellulären Umfeld abhängigen Funktionen, ist man geneigt davon auszugehen, dass die neuronale Funktion von Trpv4 eine andere ist, als die im Fettgewebe. Jedoch sei bedacht, dass hier aufgeführte Versuche zahlreiche andere, mögliche Signalwege von Trpv4 nicht untersucht haben und es aktuell ungeklärt bleibt, ob Trpv4 einen Einfluss auf die mitochondriale Biogenese und antioxidative Abwehr nimmt. Für eine solche Aussage sind weitere Studien nötig. Ebenfalls ist die Ursache für die Abnahme der mRNA-Expression (siehe Kapitel 3.2.2, Abb. 6a) noch ungeklärt und Auswirkungen auf die Integration des Trpv4 Proteins offen. Aufgrund angedeuteter altersabhängiger Expressionsunterschiede (J. Lee & Choe 2014), könnte hier in diesem Kontext bei der Trpv4-Interaktionsexploration ebenfalls die Verwendung reiferer Zellen sinnvoll sein.

Basierend auf der aktuellen Studienlage, erscheint es hierneben interessant, die Funktion von Trpv4 im Kontext einer ZNS-Entzündung innerhalb von Astrozyten weitergehend zu untersuchen. Hierfür sind die Ergebnisse folgender Studien von Interesse (Bai & Lipski 2010; Butenko et al. 2012; Bai & Lipski 2014; Shi et al. 2013; Nijland et al. 2014). Innerhalb von akuten WM-Läsionen wird PGC-1 α hochreguliert. Die gesteigerte Expression wurde überwiegend in reaktiven Astrozyten beobachtet (Nijland et al. 2014). Im Rahmen anderer neurodegenerativer Zustände war Trpv4 mit einer reaktiven Astrogliose assoziiert (Bai & Lipski 2010; Butenko et al. 2012; Bai & Lipski 2014; Shi et al. 2013). Eine durchgeführte pharmakologische Antagonisierung des Ionenkanals hatte dabei positive Auswirkungen auf das zelluläre Überleben. Außerdem konnte gezeigt werden, dass Pgc-1 α -überexprimierende Astrozyten Zellen, die in ihrer unmittelbaren Umgebung kultiviert wurden, vor oxidativen Stress schützen und zeitgleich weniger pro-inflammatorische Faktoren freisetzen (Nijland et al. 2014). So könnte Trpv4 möglicherweise antioxidative Kapazitäten in Astrozyten stärken, was sich konsekutiv auch auf das umgebende Neuron auswirkt. Es erscheint also durchaus reizvoll, weitergehend zu überprüfen, ob eine Interaktion zwischen Trpv4 und Pgc-1 α im Astrozyten vorhanden ist.

4.2 in vivo Experiment: Einfluss von Trpv4 auf die EAE

In dieser Arbeit wurde Trpv4 ebenfalls im Kontext eines pathologischen Prozesses untersucht. Der zentrale Versuch hierbei war die EAE. Durch den Vergleich der Erkrankungsverläufe zwischen WT und $Trpv4^{-/-}$ Tieren, sollte eine mögliche Einflussnahme auf eine entzündungsgebundene Neurodegeneration seitens Trpv4 aufgedeckt werden. Dabei zeigte sich, dass die späte Erkrankungsphase, die maximale Erkrankungsschwere und das kumulierte Erkrankungsausmaß zwischen den beiden Gruppen nicht zu unterscheiden waren (Kapitel 3.1, Abb. 1 und Abb. 2). Dennoch verzögerte sich die frühe Erkrankung in der Gruppe der Trpv4^{-/-} Tiere (Abb. 3). Dies ist ein interessantes Indiz. Trpv4 könnte also in diesem Rahmen eine direkte Neurotoxizität vermitteln, oder aber andere Prozesse der Entzündung auf schädliche Weise verstärken. Vor der weiteren Diskussion dieses Ergebnisses, sei aber an dieser Stelle zunächst erwähnt, dass aufgrund von allgemeinen, experimentellen Schwierigkeiten nur ein EAE Versuchslauf durchgeführt wurde. Der Autor ist sich bewusst, dass durch vorliegende Ergebnisse nur eingeschränkte Schlussfolgerungen möglich sind und zur Bestätigung der ermittelten EAE-Ergebnisse weitere Versuchsdurchläufe nötig sind. Folgende Ausführungen sind unter diesem Gesichtspunkt zu betrachten.

Der bei den *Trpv4^{-/-}* Tieren verzögerte Erkrankungsprogress der Frühphase, könnte also darin begründet liegen, dass Trpv4 im Rahmen einer ZNS Entzündung neurotoxisch wirkt. Möglicherweise entfällt durch das Fehlen des *Trpv4* Gens die negative Regulation des Pgc-1α. Hierdurch würde die antioxidative und mitochondriale Kapazität des Neurons gesteigert und seine Widerstandsfähigkeit gegenüber oxidativem Stress gestärkt. Da die frühste Schädigung in der EAE oxidativer Natur ist (Nikić et al. 2011), würde diese Hypothese zum Verlaufsunterschied in der frühen EAE passen. Allerdings wird diese Annahme durch die hier aufgeführten *in vitro* Versuche (Kapitel 3.2) entkräftet. Des Weiteren sei bedacht, dass die EAE die oxidativ geprägte MS-Pathogenese nur bedingt abbilden kann (Schuh et al. 2014). Mögliche, hierhingehende Rückschlüsse auf die MS sind also nochmals erschwert. Alternativ denkbar ist auch folgender Zusammenhang: Durch das Fehlen von Trpv4 könnte eine reduzierte Glutamatexzitotoxizität auftreten. Dieser Schädigungsweg tritt bei unterschiedlichsten neurodegenerativen Prozessen auf (Lipton & Rosenberg

1994) und konnte im Rahmen von induzierten Hirnischämien mit Trpv4 in Zusammenhang gesetzt werden. Hierbei wurde gezeigt, das Trpv4 in diesem Kontext N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptoren überaktiviert (Li et al. 2013). Da die Exzitotoxizität auch für die EAE als etablierter Pathomechanismus gilt (Pitt et al. 2000), könnte ähnliches also auch in hier gezeigten EAE-Versuch ablaufen und durch den Wegfall von Trpv4 reduziert werden. Weiter ist Trpv4 auch ein Ca²⁺permeabler Ionenkanal (Watanabe et al. 2003; Shibasaki et al. 2007) und bleibende intrazelluläre Ca²⁺-Konzentrationssteigerungen wirken neurotoxisch (Mattson 2007). So könnte, insofern neuronale Trpv4-Kanäle im Rahmen der EAE tatsächlich überaktiviert werden, auch über einen gesteigerten und Trpv4 vermittelten Ca²⁺⁻Influx, eine neuronale Schädigung vermittelt werden. Konzeptionell ist überdies denkbar, dass Trpv4, ähnlich dem verwandten Trpm4-Kanal (siehe Kapitel 1.2.2 und 1.4) redistributiert wird, mit allen schädlichen Konsequenzen (Schattling et al. 2012). Allerdings würden sich solche, durch eine Redistribution verursachte Schäden vorwiegend in der chronischen EAE-Phase durch einen Verlaufsunterschied zwischen den Versuchsgruppen zeigen und nicht in der Frühphase, wie in hier durchgeführten Versuch gesehen (Abb. 3). Somit erscheint die Hypothese der axonalen Ionenkanalredistribution für Trpv4 unwahrscheinlich.

Ebenso wichtig ist es auch andere zelluläre Einflüsse zu erwägen. In der EAE, die durch eine periphere Immunstimulation ausgelöst wird, gilt dies im Besonderen für Zellen des Immunsystems. Bisher ist wenig über die Expression und Funktion von Trpv4 in Immunzellen bekannt. Was derzeitig gezeigt werden konnte, ist eine Trpv4-Expression in Mikroglia und T-Zellen (Konno et al. 2012; Majhi et al. 2015). Die Erforschung der funktionellen Bedeutung des Kanals für diese Zelltypen steht aber erst am Anfang. Dennoch kann zusammenfassend gesagt werden, dass der Kanal an der Aktivierung der Zellen mitwirkt. In Mikrogliazellen scheint eine Agonisierung von Trpv4 die Aktivierung und Freisetzung inflammatorischer Faktoren zu hemmen (Konno et al. 2012), während für T-Zellen angeregt wurde, dass Trpv4 an der T-Zellrezeptor vermittelten Aktivierung ableiten, dass der Trpv4-KO möglicherweise die Aktivierung der T-Zellen hemmt. Die Erkenntnisse zu den Mikroglia, können nur schwer in den Kontext des hier gezeigten EAE-Verlaufs gesetzt werden.

Weiter ist der Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke (BHS) ein pathogenetischer Prozess der EAE an dem Trpv4 beteiligt sein könnte. Die Barrierefunktion der BHS wird neben anderen Bausteinen durch epitheliale Tight junctions und Astrozytenendfüße aufgebaut. An den Endfüßen wird Trpv4 funktional ausgebildet und ist an der Regulation der Mikrozirkulation beteiligt (Dunn et al. 2013). Nach einer induzierten Hirnischämie, schien Trpv4 aber die Zersetzung von Tight junctions durch Proteasen mit zu vermitteln (Jie et al. 2015). Ischämisches Gewebe teilt mitunter Parallelen zu läsionären Arealen der EAE (Trapp & Stys 2009; Li et al. 2013). Faktoren die nach Ischämie Trpv4 aktivierten, könnten auch im primär entzündlichen Kontext auftreten. Die unmittelbare Lokalisierung von Trpv4 an der BHS und bereits beschriebene Beteiligung an deren Zersetzung, könnten also auch eine Erklärung für den hier im EAE Versuch gesehenen, milderen Progress zu Versuchsbeginn darstellen. In Bezug auf die Astrozyten sei auch an dieser Stelle erwähnt, dass Trpv4 mit dem Prozess der reaktiven Astrogliose in Verbindung gebracht wurde (Bai & Lipski 2010; Butenko et al. 2012; Bai & Lipski 2014; Shi et al. 2013) und diese massiv nach entzündlicher Demyelinisierung auftritt (Popescu & Lucchinetti 2012). Ob im Rahmen einer zentralnervösen Entzündung, eine Antagonisierung und damit mögliche Hemmung der Astrogliose neuronal protektiv wirkt, ist ungewiss. Eine Antagonisierung von Trpv4 könnte kontraproduktiv wirken, da reaktive Astrozyten sich letztlich auch an der Kompensation des Myelinverlusts beteiligen (Williams et al. 2007; Anderson et al. 2016).

Zuletzt sei auch erwähnt, dass eine Diskrepanz besteht zwischen der zunehmend erkannten physiologischen Funktion von Trpv4 und dem relativ milden Phänotyp der *Trpv4*^{-/-} Tiere (Garcia-Elias et al. 2014). Möglicherweise wird also in *Trpv4*^{-/-} Tieren mittels langfristig veränderter Genexpression, der Wegfall des Trpv4 Proteins kompensiert. Um solch eine mögliche Kompensation experimentell zu umgehen, böten sich unterschiedliche Verfahren an: Zum einen konditionale *Trpv4 Knock-out* Tiere oder zum anderen spezifische pharmakologische Blockaden. Der konditionale *Knock-out* erlaubt eine Geninaktivierung, die gewebsspezifisch und teils pharmakologisch induzierbar ist (Nagy 2000). Für Trpv4 konnte diese Geninaktivierung bereits für die Epidermis (Moore et al. 2013) und das Knorpelgewebe (O'Conor et al. 2016) mittels der Cre-loxP-Technik herbeigeführt werden. Es bestünde also die Möglichkeit ebenfalls einen rein neuronalen *Knock*- out von Trpv4 herbeizuführen. Dies wurde aber bisher noch nicht durchgeführt. Andere Gene, die ZNS- sowie PNS-spezifisch mittels der Cre-loxP-Technik inaktiviert wurden. gingen darüber hinaus mit metabolischen und verhaltensbezogenen Veränderungen im Versuchstier einher (Declercq et al. 2015). Dies wiederrum macht es nötig andere, ZNS-spezifische Promoter der Cre-Rekombinase zu verwenden, oder aber zusätzliche Kontrollgruppen in den Versuchsverlauf zu integrieren. Im Rahmen der pharmakologischen Blockade von Trpv4 während einer EAE müssten diese Antagonisten bei möglichst hoher Trpv4-Spezifität, eine lange Halbwertszeit aufweisen und am besten oral verfügbar sein. Kurzwirksame und ausschließlich parenteral anwendbare Substanzen würden aufgrund der langen EAE-Versuchsdauer mit einer nicht tolerierbaren Belastung für die Versuchstiere einhergehen. Spezifische, langwirksame und oral verfügbare Trpv4-Antagonisten waren zum Zeitpunkt der Experimente nicht zu erwerben. Eine Anfrage an den Hersteller einer oral verfügbaren und aussichtvollen Substanz (GSK2193874, (Thorneloe et al. 2012)), wurde durch das Unternehmen abgelehnt. Soweit solche Pharmaka jedoch zukünftig zugänglich werden, könnten sie weitere interessante Einblicke zum Einfluss von Trpv4 auf eine entzündungsgebundene Neurodegeneration liefern.

Insgesamt liefert der EAE-Versuch ein interessantes Indiz, dass durch die Aufhebung der Trpv4-Funktion der anfängliche Erkrankungsprogress abgemildert werden kann. Dieses Ergebnis bedarf weiterer Replikation. Ferner kann noch nicht gesagt werden, wodurch dieser Effekt auftritt. Soweit eine direkte Neurotoxizität bestehen sollte, wird diese nach aktueller Studienlage am Ehesten durch eine Überaktivierung von Glutamatrezeptoren herbeigeführt (Shibasaki et al. 2007; Li et al. 2013; Jie et al. 2016). Dennoch sind viele weitere pathogenetische Zusammenhänge denkbar, denn Ansätze, die in anderen Kontexten erbracht wurden, könnten auch auf einen zentralnervösen Entzündungsprozess übertragen werden. Aktuell sticht dabei die Beteiligung von Trpv4 in der Funktion von Astrozyten und ihrer Reaktion auf pathologische ZNS-Zustände hervor, so dass hierhingehend gerichtete, weitere Untersuchungen interessante neue Einblicke liefern könnten.

5 Zusammenfassung

Die MS, eine chronisch-entzündliche Erkrankung des ZNS, verursacht bei einem Großteil der Erkrankten, irreversible neurologische Ausfälle (Thompson et al. 2018). Auftretende Behinderungen weisen dabei einen deutlichen Bezug zu neurodegenerativen Prozessen auf (Scalfari et al. 2014). Hierbei scheinen eine erworbene Dysfunktion von neuronalen Ionenkanälen und eine umfassende mitochondriale Schädigung entscheidende pathophysiologische Mechanismen zu sein (Friese et al. 2014). Begründete Hinweise bestehen, dass der TRPV4-Ionenkanal im Neuron hieran beteiligt sein könnte und er den Transkriptions-Coaktivator PGC-1 α reguliert, welcher die Zellrespiration positiv beeinflusst (Ye et al. 2012; Kumar et al. 2018).

Die vorliegende Arbeit untersuchte erstmalig den Einfluss von Trpv4 auf den Verlauf einer EAE, die Ergebnisse zeigten dabei, dass *Trpv4^{-/-}*-Tiere einen initial milderen Erkrankungsprogress erlebten. Eine Trpv4-Proteinfärbung in kultivierten, embryonalen Neuronen des Hippocampus gelang in dieser Arbeit nicht, was vermutlich durch eine zu hohe Detektionsschwelle des verwendeten Antikörpers und einer niedrigen Trpv4-Expression in jungen Tieren bedingt war. Eine funktionale Expression ist dennoch hoch wahrscheinlich. Außerdem konnte eine Reduktion der Trpv4-Transkription über die Kultivierungsdauer, bei zeitgleich steigender Pgc-1 α -Expression festgestellt werden. Da im Vergleich kultivierter *Trpv4*^{-/-}-Tieren mit Neurone von WT-Tieren keine Pqc-1α-Transkriptionsveränderung festgestellt werden konnte, scheint dennoch die vermutete, intraneuronal regulatorische Beeinflussung seitens Trpv4 unwahrscheinlich. Die Trpv4-Transkriptionsreduktion könnte im Zusammenhang mit der Zellreife stehen.

Insgesamt liefert die vorliegende Arbeit ein interessantes Indiz für eine Beteiligung von TRPV4 an einer entzündungsgebundenen Neurodegeneration des ZNS. Die *in vitro* Experimente deuten an, dass für zukünftige zelluläre Erforschung von TRPV4 im Kontext dieser Pathologie, in Maturierung oder Gattung unterschiedliche Zelltypen verwendet werden sollten.

54

5.1 Zusammenfassung in englischer Sprache

MS is a common, chronic-inflammatory disease of the CNS that causes irreversible neurological dysfunctions in most patients (Thompson et al. 2018). Observed disabilities are clearly related to neurodegenerative processes (Scalfari et al. 2014). Even though mechanisms of neurodegeneration are complex, an acquired dysfunction of ion channels and broad mitochondrial damage are crucial to this process (Friese et al. 2014). There is good reason to believe that the neuronally-expressed TRPV4 ion channel is involved within this action and may further regulate the PGC-1 α transcriptional-coactivator, which is an enhancer of cell respiration.

This work explores for the first time the interference of Trpv4 on the disease course of an EAE mouse model. Gained results show that $Trpv4^{-/-}$ -animals experience milder progression of the initial disease course (Ye et al. 2012; Kumar et al. 2018). Immuncytochemical staining for Trpv4 in embryonic, hippocampal neurons have been unsuccessful, which is believed to be mainly due to an insensitivity of the applied antibody and a low neuronal Trpv4 expression in young donor animals. Nevertheless, functional expression is highly probable. Another experiment showed a reduction of the Trpv4-transcript over a defined culture period, with a simultaneous increase in Pgc-1 α expression. Still, since no $Pgc-1\alpha$ transcriptional alteration could be detected in cultured neurons from $Trpv4^{-/-}$ animals compared with WT-animals, the suspected intraneuronal regulatory influence of Trpv4 seems unlikely. The reduction of Trpv4-expression over the culture period, could be related to cell maturity.

Overall, this work provides an interesting indication for the involvement of TRPV4 in an inflammatory, neurodegenerative disorder of the CNS. The *in vitro* experiments suggest that other cell types, different in maturation or genus, may be used for a possible further cellular study of Trpv4 in the context of this pathology.

6 Abkürzungsverzeichnis

	o	Grad
	Δ	Differenz (Delta)
	μ	Mikro (10 ⁻⁶)
Α	Abb.	Abbildung
	ANOVA	Varianzanalyse
	AraC	Arabinosylcytosine
	ATP	Adenosintriphosphat
В	BHS	Blut-Hirn-Schranke
	bp	Basenpaar
	bzw.	beziehungsweise
С	С	Celsius
	Ca ²⁺	Kalziumion
	CD4⁺	cluster of differentiation 4, Oberflächenprotein
	CD8⁺	cluster of differentiation 8, Oberflächenprotein
	cDNA	complementary deoxyribonucleic acid, komplementäre
		Desoxyribonukleinsäure
	CO ₂	Kohlenstoffdioxid
	СООН	Carboxygruppe
D	DIV	<i>Days in vitro,</i> Tage in Kultur
	dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
	D-MEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
	DNA	deoxyribonucleid acid, Desoxyribonukleinsäure
E	EAE	Experimental autoimmune Encephalomyelitis,
		experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
	EDTA	Ethylendiaminteratacetat

	et. al	et alii, lateinisch für "und Andere"
F	FCS	fetal calf serum, fetales Kalbserum
G	g	Gramm
	GM	grey matter, graue Hirnsubstanz
Н	h	Stunde
	H ₂ O	Wasser
	HBSS	Hanks Balanced Salt Solution, Hanks' ausgeglichene
		Salzlösung
1	lg	Immunglobulin
J		
к	K⁺	Kaliumion
	Кар.	Kapitel
	kilo	tausend
	ко	Knock out, mittels genetischer Manipulation herbeigeführte
		Inaktivierung eines Genes
L	L	Liter
м	m	Milli (10 ⁻³⁾
	Μ	Molar (mol L ⁻¹⁾
	MAP2	<i>microtubule associated protein</i> 2, Neuronenmarker Microtubulus-assoziiertes Protein 2
	MgCl ₂	Magnesiumchlorid
	min	Minute(n)
	MOG	Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein
	mRNA	messangerRNA, transskribierte Ribonukleinsäure
	mtDNA	mitochondriale DNA (Desoxyribonukleinsäure, siehe unter
	MS	D.)
		Multiple Sklerose
N	n	Stichprobe
1	1	

	NAWM	normal-appearing white matter, histologisch noch nicht beeinträchtigte, weiße Hirnsubstanz
	NCX	natrium-calcium Exchanger, Natrium-Kalzium Austauscher
	n.d.	nicht detektierbar
	NDS	normal donkey serum, normales Eselserum
	NH ₂	Aminogruppe
	NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
	NSF-1	neural survival factor – 1, neuronaler Stimulationfaktor-1
0	O ₂	Sauerstoff
	OXPHOS	oxidativen Phosphorylierung
Р	PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
	PCR	polymerase chain reaction, Polymerase Kettenreaktion
	PDL	Poly-D-Lysin
	PFA	Paraformaldehyd
	PGC-1α	peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1, Transkriptions-Coaktivator
	Pgc-1α	Gen des peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1
	рН	Negativer, dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
	p.m.	Post mortem, nach dem Tode
	PNGM	Primary Neuron Growth Medium, primäres Nerven- Wachstumsmedium
	РТХ	Pertussistoxin
Q	qRT-PCR	quantitative Real-Time PCR
R	RNA	Ribonucleid Acid, Ribonukleinsäure
	ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
	RT	Raumtemperatur
S	sec	Sekunden

т	TRP	transient receptor potential
	TRPM	Melastin Unterfamilie der TRP-Ionenkanäle
	TRPV	Vanilloid Unterfamilie der TRP-Ionenkanäle
	Trpv4	Gen des Mitglieds 4 der Vanilloid-Unterfamilie
	TRPV4	Protein des Mitglieds 4 der Vanilloid-Unterfamilie
	Тbp	Gen des TATA-Box <i>binding</i> Proteins
U	UKE	Universitätsklinikum Hamburg- Eppendorf
	USA	United States of America, Vereinigte Staaten von Amerika
	UV	ultraviolett
V		
w	WT	Wildtyp
	WM	white matter, weiße Hirnsubstanz
x		
Y		
z	ZNS	Zentrales Nervensystem

7 Literaturverzeichnis

- Aktas, O. et al., 2005. Neuronal damage in autoimmune neuroinflammation mediated by the death ligand TRAIL. *Neuron*, 46(3), pp.421–432.
- Alessandri-Haber, N. et al., 2006. A transient receptor potential vanilloid 4dependent mechanism of hyperalgesia is engaged by concerted action of inflammatory mediators. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 26(14), pp.3864–3874.
- Alessandri-Haber, N. et al., 2003. Hypotonicity induces TRPV4-mediated nociception in rat. *Neuron*, 39(3), pp.497–511.
- Alessandri-Haber, N. et al., 2004. Transient receptor potential vanilloid 4 is essential in chemotherapy-induced neuropathic pain in the rat. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 24(18), pp.4444–4452.
- Anderson, M.A. et al., 2016. Astrocyte scar formation aids central nervous system axon regeneration. *Nature*, 532(7598), pp.195–200.
- Androdias, G. et al., 2010. Meningeal T cells associate with diffuse axonal loss in multiple sclerosis spinal cords. *Annals of Neurology*, 68(4), pp.465–476.
- Bai, J.-Z. & Lipski, J., 2010. Differential expression of TRPM2 and TRPV4 channels and their potential role in oxidative stress-induced cell death in organotypic hippocampal culture. *Neurotoxicology*, 31(2), pp.204–214.
- Bai, J.-Z. & Lipski, J., 2014. Involvement of TRPV4 channels in Aβ(40)-induced hippocampal cell death and astrocytic Ca(2+) signalling. *Neurotoxicology*, 41, pp.64–72.
- Barkhof, F. et al., 2009. Imaging outcomes for neuroprotection and repair in multiple sclerosis trials. *Nature reviews. Neurology*, 5(5), pp.256–266.
- Barnett, M.H. & Prineas, J.W., 2004. Relapsing and remitting multiple sclerosis: pathology of the newly forming lesion. *Annals of Neurology*, 55(4), pp.458–468.
- Baxter, A.G., 2007. The origin and application of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Nature Reviews Immunology*, 7(11), pp.904–912.
- Beecham, A.H. et al., 2013. Analysis of immune-related loci identifies 48 new susceptibility variants for multiple sclerosis. *Nature Genetics*, 45(11), pp.1353– 1360.
- Belbasis, L. et al., 2015. Environmental risk factors and multiple sclerosis: an umbrella review of systematic reviews and meta-analyses. *The Lancet Neurology*, 14(3), pp.263–273.

- Benfenati, V. et al., 2011. An aquaporin-4/transient receptor potential vanilloid 4 (AQP4/TRPV4) complex is essential for cell-volume control in astrocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(6), pp.2563–2568.
- Benfenati, V. et al., 2007. Expression and functional characterization of transient receptor potential vanilloid-related channel 4 (TRPV4) in rat cortical astrocytes. *Neuroscience*, 148(4), pp.876–892.
- Bjartmar, C. et al., 2000. Neurological disability correlates with spinal cord axonal loss and reduced N-acetyl aspartate in chronic multiple sclerosis patients. *Annals of Neurology*, 48(6), pp.893–901.
- Bjartmar, C., Wujek, J.R. & Trapp, B.D., 2003. Axonal loss in the pathology of MS: consequences for understanding the progressive phase of the disease. *Journal of the neurological sciences*, 206(2), pp.165–171.
- Blauth, K. et al., 2015. Antibodies produced by clonally expanded plasma cells in multiple sclerosis cerebrospinal fluid cause demyelination of spinal cord explants. *Acta Neuropathologica*, 130(6), pp.765–781.
- Bonati, U. et al., 2011. Cervical cord and brain grey matter atrophy independently associate with long-term MS disability. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 82(4), pp.471–472.
- Broadwater, L. et al., 2011. Analysis of the mitochondrial proteome in multiple sclerosis cortex. *Biochimica et biophysica acta*, 1812(5), pp.630–641.
- Brodin, P. et al., 2015. Variation in the human immune system is largely driven by non-heritable influences. *Cell*, 160(1-2), pp.37–47.
- Browne, P. et al., 2014. Atlas of Multiple Sclerosis 2013: A growing global problem with widespread inequity. *Neurology*, 83(11), pp.1022–1024.
- Buckley, C.D. et al., 2015. Stromal cells in chronic inflammation and tertiary lymphoid organ formation. *Annual Review of Immunology*, 33, pp.715–745.
- Butenko, O. et al., 2012. The increased activity of TRPV4 channel in the astrocytes of the adult rat hippocampus after cerebral hypoxia/ischemia. *PLoS ONE*, 7(6), p.e39959.
- Calabrese, M. & Gallo, P., 2009. Magnetic resonance evidence of cortical onset of multiple sclerosis. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*, 15(8), pp.933–941.
- Calabresi, P.A., 2018. Advances in multiple sclerosis: from reduced relapses to remedies. *The Lancet Neurology*, 17(1), pp.10–12.
- Campbell, G. & Mahad, D., 2018. Neurodegeneration in Progressive Multiple Sclerosis. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*.
- Campbell, G.R. et al., 2010. Mitochondrial DNA deletions and neurodegeneration in multiple sclerosis. *Annals of Neurology*, 69(3), pp.481–492.

- Castellani, L. et al., 2014. Exercise training protects against an acute inflammatory insult in mouse epididymal adipose tissue. *Journal of applied physiology* (*Bethesda, Md. : 1985*), 116(10), pp.1272–1280.
- Chard, D.T. et al., 2003. The longitudinal relation between brain lesion load and atrophy in multiple sclerosis: a 14 year follow up study. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 74(11), pp.1551–1554.
- Chen, J.T. et al., 2004. Relating neocortical pathology to disability progression in multiple sclerosis using MRI. *NeuroImage*, 23(3), pp.1168–1175.
- Chitnis, T. et al., 2007. Elevated neuronal expression of CD200 protects Wlds mice from inflammation-mediated neurodegeneration. *The American Journal of Pathology*, 170(5), pp.1695–1712.
- Chora, Â.A. et al., 2007. Heme oxygenase-1 and carbon monoxide suppress autoimmune neuroinflammation. *The Journal of clinical investigation*, 117(2), pp.438–447.
- Ciccarelli, O. et al., 2003. A study of the mechanisms of normal-appearing white matter damage in multiple sclerosis using diffusion tensor imaging--evidence of Wallerian degeneration. *Journal of Neurology*, 250(3), pp.287–292.
- Ciura, S. et al., 2018. Trpv4 Mediates Hypotonic Inhibition of Central Osmosensory Neurons via Taurine Gliotransmission. *Cell reports*, 23(8), pp.2245–2253.
- Compston, A. & Coles, A., 2008. Multiple sclerosis. *Lancet (London, England)*, 372(9648), pp.1502–1517.
- Craner, M.J., Hains, B.C., et al., 2004. Co-localization of sodium channel Nav1.6 and the sodium-calcium exchanger at sites of axonal injury in the spinal cord in EAE. *Brain*, 127(Pt 2), pp.294–303.
- Craner, M.J., Newcombe, J., et al., 2004. Molecular changes in neurons in multiple sclerosis: altered axonal expression of Nav1.2 and Nav1.6 sodium channels and Na+/Ca2+ exchanger. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(21), pp.8168–8173.
- Cui, L. et al., 2006. Transcriptional repression of PGC-1alpha by mutant huntingtin leads to mitochondrial dysfunction and neurodegeneration. *Cell*, 127(1), pp.59–69.
- Damann, N., Voets, T. & Nilius, B., 2008. TRPs in our senses. *Current biology : CB*, 18(18), pp.R880–9.
- De Stefano, N. et al., 2010. Assessing brain atrophy rates in a large population of untreated multiple sclerosis subtypes. *Neurology*, 74(23), pp.1868–1876.
- De Stefano, N. et al., 2003. Evidence of early cortical atrophy in MS: relevance to white matter changes and disability. *Neurology*, 60(7), pp.1157–1162.

Declercq, J. et al., 2015. Metabolic and Behavioural Phenotypes in Nestin-Cre

Mice Are Caused by Hypothalamic Expression of Human Growth Hormone. *PLoS ONE*, 10(8), p.e0135502.

- Delany, N.S. et al., 2001. Identification and characterization of a novel human vanilloid receptor-like protein, VRL-2. *Physiological genomics*, 4(3), pp.165–174.
- Dendrou, C.A., Fugger, L. & Friese, M.A., 2015. Immunopathology of multiple sclerosis. *Nature Reviews Immunology*, 15(9), pp.545–558.
- Deng, H.-X. et al., 2010. Scapuloperoneal spinal muscular atrophy and CMT2C are allelic disorders caused by alterations in TRPV4. *Nature Genetics*, 42(2), pp.165–169.
- Dippel, F.W. et al., 2015. Krankenversicherungsdaten bestätigen hohe Prävalenz der Multiplen Sklerose. *Aktuelle Neurologie*, 42(04), pp.191–196.
- Dotti, C.G., Sullivan, C.A. & Banker, G.A., 1988. The establishment of polarity by hippocampal neurons in culture. *Journal of Neuroscience*, 8(4), pp.1454–1468.
- Duncan, G.J. et al., 2017. Myelin regulatory factor drives remyelination in multiple sclerosis. *Acta Neuropathologica*, 134(3), pp.403–422.
- Dunn, K.M. et al., 2013. TRPV4 channels stimulate Ca2+-induced Ca2+ release in astrocytic endfeet and amplify neurovascular coupling responses. *Proceedings* of the National Academy of Sciences of the United States of America, 110(15), pp.6157–6162.
- Dutta, R. et al., 2006. Mitochondrial dysfunction as a cause of axonal degeneration in multiple sclerosis patients. *Annals of Neurology*, 59(3), pp.478–489.
- Dziedzic, T. et al., 2010. Wallerian degeneration: a major component of early axonal pathology in multiple sclerosis. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)*, 20(5), pp.976–985.
- Elliott, C. et al., 2012. Functional identification of pathogenic autoantibody responses in patients with multiple sclerosis. *Brain*, 135(Pt 6), pp.1819–1833.
- Evangelou, N. et al., 2000. Regional axonal loss in the corpus callosum correlates with cerebral white matter lesion volume and distribution in multiple sclerosis. *Brain*, 123 (Pt 9), pp.1845–1849.
- Filippi, M. et al., 2003. Evidence for widespread axonal damage at the earliest clinical stage of multiple sclerosis. *Brain*, 126(Pt 2), pp.433–437.
- Filippi, M. et al., 2013. Gray matter damage predicts the accumulation of disability 13 years later in MS. *Neurology*, 81(20), pp.1759–1767.
- Fischer, M.T. et al., 2013. Disease-specific molecular events in cortical multiple sclerosis lesions. *Brain*, 136(Pt 6), pp.1799–1815.
- Fischer, M.T. et al., 2012. NADPH oxidase expression in active multiple sclerosis lesions in relation to oxidative tissue damage and mitochondrial injury. *Brain*,

135(Pt 3), pp.886-899.

- Fisher, E. et al., 2008. Gray matter atrophy in multiple sclerosis: a longitudinal study. *Annals of Neurology*, 64(3), pp.255–265.
- Fisniku, L.K. et al., 2008. Gray matter atrophy is related to long-term disability in multiple sclerosis. *Annals of Neurology*, 64(3), pp.247–254.
- Flachenecker, P. et al., 2017. New insights into the burden and costs of multiple sclerosis in Europe: Results for Germany. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*, 23(2_suppl), pp.78–90.
- Foster, R.E., Whalen, C.C. & Waxman, S.G., 1980. Reorganization of the axon membrane in demyelinated peripheral nerve fibers: morphological evidence. *Science (New York, N.Y.)*, 210(4470), pp.661–663.
- Friese, M.A., 2016. Widespread synaptic loss in multiple sclerosis. *Brain*, 139(Pt 1), pp.2–4.
- Friese, M.A. et al., 2007. Acid-sensing ion channel-1 contributes to axonal degeneration in autoimmune inflammation of the central nervous system. *Nature Medicine*, 13(12), pp.1483–1489.
- Friese, M.A. et al., 2008. Opposing effects of HLA class I molecules in tuning autoreactive CD8+ T cells in multiple sclerosis. *Nature Medicine*, 14(11), pp.1227–1235.
- Friese, M.A. et al., 2006. The value of animal models for drug development in multiple sclerosis. *Brain*, 129(Pt 8), pp.1940–1952.
- Friese, M.A., Schattling, B. & Fugger, L., 2014. Mechanisms of neurodegeneration and axonal dysfunction in multiple sclerosis. *Nature reviews. Neurology*, 10(4), pp.225–238.
- Frischer, J.M. et al., 2015. Clinical and pathological insights into the dynamic nature of the white matter multiple sclerosis plaque. *Annals of Neurology*, 78(5), pp.710–721.
- Frischer, J.M. et al., 2009. The relation between inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis brains. *Brain*, 132(Pt 5), pp.1175–1189.
- Fünfschilling, U. et al., 2012. Glycolytic oligodendrocytes maintain myelin and long-term axonal integrity. *Nature*, 485(7399), pp.517–521.
- Gadjanski, I. et al., 2009. Role of n-type voltage-dependent calcium channels in autoimmune optic neuritis. *Annals of Neurology*, 66(1), pp.81–93.
- Garcia-Elias, A. et al., 2014. The TRPV4 channel. *Handbook of experimental pharmacology*, 222, pp.293–319.
- Giannetti, P. et al., 2015. Increased PK11195-PET binding in normal-appearing white matter in clinically isolated syndrome. *Brain*, 138(Pt 1), pp.110–119.

- Goodin, D.S. et al., 2012. Cause of death in MS: long-term follow-up of a randomised cohort, 21 years after the start of the pivotal IFNβ-1b study. *BMJ* open, 2(6).
- Goslin, K. & Banker, G., 1989. Experimental observations on the development of polarity by hippocampal neurons in culture. *The Journal of cell biology*, 108(4), pp.1507–1516.
- Greka, A. et al., 2003. TRPC5 is a regulator of hippocampal neurite length and growth cone morphology. *Nature Neuroscience*, 6(8), pp.837–845.
- Güler, A.D. et al., 2002. Heat-evoked activation of the ion channel, TRPV4. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 22(15), pp.6408–6414.
- Haghikia, A. et al., 2013. Therapies for multiple sclerosis: translational achievements and outstanding needs. *Trends in Molecular Medicine*, 19(5), pp.309–319.
- Haider, L. et al., 2014. Multiple sclerosis deep grey matter: the relation between demyelination, neurodegeneration, inflammation and iron. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 85(12), pp.1386–1395.
- Haider, L. et al., 2011. Oxidative damage in multiple sclerosis lesions. *Brain*, 134(Pt 7), pp.1914–1924.
- Haider, L. et al., 2016. The topograpy of demyelination and neurodegeneration in the multiple sclerosis brain. *Brain*, 139(Pt 3), pp.807–815.
- Hametner, S. et al., 2013. Iron and neurodegeneration in the multiple sclerosis brain. *Annals of Neurology*, 74(6), pp.848–861.
- Harkiolaki, M. et al., 2009. T cell-mediated autoimmune disease due to low-affinity crossreactivity to common microbial peptides. *Immunity*, 30(3), pp.348–357.
- Hasan, K.M. et al., 2011. Multimodal quantitative magnetic resonance imaging of thalamic development and aging across the human lifespan: implications to neurodegeneration in multiple sclerosis. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 31(46), pp.16826–16832.
- Hasegawa, K. et al., 2016. Promotion of mitochondrial biogenesis by necdin protects neurons against mitochondrial insults. *Nature communications*, 7, p.10943.
- Hauser, S.L. et al., 2008. B-cell depletion with rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis. *New England Journal of Medicine*, 358(7), pp.676–688.
- Hauser, S.L. et al., 1986. Immunohistochemical analysis of the cellular infiltrate in multiple sclerosis lesions. *Annals of Neurology*, 19(6), pp.578–587.
- Hemmer, B., Kerschensteiner, M. & Korn, T., 2015. Role of the innate and adaptive immune responses in the course of multiple sclerosis. *The Lancet Neurology*, 14(4), pp.406–419.

- Henderson, A.P.D. et al., 2009. Multiple sclerosis: distribution of inflammatory cells in newly forming lesions. *Annals of Neurology*, 66(6), pp.739–753.
- Hochmeister, S. et al., 2006. Dysferlin is a new marker for leaky brain blood vessels in multiple sclerosis. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, 65(9), pp.855–865.
- Holland, C.M. et al., 2012. The relationship between normal cerebral perfusion patterns and white matter lesion distribution in 1,249 patients with multiple sclerosis. *Journal of neuroimaging : official journal of the American Society of Neuroimaging*, 22(2), pp.129–136.
- Holstiege, J. et al., 2017. Epidemiologie der Multiplen Sklerose eine populationsbasierte deutschlandweite Studie.
- Hong, Z. et al., 2016. Transient Receptor Potential Vanilloid 4-Induced Modulation of Voltage-Gated Sodium Channels in Hippocampal Neurons. *Molecular Neurobiology*, 53(1), pp.759–768.
- Howarth, C., Gleeson, P. & Attwell, D., 2012. Updated energy budgets for neural computation in the neocortex and cerebellum. *Journal of cerebral blood flow* and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism, 32(7), pp.1222–1232.
- Howell, O.W. et al., 2011. Meningeal inflammation is widespread and linked to cortical pathology in multiple sclerosis. *Brain*, 134(Pt 9), pp.2755–2771.
- Jang, Y. et al., 2012. Axonal neuropathy-associated TRPV4 regulates neurotrophic factor-derived axonal growth. *Journal of Biological Chemistry*, 287(8), pp.6014–6024.
- Jie, P. et al., 2016. Activation of Transient Receptor Potential Vanilloid 4 is Involved in Neuronal Injury in Middle Cerebral Artery Occlusion in Mice. *Molecular Neurobiology*, 53(1), pp.8–17.
- Jie, P. et al., 2015. Blockage of transient receptor potential vanilloid 4 inhibits brain edema in middle cerebral artery occlusion mice. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9, p.141.
- Johnson, D.A. et al., 2010. The absence of the pro-antioxidant transcription factor Nrf2 exacerbates experimental autoimmune encephalomyelitis. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*, 114(2), pp.237–246.
- Jürgens, T. et al., 2016. Reconstruction of single cortical projection neurons reveals primary spine loss in multiple sclerosis. *Brain*, 139(Pt 1), pp.39–46.
- Kauer, J.A. & Gibson, H.E., 2009. Hot flash: TRPV channels in the brain. *Trends in Neurosciences*, 32(4), pp.215–224.
- Kim, J.Y. et al., 2010. HDAC1 nuclear export induced by pathological conditions is essential for the onset of axonal damage. *Nature Neuroscience*, 13(2), pp.180–189.

- Knier, B. et al., 2016. Optical coherence tomography indicates disease activity prior to clinical onset of central nervous system demyelination. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*, 22(7), pp.893–900.
- Kolasinski, J. et al., 2012. A combined post-mortem magnetic resonance imaging and quantitative histological study of multiple sclerosis pathology. *Brain*, 135(Pt 10), pp.2938–2951.
- Konno, M. et al., 2012. Stimulation of transient receptor potential vanilloid 4 channel suppresses abnormal activation of microglia induced by lipopolysaccharide. *Glia*, 60(5), pp.761–770.
- Kornek, B. et al., 2001. Distribution of a calcium channel subunit in dystrophic axons in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain*, 124(Pt 6), pp.1114–1124.
- Kornek, B. et al., 2000. Multiple sclerosis and chronic autoimmune encephalomyelitis: a comparative quantitative study of axonal injury in active, inactive, and remyelinated lesions. *The American Journal of Pathology*, 157(1), pp.267–276.
- Kuhle, J. et al., 2011. Neurofilament heavy chain in CSF correlates with relapses and disability in multiple sclerosis. *Neurology*, 76(14), pp.1206–1213.
- Kumar, H. et al., 2018. TRPV4: a Sensor for Homeostasis and Pathological Events in the CNS. *Molecular Neurobiology*, 2(4), p.1313.
- Kutzelnigg, A. et al., 2005. Cortical demyelination and diffuse white matter injury in multiple sclerosis. *Brain*, 128(Pt 11), pp.2705–2712.
- Lambert, J.C. et al., 2013. Meta-analysis of 74,046 individuals identifies 11 new susceptibility loci for Alzheimer's disease. *Nature Genetics*, 45(12), pp.1452–1458.
- Lassmann, H., 2018. Multiple Sclerosis Pathology. Cold Spring Harbor perspectives in medicine.
- Lassmann, H. & van Horssen, J., 2016. Oxidative stress and its impact on neurons and glia in multiple sclerosis lesions. *Biochimica et biophysica acta*, 1862(3), pp.506–510.
- Lassmann, H. et al., 1997. Remyelination in multiple sclerosis. *Multiple sclerosis* (*Houndmills, Basingstoke, England*), 3(2), pp.133–136.
- Lee, H. et al., 2005. Altered thermal selection behavior in mice lacking transient receptor potential vanilloid 4. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 25(5), pp.1304–1310.
- Lee, J. & Choe, S.Y., 2014. Age-related changes in the distribution of transient receptor potential vanilloid 4 channel (TRPV4) in the central nervous system of rats. *Journal of Molecular Histology*, 45(5), pp.497–505.
- Lee, J. et al., 2012. Region-specific changes in the immunoreactivity of TRPV4

expression in the central nervous system of SOD1(G93A) transgenic mice as an in vivo model of amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Molecular Histology*, 43(6), pp.625–631.

- Lee, Y. et al., 2012. Oligodendroglia metabolically support axons and contribute to neurodegeneration. *Nature*, 487(7408), pp.443–448.
- Li, L. et al., 2013. Activation of Transient Receptor Potential Vanilloid 4 Increases NMDA-Activated Current in Hippocampal Pyramidal Neurons. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 7, p.17.
- Liedtke, W. & Friedman, J.M., 2003. Abnormal osmotic regulation in trpv4-/- mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(23), pp.13698–13703.
- Liedtke, W. et al., 2000. Vanilloid receptor-related osmotically activated channel (VR-OAC), a candidate vertebrate osmoreceptor. *Cell*, 103(3), pp.525–535.
- Lin, J. et al., 2004. Defects in adaptive energy metabolism with CNS-linked hyperactivity in PGC-1alpha null mice. *Cell*, 119(1), pp.121–135.
- Lin, J., Handschin, C. & Spiegelman, B.M., 2005. Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators. *Cell metabolism*, 1(6), pp.361–370.
- Linker, R.A. et al., 2011. Fumaric acid esters exert neuroprotective effects in neuroinflammation via activation of the Nrf2 antioxidant pathway. *Brain*, 134(Pt 3), pp.678–692.
- Lipton, S.A. & Rosenberg, P.A., 1994. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *New England Journal of Medicine*, 330(9), pp.613–622.
- Lu, F. et al., 2000. Oxidative damage to mitochondrial DNA and activity of mitochondrial enzymes in chronic active lesions of multiple sclerosis. *Journal of the neurological sciences*, 177(2), pp.95–103.
- Lucchinetti, C. et al., 2000. Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Annals of Neurology*, 47(6), pp.707–717.
- Lucchinetti, C.F. et al., 2011. Inflammatory cortical demyelination in early multiple sclerosis. *New England Journal of Medicine*, 365(23), pp.2188–2197.
- Lundström, W. et al., 2013. Soluble IL7Rα potentiates IL-7 bioactivity and promotes autoimmunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(19), pp.E1761–70.
- Lv, J. et al., 2018. PGC-1α sparks the fire of neuroprotection against neurodegenerative disorders. *Ageing research reviews*, 44, pp.8–21.
- Magliozzi, R. et al., 2010. A Gradient of neuronal loss and meningeal inflammation in multiple sclerosis. *Annals of Neurology*, 68(4), pp.477–493.

Magliozzi, R. et al., 2006. Meningeal B-cell follicles in secondary progressive

multiple sclerosis associate with early onset of disease and severe cortical pathology. *Brain*, 130(4), pp.1089–1104.

- Mahad, D. et al., 2009. Mitochondrial changes within axons in multiple sclerosis. *Brain*, 132(Pt 5), pp.1161–1174.
- Mahad, D. et al., 2008. Mitochondrial defects in acute multiple sclerosis lesions. *Brain*, 131(Pt 7), pp.1722–1735.
- Mahad, D., Trapp, B.D. & Lassmann, H., 2015. Pathological mechanisms in progressive multiple sclerosis. *The Lancet Neurology*, 14(2), pp.183–193.
- Majhi, R.K. et al., 2015. Functional expression of TRPV channels in T cells and their implications in immune regulation. *The FEBS journal*, 282(14), pp.2661–2681.
- Marik, C. et al., 2007. Lesion genesis in a subset of patients with multiple sclerosis: a role for innate immunity? *Brain*, 130(Pt 11), pp.2800–2815.
- Marrelli, S.P. et al., 2007. PLA2 and TRPV4 channels regulate endothelial calcium in cerebral arteries. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 292(3), pp.H1390–7.
- Mattson, M.P., 2007. Calcium and neurodegeneration. *Aging cell*, 6(3), pp.337–350.
- Mayo, L. et al., 2014. Regulation of astrocyte activation by glycolipids drives chronic CNS inflammation. *Nature Medicine*, 20(10), pp.1147–1156.
- Miller, D.H. et al., 2002. Measurement of atrophy in multiple sclerosis: pathological basis, methodological aspects and clinical relevance. *Brain*, 125(Pt 8), pp.1676–1695.
- Mizuno, A. et al., 2003. Impaired osmotic sensation in mice lacking TRPV4. *American journal of physiology. Cell physiology*, 285(1), pp.C96–101.
- Moll, C. et al., 1991. Increase of sodium channels in demyelinated lesions of multiple sclerosis. *Brain research*, 556(2), pp.311–316.
- Montalban, X. et al., 2017. Ocrelizumab versus Placebo in Primary Progressive Multiple Sclerosis. *New England Journal of Medicine*, 376(3), pp.209–220.
- Moore, C. et al., 2013. UVB radiation generates sunburn pain and affects skin by activating epidermal TRPV4 ion channels and triggering endothelin-1 signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(34), pp.E3225–34.
- Morelli, M.B. et al., 2013. TRP channels: new potential therapeutic approaches in CNS neuropathies. CNS & neurological disorders drug targets, 12(2), pp.274–293.
- Murphy, M.P., 2009. How mitochondria produce reactive oxygen species. *The Biochemical journal*, 417(1), pp.1–13.

- Münz, C. et al., 2009. Antiviral immune responses: triggers of or triggered by autoimmunity? *Nature Reviews Immunology*, 9(4), pp.246–258.
- Nagy, A., 2000. Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring. *Genesis (New York, N.Y. : 2000)*, 26(2), pp.99–109.
- Narita, K. et al., 2015. TRPV4 regulates the integrity of the blood-cerebrospinal fluid barrier and modulates transepithelial protein transport. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 29(6), pp.2247–2259.
- Nijland, P.G. et al., 2014. Astroglial PGC-1alpha increases mitochondrial antioxidant capacity and suppresses inflammation: implications for multiple sclerosis. *Acta neuropathologica communications*, 2, p.170.
- Nikić, I. et al., 2011. A reversible form of axon damage in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Nature Medicine*, 17(4), pp.495–499.
- Nilius, B. & Voets, T., 2013. The puzzle of TRPV4 channelopathies. *EMBO reports*, 14(2), pp.152–163.
- Oberwahrenbrock, T. et al., 2013. Retinal ganglion cell and inner plexiform layer thinning in clinically isolated syndrome. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*, 19(14), pp.1887–1895.
- Offen, D. et al., 2000. Mice overexpressing Bcl-2 in their neurons are resistant to myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG)-induced experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *Journal of molecular neuroscience : MN*, 15(3), pp.167–176.
- Ontaneda, D. et al., 2017. Progressive multiple sclerosis: prospects for disease therapy, repair, and restoration of function. *Lancet (London, England)*, 389(10076), pp.1357–1366.
- Ouardouz, M., Coderre, E., Basak, A., et al., 2009. Glutamate receptors on myelinated spinal cord axons: I. GluR6 kainate receptors. *Annals of Neurology*, 65(2), pp.151–159.
- Ouardouz, M., Coderre, E., Zamponi, G.W., et al., 2009. Glutamate receptors on myelinated spinal cord axons: II. AMPA and GluR5 receptors. *Annals of Neurology*, 65(2), pp.160–166.
- O'Conor, C.J. et al., 2016. Cartilage-Specific Knockout of the Mechanosensory Ion Channel TRPV4 Decreases Age-Related Osteoarthritis. *Scientific reports*, 6(1), p.29053.
- Paling, D. et al., 2013. Sodium accumulation is associated with disability and a progressive course in multiple sclerosis. *Brain*, 136(Pt 7), pp.2305–2317.
- Petersen, G. et al., 2014. Epidemiologie der Multiplen Sklerose in Deutschland. *Der Nervenarzt*, 85(8), pp.990–998.

- Peterson, J.W. et al., 2001. Transected neurites, apoptotic neurons, and reduced inflammation in cortical multiple sclerosis lesions. *Annals of Neurology*, 50(3), pp.389–400.
- Pikor, N.B. et al., 2015. Meningeal Tertiary Lymphoid Tissues and Multiple Sclerosis: A Gathering Place for Diverse Types of Immune Cells during CNS Autoimmunity. *Frontiers in immunology*, 6, p.657.
- Pitt, D., Werner, P. & Raine, C.S., 2000. Glutamate excitotoxicity in a model of multiple sclerosis. *Nature Medicine*, 6(1), pp.67–70.
- Popescu, B.F.G. & Lucchinetti, C.F., 2012. Pathology of demyelinating diseases. *Annual review of pathology*, 7, pp.185–217.
- Popescu, B.F.G. et al., 2011. A case of multiple sclerosis presenting with inflammatory cortical demyelination. *Neurology*, 76(20), pp.1705–1710.
- Prineas, J.W. et al., 1993. Multiple sclerosis: remyelination of nascent lesions. *Annals of Neurology*, 33(2), pp.137–151.
- Puigserver, P. et al., 1998. A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell*, 92(6), pp.829–839.
- Qi, X. et al., 2006. Mitochondrial protein nitration primes neurodegeneration in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Biological Chemistry*, 281(42), pp.31950–31962.
- Ramagopalan, S.V. et al., 2010. Multiple sclerosis: risk factors, prodromes, and potential causal pathways. *The Lancet Neurology*, 9(7), pp.727–739.
- Ramagopalan, S.V., Dyment, D.A. & Ebers, G.C., 2008. Genetic epidemiology: the use of old and new tools for multiple sclerosis. *Trends in Neurosciences*, 31(12), pp.645–652.
- Rojas, J.I. et al., 2015. Brain atrophy in radiologically isolated syndromes. *Journal* of neuroimaging : official journal of the American Society of Neuroimaging, 25(1), pp.68–71.
- Ryan, S.D. et al., 2013. Isogenic human iPSC Parkinson's model shows nitrosative stress-induced dysfunction in MEF2-PGC1α transcription. *Cell*, 155(6), pp.1351–1364.
- Sawcer, S. et al., 2011. Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. *Nature*, 476(7359), pp.214–219.
- Sawcer, S. et al., 2007. Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genomewide study. *New England Journal of Medicine*, 357(9), pp.851–862.
- Scalfari, A. et al., 2014. Onset of secondary progressive phase and long-term evolution of multiple sclerosis. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 85(1), pp.67–75.

Scarpulla, R.C., 2008. Transcriptional paradigms in mammalian mitochondrial

biogenesis and function. *Physiological reviews*, 88(2), pp.611–638.

- Schattling, B. et al., 2012. TRPM4 cation channel mediates axonal and neuronal degeneration in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Nature Medicine*, 18(12), pp.1805–1811.
- Schlaeger, R. et al., 2014. Spinal cord gray matter atrophy correlates with multiple sclerosis disability. *Annals of Neurology*, 76(4), pp.568–580.
- Schuh, C. et al., 2014. Oxidative tissue injury in multiple sclerosis is only partly reflected in experimental disease models. *Acta Neuropathologica*, 128(2), pp.247–266.
- Serafini, B. et al., 2006. Dendritic cells in multiple sclerosis lesions: maturation stage, myelin uptake, and interaction with proliferating T cells. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, 65(2), pp.124–141.
- Shi, M. et al., 2013. Glial cell-expressed mechanosensitive channel TRPV4 mediates infrasound-induced neuronal impairment. *Acta Neuropathologica*, 126(5), pp.725–739.
- Shibasaki, K. et al., 2014. A novel subtype of astrocytes expressing TRPV4 (transient receptor potential vanilloid 4) regulates neuronal excitability via release of gliotransmitters. *Journal of Biological Chemistry*, 289(21), pp.14470–14480.
- Shibasaki, K. et al., 2007. Effects of body temperature on neural activity in the hippocampus: regulation of resting membrane potentials by transient receptor potential vanilloid 4. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 27(7), pp.1566–1575.
- Shibasaki, K., Tominaga, M. & Ishizaki, Y., 2015. Hippocampal neuronal maturation triggers post-synaptic clustering of brain temperature-sensor TRPV4. *Biochemical and biophysical research communications*, 458(1), pp.168–173.
- Shigematsu, H. et al., 2010. A 3.5-nm structure of rat TRPV4 cation channel revealed by Zernike phase-contrast cryoelectron microscopy. *Journal of Biological Chemistry*, 285(15), pp.11210–11218.
- Shin, J.-H. et al., 2011. PARIS (ZNF746) repression of PGC-1α contributes to neurodegeneration in Parkinson's disease. *Cell*, 144(5), pp.689–702.
- Shirani, A. et al., 2012. Association between use of interferon beta and progression of disability in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *JAMA*, 308(3), pp.247–256.
- Sofroniew, M.V., 2015. Astrocyte barriers to neurotoxic inflammation. *Nature reviews. Neuroscience*, 16(5), pp.249–263.
- Sorbara, C.D. et al., 2014. Pervasive axonal transport deficits in multiple sclerosis models. *Neuron*, 84(6), pp.1183–1190.
- Srinivasan, R. et al., 2005. Evidence of elevated glutamate in multiple sclerosis using magnetic resonance spectroscopy at 3 T. *Brain*, 128(Pt 5), pp.1016–1025.
- St-Pierre, J. et al., 2006. Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators. *Cell*, 127(2), pp.397–408.
- Stephenson, E. et al., 2014. Iron in multiple sclerosis: roles in neurodegeneration and repair. *Nature reviews. Neurology*, 10(8), pp.459–468.
- Stirling, D.P. & Stys, P.K., 2010. Mechanisms of axonal injury: internodal nanocomplexes and calcium deregulation. *Trends in Molecular Medicine*, 16(4), pp.160–170.
- Stromnes, I.M. & Goverman, J.M., 2006. Active induction of experimental allergic encephalomyelitis. *Nature protocols*, 1(4), pp.1810–1819.
- Stys, P.K. et al., 2012. Will the real multiple sclerosis please stand up? *Nature reviews. Neuroscience*, 13(7), pp.507–514.
- Talavera, K., Nilius, B. & Voets, T., 2008. Neuronal TRP channels: thermometers, pathfinders and life-savers. *Trends in Neurosciences*, 31(6), pp.287–295.
- Tallantyre, E.C. et al., 2010. Clinico-pathological evidence that axonal loss underlies disability in progressive multiple sclerosis. *Multiple sclerosis* (*Houndmills, Basingstoke, England*), 16(4), pp.406–411.
- Taylor, L., Arnér, K. & Ghosh, F., 2017. Specific inhibition of TRPV4 enhances retinal ganglion cell survival in adult porcine retinal explants. *Experimental eye research*, 154, pp.10–21.
- Thompson, A.J. et al., 2018. Multiple sclerosis. *Lancet (London, England)*, 391(10130), pp.1622–1636.
- Thorneloe, K.S. et al., 2012. An orally active TRPV4 channel blocker prevents and resolves pulmonary edema induced by heart failure. *Science Translational Medicine*, 4(159), pp.159ra148–159ra148.
- Thorneloe, K.S. et al., 2008. N-((1S)-1-{[4-((2S)-2-{[(2,4-dichlorophenyl)sulfonyl]amino}-3-hydroxypropanoyl)-1-piperazinyl]carbonyl}-3methylbutyl)-1-benzothiophene-2-carboxamide (GSK1016790A), a novel and potent transient receptor potential vanilloid 4 channel agonist induces urinary bladder contraction and hyperactivity: Part I. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 326(2), pp.432–442.
- Trapp, B.D. & Stys, P.K., 2009. Virtual hypoxia and chronic necrosis of demyelinated axons in multiple sclerosis. *The Lancet Neurology*, 8(3), pp.280– 291.
- Trapp, B.D. et al., 1998. Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. *New England Journal of Medicine*, 338(5), pp.278–285.

- Vázquez, E. & Valverde, M.A., 2006. A review of TRP channels splicing. *Seminars in cell & developmental biology*, 17(6), pp.607–617.
- Vergnolle, N. et al., 2010. A role for transient receptor potential vanilloid 4 in tonicity-induced neurogenic inflammation. *British journal of pharmacology*, 159(5), pp.1161–1173.
- Vergo, S. et al., 2011. Acid-sensing ion channel 1 is involved in both axonal injury and demyelination in multiple sclerosis and its animal model. *Brain*, 134(Pt 2), pp.571–584.
- Vidaurre, O.G. et al., 2014. Cerebrospinal fluid ceramides from patients with multiple sclerosis impair neuronal bioenergetics. *Brain*, 137(Pt 8), pp.2271–2286.
- Vizin, R.C.L. et al., 2015. TRPV4 activates autonomic and behavioural warmthdefence responses in Wistar rats. *Acta physiologica (Oxford, England)*, 214(2), pp.275–289.
- Wallace, D.C., Fan, W. & Procaccio, V., 2010. Mitochondrial energetics and therapeutics. *Annual review of pathology*, 5, pp.297–348.
- Watanabe, H. et al., 2003. Modulation of TRPV4 gating by intra- and extracellular Ca2+. *Cell calcium*, 33(5-6), pp.489–495.
- Waxman, S.G., 2006. Axonal conduction and injury in multiple sclerosis: the role of sodium channels. *Nature reviews. Neuroscience*, 7(12), pp.932–941.
- White, J.P.M. et al., 2016. TRPV4: Molecular Conductor of a Diverse Orchestra. *Physiological reviews*, 96(3), pp.911–973.
- Wiendl, H. & Hohlfeld, R., 2009. Multiple sclerosis therapeutics: unexpected outcomes clouding undisputed successes. *Neurology*, 72(11), pp.1008–1015.
- Williams, A., Piaton, G. & Lubetzki, C., 2007. Astrocytes--friends or foes in multiple sclerosis? *Glia*, 55(13), pp.1300–1312.
- Witte, M.E. et al., 2014. Mitochondrial dysfunction contributes to neurodegeneration in multiple sclerosis. *Trends in Molecular Medicine*, 20(3), pp.179–187.
- Witte, M.E. et al., 2013. Reduced expression of PGC-1α partly underlies mitochondrial changes and correlates with neuronal loss in multiple sclerosis cortex. *Acta Neuropathologica*, 125(2), pp.231–243.
- Ye, L. et al., 2012. TRPV4 is a regulator of adipose oxidative metabolism, inflammation, and energy homeostasis. *Cell*, 151(1), pp.96–110.
- Young, E.A. et al., 2008. Imaging correlates of decreased axonal Na+/K+ ATPase in chronic multiple sclerosis lesions. *Annals of Neurology*, 63(4), pp.428–435.
- Zamvil, S.S. & Steinman, L., 1990. The T lymphocyte in experimental allergic encephalomyelitis. *Annual Review of Immunology*, 8, pp.579–621.

- Zhang, L., Papadopoulos, P. & Hamel, E., 2013. Endothelial TRPV4 channels mediate dilation of cerebral arteries: impairment and recovery in cerebrovascular pathologies related to Alzheimer's disease. *British journal of pharmacology*, 170(3), pp.661–670.
- Zrzavy, T. et al., 2017. Loss of "homeostatic" microglia and patterns of their activation in active multiple sclerosis. *Brain*, 140(7), pp.1900–1913.

8 Danksagung

Ich danke meinem Doktorvater Prof. Dr. Manuel Friese für die Ermöglichung dieser Arbeit und der stets verlässlichen und professionellen Unterstützung.

Ferner danke ich Herrn Dr. Benjamin Schattling, der mich während der Fertigstellung dieser Arbeit umfangreich betreut hat.

Außerdem bedanke ich mich bei allen Kollegen des Instituts für Neuroimmunologie und Multiple Sklerose für ihre unzähligen, konstruktiven Anregungen und Hilfestellungen. Ein besonderer Dank gilt hierbei Herrn Michael Moles und Frau Dr. Anja Fischer.

9 Lebenslauf

Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt.

10 Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: Usta Wide