

Aus der Klinik für Anästhesiologie  
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Funktionelle Effekte des 2,4-Diacetylphloroglucinol-Derivats Hyp1 in vitro und nach  
experimentellem Schädel-Hirn-Trauma in der Maus

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der  
Medizin  
der Universitätsmedizin  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Daniel Zerfaß  
aus St. Wendel

Mainz, 2022

Tag der Promotion:

06. Dezember 2022

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>V</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>VII</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>VIII</b>
<b>1. Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Literaturdiskussion .....</b>	<b>3</b>
<b>2.1 Das Gehirn.....</b>	<b>3</b>
2.1.1 Makroskopische Anatomie.....	3
2.1.2 Mikroskopische Anatomie und Physiologie .....	4
<b>2.2 Das Schädel-Hirn-Trauma .....</b>	<b>6</b>
2.2.1 Definition .....	6
2.2.2 Epidemiologie.....	7
2.2.3 Medizinische und gesellschaftliche Bedeutung.....	8
2.2.4 Pathophysiologie des SHT .....	8
2.2.4.1 Neuroinflammation.....	10
2.2.4.2 Mitochondriale Dysfunktion und oxidativer Stress .....	17
2.2.5 Das SHT im Tiermodell .....	22
<b>2.3 Johanniskraut, Hyperforin und Hyp1 .....</b>	<b>23</b>
<b>3. Material und Methoden .....</b>	<b>27</b>
<b>3.1 Material .....</b>	<b>27</b>
3.1.1 Geräte .....	27
3.1.2 Pharmaka.....	28
3.1.3 Chemikalien.....	29
3.1.4 Puffer und Lösungen .....	30
3.1.5 Kulturmedien, Zusätze und Kits.....	31
3.1.6 PCR-Kits .....	32
3.1.7 Primer und Sonden.....	32
3.1.8 Antikörper.....	33
3.1.9 Verbrauchsmaterialien.....	34
3.1.10 Software .....	35
<b>3.2 Methoden.....</b>	<b>36</b>
3.2.1 Zellkultur.....	36
3.2.1.1 Ansetzen und Pflege der Zellkulturen.....	36
3.2.1.2 Mikroskopische Zellzahlbestimmung.....	37
3.2.1.3 Stimulation der Zellen .....	38
3.2.1.4 Transfektion .....	38
3.2.2 Tierexperimentelle Methodik.....	39
3.2.2.1 Haltung und Pflege .....	40
3.2.2.2 Experimentelle Gruppen und Medikamentenapplikation.....	40
3.2.2.3 Operation .....	41
3.2.2.4 Gewichtskontrolle und Motorfunktionsanalyse.....	43
3.2.2.5 Euthanasie und Hirnentnahme.....	45
3.2.2.6 Konservierung und Weiterverarbeitung des Hirngewebes.....	45
3.2.2.7 Anfertigung der Kryoschnitte .....	46

3.2.2.8 Kresylviolett färbung .....	47
3.2.2.9 Übersicht über den Versuchsablauf .....	47
3.2.3 Proteinanalysen.....	47
3.2.3.1 Proteinextraktion aus Zellen.....	47
3.2.3.2 Proteinextraktion aus Gewebe .....	48
3.2.3.3 Konzentrationsbestimmung.....	48
3.2.3.4 Gelelektrophorese.....	49
3.2.3.5 Western Blot .....	50
3.2.3.6 IgG Dot Blot .....	51
3.2.4 RNA-Analysen.....	51
3.2.4.1 RNA-Extraktion aus Zellen.....	51
3.2.4.2 RNA-Extraktion aus Gewebe .....	52
3.2.4.3 RNA-Konzentrationsbestimmung .....	52
3.2.4.4 Synthese der komplementären DNA (cDNA) .....	52
3.2.4.5 qRT-PCR .....	53
3.2.5 Respirometrie .....	54
3.2.5.1 Vorbereitung der Zellen und des Gewebes .....	55
3.2.5.2 Substrate-Uncoupler-Inhibitor Titration (SUIT)-Protokoll .....	55
3.2.5.3 Atmungsstatus, Flux Control Ratios und OXPHOS-Kopplungseffizienz .....	57
3.2.6 ROS-Assay.....	58
3.2.7 Statistische Auswertung .....	59
3.2.8 Gesamtübersicht über die durchgeführten Experimente .....	61
<b>4. Ergebnisse.....</b>	<b>62</b>
<b>4.1 Hyp1-Effekte in Zellkulturen.....</b>	<b>62</b>
4.1.1 Proteinanalyse.....	62
4.1.2 Molekularbiologische Analyse .....	67
4.1.3 Respirometrie.....	69
4.1.4 ROS-Assay.....	74
<b>4.2 Hyp1-Effekte im Hirngewebe der Maus .....</b>	<b>76</b>
4.2.1 Proteinanalyse.....	76
4.2.2 Respirometrie.....	76
<b>4.3 Hyp1-Effekte nach SHT im Mausmodell .....</b>	<b>81</b>
4.3.1 Körpergewicht und NSS .....	82
4.3.2 Proteinanalyse.....	84
4.3.3 Molekularbiologische Analyse .....	89
4.3.4 Respirometrie .....	94
<b>5. Diskussion .....</b>	<b>99</b>
<b>5.1 Einfluss von Hyp1 auf die Neuroinflammation .....</b>	<b>99</b>
<b>5.2 Einfluss von Hyp1 auf die mitochondriale Atmung.....</b>	<b>104</b>
<b>5.3 Einfluss von Hyp1 auf die funktionelle Wiederherstellung.....</b>	<b>110</b>
<b>5.4 Limitationen und Ausblick .....</b>	<b>111</b>
<b>6. Zusammenfassung.....</b>	<b>114</b>
<b>7. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>116</b>
<b>Danksagung.....</b>	<b>129</b>
<b>Lebenslauf .....</b>	<b>130</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Mitochondriale Atmungskette.....	19
Abbildung 2: Mitochondriale Dysfunktion.....	21
Abbildung 3: Strukturformeln des Hyperforins und des 2,4-Diacylphloroglucinols Hyp1.....	26
Abbildung 4: Operationssitus.....	42
Abbildung 5: Elemente des NSS.....	44
Abbildung 6: Neurologische Bewertung anhand des NSS.....	44
Abbildung 7: Lokalisation der entnommenen Cortexareale zur respirometrischen Analyse.....	46
Abbildung 8: Darstellung der respiratorischen Messung.....	57
Abbildung 9: Gesamtübersicht über durchgeführte Experimente.....	61
Abbildung 10: TRPC6-Expression in SIM-A9-Mikroglia (24 h).....	63
Abbildung 11: COX-2-Expression in SIM-A9-Mikroglia (24 h).....	63
Abbildung 12: COX-2-Expression in SIM-A9-Mikroglia (24 h, 48 h, 72 h).....	64
Abbildung 13: COX-2- und GFAP-Expression in einer primären Gliazellkultur (24 h).....	65
Abbildung 14: COX-2- und Phospho-NF- $\kappa$ B p65-Expression in primären Gliazellen (24 h).....	66
Abbildung 15: NF- $\kappa$ B p65-Expression in primären Gliazellen (24 h).....	67
Abbildung 16: Genexpression in SIM-A9-Mikroglia 24 h nach Stimulation mit Hyp1 und/oder LPS.....	68
Abbildung 17: Mitochondriale Atmungsaktivität in SIM-A9-Mikroglia unter der Zugabe von Hyp1.....	70
Abbildung 18: OXPHOS <sub>CI+II</sub> -Kopplungseffizienz in SIM-A9-Mikroglia unter der Zugabe von Hyp1.....	70
Abbildung 19: Mitochondriale Atmungsaktivität in HEK-293-Zellen unter der Zugabe von Hyp1.....	72
Abbildung 20: OXPHOS <sub>CI+II</sub> -Kopplungseffizienz in HEK-293-Zellen unter der Zugabe von Hyp1.....	72
Abbildung 21: Transfizierte HEK-293-Zellen mit EGFP bzw. TRPC6-YFP.....	73
Abbildung 22: Mitochondriale Atmungsaktivität in TRPC6-transfizierten HEK-293-Zellen unter der Zugabe von Hyp1.....	74
Abbildung 23: OXPHOS <sub>CI+II</sub> -Kopplungseffizienz in transfizierten HEK-293-Zellen unter der Zugabe von Hyp1.....	74
Abbildung 24: ROS-Entstehung in HEK-293-Zellen nach Behandlung mit FCCP und Hyp1.....	75
Abbildung 25: TRPC6-Expression in verschiedenen Hirnarealen von WT-Mäusen.....	76
Abbildung 26: Mitochondriale Atmungsaktivität in Hirngewebe von WT-Mäusen unter der Zugabe von Hyp1.....	78
Abbildung 27: OXPHOS <sub>CI+II</sub> -Kopplungseffizienz in Hirnhomogenisaten von WT-Mäusen unter der Zugabe von Hyp1.....	78
Abbildung 28: Mitochondriale Atmungsaktivität in Hirngewebe von TRPC6-KO-Mäusen unter der Zugabe von Hyp1.....	79
Abbildung 29: OXPHOS <sub>CI+II</sub> -Kopplungseffizienz in Hirnhomogenisaten von TRPC6-KO-Mäusen unter der Zugabe von Hyp1.....	80
Abbildung 30: Mitochondriale Atmungsaktivität in Hirngewebe von WT- und TRPC6-KO-Mäusen innerhalb des LEAK-Atmungsstatus.....	81
Abbildung 31: Entwicklung des Körpergewichts.....	82
Abbildung 32: Entwicklung des NSS.....	83
Abbildung 33: Expression der $\alpha$ II-Spektrin-Spaltprodukte und von GFAP am 5. postoperativen Tag.....	86
Abbildung 34: BDNF- und COX IV-Expression am 5. postoperativen Tag.....	87
Abbildung 35: Integrität der BHS am 5. postoperativen Tag.....	88
Abbildung 36: Genexpression am 5. postoperativen Tag.....	91
Abbildung 37: Genexpression am 5. postoperativen Tag.....	93

Abbildung 38: Mitochondriale Atmungsaktivität in Hirngewebe am 5. postoperativen Tag,  
unabhängig von medikamentöser Behandlung ..... 97

Abbildung 39: Mitochondriale Atmungsaktivität in Hirngewebe am 5. postoperativen Tag  
innerhalb des LEAK-Atmungsstatus..... 98

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Materialauflistung Geräte .....	28
Tabelle 2: Materialauflistung Pharmaka .....	29
Tabelle 3: Materialauflistung Chemikalien .....	30
Tabelle 4: Materialauflistung Puffer und Lösungen .....	31
Tabelle 5: Materialauflistung Kulturmedien, Zusätze und Kits .....	31
Tabelle 6: Materialauflistung PCR-Kits .....	32
Tabelle 7: Materialauflistung Primer .....	32
Tabelle 8: Materialauflistung Sonden .....	32
Tabelle 9: Materialauflistung primäre Antikörper .....	33
Tabelle 10: Materialauflistung sekundäre Antikörper .....	33
Tabelle 11: Materialauflistung Verbrauchsmaterialien .....	35
Tabelle 12: Materialauflistung Software .....	35
Tabelle 13: Agenzien zur Zellstimulation .....	38
Tabelle 14: Pipettierschema Transfektion .....	39
Tabelle 15: Experimentelle Gruppen .....	40
Tabelle 16: Übersicht über den Versuchsablauf .....	47
Tabelle 17: Pipettierschema zur Herstellung der Polyacrylamid-Gele .....	49
Tabelle 18: Auflistung der qPCR-Kits und Pipettierschemata .....	54
Tabelle 19: SUIT-Protokoll .....	56
Tabelle 20: Mitochondriale Atmungsaktivität in SIM-A9-Mikroglia unter der Zugabe von Hyp1 ..	70
Tabelle 21: Mitochondriale Atmungsaktivität in HEK-293-Zellen unter der Zugabe von Hyp1 ....	71
Tabelle 22: Mitochondriale Atmungsaktivität in TRPC6-transfizierten HEK-293-Zellen unter Hyp1-Zugabe .....	73
Tabelle 23: Mitochondriale Atmungsaktivität in Hirngewebe von WT-Mäusen unter der Zugabe von Hyp1 .....	77
Tabelle 24: Mitochondriale Atmungsaktivität in Hirngewebe von TRPC6-KO-Mäusen unter der Zugabe von Hyp1 .....	79
Tabelle 25: Mitochondriale Atmungsaktivität in Hirngewebe am 5. postoperativen Tag (absoluter Sauerstoffverbrauch) .....	94
Tabelle 26: Mitochondriale Atmungsaktivität in Hirngewebe am 5. postoperativen Tag (FCR) ...	95
Tabelle 27: Mitochondriale Atmungsaktivität in Hirngewebe am 5. postoperativen Tag, unabhängig von medikamentöser Behandlung .....	96

## Abkürzungsverzeichnis

%, % (w/v), % (v/v)	Prozent, Massen-, Volumen-
µl, µM, µm, µg	Mikroliter, -molar, -meter, -gramm
°C	Grad Celsius
2,4-DNP	2,4-Dinitrophenol
A	Ampere
Aβ	Amyloid-β
ADAM 10	<i>A Disintegrin and Metalloproteinase 10</i>
ADP	Adenosindiphosphat
AG	Antigen
ANOVA	Varianzanalyse
ANT	Adenin-Nukleotid-Translokase
APP	<i>Amyloid Precursor Protein</i>
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
Arc	<i>Activity-regulated cytoskeleton associated protein</i>
BDNF	<i>Brain-derived Neurotrophic Factor</i>
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BSA	bovines Serumalbumin A
bspw.	beispielsweise
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
ca.	zirka
CaMK	Calcium/Calmodulin abhängige Proteinkinase
CI-V	Komplexe der Atmungskette I-V
Cbl	Cerebellum
CCI	<i>Controlled Cortical Impact</i>
cm, cm <sup>2</sup>	Zentimeter, Quadratzentimeter
contra	contraläsional
COX-1 / -2	Cyclooxygenase-1 / -2
COX IV	Cytochrom c-Oxidase (Untereinheit IV)
CREB	<i>cAMP response element-binding protein</i>
Ctrl.	Kontrolle
Ctx	Cortex
Cyt c	Cytochrom c
d	Tag
DAI	<i>diffuse axonal injury</i>
DAMP	<i>damage-associated molecular pattern</i>
DAG	Diacylglycerol
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
(c / g) DNA	komplementäre / genomische Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiaminotetraacetat
EGFP	<i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i>
Em	Emission
ETS	elektronentransportierendes System
Eu.	Euthanasie
Ex	Exzitation
F	<i>Forward</i>
FADH <sub>2</sub>	Flavin-Adenin-Dinucleotid
FCCP	Carbonylcyanid-4-phenylhydrazon



FCR	<i>Flux Control Ratio</i>
FCS	fetales Kälberserum
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
GADD45B	<i>growth arrest and DNA-damage-inducible protein beta</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GCS	<i>Glasgow Coma Scale</i>
GFAP	<i>glial fibrillary acidic protein</i>
h	Stunde
HEK	<i>Human Embryonic Kidney</i>
Hip	Hippocampus
HMGB 1	<i>high mobility group box 1</i>
HS	Pferdeserum
HSP	<i>Heat Shock Proteins</i>
Hz	Hertz
ICD10	<i>International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems</i>
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
ipsi	ipsiläsional
kDa	Kilodalton
KG	Körpergewicht
KO	<i>Knockout</i>
LPS	Lipopolysaccharid
m	Meter
M	molar
mCU	mitochondrialer Calciumuniporter
min	Minute
MM	Magermilch
MMP	Matrix-Metalloproteinase
ms, mg, ml, mM	Millisekunde, -gramm, -liter, -molar
mPTP	<i>mitochondrial permeability transition pore</i>
n	Anzahl
NADH+H <sup>+</sup>	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid
NF-κB	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells</i>
NGF	<i>nerve growth factor</i>
nm	Nanometer
NMDAR	N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptoren
NOD	nucleotide-binding oligomerization
NSS	<i>Neurological Severity Score</i>
O <sup>2-</sup>	Superoxidanion
OD	optische Dichte
OP	Operation
OXPPOS	oxidative Phosphorylierung
p75NTR	<i>p75 neurotrophin receptor</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAMP	<i>pathogen-associated molecular pattern</i>
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PDL	Poly-D-Lysin
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin E <sub>2</sub>

pmol	Pikomol
PNS	Peripheres Nervensystem
PPIA	Peptidylpropylisomerase A
PRR	<i>pattern recognition receptor</i>
R	<i>Reverse</i>
rel.	relativ(e)
RFU	<i>Relative Fluorescence Units</i>
RIPA	<i>Radioimmunoprecipitation Assay</i>
(m)RNA	( <i>messenger</i> ) Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
ROX	<i>residual oxygen consumption</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i>
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standardfehler
SHT	Schädel-Hirn-Trauma
SIM	<i>spontaneously immortalized microglial cells</i>
SOD	Superoxiddismutase
TBS(T)	<i>Tris-buffered saline (with tween)</i>
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TGF	<i>transforming growth factor</i>
TLR	<i>Toll-like-Rezeptor</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
TRPC6	klassischer/kanonischer transienter Rezeptorpotential-Kanal 6
UCP	<i>Uncoupling-Protein</i>
vs.	versus
WT	Wildtyp
YFP	<i>yellow fluorescent protein</i>
ZNS	Zentrales Nervensystem

# 1. Einleitung

Nach wie vor ist das Schädel-Hirn-Trauma (SHT) die weltweit führende Ursache für Tod und Behinderung im jüngeren Erwachsenenalter (1, 2). Etwa 30 % aller Todesfälle nach Unfällen lassen sich dem SHT zurechnen (3), 30 - 40 % der von einem schweren SHT betroffenen Patienten sterben an den Verletzungsfolgen (4, 5), nahezu alle Überlebenden eines schweren SHT leiden an lebenslang fortbestehenden Behinderungen (4). Die Häufigkeit und Schwere der Verletzungen nach SHT führt folglich zu immensen ökonomischen Aufwendungen (6). Diese Fakten verdeutlichen die Tatsache, dass es sich beim SHT bis heute um eine der großen medizinischen und gesellschaftlichen Herausforderungen handelt (7).

Definitionsgemäß ist das SHT eine Veränderung der Gehirnfunktion beziehungsweise (bzw.) das Auftreten einer Pathologie des Hirnparenchyms bedingt durch das Einwirken einer externen Kraft (8). Der Begriff SHT beschreibt dementsprechend nicht ein homogenes Krankheitsbild, sondern umfasst vielmehr eine Bandbreite von Erkrankungen, die sich unter anderem in Schweregrad, Morphologie und somit im klinischen Bild teils deutlich voneinander abheben (9). Gemeinhin unterscheidet man im Rahmen des Krankheitsbildes den Primärschaden, der unmittelbar durch die konkrete äußere Kraftereinwirkung entsteht, nicht reversibel ist und somit dem Behandler abseits präventiver Maßnahmen nicht zugänglich ist (10, 11), vom Sekundärschaden. Dieser entwickelt sich in der Zeit nach dem eigentlichen Trauma und umfasst diverse pathophysiologische Prozesse wie die Neuroinflammation, die Störung der Integrität der Blut-Hirn-Schranke oder die mitochondriale Dysfunktion, die allesamt zu einer deutlichen Verschlechterung des *Outcomes* betroffener Patienten führen können. Eine Milderung des Sekundärschadens ist daher ein wichtiges Ziel in der klinischen Versorgung und der Entwicklung neuer Therapieoptionen (12-14).

Die unterschiedlichen primären Verletzungsmuster nach einem SHT und die Komplexität der sich anschließenden Prozesse im Rahmen des Sekundärschadens (15) sind die Gründe dafür, dass trotz einer großen Zahl verschiedener Forschungsansätze seit 1993 über 30 klinische Studien bezüglich (bzgl.) SHT fehlgeschlagen sind (16).

Hyperforin, einer der Hauptwirkstoffe des Johanniskrauts, zeigt vielfach in Studien beispielsweise (bspw.) anti-depressive (17), antikarzinogene (18) und anti-bakterielle (19) Wirkungen durch Beeinflussung verschiedener zellulärer Stoffwechselwege und Signalkaskaden. Ergebnisse neuerer Studien lassen auf einen eventuell vorhandenen neuroprotektiven Effekt des Hyperforins schließen (20, 21).

Erklärt werden die durch Hyperforin vermittelten Effekte zumeist über die Modulation eines nicht-selektiven Kationenkanals, dem klassischen transienten Rezeptorpotential-Kanal 6 (TRPC6) (22),

teilweise aber auch über eine protonophore Eigenschaft des Hyperforins, durch die eine pH-Wert-Veränderung der Zelle bzw. der synaptischen Vesikel verursacht wird (23).

Das Ziel dieser Forschungsarbeit ist die Untersuchung möglicher Effekte von Hyperforin im Rahmen eines SHT. Verwendet wird hierzu das 2,4-Diacylphloroglucinol Hyp1, ein nachgewiesener Modulator des TRPC6 (24).

In einem ersten Schritt wird untersucht, ob anti-inflammatorische Effekte von Hyp1 in Gliazellen, die eine entscheidende Rolle bzgl. der Neuroinflammation im Rahmen des Sekundärschadens einnehmen, nachweisbar sind (25). Weiterhin wird der Einfluss von Hyp1 auf die mitochondriale Atmung in Gliazellkulturen und murinem Hirngewebe unter der Zugabe des Wirkstoffs Hyp1 evaluiert mit besonderem Augenmerk auf den vermuteten Wirkmechanismus des bekannten TRPC6-Aktivators Hyp1, die Modulation des Kationenkanals TRPC6. In einem letzten Schritt werden die funktionelle Wiederherstellung, die mitochondriale Atmung und weitere pathophysiologische Alterationen 5 Tage nach einem induzierten SHT in der Maus unter mehrfacher intraperitonealer (i.p.) Applikation des Hyp1 dargestellt und bewertet.

Die Tatsache, dass es bei einem derart häufigen medizinisch und sozioökonomisch relevanten Krankheitsbild wie dem SHT bis heute an einer zielgerichteten medikamentösen Therapie mangelt, die effektiv die Ausbildung des Sekundärschadens unterbindet oder zumindest abschwächt, verdeutlicht die Relevanz der Grundlagenforschung mit neuen Substanzen im Bereich der traumatischen Hirnschädigung.

Da es sich bei Hyperforin um einen medizinisch etablierten Wirkstoff handelt, der seit Jahrzehnten in Form von Johanniskraut erfolgreich bei Depressionen eingesetzt wird (26) und dem in neuen Studien anti-inflammatorische sowie neuroprotektive Effekte im Schlaganfallmodell attestiert wurden (20, 21), ist eine Untersuchung einer möglichen Wirksamkeit des Hyp1 im Rahmen eines SHT von grundlegendem biologischen und medizinischen Interesse.

## 2. Literaturdiskussion

### 2.1 Das Gehirn

#### 2.1.1 Makroskopische Anatomie

Zusammen mit dem Rückenmark repräsentiert das Gehirn das zentrale Nervensystem (ZNS). Anatomisch grenzt sich dieser Teil vom peripheren Nervensystem (PNS) ab, welcher aus Nervenbahnen, Ganglien und Plexus besteht und namensgebend die nervale Versorgung der Körperperipherie gewährleistet (27).

Embryologisch entwickelt sich das Säugetiergehirn aus drei sogenannten Hirnbläschen. Das prosencephale Hirnbläschen bildet das spätere *Telencephalon* (Großhirn) sowie das *Diencephalon* (Zwischenhirn), das Strukturen wie Thalamus und Hypothalamus enthält.

Aus dem mesencephalen Hirnbläschen entsteht das Mesencephalon oder Mittelhirn, das rhombenzephalen Hirnbläschen wird in der Entwicklung des reifen Organismus zum *Pons* (Brücke), dem *Cerebellum* (Kleinhirn) und der *Medulla oblongata* (verlängertes Mark). Sowohl Gehirn als auch Rückenmark sind durch ihre Lage in Schädelhöhle und Wirbelkanal sowie ihre Einfassung in ein System aus Hirnhäuten und *Liquor cerebrospinalis* in besonderer Weise vor äußeren Einflüssen geschützt. Dabei kleidet die *Pia mater* (weiche Hirnhaut) die Gehirnoberfläche aus, die *Arachnoidea mater* (Spinnwebhaut) stellt den äußeren Liquorraum dar, während die *Dura mater* (harte Hirnhaut) das Äquivalent einer Organkapsel bildet. Die Funktion des in den *Plexus choroidei* der Hirnventrikel gebildeten *Liquor cerebrospinalis* besteht neben der Aufgabe als Stoffwechselmedium hauptsächlich in der Gewichtsreduktion des Gehirns und einer Schutzfunktion vor mechanischen Krafteinwirkungen (28, 29). Das Großhirn als größter und komplexester Teil des Gehirns ist morphologisch aufgeteilt in zwei symmetrische Hemisphären, die durch die *Fissura longitudinalis* (Interhemisphärenspalt) voneinander getrennt sind, jedoch durch sogenannte Kommissurenbahnen wie dem *Corpus callosum* (Balken) funktionell verbunden werden. Weiter untergliedert wird jede Hemisphäre in sechs sogenannte *Lobi* (Lappen). Diesen werden grob bestimmte Aufgaben zugeschrieben. Eine feinere Differenzierung funktioneller Bereiche erfolgt auf zellarchitektonischer Grundlage in 50 nach dem Entdecker benannte Brodmann-Areale (29, 30).

Bereits makroskopisch sichtbar gliedert sich das Großhirn in die graue Substanz oder Großhirnrinde, bestehend aus den *Somata* (Zellkörpern) der Nervenzellen, und der weißen Substanz oder Großhirnmark, die die Summe der Axone (Nervenfasern) darstellt.

Ein wesentlicher makroskopischer Unterschied zwischen humanem und murinem Gehirn besteht neben unterschiedlicher Aufteilung und Größe dieser Lobi in einer im Maushirn fehlenden

Gyrierung (Vorhandensein von Gehirnwindungen) zur Oberflächenvergrößerung des Großhirns, was als *Lissenzephalie* bezeichnet wird.

### **2.1.2 Mikroskopische Anatomie und Physiologie**

Zwei Arten von Zellen lassen sich im Gehirn prinzipiell unterscheiden: Neurone (Nervenzellen) und Gliazellen.

Neurone sind hochspezialisierte und ausdifferenzierte Zellen, die der Übertragung und Verarbeitung von Nervenimpulsen auf elektrischem und chemischem Weg dienen. Die Nervenzellen lassen sich strukturell in verschiedene Abschnitte einteilen. Das Soma enthält den Zellkern und den überwiegenden Anteil der Zellorganellen. Zum Neuron gehört weiterhin mindestens ein mit dem Soma verbundener oft verzweigter Ausläufer, der der Aufnahme und Leitung elektrischer Erregung über Membranpotentialänderungen zum Nervenzellkörper dient, der Dendrit (28). Im Gegensatz dazu gibt es in jedem Neuron immer genau ein Axon, das über den Axonhügel mit dem Soma verbunden ist und den Signalausgang des Neurons darstellt. Der Axonhügel ist der Ort der zeitlichen und räumlichen Summation erregender oder hemmender Nervenimpulse, die an den Dendriten und dem Soma auf die Nervenzelle einwirken. Hier entsteht aufgrund der hohen Erregbarkeit bei einer durch Summation entstandenen überschwelligem Potentialänderung ein Aktionspotential, das schließlich über das Axon fortgeleitet wird (27, 30). Das Axon ist neben der Fortleitung der elektrischen Information ebenso zuständig für den Transport von Strukturproteinen, Enzymen, Transmittersubstanzen und Zellorganellen in die Peripherie des Neurons (31). Neben weiteren Möglichkeiten der Übertragung des Signals durch die Nervenzelle auf benachbarte Zellen, etwa der volumetrischen Übertragung oder der transmembranären Diffusion, stellt die synaptische Übertragung den Hauptkommunikationsweg dar. Hier ist im Besonderen die chemische Synapse von Bedeutung. Das auf der präsynaptischen Seite ankommende Aktionspotential bewirkt die Freisetzung von Neurotransmittern in den synaptischen Spalt. Durch Bindung der Transmitterstoffe an entsprechenden Rezeptoren kann das chemische Signal in ein elektrisches Signal rückkodiert und weitergeleitet werden (28).

Neben den Neuronen besteht das Nervengewebe aus Gliazellen, die die Aufrechterhaltung einer störungsfreien Tätigkeit der Nervenzellen garantieren. Grob unterteilt wird dabei in Makro- und Mikroglia. Zu den Makroglia gehören Astrozyten, Oligodendrozyten als Bildner der isolierenden Myelinscheide, Ependymzellen, die der inneren Auskleidung der Liquorräume dienen, und sogenannte NG2-Glia, die glialen Vorläuferzellen entsprechen. Die Makroglia entstammen ebenso wie die Neurone ontogenetisch dem Neuralrohr. Die zweite Gruppe bilden die Mikroglia, bei denen es sich um in der Embryonalzeit eingewanderte Makrophagenvorläufer handelt (31-33).

Die Astrozyten als häufigste Gliazellform (34) erfüllen unter anderem eine Stützfunktion, welche sie durch Intermediärfilamente, die wiederum aus *glial fibrillary acidic protein* (GFAP) aufgebaut sind, wahrnehmen. Astrozyten und Oligodendrozyten sind untereinander durch *Gap Junctions* verbunden, was bei der Ausübung ihrer Funktion, der extrazellulären Ionenhomöostase, von Bedeutung ist (35). Astrozyten kommunizieren sowohl untereinander als auch mit Neuronen, was als Gliotransmission bezeichnet wird (36). Sie sind je nach Lokalisation im Gehirn mehr oder weniger verzweigt und stehen in Kontakt zu Synapsen, Nervenfasern und Blutgefäßen (37). Dadurch erfüllen sie einen modulierenden Effekt bezüglich der Synaptogenese und der synaptischen Übertragung, übernehmen aber auch als Hauptspeicherort für Glykogen im ZNS eine Ernährungsfunktion für benachbarte Neurone (38), sind beteiligt an der Blut-Hirn-Schranke, können unter bestimmten Bedingungen Neurotrophine produzieren oder als Antigen-präsentierende Zellen fungieren. Nicht zuletzt bilden sie durch gesteigerte Bildung von GFAP eine Glianarbe nach Verletzung oder Degeneration von Nervengewebe (37).

Mikroglia sind die immunkompetenten Zellen des ZNS. Sie machen einen Anteil von 5 – 18 % der neokortikalen Zellen aus (39, 40), abhängig unter anderem vom Geschlecht und Alter des Individuums (40). Obwohl sie systematisch den Gliazellen zugeordnet werden, gehören sie funktionell zum mononukleären phagozytierenden System (41). Die Aufgaben der Mikroglia sind vielfältig und beschränken sich keinesfalls auf die reine Überwachung der Umgebung. Bereits in der Entwicklung des Säugetiergehirns spielen die Mikroglia mehrere entscheidende Rollen: Sie phagozytieren untergegangene Zellen, etwa Neurone oder Oligodendrozyten oder auch Teile dieser Zellen, insbesondere Synapsen, oder induzieren selbst die Apoptose nicht synaptisch verbundener Neurone (42). So werden im Laufe der Hirnentwicklung durch Mikroglia etwa die Hälfte der entstandenen Neurone und Gliazellen wieder abgebaut, was wesentlich zur Entstehung des adulten neuronalen Netzwerks beiträgt (43). Zugleich fördern sie auch das Überleben neuronaler Vorläuferzellen, indem sie die neuronale Apoptose in kortikalen Bereichen begrenzen (32, 44). Doch auch im adulten Gehirn scheinen Mikroglia Neurone und Synapsen zu beeinflussen, im Sinne des *synaptic stripping* funktionslose und beschädigte Verbindungen abzubauen, um so maßgeblich zur neuronalen Plastizität beizutragen (45).

Im ruhenden Zustand liegen Mikroglia als weit verzweigte Zellen mit zahlreichen, sich kontinuierlich bewegendenden Ausläufern vor, die dadurch große Bereiche mit enthaltenen Blutgefäßen, Neuronen und anderen Gliazellen überwachen können. Kleinere Areale geschädigten Gewebes können direkt phagozytiert werden, bei Detektion größerer Läsionen und entsprechenden Entzündungsreizen kommt es zur Strukturänderung der Mikroglia hin zum amöboiden, hoch aktiven Typ (46). Zur Erkennung pathologischer Zustände sind Mikroglia ausgestattet mit einer Reihe von Rezeptoren, etwa *pattern-recognition receptors* (PRRs) zur

Detektion pathogener oder beschädigter Substanz. Zu diesen gehören bspw. die *Toll-like*-Rezeptoren (TLR). Eine weitere Komponente der mikroglialen Zelloberfläche sind Rezeptoren, die Phagozytose ermöglichen, wie Scavenger-Rezeptoren, Integrin- oder Chemokinrezeptoren (46, 47). Pro-inflammatorische Zytokine, wie Interferon (IFN)  $-\alpha/\beta$ , IFN- $\gamma$ , Tumornekrosefaktor (TNF)  $-\alpha$ , IL (Interleukin)  $-1\beta$ , IL-10, und *transforming growth factor* (TGF)  $-\beta$ , Neurotransmitter und Neuropeptide können zur Aktivierung der Mikroglia führen (46, 48).

Die Vielfalt der physiologischen Integration der Mikroglia in die Hirnaktivität und -funktion begründet die Bedeutung dieses Zelltyps, der bei nahezu allen Pathologien des ZNS eine herausragende Rolle zu spielen scheint, etwa bei Infektionen, bei neurodegenerativen Erkrankungen wie bspw. Alzheimer und Parkinson, bei psychiatrischen Störungen und Krankheitsbildern ischämischer oder traumatischer Genese wie dem Schlaganfall oder dem SHT (32, 49-51).

## 2.2 Das Schädel-Hirn-Trauma

### 2.2.1 Definition

Eine akzeptierte und oft verwendete Definition des amerikanischen *National Institute of Neurological Disorders and Stroke* beschreibt das SHT als Veränderung der Hirnfunktion oder anderer Hinweise auf eine Pathologie des Gehirns, die durch eine externe Gewalteinwirkung bedingt ist. Diese Definition schließt neben der klinischen Einschätzung auch Bildgebung, Unfallhergang und weitere Marker mit ein (8).

Bzgl. der klinisch-neurologischen Erst- und Verlaufsbeurteilung sowie der Schweregradeinteilung des SHT hat sich die bereits 1974 veröffentlichte und heutzutage weltweit eingesetzte *Glasgow Coma Scale* (GCS) durchgesetzt. Die GCS stellt ein einheitliches Bewertungsschema zur Einordnung der Bewusstseinslage als Indikator der Verletzungsschwere dar (52). Bewertet wird beim traumatisierten Patienten die Bewusstseinsbeschränkung durch Beobachtung der Reaktion und einer anschließenden Punktevergabe in drei Teilbereichen: Augenöffnen (1-4 Punkte), die beste verbale Reaktion (1-5 Punkte) und die beste motorische Reaktion (1-6 Punkte). Die Addition der in diesen Teilbereichen erlangten Punktzahl ergibt einen Punktwert im Bereich von 3-15 Punkten, der zur Schweregradbeurteilung dient, wobei ein leichtes (GCS-Score 13-15), ein mittelschweres (GCS-Score 9-12) und ein schweres SHT (GCS-Score  $\leq 8$ ) unterschieden werden können (53, 54). Die Einteilung des SHT anhand der GCS dient einer groben Einschätzung der Verletzungsschwere und gibt eine Hilfestellung bei der Auswahl adäquater Therapieoptionen, eine Aussage bzgl. der Prognose sollte allerdings aufgrund seiner Limitationen nur in Zusammenschau mit weiteren Kriterien erfolgen, bspw. der Dauer der Bewusstlosigkeit, der Hirndrucksituation, der Lokalisation der Hirnschädigung sowie dem Alter des Patienten (53, 55, 56). Klinisch imponiert



das SHT neben Störungen des Bewusstseins durch verschiedene weitere Zeichen zentralnervöser Schädigung wie Hirnnervenstörungen, motorische Dysfunktionen, Krampfanfälle sowie retro- und/oder anterograde Amnesie. Das SHT geht oftmals einher mit Verletzungen der Kopfschwarte, Schädelfrakturen und verschieden lokalisierten intrakraniellen Blutungen wie Subdural-, Epidural- oder intrazerebralen Kontusionsblutungen (57, 58).

### **2.2.2 Epidemiologie**

Das SHT ist ein weltweit häufig auftretendes Krankheitsbild, dessen Epidemiologie vielfach in Studien untersucht worden ist. Für die Europäische Union mit 28 Mitgliedsstaaten wird die jährliche Inzidenz des SHT auf 2,5 Millionen pro Jahr geschätzt, weltweit könnte es nach Schätzungen von Maas et al. zu etwa 50 - 60 Millionen neu auftretenden SHTs pro Jahr kommen (2).

Die Angaben der Inzidenz in Europa sind wie auch weltweit mit einer immensen Streuung der Werte behaftet. Begründet ist dies in einer nicht einheitlichen Erhebung der Fallzahlen zwischen verschiedenen Studien sowie in der Existenz verschiedener Definitionen des SHT und dessen Schweregraden (2, 59). So werden je nach Studie Werte zwischen 47,3 und 690 pro 100.000 auf Staatenebene angegeben mit einem Mittelwert von 258/100.000 (60).

Deutsche Krankenhausfallzahlen für das Jahr 2018, entnommen aus der Gesundheitsberichterstattung des Bundes, subsummiert unter der *International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems 10* (ICD10) Hauptdiagnose S06 „Intrakranielle Verletzung“, beziffern sich auf 284.462 (61). Nach Daten des Traumaregisters der Deutschen Gesellschaft für Unfallchirurgie (DGU) liegt die jährliche Inzidenz mittelschwerer bis schwerer SHT, die über den Schockraum aufgenommen werden, in Deutschland bei etwa 13,6/100.000 (7). Generell häufiger betroffen ist das männliche Geschlecht, wenngleich auch die Zahlen bzgl. des Geschlechterverhältnisses stark schwanken (59). Die am häufigsten dokumentierten Verletzungsmechanismen, die zu einem SHT führen sind Autounfälle und Stürze (62), wobei in zwei neueren Reviews, die Daten europäischer Studien vergleichen, Stürze seit etwa dem Jahre 2000 an erster Stelle stehen und somit Autounfälle als Hauptgrund für ein SHT abgelöst haben (59, 60). Laut Brazinova et. al bleibt die Inzidenzrate bei Betrachtung des gesamten europäischen Kontinents gegenüber Vorzahlen aus 2006 annähernd gleich (60).

SHTs treten gehäuft bei Menschen unter 25 Jahren und bei Menschen über 75 Jahren auf (59), wobei sich in den letzten Jahren und Jahrzehnten die Zusammensetzung der von einem SHT Betroffenen geändert hat. Seit 1980 hat sich das mittlere Alter der Geschädigten in Industrienationen fast verdoppelt (2, 63), überwiegend bedingt durch die älter werdende Bevölkerung und die damit einhergehende gesteigerte Häufigkeit von Stürzen, vornehmlich auf

dem Boden kardiovaskulär- oder krebsbedingter Morbidität (2, 60, 64). In Entwicklungs- und Schwellenländern fußt eine steigende Inzidenz der SHT vornehmlich auf ein erhöhtes Verkehrsaufkommen. Überproportional viele der sich weltweit ereignenden Verkehrsunfälle sowie 90 % aller traumabedingten Todesfälle treten in diesen Ländern auf (65, 66). Dies deutet auf ein enormes Potential hin, die dortigen Fallzahlen zu vermindern, etwa durch bereits in ihrer Effektivität bestätigte Maßnahmen wie Helmpflicht (67, 68) oder der Einführung oder Anpassung einer generellen Geschwindigkeitsbeschränkung (69, 70).

### **2.2.3 Medizinische und gesellschaftliche Bedeutung**

Neben der vergleichsweise hohen Mortalität spielen nicht zuletzt aufgrund der Tatsache, dass auch die jüngere Population häufig durch ein SHT betroffen ist, Komplikationen, Folgeerkrankungen, soziale Herausforderungen sowie gesundheitsökonomische Aspekte eine herausragende Rolle bei der Betrachtung des Krankheitsbildes. Während nach einem schweren SHT Mortalitäten von bis zu 50 % angegeben werden, leiden nahezu alle Überlebenden an einer Behinderung (71).

Beschrieben werden Komplikationen und Folgeerkrankungen wie neurodegenerative Erkrankungen, etwa Morbus Alzheimer oder andere Demenzformen (72, 73), Morbus Parkinson (74) oder die chronische traumatische Enzephalopathie, welche vor allem nach wiederholten leichten SHTs im sportlichen Kontext von Bedeutung zu sein scheint (75). Eine neu auftretende Epilepsie ist in den Folgejahren nach dem SHT regelmäßig zu beobachten (76), ebenso psychiatrische Erkrankungen wie Depressionen oder Angststörungen (77, 78). Noch Jahre bis Jahrzehnte nach dem Ereignis klagen viele Betroffene über eine fortbestehende Einschränkung ihrer Lebensqualität (79).

In Anbetracht der aufwendigen intensivmedizinischen Akutbehandlung, der sich anschließenden Rehabilitation, der Behandlung der beschriebenen teils schwerwiegenden Folgeerkrankungen, des resultierenden Arbeitsausfalls der Betroffenen sowie Kosten für Pflegeleistungen und Hilfsmittel ist auch die ökonomische Belastung durch SHT zu berücksichtigen (80, 81). So werden die gesamten internationalen Kosten auf 400 Milliarden US-Dollar geschätzt, was einem Anteil von etwa 0,5 % am Welt-Bruttoinlandsprodukt entspräche (2).

### **2.2.4 Pathophysiologie des SHT**

Grundsätzlich unterscheidet man in der Pathogenese des SHT den Primär- und Sekundärschaden als Kategorien für die zeitliche Abfolge unterschiedlicher pathophysiologischer Prozesse infolge des Traumas.

Der Primärschaden beschreibt die Schädigung des Gehirns während der akut auftretenden äußeren Krafteinwirkung auf den Schädel. Er stellt somit die unmittelbare Gewebeschädigung

infolge der Deformation des Hirngewebes durch mechanische Kräfte im Rahmen des Aufpralls dar. Bei diesen mechanischen Kräften handelt es sich um Rotations- oder Linearkräfte, Aufprallverzögerungen oder eine Kombination verschiedener Mechanismen, die zu Kontusions-, Scher- und Dehnungsverletzungen von Neuronen und deren Axonen und Dendriten, Blutgefäßen aber auch Gliazellen führen (13, 82, 83). Hieraus erklären sich bspw. Blutungen in unterschiedlichen Lagebeziehungen zum Gehirn und den Hirnhäuten (58). Besonders bemerkenswert bzgl. einer axonalen Schädigung ist der *diffuse axonal injury* (DAI), da er direkt mit der Schwere des Hirnschadens in Bezug auf die Symptomatik und das funktionelle Outcome korreliert (84, 85). Der DAI bezeichnet eine direkte mechanische Zerstörung des axonalen Zytoskeletts, konsekutive Transportunterbrechung, Zellschwellung und Proteolyse. Diese Art der Schädigung trägt zur Entstehung einer initialen Bewusstlosigkeit und auf längere Sicht zu einem eventuell fortbestehenden Koma bei (86).

Der Sekundärschaden ist gekennzeichnet durch seine Entstehung über einem Zeitraum von Minuten (min) bis Monaten oder sogar Jahren nach dem eigentlichen Trauma (85, 86). Er umfasst aus klinischer Sicht die Komplikationen, die durch die primäre Schädigung ausgelöst werden. So kommt es durch metabolisch bedingte Änderungen der Membranpermeabilitäten und Integritätsveränderungen der Blut-Hirn-Schranke (BHS) konsekutiv zur Entwicklung eines Hirnödems und einem Hirndruckanstieg, der eine Minderperfusion des Hirngewebes nach sich zieht (10, 87). Daraus folgt eine Ausdehnung der primären Läsion, die teils ein Vielfaches des ursprünglich betroffenen Hirnareals umfasst (88). Oft wird dieses sekundär affizierte Gebiet als „traumatische Penumbra“ bezeichnet (71).

Doch nicht nur direkt umgebende Gebiete sind durch Hirndrucksteigerung und Minderperfusion betroffen. Durch die anatomisch bedingte Einbettung des Gehirns innerhalb der Schädelhöhle wirkt sich intrazerebraler Druckanstieg auch auf entfernte Hirnbereiche aus, zu Ungunsten der zerebralen Perfusion. Starke Drucksteigerungen können schließlich zu Herniationen von Hirngewebe führen. Im schlimmsten Falle kommt es zu einer sogenannten unteren Einklemmung, einer Verlagerung der Kleinhirntonsillen in das *Foramen occipitale magnum*, die in der Folge durch Kompression des verlängerten Marks mit enthaltenem Atem- und Kreislaufregulationszentrum direkt zum Tod führen kann (89, 90).

Besonders in der traumatischen Penumbra laufen zeitgleich verschiedenste Prozesse auf zellulärer und molekularer Ebene ab, die in ihrer Gesamtheit die Funktion des umliegenden Hirngewebes verändern und schlussendlich zu einem Gewebsuntergang durch Nekrose und Apoptose führen (10, 91), somit das Outcome des vom SHT betroffenen Patienten fortschreitend verschlechtern (71, 92, 93).

Da der Primärschaden außer durch Prävention therapeutisch nicht zu beeinflussen ist, liegt der Fokus aktueller wie zukünftiger Therapien auf der Verhinderung oder zumindest einer Abschwächung der Ausbildung des Sekundärschadens (12). In Ermangelung einer zielgerichteten Therapie, die in die pathophysiologischen Prozesse nach SHT direkt eingreift, besteht die aktuelle Behandlung in der Stabilisierung bzw. Sicherung der Vitalparameter und der Kontrolle und der nötigenfalls medikamentösen oder operativen Senkung des erhöhten Hirndrucks durch Ödembildung und intrakranielle Hämorrhagien sowie in der Versorgung von Begleitverletzungen wie bspw. Schädelfrakturen (94).

Aufgrund der Komplexität der ablaufenden pathophysiologischen Prozesse wie Exzitotoxizität (95), mitochondrialer Dysfunktion (96), oxidativem Stress (97) und Neuroinflammation (12) soll im Folgenden nur auf die dafür wesentlichen Aspekte kurz eingegangen werden.

#### **2.2.4.1 Neuroinflammation**

Nach einem SHT ablaufende Entzündungsprozesse spielen eine wichtige Rolle in der Pathogenese des sekundären Schadens. Es handelt sich hierbei um eine sogenannte sterile Entzündung, aufgrund des Fehlens eines externen Pathogens, was die Neuroinflammation wesentlich von einer Entzündungsreaktion auf Basis einer Infektion unterscheidet (92). Bei einer Inflammation aufgrund einer Infektion werden durch das Immunsystem sogenannte *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs), eine Gruppe mikrobieller Moleküle, die sich durch ähnlich biochemische Konfigurationen auszeichnen, erkannt (98). Dies geschieht durch PRPs, spezielle intra- und extrazelluläre Rezeptoren. Zu diesen PRPs gehören bspw. C-Typ-Lektinrezeptoren, *nucleotide-binding oligomerization (NOD) -like*-Rezeptoren und *Toll-like*-Rezeptoren, eine wichtige Rezeptorgruppe aus elf Subtypen, die in der Lage ist, unterschiedlichste pathogene Muster aus Bakterien, Viren, Protozoen und Parasiten zu erkennen (99).

Bei einer sterilen Entzündung kommt es zum zellulären Stress bzw. zum nicht-apoptotischen Zelluntergang und einer extrazellulären Anreicherung eigentlich zellulärer Bestandteile (92). Hierunter befinden sich Moleküle, sogenannte Alarmine, die ebenfalls spezielle biochemische Muster aufweisen und ebenso wie PAMPs an speziellen, wenn auch teilweise anderen, PRPs binden. Einige Alarmine werden zudem durch Zellen des Immunsystems aktiv sezerniert. Zu den Alarminen gehören unter anderem *high mobility group box 1* (HMBG1), ein nukleäres Protein, S100-Proteinen vor allem aus glialen Zellen, Desoxyribonukleinsäure (DNA), Ribonukleinsäure (RNA), IL-1 $\alpha$ , bestimmte *Heat Shock Proteins* (HSPs) (100) sowie im Besonderen Energiesubstrate wie Adenosindiphosphat (ADP) und Adenosintriphosphat (ATP) über purinerge Rezeptoren (101, 102).

Träger der PRPs sind Zellen des angeborenen Immunsystems, bspw. residente Mikroglia, die nach Aktivierung durch Alarmine oder PAMPs, die zusammen auch als *damage-associated molecular patterns* (DAMPs) bezeichnet werden, Funktionsänderungen zeigen. Einer Rezeptoraktivierung folgt eine intrazelluläre Signalkaskade, veränderte Genexpressionsmuster und die Sekretion pro-inflammatorischer Mediatoren. Dazu zählen bspw. Chemokine, die wiederum weitere Zelltypen aktivieren und zu einer komplexen Immunantwort führen.

Die ersten Zellen, die im Schadensgebiet nach einer traumatischen Hirnschädigung bereits innerhalb weniger Minuten zu finden sind, sind aktivierte, residente Mikroglia (25, 92, 103). Mikroglia sind nach ihrer Aktivierung einer Reihe morphologischer und physiologischer Veränderungen unterworfen. Die Ausläufer der ruhenden verzweigten Mikroglia verlängern sich in Richtung des Schadensgebiets, die übrige Verzweigung verschwindet in Teilen zugunsten einer runderen Struktur mit kürzeren aber dickeren Ausläufern, die den Immunzellen die Migration und das Umgeben geschädigter Neurone ermöglicht (104). Neben der Migration kommt es ebenso zu einer Proliferation der Mikroglia am Schadensort. Hier übernehmen sie die Phagozytose geschädigten und abgestorbenen Nervenzellgewebes, ein unbedingt notwendiger Schritt, der dem Überleben umgebender Neurone und der Myelinregeneration der Nervenbahnen dient und dem damit auch funktionelle Wiederherstellung zugesprochen wird (92, 105-107).

Die sich anschließende Rolle der aktivierten Mikroglia wird im Wesentlichen bestimmt durch die induzierte Veränderung der Genexpression und die daraus resultierende unterschiedliche Zusammensetzung der sezernierten Modulatoren. Dies führt ausgehend von einer nicht-aktivierten Zelle, die als M0-Mikroglia bezeichnet werden kann, zur Einteilung der aktivierten Mikroglia in sogenannte M1-Zellen, die klassisch aktivierten Zellen, und M2-Zellen, welche entsprechend als alternativ aktivierte Zellen bezeichnet werden (108). In diesem Zusammenhang spricht man auch von der M1- oder M2-Polarisierung der Mikroglia.

M1-Mikroglia werden in Anbetracht ihrer enzymatischen Ausstattung als neurotoxisch angesehen. Dazu zählen etwa die induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) und sezernierte Chemokine wie bspw. TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-6, die allesamt als pro-inflammatorisch gelten. M1-polarisierte Zellen weisen im Gegensatz zu M0- oder M2-Zellen eine verminderte Fähigkeit zur Phagozytose auf (108-110). Die pro-inflammatorische M1-Polarisierung wird unter anderem getriggert durch das Zytokin INF- $\gamma$  und das Lipopolysaccharid (LPS), einem Oberflächenmolekül gramnegativer Bakterien, das auch als Endotoxin bezeichnet wird. An der Erkennung des LPS ist maßgeblich der Subtyp 4 des TLR beteiligt (111, 112). Aufgrund der Tatsache der direkten Beeinflussung der Mikroglia durch LPS wird es in wissenschaftlichen Untersuchungen, so auch in der vorliegenden Arbeit, zur gezielten Aktivierung dieses Zelltyps genutzt (113, 114). Zur Einschätzung der Entzündungsaktivität werden weitere Marker herangezogen. Untersucht wird

die Expression des NF- $\kappa$ B, einem Transkriptionsfaktor, der die Gentranskription vieler Proteine beeinflusst, die im Rahmen von Entzündungen oder auch Zelltod eine Rolle spielen. NF- $\kappa$ B als Transkriptionsfaktor wird stets gebildet aus Homo- oder Heterodimeren fünf verschiedener Proteine. Hier betrachtet wird das Protein p65, das auch als Rel A bezeichnet wird. Ein starker Anstieg dieses Proteins ist in vielen Pathologien nachzuweisen. Dabei spielt die post-translationale Modifizierung bei der exakten Spezifizierung des NF- $\kappa$ B p65-Proteins eine entscheidende Rolle, etwa die Phosphorylierung des Serin-536 durch verschiedene Kinasen, die zur Aktivierung des NF- $\kappa$ B beiträgt, indem neben der Förderung der Translokation in den Zellkörper auch die Bindung an den Promotor verändert wird (115, 116). Beeinflusst durch die Aktivität des NF- $\kappa$ B wird unter anderem die Enzymexpression der induzierbaren Cyclooxygenase-2 (COX-2), die der Synthese der Prostaglandine  $H_2$ ,  $E_2$  und weiterer Prostaglandine dient. Diese wirken wiederum als Entzündungsmediatoren (117). Hierbei ist die genaue Rolle des COX-2 im Rahmen der Neuroinflammation ungeklärt. Während unter anderem durch vermehrte COX-2-Expression der Tod von Mikroglia und damit die Beendigung oder Abschwächung der Neuroinflammation beobachtet worden ist (118), beschreiben andere Forschungsgruppen neurotoxische Eigenschaften vermehrter COX-2-Expression während der akuten Phase (119, 120).

Als weiteres Markerenzym für Entzündungen, auch nach einer Hirnschädigung, dient die induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS). Im Gegensatz zu den anderen Isoformen der Stickstoffmonoxid-Synthasen ist die induzierbare Form nicht reguliert durch intrazelluläre Calciumkonzentrationen, produziert NO in deutlich höheren Konzentrationen und führt dadurch in neurologischen Ischämie-Modellen zu erhöhter Entzündungsaktivität und erhöhtem Schadensvolumen (121).

Die IL-6-Expression wird ebenso unter anderem durch NF- $\kappa$ B reguliert. Eine Hochregulation ist, bedingt durch eine Steigerung der Entzündungsaktivität nach einem SHT, mit einem verschlechterten Outcome assoziiert (122, 123). Auf der anderen Seite werden dem IL-6 neuroprotektive Eigenschaften zugesprochen, etwa bei der Verhinderung der Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) (124). Andere klinische Studien zeigen vermehrt auch einen positiven Einfluss auf das *Outcome* nach einem SHT (125). Die höchste Konzentration dieses Interleukins ist in den ersten Stunden (h) bis Tagen nach SHT nachweisbar (126).

Auch das IL-1 $\beta$  wird nach SHT als Entzündungsmediator vermehrt exprimiert und dient daher in der vorliegenden Studie als Inflammationsmarker (127). Die vermehrte Expression nach SHT ist maßgeblich beteiligt an der Entstehung eines Hirnödems und der verzögerten Schadensentwicklung (128). So konnte durch die Blockade der IL-1-Rezeptoren in Mäusen die Verringerung der Expression der iNOS nach induziertem SHT gezeigt werden (129).

Das neuroprotektive Pendant der M1-polarisierten Mikroglia sind die M2-Mikroglia. Sie sezernieren Zytokine, die der Proliferation dienen, wie TGF- $\beta$  und anti-inflammatorische Zytokine wie die Interleukine IL-10, IL-4 und IL-13, die wiederum auch selbst zur Aktivierung und Induktion des M2-Zustandes dienen. Auch der Wachstumsfaktor *Insulin-like Growth Factor 1* und die Arginase 1, die indirekt zu einer Hemmung der iNOS führt, gehören zum Sekretionsspektrum der M2-Mikroglia.

Einige Studien deuten darauf hin, dass in der zeitlichen Abfolge der Neuroinflammation unterschiedliche Polarisierungen im Vordergrund stehen. So scheinen unmittelbar in Folge des SHT M2-polarisierte Mikroglia zahlenmäßig zu überwiegen, in den Folgetagen und -wochen allerdings die neurotoxischen M1-Mikroglia (130). Aus anderen Studien ist bekannt, dass mikrogliale Aktivität noch Jahrzehnte nach dem eigentlich ursächlichen Trauma im Hirnparenchym nachgewiesen werden kann (131).

Neuere Übersichtsarbeiten distanzieren sich zunehmend vom M1/M2-Paradigma. Dieses Konstrukt scheint zu einfach, um komplexen pathophysiologischen Aspekten des SHT gerecht zu werden. Vielmehr können Mikroglia ihre Zytokinsekretion äußeren Bedingungen reversibel anpassen. Sie befinden sich dann in einem Kontinuum zwischen M1- und M2-Zustand, die jedoch nur in in-vitro-Experimenten nach gezielter Stimulation, nicht aber im physiologischen ZNS-Umfeld, klar voneinander abzugrenzen sind (104, 128).

Es ist noch nicht bis ins letzte Detail verstanden, welche mikrogliale Aktivität letztendlich das *Outcome* betroffener Patienten positiv wie negativ beeinflussen kann. Sicher scheint zu sein, dass die Aktivierung der Mikroglia durch verschiedene Parameter wie die Schwere des Traumas und die Zusammensetzung der Immunantwort bedingt ist (104, 132). Im akuten Stadium könnte die Reparaturfunktion überwiegen, während bei übermäßiger und chronischer Aktivierung der schädigende Einfluss im Vordergrund stehen könnte (49).

Ebenso vielfältig wie die Rolle der Mikroglia ist die der Astrozyten im Rahmen des SHT, weshalb etwa Colombo und Kollegen von den Schlüsselregulatoren der Neuroinflammation sprechen (133). Die Aktivierung dieser Zellen als Reaktion auf Entzündungsreize und die folgenden physiologischen und pathophysiologischen Veränderungen werden zusammen als reaktive Astroglie bezeichnet (110, 134). Die Bildung einer Glianarbe im Rahmen einer starken Aktivierung der Astrozyten, wie sie ein SHT nach sich zieht, führt zu einer Abgrenzung des Schädigungsgebiets gegenüber benachbarten Hirnregionen und trägt zu deren Schutz vor neurotoxischen Substanzen bei. Doch neben dieser positiven Eigenschaft gibt es einige Evidenz für einen negativen Effekt der entstehenden Glianarbe, denn auch die Regeneration geschädigter Axone wird durch diese Barriere stark eingeschränkt (135, 136). In diesem Zusammenhang spielt das Intermediärfilament GFAP neben weiteren Zytoskelettelementen wie Vimentin eine

Schlüsselrolle, weshalb die Detektion des GFAPs als Marker für astrozytäre Aktivität weit verbreitet ist und als Marker verschiedener ZNS-Pathologien herangezogen wird (137).

Neben der Bildung einer Glianarbe bewirken aktivierte Astrozyten über die Sekretion verschiedener Mediatoren eine deutliche Aktivitätssteigerung anderer Immunzellen (138). Die Aktivierung der Astrozyten kann einerseits über direkte mechanische Kräfte und konsekutiv geöffnete mechanosensitive Kanäle erfolgen, andererseits über ATP, das wiederum auch selbst von Astrozyten sezerniert werden kann und etliche weitere molekulare Trigger wie etwa diverse Zytokine, reaktive Sauerstoffspezies, aber auch Glutamat, durch dessen Aufnahme die Astrozyten außerdem der Exzitotoxizität entgegensteuern können (134, 138). Exzitotoxizität beschreibt das Phänomen des übermäßigen Calcium-Einstroms in neuronale Zellen und der konsekutiven elektrischen Erregung dieser Nervenzellen. Dieser Umstand wird gemeinhin durch das Überangebot von Glutamat und anderer exzitatorischer Transmitter im extrazellulären Raum infolge einer Hirngewebschädigung begründet, aber auch durch mechanosensitive Eigenschaften von N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptoren (NMDAR) (139).

Daher lässt sich ähnlich den mikroglialen Zellen auch den Astrozyten im Rahmen der Neuroinflammation eine duale Rolle zuschreiben, abhängig von der zeitlichen Abfolge und dem Kontext ihrer Aktivierung im Rahmen des Entzündungsgeschehens (133). So können grob ein neuroprotektiver und ein neurotoxischer Zustand der Astrozyten beschrieben werden. Der neuroprotektive Zustand kann bspw. durch die Freisetzung anti-inflammatorischer Zytokine zu neuronalem Überleben beitragen und so das klinische *Outcome* positiv beeinflussen. Ein wichtiger molekularer Weg in diesem Zusammenhang umfasst den Transkriptionsfaktor *signal transducers and activators of transcription 3*. Daneben erfüllen Astrozyten viele weitere protektive Aufgaben, zu denen die Produktion des anti-oxidativen Glutathions, die Beteiligung an der Regeneration der BHS und der Reduktion eines vasogenen Ödems zählen (134).

Zum nachteiligen bzw. schädigenden Aktivierungszustand der Astrozyten trägt neben etlichen weiteren Stoffen das IL-17 bei, woraufhin analog zu den oben beschriebenen Mikroglia Transkriptionsfaktoren wie das NF- $\kappa$ B die Produktion und Sekretion pro-inflammatorischer Moleküle antreiben und auf diese Weise die Ausbildung eines Hirnödems gefördert wird. So konnte gezeigt werden, dass es durch Blockade des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B zu einem Rückgang der Astrozytenschwellung und somit zu einer verminderten Ausbildung eines Hirnödems nach SHT kommt (140).

Beide Zustandsformen und etliche Zwischenformen der immunkompetenten Astroglia treten im Rahmen des neuronalen Entzündungsgeschehens auf und tragen wesentlich zur Pathophysiologie der Neuroinflammation bei (133).



Neben der Aktivierung der residenten Immunzellen spielt bei der Entwicklung der Neuroinflammation auch die Einwanderung peripherer Immunzellen in das ZNS eine entscheidende Rolle. Eine Schädigung der BHS führt zur Ausschwemmung verschiedener Mediatoren und Zelltrümmer und einer Aktivierung des peripheren Immunsystems. Dies zeigt sich in einer Erhöhung der Anzahl peripherer Immunzellen und deren Aktivierungszustands (141, 142). Bereits nach wenigen Stunden können neutrophile Granulozyten im Gehirn nachgewiesen werden (143). Auch Monozyten dringen wenige Tage nach der Hirnschädigung in das betroffene Schadensareal ein, um dort zu Makrophagen zu differenzieren (144).

Neutrophile phagozytieren untergegangene Zellen, sezernieren lysosomale Enzyme und sondern freie Radikale ab (145). Weiterhin mehrt sich die Evidenz, dass neutrophile Beteiligung zur Ausbildung des Sekundärschadens beiträgt, bzw. Blockung und Antagonisierung neutrophiler Effekte die Schädigung limitieren kann (146, 147). Nichtsdestotrotz zeigt die Beteiligung der neutrophilen Granulozyten auch positive Effekte bzgl. neurologischer Wiederherstellungsprozesse (148). Analog dazu tragen an der Neuroinflammation beteiligte Makrophagen zur Regeneration des Gewebes bei, können aber auch im Gegenteil zu einer weiteren Gewebeschädigung führen (104, 149). In ihrer Funktion bzgl. der neuronalen Inflammation und der Zusammensetzung der sezernierten Chemokine sind sie den Mikroglia ähnlich (145).

Auch T-Zellen und weitere Bestandteile des adaptiven Immunsystems sind an der Entzündungsreaktion infolge eines SHT beteiligt. Obwohl ihre Rolle noch nicht bis ins Detail verstanden ist, weisen einige Erkenntnisse auf einen eher protektiven Part hin, andere Studien bringen Evidenz für pro-inflammatorische und neurotoxische Effekte vor (150, 151).

Neben der zellulären Immunantwort auf Basis einer neuronalen Schädigung und den in diesem Zusammenhang bereits erwähnten Zytokinen, zu denen bspw. die Chemokine, die pro- und anti-inflammatorischen Interleukine, die Interferone und Tumornekrosefaktoren gehören, sind weitere humorale oder membrangebundene Faktoren am Entzündungsgeschehen beteiligt. Von besonderer Bedeutung sind die Matrix-Metalloproteinasen (MMP) und auch *A Disintegrin and Metalloproteinase* (ADAM) (152). Im gesunden Gehirn sind diese unabdingbar bei der Reorganisation der extrazellulären Matrix. Bei Auftreten von Pathologien, etwa im Rahmen eines SHT, steigt die Menge der sezernierten MMPs, die dadurch zur Neuroinflammation, dem Integritätsverlust der BHS und dem konsekutiven Zelltod beitragen (153). Eine starke Aktivität von Metalloproteinase resultiert dann bspw. in der Entstehung eines vasogenen Ödems und der Induzierung von Apoptosekaskaden, hauptsächlich bedingt durch die Konvertierung von Pro-Caspasen zu Caspasen (91, 154).

Auf der anderen Seite tragen bestimmte MMP und ADAM 10 zur synaptischen Reorganisation nach einem SHT bei, wohingegen umgekehrt eine verlängerte Aktivierung von ADAM 10 der neurologisch funktionellen Wiederherstellung entgegensteht (155).

Eine Schlüsselrolle im Rahmen der Neuroinflammation bzw. der Gewebsschädigung nach SHT, vor allem innerhalb der traumatischen Penumbra, nehmen Neurotrophine ein, eine Klasse von Signalmolekülen, die neuronalem Überleben, axonalem Wachstum und synaptischer Plastizität dienen (71). Wichtige Vertreter sind der *Nerve Growth Factor* (NGF), die Neurotrophine 3 und 4 sowie der *Brain-derived Neurotrophic Factor* (BDNF), dessen Expression in dieser Forschungsarbeit exemplarisch untersucht wird. Neurotrophine werden als Vorläuferproteine synthetisiert und anschließend zu ihrer maturen Form prozessiert. Diese maturen Neurotrophine entfalten ihre Wirkung über spezifische Trk-Rezeptoren. Die Vorläuferproteine wie proBDNF können an sogenannten p75 Neurotrophinrezeptoren (p75NTR) binden und so zur Induktion des Zelltodes führen (156, 157). In Mäusen konnte eine Erhöhung der p75NTR-Dichte nach SHT nachgewiesen werden (158). Die exakte Rolle sowie die Einordnung des BDNF als neuroprotektiv oder sogar neurodegenerativ nach SHT bleibt bei uneinheitlicher Studienlage teilweise unklar (71), wobei es Hinweise darauf gibt, dass beschriebene negative Effekte der Neurotrophine nach SHT auf der Eigenschaft des proBDNF als Induktor der Apoptose beruhen könnten (159).

Das neurologische Outcome betroffener Patienten ist neben etlichen weiteren Faktoren unter anderem abhängig vom Umfang untergegangenen Nervengewebes im Rahmen der sekundären Schädigung. Als Marker für neuronalen Zelltod gelten bspw.  $\alpha$ II-Spektrin-Spaltprodukte, die daher auch in der vorliegenden Arbeit zur Einschätzung herangezogen werden. Die Entstehung der verschiedenen Spaltprodukte des Zytoskelettproteins  $\alpha$ II-Spektrins, die sich in ihrer Molekülgröße unterscheiden, geht zurück auf die Degradierung des Zytoskeletts durch Prozesse der Apoptose und Nekrose unter wesentlicher Beteiligung der Proteasen Calpain und Caspase-3. Über den Weg einer lokalen Schädigung der axonalen Plasmamembranen, einhergehend mit einer veränderten Permeabilität dieser, kommt es zu einem intrazellulären Anstieg der Calcium-Konzentration. Dies wiederum kann durch eine direkte Aktivierung von Proteasen zu einer Schädigung des axonalen Zytoskeletts oder über eine mitochondriale Schädigung und Freisetzung pro-inflammatorischer Substanzen wie des Cytochrom c (siehe dazu auch 2.2.4.2) zu einer Caspase-vermittelten Degradation des Axon-Skeletts führen. Neben der bereits erwähnten direkten mechanischen Komponente tragen vor allem diese Pathomechanismen wesentlich zur Entstehung des traumatisch bedingten axonalen Schadens, dem DAI, bei. Die Detektion des vermehrten Anfalls der  $\alpha$ II-Spektrin-Spaltprodukte kann somit einen Hinweis auf intrazelluläre Calcium-Erhöhung, die Aktivierung von Proteasen wie Calpain oder Caspasen, mitochondriale

Funktionsbeeinträchtigungen, axonale Schädigung sowie neuronalen Untergang im untersuchten Gewebe geben (160, 161).

Daneben werden die Expressionslevel von *Growth arrest and DNA-damage-inducible protein beta* (GADD45B), einem Protein, das an der Produktion pro-inflammatorischer Zytokine und Zellplastizität beteiligt ist (162) und *Activity-regulated cytoskeleton associated protein* (Arc), einem Zellplastizitätsmarker, dessen Expression unter verschiedenen pathologischen Umständen verändert ist, quantitativ untersucht (163).

#### **2.2.4.2 Mitochondriale Dysfunktion und oxidativer Stress**

Mitochondrien sind für die zelluläre Funktion in vielfacher Hinsicht von entscheidender Bedeutung. Die oft verwandte Bezeichnung dieser Zellorganelle als die „Kraftwerke der Zelle“ kann daher ihren Stellenwert für die zelluläre Physiologie und Homöostase nur sehr eingeschränkt beschreiben. Ihre Entstehung bzw. ihr Vorkommen in humanen Zellen wird erklärt durch die sog. Endosymbiontentheorie, wonach es nach der Phagozytose von Proteobakterien anschließend nicht zu deren Verdau gekommen ist, sondern zu einer Integration in den zellulären Energiehaushalt (164, 165).

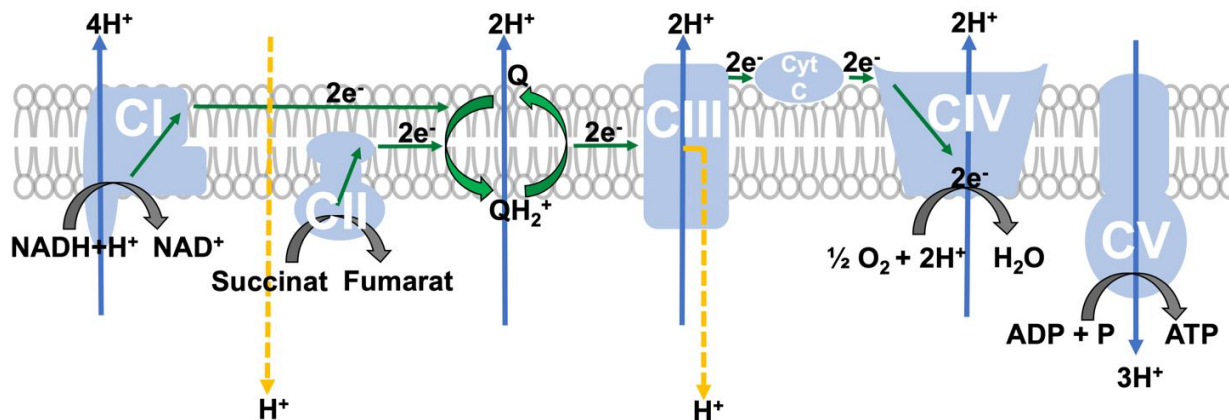
Das Mitochondrium ist der Ort des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes und des Fettsäureabbaus, zwei Prozessen, die der Generierung von Acetyl-Coenzym A dienen, einem Schlüsselmolekül des Energiestoffwechsels. Der Zitratzyklus läuft ebenfalls in der Matrix des Mitochondriums ab, die Komplexe der Elektronentransportkette sind in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert, wo ebenso die sog. oxidative Phosphorylierung stattfindet. All diese Stoffwechselwege hängen eng miteinander zusammen, bedingen einander und dienen in erster Linie der Produktion des universellen Energiesubstrates der Zelle, dem ATP (166). Mit einem Anteil von etwa 95 % des intrazellulären ATP sind Mitochondrien die Hauptproduzenten dieses Energiespeichermediums (167).

Das Gehirn hat einen besonders hohen Energiebedarf und einen damit einhergehend hohen Verbrauch von ATP. Im Kontrast zu einem Anteil von etwa 2 % an der Gesamtkörpermasse steht ein Energieumsatz des Gehirns von 20 % der kompletten Stoffwechselleistung. Ein Großteil der umgesetzten Energie wird für die synaptische Übertragung und verschiedene Haushaltsfunktionen eingesetzt, wozu bspw. die Protein- und Fettsynthese sowie diverse weitere Transportvorgänge zählen (168-170). Der Großteil des ATP entsteht in einem Prozess, der oxidative Phosphorylierung (OXPHOS) genannt wird. Hieran beteiligt ist eine Elektronentransportkette, aufgebaut aus vier Komplexen (CI-IV), eingebettet in die innere Mitochondrienmembran, die wiederum aus vier bis über 40 Proteinen bestehen und ein in Reihe geschaltetes Redoxsystem darstellen. Dabei kommt es über CI und CII zur Aufnahme von

Elektronen aus den in vorher ablaufenden Reaktionen wie dem Zitratzyklus entstandenen Reduktionsäquivalenten Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (NADH+H<sup>+</sup>) sowie Flavin-Adenin-Dinucleotid (FADH<sub>2</sub>), die in der Folge über exergone Redoxreaktionen durch die weiteren Komplexe und die mobilen Elektronentransportproteine Ubichinon (Coenzym Q) und Cytochrom c fortgeleitet werden (zusammengenommen bezeichnet als Elektronentransportsystem (ETS)), um in CIV final Sauerstoff zu Wasser zu reduzieren. Im Rahmen der freiwerdenden Energie der Redoxsysteme kommt es in den Komplexen I, III und IV sowie im sog. Q-Zyklus, der Reduktion von Ubichinon zu Ubichinol, zur Translokation von Protonen in den intermembranären Raum und damit zu einem Protonen-Konzentrationsgradienten über der inneren Mitochondrienmembran. Der Ausgleich dieses Gradienten gelingt über den Kanal der ATP-Synthase (CV), einem Enzym, das die Phosphorylierung von ADP zum energiereicheren ATP katalysiert (166, 167, 171).

Neben der ATP-Synthase gibt es weitere mögliche Wege für Protonen in die Mitochondrienmatrix in Richtung des Gradienten zurückzugelangen und dort ebenfalls unter Sauerstoffverbrauch aber ohne Energieproduktion zu Wasser zu reagieren. Dieser Anteil an der mitochondrialen Atmung wird als LEAK-Atmung (Leck-Atmung) bezeichnet, entsprechend den Protonen, die durch „Lecks“ der inneren Mitochondrienmembran die ATP-Synthase umgehen oder über den „Protonen-Slip“, einer Eigenschaft der Protonenpumpen der einzelnen Komplexe, das phosphorylierende System umgehen. Die LEAK-Atmung hat je nach Gewebe unter physiologischen Bedingungen einen Anteil von 20-50 % am Grundumsatz. Ein Großteil des Protonen-Lecks scheint bedingt durch die Durchlässigkeit der Adenin-Nukleotid-Translokase (ANT), durch den etwa das Substrat ADP ins Innere des Mitochondriums gelangt. Der basale Anteil an der LEAK-Atmung scheint dabei unreguliert zu sein, ein Teil dagegen gilt als induzierbar, bspw. über die Beeinflussung der ANTs oder sogenannter *Uncoupling*-Proteine (UCPs). Einer verstärkten LEAK-Atmung, die einer teilweisen Entkopplung des ETS vom OXPHOS entspricht, wird vermehrt eine Verringerung der Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) zugesprochen (172, 173).

### Intermembranraum



### Mitochondrienmatrix

**Abbildung 1: Mitochondriale Atmungskette**

Darstellung der Komplexe der Atmungskette (CI-V), dem Q-Zyklus (Q) und Cytochrom c (Cyt c) innerhalb der inneren Mitochondrienmembran; grüne Pfeile symbolisieren den Elektronentransport innerhalb der Redoxsysteme zur finalen Synthese von Wasser (H<sub>2</sub>O) aus Sauerstoff (O<sub>2</sub>) und Protonen (H<sup>+</sup>); die Elektronen entstammen dem Substrat des CI NADH+H<sup>+</sup> und des CII Succinat; die Redoxsysteme liefern die Energie zum Aufbau des Protonengradienten über der inneren Mitochondrienmembran; blaue Pfeile symbolisieren aktiv gepumpte Protonen durch Protonenpumpen innerhalb CI,III und IV sowie dem Q-Zyklus zum Aufbau des Protonengradienten sowie den Rücklauf der Protonen durch CV zur ATP-Synthese aus ADP und Phosphat (P); gelbe Pfeile symbolisieren den Protonenbypass durch die innere Membran (Protonen-LEAK) sowie den Protonenrückfluss durch die Komplexe bspw. bei unvollständigem Pumpvorgang (Protonen-Slip).

Während des Elektronentransfers kommt es bereits unter physiologischen Bedingungen zur Bildung von Superoxidanionen (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), in allerdings geringem Ausmaß. O<sub>2</sub><sup>-</sup> gehört zu den ROS und bewirkt bei intrazellulärer Anreicherung die Entstehung von oxidativem Stress, der auf vielfältige Weise die Zellfunktion beeinträchtigen kann. Die Generierung von O<sub>2</sub><sup>-</sup> erfolgt vornehmlich an den Komplexen I und III (174). In der gesunden Zelle gelingt ein Schutz vor in der Atmungskette entstandenem O<sub>2</sub><sup>-</sup> durch die Pufferfunktion des Glutathion-Systems und die enzymatische Eliminierung in zwei Schritten durch die Superoxiddismutase und Katalase. Im Gegensatz zu den meisten Zellen anderer Gewebe zeigen Neurone eine erhöhte Anfälligkeit für eine Schädigung durch ROS, welche unter anderem begründet wird durch den erhöhten Energiebedarf neuronaler Zellen, der Akkumulation von Schäden aufgrund ihres postmitotischen Zustandes sowie einer geringeren anti-oxidativen Aktivität (167). Abseits ihrer schädigenden Komponente sind ROS in gesunden Zellen auch an Signalwegen beteiligt und tragen zur Homöostase der Zelle bei (175). Neben ihren umfassenden Aufgaben im zellulären Energiehaushalt, nehmen Mitochondrien etliche weitere Aufgaben wahr. So sind sie maßgeblich beteiligt am Calcium-Haushalt der Zelle. Bei erhöhten intrazellulären Calciumwerten gelangt Calcium über den mitochondrialen Calcium-Uniporter (mCU) und das durch die Elektronentransportkette aufgebauten Protonen- und Spannungsgradienten über der inneren Membran in die mitochondriale Matrix (176). Das Mitochondrium wirkt auf diese Weise als Calcium-Puffer zum Schutz der Zelle vor einer

Aktivierung calcium-abhängiger Proteasen und resultierender Zellschädigung infolge einer zellulären Calciumüberladung. Eine Schlüsselrolle nehmen Mitochondrien bzgl. der Induktion des Zelltodes ein. Über den intrinsischen Weg der Apoptoseinduktion kommt es zur Freisetzung zweier Gruppen pro-apoptotischer Proteine: Einer ersten Gruppe, die den Caspase-abhängigen mitochondrialen Weg induziert, zu der auch das Cytochrom c gehört, sowie einer zweiten Gruppe, die Caspase-unabhängig die Fragmentierung der Desoxyribonukleinsäure (DNA) bedingt. Daneben sind Mitochondrien auch am Zelltod durch Nekrose beteiligt (167, 177).

In Anbetracht ihrer vielfältigen Beteiligung in der Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase, der Induktion des Zelltods und der Energiegewinnung ist von einer großen Bedeutung der Mitochondrien auch in pathologischen Zellzuständen und einer Alteration in ihrer Funktion durch äußere Einflüsse auszugehen. Es kommt zu Veränderungen, die in ihrer Gesamtheit als mitochondriale Dysfunktion bezeichnet werden und einen wesentlichen Anteil an der Entstehung des Sekundärschadens nach einem SHT innehaben. Die Calciumhomöostase und -pufferung scheint hierbei von erhöhter Wichtigkeit. Wie bereits in Kapitel 2.2.4.1 angedeutet, kommt es im Rahmen der sekundären Hirnschädigung zur Exzitotoxizität, einer Übererregung der Neurone durch Calciumüberladung, die bedingt ist durch ein übermäßiges Angebot an exzitatorischen Neurotransmittern oder auch glutamatunabhängige Szenarien wie mechanische Schädigung der Zellmembran oder eine Calciumfreisetzung aus intrazellulären Speichern wie dem endoplasmatischen Retikulum (139, 178).

Der übermäßige intrazelluläre Calciumanstieg schädigt das Neuron auf verschiedene Weise. Ein Mechanismus umfasst bspw. die Aktivitätssteigerung der neuronalen Stickstoffmonoxid-Synthase (nNOS) (179, 180) oder die Aktivierung intrazellulärer calciumabhängiger Caspasen (181).

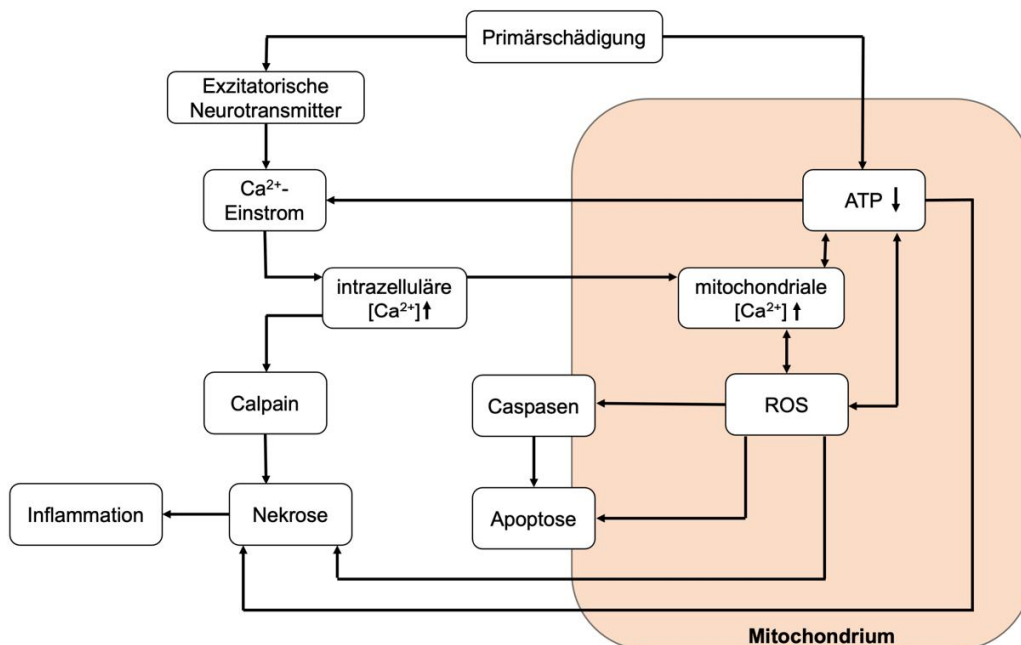
Die zellprotektive Funktion der Mitochondrien als Calcium-Puffersystem konnte unter anderem belegt werden durch deutlich erhöhte intramitochondriale Calciumwerte in Neuronen von Ratten nach einem induzierten SHT (182).

Um den aus der mitochondrialen Calciumaufnahme resultierenden Zusammenbruch des Protonengradienten über der inneren Mitochondrienmembran zu kompensieren, kommt es kurzfristig zur reaktiven Steigerung des Ablaufs der Atmungskette, langfristig jedoch zu einer deutlichen Verminderung der mitochondrialen Atmungsaktivität (167, 183). Der zunehmende Verlust des Spannungsgradienten über der inneren Mitochondrienmembran zieht verschiedene Konsequenzen nach sich: Es kommt zu einer Umkehr der Funktion der ATP-Synthase mit konsekutivem ATP-Verbrauch sowie zu einem Anstieg des Auftretens von ROS und reaktiver Stickstoffspezies. Die Oxidation verschiedener Struktur- und Kanalproteine durch die entstandenen freien Radikale führt schließlich zur Bildung einer *mitochondrial permeability transition pore* (mPTP), die wiederum den oben beschriebenen Austritt mitochondrialer Proteine

wie des Cytochroms c bedingt und apoptoseinduzierend wirkt (167). Außerdem führt die Bildung der mPTP zu einer Entkopplung des ETS von der OXPHOS, wodurch die Menge des synthetisierten ATP weiter negativ beeinflusst wird (184).

Je nach betrachtetem SHT-Traumamodell können mehr oder weniger direkte Effekte auf die mitochondriale Funktion wahrgenommen werden (167). Bei der Untersuchung der Alterationen in Ferkeln nach einem Rotationstrauma kann in der respirometrischen Untersuchung eine Abnahme der mitochondrialen Atmung nach Induktion des CI beobachtet werden bei gleichzeitiger Steigerung der CII-bedingten Atmungsaktivität (185). In Ratten konnte durch Anwendung eines *Fluid Percussion Injury* Modells (s. Kapitel 2.2.5) eine Veränderung der neuronalen ATP-Synthese, der mitochondrialen Konzentration sowie dem Volumen der Mitochondrien in verschiedenen Hirnarealen gezeigt werden (186).

Entsprechend der mitochondrialen Schädigungsmuster nach SHT, zu denen die übermäßige Calciumüberladung, eine erhöhte ROS-Entstehung, Bildung einer mPTP und die Induktion der Apoptose gehören, wurden Therapieoptionen wie der Einsatz der Entkoppler Carbonylcyanid-4-phenylhydrazon (FCCP) oder 2,4-Dinitrophenol (2,4-DNP) teilweise erfolgreich in präklinischen Studien untersucht (182, 187, 188). Auch das Immunsuppressivum Cyclosporin A, das die Bildung der mPTP abschwächt (183, 184, 189), oder das Antidiabetikum Pioglitazon beeinflussen mitochondriale Veränderungen nach SHT positiv (167, 190).



**Abbildung 2: Mitochondriale Dysfunktion**

Darstellung des Anteils mitochondrialer Funktionsstörungen in Folge der primären Schädigung im Rahmen des SHT; modifiziert nach Cheng et al., 2012 (96)

### 2.2.5 Das SHT im Tiermodell

Zur Erforschung des SHT bzgl. verschiedener Fragestellungen in vivo sind Tierversuche notwendig. Etabliert hat sich die tierexperimentelle Forschung an Mäusen, die daher auch in der vorliegenden Arbeit genutzt werden, unter anderem aufgrund ihrer geringen Körpergröße, guter Zuchtbedingungen, hoher Kosteneffizienz, dem Vorliegen etablierter Messinstrumente zur Beurteilung des Outcomes, der Möglichkeit gentechnischer Veränderungen und einer guten Studienlage bei Untersuchung induzierter SHTs an Nagetieren (191, 192). Trotz eines vergleichbaren zentralnervösen Aufbaus unterscheidet sich das murine Hirn von dem des Menschen bzgl. einiger anatomischer, physiologischer und biochemischer Parameter, was die Übertragbarkeit der gewonnenen Erkenntnisse limitiert. Dennoch lässt sich die Pathophysiologie und deren Beeinflussung am Mausmodell nachvollziehen (192, 193).

Die Induktion eines SHT im Mausmodell bietet zudem den Vorteil der Betrachtung einer homogenen Kohorte ohne wesentliche Differenzen bzgl. Geschlecht, der Art des Traumas, dem genetischen Hintergrund oder dem Lebensstil. Zum Zweck der Reproduzierbarkeit der induzierten Hirnschädigung werden verschiedene Modelle zur Induktion eines SHT im Tiermodell eingesetzt, die alle unterschiedliche Schädigungsmuster nach sich ziehen und jeweils Vorteile aber auch Schwächen aufweisen. Können einige Modelle die diffuse axonale Schädigung darstellen, so sind in anderen Modellen der lokalisierte Hirnschaden, Blutungskomplikationen oder das offene SHT besser zu untersuchen (191). Durch keines der verwendeten Modelle kann die volle Bandbreite der Schädigungen nach einem SHT exakt nachgestellt werden (194).

Häufig eingesetzt werden bspw. das FPI, bei dem das Auftreffen eines definierten Wasserstrahls auf die intakte Dura zur Schädigung führt, sog. *Weight drop* Modelle, in denen ein Gewicht definierter Masse aus festgelegter Höhe auf den intakten Schädel auftrifft oder das Modell des *Controlled Cortical Impact (CCI)*, das auch in der vorliegenden Studie genutzt wird. Hierbei wird ein Bolzen, welcher direkt der Dura mater aufliegt, durch elektromagnetische oder pneumatische Kraft beschleunigt und dringt kurzzeitig ins Hirnparenchym ein. Mithilfe des CCI lässt sich die Kontusion als Schädigung fokaler Hirnbereiche mit einhergehenden Mikroblutungen, wie sie im menschlichen SHT sehr häufig beobachtet werden, am ehesten nachstellen (193). Nach einem CCI treten axonale Schädigungen, Störungen der BHS, Ödeme, inflammatorische Prozesse und kognitive Veränderungen auf, wie sie aus klinischen Untersuchungen bekannt sind. Daneben sind die hohe Reproduzierbarkeit und eine hohe Kontrolle der Schädigungsmuster sowie eine geringe Mortalität Vorteile des CCI gegenüber einigen anderen Modellen (194).



## 2.3 Johanniskraut, Hyperforin und Hyp1

Das Echte Johanniskraut, aufgrund seiner durchlöcherten Blattstruktur auch als *Hypericum perforatum* bezeichnet, wird bereits seit Jahrhunderten sowohl in der europäischen wie auch der traditionellen chinesischen Medizin als Heilpflanze eingesetzt (26, 195). Dem Johanniskraut werden dabei vielfach positive Eigenschaften zugesprochen, was einen Einsatz der Pflanzenextrakte bei Infektionen, Wunden der Haut und Schleimhaut und weiteren Entzündungserscheinungen nach sich zieht (19, 196). Auch anti-tumorale bzw. anti-karzinogene Effekte werden dem Johanniskraut oder dessen Inhaltsstoffen in Studien attestiert (18, 197). Bereits seit fast 500 Jahren wird das Johanniskraut bei psychiatrischen Krankheitsbildern wie Angststörungen und Depressionen eingesetzt, in deren Behandlung es bis heute einen festen Platz innehat. Johanniskraut fand sogar Einzug in die deutsche S3-Leitlinie zur Behandlung der unipolaren Depression. Danach ist Johanniskraut eines der meistverordneten anti-depressiven Medikamente. Trotz allem ist die Wirksamkeit in der Behandlung der Depression nicht unumstritten und der Einsatz unter anderem aufgrund unerwünschter Wechselwirkungen nicht uneingeschränkt empfohlen (195, 198, 199).

Die wesentlichen pharmakologischen Eigenschaften des Johanniskrauts scheinen auf einem der Hauptinhaltsstoffe, dem Hyperforin, zu beruhen (195, 196). Chemisch handelt es sich bei Hyperforin um ein polyprenyliertes Acylphloroglucinol (22). Im Gegensatz zu vielen anderen Antidepressiva, die meist relativ selektiv die Wiederaufnahme von Serotonin oder auch Noradrenalin behindern und so eine erhöhte Neurotransmitterkonzentration im synaptischen Spalt nach sich ziehen, inhibiert Hyperforin neben der Wiederaufnahme von Serotonin, Noradrenalin und Dopamin ebenso die Wiederaufnahme von Gamma-Aminobuttersäure (GABA) und Glutamat. Der exakte Wirkmechanismus des Hyperforins im Rahmen der Depression und weiteren Einsatzgebieten ist dabei nicht schlussendlich geklärt und somit weiterhin Gegenstand aktueller Forschung. Bereits 2007 konnte durch Leuner et al. die selektive Aktivierung des TRPC6, einem nicht-selektiven Kationenkanal, durch Hyperforin gezeigt werden, der physiologisch unter anderem durch das Neurotrophin BDNF oder den Second Messenger Diacylglycerol (DAG) aktiviert wird und auf diesem Weg unter anderem zur Förderung axonalen Wachstums beiträgt (22, 200). Die TRPC6-Aktivierung und der konsekutive Calciumanstieg führen intrazellulär durch die Aktivierung der Calcium/Calmodulin-abhängigen Proteinkinase (CaMK) zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors *cAMP response element-binding protein* (CREB) durch Phosphorylierung. CREB trägt wiederum durch Förderung der Gentranskription von Neurotrophinen wie BDNF und weiteren Proteinen aktiv zur Neurogenese und neuronalem Überleben bei (201, 202). Unter Hyperforingabe konnte TRPC6-abhängig neuronales Wachstum und eine veränderte Morphologie der dendritischen Dornfortsätze hippocampaler Neurone

nachgewiesen werden. Diese Dornfortsätze gelten gemeinhin als zentrale Strukturen im Rahmen synaptischer Plastizität (203, 204). Bei diesen Prozessen scheint dem intrazellulären Calciumanstieg nach Aktivierung des TRPC6-Kanals die entscheidende Rolle zuzukommen, während die Inhibition der Monoaminwiederaufnahme im Rahmen der anti-depressiven Eigenschaften infolge steigender Natriumkonzentrationen durch die TRPC6-Aktivierung erklärt wird (203, 205). Auch konnte gezeigt werden, dass Hyperforin über TRPC6 in Zellkulturen die Gentranskription verändert, bspw. von c-Fos als Bestandteil des Transkriptionsfaktors AP-1 (206). Die Beobachtung, dass Hyperforin nicht nur den Calciumeinstrom durch die Plasmamembran über den Kationenkanal TRPC6 reguliert, sondern auch die Freisetzung von Zink und Calcium aus Mitochondrien bedingt, legt nahe, dass Hyperforin seine Wirkung nicht alleine über TRPC6 erzielt (207). In Zellkulturen konnte gezeigt werden, dass die Inhibition der Neurotransmitter-Wiederaufnahme in die Zelle und deren Vesikel unabhängig vom TRPC6 durch Hyperforin verursacht wird, indem Hyperforin selbst als Protonophor wirkt, das den Fluss von Protonen über Membranen entlang ihres Konzentrationsgradienten ermöglicht (23). Eine weitere Studie legt nahe, dass der protonophore Effekt des Hyperforins ebenfalls verantwortlich gemacht werden kann für eine direkte Beeinflussung der mitochondrialen Funktion. In Leukämiezellen konnte ein Verlust des Spannungsgradienten über der inneren Mitochondrienmembran und eine verminderte ATP-Synthese nach Hyperforingabe in einer ähnlichen Weise wie unter Zugabe des starken Protonophors FCCP beobachtet werden (208).

Neben der in etlichen Studien gezeigten anti-depressiven Wirkung des Hyperforins wurden positive Effekte bzgl. einiger weiterer neurologischer Krankheitsbilder für Hyperforin dargelegt. In einigen kürzlich veröffentlichten Studien konnten günstige Effekte in der Pathogenese des Morbus Alzheimer durch eine Aktivierung des TRPC6-Kanals gezeigt werden. So konnte in Neuronen, die aus humanen pluripotenten Stammzellen an Morbus Alzheimer Erkrankter generiert wurden, eine vermehrte Expression von Phospho-Tau und der charakteristischen Amyloid-beta- ( $A\beta$ -) Plaques bei gleichzeitig geringer TRPC6-Dichte dargestellt werden. Eine Behandlung mit Hyperforin führte neben einem Anstieg der TRPC6-Expression ebenfalls zur Absenkung der  $A\beta_{42}$ - und  $A\beta_{40}$ -Expression (209).

Begründet wird diese Reduktion der  $A\beta$ -Moleküle von Wang et al. durch eine direkte Interaktion des TRPC6 mit dem *Amyloid Precursor Protein* (APP) unabhängig von der Aktivität des TRPC6 als Kationenkanal (210).

$A\beta$ -Plaques führen in Alzheimer-Modellen zu einer Neurotoxizität, die durch die Beurteilung der dendritischen Ausläufer quantifiziert werden kann, wobei eine wesentliche Begrenzung dieser schädigenden Wirkung der  $A\beta$ -Plaques durch Hyperforin und einige chemisch ähnliche Derivate gezeigt werden konnte (211, 212).

In weiteren Studien wird die positive Wirkung des Hyperforins begründet über eine anti-oxidative und anti-entzündliche Wirkung bei nachgewiesener Reduktion der Proteinexpression von IL-1 $\beta$ , NF- $\kappa$ B, Superoxiddismutase (SOD) und Katalase in PC12- Zellen (213). Ähnlich positive Effekte auf die Entstehung von ROS und die Induktion der Apoptose konnte in PC12- und SH-SY5Y-Zellen unter Aluminium-Maltolat-Stimulation gezeigt werden (214). In einer früheren Studie beschrieben Albert et al. bereits die Eigenschaft des Hyperforins als Inhibitor der COX-1 und 5-Lipoxygenase, zweier Enzyme zur Bildung pro-inflammatorischer Eicosanoide (215). Hyperforin führte in einer weiteren Studie zur Senkung der Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) -Blutspiegel LPS-stimulierten humanen Vollbluts, was eher bedingt ist durch die Inhibition der Prostaglandin E-Synthase als der COX-Enzyme (216).

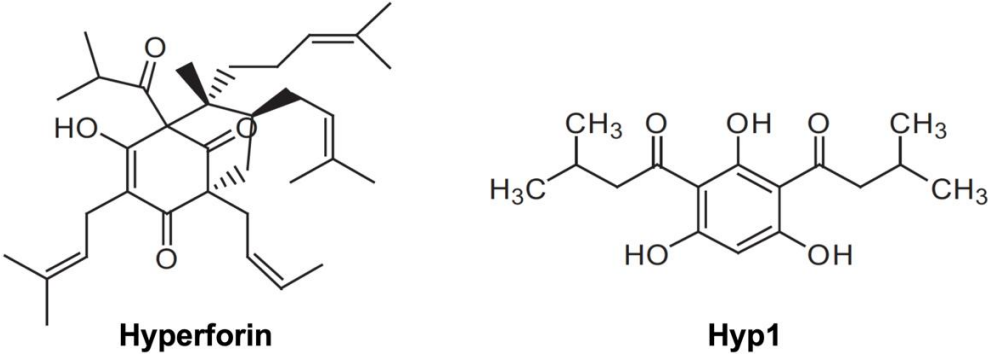
Nach einem induzierten Status epilepticus in der Ratte konnte nach Hyperforingabe, neben einer erhöhten TRPC6 Expression in Mikroglia, eine verminderte mikrogliale Aktivität, geringere TNF $\alpha$ -Expressionslevel und eine verminderte Phosphorylierung und damit Aktivierung des NF- $\kappa$ B p65 in Mikroglia nachgewiesen werden (217).

Doch auch pro-inflammatorische Wirkungen des Hyperforins werden in einigen Studien beschrieben (195). So wurde kürzlich in bronchialen Epithelzellen nach LPS-Stimulation unter anderem höhere Expressionslevel der pro-inflammatorischen Interleukine IL-6 und IL-8 sowie der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B nach Hyp9-Behandlung, einem TRPC6-Aktivator, über einen TRPC6-abhängigen Weg nachgewiesen (24, 218).

In zwei neuen Studien konnte die Wirksamkeit von Hyperforin im Rahmen einer akuten zerebralen Ischämie in Mäusen gezeigt werden. Erklärt werden die positiven Effekte unter Hyperforinbehandlung einerseits durch die Erhöhung astrozytischen IL-6 und die darauffolgende Herunterregulation der Immunantwort (21, 219). Andererseits vermindert die Gabe von Hyperforin nach zerebraler Ischämie die Expression des IL-17 nach 72 h und führt so nach Einschätzung der Autoren zu vermindertem Infarkt volumen und besserem neurologischem Outcome durch Abschwächung der mikroglialen Aktivierung und einer Verschiebung zum neuroprotektiven M2-Typ (220).

Hyperforin als Phloroglucinol weist eine strukturelle Ähnlichkeit zum DAG als bekanntem Aktivator einiger TRPC-Kationenkanäle auf. Die für die Aktivierung des TRPC6 essenzielle Struktur ist dabei wohl das Phloroglucinol in Verbindung mit zwei symmetrisch angeordneten Acylgruppen. Hyperforin und die 2,4-Diacylphloroglucinol-Derivate wie die Hyp1, Hyp5, Hyp7, Hyp8 oder Hyp9 führen so zur selektiven Aktivierung des TRPC6, ohne die Funktion anderer TRPC zu beeinflussen. Aufgrund der Tatsache, dass es sich bei diesen Molekülen im Gegensatz zu Hyperforin um leichter synthetisierbare und stabilere Verbindungen mit ähnlichen pharmakologischen Eigenschaften handelt, eignen sich diese zur weiteren Erforschung des

Einflusses des Hyperforins und dessen Wirkungsweise über den TRPC6 (24). Aus diesem Grund wird in allen Versuchen der vorliegenden Arbeit auf das 2,4-Diacetylphloroglucinol-Derivat Hyp1 zurückgegriffen.



**Abbildung 3: Strukturformeln des Hyperforins und des 2,4-Diacetylphloroglucinols Hyp1**  
(modifiziert nach Leuner et al., 2010 (24))

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Geräte

Geräteart	Gerätename	Hersteller
Blotkammer	Mini Trans-Blot® Cell	Bio-Rad, Hercules, USA
CCI-Applikator	Impact One Stereotaxic Impactor	Leica Biosystems, Richmond, USA
Detektionssystem	GloMax®-Multi+ Detection System	Promega, Mannheim, DE
Elektrophoresekammer	Mini-Protean® Electrophoresis Cell	Bio-Rad, Hercules, USA
Elektroversorgung	PowerPac™ 300	Bio-Rad, Hercules, USA
Elektroversorgung	PowerPac™ HC	Bio-Rad, Hercules, USA
Fluoreszenz-Bildgeber	Odyssey® Sa Imager 9260	LI-COR® Biosciences, Lincoln, USA
Fluoreszenzmikroskop	EVOS fl	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Homogenisierührer	WireStir® HS-30E + 5 Kubikzentimeter (cm <sup>3</sup> ) Glaskolben und Rühreraufsatz	Witek Labortechnik GmbH, Wertheim, DE
Inkubator	Inkubator 8000	Drägerwerk AG & Co. KGaA, Lübeck, DE
Käfige	Filtertopkäfig Typ II lang	Bioscape GmbH, Castrop-Rauxel, DE
Kryostat	Microm™ HM 560 Cryostat	Thermo Fisher Scientific Inc., Walldorf, DE
Lochzange		Zoonlab GmbH, Castrop-Rauxel, DE
Luftstromschrank	UniProtect THF 3378-VO2	Bioscape, Castrop-Rauxel, DE
Magnetührer	Ikamag® Ret	Janke & Kunkel GmbH IKA®-Labortechnik, Staufen, DE
	IKA® Ret basic	Janke & Kunkel GmbH IKA®-Labortechnik, Staufen, DE
Mikroliterspritze	1700 Series, 10 Mikroliter (µl), 15 µl, 25 µl, 50 µl	Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, CH
Mikroskop	Wilovert S	Helmut Hund GmbH, Wetzlar, DE
Mischgerät	Unimax 2010	Heidolph Instruments, Schwabach, DE
Mischgerät	Rocking Platform	VWR GmbH, Darmstadt, DE
Narkosemittelverdampfer	Vapor 19.3	Drägerwerk AG & Co. KGaA, Lübeck, DE
Operationsmikroskop	Technoskop OPMI 11	Carl Zeiss Meditec AG, Jena, DE
pH-Meter	CG 842	Schott AG, Mainz, DE
Photometer	NanoVue™	GE Healthcare, Chalfont Saint Giles, UK
Pipetten	Research®, Research® plus, Reference®	Eppendorf AG, Hamburg, DE

	Sartorius™ Biohit™ Proline	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Pipettierhilfe	Pipetus®	Hirschmann Laborgeräte GmbH und Co. KG, Eberstadt, DE
Plattformschüttler	Rotamax 120	Heidolph Instruments, Schwabach, DE
Präzisionshandbohrer	Labset-N	Paggen Werkzeugtechnik GmbH, Starnberg, DE
<i>Real-Time</i> -PCR-System	LightCycler® LC 480	Roche Molecular Systems Inc., Pleasanton, USA
Respirometer	O2k Oxygraph	Oroboros Instruments GmbH, Innsbruck, AT
Saugsystem	ISS-integrated suction system	Oroboros Instruments GmbH, Innsbruck, AT
Schwingmühle (Tissue Lyser)	Mixer Mill MM 300	Retsch GmbH, Haan, DE
Stereotaxierahmen		World Precision Instruments Germany GmbH, Friedberg, DE
Thermoblock	ThermoMixer® comfort	Eppendorf AG, Hamburg, DE
	ThermoMixer® 5436	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Thermozykler	Mastercycler gradient	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Tier- Temperaturkontrollsystem	Modell BAT-12	Physitemp Instruments, New Jersey, USA
Vortexmischer	Reax control	Heidolph Instruments, Schwabach, DE
	Velp Scientifica	Starlab International GmbH
	VWR 1719	VWR GmbH, Darmstadt, DE
Waage	Research R 180 D	Sartorius AG, Göttingen, DE
Wärmeunterlage	ThermoLux®	Witte + Sutor GmbH, Murrhardt, DE
Zählkammer	Neubauer Improved, Tiefe 0,1 mm, 0,0025 Quadratzenimeter (cm <sup>2</sup> )	La fontaine, DE
Zellkultur-Inkubator	Heracell™ 240i	Thermo Scientific, Walldorf, DE
	New Brunswick Galaxy 170S	Eppendorf Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
Zentrifugen	Heraeus Megafuge® 1.0	Thermo Scientific, Walldorf, DE
	Centrifuge 5804 R	Eppendorf AG, Hamburg, DE
	Micro Star 17R	VWR GmbH, Darmstadt, DE
	Sprout Minizentrifuge	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldenburg, DE
	Mini Star silverline	VWR GmbH, Darmstadt, DE

Tabelle 1: Materialaufistung Geräte

### 3.1.2 Pharmaka

Wirkstoff	Handelsname	Beschreibung	Hersteller
Dexpanthenol	Bepanthen® Augen- und Nasensalbe	Wundheilungs- förderung	Bayer AG, Leverkusen, DE
Isofluran	Forene®	Volatiles Inhalations- narkotikum	AbbVie Deutschland GmbH & Co. KG, Wiesbaden, DE

n-Butyl-2-Cyanoacrylat	Histoacryl® Gewebekleber	Gewebekleber	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, DE
------------------------	--------------------------	--------------	--------------------------------------

Tabelle 2: Materialaufistung Pharmaka

### 3.1.3 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
ADP 117105-1GM	Merck, Darmstadt, DE
Ammoniumpersulfat (APS)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Antimycin A A8674	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Aqua destillata	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, DE
β-Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Bromphenolblau	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Bovines Serumalbumin A (BSA)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Chameleon™ Duo Prestained Protein Ladder	LI-COR® Biosciences, Lincoln, USA
Chloroform	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Cytochrom c C7752	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Digitonin D5628	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Aldrich, Steinheim, DE
Dinatriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Applichem, Darmstadt, DE
D-Sucrose	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Enhanced Green Fluorescent Protein (pEGFP-C1)	Invitrogen, AG, Carlsbad, USA
Ethanol absolut	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Ethylendiaminotetraacetat (EDTA)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Ethylenglycolbistetraessigsäure (EGTA)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
FCCP C2929	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Glutamat G1626	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Glycerin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Glycin	Applichem, Darmstadt, DE
HEPES	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Hyp1	synthetisiert durch AG Friedland, Institut für Pharmazeutische und Biomedizinische Wissenschaften, Universitätsmedizin Mainz
Isopropanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
jetPrime® Reagenz	Polyplus-transfection SA, Illkirchen-Graffenstaden, FR
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck, Darmstadt, DE
Kaliumhydroxid (KOH)	Merck, Darmstadt, DE
Kaliumchlorid (KCl)	Applichem, Darmstadt, DE
Kresylviolett (Acetat)	Merck, Darmstadt, DE
Lactobionsäure	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
LPS (1 Milligramm (mg) / Milliliter (ml))	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Magermilchpulver	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Magnesiumchlorid Hexahydrat (MgCl <sub>2</sub> ·H <sub>2</sub> O)	Merck, Darmstadt, DE
Malat M1000	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Methanol (MeOH)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate; SDS)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE

Nonidet™ P-40 (NP-40)	Applichem, Darmstadt, DE
Oligomycin O4876	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Phosphatase Inhibitor Cocktail Tablets PhosSTOP, EASYpack	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, DE
Ponceau S	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
PageRuler Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Protease Inhibitor Cocktail Tablets cOmplete Tablets, Mini, EDTA-free	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, DE
Proteinbestimmungsreagenzien DC™ Protein Assay Reagent (A, B, S)	Bio-Rad, Hercules, USA
RNAse-freies Wasser	Fermentas, St. Leon Rot, DE
Rotenon R8875	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Roti@Histokitt	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Roti@Histol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Rotiphorese® Gel 30 (Acrylamid 30 %)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt, DE
Stickstoff, flüssig	Air Liquide S.A., Düsseldorf, DE
Succinat S2378	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Taurin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan (Tris)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
TRPC6-yellow fluorescent protein (YFP)	synthetisiert durch AG Friedland, Institut für Pharmazeutische und Biomedizinische Wissenschaften, Universitätsmedizin Mainz
Tween-20	GE Healthcare, Chalfont Saint Giles, UK
Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) 30 %	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE

Tabelle 3: Materialauflistung Chemikalien

### 3.1.4 Puffer und Lösungen

Puffer/Lösung	Rezeptur/Hersteller
ADP 500 millimolar (mM)	501,3 mg ADP, 1,2 mL H <sub>2</sub> O, 5 molar (M) KOH (pH 7,0), 121,98 mg MgCl <sub>2</sub>
Antimycin A 5 mM	5,4 mg Antimycin A, 2ml Ethanol 99,9 %
Blockierlösungen	2,5 % Gewicht/Volumen (weight/volume; w/v) Magermilch in TBS
	3 % (w/v) Magermilch (MM) in TBS
	4 % (w/v) MM in TBS
	4 % (w/v) BSA in TBS
Blotpuffer	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20 % Volumen/Volumen (v/v) MeOH
Cytochrom c 4mM	50 mg Cytochrom c, 1ml H <sub>2</sub> O
Digitonin 8,1 mM	10 mg Digitonin in 10 ml DMSO
Elektrophoresepuffer	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0.1 % (w/v) SDS
EDTA/EGTA/Glukose	1 mM EDTA, 1 mM, 1mg/ml Glukose in PBS
FCCP 1mM	1,27 mg in 5 ml 99,9 % Ethanol
Glutamat 2M	1.691 g Glutamat, 3 ml H <sub>2</sub> O, 5M KOH (pH 7,0)
jetPrime® Puffer	Polyplus-transfection SA, Illkirchen-Graffenstaden, FR
Kresylviolett-Lösung	0,031 mM Kresylviolett (Acetat), 20 % (v/v) Ethanol
Malat 400mM	268,2 mg Malat, 3 ml H <sub>2</sub> O, 5 M KOH,



MiR05 mitochondrial respiration medium (Atmungsmedium für Mitochondrien)	0,5 mM EGTA, 3 mM MgCl <sub>2</sub> ·H <sub>2</sub> O, 60 mM Lactobionsäure, 20 mM Taurin, 10 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 20 mM HEPES, 110 mM D-Sucrose, 1 g / l BSA (fettsäurefrei)
Oligomycin 5mM	4 mg Oligomycin in 5ml Ethanol 99,9 %
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 6,5 mM Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 1,5 mM, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 7,5)
Poly-D-Lysin (PDL)-Lösung 1,0 mg/ml	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Probenpuffer 2x	4 % (w/v) SDS, 20 % (v/v) Glycerin, 10 % (v/v) β-Mercaptoethanol, 0.004 % (w/v) Bromphenolblau, 0,125 M Tris-HCl, pH 6,8
Puffer RLT	Qiagen N.V., Venlo, NL
Puffer RLT Plus	Qiagen N.V., Venlo, NL
Puffer RW1	Qiagen N.V., Venlo, NL
Puffer RPE	Qiagen N.V., Venlo, NL
Radioimmunoprecipitation Assay (RIPA) Lysepuffer	150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 % (v/v) NP-40; 0,1 % (w/v) SDS, 1 Tbl. Phosphataseinhibitor, 1 Tbl. Proteaseinhibitor, 50 mM Tris pH 7,4
Rotenon 1mM	0,39 mg Rotenon in 1 ml Ethanol 99,9 %
Sammelgelpuffer	50 mM Tris, 4 % (v/v) SDS (pH 6,8)
Succinat 1mM	1,3505 g Succinat, 3 mL H <sub>2</sub> O (pH 7,0)
TBS-Puffer	15 mM NaCl, 5 mM Tris, 0,2 mM HCl (pH 7,4)
TBST-Puffer	TBS-Puffer + 0,05% (v/v) Tween-20
Trenngelpuffer	150 mM Tris, 4 % (v/v) SDS (pH 8,8)
Trypsin-EDTA	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Trypanblau-Lösung 0,4 %	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Vehikellösung	1,66 % (v/v) DMSO in PBS

Tabelle 4: Materialauflistung Puffer und Lösungen

### 3.1.5 Kulturmedien, Zusätze und Kits

Produktbezeichnung	Hersteller
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Gibco/Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
DMEM/F-12	Gibco/Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Fetales Kälberserum (fetal calf serum; FCS)	Gibco/Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Neuronal Tissue Dissociation Kit	Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG
Penicillin/Streptomycin	Gibco/Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Pferdeserum (HS)	Gibco/Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
ROS Assay-Kit Cellular Reactive Oxygen Species Detection Assay Kit (ab186027)	Abcam® AG, Cambridge, UK

Tabelle 5: Materialauflistung Kulturmedien, Zusätze und Kits

### 3.1.6 PCR-Kits

Produktbezeichnung	Hersteller
Absolute Blue QPCR Mix, SYBR Green	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
LightCycler® 480 Probes Master	Roche Molecular Systems Inc., Pleasanton, USA
RNeasy® Micro Kit	Qiagen N.V., Venlo, NL
RNeasy® Mini Kit	Qiagen N.V., Venlo, NL
QIAzol® Lyse-Reagenz	Qiagen N.V., Venlo, NL
QuantiTect® Reverse Transcription Kit	Qiagen N.V., Venlo, NL

Tabelle 6: Materialaufistung PCR-Kits

### 3.1.7 Primer und Sonden

Ziel	Richtung	Basenabfolge 5' → 3'	Hersteller
Arc	F	CTCAACTTCCGGGGATGCAG	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
	R	CTGGTATGAATCACTGGGGGC	
BDNF	F	ACTTGGCCTACCCAGGTG	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldenburg, DE
	R	GTTGGGCCGAACCTTCT	
c-Fos	F	CGGGTTTCAACGCCGACTA	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
	R	TGGCACTAGAGACGGACAGAT	
GADD45B	F	CCTCCTGGTCACGAACTGTC	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
	R	TGGGTCTCAGCGTTCCTCTA	
IL-1β	F	GTGCTGTCCGACCCATATGAG	Roche Molecular Systems Inc., Pleasanton, USA
	R	CAGGAAGACAGGCTTGTGCTC	
IL-6	F	TCGTGAAATGAGAAAAGAGTTG	Roche Molecular Systems Inc., Pleasanton, USA
	R	TATGCTTAGGCATAACGCACTAG	
iNOS	F	TGTGTCAGCCCTCAGAGTAC	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
	R	CACTGACACTYCGCACAA	
PPIA	F	GCGTCTSCTTCGAGCTGTT	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
	R	RAAGTCACCACCCTGGCA	
COX-2	F	TCTGCCTCAACACCAAGAC	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
	R	ATGCCAAGCCACGAAAAC	
TRPC6	F	CTCTTCCCTCATTATCCTCTCC	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
	R	CTCGTCCATCAGCAAATAGTC	

Tabelle 7: Materialaufistung Primer

Ziel	Richtung	Basenabfolge 5' → 3'	Hersteller
IL-1β	Cy5	Cy5-CAGCTGGAGAGTGTGGAT CCC AAGC-PH	Roche Molecular Systems Inc., Pleasanton, USA
	FL	TAATGAAAGACGGCACACCCA CCC-FL	
IL-6	Cy5	Cy5-TGCTCTCCTAACAGATAA GCTGGAGTCAC-PH	Roche Molecular Systems Inc., Pleasanton, USA
	FL	CATAAAATAGTCCTTCCCTACC CCAATTTCC-FL	

Tabelle 8: Materialaufistung Sonden

### 3.1.8 Antikörper

Zielstruktur	Antikörper	Spezies	Verdünnung	Masse des AGs	Hersteller
$\alpha$ I-Spektrin (Spaltfragmente)	BML-FG6090	Maus	1:1000 (2,5 % Magermilch (MM)/TBS)	120 kDa 145/150 kDa	Enzo Life Science, Farmingdale, USA
BDNF	N-20	Kaninchen	1:200 (2,5 % MM/TBS)	23 kDa	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA
COX-2	AB 15191	Kaninchen	1:200 (2,5 % MM/TBS)	69 kDa	Abcam®, Cambridge, USA
COX IV	#4844	Kaninchen	1:1000 (2,5 % BSA)	14 kDa	Cell Signaling Technology® Co., Cambridge, UK
GAPDH	ACR001PS	Maus	1:10000 (2,5 % MM/TBS)	37 kDa	Acris Antibody Inc., San Diego, USA
GFAP	Z033401-2	Kaninchen	1:1000 (2,5 % MM/TBS)	50 kDa	Dako Omnis, Agilent Technologies, Sanata Clara, USA
NF- $\kappa$ B p65	4764	Kaninchen	1:500 (2,5 % MM/TBS)	65 kDa	Cell Signaling Technology® Co., Cambridge, UK
Phospho-NF- $\kappa$ B p65	3033	Kaninchen	1:500 (2,5 % BSA)	65 kDa	Cell Signaling Technology® Co., Cambridge, UK
TRPC6	ACC-017	Kaninchen	1:200 (2,5 % MM/TBS)	100 kDa	Alomone Labs Ltd, Jerusalem, IL
TRPC6	515837	Kaninchen	1:200 (2,5 % MM/TBS)	100 kDa	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA

Tabelle 9: Materialauflistung primäre Antikörper

Zielstruktur	Antikörper	Spezies	Verdünnung	Hersteller
Anti-Kaninchen-Antikörper	IRDye 680RD 926-68071	Ziege	1:15000 (in 2,5% MM/TBST)	LI-COR® Biosciences, Lincoln, USA
Anti-Kaninchen-Antikörper	IRDye 800CW 926-32211	Ziege	1:15000 (in 2,5% MM/TBST)	LI-COR® Biosciences, Lincoln, USA
Anti-Maus-Antikörper	IRDye 680RD 926-68070	Ziege	1:1500 (in 2,5% MM/TBST)	LI-COR® Biosciences, Lincoln, USA
Anti-Maus-Antikörper	IRDye 800CW 926-32210	Ziege	1:15000 (in 2,5% MM/TBST)	LI-COR® Biosciences, Lincoln, USA

Tabelle 10: Materialauflistung sekundäre Antikörper

### 3.1.9 Verbrauchsmaterialien

Produkt	Produktbezeichnung/ -beschreibung	Hersteller
12- <i>well</i> -Zellkulturplatten	Cellstar®	Greiner Bio One International GmbH, Kremsmünster, AT
96- <i>well</i> -PCR-Platte	0,2 ml	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
96- <i>well</i> -Zellkulturplatten	Cellstar®	Greiner Bio One International GmbH, Kremsmünster, AT
96- <i>well</i> -Zellkulturplatte	Corning™, schwarz, transparenter Boden	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Blotting-Papier	GB 002	Schleicher & Schuell BioScience GmbH, Dassel, DE
Deckgläser	24 x 50 Millimeter (mm)	Waldemar Knittel Glasbearbeitungs-GmbH, Braunschweig, DE
Einbettmedium	NEG-50™	Thermo Fisher Scientific Inc., Walldorf, DE
Einstreu	Lignocel® FS 14	J. Rettenmaier & Söhne GmbH & Co. KG, Rosenberg, DE
Einmalkanüle	19 Gauge	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, DE
Einmalkanülen	26 Gauge	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, DE
Einmalspritze	BD Discardit™ II 2 ml, 10 ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, DE
Faltenfilter	MN 615 1/4	Macherey-Nagel, Düren, DE
Feindosierungsspritzen	Injekt®-F	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, DE
genomische DNA (gDNA) Eliminator-Säule		Qiagen N.V., Venlo, NL
Kompressen, steril	10 x 10 Zentimeter (cm)	MaiMed GmbH, Neuenkirchen, DE
Kryoboxen		Ratiolab GmbH, Dreieich, DE
Kryostatklingen	Microtome Blade C35	Feather Safety Razor Co., Osaka, J
LightCycler® Kapillaren	20 µl	Roche Molecular Systems Inc., Pleasanton, USA
Mikroreaktionsgefäße	TubeOne® 1,5 ml, 2 ml	Starlab International GmbH
Nahtmaterial	Prolene® 6-0	Ethicon Inc., Somerville, USA
Nitrocellulosemembranen	0,45 µm, 30 cm x 3,5 m Rolle	Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, USA
Objektträger	Superfrost® plus	Thermo Scientific, Braunschweig, DE
Papierhandtücher	25 x 21 cm, 1-lagig, grün	Schuch Laborhandel, Langgöns. DE
PCR-Einzelgefäß	0,5 ml	Starlab International GmbH
Pipetten, serologisch, steril	Cellstar® 25 Milliliter (ml), 10 ml, 5ml	Greiner Bio One International GmbH, Kremsmünster, AT
Pipettenspitzen	10 µl, 200 µl, 1000 µl	Starlab International GmbH

Pipettenspitzen, Filter	TipOne®, 10 µl, 200 µl, 1000 µl	Starlab International GmbH
Saugtupfer	Sugi® Sponge Points	Kettenbach GmbH, Eschenburg, DE
Schnittstreckerplättchen	Microm™ 39,5 mm	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Skalpelle	Disposable scalpel (No.23)	Feather Safety Razor Co., Osaka, J
Spin-Säule	RNeasy Mini Spin Column	Qiagen, Hilden, DE
Tierfutterpellets	Maus-Zucht (M-Z) Extrudat	ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, DE
Wattestäbchen	steril, Holz	Centramed Medizintechnik Handelsgesellschaft mbH & Co. KG, Koblenz, DE
Zellkulturflaschen	Cellstar®, 25 cm <sup>2</sup> , 75 cm <sup>2</sup>	Greiner Bio One International GmbH, Kremsmünster, AT
Zentrifugenröhrchen	Falcon™ 15 ml, 50 ml	Greiner Bio One International GmbH, Kremsmünster, AT

Tabelle 11: Materialauflistung Verbrauchsmaterialien

### 3.1.10 Software

Software	Hersteller
DatLab Version 5.2, Version 7.4	Oroboros Instruments GmbH, Innsbruck, AT
EndNote X9.3.3	Clavirate, Philadelphia, USA
Image Studio, Version 3.1	LI-COR® Biosciences, Lincoln, USA
LightCycler® Software 4.5	Roche Molecular Systems Inc., Pleasanton, USA
Microsoft® Excel für Mac, Version 16.13	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Microsoft® Word für Mac, Version 16.13	Microsoft Corporation, Redmond, USA
Prism 8.1.0 für Windows	GraphPad Software Inc., La Jolla, USA
ZEN® 2	Carl Zeiss Meditec AG, Jena, DE

Tabelle 12: Materialauflistung Software

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Zellkultur

#### 3.2.1.1 Ansetzen und Pflege der Zellkulturen

Von größter Bedeutung bei allen nachfolgend beschriebenen Methoden ist das sterile Arbeiten. Daher werden stets sterile Einwegmaterialien genutzt, auf eine regelmäßige Flächendesinfektion der Arbeitsplätze und Inkubatoren, Handdesinfektion und das Einhalten der Kittelpflicht geachtet. In den verschiedenen Experimenten werden *spontaneously immortalized microglial cells* (SIM) - A9-Zellen, HEK-293-Zellen und primäre Gliazellkulturen verwendet. Die primäre Gliazellkultur wird aus kortikalem Hirngewebe neugeborener Mäuse vom Wildtyp gewonnen. Hierzu wird nach Entnahme der Gehirne und Waschen in PBS mit Hilfe des *Neuronal tissue dissociation kit* das Gewebe dissoziiert und die Gliazellen anschließend in dem Vollmedium DMEM, dem 10 % (v/v) fetales Kälberserum (FCS) und 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin zur Prävention bakterieller Besiedlung der Kulturen zugesetzt sind, kultiviert. Die in den beschriebenen Experimenten genutzte primäre Gliazellkultur ist zwei Monate zuvor angelegt worden. HEK-293-Zellen (*Human Embryonic Kidney*) sind künstlich transformierte menschliche embryonale Nierenzellen, die Erbgut des menschlichen Adenovirus 5 enthalten. Die Kultivierung und Transfektion dieser Zelllinie erweist sich als einfach und sehr erfolgreich. Weiterhin konnte in vorherigen Studien bereits gezeigt werden, dass HEK-293-Zellen kein TRPC6 in einer detektierbaren Menge exprimieren (206). HEK-293-Zellen werden kultiviert in DMEM mit 10 % (v/v) FCS und 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin. Bei der Zelllinie SIM-A9 handelt es sich um spontan immortalisierte Mikroglia, welche durch äußere Entzündungsreize wie etwa LPS stimuliert werden können und für Mikroglia typische Proteine exprimieren und sich daher als Modellsystem für mikrogliales Verhalten in vitro eignen. Die Kultivierung dieser Zelllinie erfolgt in DMEM/F12 unter Zugabe von Penicillin/Streptomycin und FCS in gleicher Dosierung wie der HEK-293-Zellkultur sowie zusätzlicher Zugabe von 5 % (v/v) Pferdeserum (HS). Aufgrund des unterschiedlich schnellen Nährstoffverbrauchs in den verwendeten Kulturmedien durch die verwendeten Zelllinien, bedingt durch die Zellart, deren Aktivität und die Zelldichte der Kultur, werden die Intervalle des Medienwechsels angepasst. In den beschriebenen Experimenten erfolgt der Wechsel in der Regel alle zwei bis drei Tage. Als Indikator des Nährstoffverbrauchs im Medium dient der pH-Wert, der sich in einer Farbveränderung des Mediums niederschlägt. Den SIM-A9-Zellen und der primären Gliazellkultur, die jeweils in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen kultiviert werden, wird bei jedem Medienwechsel 15 ml frisches Kulturmedium hinzugegeben, den verwendeten HEK-293-Zelle, die in 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen kultiviert werden, analog 5 ml. Der Medienwechsel muss stets vorsichtig durchgeführt werden, um ein Ablösen der adhärennten Zellen zu verhindern. Gerade bei

schnell wachsenden Zelllinien wie der SIM-A9-Linie ist auf ein regelmäßiges Passagieren der Zellen zu achten. Adhärenz Zellen können bei zu hoher Zelldichte und entsprechend verminderter Wachstumsfläche nicht weiterwachsen. Man spricht in diesem Fall von einer Kontakthemmung. Dies kann zu einer verminderten Proliferationsrate und dem Absterben der Kultur führen. Aus diesem Grund werden Kulturen bei Erreichen einer Maximaldichte von etwa 80 % am Ende der exponentiellen Phase des Wachstums subkultiviert. Nach Entfernen des alten Mediums und dem Waschen mit 5 ml PBS pro 75 cm<sup>2</sup> bzw. 3 ml PBS pro 25 cm<sup>2</sup> zum Entfernen abgestorbener Zellen werden die adhärenz Zellen durch die vorsichtige Zugabe von 1 ml Trypsin-EDTA-Lösung und die Inkubation für 3 min bei 37 °C abgelöst. Sim-A9-Zellen dagegen werden abgelöst durch Zugabe von 5 ml einer Lösung aus EDTA/EGTA/Glukose-Lösung und Inkubation für 5 – 10 min bei 37 °C. Diese Lösung wird mehrfach auf den Zellrasen hin- und rückpipettiert, um das Ablösen möglichst aller Zellen zu erreichen. Der Ablöseerfolg wird jeweils unter Zuhilfenahme des Mikroskops evaluiert. Zu den primären Gliazellen und den HEK-293-Zellen wird anschließend 5 ml des verwendeten Kulturmediums hinzugegeben und die Lösung in ein 15 ml fassendes Falcon überführt. Analog werden auch die SIM-A9-Zellen überführt, jedoch ohne die Zugabe zusätzlichen Mediums. Nach der Zentrifugation für 3 min bei 800 Umdrehungen pro Minute (*revolutions per minute*, rpm) und der Entfernung des Überstandes wird das entstandene Zellpellet in 5 ml Kulturmedium resuspendiert und die gewünschte Zellzahl (in der Regel  $\frac{1}{2}$  bis  $\frac{1}{4}$  der Gesamtzellzahl) in die Zellkulturflasche hinzugegeben und mit entsprechender Menge des Kulturmediums aufgefüllt.

### **3.2.1.2 Mikroskopische Zellzahlbestimmung**

Die Zellzahlbestimmung ist notwendig für die Herstellung von Zelllösungen definierter Konzentrationen für diverse Experimente wie die Respirometrie. Verwendet wird eine Zählkammer des Typs Neubauer improved. Vor Verwendung wird die Sauberkeit der Zählkammer überprüft und diese falls nötig gereinigt. Nach korrektem Aufsetzen des Deckglases sind die Newtonschen Ringe sichtbar. Die zu zählenden Zellen werden analog den Schritten unter Punkt 3.2.1.1 bis zur Resuspension des Zellpellets in 5 ml des entsprechenden Kulturmediums vorbereitet. Danach folgt eine weitere 1:10-Verdünnung der Zellsuspension. Bei der Auszählung einer weniger dicht gewachsenen Zellkultur wird auf die Verdünnung verzichtet und dies in der Formel zur Berechnung berücksichtigt. Zur Auszählung wird die Zellsuspension in die Zählkammer pipettiert, wo es durch Kapillarkräfte zur gleichmäßigen Verteilung kommt. Unter mikroskopischer Darstellung wird anschließend die Zellzahl innerhalb der Eckquadrate ausgezählt und ein Mittelwert gebildet. Da das auszuzählende Volumen pro Eckquadrat 0,1 µl beträgt, erhält man durch Multiplikation des Mittelwerts der ausgezählten Zellzahl mit dem Faktor 1000 die

Zellzahl / ml. Für weitere Versuche wird diese Zellsuspension auf die gewünschte Zielkonzentration verdünnt. Die Zellzählung für die nachfolgende respirometrische Analyse erfolgt ohne vorhergehende Zentrifugation nach Ablösen der Zellen mittels Trypsin-EDTA-Lösung und Verdünnung der Zellsuspension auf insgesamt 5 ml mit entsprechendem Kulturmedium. Nach sich anschließender Zentrifugation bei 800 rpm für 3 min wird das entstandene Zellpellet je nach gewünschter Zellzahl in der entsprechenden Menge MiR05 gelöst. Zur Zählung der HEK-293-Zellen für die anschließende Respirometrie wurde die Zellsuspension 1:1 in Trypanblau-Lösung verdünnt, um eine Zählung ausschließlich der lebenden Zellen zu ermöglichen.

### 3.2.1.3 Stimulation der Zellen

Zur Ermittlung des Einflusses von Hyp1 auf mit LPS aktivierte Zellkulturen werden SIM-A9-Zellen und primäre Glia nach der Zählung in festgelegter Konzentration von 150.000 Zellen / ml vorbereitet. Anschließend wird die hergestellte Zellsuspension in vier 15 ml Falcons so aufgeteilt und entsprechend mit LPS oder Hyp1 angereichert, dass folgende Zielkonzentrationen für vier unterschiedliche Konditionen erreicht werden:

Kondition	Stammkonzentration	Zielkonzentration
Kontrolle (Ctrl)		
Hyp1	100 mM	1 $\mu$ M
LPS	1 mg/ml	30 Nanogramm (ng)/ml
Hyp1 + LPS	s. o.	1 $\mu$ M Hyp1 + 30 ng/ml LPS

Tabelle 13: Agenzien zur Zellstimulation

Volumina von 500  $\mu$ l der jeweiligen Ansätze werden als Triplikate in 12-well-Platten pipettiert. Die SIM-A9-Zellen sowie die primären Gliazellen werden über 24 h bei 37 °C inkubiert und anschließend abgeerntet. Es werden jeweils zwei identische 12-well-Zellkulturplatten pro Versuch angelegt, jeweils eine für proteinanalytische und eine für molekularbiologische Untersuchungen. In einem weiteren Versuch werden SIM-A9-Zellen in insgesamt drei 12-well-Zellkulturplatten ausgesät und je eine Zellkulturplatte für 24 h, 48 h und 72 h bei 37 °C inkubiert und nach der jeweils abgelaufenen Inkubationszeit abgeerntet. Hierbei erfolgt ein täglicher Wechsel des Zellkulturmediums inklusive der zugesetzten Agenzien (LPS und Hyp1) entsprechend dem oben dargestellten Schema.

### 3.2.1.4 Transfektion

Zum Zweck der Transfektion wird eine Zellzahl von etwa  $10^6$  Zellen der HEK-293-Zelllinie am Tag vor der geplanten Transfektion in zwei 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen ausgesät, um bei einer ungefähren Generationszeit von 20 h nach einem Tag eine Konfluenz von etwa 80 % zu erreichen, was die höchste Effizienz der Transfektion verspricht. Nach mikroskopischer Kontrolle ausreichender Konfluenz wird vor der Transfektion das Kulturmedium gewechselt.



Zur Transfektion werden das jetPrime® Reagenz sowie der jetPrime® Puffer von Polyplus transfection® sowie die Plasmide TRPC6-YFP und pEGFP-C1 genutzt. Zwei Ansätze (A, B) werden wie folgt vorbereitet:

A	200 µl jetPrime® Puffer	2,5 µg EGFP	8 µl jetPrime® Reagenz
B	200 µl jetPrime® Puffer	4 µg TRPC6-YFP	8 µl jetPrime® Reagenz

Tabelle 14: Pipettierschema Transfektion

Nach ausreichender Durchmischung der Ansätze und zehnmütiger Inkubation bei 37 °C werden die Ansätze A und B vorsichtig tropfenweise zu jeweils einer Zellkulturflasche zugegeben. Das Medium inklusive der jeweiligen Transfektionslösungen wird nach einer Zeit von 4 h entfernt und durch frisches Kulturmedium ersetzt. Die Zellkulturen werden über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag erfolgt die Überprüfung und Dokumentation des Transfektionserfolges mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops. Die Resuspension der Zellen erfolgt nach Zellzählung in mindestens 2,5 ml MiR05 Atmungsmedium, wobei eine jeweils gleiche Zellzahl der Zellsuspensionen von etwa 10<sup>6</sup> Zellen / ml angestrebt wird.

### 3.2.2 Tierexperimentelle Methodik

Alle Tierversuche, die in dieser Dissertation beschrieben werden, erfolgen unter strenger Beachtung der aktuell gültigen Versionen des Tierschutzgesetzes sowie der Tierschutzversuchstierverordnung (221, 222) und sind durch das Landesuntersuchungsamt Rheinland-Pfalz genehmigt (Aktenzeichen: G16-1-022).

Das Tierexperiment mit induziertem SHT im CCI-Modell erfolgt mit insgesamt 16 Mäusen (I). Zur respiratorischen Analyse des Maushirngewebes unter anschließender Zugabe von Hyp1 und der zusätzlichen Proteinanalyse werden zudem jeweils drei Mäuse vom Wildtyp (WT) (II) und drei TRPC6-Knockout (KO)-Mäuse herangezogen (III). Bei allen Versuchsmäusen vom Wildtyp handelt es sich um männliche Mäuse (*Mus musculus*) der Inzuchtlinie C57BL/6NRj von Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, Frankreich. Die Tiere weisen zu Versuchsbeginn ein Alter von 9 Wochen (I) bzw. 32 bis 38 Wochen (II) auf. Das primäre Gewicht der Tiere liegt zu Beginn der Versuche zwischen 21,9 und 26,2 g (I) bzw. 27,3 und 37,7 g (II). Die TRPC6-KO-Mäuse (III) entstammen der Forschungsanstalt The Jackson Laboratory und werden dort unter dem Namen B6; 129S-Trpc6<sup>tm1Lbi</sup> / Mjax geführt. Der KO ist erfolgt in embryonalen Stammzellen von Mäusen des Stamms 129S/SvEv-Gpi1<sup>o</sup> durch das Einbringen eines Zielvektors und der Ausschaltung des Exons 7 des TRPC6-Gens, was durch Verlust zweier Transmembranproteine die Funktion der Porenregion beeinträchtigt. Durch Kreuzung mit Mäusen der Inzuchtlinie C57BL/6N ist eine homozygote Kolonie aufgebaut worden. Die weitere Zucht ist bis zu Versuchsbeginn in der zentralen Versuchstiereinrichtung der Universitätsmedizin Mainz erfolgt. Zu Beginn der Versuche weisen die Tiere ein Alter von 12 Wochen und ein Gewicht von 22,7 und 24,6 g auf.

### 3.2.2.1 Haltung und Pflege

Die Zucht und Haltung der Versuchstiere erfolgt im Gebäude der Zentralen Versuchstiereinrichtung der Universitätsmedizin Mainz. Die Tierhaltung innerhalb des Forschungslabors der Klinik für Anästhesiologie erfolgt in Käfigen zu jeweils zwei Versuchstieren. Die Käfige umfassen eine Fläche von zirka (ca.) 350 cm<sup>2</sup>, die vollständig mit Tiereinstreu bedeckt ist. Zusätzlich enthalten alle Käfige eine Plastikröhre als Rückzugsort und ein Papierhandtuch zum Nestbau, das bei Bedarf, jedoch zumindest einmal wöchentlich zusammen mit der Tiereinstreu, gewechselt wird. Die Tiere haben jederzeit selbstbestimmten Zugang zu Trinkwasser aus einer Flasche und standardisierten Tierfutterpellets, welche sich innerhalb eines Gittereinsatzes oberhalb der Lauffläche befinden. Die Haltung erfolgt in einem speziellen Luftstromschrank, der kontinuierliche Haltungsparameter wie eine Lufttemperatur von 22 °C, eine relative Luftfeuchtigkeit von 55 % und einen 12 h-Tag-Nacht-Rhythmus gewährleistet. Eine tägliche Kontrolle der Versuchstiere während der Experimente bzgl. verschiedener Parameter, die auf eine starke Zustandsverschlechterung hinweisen (starker Gewichtsverlust, apathisches Verhalten, Zähneknirschen, Aggression, Selbstverstümmelung etc.), ist obligat.

### 3.2.2.2 Experimentelle Gruppen und Medikamentenapplikation

Im Rahmen der CCI-Studie (I) werden vorab vier experimentelle Gruppen zu je vier Mäusen festgelegt. Die Zuordnung der Versuchstiere erfolgt entsprechend randomisiert und unter Verblindung des Untersuchers. Bei insgesamt acht der 16 Versuchstiere wird ein CCI appliziert, bei den übrigen Mäusen wird eine Scheinoperation durchgeführt (Sham). Jeweils die Hälfte der CCI- und scheinoperierten Versuchstiere erhält per intraperitonealer Injektion eine Lösung des Medikaments Hyp1, welches jeweils unmittelbar vor der Injektion in einer Dosierung von 5 mg / kg in 1,66 % DMSO in PBS gelöst wird. Die Menge der applizierten Injektion richtet sich nach dem aktuellen Körpergewicht und entspricht 10 µl pro Gramm (g) Körpergewicht (KG), was einer Hyp1-Menge von 5 mg / kg KG entspricht. Die Vorbereitung und Applikation der Trägerlösung 1,66 % DMSO in PBS erfolgt analog bei der 2. Hälfte der Kohorte. Jede Maus erhält insgesamt sechs intraperitoneale Injektionen, die täglich appliziert werden, beginnend jeweils drei Tage vor dem Operationstag, unmittelbar im Anschluss an die Operation selbst sowie bis einschließlich zwei Tage nach der Operation, wobei die Seite der Injektionsstelle täglich gewechselt wird.

Gruppe	Anzahl (n)	Art der Operation	Injektionslösung
A	4	Sham	Vehikel
B	4	Sham	Hyp1
C	4	CCI	Vehikel
D	4	CCI	Hyp1

Tabelle 15: Experimentelle Gruppen

### **3.2.2.3 Operation**

#### Präoperative Maßnahmen und perioperative Anästhesie

Vor der Operation erfolgt eine Inaugenscheinnahme aller Versuchstiere (I), die die Beurteilung des Gesamtzustandes und der Operationstauglichkeit beinhaltet.

Für die Narkoseeinleitung wird die Maus innerhalb eines umgedrehten Trichters platziert, sodass es möglich ist, dem Tier mittels eines Narkosemittelverdampfers eine konstante Dosis von 4 % (v/v) des Inhalationsanästhetikums Isofluran in reinem Sauerstoff über eine Dauer von einer Minute zu verabreichen. Nach adäquater Einleitung erfolgt die Lagerung des Versuchstiers auf einer Wärmeplatte und das Fixieren des Kopfes in einem Stereotaxierahmen zur optimalen Ruhigstellung. Über eine abgedichtete Latexmaske erfolgt bei an den Schneidezähnen fixiertem und geöffnetem Maul die Erhaltungsnarkose nach Art einer Inhalationsnarkose unter erhaltener Spontanatmung mit einer Isofluran-Konzentration von etwa 2 % (v/v) bei einer Sauerstoffkonzentration von knapp unter 40 % (v/v). In kurzen Abständen wird die ausreichende Narkosetiefe anhand des fehlenden Zwischenzehenreflexes evaluiert. Die Temperaturüberwachung erfolgt kontinuierlich über eine rektal eingelegte Temperatursonde. Die Temperatur wird mittels eines Temperaturkontrollsystems und der daran angeschlossenen Wärmeplatte konstant auf einem Niveau von etwa 37 °C gehalten. Zudem werden durchweg die Atmung sowie die Herzfrequenz nichtapparativ überprüft. Einem Austrocknen der Augen wird durch das Auftragen einer Augensalbe vorgebeugt. Das Fell oberhalb der Schädelkalotte wird mit 0,9 %iger steriler Kochsalzlösung benetzt und zur Seite gelegt.

#### Controlled Cortical Impact und Scheinoperation (Sham)

Zu Beginn der Operation erfolgt die Eröffnung der Kopfhaut sowie darunterliegenden Gewebes bis zur Schädelkalotte mittels eines medianen, sagittalen Scherenschnitts von 1,5 cm Länge. Anschließend wird auch das Periost in einem kleinen Gebiet rechtsseitig der Sagittalnaht mit einem sterilen Wattestäbchen stumpf wegpräpariert. Es erfolgt die Eröffnung der knöchernen Kalotte unter Verwendung eines Mikrobohrers. Hierzu wird eine etwa quadratische Fläche von ca. 0,5 cm<sup>2</sup> unter Schonung von Blutgefäßen und der darunterliegenden harten Hirnhaut aufgebohrt, die durch die Sagittalnaht zur Mitte, die Koronarnaht nach vorne und die Lambdanaht nach hinten begrenzt ist. Das entstandene Knochenfragment kann bei bestehender Verbindung zur Sagittalnaht nach medial aufgeklappt und der Blick auf die unverletzte Dura mater ermöglicht werden. Der CCI-Applikator wird daraufhin oberhalb der freigelegten Fläche platziert und so exakt so eingestellt, dass die Grundfläche des CCI-Applikatorbolzens parallel zur harten Hirnhaut ausgerichtet ist und dieser vollständig und gleichmäßig aufliegt. Ist dies der Fall wird der Bolzen des CCI-Applikators, welcher einen Durchmesser von 3 mm aufweist, elektromagnetisch ausgelöst und dringt mit einer Geschwindigkeit von 6 Metern (m) / Sekunde (s) für 200

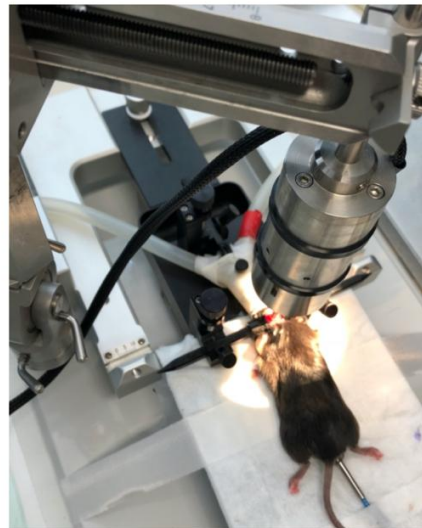
Millisekunden (ms) mit einer Schadenstiefe von 1,5 mm ins darunterliegende Gewebe ein. Unmittelbar nach CCI wird das Knochenfragment zurückgeklappt, eventuelle Blut- und Gewebereste entfernt und der Schädelknochen schnellstmöglich mit Gewebekleber in der ursprünglichen Lage fixiert, um einer andernfalls möglichen Ausdehnung des Hirngewebes durch die freigelegte Fläche des Schädelknochens entgegenzuwirken. Die Kopfhaut wird mit chirurgischem Nahtmaterial durch bis zu vier Einzelknopfnähte primär verschlossen. Wie unter Punkt 3.2.2.2 beschrieben, erhalten die Tiere auch zu diesem Zeitpunkt entsprechend ihrer randomisierten Gruppenzuordnung eine intraperitoneale Injektion. Zum Ende der Operation wird die Zufuhr des Narkosegases eingestellt, der Stereotaxierahmen und die rektale Temperatursonde entfernt. Anschließend werden die operierten Tiere für eine Stunde in einem Einzelkäfig innerhalb eines Inkubators bei 33 °C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 35 % nachüberwacht.

Die Scheinoperation erfolgt bis zum Schritt des Aufbohrens der Schädelkalotte analog zur CCI-Operation. Statt des Aufbohrens und der Eröffnung des Schädelknochens wird lediglich mittels eines Wattestäbchens an der Schädelkalotte geschabt um analog zur CCI-Operation leichten mechanischen Stress auszuwirken, was die Vergleichbarkeit der beiden Operationsmethoden erhöht.

**A**



**B**



**Abbildung 4: Operationssitus**

Der Kopf der Maus wird während der Operation beidseitig mittels eines Stereotaxierahmens in der gewünschten Position fixiert. Zur Beatmung umschließt das Maul der Maus eine spezielle Vorrichtung, die durch einen Gummihandschuh nach außen luftdicht abgedichtet wird.

**A** Die Kopfhaut ist mediansagittal gespalten, ein Knochenfenster auf der rechten Seite der Kalotte eröffnet und nach medial weggeklappt.

**B** Dargestellt ist weiterhin die kontinuierliche rektale Temperaturmessung. Der CCI-Applikator wird wie dargestellt oberhalb des eröffneten Situs platziert. Die Grundfläche des Applikatorbolzens liegt dabei direkt der Hirnoberfläche auf.

### **3.2.2.4 Gewichtskontrolle und Motorfunktionsanalyse**

#### Körpergewicht

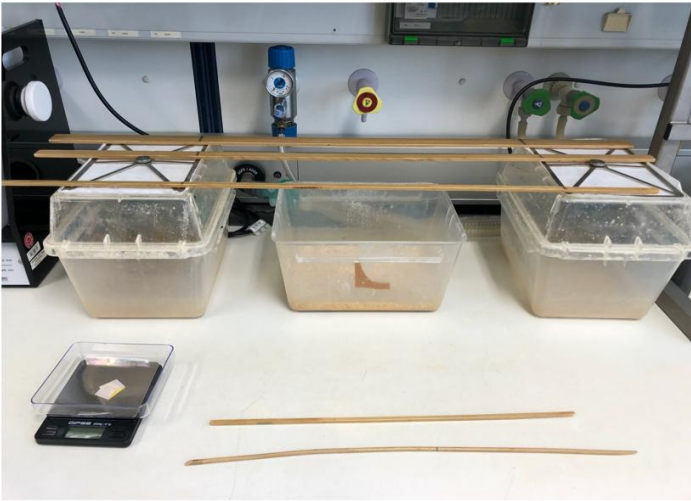
Die Gewichtserfassung aller Versuchstiere (I) erfolgt täglich morgens zur selben Uhrzeit, bei vorgesehener neurologischer Testung am gleichen Tag stets davor, um tageszeitliche und stressbedingte Schwankungen zu relativieren. Die Kontrolle des Körpergewichts lässt unter anderem Rückschlüsse auf das Fressverhalten der Versuchstiere als Indikator des körperlichen Allgemeinzustands zu.

#### Neuroscoring

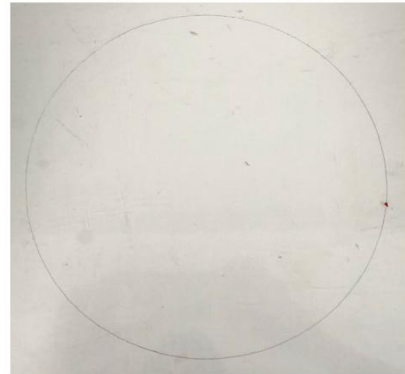
Das in diesen Versuchen (I) verwendete neurologische Bewertungssystem ist eine abgewandelte Form des *Neurological Severity Score* (NSS) von Tsenter et. al (223). In der von unserer Forschungsgruppe angewendeten und etablierten Version (224) umfasst das Bewertungssystem insgesamt zehn zu evaluierende Aspekte in sechs Kategorien, die im Folgenden kurz erklärt werden:

1. Verlassen eines Kreises: Die Zeitdauer bis zum Verlassen des Kreises (Durchmesser 25 cm) mit beiden Vorderpfoten wird erfasst.
2. Reflexe: Die Schreckreaktion auf das Zusammenklatschen der Hände wird erfasst.
3. Verhaltensdefizite: Das Erkundungsverhalten und das Geradeauslaufen werden evaluiert.
4. Koordination: Die Fähigkeit auf unterschiedlich dicken Balken zu Laufen wird in Bezug auf eventuelle Fehlritte oder Herunterfallen bewertet.
5. Balance: Die Fähigkeit des Haltens auf einem zuerst quadratischen, danach auf einem runden Stab wird erfasst.
6. Motorische Defizite: Die Schwere der motorischen Einschränkung der linken Körperseite wird beurteilt.

**A**



**B**



**Abbildung 5: Elemente des NSS**

**A:** Auf den Käfigen aufliegend sind drei Holzstäbe dargestellt in den Breiten 3 cm, 1,5 cm und 1 cm, die die Maus in absteigender Breite überquert. Dies dient der Testung der Koordination. Am vorderen Bildrand befinden sich je ein runder und ein rechteckiger Stab. Die unbeeinträchtigte Maus hält sich für mindestens 10 s mit allen Pfoten an den nach oben gehaltenen Stäben fest. Getestet wird so die Balance.

**B:** Darstellung eines aufgezeichneten Kreises auf einer flachen Plexiglasscheibe mit dem Durchmesser von 25 cm. Gemessen wird die Zeitdauer bis zum Verlassen des Kreises durch die in der Kreismitte platzierte Maus.

Animal ID:	
OP-Date:	

Date and time:

**1. Exit from circle?**

< 30 sec	(0)
30-60 sec	(1)
61-119 sec	(2)
> 2 min	(3)

**2. Reflexes**

startle reflex	Present	(0)
	Absent	(1)
If the mouse is not moving at all, clap your hands once above the mouse; did it react?		

**3. General behavioral deficit?**

Seeking behavior	Present	(0)
	Absent	(1)
Walk straight	Present	(0)
	Absent	(1)

**4. Coordination**

Beam walking 3 cm	Score	(0-2)
Beam walking 1,5 cm	Score	(0-2)
Beam walking 1 cm	Score	(0-2)

Criteria:

0 point: normal movement / no impairment  
 1 points: feet misplacements / unstable movement  
 2 points: sits down / stops moving on beam / falls down  
 (Criteria (old): Count misplacements (new: in index))

**5. Balance**

Round stick	Score	(0-1)
Square stick	Score	(0-1)

Criteria:

0 point: Can grip the stick with 4 paws for 10 seconds  
 1 points: Turn the stick: can it do that again, or is a paw (hemiparesis) "hanging out"

**6. Motor deficit**

Paresis	Absent	(0)
	One foot	(1)
	Hemiparesis	(2)

**Abbildung 6: Neurologische Bewertung anhand des NSS**

Die neurologische Einschätzung aller Tiere erfolgt durch Punktvorgabe in 6 Kategorien entsprechend hier beschriebener Bewertungskriterien am Tag vor sowie am 1., 3. und 5. Tag nach der Operation

In allen Kategorien werden entsprechend den Ausfallerscheinungen Punkte vergeben und am Ende der Testung eine Gesamtpunktzahl errechnet, wobei minimal 0 Punkte und eine Maximalzahl von 16 Punkten erreicht werden können, entsprechend einer extremen Beeinträchtigung. Alle Mäuse werden hinsichtlich ihrer neuromotorischen Ausfälle am 1., 3. und 5. postoperativen Tag durch den NSS eingestuft. Diese Werte können anschließend in Relation gesetzt werden zu einem individuellen Ausgangswert, welcher am Tag vor der Operation erhoben wird, um tatsächlich CCI-bedingte Ausfälle von anderen Ursachen diskriminieren zu können. Von Bedeutung für die intra- und interindividuelle Vergleichbarkeit der Bewertung mittels des NSS ist die Durchführung zur jeweils selben Tageszeit in möglichst ruhiger und gleichbleibender Umgebung durch nur einen nicht wechselnden Untersucher.

### **3.2.2.5 Euthanasie und Hirnentnahme**

Die Versuchstiere werden am 5. postoperativen Tag nach Erfassung des Körpergewichts und Erhebung des NSS euthanasiert (I). Hierzu erfolgt nach einminütiger Isofluran-Exposition in einer Konzentration von 4 % (v/v) die zervikale Dislokation, gefolgt von der Dekapitation der Tiere. Anschließend wird die Kopfhaut mit den darunterliegenden Strukturen mit einer Schere von kaudal nach rostral eröffnet. Ausgehend vom Foramen magnum wird der Schädelknochen des nun umgedrehten Kopfes wenige Millimeter in rostrale Richtung eingeschnitten, um anschließend die beiden Seiten der knöchernen Kalotte vorsichtig und ohne Beschädigung des Hirnparenchyms zu entfernen. Nach Entfernung des Schädelknochens und der Dura mater kann das Gehirn mit einem stumpfen Spatel entnommen werden. Analog wird mit den übrigen Versuchstieren (II, III) verfahren.

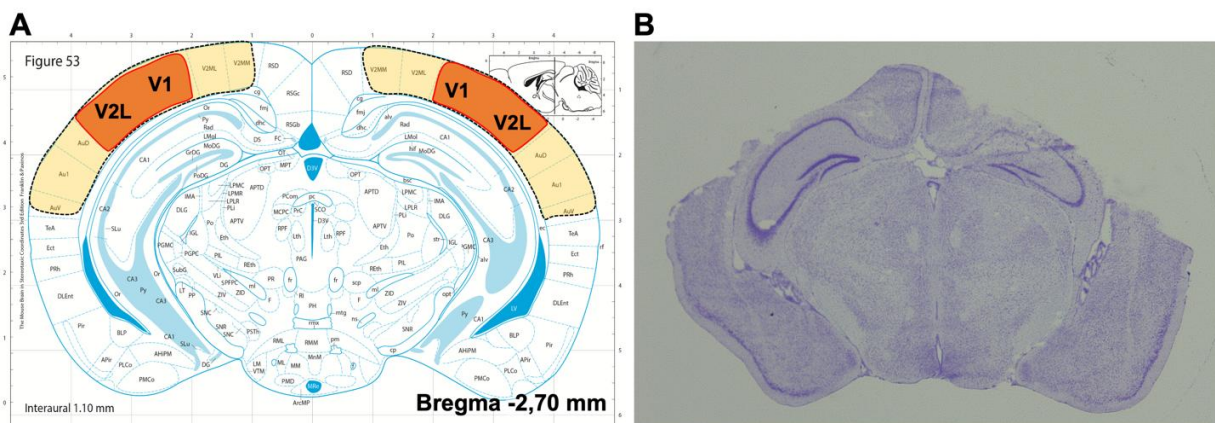
### **3.2.2.6 Konservierung und Weiterverarbeitung des Hirngewebes**

Nach Euthanasie der Tiere und Hirnentnahme erfolgt umgehend die Entnahme der Cortexareale zum Zweck der Respirometrie. Hierzu wird beidseits auf gleicher Höhe ein schmaler Streifen corticalen Gewebes von etwa 0,5 – 1 mm in rostral-occipitaler Ausdehnung und etwa 3 mm in mediolateraler Ausdehnung stumpf präpariert. Dieses Areal liegt auf der Schadensseite der CCI-Tiere dicht hinter der sichtbaren Schadensstelle. Diese Areale werden analog auch den Cortices der scheinoperierten Tiere entnommen. Es folgt das unmittelbare Abwiegen eines zentralen Anteils des präparierten Gewebes von etwa 5 mg, der funktionell-anatomisch am ehesten dem visuellen Cortex zuzuordnen ist (*Abbildung 7*). Zum Schutz vor Austrocknung erfolgt die direkte Zugabe von 2 ml eiskaltem MiR05 Atmungspuffer. Mittels eines Homogenisierers wird das Gewebe im Atmungspuffer durch 10-maliges langsames Auf- und Abbewegen des Glaskolbens unter permanenter Kühlung homogenisiert. Unter weiterer Zugabe des MiR05 erfolgt die Herstellung einer Lösung der Konzentration 1 mg / ml zur unmittelbar folgenden respirometrischen



Analyse. Das restliche Hirngewebe wird auf pulverisiertem Trockeneis für 1 min schockgefroren und anschließend bei -20 °C gelagert.

Analog zur geschilderten Entnahme der visuellen Cortices im CCI-Tierversuch wird bei der Untersuchung der WT- und TRPC6-KO-Tiere (II und III, siehe 3.2.2 Tierexperimentelle Methodik) verfahren. Hierbei wird jeweils das rechtsseitige Cortexareal für die Respirometrie vorbereitet. Das linksseitige Cortexareal sowie die beidseitige Hippocampusformation und das Cerebellum werden getrennt voneinander bei -80 °C gelagert und später proteinanalytisch untersucht.



**Abbildung 7: Lokalisation der entnommenen Cortexareale zur respirometrischen Analyse**

Gegenüberstellung der anatomischen Darstellung (modifiziert nach (225)) (A) und entsprechendem Hirnschnitt nach Kresylviolett färbung (B) auf Höhe Bregma -2,7 mm; **gelb markiert:** stumpf entnommener Bereich unmittelbar nach Hirnentnahme in einer rostral-occipitalen Ausdehnung von ca. 0,5 – 1 mm; **orange markiert:** ca. 5 mg schwerer zentraler Bereich des präparierten Areals zur respirometrischen Analyse, entsprechend den visuellen Cortexarealen V1 und V2L.

### 3.2.2.7 Anfertigung der Kryoschnitte

Zum Zweck der Gewinnung von Hirnmaterial zur Protein- und molekularbiologischen Analyse sowie der Darstellung des Schadensvolumens der CCI-Tiere (I) und des Volumens und der Lokalisation der entnommenen Cortexareale zur respirometrischen Untersuchung werden koronare Schnitte des Maushirns angefertigt. Dies geschieht nach vorheriger Fixierung der Hirne mittels eines Einbettmediums und korrekter Ausrichtung mithilfe eines auf -20 °C gekühlten Kryostats. Die Schnittfolge ist bestimmt durch ein etabliertes Schnittprotokoll unserer Arbeitsgruppe: Beginnend auf Höhe des Bregmas +3,14 mm werden im Abstand von 500 µm jeweils mehrere Schnitte einer Dicke von 12 µm angefertigt und auf Objektträgern fixiert, wobei insgesamt 16 Ebenen untersucht werden. Zusätzlich werden zwischen den Ebenen 6 und 13 sogenannte Trimschnitte erstellt. In jeder Ebene werden hierzu acht 30 µm dicke Schnitte angefertigt, die übereinandergelegt und in der Mediansagittalebene geteilt werden. Alle Trimschnitte einer Hemisphäre werden zusammen in Kryogefäße gegeben und bei -80 °C bis zur Weiterverarbeitung gelagert.



### 3.2.2.8 Kresylviolettfräbung

Die Kresylviolettfräbung wird als histologische Übersichtsfräbung angewandt. Der basophile Farbstoff bindet an Ribonukleinsäuren (RNA und DNA), die sich in Nervenzellen überwiegend innerhalb des Somas befinden. Zu Beginn werden die auf den Objektträgern fixierten Schnitte für 1 h luftgetrocknet. Anschließend folgt das Eintauchen in verschiedene Lösungen nach folgendem Schema: 70 % Ethanol für 2 min, Kresylviolettlösung für 10 min, 2 mal kurzes Eintauchen in Aqua destillata, 2 mal kurzes Eintauchen in 70 % Ethanol, 2 mal kurzes Eintauchen in 96 % Ethanol, Roti®Histol für 5 min, Roti®Histol für 2 min. Zur Versiegelung werden das Roti®Histokitt Einschlussmittel und ein Deckglas genutzt. Die Schnitte werden mikroskopisch dargestellt und mit der Software ZEN® 2 aufgenommen.

### 3.2.2.9 Übersicht über den Versuchsablauf

Zur besseren Übersicht über den zeitlichen Versuchsablauf, die Einordnung von Operation (OP), intraperitonealer Injektionen und der Euthanasie (Eu.) und die Erfassung von Körpergewicht und NSS erfolgt hier eine tabellarische Darstellung.

Versuchstag	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Post-OP-Tag					1	2	3	4	5
Ereignis				OP					Eu.
Injektion	X	X	X	X	X	X			
Körpergewicht	X	X	X	X	X	X	X	X	X
NSS			X		X		X		X

Tabelle 16: Übersicht über den Versuchsablauf

### 3.2.3 Proteinanalysen

#### 3.2.3.1 Proteinextraktion aus Zellen

Die Zellyse vor Proteinanalyse mittels Western Blot wird unmittelbar am Ende der vorgesehenen Inkubationszeit mit jeweiligen Agenzien in 12-well-Platten durchgeführt. Hierzu wird einzeln das Zellkulturmedium vorsichtig entfernt. Es folgt ein Waschen der Zellen mit 1 ml kalter PBS-Lösung. Anschließend erfolgt die Zugabe von 40 µl zweifach konzentriertem Probenpuffer in die Mitte des jeweiligen wells, gefolgt von mechanischem Abschaben und Sammeln des Lysats. Der Probenpuffer enthält unter anderem Bromphenolblau zur Markierung der Laufmittelfront, β-Mercaptoethanol zur Proteinreduktion und somit Spaltung der Disulfidbrücken sowie Natriumdodecylsulfat (SDS) zur Proteindenaturierung. Die Anlagerung des negativ geladenen SDS an die Proteine bewirkt im elektrischen Feld eine Wanderung zum Pluspol und eine Auftrennung nach Molekülmasse statt Eigenladung der Proteine. Die Proben werden anschließend für 5 min bei 95 °C inkubiert.

### **3.2.3.2 Proteinextraktion aus Gewebe**

Zur Proteinextraktion des Hirngewebes aus den Trimmschnitten (I, siehe 3.2.2 Tierexperimentelle Methodik) wird das bei -80 °C gelagerte Gewebe abgewogen und entsprechend ein Volumen des RIPA-Lysepuffers von 10 µl pro mg Gewebe hinzugegeben. Der eingesetzte RIPA-Lysepuffer setzt sich neben Puffersubstanzen zusammen aus Detergenzien zur Zelllyse und Denaturierung der Proteine sowie dem Komplexbildner EDTA. Der Lysepuffer wird im Vorfeld mit jeweils einer Protease- und Phosphataseinhibitor Cocktail Tablette pro 10 ml des Puffers versetzt, um dem enzymatischen Proteinabbau sowie der Abspaltung von Phosphorsäuregruppen entgegenzuwirken.

Nach Zugabe des RIPA-Lysepuffers und Mischen der Proben folgt die Inkubation auf Eis für die Dauer von 30 min, wobei die Proben alle 10 min erneut kräftig manuell durchmischt werden. Anschließend werden die Proben bei 4 °C und 1400 rpm über 20 min zentrifugiert. Das entstandene Pellet aus Zelltrümmern und übrigen Gewebsbestandteilen wird verworfen, nachdem der Überstand, der die gelösten Proteine enthält, in neue vorgekühlte Mikroreaktionsgefäße überführt worden ist. Dieser wird bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C aufbewahrt.

Analog zur Proteinextraktion aus Trimmschnitten wird bei der Extraktion der Proteine aus den Hirnarealen Cortex, Hippocampus und Cerebellum (II und III, siehe 3.2.2 Tierexperimentelle Methodik) vorgegangen. Die benannten Hirnareale werden umgehend nach dem Auftauen abgewogen und weiterverarbeitet, während auf stetige Kühlung durch Lagerung der Proben auf Eis und Schutz vor Austrocknung durch stetiges Befeuchten mit PBS-Lösung geachtet wird.

### **3.2.3.3 Konzentrationsbestimmung**

Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde im Wesentlichen nach der Methode von Lowry mittels *DC Protein Assay Kit* (Bio-Rad) durchgeführt (226). Zu Beginn werden Verdünnungen der einzelnen Proteinlysate mit Aqua destillata im Verhältnis 1:10 hergestellt. Auf eine 96-well-Mikrotiterplatte werden pro well 5 µl einer Standardreihe der definierten Proteinkonzentrationen 0 mg / ml, 0,5 mg / ml, 0,75 mg / ml, 1 mg / ml, 1,5 mg / ml, 2 mg / ml, 2,5 mg / ml und 3 mg / ml gegeben sowie jeweils 5 µl der hergestellten verdünnten Proteinlysate aufgetragen. Sowohl die Proben der Standardreihe als auch die zu messenden Verdünnungen werden als Duplikate aufgetragen. Zu allen Proben werden 25 µl des Gemischs aus den Proteinbestimmungsreagenzien A und S (Verhältnis 50:1) sowie 200 µl des Proteinbestimmungsreagenz B pipettiert. Daraufhin folgt die Inkubation der Proben für 12 min in Dunkelheit. Während dieser Inkubationszeit entsteht eine entsprechende Menge eines blauen Farbstoffes, die sich direkt proportional zur Proteinkonzentration der Proben verhält. Die Blaufärbung der Probe kann photometrisch anhand der Extinktion von Licht der Wellenlänge

750 nm mit Hilfe des Detektionssystems GloMax®-Multi+ bestimmt werden. Die gemessenen Werte der Duplikate der Standardreihe werden gemittelt und eine Standardkurve erstellt, die den Extinktionswerten der Proben eine Proteinkonzentration zuordnet.

### 3.2.3.4 Gelelektrophorese

Für die Auftrennung der Proteine nach ihrer Molekülmasse wird die Gelelektrophorese durchgeführt. Die hier eingesetzte Methode ist die SDS-PAGE, bei der zuvor ein Gel gegossen werden muss, in welchem die Konzentration an enthaltenem Acrylamid die Porengröße des Gels bestimmt. Neben Rotiphorese® Gel 30, welches Acrylamid und Bisacrylamid zur Quervernetzung der Polyacrylamid-Ketten enthält, werden APS als Radikalstarter und TEMED als Polymerisationskatalysator hinzugegeben. Die Porengröße verhält sich umgekehrt proportional zur Gesamtkonzentration an Acrylamiden. Je nach Molekülmasse der zu detektierenden Proteine ist die Porengröße anzupassen, weshalb in der vorliegenden Arbeit Gele zweier verschiedener Konzentrationen verwendet werden. Die Substanzen werden entsprechend der in Tabelle 17 aufgeführten Rezeptur für das Gießen jeweils zweier Gele gemischt.

Substanz	Sammelgel	Trenngel 10 %	Trenngel 15 %
Aqua destillata	2,5 ml	4 ml	2,35 ml
Sammelgelpuffer (pH = 6,8)	1,25 ml		
Trenngelpuffer (pH = 8,8)		2,5 ml	2,5 ml
Rotiphorese® Gel 30	1,25 ml	3,25 ml	5 ml
APS	75 µl	150 µl	150 µl
TEMED	5 µl	5 µl	5 µl

Tabelle 17: Pipettierschema zur Herstellung der Polyacrylamid-Gele

Vor dem eigentlichen Gießen der Gele werden die Elektrophoresekammern vorbereitet. Zwischen zwei parallelen Glasplatten, die durch zwei dünne Kunststoffplatzhalter voneinander getrennt sind und einen Hohlraum bilden, wird nach vorheriger gründlicher Durchmischung mittels Vortexmischer zuerst die Trenngellösung aufgetragen. Diese wird pro Kammer mit etwa 1 ml Isopropanol bedeckt, um eine glatte obere Grenzfläche des Trenngels zu erzeugen. Nach etwa 30-minütiger Wartezeit zur Aushärtung kann nach Abgießen des Isopropanols die Sammelgellösung hinzugefügt und ein Plastikkamm je nach gewünschter Taschenanzahl eingesteckt werden. Nach weiteren 30 min Aushärtungszeit können die Gele eingesetzt werden. Aliquote der Proteinlysate werden im Verhältnis 1:5 mit Probenpuffer versetzt und bei 95 °C für 5 min inkubiert. Nach Einsetzen der Gele in die Elektrophoresekammern, Auffüllen mit Elektrophoresepuffer und Entfernen der Kämmen werden die Gele beladen. Hierzu werden in die jeweils erste Tasche 5 µl Chameleon™ Duo *Prestained Protein Marker*, in die letzte Tasche eines Gels 5 µl *Prestained Marker* gefüllt. Die weiteren Taschen werden mit der nötigen Menge eines Gemischs aus Proteinlösung und Probenpuffer befüllt, um pro Tasche einen Proteingehalt von

25 µg bei der Proteinanalyse der Trimmstücke bzw. 50 µg bei der Untersuchung der Hirnareale zu erreichen. Die Elektrophorese erfolgt bei 0,02 Ampere (A). Die Zeitdauer variiert je nach Bandengröße der zu detektierenden Proteine und Konzentration der Gele.

### **3.2.3.5 Western Blot**

Der Western Blot dient der Übertragung der nach Molekülmasse aufgetrennten Proteine auf Nitrozellulosemembranen. Das Gel wird hierzu nach der Elektrophorese in einer Kompressionskassette in einer Schicht verschiedener Materialien, die in Blotpuffer getränkt sind, frei von Luftblasen eingebettet. Im Detail erfolgt folgende Schichtung von der Anode zur Kathode: Ein Schwamm, zwei Blotting-Papiere, das Gel, eine Nitrocellulosemembran, zwei Blotting-Papiere, ein Schwamm. Die Proteinübertragung auf die Nitrocellulosemembran erfolgt je nach Proteingröße bei 0,38 A bis 0,4 A für 75 bis 120 min in einer mit Blotpuffer gefüllten und eisgekühlten Blotkammer. Anschließend kann der Erfolg des Western Blots durch das Sichtbarmachen von Proteinbanden nach Zugabe von Ponceau S bestätigt werden. Um nachfolgend unspezifische Antikörperbindungen auf der Nitrozellulosemembran zu unterbinden, werden freie Bindungsstellen blockiert. Zu diesem Zweck wird die Nitrozellulosemembran für 1 h bei Raumtemperatur in 2,5 % MM in TBS inkubiert. Nach dem Blockieren der Membran und dem zweimaligen Waschen in PBS für je 5 min wird die entsprechend konzentrierte MM- oder BSA-Lösung, die den Primärantikörper enthält, dessen Antigenbindungsstelle gegen das zu detektierende Protein gerichtet ist, hinzugefügt und die Membran über Nacht bei 4 °C inkubiert. Daraufhin folgt zweimaliges Waschen der Nitrocellulosemembran in TBST für 5 min zur Ablösung unspezifisch gebundener Primärantikörper und die anschließende Inkubation der Membran mit der Sekundärantikörperlösung in Dunkelheit für 1 h. Der Sekundärantikörper, an den ein Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist, wird entsprechend der Spezies des Primärantikörpers und der gewünschten Wellenlänge des Fluoreszenzsignals ausgewählt. Nach zweimaligem Waschen in TBST für jeweils 5 min erfolgt die Detektion des Fluoreszenzsignals mit Hilfe des Fluoreszenz-Bildgebers Odyssey® Sa Imager 9260 in Verbindung mit der Software Image Studio. Ebenfalls erfolgt die Auswertung der Detektionsergebnisse mithilfe dieser Software, indem wenn immer möglich gleichgroße rechteckige Formen über die jeweiligen Banden gelegt werden. Die Software errechnet für jedes Rechteck automatisiert nach Abzug des Hintergrundsignals einen jeweiligen Wert, der der Menge der gebundenen Antikörper entspricht und proportional ist zur Menge des zu detektierten Proteins. Abschließend erfolgt die Normalisierung der erhaltenen Werte zu dem ebenfalls in jeder Proteinprobe analysierten Referenzprotein Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH).

### **3.2.3.6 IgG Dot Blot**

Eine Schädigung der BHS, die auch im Rahmen eines SHT auftreten kann, führt zum Übertritt im Blut gelöster Substanzen ins ZNS. Exemplarisch kann durch die Quantifizierung des körpereigenen IgG im Hirngewebe der Nachweis einer BHS-Störung erfolgen. Zur Detektion des in den Proteinproben enthaltenen IgG erfolgt ein Dot Blot. Ein Volumen von 2 µl des aus Gewebe gewonnenen und in einer Konzentration von 5 µg / µl in RIPA-Puffer gelösten Proteinlysats (siehe 3.2.3.2 Proteinextraktion aus Gewebe) wird auf vormarkierte Felder einer Nitrozellulosemembran aufgetragen. Zudem werden 2 Negativkontrollen in Form eines Volumens von 3 µl RIPA-Puffer auf die Membran gegeben. Nach 45-minütiger Lufttrocknung der Membran bei Raumtemperatur erfolgt das Blockieren freier Bindungsstellen der Membran in 2,5 % MM in TBS. Anschließend erfolgt die Inkubation mit dem mit einem Fluoreszenzfarbstoff beladenen Antikörper gegen murines IgG. Nach 3-maligem Waschen der Membran in TBST für je 5 min erfolgt die Messung des Fluoreszenzsignals mittels des Fluoreszenzbildgebers Odyssey® Sa Imager 9260.

### **3.2.4 RNA-Analysen**

#### **3.2.4.1 RNA-Extraktion aus Zellen**

Die Extraktion der RNA aus den verwendeten SIM-A9-Zellen, die in 12-well-Platten inkubiert worden sind, erfolgt mittels des RNeasy Kits von Qiagen aufgrund der eher geringen Menge enthaltener RNA. Den Zellen wird nach einmaligem Waschen mit kalter PBS-Lösung 350 µl des Lysepuffers RLT zugegeben, welcher zusätzlich 10 µl β-Mercaptoethanol / ml enthält. Die Zelllysate werden nach Überführen in QIAshredder-Säulen bei 13500 rpm für 2 min zentrifugiert. Nach Mischen mit 250 µl Lysepuffer RLT Plus werden die nun homogenisierten Lysate auf gDNA-Eliminatorsäulen gegeben und für 30 s bei 10000 rpm zentrifugiert. Nachfolgend werden den Proben 600 µl 70 %iges Ethanol zugegeben und diese nach Überführen auf RNeasy Mini Spin-Säulen für 15 s bei 10000 rpm zentrifugiert. In diesem Schritt wird die RNA auf Membranen in den RNeasy Mini Spin-Säulen gebunden. Es folgen zwei einzelne Schritte zur Aufreinigung der RNA mit 700 µl des Puffers RW1 und 500 µl des Puffers RPE jeweils gefolgt von 15-sekündiger Zentrifugation bei 10000 rpm und einem weiteren Reinigungsschritt mit 80 %igem Ethanol für 2 min bei 10000 rpm und anschließender Zentrifugation für 5 min bei 13500 rpm zur Trocknung der Membran der RNeasy Mini Spin-Säule. Das eigentliche Eluieren der RNA findet im Anschluss nach Zugabe von 14 µl RNase-freiem Wasser und der 1-minütigen Zentrifugation bei 13500 rpm statt.

#### **3.2.4.2 RNA-Extraktion aus Gewebe**

Zur Extraktion der RNA aus Trimmchnitten der Maushirne wird das RNeasy Mini Kit verwendet. Zu allen Gewebeprouben werden 900 µl des Qiazol®-Lysereagenz zugefügt. Jedem Mikroreaktionsgefäß wird eine Edeltahlkugel hinzugegeben und das Gewebe für 2 min bei 20 (Hertz) Hz in einer Schwingmühle homogenisiert und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend werden 100 µl gDNA Eliminator-Lösung hinzugegeben und die Probe mit Hilfe eines Vortexmischers 15 s durchmischt. Nach Zugabe von 180 µl Chloroform und einer weiteren 15-sekündigen Durchmischung werden die Proben für 15 min bei 12000 rpm bei 4 °C zentrifugiert. Es wird eine Dreischichtung der Probenbestandteile sichtbar, wobei sich eine organische Schicht am Boden des Mikroreaktionsgefäßes befindet, darüber eine Schicht, in welcher sich die DNA befindet. Die obere wässrige Schicht, welche die RNA enthält, kann in neue Mikroreaktionsgefäße überführt werden. Nun werden 600 µl 70 %igen Ethanol hinzugefügt und die Lösung in eine RNeasy Mini Spin-Säule überführt und für 15 s bei 8000 rpm zentrifugiert. Es werden zwei Waschschrille mit 700 µl Puffer RWT und 500 µl Puffer RPE durchgeführt, gefolgt von einer jeweils 15-sekündigen Zentrifugation bei 8000 rpm. Nach einem weiteren Waschschrill mit 500 µl des Puffers RPE und 2-minütiger Zentrifugation bei 8000 rpm wird zur Trocknung der Membran die RNeasy Mini Spin-Säule bei 13500 rpm zentrifugiert. Die Eluation der RNA erfolgt mit 30 µl RNase-freiem Wasser, das auf die Membran gegeben wird und der abschließenden 1-minütigen Zentrifugation bei 800 rpm.

#### **3.2.4.3 RNA-Konzentrationsbestimmung**

Die RNA-Konzentration des gewonnenen RNA-Eluats und dessen Reinheitsgrad kann photometrisch bestimmt werden. Gemessen werden die optischen Dichten (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm ( $OD_{260}$ ), was dem Absorptionsspektrum der DNA entspricht, und 280 nm ( $OD_{280}$ ), dem Absorptionsmaximum von Proteinen. Eine eventuelle Verunreinigung der Probe lässt sich durch die Berechnung des Quotienten aus  $OD_{260}$  und  $OD_{280}$  erkennen, dessen Wert zwischen 1,8 und 2,1 betragen sollte.

#### **3.2.4.4 Synthese der komplementären DNA (cDNA)**

Vor der eigentlichen quantitativen Real Time-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) erfolgt die Synthese doppelsträngiger cDNA aus vorher einzelsträngiger mRNA. Zu diesem Zweck wird das QuantiTect® Reverse Transcription Kit von Qiagen eingesetzt. Um einem Abbau der RNA entgegenzuwirken, werden alle folgend beschriebenen Schritte auf Eis durchgeführt. Den bestimmten RNA-Konzentrationen entsprechend wird jeder Probe eine RNA-Menge von 1 µg entnommen und in einem Mikroreaktionsgefäß mit RNase-freies Wasser auf ein Gesamtvolumen von 12 µl aufgefüllt. Jeder Probe werden weiterhin 2 µl gDNA Wipeout Puffer zugefügt, um eine

Verunreinigung mit gDNA auszuschließen. Nach einer Inkubationszeit von 8 min bei 42 °C wird jeder Probe ein Volumen von 6 µl des angesetzten Mastermix hinzugefügt, der Quantiscript Reverse Transkriptase, Quantiscript Reverse Transkriptase-Puffer und Reverse Transkriptase-Primer im Verhältnis 1:4:1 beinhaltet. Während einer sich anschließenden Inkubationszeit von 30 min bei 42 °C erfolgt die reverse Transkription zur Synthese der cDNA. Durch eine dreiminütige Erhitzung der Proben auf 95 °C wird der Prozess durch Denaturierung der reversen Transkriptase gestoppt. Abschließend erfolgt eine Verdünnung der Proben mit RNase-freies Wasser im Verhältnis 1:1. Eine Lagerung der Proben bei -80 °C bis zur Weiterverarbeitung ist möglich.

#### **3.2.4.5 qRT-PCR**

Die qRT-PCR bietet die Möglichkeit in einer Probe die vorhandene Menge an gesuchten Nukleinsäuren zahlenmäßig zu bestimmen. Im Fall der vorliegenden Arbeit geht es um die Bestimmung von cDNA aus mRNA, um Rückschlüsse auf die tatsächliche Genexpression aus Zellkulturen oder Maushirnen zum Entnahmezeitpunkt ziehen zu können. Grundsätzlich zur Durchführung einer PCR benötigt werden die vorbereitete DNA-Lösung, eine thermostabile DNA-Polymerase, die dem wärmeliebenden Bakterium *Thermus aquaticus* entstammt und daher als Taq-Polymerase bezeichnet wird, sowie sogenannte Primer als kleine komplementäre DNA-Stücke, die der Initiation der Polymeraseaktivität dienen. Notwendig sind pro DNA-Abschnitt zwei verschiedene Primer für beide DNA-Matrizen, die als vorwärts- oder rückwärtsgerichtete Primer angesehen werden können und entsprechend als *Forward* (F) und *Reverse* (R) Primer bezeichnet werden. Weiterhin werden die DNA-Bausteine, die Desoxynukleotidtriphosphaten Desoxyadenosin-, Desoxyguanosin-, Desoxycytidin- und Desoxythymidintriphosphat, benötigt. Bei der qRT-PCR wird die DNA über 20 - 50 Zyklen mithilfe des *Real-Time*-PCR-Systems LightCycler® automatisiert vervielfacht. Grob kann man pro Zyklus drei Schritte unterscheiden: eine Denaturierungsphase bei 95 °C, bei der die Einzelstränge durch Lösen von Wasserstoffbrückenbindungen getrennt werden, eine Phase, die der Hybridisierung der Primer an die DNA dient, die je nach Primer in ihrer benötigten Temperatur variiert und eine Elongationsphase, in der eine Temperatur von 72 °C vorherrscht, dem Temperaturoptimum der Taq-Polymerase, zur Synthese der Komplementärstränge. Die Quantifizierung der cDNA in Echtzeit im Rahmen der qRT-PCR erfolgt durch die Detektion und Interpretation von Fluoreszenzsignalen mittels des LightCycler® und der zugehörigen Software. Fluoreszenzfarbstoffe binden entweder unspezifisch an der DNA wie im Falle des SYBR Green Farbstoffs oder sind gekoppelt an spezifische Hybridisierungssonden.

Zielstruktur	qPCR-Kit	Pipettierschema
Arc	ABsolute™ Blue SYBR Green QPCR Mix	5 µl SYBR Green Master Mix 0,25 µl Primer F 0,25 µl Primer R 3,5 µl H <sub>2</sub> O 1 µl Ziel-DNA
BDNF		
COX-2		
c-Fos		
GADD45B		
iNOS		
PPIA		
TRPC6		
IL-1β	LightCycler® 480 Probes Mix	5 µl Probes Master Mix 0,25 µl Primer F 0,25µl Primer R 0,5 µl Sonde FL 0,5µl Sonde Cy5 2,5 µl H <sub>2</sub> O 1 µl Ziel-DNA
IL-6		

**Tabelle 18: Auflistung der qPCR-Kits und Pipettierschemata**

Zuordnung der verwendeten qPCR-Kits entsprechend der zu detektierenden Zielstruktur inklusive des jeweils verwendeten Pipettierschemas.

Die Intensität des Fluoreszenzsignals korreliert mit der entstandenen DNA während der zyklischen Vervielfältigung. So wird computergestützt eine sigmoidale Kurve erstellt, die das gemessene Fluoreszenzsignal in Abhängigkeit von der Anzahl der abgelaufenen PCR-Zyklen darstellt. Zur Quantifizierung der Ursprungsmenge der gesuchten DNA-Abschnitte werden sogenannte *Crossing Points* betrachtet. Diese sind definiert als die Anzahl an PCR-Zyklen, die bis zum Erreichen eines konstant definierten Fluoreszenzniveaus, das das Hintergrundfluoreszenzsignal überschreitet, abgelaufen sind. Anhand des computergestützten Abgleichs dieser Werte mit den Werten einer Standardkurve aus Proben bekannter DNA-Konzentrationen kann den *Crossing Point*-Werten eine Ursprungskonzentration der DNA-Abschnitte in den zu untersuchenden Proben zugeordnet werden. Um etwaige Einflussfaktoren auf die gemessene DNA-Konzentration zu minimieren, etwa unterschiedliche RNA-Extraktionseffizienzen zwischen den Proben, kommt die relative Quantifizierung zur Anwendung. Die jeweils in Duplikaten gemessenen Werte der Probe werden gemittelt und gegen die Mittelwerte eines sog. Referenzgen (*Housekeeping Gens*) normalisiert. Als Referenzgen wird hier Peptidylprolylisomerase A (PPIA, *Cyclophilin A*) genutzt, das nach Untersuchungen in verschiedenen Zelltypen, Geweben und Organen konstitutiv und von äußeren Einflüssen, wie z. B. einem SHT, weitgehend unabhängig exprimiert wird (227, 228).

### 3.2.5 Respirometrie

Zur Messung der mitochondrialen Atmung von Zellen und homogenisiertem Hirngewebe wird das High-Resolution Respirometer Oxygraph-2k von Oroboros Instruments verwendet. In zwei voneinander getrennten Kammern können in Verbindung mit der Software DatLab in Echtzeit die



Sauerstoffkonzentration sowie die errechneten Werte für den Sauerstoffverbrauch in Pikomol (pmol) pro s pro Million Zellen bzw. pro mg Hirngewebe numerisch und grafisch dargestellt werden. Nach Vorgaben des Herstellers werden die Kammern jeweils vor Inbetriebnahme gespült und über 30 min mit dem Atmungsmedium MiR05 kalibriert. Alle angegebenen Werte werden gegenüber einem Hintergrundwert, welcher am Ende der Kalibration manuell markiert wird, korrigiert. Während der Versuche wird das Atmungsmedium, das die Zellen bzw. Gewebehomogenisate beinhaltet, kontinuierlich bei 750 rpm durchmischt und auf einer Temperatur von exakt 37 °C gehalten.

#### **3.2.5.1 Vorbereitung der Zellen und des Gewebes**

Die Zellen werden, wie in Kapitel 3.2.1 beschrieben, kultiviert, ausgezählt und anschließend im Atmungsmedium MiR05 resuspendiert. Dies geschieht jeweils unmittelbar vor der Respirometrie während der Kalibrierung des Gerätes. Es wird sowohl bei den SIM-A9-Zellen als auch bei den HEK-293-Zellen eine Konzentration von  $10^6$  Zellen / ml angestrebt und jeweils die exakten Konzentrationen der Proben für die automatisierte Berechnung des Sauerstoffverbrauchs pro Million Zellen in DatLab eingepflegt. Die Konzentration in beiden Kammern während eines Experiments ist dabei stets gleich. Die Gewebehomogenisate werden entsprechend unmittelbar vor der Respirometrie in einer Konzentration von 1 mg Gewebe pro ml MiR05-Atmungsmedium vorbereitet (siehe 3.2.2.6 Konservierung und Weiterverarbeitung des Hirngewebes). Sowohl die Gewebehomogenisate als auch die vorbereiteten Zellen werden bis zum Einfüllen in die Kammern des Respirometers auf Eis gelagert.

#### **3.2.5.2 Substrate-Uncoupler-Inhibitor Titration (SUIT)-Protokoll**

Nachdem beide Kammern vollständig (jeweils ca. 2,2 ml) mit der zu untersuchenden Lösung frei von Luftblasen befüllt sind, können nach einer etwa 10-minütigen Äquilibration bis zur Stabilisierung des angezeigten Sauerstoffverbrauchs die Kammern des Respirometers komplett geschlossen werden. Bei den Messungen der Zellen und der Hirnhomogenisate aus den WT- und TRPC6-KO-Mäusen wird nach anschließender Stabilisierung des vom DatLab errechneten Sauerstoffverbrauchs das Hyp1 in einer Zielkonzentration von 1  $\mu$ M bzw. die Trägersubstanz 1,6 % (v/v) DMSO in PBS direkt zu den Kammern zugegeben. Anschließend erfolgt die Messung der mitochondrialen Atmung nach Zugabe verschiedener Substrate, Inhibitoren und Entkoppler. Alle Zugaben erfolgen manuell mittels Mikroliterspritzen von Hamilton.

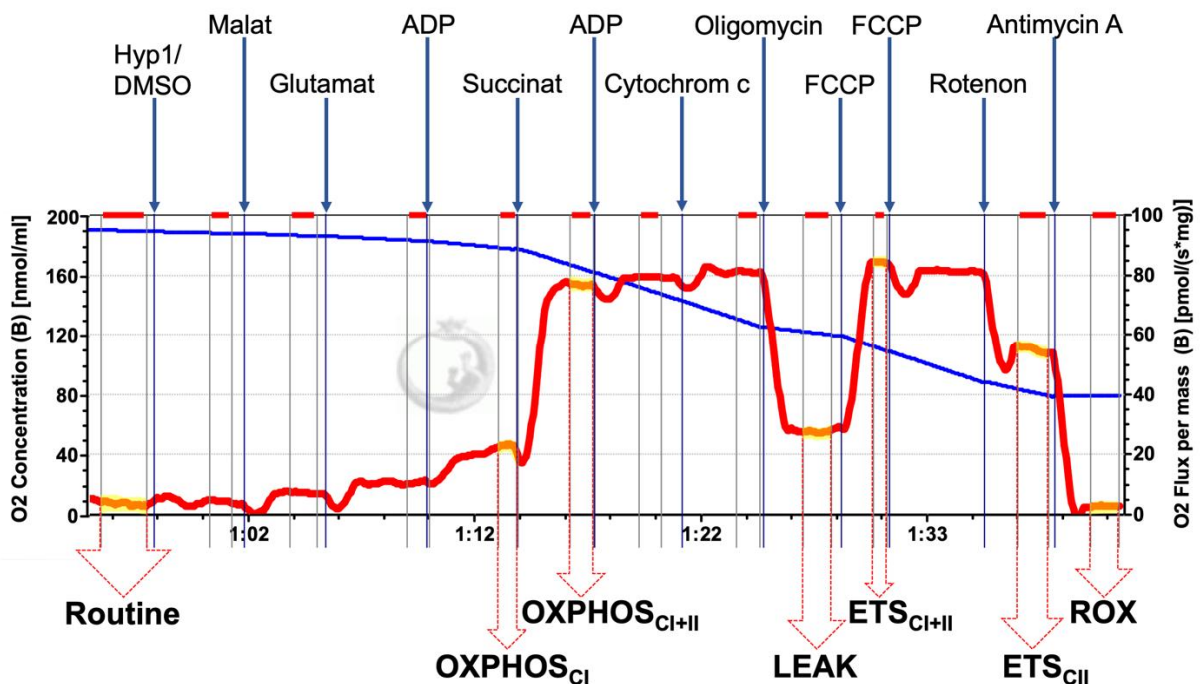
	Agens	Zielkonzentration
1	Malat	2 mM
2	Glutamat	10 mM
(3	Digitonin	1 $\mu$ M)
4	ADP	2 mM
5	Succinat	10 mM
6	ADP	2 mM
7	Cytochrom c	4 mM
8	Oligomycin	5 mM
9	FCCP	0,25 $\mu$ M (wiederholt)
10	Rotenon	0,5 mM
11	Antimycin A	2,5 $\mu$ M

Tabelle 19: SUIT-Protokoll

Die Agenzien werden jeweils nach Erreichen stabiler Werte für den aktuellen Sauerstoffverbrauch hinzugefügt. Die Verwendung von Digitonin erfolgt in der vorliegenden Arbeit nur bei der respirometrischen Untersuchung von Zellkulturen, nicht bei der Untersuchung der Hirnhomogenisate. Im ersten Falle wird Digitonin zugefügt und eine Zeit von 30 min zur vollständigen Permeabilisation der Plasmamembranen abgewartet. Am Ende des SUIT-Protokolls steht die Zugabe von Antimycin A, einem Inhibitor des CIII der Atmungskette, der die mitochondriale Atmung nahezu komplett unterbindet und den Atmungsstatus *Residual oxygen consumption* (ROX) bedingt. Dieser beschreibt den verbleibenden Sauerstoffverbrauch durch nicht-mitochondriale Atmung abseits des ETS. Die Zugabe von Cytochrom c dient der Überprüfung der Integrität der äußeren Mitochondrienmembran. Bei hoher Integrität kommt es zu keiner oder nur geringer Steigerung des aktuellen Sauerstoffverbrauchs. Bei Beeinträchtigung der Integrität der äußeren Membran kommt es jedoch zur Freisetzung von Cytochrom c ins Zytoplasma, was zu einer Funktionsstörung der mitochondrialen Atmungskette führt, die sich als Verringerung des aktuellen Sauerstoffverbrauchs darstellt. Von außen zugegebenes Cytochrom c, welches bei erhaltener Integrität nicht durch die äußere Mitochondrienmembran diffundieren kann, führt im Fall der Beeinträchtigung zu einem deutlichen Anstieg des momentanen Sauerstoffverbrauchs. Je nach Art der verwendeten Zellen bzw. der verwendeten Gewebe sowie deren Aufbereitung kann der durchschnittliche Anstieg im Rahmen der Cytochrom c-Zugabe deutlich variieren (229-231). Aufgrund eigener Erfahrungen unserer Forschungsgruppe werden dementsprechend bei der Untersuchung der HEK-293-Zellen Anstiege von maximal 5 % gegenüber der Atmungsaktivität nach der zweiten ADP-Zugabe akzeptiert, bei SIM-A9-Zellen, wo grundsätzlich höhere Werte beobachtet werden, von maximal 15 % und bei Hirnhomogenisaten Anstiege von maximal 25 %. Bei Überschreitung dieser Grenzwerte werden die Experimente nicht in die Auswertung aufgenommen.

### 3.2.5.3 Atmungsstatus, Flux Control Ratios und OXPHOS-Kopplungseffizienz

Alle Werte für die Darstellung der Atmungsstatus werden der Software DatLab entnommen. Die Darstellung der absoluten Werte der mitochondrialen Atmung erfolgt als Sauerstoffverbrauch in  $\text{pmol O}_2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{Million Zellen}^{-1}$  bzw.  $\text{pmol O}_2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{mg Hirngewebe}^{-1}$ . Hierbei handelt es sich um errechnete Mittelwerte manuell markierter stabiler Bereiche des aktuellen Sauerstoffverbrauchs.



**Abbildung 8: Darstellung der respiratorischen Messung**

Beispielhafter Ausschnitt eines Graphen einer respiratorischen Analyse murinen Hirnhomogenisats nach hier verwendetem SUIT-Protokoll (Titration entsprechend der Erklärung der blauen Pfeile und Tabelle 19; die Analyse von Zellkulturen beinhaltet zusätzlich die Gabe von Digitonin nach der Titration von Glutamat); blaue Linie: absolute Sauerstoffkonzentration innerhalb der Kammer des Respirometers [ $\text{nmol O}_2 \cdot \text{ml}^{-1}$ ]; rote Linie: errechneter Sauerstoffverbrauch (=  $\text{O}_2$ -Flux) [ $\text{pmol O}_2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{mg Hirngewebe}^{-1}$ ]; gelb markierte Bereiche: ausgewählte stabile Bereiche zur Berechnung der definierten Atmungsstatus (rote Pfeile); alle zur weiteren Verwendung berechneten Werte entstehen durch Subtraktion des Wertes für ROX von den Sauerstoffverbrauchswerten der übrigen Atmungsstatus (modifizierter repräsentativer Ausschnitt, DatLab Version 7.4, Oroboros Instruments).

Alle Werte werden in der Folge gegen ROX korrigiert. Folgende Atmungsstatus werden betrachtet.

**ROUTINE:** ROUTINE beschreibt den physiologischen Atmungsstatus der lebenden Zellen innerhalb der geschlossenen Kammern ohne die zusätzliche Zugabe weiterer Substrate oder Inhibitoren der Atmungskette.

**OXPHOS<sub>Ci</sub>:** Dieser Atmungsstatus wird gemessen nach der Zugabe der Substrate Malat und Glutamat, die über Zwischenschritte über die Entstehung von  $\text{NADH} + \text{H}^+$  zur verstärkten Aktivierung des CI führen. Die Messung dieses Atmungsstatus erfolgt nach einer Aufsättigung des Systems mit ADP, dem Substrat der ATP-Synthase.

**OXPHOS<sub>Ci+II</sub>:** Zur Bestimmung der OXPHOS<sub>Ci+II</sub>-Kapazität wird Succinat als Substrat des CII zugefügt.

LEAK: Die Gabe von Oligomycin als Inhibitor der ATP-Synthase führt zu einem mitochondrialen Sauerstoffverbrauch ohne resultierende ATP-Produktion, der bedingt ist durch Protonen-Lecks und -*Slips* (siehe 2.2.4.2 Mitochondriale Dysfunktion und oxidativer Stress).

ETS<sub>CI+II</sub>: Dieser Atmungszustand, induziert durch das aufgrund seiner protonophoren Eigenschaften als Entkoppler wirkende FCCP, quantifiziert die Effektivität des ETS ohne dessen Begrenzung durch die Phosphorylierung von ADP. Dies wird erreicht durch die Möglichkeit des „Abflusses“ der Protonen des Intermembranraums ins Zellinnere. FCCP wird dabei wiederholt hinzugegeben, bis es zu keiner weiteren Steigerung des Sauerstoffverbrauchs kommt.

ETS<sub>CI</sub>: Durch Inhibition des CI mittels Rotenon kann die Kapazität des ETS, die dann ausschließlich durch CII bedingt ist, betrachtet werden.

Zum Zweck der internen Normalisierung und zur Unterscheidung zwischen mitochondrialer Qualität von mitochondrialer Dichte dienen die *Flux Control Ratios* (FCRs). In der vorliegenden Arbeit erfolgt daher die Normalisierung aller Atmungsstatus zum Status des höchsten Sauerstoffverbrauchs des Protokolls, dem ETS<sub>CI+II</sub>. Die OXPHOS-Kopplungseffizienz ist beschrieben durch die Formel  $1 - (LEAK / OXPHOS_{CI+II})$  und veranschaulicht den Grad der Kopplung des Systems, indem es einen Hinweis auf den Anteil des phosphorylierenden Systems am detektierten Sauerstoffverbrauch in Bezug auf den Gesamtsauerstoffverbrauch gibt. Dabei beschreibt ein Wert von 1 ein vollständig gekoppeltes System, ein Wert von 0 ein vollständig von der Phosphorylierung entkoppeltes System. In der vorliegenden Arbeit treten aufgrund von Schwankungen des momentanen Sauerstoffverbrauchs abweichend von der Definition teilweise negative Werte der OXPHOS-Kopplungseffizienz auf. Diese sind als Hinweis auf ein vollständig entkoppeltes System zu interpretieren.

### **3.2.6 ROS-Assay**

Zur Quantifizierung der Entstehung von ROS in HEK-293-Zellen wird das *Cellular Reactive Oxygen Species Detection Assay Kit* von Abcam herangezogen. Die HEK-293-Zellkultur wird nach mindestens einmaligem Passagieren für die Untersuchung der ROS genutzt. Die *wells* einer schwarzen 96-*well*-Platte mit transparentem Boden werden mit 100 µl Poly-D-Lysin (PDL) in einer Konzentration von 0,1 mg / ml befüllt, das der Anhaftung der adhärenen HEK-293-Zellen dient. Nach einer Inkubationszeit von 2 h bei 37 °C wird die PDL-Lösung entfernt und die *wells* zweimal mit 100 µl H<sub>2</sub>O / *well* gewaschen. Anschließend werden die benötigten *wells* der 96-*well*-Platte mit jeweils 10.000 Zellen in 200 µl DMEM / 10 % FCS / 1% Penicillin / Streptomycin bestückt. Es folgt eine Inkubation der 96-*well*-Platte über Nacht bei 37 °C. Am nächsten Tag werden 100 µl des Mediums abgenommen. Der Zugabe von 100 µl einer laut Herstellerprotokoll vorbereiteten

Mischung aus ROS Red Stock-Lösung und ROS Assay Puffer in einer Konzentration von 1:500 pro *well* folgt eine Inkubationszeit von 1 h bei 37 °C. Anschließend werden den Zellen entsprechende Mengen der Reagenzien FCCP oder Hyp1 hinzugegeben, um Endkonzentrationen von 1 µM und 10 µM für Hyp1 bzw. 100 nM und 1 µM für FCCP in den *wells* zu erreichen. Zusätzlich werden zur Kontrolle *wells* mit 1,66 % (v/v) DMSO in PBS bestückt, entsprechend dem Volumen der Hyp1- bzw. FCCP-Lösungen. Jeweils der Hälfte der Proben wird die Menge H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in einer PBS-Lösung zugegeben, die eine Endkonzentration von 1 mM pro *well* bedingt, der anderen Hälfte das gleiche Volumen der reinen PBS-Lösung. Alle Konditionen werden im dreifachen Ansatz untersucht. Weiterhin werden drei *wells* ohne Zellen nur mit 100 µl Medium, 100 µl der ROS Red Stock-Lösung in Assay Puffer und der den Kontrollen entsprechenden Menge 1,66 % (v/v) DMSO in PBS bestückt, die die Absorption des leeren *wells* darstellen. Nach einer zweistündigen Inkubation bei 37 °C erfolgt die Detektion der Fluoreszenz mittels des Detektionssystems GloMax®-Multi+. Gemessen wird die Emission (Em) bei einer Wellenlänge von 580 – 640 nm bei einer Exzitation (Ex) von 525 nm. Die errechneten Werte sind relative Verhältnisse aus Emission und Exzitation und werden folglich angegeben als *Relative Fluorescence Units* (RFU). Im Rahmen der Auswertung werden alle Einzelwerte gegen den Mittelwert der Leermessungen korrigiert.

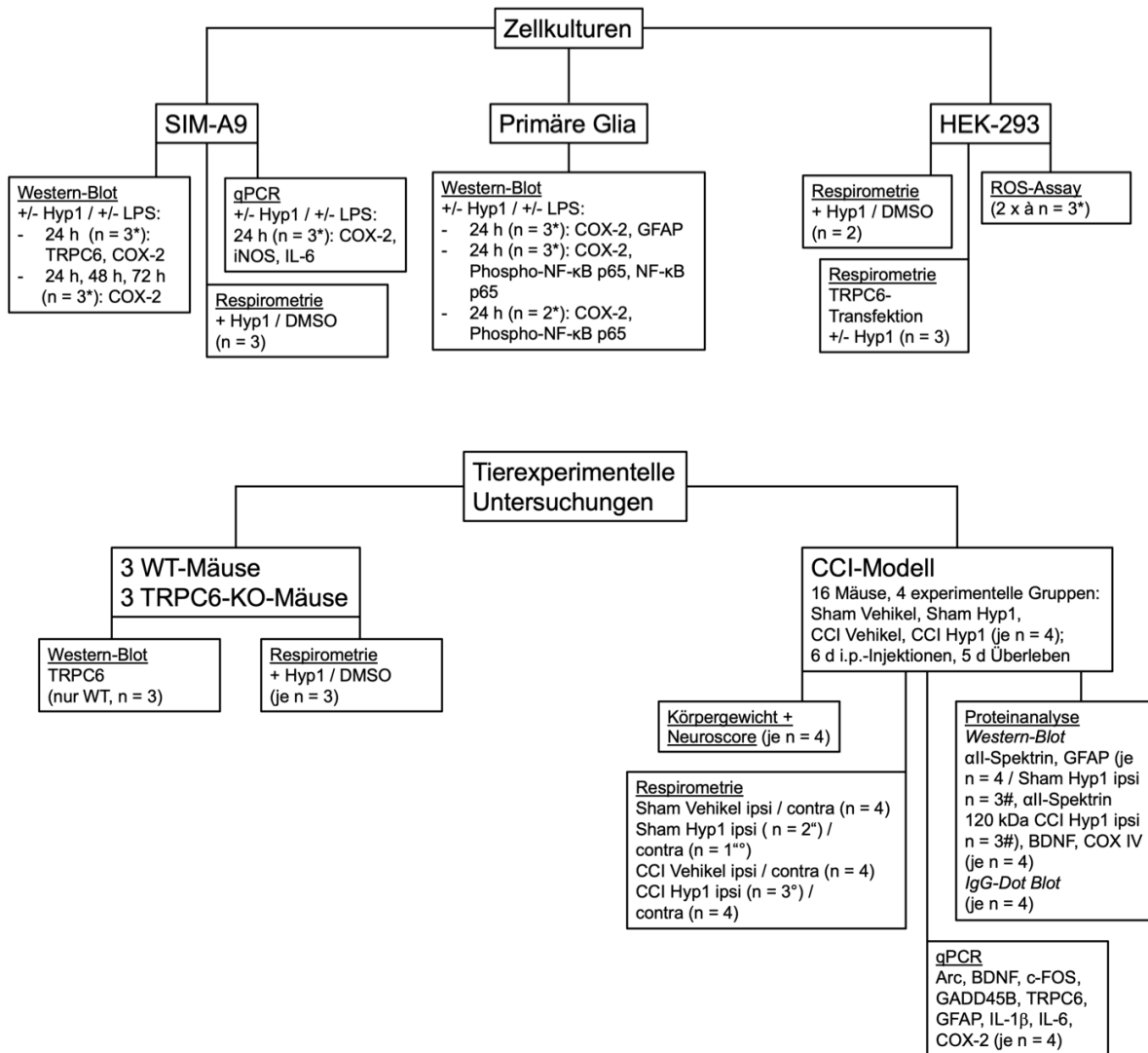
### 3.2.7 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung und graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgt mithilfe der Software GraphPad Prism 8.1.0 für Windows. Die Daten der Experimente werden mittels des Rout-Testes bei festgelegtem Q = 1 % auf Ausreißer untersucht. Es folgt eine Testung auf Normalverteilung mittels des Shapiro-Wilk-Tests zu einem Signifikanzlevel von  $\alpha = 5\%$ . Bei fehlender Normalverteilung im Shapiro-Wilk-Test wird zusätzlich der QQ-Plot des entsprechenden Datensets zur Beurteilung der Normalverteilung herangezogen. Bei normalverteilten Daten wird anschließend ein *Student's t-Test* zum Vergleich zweier Konditionen bzw. eine einfaktorielles Varianzanalyse (*one-way Analysis of Variance* (ANOVA)) zum Vergleich mehrerer Konditionen durchgeführt. Zur Untersuchung der Daten der Respirometrie der SIM-A9-Zellen sowie der Hirnhomogenisate unter Zugabe von Hyp1 oder der Trägerlösung werden gepaarte t-Tests verwendet. In den übrigen Fällen erfolgt die Testung unter Verwendung ungepaarter t-Tests bzw. ungepaarter *one-way* ANOVAs. Nach der Verwendung einer *one-way* ANOVA folgt die Post-hoc-Testung mittels des Holm-Šídák-Tests. Im Fall nicht normalverteilter Daten wird zum Vergleich zweier Gruppen der Mann-Whitney-Test herangezogen, ab drei Gruppen wird der Kruskal-Wallis-Test verwendet, gefolgt von der Post-hoc-Analyse mittels Dunn-Test. Die statistische Analyse der Gewichtsentwicklung und der Beurteilung des neurologischen Status erfolgt mittels

zweifaktorieller Varianzanalyse *two-way* ANOVA gefolgt von der Post-hoc-Testung nach Holm-Šídák. Wenn nicht anders erwähnt, erfolgt bei der statistischen Analyse durch ANOVA oder Kruskal-Wallis der Mittelwertvergleich aller Gruppen. Das Signifikanzniveau ist bei allen verwendeten Testarten auf  $\alpha = 5\%$  festgesetzt. Dementsprechend werden alle Werte mit  $p < 0,05$  als statistisch signifikant bewertet. Für die numerische und grafische Darstellung der Ergebnisse wird im Folgenden der Mittelwert herangezogen, die Fehlerbalken zeigen grafisch den Standardfehler (SEM). Unterschiedliche Signifikanzniveaus werden, falls nicht anders erwähnt, wie folgt dargestellt:  $p < 0,05$  entspricht \*,  $p < 0,01$  entspricht \*\*,  $p < 0,001$  entspricht \*\*\*,  $p < 0,0001$  entspricht \*\*\*\*.

### 3.2.8 Gesamtübersicht über die durchgeführten Experimente

Zum besseren Verständnis werden nachfolgend alle durchgeführten Experimente schematisch dargestellt.



**Abbildung 9: Gesamtübersicht über durchgeführte Experimente**

Schematische Darstellung aller durchgeführten Versuche in Zellkulturen und der tierexperimentellen Untersuchungen; \* technische Wiederholungen, \*\* Ausfall aufgrund technischer Probleme des Respirometers, ° Ausfall aufgrund des Cytochrom c-Tests, # Ausfall aufgrund fehlender Auslesbarkeit der Banden im Western Blot

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Hyp1-Effekte in Zellkulturen

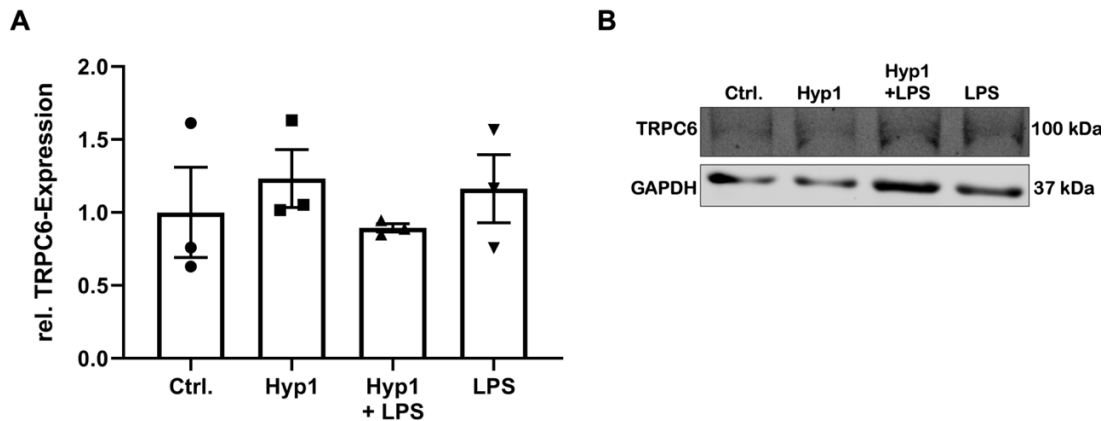
#### 4.1.1 Proteinanalyse

Durch die gezielte Zugabe bestimmter Substanzen zu Zellkulturen und die nachfolgende Inkubation ist es möglich, das Induktionsverhalten der Proteinexpression innerhalb der Zellkulturen zu beeinflussen. Das Bakterientoxin LPS verändert bekanntlich die zelluläre Expression einer Reihe proinflammatorischer Zytokine, Proteine und Enzyme (113, 114). Ziel der folgenden Experimente ist die Darstellung eines möglichen Einflusses von Hyp1 auf die Expression des TRPC6 sowie einiger proinflammatorischer Marker. Hierzu wird die Proteinexpression in verschiedenen Zellkulturen nach Stimulation mit Hyp1, mit LPS oder nach kombinierter Stimulation (Hyp1+LPS) bzw. ohne jegliche Stimulation als Kontrollkondition (Ctrl.) betrachtet. Falls nicht anders erwähnt, wird pro Experiment eine Anzahl von 3 technischen Wiederholungen ( $n = 3$ ) zur Beurteilung herangezogen. Dargestellt ist jeweils die relative Proteinexpression, normalisiert zum Referenzprotein GAPDH und relativ zu Ctrl. als Mittelwerte  $\pm$  SEM. Die statistische Analyse erfolgt, falls nicht anders erwähnt, mittels Vergleiches aller Gruppen untereinander durch *one-way* ANOVA.

Bei einer geringen Anzahl an bzw. fehlenden biologischen Wiederholungen der Experimente in diesem Abschnitt sollen die folgenden statistischen Analysen als deskriptiv verstanden werden, weshalb die dargestellten Signifikanzniveaus und *p*-Wert-Angaben ebenso als deskriptiv anzusehen sind.

Die Analyse der Expression von TRPC6 in SIM-A9-Mikroglia zeigt 24 h nach der Behandlung der Zellen mit Hyp1 ( $1,23 \pm 0,20$ ), Hyp1+LPS ( $0,89 \pm 0,03$ ), LPS ( $1,16 \pm 0,23$ ) im Vergleich zur Kontrollkondition ( $1,00 \pm 0,31$ ) in der Proteinanalyse keine offensichtlichen Unterschiede. Dies deutet dementsprechend darauf hin, dass weder Hyp1 noch LPS einen Einfluss auf die TRPC6-Expression in SIM-A9-Mikroglia-kulturen haben.



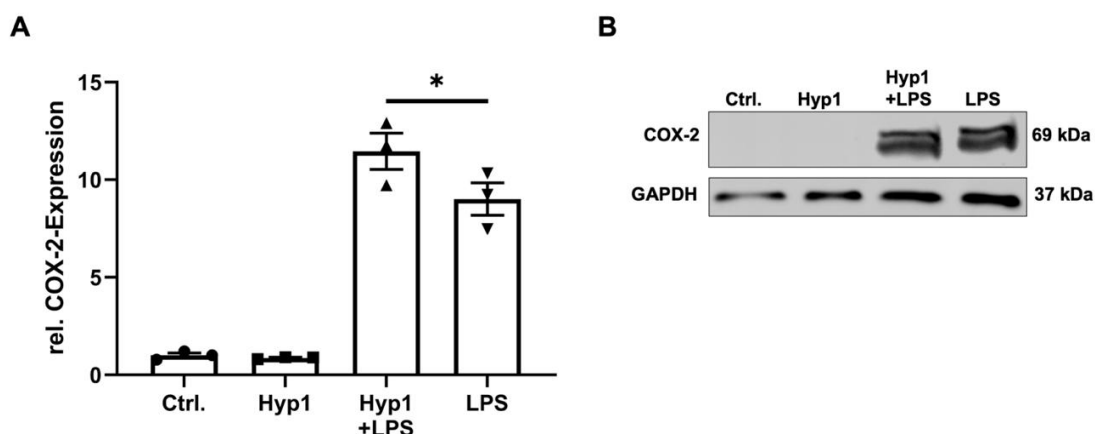


**Abbildung 10: TRPC6-Expression in SIM-A9-Mikroglia (24 h)**

**A** Quantifizierung der relativen (rel.) Proteinbandenintensitäten von TRPC6 24 h nach Stimulation mit Hyp1 und/oder LPS, normalisiert zum Referenzprotein GAPDH, relativ zur Kontrollkondition (Ctrl.), pro Gruppe n = 3, Mittelwerte ± SEM, *one-way* ANOVA, Korrektur nach Holm-Šidák

**B** Repräsentativer Ausschnitt des Western Blots mit TRPC6 und dem Referenzprotein GAPDH 24 h nach Behandlung mit Hyp1 und/oder LPS

Durch die Bestimmung der Proteinexpression des Enzyms COX-2 können Rückschlüsse auf die Entzündungsaktivität der SIM-A9-Mikroglia gezogen werden (232). Es kann nach 24 h jeweils eine deutliche Induktion von COX-2 nach Zugabe von LPS beobachtet werden (jeweils  $p < 0,001$ ). Die alleinige Hyp1-Behandlung ( $0,87 \pm 0,03$ ) führt zu keiner Steigerung gegenüber der Kontrollkondition ( $1,00 \pm 0,12$ ). Die gleichzeitige Behandlung der Zellen mit Hyp1 + LPS führt zu einer Erhöhung der COX-2 Expression um ca. 27 % gegenüber den ausschließlich mit LPS stimulierten SIM-A9-Mikroglia ( $11,46 \pm 0,93$  versus (vs.)  $9,01 \pm 0,83$ ,  $p = 0,0488$ ).

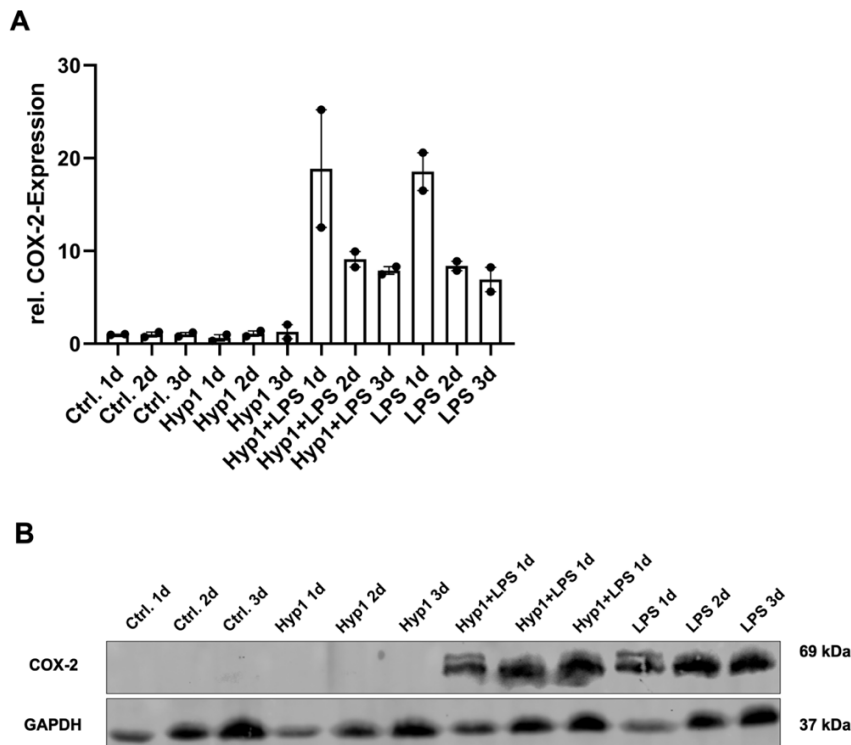


**Abbildung 11: COX-2-Expression in SIM-A9-Mikroglia (24 h)**

**A** Quantifizierung der Proteinbandenintensitäten von COX-2 24 h nach Stimulation mit Hyp1 und/oder LPS, normalisiert zum Referenzprotein GAPDH, relativ zur Kontrollkondition (Ctrl.), pro Gruppe n = 3, Mittelwerte ± SEM, *one-way* ANOVA, Korrektur nach Holm-Šidák, \*  $p < 0,05$ , signifikante Unterschiede zwischen den Konditionen +/- LPS werden nicht dargestellt.

**B** Repräsentativer Ausschnitt des Western Blots mit COX-2 und GAPDH 24 h nach Behandlung mit Hyp1 und/oder LPS

In einer Zeitreihe von jeweils 24 h, 48 h und 72 h Behandlungszeit mit den Agenzien Hyp1 und LPS zeigen sich bzgl. der COX-2-Expression der SIM-A9-Zellen teils sichtbare Unterschiede. Die höchste COX-2-Expression ist nach 24-stündiger Stimulation mit LPS feststellbar, die bereits nach 48 h deutlich abgefallen ist, um dann nahezu konstant zu bleiben. Hier werden pro Kondition zwei technische Wiederholungen betrachtet, weshalb auf eine statistische Auswertung verzichtet wird.



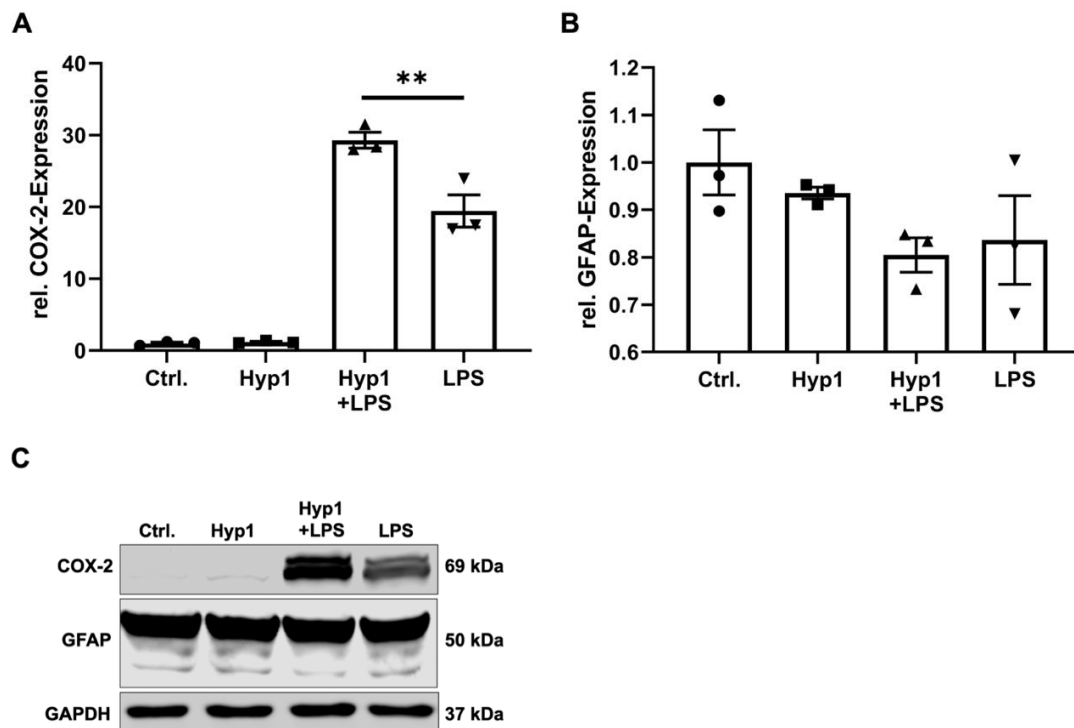
**Abbildung 12: COX-2-Expression in SIM-A9-Mikroglia (24 h, 48 h, 72 h)**

**A** Quantifizierung der Proteinbandenintensitäten von COX-2 24 h (1d), 48 h (2d) und 72 h (3d) nach Stimulation mit Hyp1 und/oder LPS, normalisiert zum Referenzprotein GAPDH, relativ zur entsprechenden Kontrollkondition (Ctrl. 1d, Ctrl. 2d, Ctrl. 3d), pro Gruppe  $n = 2$ , Mittelwerte  $\pm$  SEM, Kruskal-Wallis-Test, Korrektur nach Dunn

**B** Repräsentativer Ausschnitt des Western Blots mit COX-2 und dem Referenzprotein GAPDH 24 h (1d), 48 h (2d) und 72 h (3d) nach Behandlung mit Hyp1 und/oder LPS

In einem nächsten Schritt wird der Einfluss von Hyp1 auf die COX-2-Proteinexpression in einer gemischten primären Gliazellkultur untersucht. Hierbei zeigt sich ebenfalls eine Induktion der COX-2-Expression durch LPS (LPS:  $19,44 \pm 2,26$ ; Hyp1+LPS:  $29,30 \pm 1,92$ ) gegenüber der Kontrollkondition und der alleinigen Hyp1-Behandlung (Ctrl.:  $1,00 \pm 0,15$ ; Hyp1:  $1,18 \pm 0,10$ ; jeweils  $p < 0,0001$ ). Darüber hinaus bewirkt Hyp1 in LPS-stimulierten Zellen eine sichtbare Erhöhung der COX-2-Proteinexpression (Erhöhung um etwa 51%,  $p = 0,0011$ ).

Dagegen weist die GFAP-Expression, ein Marker für die Aktivität von Astrozyten, keine offensichtlichen Veränderungen zwischen den verschiedenen Konditionen auf (Ctrl.:  $1,00 \pm 0,07$ , Hyp1:  $0,94 \pm 0,01$ , Hyp1+LPS:  $0,80 \pm 0,04$ , LPS:  $0,84 \pm 0,09$ ).



**Abbildung 13: COX-2- und GFAP-Expression in einer primären Gliazellkultur (24 h)**

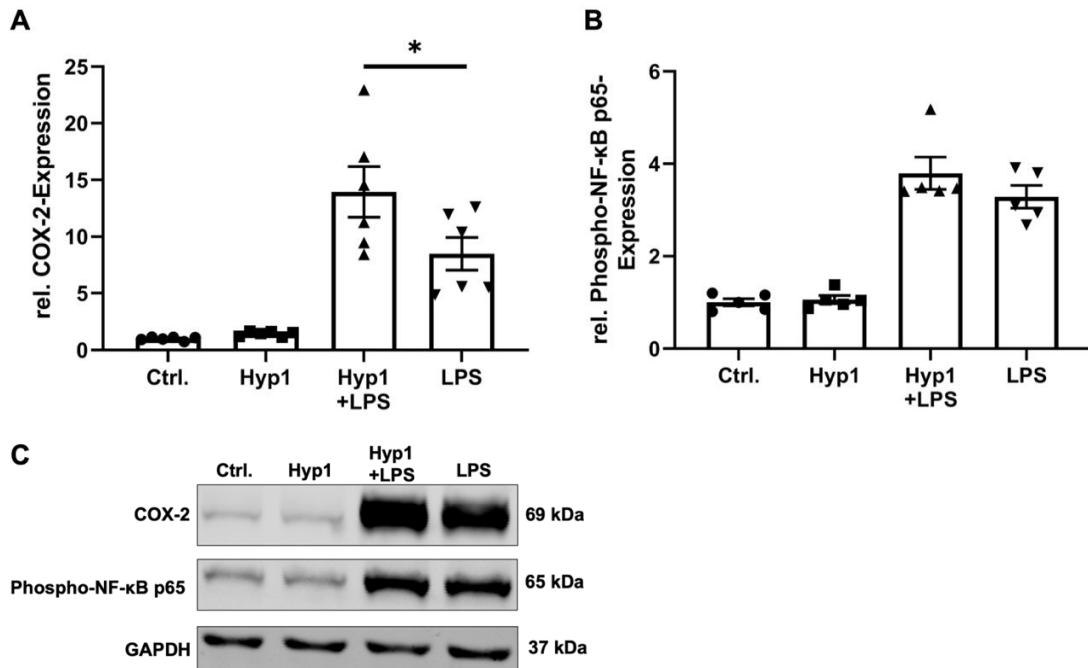
**A** Quantifizierung der Proteinbandenintensitäten von COX-2 24 h nach Stimulation mit Hyp1 und/oder LPS, normalisiert zum Referenzprotein GAPDH, relativ zur Kontrollkondition (Ctrl.), pro Gruppe n = 3, Mittelwerte  $\pm$  SEM, *one-way* ANOVA, Korrektur nach Holm-Šídák, \*\*  $p < 0,01$ , signifikante Unterschiede zwischen den Konditionen +/-LPS werden nicht dargestellt.

**B** Quantifizierung der Proteinbandenintensitäten von GFAP 24 h nach Stimulation mit Hyp1 und/oder LPS, normalisiert zum Referenzprotein GAPDH, relativ zur Kontrollkondition (Ctrl.), pro Gruppe n = 3, Mittelwerte  $\pm$  SEM, *one-way* ANOVA, Korrektur nach Holm-Šídák

**C** Repräsentativer Ausschnitt des Western Blots mit COX-2 und GFAP sowie dem Referenzprotein GAPDH 24 h nach Behandlung mit Hyp1 und/oder LPS

Zur Bestätigung dieser Ergebnisse werden in zwei Wiederholungen (n = 3 und n = 2) ebenfalls die relativen COX-2-Expressionslevel in primären Gliazellkulturen analysiert. Die Ergebnisse dieser Experimente werden im Folgenden zusammengefügt dargestellt. Auch hier führt die LPS-Stimulation zu einem Anstieg der COX-2-Expression gegenüber der Kontrolle ( $1,00 \pm 0,16$ ) und der alleinigen Hyp1-Behandlung ( $1,43 \pm 0,09$ , jeweils  $p < 0,0001$ ). Ebenso bewirkt Hyp1 eine Erhöhung der relativen COX-2-Expression um ca. 65 % in LPS-stimulierten primären Gliazellen (Hyp1+LPS:  $13,95 \pm 2,23$ , LPS  $8,48 \pm 1,45$ ;  $p = 0,0174$ ).

Weiterhin wird im Rahmen dieser Western Blots die Expression der phosphorylierten Untereinheit p65 des Proteins NF- $\kappa$ B (Phospho-NF- $\kappa$ B p65) detektiert, das als Transkriptionsfaktor die Genexpression vieler Proteine, die an Entzündungsprozessen beteiligt sind, beeinflusst (116, 233). Die Expression wird durch die Stimulation mit LPS jeweils gegenüber der Kontrollkondition ( $1,00 \pm 0,08$ ) und der alleinigen Hyp1-Behandlung ( $1,06 \pm 0,09$ ) gesteigert (jeweils  $p < 0,0001$ ). Hyp1 bewirkt dagegen in LPS-stimulierten primären Gliazellkulturen keinen klaren Unterschied bzgl. der Phospho-NF- $\kappa$ B p65-Expression ( $p = 0,7086$ ).



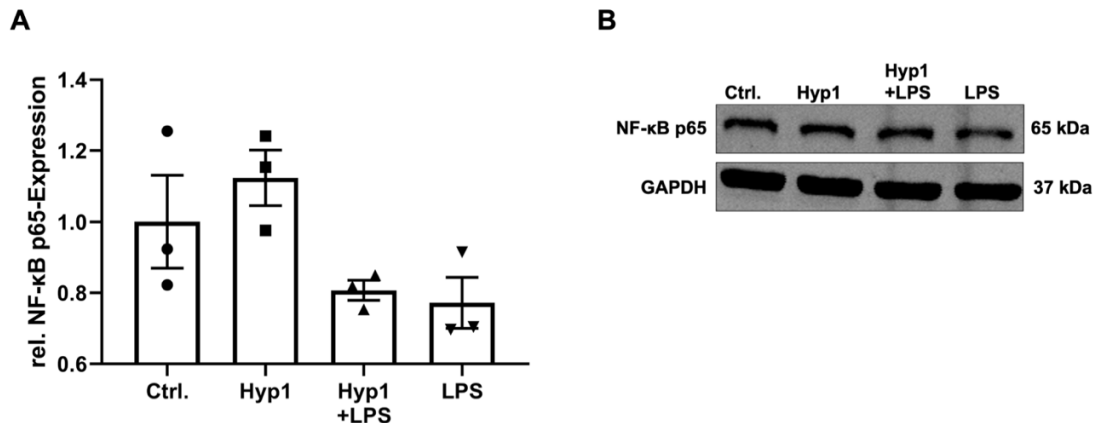
**Abbildung 14: COX-2- und Phospho-NF-κB p65-Expression in primären Gliazellen (24 h)**

**A** Quantifizierung der Proteinbandenintensitäten von COX-2 24 h nach Stimulation mit Hyp1 und/oder LPS, normalisiert zum Referenzprotein GAPDH, relativ zur Kontrollkondition (Ctrl.), pro Gruppe n = 5 in 2 Experimenten mit n = 2 bzw. n = 3, Mittelwerte ± SEM, *one-way* ANOVA, Korrektur nach Holm-Šidák, \* p < 0,05, signifikante Unterschiede zwischen den Konditionen +/-LPS werden nicht dargestellt.

**B** Quantifizierung der Proteinbandenintensitäten von Phospho-NF-κB p65 24 h nach Stimulation mit Hyp1 und/oder LPS, normalisiert zum Referenzprotein GAPDH, relativ zur Kontrollkondition (Ctrl.), pro Gruppe n = 5 in 2 Experimenten mit n = 2 bzw. n = 3, Mittelwerte ± SEM, *one-way* ANOVA, Korrektur nach Holm-Šidák, signifikante Unterschiede zwischen den Konditionen +/-LPS werden nicht dargestellt.

**C** Repräsentativer Ausschnitt des Western Blots COX-2, Phospho-NF-κB p65 und dem Referenzprotein GAPDH 24 h nach Behandlung mit Hyp1 und/oder LPS

Zudem erfolgt innerhalb der ersten dieser beiden Wiederholungen (n = 3) die Analyse des insgesamt in der primären Gliazellkultur exprimierten NF-κB p65, ungeachtet des Phosphorylierungs- und damit des Aktivitätszustandes. Hier ergeben sich keine offensichtlichen Unterschiede zwischen der Kontrollkondition (1,00 ± 0,13), der Behandlung mit Hyp1 (1,12 ± 0,08), der Behandlung mit Hyp1+LPS (0,81 ± 0,03) und der reinen LPS-Behandlung (0,77 ± 0,07).



**Abbildung 15: NF-κB p65-Expression in primären Gliazellen (24 h)**

**A** Quantifizierung der Proteinbandenintensitäten von NF-κB p65 24 h nach Stimulation mit Hyp1 und/oder LPS, normalisiert zum Referenzprotein GAPDH, relativ zur Kontrollkondition (Ctrl.), pro Gruppe n = 3, Mittelwerte ± SEM, *one-way* ANOVA, Korrektur nach Holm-Šidák

**B** Repräsentativer Ausschnitt des Western Blots mit NF-κB p65 und dem Referenzprotein GAPDH 24 h nach Behandlung mit Hyp1 und/oder LPS

#### 4.1.2 Molekularbiologische Analyse

Analog zur im Vorabschnitt beschriebenen Proteinexpressionsanalyse in einer SIM-A9-Gliazellkultur erfolgt die Analyse eines möglichen Einflusses von Hyp1 auf die Genexpression der proinflammatorischen Enzyme COX-2, iNOS und des Interleukins IL-6 sowie des Kationenkanals TRPC6 nach 24-stündiger Inkubation eines Teils der SIM-A9-Zellen mit Hyp1 und/oder dem Bakterientoxin LPS zur Induktion einer Inflammationsreaktion. Die Quantifizierung der Genexpression ist dargestellt als relative mRNA-Expression, normalisiert zum Referenzprotein PPIA als Mittelwerte ± SEM. Jedes Experiment umfasst pro Kondition eine Anzahl dreier technischer Replikate (n = 3). Es handelt sich daher auch hier um deskriptive Analysen. Die angegebenen Signifikanzniveaus und *p*-Werte sind ebenso als deskriptiv zu verstehen.

##### COX-2

In der Quantifizierung der Expression von COX-2 zeigen sich klare Unterschiede durch die Stimulation mit LPS (Hyp1+LPS:  $0,066 \pm 0,002$ , LPS:  $0,069 \pm 0,003$ ) gegenüber der Kontrollkondition ( $0,011 \pm 0,002$ ) und der alleinigen Hyp1-Zugabe ( $0,010 \pm 0,001$ ; jeweils  $p < 0,0001$ ). Hyp1 führt dagegen nicht zu nachweisbaren Veränderungen der Genexpressionslevel des COX-2 nach 24 h.

##### iNOS

Die LPS-Stimulation bewirkt eine Steigerung der iNOS-Genexpression, während die Hyp1-Behandlung nicht zu Veränderungen führt. Aufgrund fehlender Normalverteilung erfolgt die Analyse der iNOS-mRNA-Expressionslevel mittels des Kruskal-Wallis-Tests. Die Hyp1-

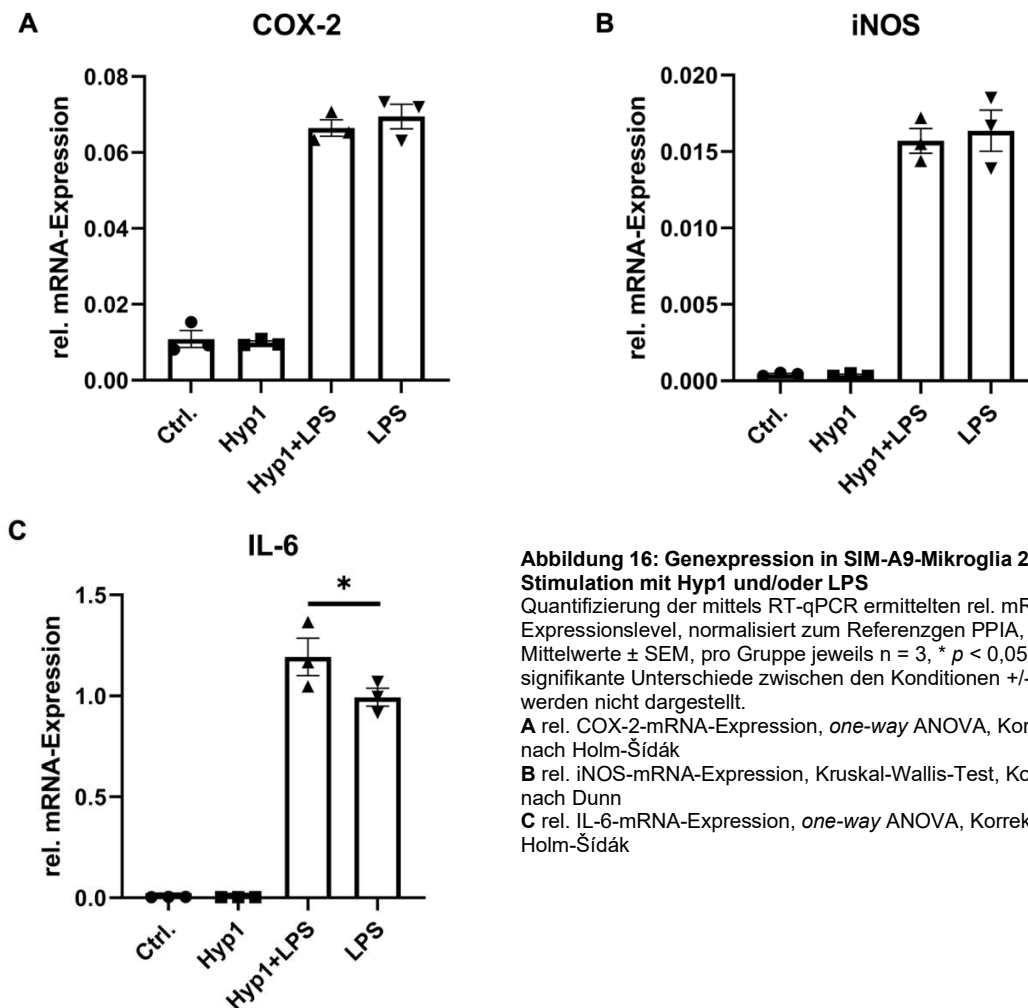
Behandlung bewirkt keine offensichtlichen Unterschiede zwischen den Gruppen (Ctrl.:  $0,000 \pm 0,000$ , Hyp1:  $0,000 \pm 0,000$ , Hyp1+LPS:  $0,016 \pm 0,001$ , LPS:  $0,016 \pm 0,001$ ).

### IL-6

Es zeigt sich in der statistischen Analyse ein sichtbarer Anstieg der mRNA-Expression des IL-6 unter LPS-Stimulation ( $0,994 \pm 0,044$ ) und der zusätzlichen Stimulation mit Hyp1 ( $1,193 \pm 0,093$ ) gegenüber der Kontrolle ( $0,004 \pm 0,000$ ) und der alleinigen Stimulation mit Hyp1 ( $0,003 \pm 0,000$ ). Weiterhin kommt es zu einer deutlich gesteigerten Expression des IL-6 um ca. 20 % unter zusätzlicher Hyp1-Behandlung der LPS-stimulierten Zellen ( $p = 0,0497$ ).

### TRPC6

Die quantitative Bestimmung der Genexpression des TRPC6 war in diesem Experiment aufgrund einer mRNA-Expression unterhalb der Detektionssensitivität der qPCR nicht möglich.



**Abbildung 16: Genexpression in SIM-A9-Mikroglia 24 h nach Stimulation mit Hyp1 und/oder LPS**

Quantifizierung der mittels RT-qPCR ermittelten rel. mRNA-Expressionslevel, normalisiert zum Referenzgen PPIA, Mittelwerte  $\pm$  SEM, pro Gruppe jeweils  $n = 3$ , \*  $p < 0,05$ , signifikante Unterschiede zwischen den Konditionen +/-LPS werden nicht dargestellt.

**A** rel. COX-2-mRNA-Expression, *one-way* ANOVA, Korrektur nach Holm-Šidák

**B** rel. iNOS-mRNA-Expression, Kruskal-Wallis-Test, Korrektur nach Dunn

**C** rel. IL-6-mRNA-Expression, *one-way* ANOVA, Korrektur nach Holm-Šidák

Zusammenfassend weisen die deskriptiven Untersuchungen zur Wirkung von Hyp1 während der LPS-vermittelten pro-inflammatorischen Aktivierung von SIM-A9-Mikroglia und gemischten primären Gliazellkulturen darauf hin, dass Hyp1 einen verstärkenden pro-inflammatorischen Effekt ausübt.

#### 4.1.3 Respirometrie

Zur Beurteilung eines möglichen Effektes von Hyp1 auf die mitochondriale Atmung bzw. einer möglichen Beeinflussung einzelner Komplexe der Atmungskette durch Hyp1 in Zellkulturen erfolgen respirometrische Untersuchungen unter direkter Zugabe von in DMSO gelöstem Hyp1 oder der alleinigen Zugabe des Lösungsmittels. Die in diesem Kapitel dargestellten Werte entsprechen Mittelwerten des absoluten Sauerstoffverbrauchs (in  $\text{pmol O}_2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{Million Zellen}^{-1}$ ), FCRs (Verbrauchswerte des jeweiligen Atmungsstatus relativ zu  $\text{ETS}_{\text{CI+II}}$ ; dienen der internen Normalisierung unabhängig der Mitochondriendichte) oder  $\text{OXPHOS}_{\text{CI+II}}$ -Kopplungseffizienzen ( $1 - (\text{LEAK} / \text{OXPHOS}_{\text{CI+II}})$ ) jeweils  $\pm$  SEM.

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Untersuchung der mitochondrialen Atmung von SIM-A9-Mikroglia unter der direkten Zugabe von  $1 \mu\text{M}$  Hyp1 (gelöst in DMSO) und der Kontrollkondition DMSO in die parallel operierenden Messkammern des Respirometers dargestellt ( $n = 3$ ; *Tabelle 20, Abbildung 17*).

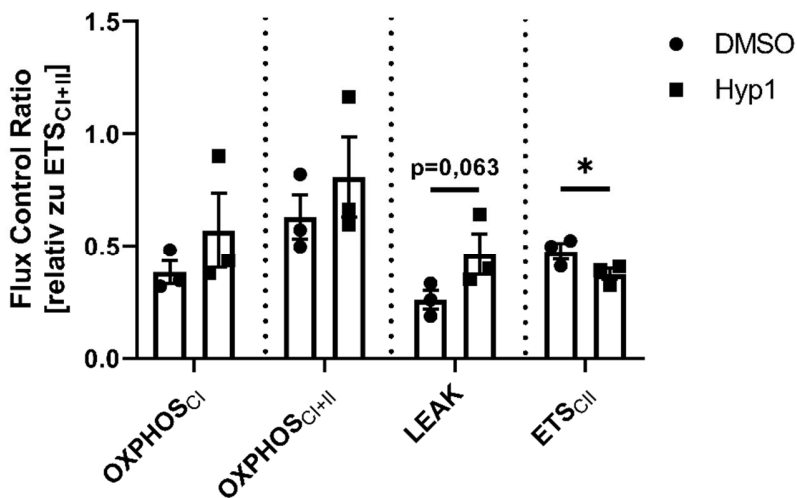
Die statistische Analyse erfolgt zwischen den beiden Konditionen pro Atmungsstatus jeweils anhand eines gepaarten t-Tests. Signifikant erhöht ist der absolute Sauerstoffverbrauch im  $\text{ETS}_{\text{CI+II}}$ -Atmungsstatus unter der Zugabe von Hyp1 (Erhöhung um ca. 24 %,  $p = 0,0087$ ). Auch im LEAK-Atmungsstatus ist eine signifikante Erhöhung der mitochondrialen Atmung in Anwesenheit von Hyp1 hinsichtlich des absoluten Sauerstoffverbrauchs zu beobachten (Erhöhung um ca. 122 %,  $p = 0,0389$ ).

Bzgl. der Werte der FCRs, der Werte des aktuellen Sauerstoffverbrauchs normalisiert zu  $\text{ETS}_{\text{CI+II}}$ , bewirkt Hyp1 eine signifikante Verminderung des  $\text{ETS}_{\text{CI}}$ -Atmungsstatus um etwa 22 % ( $p = 0,0224$ ). Bei Betrachtung der FCRs im LEAK-Atmungsstatus zeigt sich im Trend dagegen eine ca. 76 %ige Steigerung der mitochondrialen Atmung ( $p = 0,0629$ ) unter der direkten Zugabe von Hyp1 zu den SIM-A9-Zelllysaten.

	pmol O <sub>2</sub> · s <sup>-1</sup> · Million Zellen <sup>-1</sup>		Flux Control Ratio (relativ zu ETS <sub>CI+II</sub> )	
	DMSO	Hyp1	DMSO	Hyp1
OXPHOS <sub>CI</sub>	63,85 ± 8,75	117,3 ± 31,72	0,38 ± 0,05	0,57 ± 0,17
OXPHOS <sub>CI+II</sub>	104,9 ± 16,17	166,5 ± 33,74	0,63 ± 0,10	0,81 ± 0,18
LEAK	42,98 ± 6,45	95,51 ± 16,77*	0,26 ± 0,04	0,46 ± 0,16
ETS <sub>CI+II</sub>	167,1 ± 10,44	208,1 ± 11,76**		
ETS <sub>CI</sub>	79,64 ± 6,84	78,33 ± 8,52	0,48 ± 0,03	0,37 ± 0,02*

**Tabelle 20: Mitochondriale Atmungsaktivität in SIM-A9-Mikroglia unter der Zugabe von Hyp1**

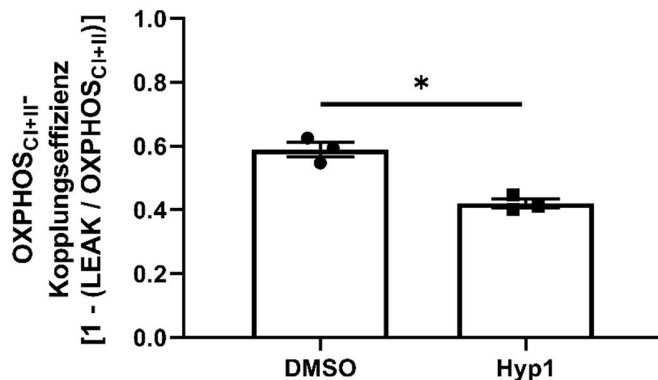
Zugabe von Hyp1 oder DMSO zu identischen SIM-A9-Zelllösungen in die Kammern A und B des Respirometers, Bestimmung der mitochondrialen Atmungsaktivität in den definierten Atmungsstatus nach Titration von Substraten, Entkopplern und Inhibitoren dem SUIT-Protokoll entsprechend, pro Gruppe n = 3, Analyse jeweils pro Atmungsstatus mittels gepaartem t-Test, \* p < 0,05, \*\* p < 0,01 links: dargestellt als absoluter Sauerstoffverbrauch in pmol O<sub>2</sub> · s<sup>-1</sup> · Million Zellen<sup>-1</sup> rechts: dargestellt als FCR, normalisiert zum Atmungsstatus ETS<sub>CI+II</sub>



**Abbildung 17: Mitochondriale Atmungsaktivität in SIM-A9-Mikroglia unter der Zugabe von Hyp1**

FCRs der definierten Atmungsstatus nach Titration von Substraten, Entkopplern und Inhibitoren entsprechend dem SUIT-Protokoll nach Zugabe von Hyp1 oder DMSO zu identischen SIM-A9-Zelllösungen in die Kammern A und B des Respirometers, pro Gruppe n = 3, Mittelwerte ± SEM, Analyse jeweils pro Atmungsstatus mittels gepaartem t-Test

Die OXPHOS<sub>CI+II</sub>-Kopplungseffizienz zur Quantifizierung der mitochondrialen Kopplung ist im Vergleich zur alleinigen DMSO-Zugabe (0,59 ± 0,02) unter Hyp1-Zugabe (0,42 ± 0,01) signifikant vermindert (um ca. 29 %, p = 0,0175).



**Abbildung 18: OXPHOS<sub>CI+II</sub>-Kopplungseffizienz in SIM-A9-Mikroglia unter der Zugabe von Hyp1**

OXPHOS<sub>CI+II</sub>-Kopplungseffizienz (1-(LEAK / OXPHOS<sub>CI+II</sub>)) nach Zugabe von Hyp1 bzw. DMSO zu identischen SIM-A9-Zelllösungen in beide Messkammern des Respirometers, pro Gruppe n = 3, gepaarter t-Test, \* p < 0,05



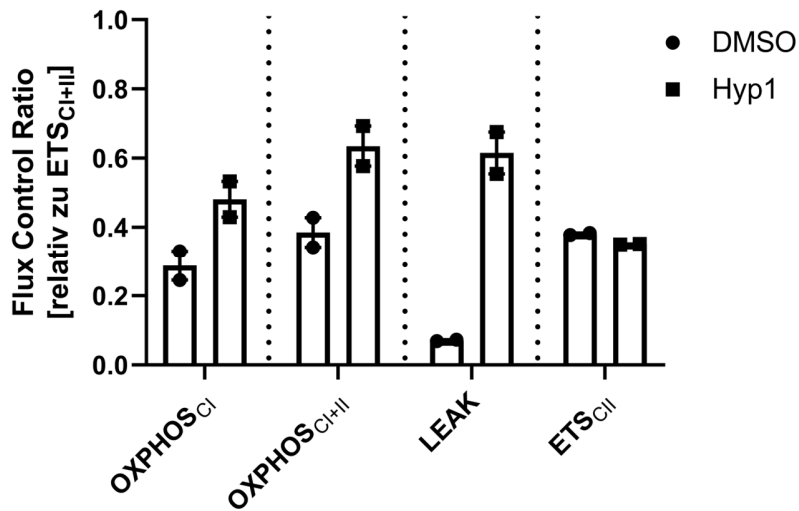
Die Ergebnisse der Respirometrie in SIM-A9-Mikroglia zeigen einen im Schnitt erhöhten Sauerstoffverbrauch in Anwesenheit von Hyp1. Auch die FCRs – insbesondere des LEAK-Atmungsstatus –, die der Nivellierung eventueller Unterschiede in der Mitochondriendichte oder Mitochondrienqualität dienen, zeigen sich unter Hyp1-Zugabe erhöht. Dies und die signifikante Verminderung der OXPHOS<sub>Cl+II</sub>-Kopplungseffizienz unter der Zugabe von Hyp1 sprechen für eine geringere Kopplung des Sauerstoffverbrauchs bzw. des durch die Atmungskette erzeugten Protonengradienten mit dem phosphorylierenden System.

Zur Evaluierung der Abhängigkeit dieser gezeigten Effekte des Hyp1 von der Expression des Kationenkanals TRPC6, werden analog den zuvor beschriebenen Experimenten mit SIM-A9-Mikroglia zwei weitere unabhängige und explorative Experimente mit gleichem Versuchsaufbau in HEK-293-Zellen durchgeführt, von denen bekannt ist, dass sie TRPC6 nicht exprimieren (206). Verglichen werden die absoluten Sauerstoffverbrauchswerte und die FCRs in den einzelnen Atmungsstatus (*Tabelle 21, Abbildung 19*). Hier bewirkt Hyp1 entsprechend der respirometrischen Analyse der SIM-A9-Zellen im LEAK-Atmungsstatus eine deutliche Erhöhung des absoluten mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs. Auch bei der Betrachtung der FCRs im LEAK-Atmungsstatus wird eine Erhöhung um den Faktor 7,9 sichtbar. Aufgrund der geringen Anzahl an Wiederholungen dieser Experimente ist allerdings durch die statistische Analyse anhand des Mann-Whitney-Tests in keinem Atmungsstatus ein signifikanter Unterschied der mitochondrialen Atmung nach Zugabe von Hyp1 bzw. DMSO erkennbar. Dennoch ist davon auszugehen, dass Hyp1 in HEK-293-Zellen einen ähnlichen – vielleicht sogar stärkeren – Einfluss auf die mitochondriale Atmungsaktivität hat, wie er bereits in SIM-A9-Mikroglia erkennbar geworden ist.

	pmol O <sub>2</sub> · s <sup>-1</sup> · Million Zellen <sup>-1</sup>		Flux Control Ratio (relativ zu ETS <sub>Cl+II</sub> )	
	DMSO	Hyp1	DMSO	Hyp1
OXPHOS <sub>Cl</sub>	23,18 ± 0,19	42,50 ± 5,57	0,29 ± 0,04	0,48 ± 0,05
OXPHOS <sub>Cl+II</sub>	31,18 ± 1,43	56,27 ± 6,97	0,39 ± 0,04	0,63 ± 0,06
LEAK	5,80 ± 0,72	54,43 ± 6,38	0,07 ± 0,00	0,62 ± 0,06
ETS <sub>Cl+II</sub>	82,40 ± 12,90	90,38 ± 19,25		
ETS <sub>ClI</sub>	31,33 ± 4,66	31,71 ± 6,68	0,38 ± 0,00	0,35 ± 0,00

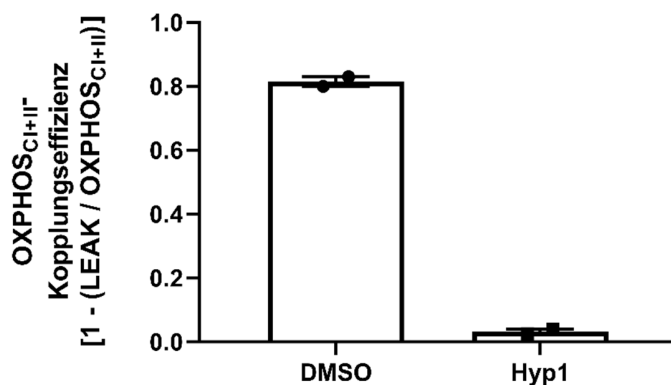
**Tabelle 21: Mitochondriale Atmungsaktivität in HEK-293-Zellen unter der Zugabe von Hyp1**

Zugabe von Hyp1 oder DMSO zu identischen HEK-293-Zelllösungen in die Kammern A und B des Respirometers, Bestimmung der mitochondrialen Atmungsaktivität in den definierten Atmungsstatus nach Titration von Substraten, Entkopplern und Inhibitoren dem SUIT-Protokoll entsprechend, n = 2, Analyse jeweils pro Atmungsstatus mittels Mann-Whitney-Test links: dargestellt als absoluter Sauerstoffverbrauch in pmol O<sub>2</sub> · s<sup>-1</sup> · Million Zellen<sup>-1</sup> rechts: dargestellt als FCR, normalisiert zum Atmungsstatus ETS<sub>Cl+II</sub>



**Abbildung 19: Mitochondriale Atmungsaktivität in HEK-293-Zellen unter der Zugabe von Hyp1**  
 FCRs der definierten Atmungsstatus nach Titration von Substraten, Entkopplern und Inhibitoren entsprechend dem SUIT-Protokoll nach Zugabe von Hyp1 oder DMSO zu identischen HEK-293-Zelllösungen in die Kammern A und B des Respirometers, pro Gruppe n = 2, Mittelwerte ± SEM, Analyse jeweils pro Atmungsstatus mittels Mann-Whitney-Test

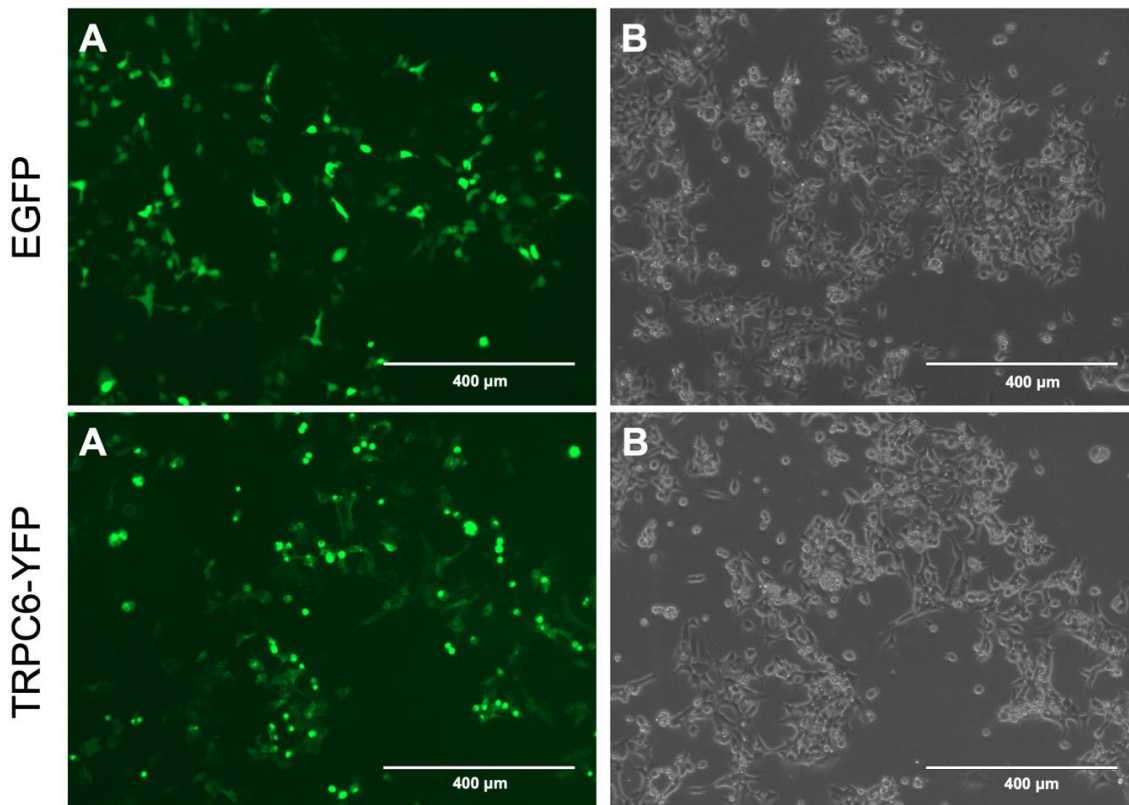
Beim Vergleich der OXPHOS<sub>CI+II</sub>-Kopplungseffizienz unter direkter Hyp1-Zugabe zu HEK-293-Zellen zeigt sich ein ähnliches Bild wie bei der Untersuchung der SIM-A9-Zellen (*Abbildung 20*). Die Kopplungseffizienz sinkt unter der Zugabe von Hyp1 um ca. 96 %. Der Unterschied ist bei einer Anzahl von zwei Versuchen und der Untersuchung mittels Mann-Whitney Test nicht signifikant (Hyp1: 0,03 ± 0,01, DMSO: 0,81 ± 0,01;  $p = 0,3333$ ).



**Abbildung 20: OXPHOS<sub>CI+II</sub>-Kopplungseffizienz in HEK-293-Zellen unter der Zugabe von Hyp1**  
 OXPHOS<sub>CI+II</sub>-Kopplungseffizienz (1-(LEAK / OXPHOS<sub>CI+II</sub>)) nach Zugabe von Hyp1 bzw. DMSO zu identischen HEK-293-Zelllösungen in die Kammern A und B des Respirometers, pro Gruppe n = 2, Mann-Whitney-Test

Die bis hierhin durchgeführten explorativen Untersuchungen in HEK-293-Zellen weisen darauf hin, dass Hyp1 einen Einfluss auf die mitochondriale Atmung ausübt, welcher unabhängig von der Expression des TRPC6 zu sein scheint. Um diese Effekte und deren Abhängigkeit von TRPC6 eingehender zu untersuchen, werden im Folgenden die mitochondrialen Atmungsaktivitäten von HEK-293-Zellen verglichen, die entweder mit TRPC6-YFP-Expressionsplasmiden oder mit EGFP-Expressionsplasmiden transfiziert worden sind. Dies erfolgt jeweils unter direkter Zugabe von

1  $\mu\text{M}$  Hyp1 zu den Zelllösungen in den Messkammern. Hier zeigen sich weder bei Betrachtung der absoluten Sauerstoffverbrauchswerte noch in der Betrachtung der FCRs in ungepaarten t-Tests signifikante Unterschiede innerhalb der einzelnen Atmungsstatus (*Tabelle 22, Abbildung 22*). Auch die  $\text{OXPHOS}_{\text{CI+II}}$ -Kopplungseffizienz (*Abbildung 23*) unterscheidet sich nicht signifikant (EGFP:  $0,03 \pm 0,10$ ; TRPC6:  $0,11 \pm 0,02$ ;  $p = 0,4641$ ).



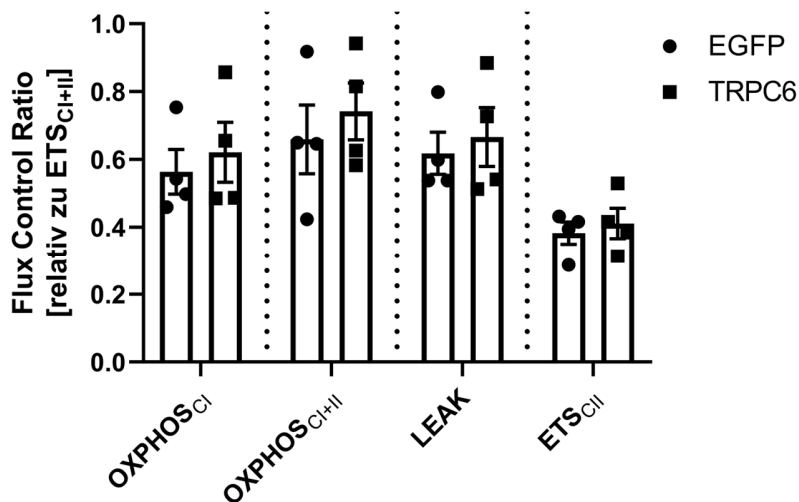
**Abbildung 21: Transfizierte HEK-293-Zellen mit EGFP bzw. TRPC6-YFP**

Repräsentative Ausschnitte der mikroskopischen Überprüfung des Transfektionserfolgs nach Transfektion der HEK-293-Zellkultur mit EGFP- (oben) bzw. TRPC6-YFP-Expressionsplasmiden (unten) unter der Verwendung des JetPrime®-Kit; **A** Fluoreszenzlicht, **B** Normallicht; für Details zum Ablauf der Transfektion siehe 3.2.1.4 Transfektion

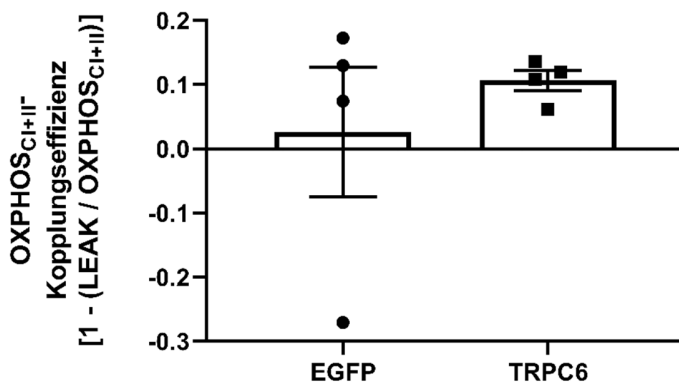
	$\text{pmol O}_2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{Million Zellen}^{-1}$		<i>Flux Control Ratio</i> (relativ zu $\text{ETS}_{\text{CI+II}}$ )	
	EGFP	TRPC6	EGFP	TRPC6
$\text{OXPHOS}_{\text{CI}}$	$35,47 \pm 11,26$	$38,27 \pm 12,71$	$0,56 \pm 0,07$	$0,62 \pm 0,09$
$\text{OXPHOS}_{\text{CI+II}}$	$41,20 \pm 13,83$	$46,49 \pm 16,06$	$0,66 \pm 0,10$	$0,74 \pm 0,08$
LEAK	$37,87 \pm 10,28$	$41,56 \pm 14,33$	$0,62 \pm 0,06$	$0,67 \pm 0,09$
$\text{ETS}_{\text{CI+II}}$	$65,15 \pm 21,33$	$61,76 \pm 18,26$		
$\text{ETS}_{\text{CI}}$	$23,08 \pm 5,19$	$23,70 \pm 4,72$	$0,38 \pm 0,03$	$0,41 \pm 0,04$

**Tabelle 22: Mitochondriale Atmungsaktivität in TRPC6-transfizierten HEK-293-Zellen unter Hyp1-Zugabe**

Zugabe von 1  $\mu\text{M}$  Hyp1 zu mit TRPC6-YFP bzw. EGFP transfizierten HEK-293-Zelllösungen, Bestimmung der mitochondrialen Atmungsaktivität in den definierten Atmungsstatus nach Titration von Substraten, Entkopplern und Inhibitoren entsprechend dem SUIT-Protokoll,  $n = 4$ , Analyse jeweils pro Atmungsstatus mittels ungepaartem t-Test  
links: dargestellt als absoluter Sauerstoffverbrauch in  $\text{pmol O}_2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{Million Zellen}^{-1}$   
rechts: dargestellt als FCR, normalisiert zum Atmungsstatus  $\text{ETS}_{\text{CI+II}}$



**Abbildung 22: Mitochondriale Atmungsaktivität in TRPC6-transfizierten HEK-293-Zellen unter der Zugabe von Hyp1**  
 FCRs der definierten Atmungsstatus nach Titration von Substraten, Entkopplern und Inhibitoren entsprechend dem SUIT-Protokoll nach Zugabe von Hyp1 zu mit TRPC6-YFP bzw. EGFP transfizierten HEK-293-Zelllösungen, pro Gruppe n = 4, Mittelwerte ± SEM, Analyse jeweils pro Atmungsstatus mittels ungepaartem t-Test



**Abbildung 23: OXPHOS<sub>Cl+II</sub>-Kopplungseffizienz in transfizierten HEK-293-Zellen unter der Zugabe von Hyp1**  
 OXPHOS<sub>Cl+II</sub>-Kopplungseffizienz (1-(LEAK / OXPHOS<sub>Cl+II</sub>)) nach Zugabe von Hyp1 zu mit TRPC6-YFP bzw. EGFP transfizierten HEK-293-Zelllösungen, pro Gruppe n = 4, ungepaarter t-Test

Zusammengefasst sprechen diese Ergebnisse dafür, dass die Beeinflussung der mitochondrialen Atmung durch Hyp1 unabhängig von TRPC6 ist.

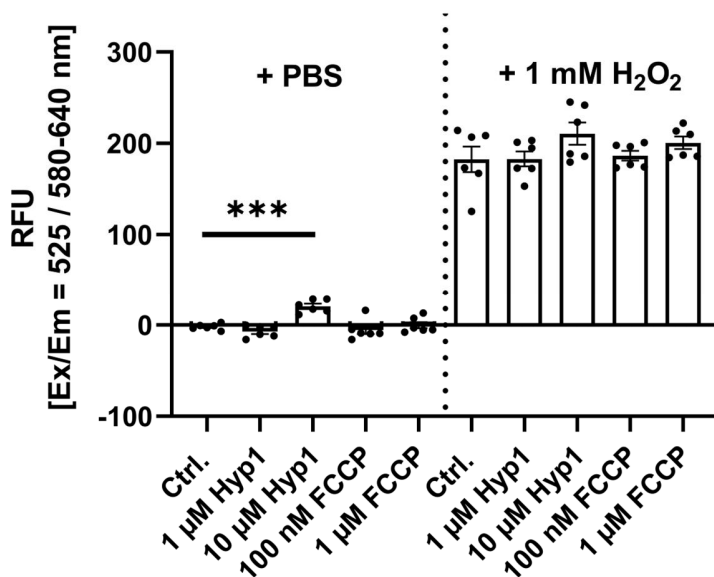
#### 4.1.4 ROS-Assay

Die zuvor beschriebenen Ergebnisse zur Wirkung von Hyp1 auf die mitochondriale Atmung in Zellkulturen deuten darauf hin, dass Hyp1 zu einer Entkopplung des mitochondrialen Systems beiträgt. Da in der Literatur eine Verminderung der Entstehung von ROS durch milde Entkopplung vorbeschrieben ist, wird im Folgenden der Einfluss von Hyp1 und des bekannten Entkopplers FCCP auf die ROS-Produktion untersucht (172, 173, 182).

Die Analyse der Menge an gebildeten ROS in einer HEK-293-Zellkultur 2 h nach der Zugabe der Agenzien Hyp1 (1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ ) und FCCP (100 nM und 1  $\mu\text{M}$ ) erfolgt jeweils unter der Stimulation mit 1 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  und ohne zusätzliche Stimulation (+ PBS-Lösung). Diese beiden Konditionen +/-  $\text{H}_2\text{O}_2$  werden getrennt voneinander ausgewertet. Verglichen werden die Mittelwerte der jeweiligen experimentellen Gruppen mithilfe einer *one-way* ANOVA ausschließlich zur entsprechenden Kontrollkondition. Betrachtet wird eine Anzahl von insgesamt sechs technischen Replikaten aus zwei unabhängig voneinander durchgeführten explorativen Experimenten.

Ohne zusätzliche Stimulation der Zellen mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  zeigt sich die RFU als Maß für die ROS-Entstehung unter der Behandlung der Zellen mit 10  $\mu\text{M}$  Hyp1 gegenüber der Kontrolle erhöht ( $n = 6$  technische Replikate,  $p = 0,0001$ ). Hyp1 in einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$ , wie es in allen übrigen Zellkulturexperimenten der vorliegenden Arbeit eingesetzt wird, bewirkt keine veränderte ROS-Entstehung. Ebenso führt der bekannte Entkoppler FCCP in HEK-293-Zellen nicht zu einer Veränderung (RFU ohne  $\text{H}_2\text{O}_2$ , Mittelwerte  $\pm$  SEM: Ctr1:  $-1,95 \pm 1,33$ , 1  $\mu\text{M}$  Hyp1:  $-7,06 \pm 2,62$ , 10  $\mu\text{M}$  Hyp1:  $20,57 \pm 2,88$ , 100 nM FCCP:  $-5,39 \pm 4,54$ , 1  $\mu\text{M}$  FCCP:  $-0,17 \pm 3,47$ ).

Auch in Anwesenheit von  $\text{H}_2\text{O}_2$  ist die ROS-Produktion unter Zugabe von Hyp1 in einer Zielkonzentration von 10  $\mu\text{M}$  um etwa 15 % gegenüber der entsprechenden Kontrollkondition gesteigert ( $p = 0,1968$ ). Eine Hyp1-Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  bewirkt wie FCCP in den verwendeten Konzentrationen keine relevant veränderte ROS-Entstehung in HEK-293-Zellen (RFU mit  $\text{H}_2\text{O}_2$ , Mittelwerte  $\pm$  SEM: Ctr1:  $182,5 \pm 13,92$ , 1  $\mu\text{M}$  Hyp1:  $182,9 \pm 8,12$ , 10  $\mu\text{M}$  Hyp1:  $210,6 \pm 12,10$ , 100 nM FCCP:  $186,5 \pm 5,35$ , 1  $\mu\text{M}$  FCCP:  $200,6 \pm 6,744$ ).



**Abbildung 24: ROS-Entstehung in HEK-293-Zellen nach Behandlung mit FCCP und Hyp1**

Relative Fluoreszenzbestimmung als RFU (Ex/Em = 525 / 580-640 nm) entsprechend der Menge entstehender ROS in HEK-293-Zellen nach Zugabe von Hyp1 (1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ ), FCCP (100 nM, 1  $\mu\text{M}$ ) oder DMSO (Ctrl.), Stimulation mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  bzw. ohne zusätzliche Stimulation (PBS), pro Gruppe  $n = 6$  in 2 Experimenten, Mittelwerte  $\pm$  SEM, getrennte Analyse +/-  $\text{H}_2\text{O}_2$  mittels *one-way* ANOVA aller Konditionen zur entsprechenden Kontrollkondition, Korrektur nach Holm-Šidák \*\*\*  $p < 0,001$

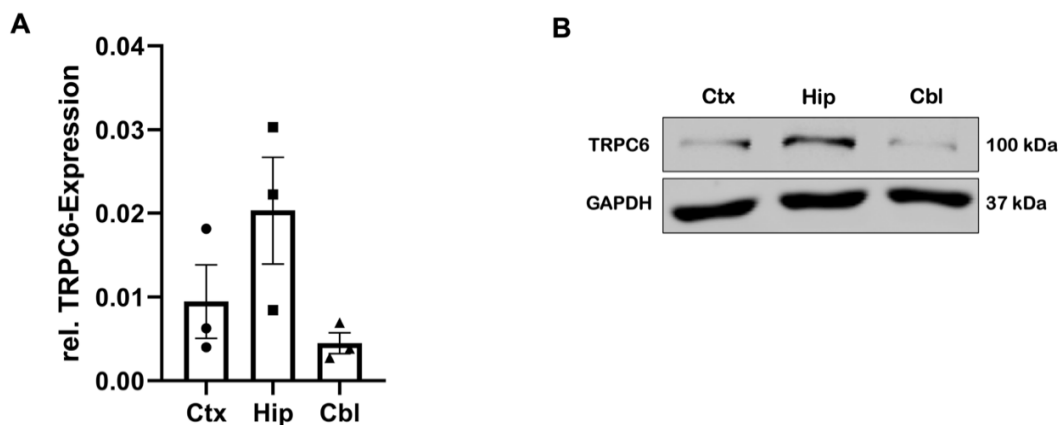
Die explorative Untersuchung der ROS-Entstehung unter Zugabe von Hyp1 in einer Zielkonzentration von 1  $\mu\text{M}$  und verschiedenen Konzentrationen des bekannten Entkoppler FCCP zeigt keine Reduktion. Die Ergebnisse weisen jedoch darauf hin, dass es unter Anwesenheit einer höheren Konzentration von Hyp1 (10  $\mu\text{M}$ ) zu einer vermehrten ROS-Produktion kommt.

## 4.2 Hyp1-Effekte im Hirngewebe der Maus

### 4.2.1 Proteinanalyse

Frühere Untersuchungen haben bereits gezeigt, dass Hyp1 den Kationenkanal TRPC6 aktiviert (24). In-situ-Hybridisierungen weisen zudem auf eine starke mRNA-Expression von TRPC6 im Gehirn und insbesondere im Hippocampus der Maus hin (234).

Die Expression des Kationenkanals TRPC6 in den Hirnarealen Cortex (Ctx), Hippocampus (Hip) und Cerebellum (Cbl) wird hier differenziert mittels einer Western Blot-Analyse untersucht. Dargestellt sind hier die relativen Proteinexpressionen, normalisiert zum Referenzprotein GAPDH, als Mittelwerte  $\pm$  SEM. Die höchste relative TRPC6-Expression zeigt sich im Hippocampus ( $0,02 \pm 0,01$ ), die niedrigste im Cerebellum ( $0,005 \pm 0,001$ ). Die relative TRPC6-Expression im Cortex beträgt  $0,01 \pm 0,00$ . Die Unterschiede bzgl. der TRPC6-Expression in den betrachteten Hirnarealen in 3 WT-Mäusen zeigen sich allerdings in der statistischen Untersuchung durch *one-way* ANOVA nicht signifikant.



**Abbildung 25: TRPC6-Expression in verschiedenen Hirnarealen von WT-Mäusen**

**A** Quantifizierung der Proteinbandenintensitäten von TRPC6 in Ctx, Hip und Cbl, normalisiert zum Referenzprotein GAPDH, pro Gruppe  $n = 3$ , Mittelwerte  $\pm$  SEM, *one-way* ANOVA, Korrektur nach Holm-Šidák

**B** Repräsentativer Ausschnitt des Western Blots mit TRPC6 und dem Referenzprotein GAPDH

### 4.2.2 Respirometrie

Im Folgenden wird der Einfluss von Hyp1 auf die mitochondriale Atmung im murinen Hirngewebe (rechter visueller Cortex) untersucht. Die in diesem Kapitel dargestellten Werte entsprechen

Mittelwerten des absoluten Sauerstoffverbrauchs (in  $\text{pmol O}_2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{mg Hirngewebe}^{-1}$ ), FCRs (jeweiliger Atmungsstatus relativ zu  $\text{ETS}_{\text{CI+II}}$ ) oder  $\text{OXPHOS}_{\text{CI+II}}$ -Kopplungseffizienzen ( $1 - (\text{LEAK} / \text{OXPHOS}_{\text{CI+II}})$ ) jeweils  $\pm$  SEM.

In einem ersten Schritt wird die mitochondriale Atmungsaktivität des Hirngewebes dreier WT-Mäuse untersucht. Pro Experiment werden die korrespondierenden Messkammern mit der definierten Menge homogenisierten Hirngewebes, welches in der Trägersubstanz DMSO gelöst ist, bestückt. Zu jeweils einer der Messkammern erfolgt die Zugabe von Hyp1 in einer Zielkonzentration von  $1 \mu\text{M}$ . Die Auswertung der einzelnen Atmungsstatus erfolgt mittels gepaarter t-Tests.

Bei Betrachtung des absoluten Sauerstoffverbrauchs pro mg Hirngewebe zeigt sich eine Erhöhung der Werte im LEAK-Atmungsstatus um ca. 105 % bei Zugabe von Hyp1 im Vergleich zur alleinigen Zugabe der Vehikellösung ( $p = 0,0079$ ). Die Betrachtung der übrigen Atmungsstatus lässt keine signifikanten Unterschiede bzgl. des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs unter Hyp1-Zugabe erkennen.

Analog bewirkt Hyp1 im statistischen Vergleich der relativen FCRs innerhalb des LEAK-Atmungsstatus eine signifikante Erhöhung um 142 % ( $p = 0,0026$ , *Tabelle 23, Abbildung 26*).

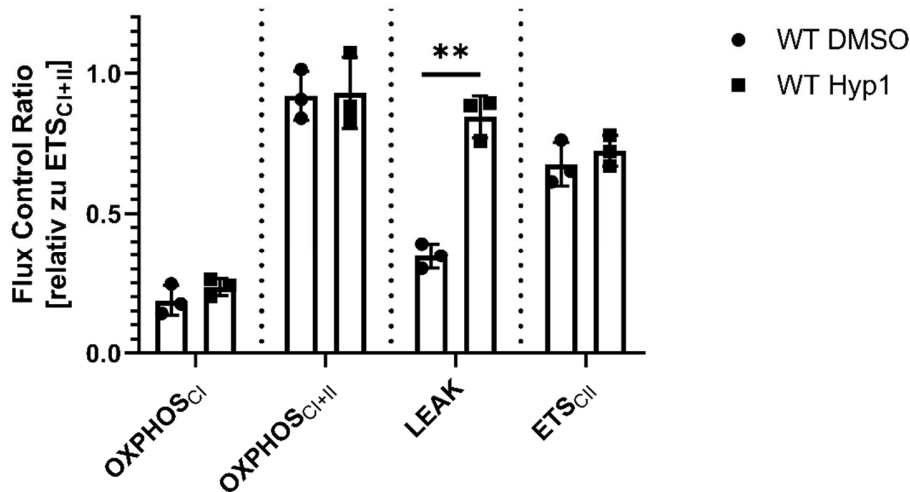
	$\text{pmol O}_2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$		Flux Control Ratio (relativ zu $\text{ETS}_{\text{CI+II}}$ )	
	WT DMSO	WT Hyp1	WT DMSO	WT Hyp1
$\text{OXPHOS}_{\text{CI}}$	$12,19 \pm 3,10$	$12,35 \pm 2,62$	$0,19 \pm 0,03$	$0,24 \pm 0,02$
$\text{OXPHOS}_{\text{CI+II}}$	$56,84 \pm 9,20$	$47,72 \pm 5,71$	$0,92 \pm 0,05$	$0,93 \pm 0,07$
LEAK	$21,05 \pm 2,04$	$43,24 \pm 4,00^{**}$	$0,35 \pm 0,03$	$0,85 \pm 0,04^{**}$
$\text{ETS}_{\text{CI+II}}$	$61,80 \pm 9,92$	$51,88 \pm 7,65$		
$\text{ETS}_{\text{CII}}$	$41,59 \pm 6,40$	$37,37 \pm 4,44$	$0,68 \pm 0,04$	$0,72 \pm 0,03$

**Tabelle 23: Mitochondriale Atmungsaktivität in Hirngewebe von WT-Mäusen unter der Zugabe von Hyp1**

Zugabe von Hyp1 oder DMSO zu identischen Hirnhomogenisaten in beide Messkammern, Bestimmung der mitochondrialen Atmungsaktivität in den definierten Atmungsstatus nach Titration von Substraten, Entkopplern und Inhibitoren dem SUIT-Protokoll entsprechend, pro Gruppe  $n = 3$ , Analyse jeweils pro Atmungsstatus mittels gepaartem t-Test,  $^{**} p < 0,01$

links: dargestellt als absoluter Sauerstoffverbrauch in  $\text{pmol O}_2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$

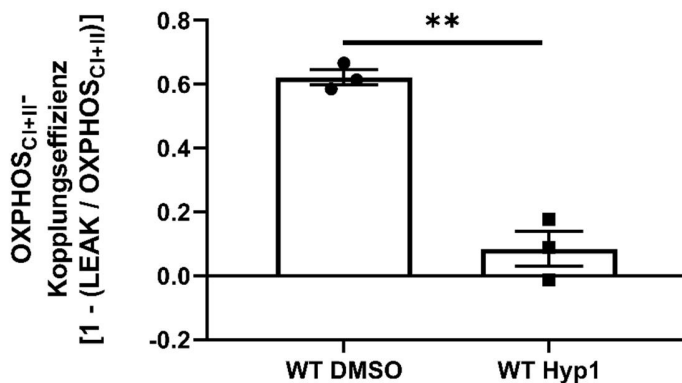
rechts: dargestellt als FCR, normalisiert zum Atmungsstatus  $\text{ETS}_{\text{CI+II}}$



**Abbildung 26: Mitochondriale Atmungsaktivität in Hirngewebe von WT-Mäusen unter der Zugabe von Hyp1**

FCRs der definierten Atmungsstatus nach Titration von Substraten, Entkopplern und Inhibitoren dem SUIT-Protokoll entsprechend nach Zugabe von Hyp1 oder DMSO zu identischen Hirnhomogenisaten in beide Messkammern, pro Gruppe n = 3, Mittelwerte ± SEM, Analyse jeweils pro Atmungsstatus mittels gepaartem t-Test, \*\*  $p < 0,01$

Beim Vergleich der OXPHOS<sub>CI+II</sub>-Kopplungseffizienz zeigt sich in den WT-Maushirnen eine signifikante Reduktion um ca. 87 % bei der Zugabe von Hyp1 ( $0,08 \pm 0,05$ ) im Vergleich zur DMSO-Zugabe ( $0,62 \pm 0,02$ ,  $p = 0,0087$ , *Abbildung 27*).



**Abbildung 27: OXPHOS<sub>CI+II</sub>-Kopplungseffizienz in Hirnhomogenisaten von WT-Mäusen unter der Zugabe von Hyp1**

OXPHOS<sub>CI+II</sub>-Kopplungseffizienz ( $1 - (\text{LEAK} / \text{OXPHOS}_{\text{CI+II}})$ ) nach Zugabe von Hyp1 bzw. DMSO zu identischen Hirnhomogenisaten in beide Messkammern, pro Gruppe n = 3, gepaarter t-Test, \*\*  $p < 0,01$

Zusammengefasst werden durchweg höhere Werte des absoluten Sauerstoffverbrauchs bzw. der FCRs innerhalb des LEAK-Atmungsstatus sowie eine deutlich verminderte OXPHOS<sub>CI+II</sub>-Kopplungseffizienz unter der Zugabe von Hyp1 zu homogenisiertem murinem Cortextgewebe sichtbar. Dies spricht analog den bisher beschriebenen Ergebnissen in SIM-A9-Mikroglia bzw. HEK-293-Zellen für eine Verminderung der mitochondrialen Kopplung im Cortextgewebe der Maus in Anwesenheit von Hyp1.

Zur weiteren Beurteilung des Anteils des TRPC6 an der Hyp1-Wirkung auf die Veränderung der mitochondrialen Atmungsaktivität erfolgen respirometrische Untersuchungen der

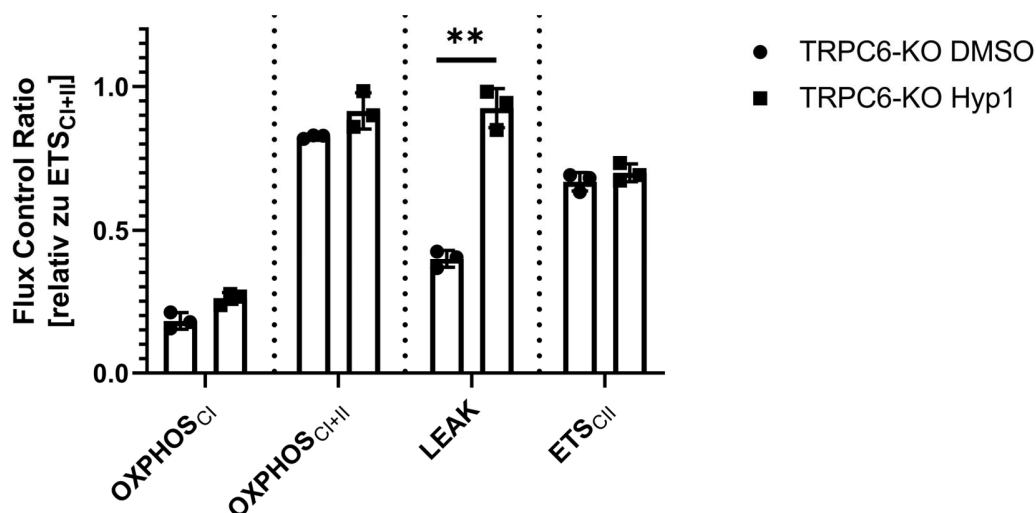


homogenisierten Cortexareale (rechter visueller Cortex) dreier TRPC6-KO-Mäuse, ebenfalls nach Zugabe von Hyp1 bzw. der Vehikellösung DMSO. Eine signifikante Steigerung der Werte im LEAK-Atmungsstatus unter der Zugabe des Hyp1 zeigt sich analog der Untersuchung der WT-Maushirne sowohl bzgl. des absoluten Sauerstoffverbrauchs (um 93 %,  $p = 0,0089$ ) als auch bei Betrachtung der FCRs (um 142 %,  $p = 0,0017$ ).

Dagegen lässt sich in Hirnhomogenisaten der TRPC6-KO-Mäuse eine Verminderung der Werte des absoluten Sauerstoffverbrauchs innerhalb des ETS<sub>Cl+II</sub>-Atmungsstatus um ca. 13 % unter Hyp1-Zugabe nachweisen ( $p = 0,0018$ ), die in der normalisierten Darstellung als FCRs keinen Bestand hat (Tabelle 24, Abbildung 28).

	pmol O <sub>2</sub> · s <sup>-1</sup> · mg <sup>-1</sup>		Flux Control Ratio (relativ zu ETS <sub>Cl+II</sub> )	
	TRPC6-KO DMSO	TRPC6-KO Hyp1	TRPC6-KO DMSO	TRPC6-KO Hyp1
OXPHOS <sub>Cl</sub>	10,86 ± 0,29	13,16 ± 1,68	0,18 ± 0,02	0,26 ± 0,01
OXPHOS <sub>Cl+II</sub>	50,05 ± 3,38	46,59 ± 6,31	0,83 ± 0,00	0,92 ± 0,04
LEAK	24,05 ± 0,53	46,43 ± 2,62**	0,40 ± 0,02	0,93 ± 0,04**
ETS <sub>Cl+II</sub>	60,59 ± 4,00	50,60 ± 5,05		
ETS <sub>ClI</sub>	40,69 ± 3,69	35,47 ± 3,72**	0,67 ± 0,02	0,70 ± 0,02

**Tabelle 24: Mitochondriale Atmungsaktivität in Hirngewebe von TRPC6-KO-Mäusen unter der Zugabe von Hyp1**  
Zugabe von Hyp1 oder DMSO zu identischen Hirnhomogenisaten in beide Messkammern, Bestimmung der mitochondrialen Atmungsaktivität in den definierten Atmungsstatus nach Titration von Substraten, Entkopplern und Inhibitoren dem SUIT-Protokoll entsprechend, pro Gruppe n = 3, Analyse jeweils pro Atmungsstatus mittels gepaartem t-Test, \*\*  $p < 0,01$   
links: dargestellt als absoluter Sauerstoffverbrauch in pmol O<sub>2</sub> · s<sup>-1</sup> · mg<sup>-1</sup>  
rechts: dargestellt als FCR, normalisiert zum Atmungsstatus ETS<sub>Cl+II</sub>



**Abbildung 28: Mitochondriale Atmungsaktivität in Hirngewebe von TRPC6-KO-Mäusen unter der Zugabe von Hyp1**  
FCRs der definierten Atmungsstatus nach Titration von Substraten, Entkopplern und Inhibitoren dem SUIT-Protokoll entsprechend nach Zugabe von Hyp1 oder DMSO zu identischen Hirnhomogenisaten in beide Messkammern, pro Gruppe n = 3, Mittelwerte ± SEM, Analyse jeweils pro Atmungsstatus mittels gepaartem t-Test, \*\*  $p < 0,01$

Wie bereits in den Untersuchungen der WT-Mäuse erkennbar geworden, zeigt sich auch in der respirometrischen Analyse der TRPC6-KO-Maushirne eine deutliche Reduktion der OXPHOS<sub>CI+II</sub>-Kopplungseffizienz (Abbildung 29). Die errechneten Werte liegen bei Zugabe des Hyp1 ( $0,52 \pm 0,02$ ) um mehr als 100 % unter denen der DMSO-Gruppe ( $-0,02 \pm 0,08$ ). Eine Normalverteilung wird bei nicht normalverteilten Werten im Shapiro-Wilk-Test anhand des vorliegenden QQ-Plots dennoch angenommen. Im gepaarten t-Test ergibt sich eine Signifikanz der beschriebenen Reduktion unter Hyp1-Zugabe ( $p = 0,0105$ ).

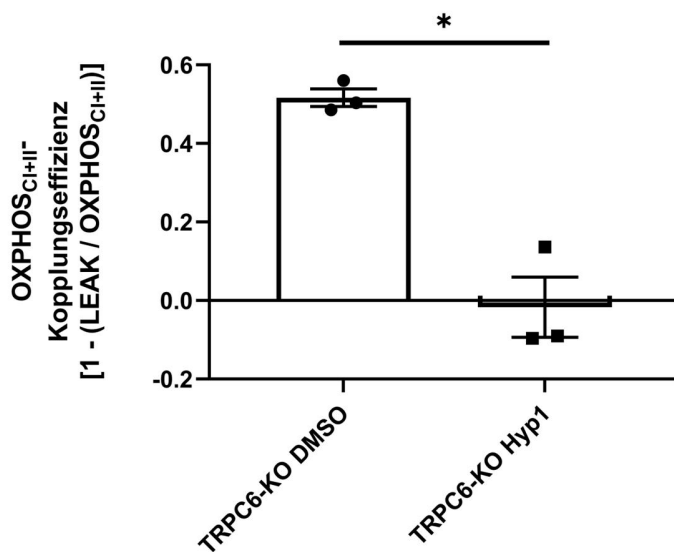


Abbildung 29: OXPHOS<sub>CI+II</sub>-Kopplungseffizienz in Hirnhomogenisaten von TRPC6-KO-Mäusen unter der Zugabe von Hyp1 OXPHOS<sub>CI+II</sub>-Kopplungseffizienz ( $1 - (\text{LEAK} / \text{OXPHOS}_{\text{CI+II}})$ ) nach Zugabe von Hyp1 bzw. DMSO zu identischen Hirnhomogenisaten in beide Messkammern, pro Gruppe  $n = 3$ , gepaarter t-Test, \*  $p < 0,05$

Zusätzlich werden die einzelnen Atmungsstatus der respirometrischen Untersuchungen der WT- und TRPC6-KO-Maushirne mittels *one-way* ANOVA auf Unterschiede überprüft. In keinem Atmungsstatus finden sich signifikante Unterschiede zwischen WT und KO. Exemplarisch werden hier die FCR-Werte des LEAK-Atmungsstatus im Vergleich der beiden Gruppen dargestellt, die ein nahezu identisches Bild zeigen (WT DMSO vs. WT Hyp1 und TRPC6-KO DMSO vs. TRPC6-KO Hyp1:  $p < 0,0001$ , Abbildung 30).

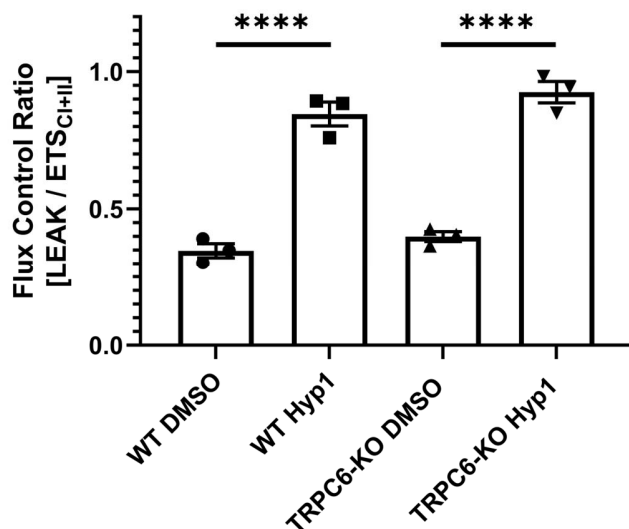


Abbildung 30: Mitochondriale Atmungsaktivität in Hirngewebe von WT- und TRPC6-KO-Mäusen innerhalb des LEAK-Atmungsstatus dargestellt als FCR, normalisiert zum Atmungsstatus ETS<sub>Cl+II</sub>, pro Gruppe n = 3, Mittelwerte ± SEM, *one-way* ANOVA, Korrektur nach Holm-Šidák, \*\*\*\*  $p < 0,0001$

Die Expression des TRPC6-Kanals im Hirngewebe hat demnach keinen sichtbaren Einfluss auf die dargestellten Effekte des Hyp1 bzgl. mitochondrialer Atmungsaktivität, weshalb hier eine Wirkungsweise des Hyp1 unabhängig von TRPC6 anzunehmen ist.

### 4.3 Hyp1-Effekte nach SHT im Mausmodell

Nachdem die Ergebnisse der Experimente in Zellkulturen und murinem Hirngewebe darauf hindeuten, dass Hyp1 bestimmte Effekte etwa in Bezug auf Entzündungsreaktionen und die mitochondriale Atmung ausübt, ist zur Beantwortung der Fragestellung, ob Hyp1 tatsächlich neuroprotektive Effekte im Rahmen eines SHT vermitteln könnte, die Untersuchung dieses Wirkstoffs im lebenden Mausorganismus von großer Bedeutung.

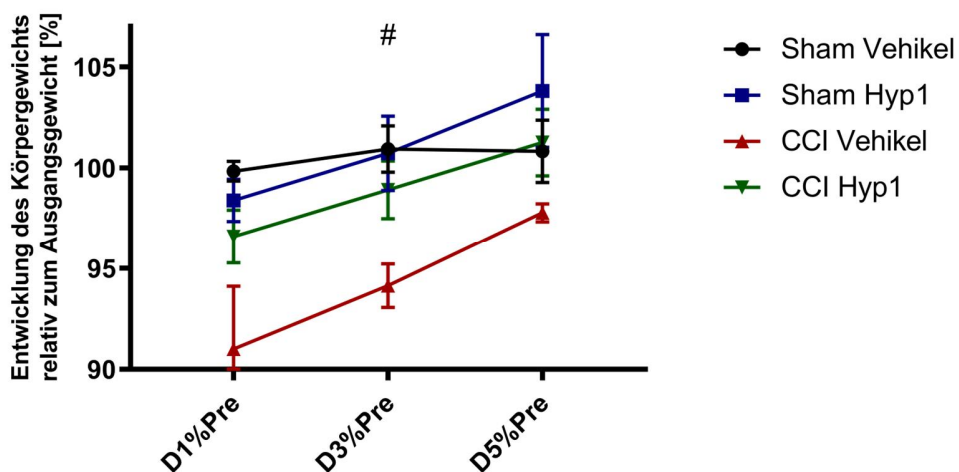
Diese Untersuchung erfolgt anhand des in unserer Forschungsgruppe bereits vielfach verwendeten und etablierten Modells des CCI (235, 236). Bei über insgesamt 6 Tage täglich wiederholter i.p.-Injektion von gelöstem Hyp1 bzw. der Trägerlösung wird am 4. Tag das induzierte SHT als CCI oder alternativ die Scheinoperation durchgeführt. Nach 5-tägiger postoperativer Überlebenszeit erfolgt die Euthanasie der Tiere (siehe 3.2.2.9 Übersicht über den Versuchsablauf).

Die Evaluierung eines möglichen Effekts des applizierten Hyp1 erfolgt mit besonderem Fokus auf die Beeinflussung relevanter Gen- und Proteinexpressionen, der mitochondrialen Atmung

innerhalb des murinen Cortextgewebes sowie auf ein eventuell verändertes funktionelles Outcome der Tiere.

#### 4.3.1 Körpergewicht und NSS

Die Entwicklung des zum Ausgangsgewicht (Pre; am Morgen des Operationstages) normalisierten Körpergewichts wird mittels *two-way* ANOVA zwischen den verschiedenen Konditionen verglichen. Hierzu werden jeweils die Körpergewichte am 1. (D1), 3. (D3) und 5. postoperativen Tag (D5) relativ zum Ausgangsgewicht prozentual als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt. Bei Betrachtung des 1. postoperativen Tages (D1%Pre) zeigen sich niedrigere Werte in den beiden CCI-Gruppen gegenüber den scheinoperierten Tieren, es lassen sich allerdings keine signifikanten Unterschiede erkennen. Am 3. postoperativen Tag (D3%Pre) zeigt sich ein signifikant niedrigeres Durchschnittsgewicht in der Gruppe CCI Vehikel gegenüber der Gruppe Sham Vehikel ( $p = 0,0300$ ). Am 5. postoperativen Tag gibt es zwischen den Gruppen keine signifikanten Unterschiede. An allen betrachteten Tagen zeigen sich höhere Mittelwerte der relativen Körpergewichte in der Gruppe der mit Hyp1 behandelten CCI-Tiere gegenüber den mit der Vehikellösung behandelten Tieren nach CCI. Dieser Unterschied ist allerdings zu keinem Zeitpunkt signifikant (D1%Pre:  $p = 0,4320$ ; D3%Pre:  $p = 0,1508$ ; D5%Pre:  $p = 0,5274$ ; Entwicklung des relativen Körpergewichts in % des Ausgangsgewichts, Mittelwerte  $\pm$  SEM: D1%Pre: Sham Vehikel:  $99,83 \pm 0,49$ , Sham Hyp1:  $98,38 \pm 1,05$ , CCI Vehikel:  $91,00 \pm 3,10$ , CCI Hyp1:  $96,58 \pm 1,32$ ; D3%Pre: Sham Vehikel:  $100,90 \pm 1,15$ , Sham Hyp1:  $100,70 \pm 1,84$ , CCI Vehikel:  $94,13 \pm 1,08$ , CCI Hyp1:  $98,91 \pm 1,44$ ; D5%Pre: Sham Vehikel:  $100,80 \pm 1,54$ , Sham Hyp1:  $103,8 \pm 2,79$ , CCI Vehikel:  $97,76 \pm 0,44$ , CCI Hyp1:  $101,30 \pm 1,65$ ).

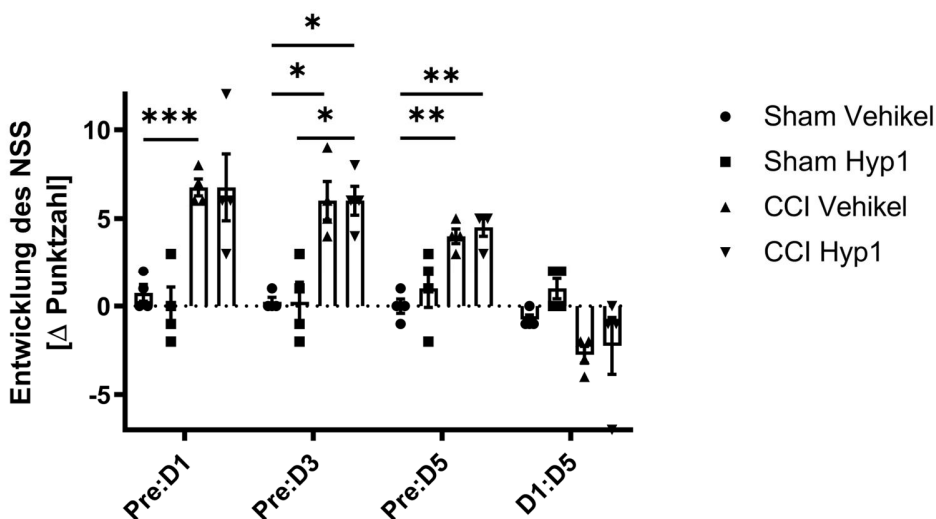


**Abbildung 31: Entwicklung des Körpergewichts**

relatives Körpergewicht in % des Ausgangsgewichts am Morgen des Operationstages (Pre) am 1. (D1%Pre), 3. (D3%Pre) und 5. (D5%Pre) postoperativen Tag, Mittelwerte  $\pm$  SEM, pro Gruppe  $n = 4$ , *two-way* ANOVA, Korrektur nach Holm-Šidák, Signifikanz zwischen den Gruppen Sham Vehikel und CCI Vehikel zum Zeitpunkt D3: #  $p < 0,05$

Die Entwicklung der Punktwerte im NSS wird jeweils als Differenz der Punktwerte am 1. (D1), 3. (D3) und 5. postoperativen Tag (D5) zu den Punktwerten am 1. präoperativen Tag (Pre) bzw. zu D1 dargestellt.

Bei der Betrachtung der Differenz des Punktwertes im NSS von D1 zu Pre (Pre:D1) zeigt sich ein signifikant erhöhter Wert in der Gruppe CCI Vehikel gegenüber der Gruppe Sham Vehikel ( $p = 0,0007$ ). Bei Betrachtung der Differenz Pre:D3 zeigen sich signifikant erhöhte Werte der Gruppen CCI Hyp1 gegenüber Sham Vehikel ( $p = 0,0227$ ) bzw. gegenüber Sham Hyp1 ( $p = 0,0346$ ) und CCI Vehikel gegenüber Sham Vehikel ( $p = 0,0391$ ). Die Differenz des NSS am 5. postoperativen Tag (Pre:D5) zeigt sich signifikant erhöht gegenüber der Gruppe Sham Vehikel in den Gruppen CCI Vehikel ( $p = 0,0027$ ) und CCI Hyp1 ( $p = 0,0027$ ). Somit bewirkt ein CCI erwartungsgemäß eine deutliche Punktwertsteigerung im NSS, entsprechend einem beeinträchtigten neuromotorischen Status infolge des induzierten Traumas. Es kommt am 1. postoperativen Tag in beiden CCI-Gruppen zu einem Anstieg des Punktwertes um 6,75, was sich in den Folgetagen rückläufig darstellt. Durch die Scheinoperation kommt es allenfalls zu einer minimalen neuromotorischen Verschlechterung. Die insgesamt sechstägige Hyp1-Behandlung zieht dagegen keinerlei statistisch signifikante Unterschiede nach sich (Änderung der Punktwerte im NSS, Mittelwerte  $\pm$  SEM: Pre:D1: Sham Vehikel:  $0,75 \pm 0,48$ , Sham Hyp1:  $0,00 \pm 1,08$ , CCI Vehikel:  $6,75 \pm 0,48$ , CCI Hyp1:  $6,75 \pm 1,89$ ; Pre:D3: Sham Vehikel:  $0,25 \pm 0,25$ , Sham Hyp1:  $0,25 \pm 1,11$ , CCI Vehikel:  $6,00 \pm 1,08$ ; CCI Hyp1:  $6,00 \pm 0,82$ ; Pre:D5: Sham Vehikel:  $0,00 \pm 0,41$ , Sham Hyp1:  $1,00 \pm 1,08$ , CCI Vehikel:  $4,00 \pm 0,41$ , CCI Hyp1:  $4,50 \pm 0,50$ ; D1:D5: Sham Vehikel:  $-0,75 \pm 0,25$ , Sham Hyp1:  $1,00 \pm 0,58$ , CCI Vehikel:  $-2,75 \pm 0,48$ , CCI Hyp1:  $-2,25 \pm 1,60$ ).



**Abbildung 32: Entwicklung des NSS**

Entwicklung der Punktzahl im NSS bezogen auf einen Ausgangswert des 1. präoperativen Tages am 1. (Pre:D1), 3. (Pre:D3) und 5. postoperativen Tag (Pre:D5), Mittelwerte  $\pm$  SEM, pro Gruppe  $n = 4$ , two-way ANOVA, Korrektur nach Holm-Šidák, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$

### 4.3.2 Proteinanalyse

Die Proteinanalyse erfolgt aus dem Hirngewebe serieller Gefrierschnitte der nach dem 5. postoperativen Tag euthanasierten Mäuse. Es werden jeweils die ipsiläsionalen (ipsi) und contraläsionalen (contra) Proteinexpressionen der vier Konditionen Scheinoperation mit i.p. verabreichter Trägerlösung (Sham Vehikel) oder i.p. verabreichter Hyp1-Lösung (Sham Hyp1) sowie die CCI-Tiere mit Injektion der Trägerlösung (CCI Vehikel) oder der Hyp1-Lösung (CCI Hyp1) betrachtet. Die statistische Analyse erfolgt, falls nicht anders erwähnt, mittels der Vergleiche aller Gruppen durch *one-way* ANOVA, dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  SEM.

#### αII-Spektrin-Spaltfragmente

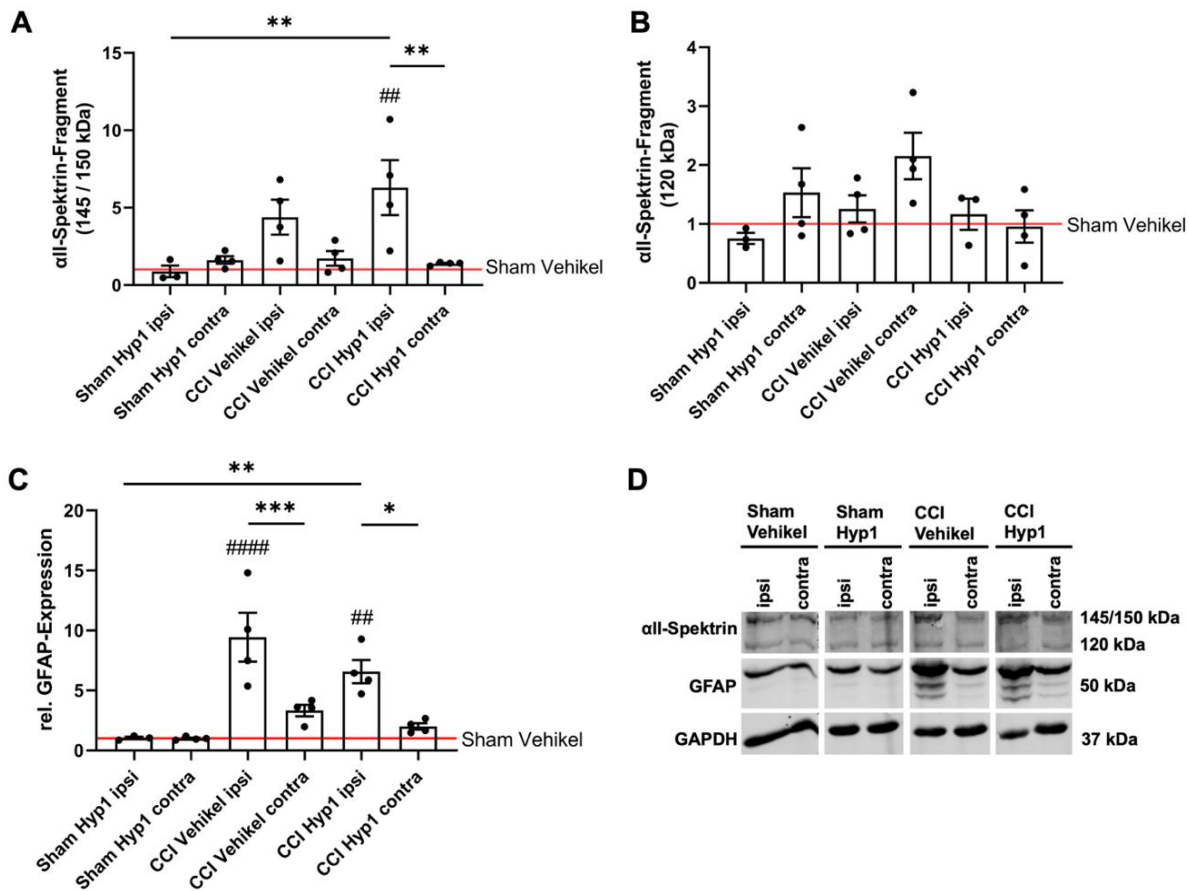
Anhand des Ausmaßes der Spaltung des Zytoskelett-Proteins αII-Spektrin lassen sich unter anderem Rückschlüsse ziehen auf eine veränderte intraaxonale Calciumhomöostase, die Aktivität der Proteasen Caspase-3 und Calpain sowie eine damit einhergehende axonale Degeneration und neuronalen Zelltod (235). Während die Calpain-vermittelte Spaltung zu 145 und 150 kDa-Spaltprodukten führt, bedingt Caspase-3 die Spaltung des Spektrins in 120 bzw. 150 kDa schwere Spaltprodukte (237). Bei Betrachtung der 145 /150 kDa-Fragmente lassen sich höhere Werte in den Hirnen der CCI-Tiere im Vergleich zu den korrespondierenden Sham-Gruppen sowie innerhalb der CCI-Gruppen zwischen der jeweils ipsiläsionalen Hemisphäre gegenüber der kontralateralen Hemisphäre feststellen. Eine signifikant gesteigerte Expression der 145 / 150 kDa-Fragmente ist zwischen den Gruppen CCI Hyp1 ipsi und Sham Hyp1 ipsi zu sehen ( $p = 0,0059$ ). Auch ist die Expression der 145 /150 kDa-Fragmente ipsiläsional gegenüber der contraläsionalen Seite in der Hyp1-behandelten CCI-Gruppe signifikant gesteigert ( $p = 0,0070$ ) sowie die Spaltfragment-Expression der Hyp1-behandelten Tiere gegenüber der Sham-Gruppe mit injizierter Trägerlösung ( $p = 0,0034$ ; Sham Vehikel ipsi ( $n = 4$ ):  $1,00 \pm 0,32$ , Sham Vehikel contra ( $n = 4$ ):  $1,00 \pm 0,38$ , Sham Hyp1 ipsi ( $n = 3$ ):  $0,88 \pm 0,38$ , Sham Hyp1 contra ( $n = 4$ ):  $1,61 \pm 0,25$ , CCI Vehikel ipsi ( $n = 4$ ):  $4,39 \pm 1,13$ , CCI Vehikel contra ( $n = 4$ ):  $1,72 \pm 0,47$ , CCI Hyp1 ipsi ( $n = 4$ ):  $6,29 \pm 1,78$ , CCI Hyp1 contra ( $n = 4$ ):  $1,38 \pm 0,05$ ).

Bei der Betrachtung der 120 kDa-Spaltfragmente ergeben sich keinerlei signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen (Sham Vehikel ipsi ( $n = 4$ ):  $1,00 \pm 0,30$ , Sham Vehikel contra ( $n = 4$ ):  $1,00 \pm 0,10$ , Sham Hyp1 ipsi ( $n = 3$ ):  $0,75 \pm 0,09$ , Sham Hyp1 contra ( $n = 4$ ):  $1,53 \pm 0,41$ , CCI Vehikel ipsi ( $n = 4$ ):  $1,26 \pm 0,23$ , CCI Vehikel contra ( $n = 4$ ):  $2,15 \pm 0,39$ , CCI Hyp1 ipsi ( $n = 3$ ):  $1,16 \pm 0,26$ , CCI Hyp1 contra ( $n = 4$ ):  $0,96 \pm 0,27$ ).

Somit lässt sich schließen, dass das induzierte SHT in Form eines CCI zu gesteigerter Zytoskelettdegradation und somit erhöhtem Zelluntergang in ipsiläsionalen Hemisphären führt, wobei eine Hyp1-Behandlung ohne sichtbaren Effekt bleibt.

## GFAP

Die GFAP-Expression als Marker für astrozytäre Aktivität zeigt sich in den ipsiläsionalen Hemisphären der CCI-Tiere jeweils erhöht. Eine signifikante Steigerung der GFAP-Expression 5 Tage nach erfolgtem CCI zeigt sich jeweils zwischen der ipsiläsionalen und contraläsionalen Hemisphären der CCI Gruppen (CCI Vehikel ipsi vs. contra:  $p = 0,0007$ ; CCI Hyp1 ipsi vs. contra:  $p = 0,0143$ ), sowie wie beim Vergleich der ipsiläsionalen Hemisphäre der CCI Gruppen mit den korrespondierenden Hemisphären der Sham-Gruppen. Erwartungsgemäß bedingt ein CCI eine Steigerung der GFAP-Expression als Indikator für astrozytäre Aktivierung im Rahmen der Sekundärschädigung. Die 6-tägige Hyp1-Behandlung führt dagegen in diesem experimentellen Versuchsaufbau nicht zu einer signifikanten Verringerung astrozytärer Aktivierung (CCI Vehikel ipsi vs. Sham Vehikel ipsi:  $p < 0,0001$ ; CCI Hyp1 ipsi vs. Sham Hyp1 ipsi:  $p = 0,0048$ ; CCI Hyp1 ipsi vs. Sham Vehikel ipsi:  $p = 0,0022$ ; Sham Vehikel ipsi ( $n = 4$ ):  $1,00 \pm 0,02$ , Sham Vehikel contra ( $n = 4$ ):  $1,00 \pm 0,04$ , Sham Hyp1 ipsi ( $n = 3$ ):  $1,03 \pm 0,10$ , Sham Hyp1 contra ( $n = 4$ ):  $1,00 \pm 0,07$ , CCI Vehikel ipsi ( $n = 4$ ):  $9,44 \pm 2,04$ , CCI Vehikel contra ( $n = 4$ ):  $3,32 \pm 0,47$ , CCI Hyp1 ipsi ( $n = 4$ ):  $6,57 \pm 0,97$ , CCI Hyp1 contra ( $n = 4$ ):  $1,99 \pm 0,27$ ).



**Abbildung 33: Expression der alphaII-Spektrin-Spaltprodukte und von GFAP am 5. postoperativen Tag**

**A-C** Quantifizierung der Proteinbandenintensität der 145 kDa und 150 kDa schweren Spaltprodukte des alphaII-Spektrins, des 120 kDa schweren Spaltprodukts des alphaII-Spektrins und von GFAP, am 5. Tag nach CCI bzw. Scheinoperation, nach 6-maliger i.p.-Applikation von Hyp1 oder der Vehikellösung nach Studienprotokoll, pro Gruppe n = 4, Sham Hyp1 ipsi n = 3, alphaII-Spektrin 120 kDa CCI Hyp1 ipsi (B) n = 3, Mittelwerte ± SEM, normalisiert zum Referenzprotein GAPDH, relativ zur mittleren Proteinexpression der jeweiligen Hemisphäre von Sham Vehikel, *one-way* ANOVA, Korrektur nach Holm-Šidák, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , Signifikanz zu Sham Vehikel ipsi: ##  $p < 0,01$ , ###  $p < 0,001$

**D** Repräsentativer Ausschnitt des Western Blots mit alphaII-Spektrin (145 / 150 kDa bzw. 120 kDa), GFAP und dem Referenzprotein GAPDH

## BDNF

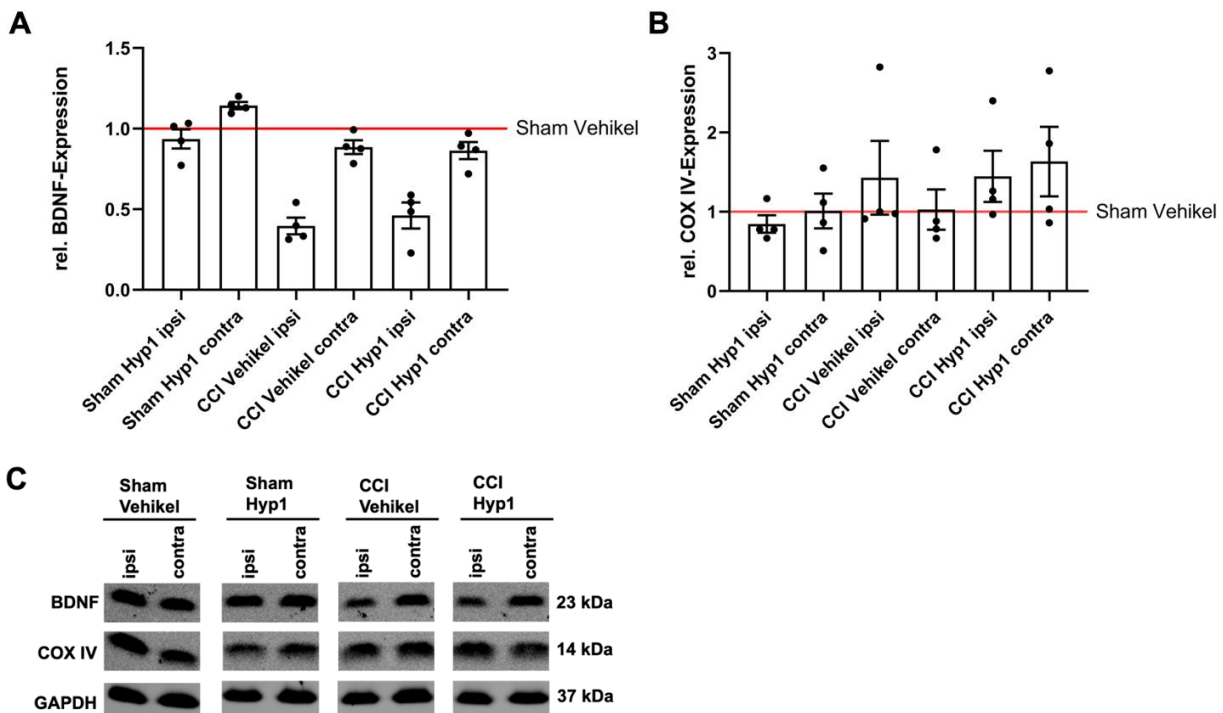
Die Betrachtung des Neurotrophins BDNF zeigt erwartungsgemäß einen deutlichen Abfall der relativen Expression innerhalb der ipsiläsionalen Hemisphären der CCI-Tiere beider Behandlungen (*Abbildung 34 A, C*). Aufgrund einer fehlenden Normalverteilung zeigt sich dieser Abfall nicht signifikant im Kruskal-Wallis-Test. Die 6-tägige i.p.-Behandlung mit Hyp1 hat dagegen am 5. postoperativen Tag keinen Einfluss auf die Expressionslevel von BDNF (CCI Vehikel ipsi vs. contra und CCI Hyp1 ipsi vs. contra:  $p > 0,9999$ ; pro Gruppe jeweils n = 4, Sham Vehikel ipsi:  $1,00 \pm 0,09$ , Sham Vehikel contra:  $1,00 \pm 0,03$ , Sham Hyp1 ipsi:  $0,94 \pm 0,06$ , Sham Hyp1 contra:  $1,14 \pm 0,02$ , CCI Vehikel ipsi:  $0,40 \pm 0,05$ , CCI Vehikel contra:  $0,89 \pm 0,04$ , CCI Hyp1 ipsi:  $0,46 \pm 0,08$ , CCI Hyp1 contra:  $0,86 \pm 0,05$ ).



## COX IV

Das Enzym Cytochrom c-Oxidase bildet den CIV der Atmungskette und ist somit ein Protein, welches in der Mitochondrienhülle lokalisiert ist. Die Untersuchung der Proteinexpression der vierten Untereinheit der Cytochrom c-Oxidase (COX IV) erlaubt daher Rückschlüsse auf den Mitochondriengehalt der jeweiligen Proben (*Abbildung 34 B, C*).

Hier ergeben sich keinerlei signifikante Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen. Somit ist davon auszugehen, dass die mitochondriale Konzentration zumindest bei Betrachtung der kompletten Hemisphäre nicht wesentlich durch ein CCI beeinflusst wird. Auch eine Hyp1-Behandlung wirkt sich nicht auf den Mitochondriengehalt aus (pro Gruppe jeweils  $n = 4$ , Sham Vehikel ipsi:  $1,00 \pm 0,24$ , Sham Vehikel contra:  $1,00 \pm 0,30$ , Sham Hyp1 ipsi:  $0,85 \pm 0,11$ , Sham Hyp1 contra:  $1,01 \pm 0,22$ , CCI Vehikel ipsi:  $1,43 \pm 0,47$ , CCI Vehikel contra:  $1,03 \pm 0,25$ , CCI Hyp1 ipsi:  $1,45 \pm 0,32$ , CCI Hyp1 contra:  $1,63 \pm 0,44$ ).



**Abbildung 34: BDNF- und COX IV-Expression am 5. postoperativen Tag**

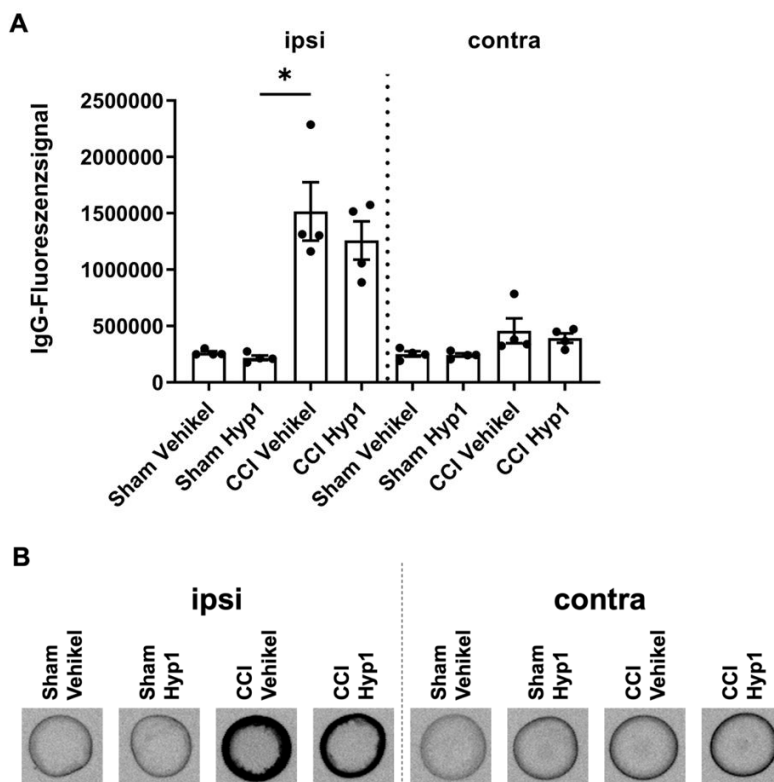
**A, B** Quantifizierung der Proteinbandenintensität von BDNF und COX IV, am 5. Tag nach CCI bzw. Scheinoperation, nach mehrmaliger i.p.-Applikation von Hyp1 oder der Vehikellösung nach Studienprotokoll, pro Gruppe  $n = 4$ , Mittelwerte  $\pm$  SEM, normalisiert zum Referenzprotein GAPDH, relativ zur Proteinexpression der jeweiligen Hemisphäre von Sham Vehikel, BDNF: Kruskal-Wallis-Test, Korrektur nach Dunn, COX IV: *one-way* ANOVA, Korrektur nach Holm-Šidák

**C** Repräsentativer Ausschnitt des Western Blots mit BDNF, COX IV und dem Referenzprotein GAPDH

## IgG-Dot Blot

Der Dot Blot zum Nachweis von IgG-Antikörpern als Indikator einer gestörten Integrität der BHS wird jeweils für die ipsi- und contraläsionale Seite getrennt und aufgrund fehlender

Normalverteilung mit dem Kruskal-Wallis-Test ausgewertet. Es zeigen sich sowohl in den ipsiläsionalen wie contraläsionalen Hemisphären höhere IgG-Fluoreszenzsignale nach CCI (*Abbildung 35*). Signifikant stellt sich diese Erhöhung der Werte nur zwischen den ipsiläsionalen Gruppen Sham Hyp1 und CCI Vehikel dar ( $p = 0,0227$ ). Die Werte der ipsiläsionalen Hemisphären der Hyp1-behandelten CCI-Tiere sind im Vergleich zu Hyp1-behandelten Sham-Tieren im Trend erhöht ( $p = 0,0561$ ). Auch bei Betrachtung der contraläsionalen Seite ist das IgG-Fluoreszenzsignal innerhalb der Gruppen CCI Vehikel ( $p = 0,0694$ ) und CCI Hyp1 ( $p = 0,0856$ ) gegenüber der Gruppe Sham Hyp1 im Trend erhöht. Ein CCI führt somit in der vorliegenden Arbeit erwartungsgemäß zu einem deutlichen Integritätsverlust der BHS, sowohl ipsiläsional als auch in geringerem Ausmaß contraläsional. Die Behandlung mit Hyp1 bewirkt dagegen keine signifikanten Unterschiede bzgl. der Integrität der BHS (pro Gruppe jeweils  $n = 4$ , Sham Vehikel ipsi:  $262205 \pm 12944$ , Sham Hyp1 ipsi:  $218231 \pm 20395$ , CCI Vehikel ipsi:  $1516638 \pm 259294$ , CCI Hyp1 ipsi:  $1258522 \pm 169489$ , Sham Vehikel contra:  $251363 \pm 23999$ , Sham Hyp1 contra:  $242622 \pm 15377$ , CCI Vehikel contra:  $456985 \pm 109984$ , CCI Hyp1 contra:  $393056 \pm 41823$ ).



**Abbildung 35: Integrität der BHS am 5. postoperativen Tag**

Detektion und Darstellung des IgG-Fluoreszenzsignals im Hirngewebe als Marker für die Integrität der BHS am 5. Tag nach OP und nach Studienprotokoll mehrfach i.p. appliziertem Hyp1 oder der Vehikellösung

**A** Quantifizierung des IgG-Fluoreszenzsignals (dimensionslos), pro Gruppe  $n = 4$ , Mittelwerte  $\pm$  SEM, getrennte Analyse der ipsi- bzw. contraläsionalen Hemisphäre jeweils mittels Kruskal-Wallis-Test, Korrektur nach Dunn, \*  $p < 0,05$

**B** Repräsentative Ausschnitte des Dot Blots mit murinem IgG

### 4.3.3 Molekularbiologische Analyse

Nachfolgend werden die Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchungen der mRNA-Expression mittels qPCR dargestellt. Verglichen werden jeweils nur die Proteinexpressionslevel der ipsiläsionalen Hemisphären, die untersuchte Gruppengröße umfasst unter allen Konditionen jeweils 4 Versuchstiere ( $n = 4$ ). Die Quantifizierungen aller analysierten Zielstrukturen werden normalisiert zur Genexpression des Referenzgens PPIA dargestellt. Wenn nicht anders beschrieben, erfolgt die statistische Analyse aller Gruppen untereinander mittels *one-way* ANOVA (Arc, BDNF, c-Fos, GADD45B, TRPC6: *Abbildung 36*; GFAP, IL-1 $\beta$ , IL-6, COX-2: *Abbildung 37*).

#### Arc

Bei der Analyse der mRNA-Expressionslevel von Arc zeigen sich zwischen den Gruppen keine signifikanten Unterschiede. Allerdings sinkt die mRNA-Expression in den CCI-Gruppen gegenüber den korrespondierenden Sham-Gruppen um 67 % (Sham Vehikel vs. CCI Vehikel,  $p = 0,2704$ ) bzw. 71 % (Sham Hyp1 vs. CCI Hyp1,  $p = 0,0684$ ) ab. Bei letztgenanntem Vergleich kann daher von einem statistischen Trend gesprochen werden (rel. Arc-mRNA-Expression, Mittelwerte  $\pm$  SEM: Sham Vehikel:  $0,000748 \pm 0,000241$ , Sham Hyp1:  $0,001049 \pm 0,000264$ , CCI Vehikel:  $0,000225 \pm 0,000041$ , CCI Hyp1:  $0,000296 \pm 0,000068$ ).

#### BDNF

Die quantitative Betrachtung des neuronalen Wachstumsfaktors BDNF zeigt signifikante Erniedrigungen der BDNF-Spiegel innerhalb der beiden CCI-Gruppen. Die Genexpression ist in der Gruppe CCI Vehikel um etwa 27 % erniedrigt gegenüber der Sham Gruppe bei Applikation der Vehikellösung ( $p = 0,0465$ ). Weiterhin ist eine signifikant niedrigere Genexpression in der Gruppe CCI Hyp1 gegenüber der Gruppe Sham Vehikel (-30 %,  $p = 0,0226$ ) und der Gruppe Sham Hyp1 (-32 %,  $p = 0,0378$ ) zu erkennen. Die 6-tägige i.p.-Behandlung mit Hyp1 bewirkt dagegen weder in den ipsiläsionalen Hemisphären der scheinoperierten Tiere noch der Tiere nach CCI statistisch signifikante Unterschiede (rel. BDNF-mRNA-Expression, Mittelwerte  $\pm$  SEM: Sham Vehikel:  $0,006183 \pm 0,000604$ , Sham Hyp1:  $0,005968 \pm 0,000156$ , CCI Vehikel:  $0,004503 \pm 0,000312$ , CCI Hyp1:  $0,004155 \pm 0,000396$ ).

#### c-Fos

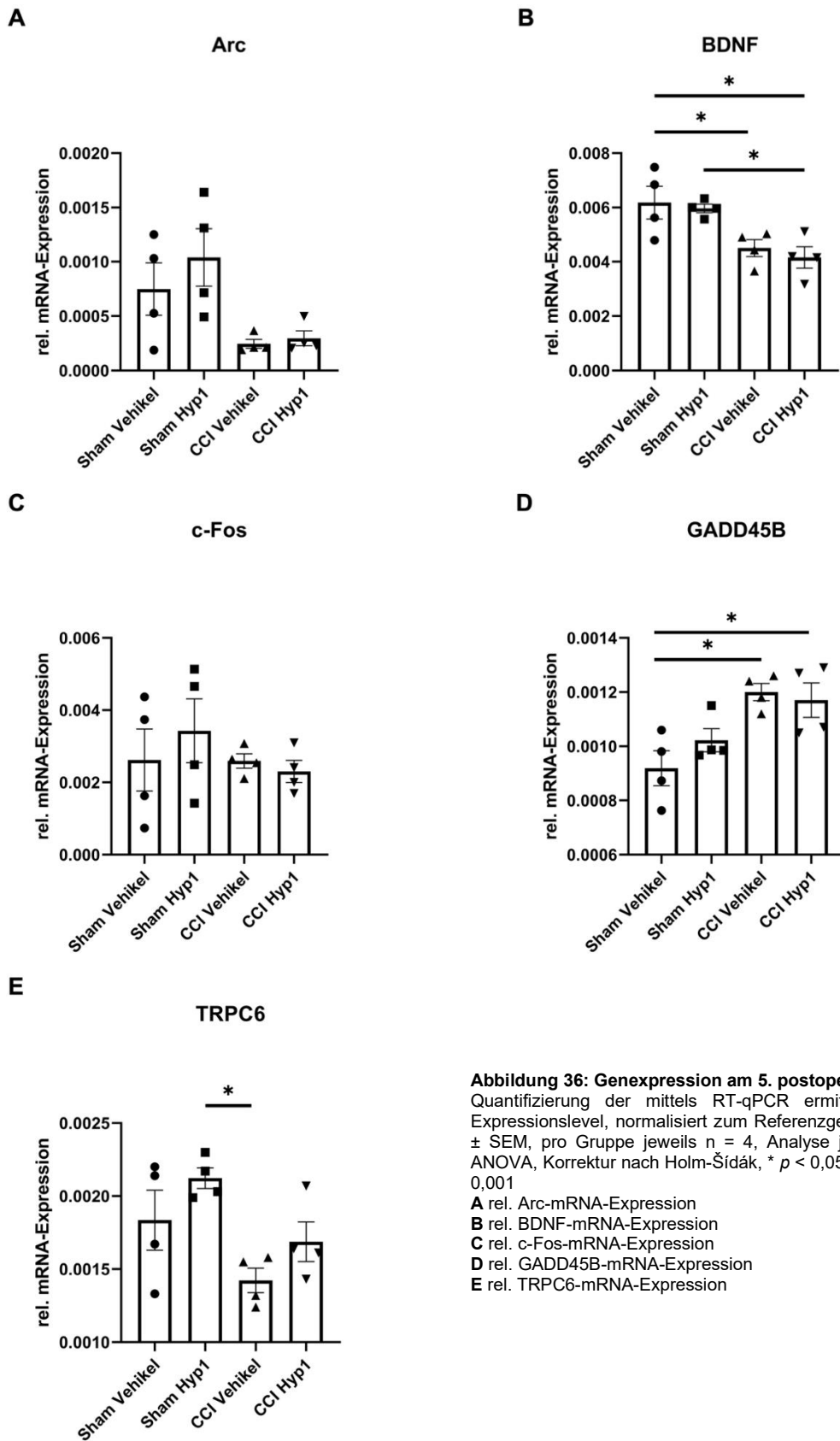
Bei der Betrachtung der mRNA-Expressionslevel des Protoonkogens c-Fos zeigen sich zwischen den Gruppen keinerlei signifikante Unterschiede (rel. c-Fos-Expression, Mittelwerte  $\pm$  SEM: Sham Vehikel:  $0,002619 \pm 0,000860$ , Sham Hyp1:  $0,003428 \pm 0,000883$ , CCI Vehikel:  $0,002593 \pm 0,000199$ , CCI Hyp1:  $0,002303 \pm 0,000303$ ).

### GADD45B

Die Genexpressionslevel von GADD45B sind 5 Tage nach CCI in beiden CCI-Gruppen gegenüber den Sham-Gruppen erhöht. Eine signifikante Erhöhung der mRNA-Level zeigt sich in der Gruppe CCI Vehikel gegenüber Sham Vehikel (um ca. 30%,  $p = 0,0159$ ) und in der CCI Hyp1-Gruppe gegenüber Sham Vehikel (um ca. 27%,  $p = 0,0276$ ). Die Behandlung mit Hyp1 bewirkt dagegen keine signifikanten Unterschiede bezüglich der GADD45B-Genexpression (rel. GADD45B-mRNA-Expression, Mittelwerte  $\pm$  SEM: Sham Vehikel:  $0,000919 \pm 0,000065$ , Sham Hyp1:  $0,001022 \pm 0,000043$ , CCI Vehikel:  $0,001200 \pm 0,000032$ , CCI Hyp1:  $0,001200 \pm 0,000064$ ).

### TRPC6

Die Genexpression des TRPC6 zeigt nur beim Vergleich der Gruppen Sham Hyp1 und CCI Vehikel signifikant höhere Werte in der Sham-Gruppe ( $p = 0,0192$ ). Wenn auch die TRPC6-Expression der ipsiläsionalen Hemisphären nach CCI im Mittel geringere Werte annimmt als nach der Scheinoperation und die Mittelwerte nach Hyp1-Behandlung unabhängig der Operationsart leicht höher liegen, können hier keine statistisch signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden (rel. TRPC6-mRNA-Expression, Mittelwerte  $\pm$  SEM: Sham Vehikel:  $0,001835 \pm 0,000206$ , Sham Hyp1:  $0,002123 \pm 0,000071$ , CCI Vehikel:  $0,001423 \pm 0,000084$ , CCI Hyp1:  $0,001688 \pm 0,000136$ ).



**Abbildung 36: Genexpression am 5. postoperativen Tag**

Quantifizierung der mittels RT-qPCR ermittelten rel. mRNA-Expressionslevel, normalisiert zum Referenzgen PPIA, Mittelwerte  $\pm$  SEM, pro Gruppe jeweils  $n = 4$ , Analyse jeweils mit *one-way* ANOVA, Korrektur nach Holm-Šidák, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$

- A** rel. Arc-mRNA-Expression
- B** rel. BDNF-mRNA-Expression
- C** rel. c-Fos-mRNA-Expression
- D** rel. GADD45B-mRNA-Expression
- E** rel. TRPC6-mRNA-Expression

### GFAP

Die mRNA-Expression von GFAP als Marker für astrozytäre Aktivität ist in den beiden CCI-Gruppen gegenüber der in den scheinoperierten Tieren deutlich erhöht. Aufgrund fehlender Normalverteilung erfolgt die Auswertung mittels Kruskal-Wallis-Test. Eine signifikante Steigerung der Genexpression zeigt sich im Vergleich der Gruppe CCI Vehikel gegenüber der Gruppe Sham Vehikel (ca. 13-fache Erhöhung,  $p = 0,0225$ ). Die 6-tägige Behandlung mit Hyp1 bewirkt bei keiner der Operationsarten Sham oder CCI einen signifikanten Unterschied gegenüber der Injektion der Vehikellösung (rel. GFAP-mRNA-Expression, Mittelwerte  $\pm$  SEM: Sham Vehikel:  $0,000248 \pm 0,000034$ , Sham Hyp1:  $0,000279 \pm 0,000017$ , CCI Vehikel:  $0,003488 \pm 0,000265$ , CCI Hyp1:  $0,003073 \pm 0,000145$ ).

### IL-1 $\beta$

Die mRNA-Expressionslevel des pro-inflammatorischen IL-1 $\beta$  sind in den CCI-Gruppen gegenüber den Gruppen der scheinoperierten Tiere erhöht. Da keine Normalverteilung der Werte vorliegt, erfolgt der Vergleich mittels Kruskal-Wallis-Test. Eine signifikant erhöhte IL-1 $\beta$ -Genexpression zeigt sich nur bei der Betrachtung der Gruppe CCI Vehikel gegenüber der mit Hyp1 behandelten Sham-Gruppe jeweils 5 Tage nach der Operation ( $p = 0,0360$ ). Es zeigen sich keinerlei signifikante Unterschiede, die sich aus einer Behandlung mit Hyp1 ergeben – sowohl zwischen den Sham-Gruppen als auch zwischen den beiden CCI-Gruppen (rel. IL-1 $\beta$ -mRNA-Expression, Mittelwerte  $\pm$  SEM: Sham Vehikel:  $0,000237 \pm 0,000013$ , Sham Hyp1:  $0,000223 \pm 0,000036$ , CCI Vehikel:  $0,000576 \pm 0,000112$ , CCI Hyp1:  $0,000553 \pm 0,000179$ ).

### IL-6

Das ebenfalls pro-inflammatorische Zytokin IL-6 zeigt sich in den CCI-Gruppen gegenüber den korrespondierenden Sham-Gruppen signifikant erhöht (Sham Vehikel vs. CCI Vehikel: Erhöhung um ca. 147 %,  $p = 0,0004$ ; Sham Hyp1 vs. CCI Hyp1: Erhöhung um ca. 126 %,  $p = 0,0005$ ). Signifikant höhere Werte zeigen sich auch im Vergleich der Gruppe CCI Vehikel gegenüber Sham Hyp1 ( $p = 0,0004$ ) und der Gruppe CCI Hyp1 gegenüber Sham Vehikel ( $p = 0,0005$ ).

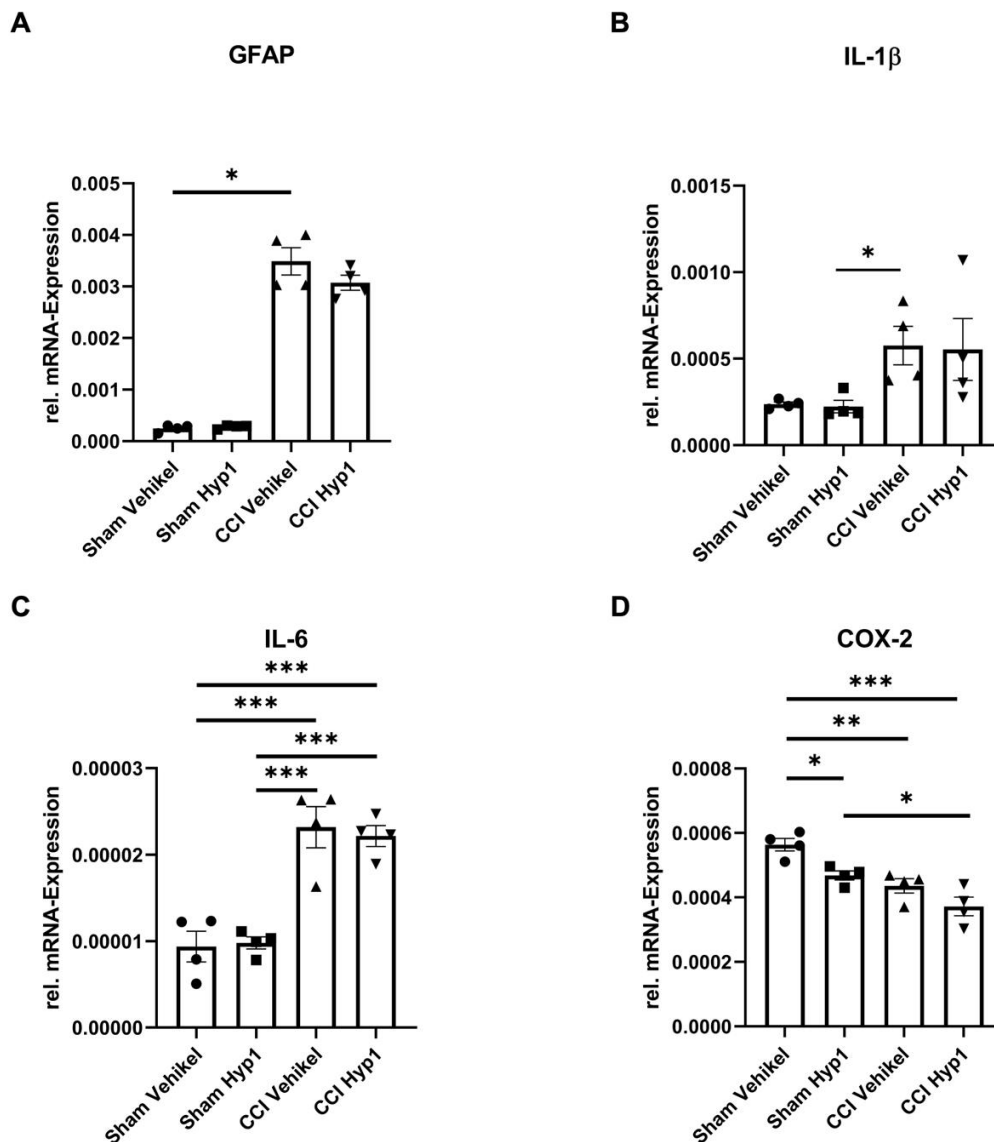
Keine signifikanten Unterschiede zeigen sich durch die Behandlung mit Hyp1 gegenüber der Vehikellösung sowohl zwischen den Sham-Gruppen als auch zwischen den CCI-Gruppen (rel. IL-6-mRNA-Expression, Mittelwerte  $\pm$  SEM: Sham Vehikel:  $0,0000094 \pm 0,0000017$ , Sham Hyp1:  $0,0000098 \pm 0,0000007$ , CCI Vehikel:  $0,0000232 \pm 0,0000024$ , CCI Hyp1:  $0,0000222 \pm 0,0000012$ ).

### COX-2

Die Genexpression des Enzyms COX-2 ist in beiden CCI-Gruppen gegenüber den korrespondierenden Sham-Gruppen signifikant vermindert (CCI Vehikel vs. Sham Vehikel: ca. -

22 %,  $p = 0,007$ ; CCI Hyp1 vs. Sham Hyp1: ca. -21 %). Weiterhin zeigt sich eine signifikant erniedrigte COX-2-mRNA-Expression in der Gruppe CCI Hyp1 gegenüber der Gruppe Sham Vehikel (ca. -33 %,  $p = 0,0003$ ).

Zudem zeigt sich eine im Mittel verminderte mRNA-Expression bei Behandlung mit Hyp1 sowohl nach erfolgtem CCI als auch nach erfolgter Scheinoperation, die sich nur bei Betrachtung der Sham-Gruppen signifikant zeigt (ca. -16 %,  $p = 0,0351$ ; rel. COX-2-mRNA-Expression, Mittelwerte  $\pm$  SEM: Sham Vehikel:  $0,000564 \pm 0,000020$ , Sham Hyp1:  $0,000468 \pm 0,000014$ , CCI Vehikel:  $0,000436 \pm 0,000022$ , CCI Hyp1:  $0,000372 \pm 0,000029$ ).



**Abbildung 37: Genexpression am 5. postoperativen Tag**

Quantifizierung der mittels RT-qPCR ermittelten rel. mRNA-Expressionslevel, normalisiert zum Referenzgen PPIA, pro Gruppe jeweils  $n = 4$ , Mittelwerte  $\pm$  SEM, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$

**A** rel. GFAP-mRNA-Expression, Kruskal-Wallis-Test, Korrektur nach Dunn

**B** rel. IL-1 $\beta$ -mRNA-Expression, Kruskal-Wallis-Test, Korrektur nach Dunn

**C** rel. IL-6-mRNA-Expression, *one-way* ANOVA, Korrektur nach Holm-Šidák

**D** rel. COX-2-mRNA-Expression, *one-way* ANOVA, Korrektur nach Holm-Šidák

#### 4.3.4 Respirometrie

Die in diesem Kapitel dargestellten Werte entsprechen Mittelwerten des absoluten Sauerstoffverbrauchs (in  $\text{pmol O}_2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{mg Hirngewebe}^{-1}$ ) oder FCRs (jeweiliger Atmungsstatus relativ zu  $\text{ETS}_{\text{CI+II}}$ ), jeweils  $\pm$  SEM.

Verglichen werden jeweils die 8 Konditionen Sham Vehikel ipsi / contra, Sham Hyp1 ipsi / contra, CCI Vehikel ipsi / contra und CCI Hyp1 ipsi / contra.

Bei Betrachtung der mitochondrialen Atmung des am 5. Tag nach erfolgtem CCI oder erfolgter Scheinoperation gewonnenen Hirngewebes anhand des absoluten Sauerstoffverbrauchs in  $\text{pmol O}_2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  wird aufgrund fehlender Normalverteilung der Kruskal-Wallis-Test herangezogen. Zwischen keinen der betrachteten Gruppen treten signifikante Unterschiede auf (*Tabelle 25*). Ebenso finden sich im verwendeten Kruskal-Wallis-Test keine signifikanten Unterschiede bei Vergleich der entsprechenden FCRs, die zum Atmungsstatus  $\text{ETS}_{\text{CI+II}}$  normalisiert sind (*Tabelle 26*).

	$\text{pmol O}_2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$			
	Sham Vehikel		Sham Hyp1	
	ipsi (n = 4)	contra (n = 4)	ipsi (n = 2)	contra (n = 1)
$\text{OXPHOS}_{\text{CI}}$	$14,60 \pm 2,55$	$18,31 \pm 3,91$	$11,47 \pm 6,69$	$18,08 \pm 0,00$
$\text{OXPHOS}_{\text{CI+II}}$	$51,92 \pm 9,87$	$65,87 \pm 6,79$	$39,49 \pm 13,84$	$52,19 \pm 0,00$
LEAK	$24,19 \pm 2,27$	$28,03 \pm 2,65$	$28,89 \pm 0,67$	$25,91 \pm 0,00$
$\text{ETS}_{\text{CI+II}}$	$65,64 \pm 6,28$	$79,01 \pm 8,32$	$60,61 \pm 1,08$	$63,17 \pm 0,00$
$\text{ETS}_{\text{CII}}$	$41,20 \pm 4,77$	$48,13 \pm 4,38$	$38,23 \pm 5,03$	$35,13 \pm 0,00$
	CCI Vehikel		CCI Hyp1	
	ipsi (n = 4)	contra (n = 4)	ipsi (n = 3)	contra (n = 4)
	$\text{OXPHOS}_{\text{CI}}$	$10,78 \pm 3,38$	$16,11 \pm 4,17$	$11,85 \pm 3,61$
$\text{OXPHOS}_{\text{CI+II}}$	$39,69 \pm 10,56$	$55,16 \pm 12,91$	$46,45 \pm 2,85$	$54,21 \pm 8,52$
LEAK	$17,63 \pm 1,77$	$25,92 \pm 1,80$	$20,29 \pm 1,95$	$31,05 \pm 4,48$
$\text{ETS}_{\text{CI+II}}$	$47,98 \pm 4,74$	$69,99 \pm 7,85$	$50,69 \pm 2,86$	$63,49 \pm 6,32$
$\text{ETS}_{\text{CII}}$	$33,62 \pm 2,37$	$45,36 \pm 4,72$	$34,09 \pm 4,85$	$38,68 \pm 5,71$

**Tabelle 25: Mitochondriale Atmungsaktivität in Hirngewebe am 5. postoperativen Tag (absoluter Sauerstoffverbrauch)**

Respirometrische Untersuchung von Hirngewebe nach Entnahme am 5. postoperativen Tag nach erfolgtem CCI oder erfolgter Scheinoperation unter mehrfacher i.p.-Injektion von Hyp1 dem Studienprotokoll entsprechend, mitochondriale Atmungsaktivität dargestellt als absoluter Sauerstoffverbrauch in  $\text{pmol O}_2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$

Vergleich von jeweils 8 verschiedenen Konditionen (Sham Vehikel ipsi / contra, Sham Hyp1 ipsi / contra, CCI Vehikel ipsi / contra, CCI Hyp1 ipsi / contra) in definierten Atmungsstatus nach Titration von Substraten, Entkopplern und Inhibitoren dem SUIT-Protokoll entsprechend, Mittelwerte  $\pm$  SEM, Analyse jeweils pro Atmungsstatus mittels Kruskal-Wallis-Test



	<i>Flux Control Ratio (relativ zu ETS<sub>CI+II</sub>)</i>			
	Sham Vehikel		Sham Hyp1	
	ipsi (n = 4)	contra (n = 4)	ipsi (n = 2)	contra (n = 1)
OXPHOS <sub>CI</sub>	0,22 ± 0,03	0,23 ± 0,03	0,19 ± 0,11	0,29 ± 0,00
OXPHOS <sub>CI+II</sub>	0,76 ± 0,10	0,83 ± 0,01	0,65 ± 0,22	0,83 ± 0,00
LEAK	0,37 ± 0,00	0,36 ± 0,02	0,39 ± 0,02	0,41 ± 0,00
ETS <sub>CI</sub>	0,63 ± 0,03	0,61 ± 0,03	0,63 ± 0,09	0,56 ± 0,00
	CCI Vehikel		CCI Hyp1	
	ipsi (n = 4)	contra (n = 4)	ipsi (n = 3)	contra (n = 4)
	OXPHOS <sub>CI</sub>	0,21 ± 0,05	0,22 ± 0,04	0,24 ± 0,08
OXPHOS <sub>CI+II</sub>	0,78 ± 0,17	0,76 ± 0,12	0,92 ± 0,07	0,84 ± 0,07
LEAK	0,37 ± 0,03	0,38 ± 0,02	0,40 ± 0,02	0,50 ± 0,07
ETS <sub>CI</sub>	0,71 ± 0,03	0,65 ± 0,01	0,67 ± 0,06	0,60 ± 0,04

**Tabelle 26: Mitochondriale Atmungsaktivität in Hirngewebe am 5. postoperativen Tag (FCR)**

Respirometrische Untersuchung von Hirngewebe nach Entnahme am 5. postoperativen Tag nach erfolgtem CCI oder erfolgter Scheinoperation unter mehrfacher i.p.-Injektion von Hyp1 dem Studienprotokoll entsprechend, mitochondriale Atmungsaktivität dargestellt als FCR, normalisiert zum Atmungsstatus ETS<sub>CI+II</sub>

Vergleich von jeweils 8 verschiedenen Konditionen (Sham Vehikel ipsi / contra, Sham Hyp1 ipsi / contra, CCI Vehikel ipsi / contra, CCI Hyp1 ipsi / contra) in definierten Atmungsstatus nach Titration von Substraten, Entkopplern und Inhibitoren dem SUIT-Protokoll entsprechend, Mittelwerte ±SEM, Analyse jeweils pro Atmungsstatus mittels Kruskal-Wallis-Test

Es zeigen sich jedoch auch unabhängig von der Behandlung mit Hyp1 oder der Trägerlösung bei Betrachtung der Werte des absoluten Sauerstoffverbrauchs in einigen Atmungsstatus teils deutlich niedrigere Werte in der Untersuchung des Hirngewebes der ipsiläsionalen Seite nach CCI gegenüber den übrigen Konditionen. Daher werden die entsprechenden Sauerstoffverbrauchswerte unabhängig von der medikamentösen Behandlung zusammengefügt und nur nach der durchgeführten Operationsart (CCI bzw. Sham) und Hemisphäre (ipsi bzw. contra) verglichen (*Tabelle 27, Abbildung 38*). Hierbei zeigen sich in den Atmungsstatus LEAK und ETS<sub>CI+II</sub> jeweils signifikant niedrigere Werte in den ipsiläsionalen Hemisphären der CCI-Tiere gegenüber den contraläsionalen Hemisphären der Sham- und CCI-Tiere (LEAK: CCI ipsi vs. Sham contra:  $p = 0,0177$ , CCI ipsi vs. CCI contra:  $p = 0,0079$ ; ETS<sub>CI+II</sub>: CCI ipsi vs. Sham contra:  $p = 0,0059$ , CCI ipsi vs. CCI contra:  $p = 0,0476$ ). Bei identischem Vorgehen bei Betrachtung der entsprechenden FCR-Werte zeigen sich keinerlei signifikante Unterschiede. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass am 5. Tag nach CCI in der Maus die mitochondriale Funktion bzw. die mitochondriale Dichte beeinträchtigt ist, ohne dass sich jedoch die Funktionalität der einzelnen Komplexe der Atmungskette wesentlich verändert darstellt.

	pmol O <sub>2</sub> · s <sup>-1</sup> · mg <sup>-1</sup>			
	Sham ipsi (n = 6)	Sham contra (n = 5)	CCI ipsi (n = 7)	CCI contra (n = 8)
OXPHOS <sub>Cl</sub>	13,56 ± 2,45	18,27 ± 3,03	11,24 ± 2,27	15,55 ± 2,41
OXPHOS <sub>Cl+II</sub>	47,78 ± 7,65	63,13 ± 5,93	42,59 ± 5,91	54,68 ± 7,16
LEAK	24,09 ± 1,45	27,60 ± 2,09	18,77 ± 1,32*##	28,48 ± 2,44
ETS <sub>Cl+II</sub>	63,97 ± 4,12	75,84 ± 7,18	49,14 ± 2,81*#	66,74 ± 4,82
ETS <sub>ClI</sub>	40,21 ± 3,34	45,53 ± 4,27	33,82 ± 2,23	42,02 ± 3,65

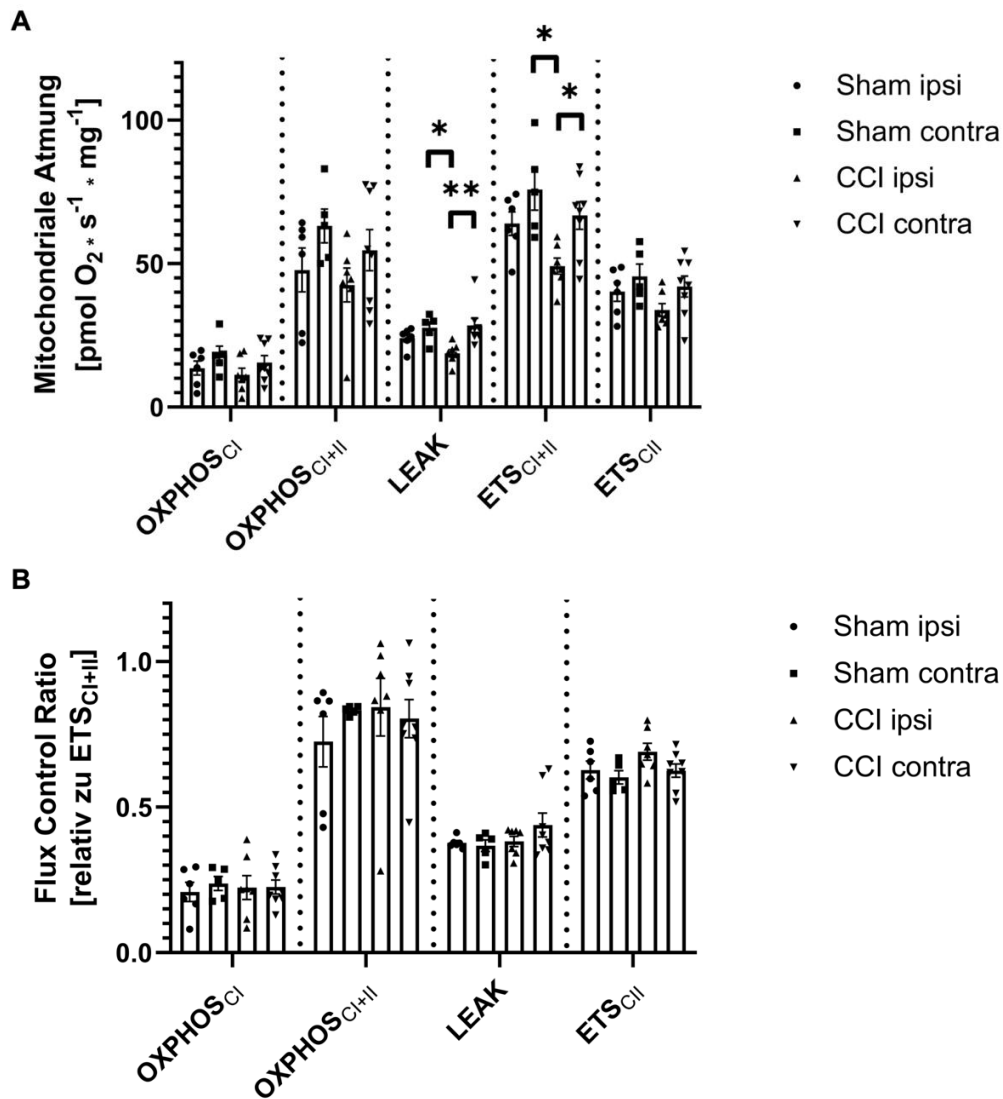
	Flux Control Ratio (relativ zu ETS <sub>Cl+II</sub> )			
	Sham ipsi (n = 6)	Sham contra (n = 5)	CCI ipsi (n = 7)	CCI contra (n = 8)
OXPHOS <sub>Cl</sub>	0,21 ± 0,03	0,24 ± 0,02	0,22 ± 0,04	0,23 ± 0,02
OXPHOS <sub>Cl+II</sub>	0,73 ± 0,09	0,83 ± 0,01	0,84 ± 0,10	0,80 ± 0,07
LEAK	0,38 ± 0,01	0,37 ± 0,02	0,38 ± 0,02	0,44 ± 0,04
ETS <sub>ClI</sub>	0,63 ± 0,03	0,60 ± 0,02	0,69 ± 0,03	0,63 ± 0,02

**Tabelle 27: Mitochondriale Atmungsaktivität in Hirngewebe am 5. postoperativen Tag, unabhängig von medikamentöser Behandlung**

Respirometrische Untersuchung von Hirngewebe nach Entnahme am 5. postoperativen Tag nach erfolgtem CCI oder erfolgter Scheinoperation unter mehrfacher i.p.-Injektion von Hyp1 oder DMSO dem Studienprotokoll entsprechend, Vergleich von 4 verschiedenen Konditionen (Sham ipsi / contra, CCI ipsi / contra) in definierten Atmungsstatus nach Titration von Substraten, Entkopplern und Inhibitoren dem SUI-Protokoll entsprechend

**oben:** dargestellt als absoluter Sauerstoffverbrauch in pmol O<sub>2</sub> · s<sup>-1</sup> · Million Zellen<sup>-1</sup>, Mittelwerte ± SEM, OXPHOS<sub>Cl</sub>, OXPHOS<sub>Cl+II</sub>, ETS<sub>Cl+II</sub>, ETS<sub>ClI</sub>: *one-way* ANOVA, Korrektur nach Holm-Šidák; LEAK: Kruskal-Wallis-Test, Korrektur nach Dunn, Signifikanz zu Sham contra: \* *p* < 0,05, \*\* *p* < 0,01, Signifikanz zu CCI contra: # *p* < 0,05

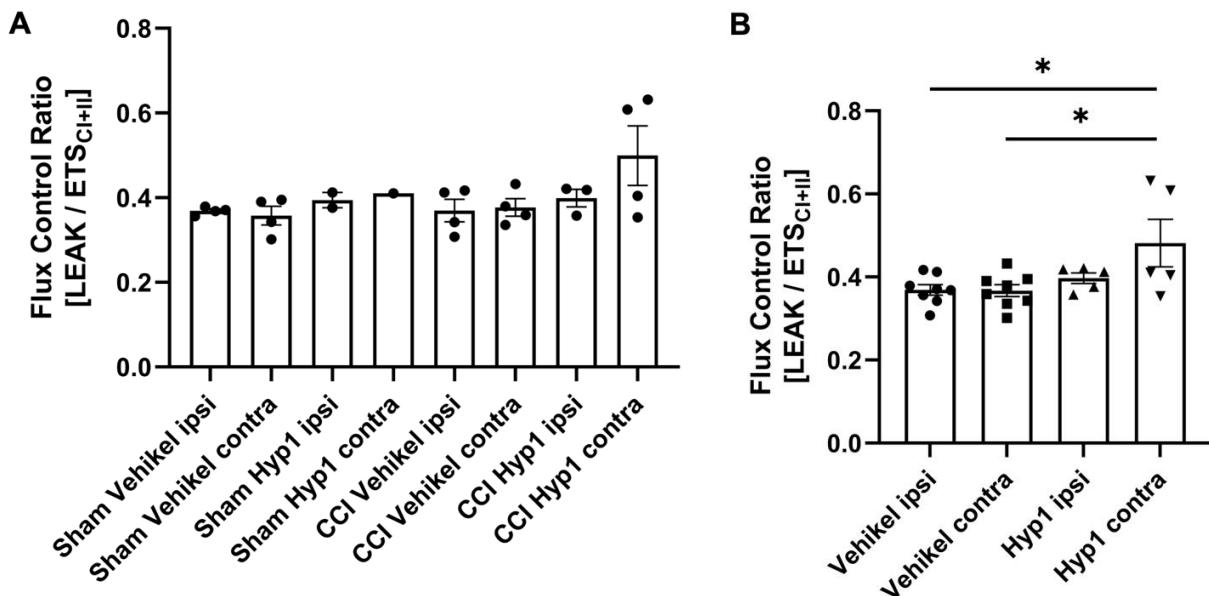
**unten:** dargestellt als FCR, normalisiert zum Atmungsstatus, Mittelwerte ± SEM, ETS<sub>Cl+II</sub>, OXPHOS<sub>Cl</sub>, ETS<sub>ClI</sub>: *one-way* ANOVA, Korrektur nach Holm-Šidák; OXPHOS<sub>Cl+II</sub>, LEAK: Kruskal-Wallis-Test, Korrektur nach Dunn



**Abbildung 38: Mitochondriale Atmungsaktivität in Hirngewebe am 5. postoperativen Tag, unabhängig von medikamentöser Behandlung**

Respirometrische Untersuchung von Hirngewebe nach Entnahme am 5. postoperativen Tag nach erfolgtem CCI oder erfolgter Scheinoperation unter mehrfacher i.p.-Injektion von Hyp1 oder DMSO dem Studienprotokoll entsprechend, Vergleich von 4 verschiedenen Konditionen (Sham ipsi (n = 6) / contra (n = 5), CCI ipsi (n = 7) / contra (n = 8)) in definierten Atmungsstatus nach Titration von Substraten, Entkopplern und Inhibitoren dem SUIT-Protokoll entsprechend **A** dargestellt als absoluter Sauerstoffverbrauch in pmol O<sub>2</sub> · s<sup>-1</sup> · Million Zellen<sup>-1</sup>, Mittelwerte ± SEM, OXPHOS<sub>Ci</sub>, OXPHOS<sub>Ci+II</sub>, ETS<sub>Ci+II</sub>, ETS<sub>CII</sub>: *one-way* ANOVA, Korrektur nach Holm-Šidák; LEAK: Kruskal-Wallis-Test, Korrektur nach Dunn \* *p* < 0,05, \*\* *p* < 0,01 **B** dargestellt als FCR, normalisiert zum Atmungsstatus, Mittelwerte ± SEM, ETS<sub>Ci+II</sub>, OXPHOS<sub>Ci</sub>, ETS<sub>CII</sub>: *one-way* ANOVA, Korrektur nach Holm-Šidák; OXPHOS<sub>Ci+II</sub>, LEAK: Kruskal-Wallis-Test, Korrektur nach Dunn

Weiterhin finden sich im Vergleich aller 8 Konditionen im Atmungsstatus LEAK stets höhere FCR-Werte in den Hyp1-behandelten Tieren als in den Tieren, denen die Vehikellösung injiziert worden ist. Dies ist nicht abhängig davon, ob die Tiere ein CCI erhalten haben oder scheinoperiert worden sind. Aus diesem Grund werden die FCR-Werte der jeweils ipsi- bzw. contraläsionalen Vehikel- und Hyp1-Gruppen unabhängig von der durchgeführten Operationsart zusammengefügt. Es zeigen sich jeweils erhöhte Werte im LEAK-Atmungsstatus in den Hyp1-behandelten Tieren, signifikant zeigt sich dieser Unterschied in der *one-way* ANOVA jeweils zwischen der Gruppe Hyp1 contra und den Gruppen Vehikel ipsi und Vehikel contra (jeweils  $p = 0,0278$ ; FCR-Werte im LEAK-Atmungsstatus: Vehikel ipsi ( $n = 8$ ):  $0,37 \pm 0,01$ , Vehikel contra ( $n = 8$ ):  $0,37 \pm 0,01$ , Hyp1 ipsi ( $n = 5$ ):  $0,40 \pm 0,01$ , Hyp1 contra ( $n = 5$ ):  $0,48 \pm 0,06$ ).



**Abbildung 39: Mitochondriale Atmungsaktivität in Hirngewebe am 5. postoperativen Tag innerhalb des LEAK-Atmungsstatus** dargestellt als FCR, normalisiert zum Atmungsstatus  $ETS_{CI+II}$

**A** Betrachtung aller 8 verschiedenen Konditionen (Sham Vehikel ipsi ( $n = 4$ ) / contra ( $n = 4$ ), Sham Hyp1 ipsi ( $n = 2$ ) / contra ( $n = 1$ ), CCI Vehikel ipsi ( $n = 4$ ) / contra ( $n = 4$ ), CCI Hyp1 ipsi ( $n = 3$ ) / contra ( $n = 4$ )), Mittelwerte  $\pm$  SEM, Analyse jeweils pro Atmungsstatus mittels Kruskal-Wallis-Test

**B** Betrachtung der jeweils ipsi- und contraläsionalen Hemisphären der Behandlungsoptionen Vehikel und Hyp1, unabhängig von der operativen Intervention CCI oder Scheinoperation, Vehikel ipsi:  $n = 8$ , Vehikel contra:  $n = 8$ , Hyp1 ipsi:  $n = 5$ , Hyp1 contra:  $n = 5$ , Mittelwerte  $\pm$  SEM, *one-way* ANOVA, Korrektur nach Holm-Sídák, \*  $p < 0,05$

## 5. Diskussion

### 5.1 Einfluss von Hyp1 auf die Neuroinflammation

Da der Neuroinflammation bei der Entstehung und Entwicklung des Sekundärschadens nach SHT eine tragende Rolle zugesprochen wird, ist die Modulation dieser Entzündungsreaktion ein vorrangiges Ziel in der aktuellen experimentellen Forschung des SHT. Begründet in der Tatsache, dass es sich bei der posttraumatischen Neuroinflammation um eine sterile Entzündung des Hirngewebes in Abwesenheit von Krankheitserregern handelt, ist es nötig, direkt in den Entzündungsprozess, also dessen Entstehung sowie dessen Aufrechterhaltung in der Phase nach dem eigentlichen Trauma, regulierend einzugreifen.

Grundsätzlich ist davon auszugehen, dass die Neuroinflammation infolge des SHT ein notwendiger Prozess ist, der dazu dient, geschädigtes Hirngewebe abzubauen und die Reorganisation und Regeneration zu fördern. Allerdings kommt es infolge eines SHT teils zu einer übermäßigen und verlängerten Entzündungsreaktion, die das Gehirn dauerhaft beeinträchtigt und somit maßgeblich mit der Schwere des sich entwickelnden Sekundärschadens und etlicher damit in Verbindung stehender Pathologien nach SHT wie Demenz oder Epilepsie zu korrelieren scheint. Die Priorität in der Behandlung liegt vorrangig nicht in der kompletten Unterbindung der posttraumatischen Neuroinflammation, sondern vielmehr in der Modulation und der Verhinderung einer übermäßigen und chronischen Aktivierung der Entzündungskaskaden (12, 104).

Der Ablauf von Entzündungsvorgängen sowie die Reaktion einzelner Zelltypen auf die Gabe eines zu evaluierenden Wirkstoffs lässt sich in Zellkulturen nachvollziehen, weshalb in der vorliegenden Arbeit auf Mikrogliazellkulturen und primäre Gliazellkulturen zurückgegriffen wird, den Hauptakteuren im Rahmen der Neuroinflammation. Da SIM-A9-Zellen alle von Mikroglia bekannten Signalwege bzgl. der Neuroinflammation abbilden, sind diese somit für die gezielte Untersuchung mikroglialer Zellen *in vitro* geeignet (232). Die Untersuchung astrozytärer Beteiligung sowie des Zusammenspiels der Astrozyten und Mikroglia im Rahmen der Neuroinflammation lässt sich durch zusätzliche Betrachtung primärer Gliazellkulturen erreichen. Dennoch kann die *in-vitro*-Betrachtung der Gliazellen hier nur als Modell für Entzündungsreaktionen und den darauf vermuteten Einfluss von Hyp1 dienen, da die exakte Simulation eines SHT in Zellkulturen kaum möglich ist. Die Stimulation der Zellkulturen erfolgt in der vorliegenden Arbeit durch das bakterielle Endotoxin LPS. Die Einleitung der Inflammationsreaktion auf LPS wird durch den Rezeptor TLR4, welcher zu den PRPs gehört, vermittelt (112). In vorangegangenen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass TLR4 ebenso eine wichtige Rolle bzgl. der Neurodegeneration und der Initiierung steriler Neuroinflammation im Rahmen eines SHT spielt, weshalb die Stimulation der verwendeten Zellkulturen mit LPS dennoch

geeignet ist, eine sterile Entzündungsreaktion, wie sie im Rahmen eines SHT auftritt, nachzuahmen (238, 239).

Nach LPS-Stimulation in SIM-A9-Zellen kann eine massive Steigerung der COX-2-Proteinexpression beobachtet werden, einem Enzym, das der Prostaglandinsynthese dient und daher gemeinhin als pro-inflammatorischer M1-Marker herangezogen wird (114). Die zusätzliche Behandlung der Mikroglia mit Hyp1 über 24 h führt zu einer signifikanten Steigerung der COX-2-Expression, was folglich für eine gesteigerte pro-inflammatorische Aktivierung der SIM-A9-Mikroglia unter Hyp1-Behandlung spricht. Ein ähnliches Bild zeigt sich nach LPS-Stimulation primärer Gliazellkulturen. Zusätzlich lassen sich in primären Gliazellkulturen unter Hyp1-Applikation tendenziell höhere Expressionslevel der durch Phosphorylierung aktivierten Form des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B nachweisen, der neben der Genexpression des COX-2 auch die Genexpression der pro-inflammatorischen Interleukine IL-6 und iNOS reguliert (240, 241). Wenn auch dieser mögliche Effekt des Hyp1 auf die Expression des phosphorylierten NF- $\kappa$ B p65 nicht signifikant ist, so zeigt sich in der Analyse der mRNA-Expression unter der Hyp1-Applikation eine signifikant höhere Expression des IL-6 in Mikroglia 24 h nach LPS-Stimulation. Jedoch sind keine Unterschiede in der mRNA-Expression der Enzyme COX-2 und iNOS nachzuweisen.

In der Zusammenschau lassen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit den Schluss zu, dass das Diacylphloroglucinol Hyp1 die pro-inflammatorische Aktivierung von Mikroglia durch LPS verstärkt. Diese Erkenntnis kontrastiert mit den Ergebnissen einiger neuerer Studien, die zwar nicht dem Hyp1, wohl aber der Substanz Hyperforin anti-inflammatorische Eigenschaften attestieren. So konnte in PC12-Zellen durch Hyperforin eine Reduktion bspw. der Enzyme Superoxiddismutase und Katalase, sowie von NF- $\kappa$ B und IL-1 $\beta$  – allesamt pro-inflammatorische Marker – gezeigt werden, in Leukozyten kam es durch Hyperforingabe zur Inhibition der COX I und 5-LO (213, 215).

Auf der anderen Seite konnte dagegen in einer vorangegangenen Studie dargelegt werden, dass der Kationenkanal TRPC6, der sowohl durch Hyperforin als auch Hyp1 aktiviert wird (24), in bronchialen Epithelzellen zu einer gesteigerten Entzündungsaktivität und unter anderem einer vermehrten Expression von IL-6, IL-8 und NF- $\kappa$ B nach Stimulation mit LPS beiträgt. Erklärt wird dies zum einen durch die TRPC6-vermittelte Aktivierung pro-inflammatorischer Signalwege infolge vermehrten oxidativen Stresses, zum anderen durch eine LPS-vermittelte Überexpression von TRPC6 (218, 242). Diese Erkenntnisse passen zu der in der vorliegenden Arbeit nachgewiesenen Steigerung pro-inflammatorischer Marker in Gliazellkulturen. Allerdings bewirkt weder die Stimulation mit LPS noch die Zugabe von Hyp1 eine signifikante Veränderung der Expressionslevel des TRPC6 in SIM-A9-Mikroglia.

Weiterhin bleibt die Einordnung der hier gezeigten Erhöhungen von COX-2 und IL-6 in Gliazellkulturen durch Hyp1 hinsichtlich deren Auswirkung auf eine pro-inflammatorische Aktivierung unklar. In früheren Studien wurde eine Verringerung der Expressionslevel von COX-2, IL-6 und iNOS in Mikroglia kulturen durch die Substanzen Resveratrol, Honokiol oder Pifithrin aufgrund der verringerten inflammatorischen Aktivität als neuroprotektiv bewertet (243-245). Eine weitere Studie bringt eine TRPC6-abhängige Steigerung der COX-2 in BV-2 Mikroglia mit einem daraus resultierenden hippocampalen neuronalen Schaden in Verbindung (246). Andere Forschungsarbeiten kommen zu einer davon abweichenden Schlussfolgerung. Yang et al. konnten in LPS-stimulierten Mikrogliazellen von Ratten eine erhöhte COX-2-Expression mit gesteigertem mikroglialem Zelltod in Verbindung bringen, welcher in der Folge wiederum eine überschießende Neuroinflammation abschwächen könnte (118).

Darüber hinaus ist sicherlich die bedeutende physiologische Funktion von COX-2 im Rahmen der normalen Hirnentwicklung und -funktion, die vor allem Gedächtnisfunktionen und die synaptische Plastizität umfasst, zu bedenken (247, 248). Auch die Betrachtung des Einflusses von COX-2 im Rahmen chronisch neurodegenerativer Erkrankungen wie etwa Multipler Sklerose oder Amyotropher Lateralsklerose muss differenziert erfolgen. Neben Studien, die eine Blockade des Enzyms mit einem verbesserten neurologischen Outcome in Verbindung bringen (249, 250), gibt es ebenso Hinweise darauf, dass COX-2 Aktivität im Rahmen dieser Krankheitsbilder sogar protektive Funktionen ausüben könnte (247, 251, 252).

Während IL-6 klassischerweise als pro-inflammatorisches Zytokin zur Quantifizierung der Entzündungsaktivität herangezogen wurde, mehrt sich mittlerweile Evidenz, die einer erhöhten IL-6-Expression, wie sie auch in der vorliegenden Arbeit unter Hyp1-Behandlung in stimulierten SIM-A9-Zellen detektiert werden kann, positive Aspekte im Rahmen der Neuroinflammation zuschreibt. In einem Übersichtsartikel beschreiben Erta et al. die vielfach in vivo dargestellten positiven Effekte von IL-6 nach einer Hirnschädigung, die etwa die Induktion von Neutrophinen wie BDNF, die Verminderung von oxidativem Stress und Exzitotoxizität oder die verbesserte posttraumatische Revaskularisierung umfassen. So konnte in Studien gezeigt werden, dass in IL-6-KO-Mäusen ein geringerer Grad an Wiederherstellung nach neuronaler Schädigung, in Mäusen, die eine Überexpression von IL-6 im ZNS zeigen, dagegen eine schnellere Heilung zu erwarten ist. Dagegen konnten in anderen Forschungsarbeiten, die die IL-6-Wirkung in neuronalen Zellkulturen untersuchten, teils schädigende Wirkungen des Interleukins auf neuronales Wachstum aufgezeigt werden. Dies unterstreicht den vermutlich entscheidenden Einfluss des Kontexts der Untersuchung der IL-6-Wirkung in Zellkulturen oder im Hirngewebe. (253-256).

Neben den Effekten des Hyp1 auf die Expression der genannten pro-inflammatorischen Marker in Gliazellkulturen wird in der vorliegenden Arbeit auch deren Expression in murinem Hirngewebe

am 5. Tag nach induziertem SHT nach 6-tägiger i.p. Applikation von Hyp1 untersucht. Erwartungsgemäß zeigen sich nach SHT erhöhte Werte der Interleukine IL-1 $\beta$  und IL-6. Die 6-tägige Behandlung mit Hyp1 hat auf deren Expressionslevel allerdings keinen Einfluss. Dagegen konnten durch Yao et al. erhöhte IL-6-Expressionslevel nach induziertem Schlaganfall durch Hyperforingabe gezeigt werden, die nach Ansicht der Autoren zur Herunterregulation der Neuroinflammation führen könnten. In dieser Arbeit wurden allerdings die mRNA-Expressionslevel 28 Tage nach dem induzierten Schadensereignis und nach 14-tägiger Applikation des Hyperforins gemessen, was bereits den Zeitraum der chronischen Neuroinflammation erfasst und somit nicht direkt auf die hier vorliegenden Ergebnisse übertragbar ist (21).

Bzgl. der mRNA-Expression des COX-2 kann am 5. Tag nach induziertem SHT eine signifikante Verringerung deutlich gemacht werden. In allen mit Hyp1 behandelten Tieren kann dabei im Vergleich zu den mit der Vehikellösung behandelten Tieren der Vergleichsgruppe im Mittel ein niedrigeres COX-2-Expressionslevel dargestellt werden, signifikant zeigt sich dies bei Betrachtung der scheinoperierten Tiere. Dagegen beschreiben Dehlaghi et al. 24 h nach induziertem SHT in Ratten erhöhte COX-2-Expressionslevel in der Fluoreszenzanalyse. Gegenüber den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit wurde also ein deutlich früherer Zeitpunkt in der Pathogenese des Sekundärschadens betrachtet. Weitere Erkenntnisse der erwähnten Studie beinhalten eine gleichbleibende COX-2-Expression nach Injektion des COX-2-Inhibitors Diclophenac in die Schadensregion bei allerdings signifikant verringerter Färbung durch die TUNEL-Methode als Indikator verringerter Apoptoseaktivität und signifikant verringertem Schadensvolumen (257). Bei einer in der vorliegenden Arbeit gezeigten Senkung der COX-2 5 Tage nach induziertem SHT unter Hyp1-Behandlung könnte eine Wirkung des Hyp1 in Form einer Hemmung der COX-2 vermutet werden. Analog zu Delhaghi et al. könnte somit auch die Apoptose innerhalb der geschädigten Hemisphäre durch die Gabe von Hyp1 unterdrückt werden. Dies gilt es in weiteren Untersuchungen zu beleuchten, etwa durch eine TUNEL-Färbung von Hirngewebe nach induziertem Trauma unter zusätzlicher Behandlung mit Hyp1.

Inwieweit die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Effekte des Hyp1 tatsächlich über die Aktivierung des TRPC6 zu erklären sind, lässt sich nicht abschließend klären. 5 Tage nach induziertem SHT zeigt sich eine erniedrigte Expression des Kationenkanals, allerdings ist dieser Unterschied bei teils großer Streuung der Werte zwischen den korrespondierenden Gruppen nicht signifikant. Eine signifikant vermehrte Expression des TRPC6 unter der Behandlung mit Hyp1 lässt sich hingegen nicht bestätigen, wenn auch die mit Hyp1 behandelten Tiere im Mittel etwas höhere Expressionswerte zeigen. In Ratten konnte in einer früheren Studie eine vermehrte Expression des TRPC6 24 h nach induzierter Hirnischämie und intracerebroventriculärer Gabe



von Hyperforin anhand von Western Blot-Analysen gezeigt werden. Die Autoren begründen dies durch ein Unterbinden Calpain-bedingter Degradation des TRPC6. Außerdem konnte in der genannten Studie die Calpain-bedingte Spaltung des Zytoskelettproteins  $\alpha$ II-Spektrin als Marker für Zelluntergang durch die Hyperforingabe nach zerebraler Ischämie herabgesetzt werden (20). Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, in der die Gabe von Hyp1 keine positiven Effekte bzgl. der Entstehung der Spektrin-Spaltprodukte nach sich zieht. Um nun nachweisen zu können, ob ein SHT tatsächlich eine verminderte Expression des TRPC6 bedingt oder ob eine Behandlung mit Hyp1 die TRPC6-Genexpression steigern kann, sind weitere Gen- und Proteinanalysen Hyp1-behandelter Tiere nach CCI mit einer größeren Anzahl an Versuchstieren nötig.

Auch die Beeinflussung der Expression des Neurotrophins BDNF durch ein induziertes SHT bzw. die Behandlung mit Hyp1 lässt sich in der vorliegenden Arbeit nicht abschließend klären. Die Detektion einer BDNF-Proteinbande bei etwa 23 kDa lässt keine detaillierte Aussage über die genaue Beschaffenheit dieses Spaltprodukts im Rahmen der Prozessierung des Prekursorproteins proBDNF zu, welches selbst eine Molekülmasse von etwa 32 kDa aufweist. Zur weiteren Differenzierung wäre hier der Einsatz Isoform-spezifischer Antikörper gegen Epitope des proBDNF sowie des muren BDNF angezeigt. Unabhängig von der genauen Verteilung der Isoformen des BDNF kann in Übereinstimmung mit den Daten der Genexpression nach CCI ein deutlicher Rückgang der Expressionslevel verzeichnet werden, wohingegen die Hyp1-Gabe keine Effekte auf die Expression des BDNF hat. Somit kann in der vorliegenden Arbeit eine Erhöhung der BDNF-Expression über die postulierte TRPC6-vermittelte Genexpression nicht nachgewiesen werden. Eine in vorangegangenen Arbeiten beschriebene direkte Aktivierung des TRPC6 durch das Neurotrophin BDNF scheint bei verminderten BDNF-Expressionsleveln nach CCI ebenfalls in reduziertem Maße vorzuliegen (22).

Die Integrität der BHS verändert sich aufgrund mechanischer Einflüsse im Rahmen des Traumas oder ist bedingt durch weitere sekundär ablaufende Prozesse wie Exzitotoxizität und eine gesteigerte Entzündungsaktivität. Eine BHS-Störung hat einen wichtigen Anteil an der weiteren Pathogenese des SHT, da dieser Umstand zur Ausbildung eines vasogenen Ödems und einer gesteigerten Inflammation durch Einwanderung peripherer Immunzellen beiträgt (10). Die vorliegenden Ergebnisse des IgG-Dot Blots zeigen eine deutliche Integritätsstörung der BHS nach SHT, die dementsprechend in der Gruppe der scheinoperierten Tiere nicht zu finden ist. Sie lassen allerdings keinen Einfluss von Hyp1 auf die BHS-Integrität erkennen. Der IgG-Dot Blot kann nur einen Hinweis auf den Umfang einer vermuteten BHS-Störung geben. Die direkten Folgen dieser Pathologie – nämlich der erhöhte Wassergehalt aufgrund des vasogenen Ödems bzw. das Vorhandensein peripherer Immunzellen im ZNS – könnten in weiteren Experimenten nach Hyp1-

Applikation bspw. durch immunhistochemische Färbungen sowie direkte Bestimmung des Wassergehaltes des Hirnparenchyms detaillierter analysiert werden.

## **5.2 Einfluss von Hyp1 auf die mitochondriale Atmung**

Wie viele Pathologien, die das Gehirn betreffen, hat auch das SHT einen Einfluss auf die mitochondriale Funktion bzw. führt direkt oder indirekt im Rahmen der sekundären Schädigung zu mitochondrialer Dysfunktion. Diese umfasst die Störung der Calciumhomöostase, die vermehrte Entstehung von ROS, die Induktion der Apoptose bzw. die Beteiligung bei nekrotischen Prozessen aber auch die Beeinflussung der Atmung als eine Hauptaufgabe der Mitochondrien. Ein Fokus dieser Arbeit liegt auf der Betrachtung der mitochondrialen Atmung und deren Veränderung durch die Zugabe des Wirkstoffs Hyp1, der Evaluierung des vermuteten Wirkmechanismus über den Kationenkanal TRPC6, sowie der Einschätzung der Alterationen der Funktionsfähigkeit einzelner Komplexe der Atmungskette durch ein SHT.

Die Respirometrie mikroglialer SIM-A9-Zellen unter der zusätzlichen Gabe von Hyperforin zeigt direkte Effekte des Hyp1. Grundsätzlich werden bei allen Experimenten die Werte des absoluten Sauerstoffverbrauchs sowie die FCR-Werte – als normalisierte Werte zum höchsten messbaren Wert innerhalb des SUIT-Protokolls – dargestellt. Der FCR-Wert dient dabei der Normalisierung der Atmungsaktivität der Komplexe unabhängig von der Menge und im Gegensatz zur externen Normalisierung auch unabhängig von der Qualität der enthaltenen Mitochondrien. Da die interne Normalisierung bzgl. der Mitochondrienqualität gegenüber externen Mitochondrienmarkern statistische Vorteile bietet, wird auf die Normalisierung zu externen Markern wie der Cytochrom c-Oxidase-Aktivität oder der Citrat-Synthase-Aktivität in der hier vorliegenden Arbeit verzichtet (258).

Der absolute Sauerstoffverbrauch ist in SIM-A9-Zellen unter der Zugabe von Hyp1 in allen Atmungsstatus signifikant erhöht. Dieser Effekt wird durch die interne Normalisierung bei Betrachtung der FCRs allerdings vollständig relativiert, was eine direkte Beeinflussung einzelner Komplexe der Atmungskette durch Hyp1 in SIM-A9-Mikroglia unwahrscheinlich erscheinen lässt. Entsprechend der Begründung für interne Normalisierung legen die vorliegenden Ergebnisse den Schluss nahe, dass Hyp1 die Mitochondriendichte oder – in Anbetracht des kurzen Zeitraums der Einwirkung bei direkter Zugabe von Hyp1 sicher wahrscheinlicher – die Mitochondrienqualität in den untersuchten Proben verändern könnte.

Diese Ergebnisse, die einen Einfluss von Hyp1 auf Dichte und/oder Qualität der Mitochondrien in SIM-A9-Zellkulturen nahelegen, können dagegen in der respirometrischen Untersuchung des Hirngewebes nicht wiederholt werden, weder bei direkter Zugabe des Hyp1 noch bei 6-tägiger i.p.-Applikation. Um die gesteigerte Atmungsaktivität durch Hyp1 nun einer Veränderung der

mitochondrialen Dichte oder aber der mitochondrialen Qualität zuordnen zu können, wäre eine Durchführung weiterer Versuche unter Zuhilfenahme zusätzlicher Marker für den Mitochondriengehalt, etwa der Citrat-Synthase Aktivität, zielführend. Um darüber hinaus zu verstehen, warum sich eine Steigerung der absoluten Zellatmungsaktivität unter der Zugabe des Wirkstoffs Hyp1 in Mikroglia zeigt, nicht aber in murinem Hirngewebe, könnten respirometrische Untersuchungen weiterer Zelltypen des Gehirns wie Astroglia oder Oligodendrozyten aber vor allem die Untersuchung des Einflusses von Hyp1 auf die Atmungsaktivität neuronaler Zellen hilfreich sein, wenn auch die Ergebnisse der Respirometrie in HEK-293-Zellen durchaus dafür sprechen, dass Hyp1 unabhängig vom Ursprungsorgan der Zellen den mitochondrialen Sauerstoffverbrauch erhöht.

In SIM-A9-Zellen bewirkt die Hyp1-Zugabe zudem eine signifikante Steigerung der absoluten Atmungsaktivität wie auch im Trend der FCR-Werte bei isolierter Betrachtung des LEAK-Atmungsstatus. Dieser Atmungsstatus zeigt den Sauerstoffverbrauch des Mitochondriums, der vor allem durch einen „Protonen-Bypass“ über die innere Mitochondrienmembran bedingt ist, aufgrund der Umgehung der ATP-Synthase allerdings nicht zu einer Produktion des Energiesubstrats ATP beiträgt. Ein erhöhter Anteil des LEAK-Atmungsstatus weist daher auf eine verminderte Kopplung des ETS mit dem phosphorylierenden System hin. Zu beachten ist hierbei allerdings, dass der Anteil des Sauerstoffverbrauchs durch Protonen-LEAK und *-Slip* am Gesamtsauerstoffverbrauch bei Betrachtung des LEAK-Atmungsstatus überproportional hoch ist, da es nach künstlicher Inhibition der ATP-Synthase durch Oligomycin gegenüber physiologischen Bedingungen durch fehlenden Protonenabfluss zu einem steigenden Gradienten über der inneren Mitochondrienmembran kommt (258). Es ist daher anzunehmen, dass Hyp1-Effekte auf den LEAK-Anteil an der mitochondrialen Atmung unter physiologischen Bedingungen geringer ausgeprägt sind als unter den beschriebenen experimentellen Bedingungen. Nichtsdestotrotz können hier gesehene Effekte durchaus auf die physiologische mitochondriale Aktivität übertragen werden – wenn auch nicht in vollem Ausmaß.

Die verminderte Kopplung des Systems kann anschaulich durch die  $OXPHOS_{CI+II}$ -Kopplungseffizienz ausgedrückt werden, die den Anteil des energieliefernden Sauerstoffumsatzes am Gesamtsauerstoffverbrauch des mitochondrialen Atmungssystems darstellt (258). In SIM-A9-Zellen ist die  $OXPHOS_{CI+II}$ -Kopplungseffizienz unter der Zugabe von Hyp1 signifikant abgesenkt, was auf eine teilweise Entkopplung des Systems in Anwesenheit des Hyp1 hindeutet. Diese Beobachtung lässt sich in murinem Hirngewebe unter direkter Zugabe des Hyp1 reproduzieren. Auch nach 6-tägiger Hyp1-Applikation bei Mäusen zeigt sich in der respirometrischen Untersuchung ein teilweise entkoppeltes mitochondriales System anhand einer erhöhten Atmungsaktivität im LEAK-Atmungsstatus, wenn auch in deutlich geringerem Ausmaß als bei

direkter Zugabe des Wirkstoffs zu homogenisierten Zellen oder Hirngewebe. Diese Erhöhung des LEAK-Atmungsstatus nach Hyp1-Applikation zeigt sich in vivo nur signifikant bei Betrachtung der contraläsionalen Hemisphären aller Tiere, unabhängig davon, ob sie scheinoperiert oder einem CCI unterzogen wurden. Um tatsächliche Unterschiede jeweils in scheinoperierten wie auch CCI-Tieren sichtbar machen zu können sowie eventuelle Effekte des Hyp1 auch in den ipsiläsionalen Hemisphäre der CCI-Tiere darstellen zu können, ist eine Erhöhung der Test-Power durch Vergrößerung der Anzahl an Tieren pro experimenteller Gruppe notwendig. Aufgrund der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ist anzunehmen, dass Hyp1 auch im Hirngewebe der lebenden Maus nach i.p. Applikation in relevanter Konzentration ankommt und die in vitro sichtbaren Effekte der teilweisen Entkopplung auch in vivo reproduzierbar sind. Daher sind weitere derartige Experimente zur Sicherung dieser Daten und der weiteren Aufklärung des Effekts von Hyp1 auf durch CCI geschädigtes Hirngewebe indiziert.

Zur Klärung, inwieweit die Wirkung des nachgewiesenen TRPC6-Aktivators Hyp1 tatsächlich durch die Aktivierung dieses Kationenkanals zu begründen ist, werden mit TRPC6 transfizierte HEK-293-Zellen, bei denen in Vorversuchen ebenfalls eine starke Reaktion im LEAK-Status nach Hyp1-Gabe zu beobachten war, ebenfalls unter direkter Zugabe des Hyp1 respirometrisch untersucht. Hierbei zeigen sich zu keinem Zeitpunkt Unterschiede bzgl. der mitochondrialen Atmung im Vergleich zu nichttransfizierten HEK-293-Zellen. Ebenfalls zeigen sich in der respirometrischen Untersuchung von Hirngewebe der TRPC6-KO-Mäuse bei gleicher Verfahrensweise wie mit Hirngewebe der WT-Mäuse unter der direkten Zugabe von Hyp1 keinerlei Unterschiede. Dies lässt den Schluss zu, dass Hyp1 seine Wirkung auf den erhöhten Sauerstoffverbrauch im LEAK-Atmungsstatus und damit einer teilweisen mitochondrialen Entkopplung unabhängig von TRPC6 entfaltet. Der genaue Mechanismus dieser Entkopplung durch Hyp1 bleibt allerdings vorerst unklar.

In Anbetracht der Tatsache, dass Hyperforin bereits als Protonophor bekannt ist und diese protonophore Eigenschaft auch für die pharmakologische Aktivität relevant zu sein scheint, liegt die Vermutung nahe, dass auch das Hyp1 seine Wirkung als Protonophor entfalten könnte (23). Peng et al. konnten bereits zeigen, dass die protonophoren Eigenschaften des Hyperforins auch an der inneren Mitochondrienmembran neuronaler Zellen zum Tragen kommen und ähnlich dem FCCP das Membranpotential durch den ermöglichten Rückfluss der Protonen in die Mitochondrienmatrix zum Erliegen bringen können und darüber hinaus der Ausstrom von Calcium und Zink aus dem Mitochondrium gefördert wird (207). Wiechmann et al. zeigten einen direkten protonophoren Effekt auf die innere Mitochondrienmembran in Leukämiezellen durch die Wirkstoffe Hyperforin und Myrtucommulon A, bei denen es sich wie beim Hyp1 chemisch jeweils

um Acylphloroglucinole handelt. Beide Wirkstoffe führen zur gesteigerten Apoptose in den Leukämiezellen (208).

In einer neueren Studie begründen Courtes et al. den neuroprotektiven Effekt des Guanosins anhand eines vermehrten Sauerstoffflusses und einer gesteigerten ATP-Synthese durch erhöhte mitochondriale Kopplung bzw. der Abschwächung einer schädigenden Entkopplung als Folge des SHT (259). Die neuroprotektiven Effekte des Cyclosporin A werden begründet durch die Verhinderung der Entstehung der mPTP, die die Integrität der inneren Mitochondrienmembran stark beeinflusst und somit ebenfalls zum Verlust des Membranpotentials und einer mitochondrialen Entkopplung führt. Inwiefern in diesem Fall der Verlust des mitochondrialen Membranpotentials oder andere pathologische Effekte der mPTP wie der Ausstrom von Calcium, die mitochondriale Schwellung oder die Freisetzung pro-apoptotischer Faktoren für den zu beobachtenden Zelltod verantwortlich sind, bleibt allerdings weitestgehend unklar (184). Neben diesen eher negativ zu interpretierenden Ergebnissen bzgl. der mitochondrialen Entkopplung auf die zelluläre Funktions- und Lebensfähigkeit mehrtsich andererseits zunehmend Evidenz für die positive Rolle von Entkopplern, auch im Rahmen des SHT. Entsprechend den pathophysiologischen Veränderungen der Mitochondrien nach SHT wie der Calciumüberladung und der konsekutiven ROS-Entstehung wurden die mitochondrialen Entkoppler FCCP und 2,4-DNP bereits mehrfach als potenzielle Therapeutika nach SHT beschrieben (182, 187, 188). Pandya et al. können eine verminderte mitochondriale Calciumaufnahme und verminderte ROS-Entstehung nach induziertem SHT in Ratten unter der Behandlung mit den jeweiligen Entkopplern zeigen, ebenso eine verminderte corticale Schädigung und ein verbessertes neurologisches Outcome. Auch für den physiologisch vorkommenden Entkoppler UCP2 belegen etliche Studien und Reviews positive Effekte auf die mitochondriale Atmung. Wenn auch die Gründe für die protektiven Eigenschaften moderater mitochondrialer Entkopplung noch nicht bis ins letzte Detail verstanden sind, so lässt sich anhand bisheriger Erkenntnisse der Hauptgrund in der verminderten Apoptose durch Beeinflussung der ROS-Entstehung und des mitochondrialen Calciumhaushalts vermuten (260-262).

Die ROS-Entstehung wird in der vorliegenden Arbeit in einer HEK-293-Zellkultur unter Zugabe von Hyp1 bzw. dem Entkoppler FCCP untersucht. Im verwendeten experimentellen Aufbau kann weder für Hyp1 in der verwendeten Dosierung von 1  $\mu$ M noch für FCCP eine direkte Senkung der ROS-Produktion festgestellt werden, wohl aber zeigt sich eine signifikante Steigerung der ROS-Produktion in 10facher Dosierung des Hyp1.

Die vorliegenden Daten zeigen einen eindeutigen Einfluss des Hyp1 auf die mitochondriale Atmung, vornehmlich im LEAK-Atmungsstatus über eine vermutete mitochondriale Entkopplung aufgrund eventueller protonophorer Eigenschaften des Hyp1 analog derer des Hyperforins. Ob

Hyp1 wie die chemischen Entkoppler FCCP und 2,4-DNP oder das physiologisch vorkommende UCP2 die mitochondriale Calciumüberladung und ROS-Entstehung positiv modulieren und somit wie diese Wirkstoffe neuroprotektiv wirken könnte oder im Gegenteil das Hyp1 durch einen Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials zu einer drastisch verminderten ATP-Synthese führt oder sogar die Entstehung der mPTP fördert und somit zu einem verschlechterten Outcome nach SHT führt, bleibt zunächst unklar. Es gilt, in weiteren Studien die vermutete protonophore Eigenschaft des Hyp1 sowie die damit einhergehende Veränderung des mitochondrialen Membranpotentials nachzuweisen. Hierzu wäre bspw. die Durchführung eines TMRM-Assays unter anderem mit SIM-A9-Zellen indiziert, wodurch mitochondriale Membranpotentialveränderungen nach Hyp1-Zugabe gezeigt werden können. Um den eventuellen Einfluss des Hyp1 auf die mitochondriale Calciumkonzentration und die ROS-Entstehung in vivo zu evaluieren, sollten die Methoden verwendet werden, die Pandya et al. bereits erfolgreich zum Nachweis positiver Effekte der Entkoppler FCCP und 2,4-DNP in Ratten eingesetzt haben. In zukünftigen respirometrischen Analysen Hyp1-behandelter Mäuse oder von Zellen und Hirngewebe unter der zusätzlichen Zugabe von Hyp1 sollte parallel zur Analyse des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs fluorometrisch die Calciumkonzentration, die ATP-Synthese, das mitochondriale Membranpotential sowie die ROS-Entstehung in Echtzeit untersucht werden, was mit dem hier verwendeten Respirometer Oroboros 2k möglich ist. Die Erhebung dieser Parameter kann dabei helfen, die vermuteten entkoppelnden Effekte des Hyp1 weiter zu beleuchten sowie deren Einordnung als positiv oder negativ für die mitochondriale Atmung und damit die Zellfunktion zu ermöglichen.

Abseits der in dieser Arbeit postulierten Wirkungsweise des Hyp1 über eine mitochondriale Entkopplung könnte auch eine direkte antagonistische Wirkung des Hyp1 zum Oligomycin zu einer erhöhten Atmungsaktivität im LEAK-Atmungsstatus führen, indem die Inhibition der ATP-Synthase abgeschwächt und der Sauerstoffverbrauch des experimentellen LEAK-Atmungsstatus weiterhin zur ATP-Synthese beitragen würde. Diese mögliche Hyp1-Wirkung ließe sich ebenfalls mithilfe oben beschriebener Untersuchung des Sauerstoffverbrauchs und der fluorometrischen Bestimmung des zeitgleich gebildeten ATP bekräftigen.

Die respirometrische Untersuchung des Hirngewebes von Mäusen unter Hyp1-Behandlung nach einem induzierten SHT zeigt neben den beschriebenen Effekten des Hyp1 auch deutliche Veränderungen in der mitochondrialen Atmung, die direkt durch das traumatische Geschehen bzw. durch sekundäre Pathomechanismen bedingt sind, sich allerdings teilweise von bisherigen Untersuchungen unterscheiden.

Während Kilbaugh et al. in Ferkeln 24 h nach CCI ein signifikantes Absinken der FCRs der OXPHOS-Aktivität des CI auf der ipsi- und contraläsionalen Seite bzw. der OXPHOS-Aktivität von

CI und CII sowie auch eine erniedrigte Atmungsaktivität im LEAK-Atmungsstatus sichtbar machen, können die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit dies nicht bestätigen (263). Gründe hierfür können etwa in einer Betrachtung von 9 Wochen alten Mäusen im Gegensatz zu 4 Wochen alten Ferkeln liegen, damit in der Betrachtung deutlich verschiedener Status der Hirnentwicklung und somit nicht auszuschließender unterschiedlicher mitochondrialer Reaktionen auf SHTs. Ebenfalls unterscheidet sich die Lokalisation der Entnahme des zur Respirometrie herangezogenen Hirngewebes in beiden Studien sowie der Zeitpunkt der Untersuchung nach dem Trauma.

Ein auffälliger Unterschied zwischen den Ergebnissen von Kilbaugh et al. und den hier vorliegenden besteht zudem in den erhobenen FCR-Werten. Während der experimentell vollständig entkoppelte Zustand  $ETS_{CI+II}$  in der hier vorliegenden Arbeit stets den Status des höchsten aktuellen Sauerstoffverbrauchs darstellt und somit die dazu normalisierten FCRs allesamt einen Wert unter 1 annehmen, ist dies bei Kilbaugh und Kollegen nicht der Fall. Im Status der maximalen Entkopplung werden dort stets niedrigere Werte erreicht als im  $OXPHOS_{CI+II}$ . Dies mag am unterschiedlichen Versuchsaufbau, einem etwas abgewandelten SUIT-Protokoll mit der zusätzlichen Verwendung von Digitonin durch deren Arbeitsgruppe oder anderen, nicht offensichtlichen Gründen liegen, könnte allerdings den direkten Vergleich der FCRs der beiden Studien erschweren. Nach Gnaiger könnte es sich bei diesen Ergebnissen von Kilbaugh et al. um experimentelle Artefakte handeln, da nach Titration der Entkoppler in der Regel zumindest das Atmungsniveau des Status  $OXPHOS_{CI+II}$  erreicht werden sollte (258). Eine Gemeinsamkeit der beiden Studien zeigt sich dennoch bei der Betrachtung der Absolutwerte des Sauerstoffverbrauchs im experimentell entkoppelten Zustand  $ETS_{CI+II}$ . Dieser ist sowohl bei Kilbaugh et al. als auch in der vorliegenden Arbeit bei Betrachtung der Daten unabhängig von der Behandlung mit Hyp1 in der ipsiläsionalen Hemisphäre nach einem CCI signifikant vermindert. Dies deutet auf eine herabgesetzte mitochondriale Dichte bzw. mitochondriale Qualität infolge des SHT hin. Da die in der Western Blot-Analyse der seriellen Gefrierschnitte detektierte Expression der COX IV als mitochondriales Protein durch den induzierten Hirnschaden nicht wesentlich beeinflusst wird, kann vermutet werden, dass dies eher durch eine verminderte mitochondriale Qualität in den geschädigten Hemisphären zu begründen ist.

Aufgrund der Tatsache, dass die erhobenen Werte der COX IV-Expression einer großen Streuung unterworfen sind, wäre bei der Durchführung weiterer Versuche die Bestimmung zusätzlicher externer mitochondrialer Marker wie der Citrat-Synthase-Aktivität ratsam, die gegenüber der hier verwendeten Methode den Vorteil bietet, direkt in den Proben der Kammerinhalte des Respirometers analysiert werden zu können (263).

### **5.3 Einfluss von Hyp1 auf die funktionelle Wiederherstellung**

Die Beurteilung neurologischer Veränderungen nach einem CCI in der Maus bedarf spezieller Scoringsysteme. Das hier verwendete Scoringsystem, das bereits seit Jahren innerhalb unserer Forschungsgruppe angewandt wird (224), beinhaltet neben einem Teil, der das Angstverhalten und die Reflexantwort im Rahmen der Schreckreaktion bewertet, überwiegend die Bewertung der Neuromotorik. Postoperativ kommt es entsprechend den Erwartungen basierend auf vorherigen Erkenntnissen zu einem deutlichen Punktwertanstieg im NSS, was einer neurologischen Verschlechterung entspricht, bei den Tieren nach CCI verglichen mit den scheinoperierten Tieren, die nahezu keine Veränderung der neurologischen Funktionen zeigen. Die neurologischen Defizite der Mäuse in beiden CCI-Gruppen zeigen über den 3. bis 5. Tag eine abnehmende Tendenz, bleiben jedoch auch am 5. Tag teils signifikant erhöht. Die Behandlung mit Hyp1 über 6 Tage lässt in der Beurteilung der neurologischen Funktionen zu keinem Zeitpunkt wesentliche Unterschiede erkennen.

Die Entwicklung des Körpergewichts als Indikator für das Fressverhalten lässt dagegen Schlüsse auf das allgemeine körperliche Befinden der Tiere nach dem induzierten Trauma zu. Auch hier entsprechen die erhaltenen Daten denen vergleichbarer Forschungsarbeiten unseres Labors (264, 265). Bereits am 1. Tag nach einem CCI kommt es zu einem starken Abfall des Körpergewichts, das sich dann in den Folgetagen langsam dem Körpergewicht der scheinoperierten Tiere angleicht. Hyp1 kann auch hier keine gegenüber der Vergleichsgruppe signifikante Erhöhung des Körpergewichts und damit verbesserten Allgemeinzustand der Tiere bewirken. Allerdings liegen die mittleren Körpergewichte unter Hyp1-Behandlung nach CCI an allen Tagen oberhalb derer der Vergleichsgruppe. Ein möglicher Effekt des Hyp1 lässt sich dementsprechend nicht ausschließen.

In Anbetracht der Tatsache, dass sich die Entwicklung des Körpergewichts im Verhältnis zum Ausgangsgewicht in der vorliegenden Arbeit in einem Rahmen von maximal 9 % bewegt und es aufgrund interindividueller Unterschiede teils zu einer sehr hohen Streuung innerhalb der experimentellen Gruppen kommt, ist für die statistisch valide Darstellung eines eventuellen Hyp1-Effektes auf das Körpergewicht die Erhöhung der *Test-Power* durch Betrachtung einer größeren Kohorte notwendig. Dies lässt sich auch auf die erhobenen Daten des Neuroscores übertragen.

Durch Gabe von Hyperforin nach induzierter Hirnischämie in Mäusen konnten Yao et al. eine funktionelle Erholung der Tiere 28 Tage nach der Ischämie erreichen, Lin et al. beschreiben eine verbesserte Wiederherstellung neurologischer Funktionen durch Hyperforin 24 h nach Hirnischämie in Ratten. Ungeachtet der Tatsache, dass eine induzierte Hirnischämie erhebliche pathophysiologische Unterschiede zum induzierten SHT aufweist, limitieren weitere Faktoren die Vergleichbarkeit dieser Studien mit den Erkenntnissen der vorliegenden Arbeit. Beide



Forschungsgruppen verwendeten abweichende Methoden zur Erfassung der neurologischen Funktionalität. Zudem wurden unterschiedliche Zeitpunkte nach dem induzierten Schadensereignis in teils unterschiedlichen Modellorganismen gewählt (20, 21). Weiterhin bleibt unklar, inwieweit Hyp1 als TRPC6-Aktivator tatsächlich der pharmakologischen Wirkungsweise des Hyperforins entspricht, die zur Neuroprotektion und verbesserter funktioneller Wiederherstellung beitragen kann.

Es empfiehlt sich, bei Durchführung weiterer Experimente entsprechend dem hier gezeigten Versuchsablauf zwecks eingehender Untersuchung des Einflusses der Hyp1-Behandlung auf mitochondriale Dysfunktion und Neuroinflammation *in vivo* auch die Erhebung des Körpergewichts und des NSS nach hier beschriebenem Vorgehen durchzuführen.

## **5.4 Limitationen und Ausblick**

Die Rekapitulation der in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse erbringt die Erkenntnis des Vorhandenseins eindeutiger Effekte des Hyp1 sowohl in Zellkulturen als auch im Modellorganismus Maus.

Kann etwa in Mikroglia und primären Gliazellkulturen ein pro-inflammatorischer Einfluss des Hyp1 bei gesteigerter COX-2-, IL-6-Expression und vermutlich gesteigerter Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B dargestellt werden, so bleibt die korrekte Interpretation dieser Erkenntnisse unklar. Ob die gesteigerte Expression dieser pro-inflammatorischen Proteine in glialen Zellkulturen zu einer tatsächlich gesteigerten Neuroinflammation führen würde oder durch den daraus resultierenden Tod mikroglialer Zellen die Neuroinflammation sogar begrenzt werden könnte (118), gilt es in weiteren Studien eingehend zu untersuchen. In einem ersten Schritt wäre die protein- und molekularbiologische Bestimmung pro-apoptotischer Moleküle oder die fluoreszenzmikroskopische Bestimmung abgestorbener Zellen in SIM-A9- und primären Gliazellkulturen richtungsweisend. Auch eine Untersuchung der Apoptose bzw. des Nekrosebedingten Zelltodes in neuronalen Zellkulturen unter der Behandlung mit Hyp1 könnte weitere Hinweise zur Interpretation des Hyp1-Effekts im Rahmen der Inflammation bringen. Die postulierte anti-inflammatorische Wirkungsweise des Hyp1 über TRPC6 sollte dabei durch die Expressionsanalyse des Kationenkanals sowie durch zusätzliche Verwendung bekannter TRPC6-Inhibitoren wie dem Calciumkanalblocker BTP2 evaluiert werden (266). Entgegen diesen Ergebnissen auf zellulärer Ebene bewirkt die Behandlung mit Hyp1 *in vivo* eine unveränderte Expression des IL-6, allerdings sogar ein Absinken der Expression des COX-2 als Indiz für eventuell *in vivo* existierende anti-inflammatorische Effekte des Hyp1. Eine finale Interpretation ist zu diesem Zeitpunkt jedoch nicht möglich. Weitere Experimente unter Hyp1-Einsatz *in vivo* und zusätzliche Untersuchung weiterer Inflamationsparameter sowie der Apoptose etwa durch

immunhistochemische Analyse von COX-2 bei gleichzeitiger TUNEL-Färbung könnten zum besseren Verständnis dieser bisherigen Ergebnisse beitragen.

Bezüglich der mitochondrialen Atmung konnte der Haupteffekt des Hyp1 auf eine Erhöhung der LEAK-Atmung festgestellt werden, was am ehesten für eine teilweise Entkopplung des mitochondrialen Atmungssystems durch Hyp1 spricht. Diese Effekte beruhen laut den hier erhobenen Ergebnissen wider Erwarten nicht auf einer Wirkung über den Kationenkanal TRPC6. Wie bereits ausführlich beschrieben könnte eine milde mitochondriale Entkopplung neuroprotektive Effekte vermuten lassen, im Gegenteil aber eine Entkopplung durch verminderte Generierung von Energiesubstraten auch neurotoxische Effekte nach sich ziehen. Um die Wirkungsweise des Hyp1 verstehen zu können, ist eine respirometrische Untersuchung verschiedener weiterer Zelltypen, vor allem aber neuronaler Zellen, notwendig. Außerdem ist zur weiteren Evaluierung der vermuteten mitochondrialen Entkopplung die Erhöhung der Test-Power erforderlich. Um diesen Effekt in seiner Bedeutung einordnen und eventuelle neuroprotektive Eigenschaften des Hyp1 durch seine Wirkung als Entkoppler sichtbar machen zu können, können weitere Experimente zur Untersuchung des mitochondrialen Membranpotentials und dessen Beeinflussung durch Hyp1 durchgeführt werden und in zukünftigen respirometrischen Analysen parallel die mitochondriale Calciumkonzentration oder auch ROS-Entstehung mitbeurteilt werden, die als Hauptkomponenten der mitochondrialen Dysfunktion nach SHT gelten. Diese Ergebnisse sind in Zusammenschau mit weiterhin zu erhebenden Daten zur funktionellen Wiederherstellung, zur Schadensvolumenanalyse und zur Analyse der Apoptose und Neuroinflammation in betroffenen Hirngeweben zu bewerten und könnten dann eine finale Beurteilung der möglichen Entkopplung durch Hyp1 ermöglichen.

Die zusätzliche Verwendung externer Mitochondrienmarker bei weiteren respirometrischen Analysen, könnte eine klarere Differenzierung der Veränderungen im Rahmen des SHT oder Hyp1-Effekte auf die mitochondriale Qualität oder aber die mitochondriale Dichte im direkten Vergleich mit den erhobenen FCRs ermöglichen.

Die Verwendung des Diacylphloroglucinols Hyp1 anstelle der Substanz Hyperforin erschwert weiterhin die Beurteilung der gewonnenen Ergebnisse. Trotz des erbrachten Beweises für die Wirkungsweise des Hyp1 über Aktivierung des Kationenkanals TRPC6 – entsprechend der Wirkungsweise des Hyperforins – ist wenig über weitere pharmakologischen Eigenschaften des Hyp1 bekannt (24). So fehlen bisher relevante Informationen zur Pharmakokinetik, wie der Resorption, der Verteilung im Körper, der ZNS-Gängigkeit, wie auch zur Elimination und Ausscheidung. Auch ist wenig bekannt über die notwendige Dosierung, die zu wirksamen Konzentrationen in Zellkulturen oder Plasmaspiegeln in vivo führt. Die Tatsache, dass Hyp1 zu den genannten Veränderungen in der vorliegenden Arbeit sowohl innerhalb von Zellkulturen als

auch in Hirngewebe in vivo zu Veränderungen der Proteinexpression wie auch der mitochondrialen Funktion führt, lässt den Schluss zu, dass die verwendeten Dosierungen von 1  $\mu\text{M}$  in vitro bzw. 5 mg/kg in vivo, wie sie in vorangegangenen Studien mit Hyperforin bereits erfolgreich eingesetzt wurden, wirksam sind (207, 267). Eine zumindest partielle ZNS-Gängigkeit des Hyp1 nach i.p.-Injektion kann somit anhand der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit angenommen werden. Zur Findung einer optimalen Dosis sind allerdings weitere Experimente und auch ein direkter Nachweis der Substanz im Hirngewebe notwendig. Auch der optimale Zeitpunkt der Applikation bleibt unklar. Erfolgt in der vorliegenden Arbeit die Hyp1-Behandlung bereits 3 Tage vor dem CCI zum Erreichen einer ausreichenden Konzentration während der akuten Phase des SHT, ist dies in der Realität so nicht umsetzbar. Hier wäre eine Behandlung erst in der Folge eines Traumas möglich. Ob Hyp1 auch dann wirksam wäre, müsste durch eine Anpassung des Versuchsablaufs evaluiert werden.

In dem Fall, dass Hyp1 seine anti-inflammatorische Wirkung erst im Rahmen der chronischen Entzündung oder bei länger andauernder Behandlung entfaltet, müsste eine Beurteilung statt nach 5 Tagen zusätzlich etwa nach einer Zeit von bis zu mehreren Wochen erfolgen.

Wenn auch für die protonophore Eigenschaft des Hyperforins bereits Evidenz vorliegt, so steht dies für das Hyp1 noch aus. Die vorliegenden Ergebnisse, die für eine Eigenschaft des Hyp1 als mitochondrialer Entkoppler unabhängig von der TRPC6-Aktivierung sprechen, legen protonophore Effekte des Hyp1 nahe. Dies gilt es in weiteren Experimenten zu evaluieren. Weitere respirometrische Experimente zur Untersuchung mitochondrialer Entkopplung durch Hyp1 sollten künftig zusätzlich mit dem Wirkstoff Hyperforin als bekanntem Protonophor durchgeführt und parallel beurteilt werden.

## 6. Zusammenfassung

Der Sekundärschaden im Rahmen des SHT umfasst pathophysiologische Prozesse wie die sterile Neuroinflammation, Exzitotoxizität, den Verlust der BHS-Integrität und die mitochondriale Dysfunktion, die in ihrer Gesamtheit teils zu einem erheblich verschlechterten Outcome der Patienten nach initial mechanischem Trauma führen. Allerdings fehlt bis heute eine geeignete Therapie, die unmittelbar die pathophysiologischen Vorgänge der Entstehung des Sekundärschadens beeinflusst, was die Bedeutung der Grundlagenforschung in diesem Bereich unterstreicht.

Hyperforin ist einer der Hauptwirkstoffe des Johanniskrauts, welches seit Jahrhunderten als Naturheilmittel für verschiedenste Indikationen in der Komplementär- und Schulmedizin eingesetzt wird und so beispielsweise bis heute eines der meistverordneten Antidepressiva darstellt. Mit Hyperforin konnte eine Substanz gefunden werden, die neben anti-depressiver, anti-proliferativer und anti-bakterieller Wirkung in neueren Studien vermehrt auch neuroprotektive Eigenschaften in der Behandlung des Morbus Alzheimer aber auch in der Therapie akuter Schadensereignisse wie der zerebralen Ischämie attestiert wurden. Die proklamierte Wirkungsweise beruht vornehmlich auf der Aktivierung des nichtselektiven Kationenkanals TRPC6, aber auch eine pharmakologische Wirkung über protonophore Eigenschaften des Hyperforins konnte in der Vergangenheit gezeigt werden.

In der vorliegenden Arbeit wird das 2,4-Diacetylphloroglucinol Hyp1 als ebenfalls nachgewiesener TRPC6-Aktivator in seiner Wirkung in stimulierten Gliazellkulturen und in vivo in der Maus untersucht, mit besonderem Augenmerk auf die Modulation der Entzündungsaktivität sowie den Einfluss auf die mitochondriale Funktion.

Durch molekularbiologische und proteinanalytische Verfahren kann gezeigt werden, dass Hyp1 in kultivierten Gliazellen die LPS-induzierte pro-inflammatorische Aktivierung, angezeigt durch die Inflammationsmarker COX-2 und IL-6, verstärkt.

Respirometrische Analysen belegen eine Erhöhung des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs im LEAK-Atmungsstatus durch Hyp1, der eine mitochondriale Entkopplung zu Grunde liegen könnte. Dieser Effekt zeigt sich deutlich nach direkter Zugabe von Hyp1 zu Zellen und Hirngewebe und in abgeschwächter Form in Hirngewebe im Anschluss an eine 6-tägige Behandlung der Mäuse mit i.p. appliziertem Hyp1. Untersuchungen nach transients Überexpression von TRPC6 in HEK-293-Zellen sowie von Hirngewebe TRPC6-defizienter KO-Mäuse zeigen entgegen den ursprünglichen Erwartungen, dass Hyp1 Effekte auf die mitochondriale Atmung ausübt, die unabhängig von TRPC6 sind. Dieses Ergebnis deutet auf eine protonophore Wirkungsweise des Hyp1 hin. Weiterhin kann durch respirometrische Untersuchungen gezeigt werden, dass ein CCI in der Maus am 5. postoperativen Tag einen generell verminderten absoluten Sauerstoffverbrauch als

Indikator verminderter mitochondrialer Dichte bzw. Qualität nach sich zieht, ohne einzelne Komplexe der Atmungskette in signifikanter Weise zu beeinflussen. Bzgl. neurobiologischer Wiederherstellung und allgemein körperlicher Verfassung der Mäuse nach CCI bewirkt Hyp1 im gewählten experimentellen Aufbau keine signifikante Verbesserung.

Inwiefern die Modulation der Entzündungsaktivität sowie die Veränderungen der mitochondrialen Atmung durch Hyp1 die Pathogenese sowie schlussendlich das neurologische Outcome nach SHT tatsächlich beeinflusst, bleibt so zunächst unklar. Ob der vermutete entkoppelnde Effekt des Hyp1 tatsächlich auf protonophore Eigenschaften zurückzuführen ist und Hyp1 ähnlich den bekannten Entkopplern FCCP und 2,4-DNP durch die Beeinflussung mitochondrialer Dysfunktion im Sinne einer milden mitochondrialen Entkopplung neuroprotektiv wirkt, gilt es in künftigen Studien weiter zu beleuchten.

## 7. Literaturverzeichnis

1. Fleminger S, Ponsford J. Long term outcome after traumatic brain injury. *Bmj*. 2005;331(7530):1419-20.
2. Maas AIR, Menon DK, Adelson PD, Andelic N, Bell MJ, Belli A, et al. Traumatic brain injury: integrated approaches to improve prevention, clinical care, and research. *Lancet Neurol*. 2017;16(12):987-1048.
3. Langlois JA, Rutland-Brown W, Wald MM. The epidemiology and impact of traumatic brain injury: a brief overview. *J Head Trauma Rehabil*. 2006;21(5):375-8.
4. Rosenfeld JV, Maas AI, Bragge P, Morganti-Kossmann MC, Manley GT, Gruen RL. Early management of severe traumatic brain injury. *Lancet*. 2012;380(9847):1088-98.
5. Moore L, Evans D, Hameed SM, Yanchar NL, Stelfox HT, Simons R, et al. Mortality in Canadian Trauma Systems: A Multicenter Cohort Study. *Ann Surg*. 2017;265(1):212-7.
6. Seifert J. Incidence and economic burden of injuries in the United States. *J Epidemiol Community Health*. 2007;61(10):926-.
7. Maegele M, Lefering R, Sakowitz O, Kopp MA, Schwab JM, Steudel WI, et al. The Incidence and Management of Moderate to Severe Head Injury. *Dtsch Arztebl Int*. 2019;116(10):167-73.
8. Menon DK, Schwab K, Wright DW, Maas AI. Position statement: definition of traumatic brain injury. *Arch Phys Med Rehabil*. 2010;91(11):1637-40.
9. Morganti-Kossmann MC, Semple BD, Hellewell SC, Bye N, Ziebell JM. The complexity of neuroinflammation consequent to traumatic brain injury: from research evidence to potential treatments. *Acta Neuropathol*. 2019;137(5):731-55.
10. Werner C, Engelhard K. Pathophysiology of traumatic brain injury. *Br J Anaesth*. 2007;99(1):4-9.
11. Maas AI, Stocchetti N, Bullock R. Moderate and severe traumatic brain injury in adults. *Lancet Neurol*. 2008;7(8):728-41.
12. Simon DW, McGeachy MJ, Bayir H, Clark RSB, Loane DJ, Kochanek PM. The far-reaching scope of neuroinflammation after traumatic brain injury. *Nat Rev Neurol*. 2017;13(9):572.
13. McKee AC, Daneshvar DH. The neuropathology of traumatic brain injury. *Handb Clin Neurol*. 2015;127:45-66.
14. Ghajar J. Traumatic brain injury. *Lancet*. 2000;356(9233):923-9.
15. Loane DJ, Faden AI. Neuroprotection for traumatic brain injury: translational challenges and emerging therapeutic strategies. *Trends Pharmacol Sci*. 2010;31(12):596-604.
16. Samadani U, Daly, S. R. . When will a clinical trial for traumatic brain injury succeed. *AANS Neurosurgeon*. 2016.
17. Müller WE. Current St John's wort research from mode of action to clinical efficacy. *Pharmacol Res*. 2003;47(2):101-9.
18. Schempp CM, Kirkin V, Simon-Haarhaus B, Kersten A, Kiss J, Termeer CC, et al. Inhibition of tumour cell growth by hyperforin, a novel anticancer drug from St. John's wort that acts by induction of apoptosis. *Oncogene*. 2002;21(8):1242-50.
19. Schempp CM, Pelz K, Wittmer A, Schöpf E, Simon JC. Antibacterial activity of hyperforin from St John's wort, against multiresistant *Staphylococcus aureus* and gram-positive bacteria. *Lancet*. 1999;353(9170):2129.
20. Lin Y, Zhang J-C, Fu J, Chen F, Wang J, Wu Z-L, et al. Hyperforin attenuates brain damage induced by transient middle cerebral artery occlusion (MCAO) in rats via inhibition of TRPC6 channels degradation. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2013;33(2):253-62.
21. Yao H, Zhang Y, Shu H, Xie B, Tao Y, Yuan Y, et al. Hyperforin Promotes Post-stroke Neuroangiogenesis via Astrocytic IL-6-Mediated Negative Immune Regulation in the Ischemic Brain. *Frontiers in cellular neuroscience*. 2019;13:201-.

22. Leuner K, Kazanski V, Müller M, Essin K, Henke B, Gollasch M, et al. Hyperforin--a key constituent of St. John's wort specifically activates TRPC6 channels. *Faseb j.* 2007;21(14):4101-11.
23. Sell TS, Belkacemi T, Flockerzi V, Beck A. Protonophore properties of hyperforin are essential for its pharmacological activity. *Scientific reports.* 2014;4:7500-.
24. Leuner K, Heiser JH, Derksen S, Mladenov MI, Fehske CJ, Schubert R, et al. Simple 2,4-diacetylphloroglucinols as classic transient receptor potential-6 activators--identification of a novel pharmacophore. *Mol Pharmacol.* 2010;77(3):368-77.
25. Nayak D, Roth TL, McGavern DB. Microglia development and function. *Annual review of immunology.* 2014;32:367-402.
26. Ng QX, Venkatanarayanan N, Ho CY. Clinical use of *Hypericum perforatum* (St John's wort) in depression: A meta-analysis. *J Affect Disord.* 2017;210:211-21.
27. Schünke M, Schulte, E., Schumacher, U. Prometheus LernAtlas der Anatomie: Kopf, Hals und Neuroanatomie, 4. Auflage, Stuttgart: Thieme Verlag, 2015.
28. Huggenbergs S, Moser, N, Schröder H, Cozzi B, Granato A, Merighi A. Neuroanatomie des Menschen, 1. Auflage, Berlin: Springer, 2018.
29. M. T. Neuroanatomie, 7. Auflage, Amsterdam: Elsevier, 2017.
30. Schmidt R LF, Heckmann M. Physiologie des Menschen, 31. Auflage, Berlin: Springer, 2011.
31. Lüllmann-Rauch R. Taschenlehrbuch Histologie, 5. Auflage, Stuttgart, Thieme Verlag 2015.
32. Wolf SA, Boddeke HW, Kettenmann H. Microglia in Physiology and Disease. *Annu Rev Physiol.* 2017;79:619-43.
33. Dimou L, Wegner M. Oligodendrogliale Heterogenität in Zeit und Raum (NG2 Glia im ZNS). *e-Neuroforum.* 2015;21.
34. Tower DB, Young OM. The activities of butyrylcholinesterase and carbonic anhydrase, the rate of anaerobic glycolysis, and the question of a constant density of glial cells in cerebral cortices of various mammalian species from mouse to whale. *J Neurochem.* 1973;20(2):269-78.
35. Simard M, Nedergaard M. The neurobiology of glia in the context of water and ion homeostasis. *Neuroscience.* 2004;129(4):877-96.
36. Volterra A, Meldolesi J. Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. *Nat Rev Neurosci.* 2005;6(8):626-40.
37. Guillamón-Vivancos T, Gómez-Pinedo U, Matías-Guiu J. Astrocytes in neurodegenerative diseases: function and molecular description. *Neurología (English Edition).* 2015;30(2):119-29.
38. Rouach N, Koulakoff A, Abudara V, Willecke K, Giaume C. Astroglial metabolic networks sustain hippocampal synaptic transmission. *Science.* 2008;322(5907):1551-5.
39. Lyck L, Santamaria ID, Pakkenberg B, Chemnitz J, Schröder HD, Finsen B, et al. An empirical analysis of the precision of estimating the numbers of neurons and glia in human neocortex using a fractionator-design with sub-sampling. *Journal of Neuroscience Methods.* 2009;182(2):143-56.
40. Pelvig DP, Pakkenberg H, Stark AK, Pakkenberg B. Neocortical glial cell numbers in human brains. *Neurobiology of Aging.* 2008;29(11):1754-62.
41. Ginhoux F, Greter M, Leboeuf M, Nandi S, See P, Gokhan S, et al. Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science.* 2010;330(6005):841-5.
42. Bilimoria PM, Stevens B. Microglia function during brain development: New insights from animal models. *Brain Res.* 2015;1617:7-17.
43. Yeo W, Gautier J. Early neural cell death: dying to become neurons. *Developmental Biology.* 2004;274(2):233-44.
44. Ueno M, Fujita Y, Tanaka T, Nakamura Y, Kikuta J, Ishii M, et al. Layer V cortical neurons require microglial support for survival during postnatal development. *Nature Neuroscience.* 2013;16(5):543-51.

45. Kettenmann H, Kirchhoff F, Verkhratsky A. Microglia: New Roles for the Synaptic Stripper. *Neuron*. 2013;77(1):10-8.
46. Colonna M, Butovsky O. Microglia Function in the Central Nervous System During Health and Neurodegeneration. *Annual Review of Immunology*. 2017;35(1):441-68.
47. Lauro C, Chece G, Monaco L, Antonangeli F, Peruzzi G, Rinaldo S, et al. Fractalkine Modulates Microglia Metabolism in Brain Ischemia. *Frontiers in cellular neuroscience*. 2019;13:414-.
48. Michell-Robinson MA, Touil H, Healy LM, Owen DR, Durafourt BA, Bar-Or A, et al. Roles of microglia in brain development, tissue maintenance and repair. *Brain*. 2015;138 (Pt 5):1138-59.
49. Hickman S, Izzy S, Sen P, Morsett L, El Khoury J. Microglia in neurodegeneration. *Nat Neurosci*. 2018;21(10):1359-69.
50. Ma Y, Wang J, Wang Y, Yang GY. The biphasic function of microglia in ischemic stroke. *Prog Neurobiol*. 2017;157:247-72.
51. Loane DJ, Kumar A. Microglia in the TBI brain: The good, the bad, and the dysregulated. *Exp Neurol*. 2016;275 Pt 3(0 3):316-27.
52. Teasdale G, Maas A, Lecky F, Manley G, Stocchetti N, Murray G. The Glasgow Coma Scale at 40 years: standing the test of time. *Lancet Neurol*. 2014;13(8):844-54.
53. Teasdale G, Jennett B. Assessment of coma and impaired consciousness. A practical scale. *Lancet*. 1974;2(7872):81-4.
54. Jennett B, Teasdale G. ASPECTS OF COMA AFTER SEVERE HEAD INJURY. *The Lancet*. 1977;309(8017):878-81.
55. Braine ME, Cook N. The Glasgow Coma Scale and evidence-informed practice: a critical review of where we are and where we need to be. *J Clin Nurs*. 2017;26(1-2):280-93.
56. Matis G, Birbilis T. The Glasgow Coma Scale--a brief review. Past, present, future. *Acta Neurol Belg*. 2008;108(3):75-89.
57. Augat P, Baas NU, Beickert R, Botzlar A, Bühren V, Carrel T, et al. Mögliche klinische Symptomatik der Hirnfunktionsstörung. In: Bühren V, Keel MJB, Marzi I, editors. *Checkliste Traumatologie*. 8., vollständig überarbeitete Auflage ed: Georg Thieme Verlag; 2016.
58. Pingel A, Hoffmann C-H. Schädel-Hirn-Trauma (SHT). In: Günther K-P, Hoffmann R, editors. *SOPs in der Orthopädie und Unfallchirurgie*. 1. Auflage ed: Georg Thieme Verlag; 2017.
59. Peeters W, van den Brande R, Polinder S, Brazinova A, Steyerberg EW, Lingsma HF, et al. Epidemiology of traumatic brain injury in Europe. *Acta Neurochir (Wien)*. 2015;157(10):1683-96.
60. Brazinova A, Rehorcikova V, Taylor MS, Buckova V, Majdan M, Psota M, et al. Epidemiology of Traumatic Brain Injury in Europe: A Living Systematic Review. *J Neurotrauma*. 2018.
61. DESTATIS GDBGGVRU. Diagnosedaten der Krankenhäuser ab 2000 (Eckdaten der vollstationären Patienten und Patientinnen). Gliederungsmerkmale: Jahre, Behandlungs-/Wohnort, ICD10, Region: Deutschland, ICD10: S06 Intrakranielle Verletzung, Art der Standardisierung: Standardbevölkerung "Deutschland 2011 [Internet], letztes Update: 05.09.2020, [zitiert am 18.09.2020], URL:[http://www.gbe-bund.de/oowa921-install/servlet/oowa/aw92/dboowasys921.xwdevkit/xwd\\_init?gbe.isgbetol/xs\\_start\\_neu/&p\\_aid=i&p\\_aid=89673085&nummer=550&p\\_sprache=D&p\\_indsp=-&p\\_aid=49953614](http://www.gbe-bund.de/oowa921-install/servlet/oowa/aw92/dboowasys921.xwdevkit/xwd_init?gbe.isgbetol/xs_start_neu/&p_aid=i&p_aid=89673085&nummer=550&p_sprache=D&p_indsp=-&p_aid=49953614)
62. Tagliaferri F, Compagnone C, Korsic M, Servadei F, Kraus J. A systematic review of brain injury epidemiology in Europe. *Acta Neurochir (Wien)*. 2006;148(3):255-68; discussion 68.
63. Roozenbeek B, Maas AI, Menon DK. Changing patterns in the epidemiology of traumatic brain injury. *Nat Rev Neurol*. 2013;9(4):231-6.
64. Coronado VG, Thomas KE, Sattin RW, Johnson RL. The CDC traumatic brain injury surveillance system: characteristics of persons aged 65 years and older hospitalized with a TBI. *J Head Trauma Rehabil*. 2005;20(3):215-28.



65. Rubiano AM, Carney N, Chesnut R, Puyana JC. Global neurotrauma research challenges and opportunities. *Nature*. 2015;527(7578):S193-7.
66. Iaccarino C, Carretta A, Nicolosi F, Morselli C. Epidemiology of severe traumatic brain injury. *J Neurosurg Sci*. 2018;62(5):535-41.
67. Macpherson A, Spinks A. Bicycle helmet legislation for the uptake of helmet use and prevention of head injuries. *Cochrane Database Syst Rev*. 2008(3):Cd005401.
68. Lam C, Wiratama BS, Chang WH, Chen PL, Chiu WT, Saleh W, et al. Effect of motorcycle helmet types on head injuries: evidence from eight level-I trauma centres in Taiwan. *BMC Public Health*. 2020;20(1):78.
69. Richter ED, Berman T, Friedman L, Ben-David G. Speed, road injury, and public health. *Annu Rev Public Health*. 2006;27:125-52.
70. Bunn F, Collier T, Frost C, Ker K, Roberts I, Wentz R. Traffic calming for the prevention of road traffic injuries: systematic review and meta-analysis. *Inj Prev*. 2003;9(3):200-4.
71. da Silva Meirelles L, Simon D, Regner A. Neurotrauma: The Crosstalk between Neurotrophins and Inflammation in the Acutely Injured Brain. *Int J Mol Sci*. 2017;18(5).
72. Ramos-Cejudo J, Wisniewski T, Marmar C, Zetterberg H, Blennow K, de Leon MJ, et al. Traumatic Brain Injury and Alzheimer's Disease: The Cerebrovascular Link. *EBioMedicine*. 2018;28:21-30.
73. Mendez MF. What is the Relationship of Traumatic Brain Injury to Dementia? *J Alzheimers Dis*. 2017;57(3):667-81.
74. Gardner RC, Byers AL, Barnes DE, Li Y, Boscardin J, Yaffe K. Mild TBI and risk of Parkinson disease: A Chronic Effects of Neurotrauma Consortium Study. *Neurology*. 2018;90(20):e1771-e9.
75. VanItallie TB. Traumatic brain injury (TBI) in collision sports: Possible mechanisms of transformation into chronic traumatic encephalopathy (CTE). *Metabolism*. 2019;100s:153943.
76. Pitkänen A, Immonen R. Epilepsy related to traumatic brain injury. *Neurotherapeutics*. 2014;11(2):286-96.
77. Ahmed S, Venigalla H, Mekala HM, Dar S, Hassan M, Ayub S. Traumatic Brain Injury and Neuropsychiatric Complications. *Indian J Psychol Med*. 2017;39(2):114-21.
78. Zaninotto AL, Vicentini JE, Fregni F, Rodrigues PA, Botelho C, de Lucia MCS, et al. Updates and Current Perspectives of Psychiatric Assessments after Traumatic Brain Injury: A Systematic Review. *Front Psychiatry*. 2016;7:95-.
79. Andelic N, Howe EI, Hellstrøm T, Sanchez MF, Lu J, Løvstad M, et al. Disability and quality of life 20 years after traumatic brain injury. *Brain Behav*. 2018;8(7):e01018.
80. Raj R, Bendel S, Reinikainen M, Hoppu S, Laitio R, Ala-Kokko T, et al. Costs, outcome and cost-effectiveness of neurocritical care: a multi-center observational study. *Crit Care*. 2018;22(1):225.
81. van Dijck J, Dijkman MD, Ophuis RH, de Ruiten GCW, Peul WC, Polinder S. In-hospital costs after severe traumatic brain injury: A systematic review and quality assessment. *PLoS One*. 2019;14(5):e0216743.
82. Blennow K, Brody DL, Kochanek PM, Levin H, McKee A, Ribbers GM, et al. Traumatic brain injuries. *Nature Reviews Disease Primers*. 2016;2(1):16084.
83. Steenerson K, Starling AJ. Pathophysiology of Sports-Related Concussion. *Neurol Clin*. 2017;35(3):403-8.
84. Gennarelli TA, Thibault LE, Adams JH, Graham DI, Thompson CJ, Marcincin RP. Diffuse axonal injury and traumatic coma in the primate. *Ann Neurol*. 1982;12(6):564-74.
85. Ng SY, Lee AYW. Traumatic Brain Injuries: Pathophysiology and Potential Therapeutic Targets. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2019;13(528).
86. Johnson VE, Stewart W, Smith DH. Axonal pathology in traumatic brain injury. *Experimental neurology*. 2013;246:35-43.
87. da Fonseca AC, Matias D, Garcia C, Amaral R, Geraldo LH, Freitas C, et al. The impact of microglial activation on blood-brain barrier in brain diseases. *Front Cell Neurosci*. 2014;8:362.

88. Stoffel M, Rinecker M, Graf R, Baethmann A, Plesnila N. Nitric oxide in the penumbra of a focal cortical necrosis in rats. *Neuroscience Letters*. 2002;324(3):201-4.
89. Niethard FU, Pfeil J, Biberthaler P. Schädel-Hirn-Trauma (SHT). In: Niethard FU, Pfeil J, Biberthaler P, editors. *Duale Reihe Orthopädie und Unfallchirurgie*. 8., unveränderte Auflage ed: Georg Thieme Verlag; 2017.
90. Le Roux P. *Frontiers in Neuroscience* Intracranial Pressure Monitoring and Management. In: Laskowitz D, Grant G, editors. *Translational Research in Traumatic Brain Injury*. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor and Francis Group © 2016 by Taylor & Francis Group, LLC.; 2016.
91. Yang Y, Estrada EY, Thompson JF, Liu W, Rosenberg GA. Matrix metalloproteinase-mediated disruption of tight junction proteins in cerebral vessels is reversed by synthetic matrix metalloproteinase inhibitor in focal ischemia in rat. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2007;27(4):697-709.
92. Corps KN, Roth TL, McGavern DB. Inflammation and Neuroprotection in Traumatic Brain Injury. *JAMA Neurology*. 2015;72(3):355-62.
93. Chesnut RM, Marshall LF, Klauber MR, Blunt BA, Baldwin N, Eisenberg HM, et al. The role of secondary brain injury in determining outcome from severe head injury. *J Trauma*. 1993;34(2):216-22.
94. Firsching R. RE, Mauer U.M., Sakowitz O.W., Messing-Jünger M., Engelhard K., Schwenkreis P., Linn J., Biberthaler P., Schwerdtfeger K. LEITLINIE SCHÄDEL-HIRN-TRAUMA IM ERWACHSENENALTER, S2e, AWMF-Register Nr. 008/001. 2015.
95. Faden AI, Demediuk P, Panter SS, Vink R. The role of excitatory amino acids and NMDA receptors in traumatic brain injury. *Science*. 1989;244(4906):798.
96. Cheng G, Kong R-h, Zhang L-m, Zhang J-n. Mitochondria in traumatic brain injury and mitochondrial-targeted multipotential therapeutic strategies. *British journal of pharmacology*. 2012;167(4):699-719.
97. Khatri N, Thakur M, Pareek V, Kumar S, Sharma S, Datusalia AK. Oxidative Stress: Major Threat in Traumatic Brain Injury. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2018;17(9):689-95.
98. Bianchi ME. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *Journal of Leukocyte Biology*. 2007;81(1):1-5.
99. Takeuchi O, Akira S. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell*. 2010;140(6):805-20.
100. Kim JY, Kim JW, Yenari MA. Heat shock protein signaling in brain ischemia and injury. *Neurosci Lett*. 2020;715:134642.
101. Eltzschig HK, Sitkovsky MV, Robson SC. Purinergic signaling during inflammation. *N Engl J Med*. 2012;367(24):2322-33.
102. Calovi S, Mut-Arbona P, Sperlágh B. Microglia and the Purinergic Signaling System. *Neuroscience*. 2019;405:137-47.
103. Davalos D, Grutzendler J, Yang G, Kim JV, Zuo Y, Jung S, et al. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nature Neuroscience*. 2005;8(6):752-8.
104. Jassam YN, Izzy S, Whalen M, McGavern DB, El Khoury J. Neuroimmunology of Traumatic Brain Injury: Time for a Paradigm Shift. *Neuron*. 2017;95(6):1246-65.
105. Rotshenker S. Microglia and macrophage activation and the regulation of complement-receptor-3 (CR3/MAC-1)-mediated myelin phagocytosis in injury and disease. *J Mol Neurosci*. 2003;21(1):65-72.
106. Redondo-Castro E, Hernández J, Mahy N, Navarro X. Phagocytic microglial phenotype induced by glibenclamide improves functional recovery but worsens hyperalgesia after spinal cord injury in adult rats. *Eur J Neurosci*. 2013;38(12):3786-98.
107. Fu R, Shen Q, Xu P, Luo JJ, Tang Y. Phagocytosis of microglia in the central nervous system diseases. *Mol Neurobiol*. 2014;49(3):1422-34.

108. Kumar A, Stoica BA, Sabirzhanov B, Burns MP, Faden AI, Loane DJ. Traumatic brain injury in aged animals increases lesion size and chronically alters microglial/macrophage classical and alternative activation states. *Neurobiology of aging*. 2013;34(5):1397-411.
109. Tang Y, Le W. Differential Roles of M1 and M2 Microglia in Neurodegenerative Diseases. *Mol Neurobiol*. 2016;53(2):1181-94.
110. Karve IP, Taylor JM, Crack PJ. The contribution of astrocytes and microglia to traumatic brain injury. *British journal of pharmacology*. 2016;173(4):692-702.
111. Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu M-Y, Huffel CV, Du X, et al. Defective LPS Signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr Mice: Mutations in  $\text{Tlr4}$  Gene. *Science*. 1998;282(5396):2085.
112. Płóciennikowska A, Hromada-Judycka A, Borzęcka K, Kwiatkowska K. Co-operation of TLR4 and raft proteins in LPS-induced pro-inflammatory signaling. *Cell Mol Life Sci*. 2015;72(3):557-81.
113. Zheng X, Huang H, Liu J, Li M, Liu M, Luo T. Propofol Attenuates Inflammatory Response in LPS-Activated Microglia by Regulating the miR-155/SOCS1 Pathway. *Inflammation*. 2018;41(1):11-9.
114. Orihuela R, McPherson CA, Harry GJ. Microglial M1/M2 polarization and metabolic states. *Br J Pharmacol*. 2016;173(4):649-65.
115. Giridharan S, Srinivasan M. Mechanisms of NF- $\kappa$ B p65 and strategies for therapeutic manipulation. *J Inflamm Res*. 2018;11:407-19.
116. Sakurai H, Chiba H, Miyoshi H, Sugita T, Toriumi W. I $\kappa$ B kinases phosphorylate NF- $\kappa$ B p65 subunit on serine 536 in the transactivation domain. *J Biol Chem*. 1999;274(43):30353-6.
117. Hawkey CJ. COX-1 and COX-2 inhibitors. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*. 2001;15(5):801-20.
118. Yang MS, Ji KA, Jeon SB, Jin BK, Kim SU, Jou I, et al. Interleukin-13 enhances cyclooxygenase-2 expression in activated rat brain microglia: implications for death of activated microglia. *J Immunol*. 2006;177(2):1323-9.
119. Teismann P, Tieu K, Choi DK, Wu DC, Naini A, Hunot S, et al. Cyclooxygenase-2 is instrumental in Parkinson's disease neurodegeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(9):5473-8.
120. Lin TY, Lu CW, Wang CC, Huang SK, Wang SJ. Cyclooxygenase 2 inhibitor celecoxib inhibits glutamate release by attenuating the PGE2/EP2 pathway in rat cerebral cortex endings. *J Pharmacol Exp Ther*. 2014;351(1):134-45.
121. del Zoppo G, Ginis I, Hallenbeck JM, Iadecola C, Wang X, Feuerstein GZ. Inflammation and Stroke: Putative Role for Cytokines, Adhesion Molecules and iNOS in Brain Response to Ischemia. *Brain Pathology*. 2000;10(1):95-112.
122. Rodney T, Osier N, Gill J. Pro- and anti-inflammatory biomarkers and traumatic brain injury outcomes: A review. *Cytokine*. 2018;110:248-56.
123. Weber DJ, Allette YM, Wilkes DS, White FA. The HMGB1-RAGE Inflammatory Pathway: Implications for Brain Injury-Induced Pulmonary Dysfunction. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2015;23(17):1316-28.
124. Ziebell JM, Morganti-Kossmann MC. Involvement of pro- and anti-inflammatory cytokines and chemokines in the pathophysiology of traumatic brain injury. *Neurotherapeutics*. 2010;7(1):22-30.
125. Penkowa M, Camats J, Hadberg H, Quintana A, Rojas S, Giralt M, et al. Astrocyte-targeted expression of interleukin-6 protects the central nervous system during neuroglial degeneration induced by 6-aminonicotinamide. *J Neurosci Res*. 2003;73(4):481-96.
126. Schmidt OI, Leinhase I, Hasenboehler E, Morgan SJ, Stahel PF. Die Bedeutung der posttraumatischen Entzündungsreaktion im verletzten Gehirn. *Der Orthopäde*. 2007;36(3):248-58.

127. Yan HQ, Banos MA, Herregodts P, Hooghe R, Hooghe-Peters EL. Expression of interleukin (IL)-1 beta, IL-6 and their respective receptors in the normal rat brain and after injury. *Eur J Immunol.* 1992;22(11):2963-71.
128. Sulhan S, Lyon KA, Shapiro LA, Huang JH. Neuroinflammation and blood-brain barrier disruption following traumatic brain injury: Pathophysiology and potential therapeutic targets. *J Neurosci Res.* 2020;98(1):19-28.
129. Jones NC, Prior MJW, Burden-Teh E, Marsden CA, Morris PG, Murphy S. Antagonism of the interleukin-1 receptor following traumatic brain injury in the mouse reduces the number of nitric oxide synthase-2-positive cells and improves anatomical and functional outcomes. *European Journal of Neuroscience.* 2005;22(1):72-8.
130. Wang G, Zhang J, Hu X, Zhang L, Mao L, Jiang X, et al. Microglia/macrophage polarization dynamics in white matter after traumatic brain injury. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism.* 2013;33(12):1864-74.
131. Ramlackhansingh AF, Brooks DJ, Greenwood RJ, Bose SK, Turkheimer FE, Kinnunen KM, et al. Inflammation after trauma: Microglial activation and traumatic brain injury. *Annals of Neurology.* 2011;70(3):374-83.
132. Saijo K, Glass CK. Microglial cell origin and phenotypes in health and disease. *Nature Reviews Immunology.* 2011;11(11):775-87.
133. Colombo E, Farina C. Astrocytes: Key Regulators of Neuroinflammation. *Trends in Immunology.* 2016;37(9):608-20.
134. Sofroniew MV, Vinters HV. Astrocytes: biology and pathology. *Acta neuropathologica.* 2010;119(1):7-35.
135. Cregg JM, DePaul MA, Filous AR, Lang BT, Tran A, Silver J. Functional regeneration beyond the glial scar. *Experimental neurology.* 2014;253:197-207.
136. Wang H, Song G, Chuang H, Chiu C, Abdelmaksoud A, Ye Y, et al. Portrait of glial scar in neurological diseases. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2018;31:2058738418801406.
137. Sofroniew MV. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends in Neurosciences.* 2009;32(12):638-47.
138. Burda JE, Bernstein AM, Sofroniew MV. Astrocyte roles in traumatic brain injury. *Experimental Neurology.* 2016;275:305-15.
139. Tehse J, Taghibiglou C. The overlooked aspect of excitotoxicity: Glutamate-independent excitotoxicity in traumatic brain injuries. *European Journal of Neuroscience.* 2019;49(9):1157-70.
140. Jayakumar AR, Tong XY, Ruiz-Cordero R, Bregy A, Bethea JR, Bramlett HM, et al. Activation of NF- $\kappa$ B Mediates Astrocyte Swelling and Brain Edema in Traumatic Brain Injury. *Journal of Neurotrauma.* 2014;31(14):1249-57.
141. Schwulst SJ, Trahanas DM, Saber R, Perlman H. Traumatic brain injury-induced alterations in peripheral immunity. *J Trauma Acute Care Surg.* 2013;75(5):780-8.
142. Lu J, Goh SJ, Tng PY, Deng YY, Ling EA, Moochhala S. Systemic inflammatory response following acute traumatic brain injury. *Front Biosci (Landmark Ed).* 2009;14:3795-813.
143. Carlos TM, Clark RS, Franicola-Higgins D, Schiding JK, Kochanek PM. Expression of endothelial adhesion molecules and recruitment of neutrophils after traumatic brain injury in rats. *J Leukoc Biol.* 1997;61(3):279-85.
144. Beschorner R, Nguyen TD, Gözalan F, Pedal I, Mattern R, Schluesener HJ, et al. CD14 expression by activated parenchymal microglia/macrophages and infiltrating monocytes following human traumatic brain injury. *Acta Neuropathologica.* 2002;103(6):541-9.
145. Nizamutdinov D, Shapiro LA. Overview of Traumatic Brain Injury: An Immunological Context. *Brain sciences.* 2017;7(1):11.
146. Roth TL, Nayak D, Atanasijevic T, Koretsky AP, Latour LL, McGavern DB. Transcranial amelioration of inflammation and cell death after brain injury. *Nature.* 2014;505(7482):223-8.

147. Kenne E, Erlandsson A, Lindbom L, Hillered L, Clausen F. Neutrophil depletion reduces edema formation and tissue loss following traumatic brain injury in mice. *J Neuroinflammation*. 2012;9:17.
148. Stirling DP, Liu S, Kubes P, Yong VW. Depletion of Ly6G/Gr-1 leukocytes after spinal cord injury in mice alters wound healing and worsens neurological outcome. *J Neurosci*. 2009;29(3):753-64.
149. Wynn TA, Vannella KM. Macrophages in Tissue Repair, Regeneration, and Fibrosis. *Immunity*. 2016;44(3):450-62.
150. Melzer N, Meuth SG, Wiendl H. CD8+ T cells and neuronal damage: direct and collateral mechanisms of cytotoxicity and impaired electrical excitability. *Faseb j*. 2009;23(11):3659-73.
151. Moalem G, Leibowitz-Amit R, Yoles E, Mor F, Cohen IR, Schwartz M. Autoimmune T cells protect neurons from secondary degeneration after central nervous system axotomy. *Nat Med*. 1999;5(1):49-55.
152. Abdul-Muneer PM, Pfister BJ, Haorah J, Chandra N. Role of Matrix Metalloproteinases in the Pathogenesis of Traumatic Brain Injury. *Mol Neurobiol*. 2016;53(9):6106-23.
153. Yong VW. Metalloproteinases: mediators of pathology and regeneration in the CNS. *Nat Rev Neurosci*. 2005;6(12):931-44.
154. Candelario-Jalil E, Yang Y, Rosenberg GA. Diverse roles of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in neuroinflammation and cerebral ischemia. *Neuroscience*. 2009;158(3):983-94.
155. Warren KM, Reeves TM, Phillips LL. MT5-MMP, ADAM-10, and N-cadherin act in concert to facilitate synapse reorganization after traumatic brain injury. *J Neurotrauma*. 2012;29(10):1922-40.
156. Rabizadeh S, Bredesen DE. Ten years on: mediation of cell death by the common neurotrophin receptor p75NTR. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 2003;14(3):225-39.
157. Clewes O, Fahey MS, Tyler SJ, Watson JJ, Seok H, Catania C, et al. Human ProNGF: biological effects and binding profiles at TrkA, P75NTR and sortilin. *J Neurochem*. 2008;107(4):1124-35.
158. Sebastiani A, Granold M, Ditter A, Sebastiani P, Gölz C, Pöttker B, et al. Posttraumatic Propofol Neurotoxicity Is Mediated via the Pro-Brain-Derived Neurotrophic Factor-p75 Neurotrophin Receptor Pathway in Adult Mice\*. *Critical Care Medicine*. 2016;44(2).
159. Koshimizu H, Hazama S, Hara T, Ogura A, Kojima M. Distinct signaling pathways of precursor BDNF and mature BDNF in cultured cerebellar granule neurons. *Neurosci Lett*. 2010;473(3):229-32.
160. Yan X-X, Jeromin A, Jeromin A. Spectrin Breakdown Products (SBDPs) as Potential Biomarkers for Neurodegenerative Diseases. *Curr Transl Geriatr Exp Gerontol Rep*. 2012;1(2):85-93.
161. Büki A, Povlishock JT. All roads lead to disconnection?--Traumatic axonal injury revisited. *Acta Neurochir (Wien)*. 2006;148(2):181-93; discussion 93-4.
162. Labonté B, Jeong YH, Parise E, Issler O, Fatma M, Engmann O, et al. Gadd45b mediates depressive-like role through DNA demethylation. *Scientific Reports*. 2019;9(1):4615.
163. Nikolaienko O, Patil S, Eriksen MS, Bramham CR. Arc protein: a flexible hub for synaptic plasticity and cognition. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 2018;77:33-42.
164. Martin WF, Garg S, Zimorski V. Endosymbiotic theories for eukaryote origin. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2015;370(1678):20140330-.
165. Wallace DC. Why Do We Still Have a Maternally Inherited Mitochondrial DNA? Insights from Evolutionary Medicine. *Annual Review of Biochemistry*. 2007;76(1):781-821.
166. Heinrich P MM, Graeve L. *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*, 9. Auflage, Berlin: Springer, 2014.
167. Yonutas HM, Vekaria HJ, Sullivan PG. Mitochondrial specific therapeutic targets following brain injury. *Brain Res*. 2016;1640(Pt A):77-93.

168. Engl E, Attwell D. Non-signalling energy use in the brain. *The Journal of physiology*. 2015;593(16):3417-29.
169. Attwell D, Laughlin SB. An energy budget for signaling in the grey matter of the brain. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2001;21(10):1133-45.
170. Harris JJ, Attwell D. The energetics of CNS white matter. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2012;32(1):356-71.
171. van der Blik AM, Sedensky MM, Morgan PG. *Cell Biology of the Mitochondrion*. Genetics. 2017;207(3):843-71.
172. Jastroch M, Divakaruni AS, Mookerjee S, Treberg JR, Brand MD. Mitochondrial proton and electron leaks. *Essays Biochem*. 2010;47:53-67.
173. Brand MD, Pakay JL, Ocloo A, Kokoszka J, Wallace DC, Brookes PS, et al. The basal proton conductance of mitochondria depends on adenine nucleotide translocase content. *The Biochemical journal*. 2005;392(Pt 2):353-62.
174. Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J*. 2009;417(1):1-13.
175. Shadel GS, Horvath TL. Mitochondrial ROS signaling in organismal homeostasis. *Cell*. 2015;163(3):560-9.
176. De Stefani D, Raffaello A, Teardo E, Szabò I, Rizzuto R. A forty-kilodalton protein of the inner membrane is the mitochondrial calcium uniporter. *Nature*. 2011;476(7360):336-40.
177. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*. 2007;35(4):495-516.
178. Lau A, Tymianski M. Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*. 2010;460(2):525-42.
179. Dawson VL, Kizushi VM, Huang PL, Snyder SH, Dawson TM. Resistance to neurotoxicity in cortical cultures from neuronal nitric oxide synthase-deficient mice. *J Neurosci*. 1996;16(8):2479-87.
180. Sattler R, Xiong Z, Lu WY, Hafner M, MacDonald JF, Tymianski M. Specific coupling of NMDA receptor activation to nitric oxide neurotoxicity by PSD-95 protein. *Science*. 1999;284(5421):1845-8.
181. Tenneti L, D'Emilia DM, Troy CM, Lipton SA. Role of caspases in N-methyl-D-aspartate-induced apoptosis in cerebrocortical neurons. *J Neurochem*. 1998;71(3):946-59.
182. Pandya JD, Pauly JR, Sullivan PG. The optimal dosage and window of opportunity to maintain mitochondrial homeostasis following traumatic brain injury using the uncoupler FCCP. *Exp Neurol*. 2009;218(2):381-9.
183. Sullivan PG, Sebastian AH, Hall ED. Therapeutic window analysis of the neuroprotective effects of cyclosporine A after traumatic brain injury. *J Neurotrauma*. 2011;28(2):311-8.
184. Sullivan PG, Rabchevsky AG, Waldmeier PC, Springer JE. Mitochondrial permeability transition in CNS trauma: cause or effect of neuronal cell death? *J Neurosci Res*. 2005;79(1-2):231-9.
185. Kilbaugh TJ, Karlsson M, Duhaime AC, Hansson MJ, Elmer E, Margulies SS. Mitochondrial response in a toddler-aged swine model following diffuse non-impact traumatic brain injury. *Mitochondrion*. 2016;26:19-25.
186. Lifshitz J, Friberg H, Neumar RW, Raghupathi R, Welsh FA, Janmey P, et al. Structural and functional damage sustained by mitochondria after traumatic brain injury in the rat: evidence for differentially sensitive populations in the cortex and hippocampus. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2003;23(2):219-31.
187. Pandya JD, Pauly JR, Nukala VN, Sebastian AH, Day KM, Korde AS, et al. Post-Injury Administration of Mitochondrial Uncouplers Increases Tissue Sparing and Improves Behavioral Outcome following Traumatic Brain Injury in Rodents. *J Neurotrauma*. 2007;24(5):798-811.
188. Geisler JG. 2,4 Dinitrophenol as Medicine. *Cells*. 2019;8(3):280.

189. Kilbaugh TJ, Bhandare S, Lorom DH, Saraswati M, Robertson CL, Margulies SS. Cyclosporin A preserves mitochondrial function after traumatic brain injury in the immature rat and piglet. *Journal of neurotrauma*. 2011;28(5):763-74.
190. Sauerbeck A, Gao J, Readnower R, Liu M, Pauly JR, Bing G, et al. Pioglitazone attenuates mitochondrial dysfunction, cognitive impairment, cortical tissue loss, and inflammation following traumatic brain injury. *Experimental Neurology*. 2011;227(1):128-35.
191. Xiong Y, Mahmood A, Chopp M. Animal models of traumatic brain injury. *Nature reviews Neuroscience*. 2013;14(2):128-42.
192. Chiu C-C, Liao Y-E, Yang L-Y, Wang J-Y, Tweedie D, Karnati HK, et al. Neuroinflammation in animal models of traumatic brain injury. *Journal of neuroscience methods*. 2016;272:38-49.
193. Marklund N, Hillered L. Animal modelling of traumatic brain injury in preclinical drug development: where do we go from here? *Br J Pharmacol*. 2011;164(4):1207-29.
194. Osier ND, Dixon CE. The Controlled Cortical Impact Model: Applications, Considerations for Researchers, and Future Directions. *Frontiers in neurology*. 2016;7:134-.
195. Medina MA, Martinez-Poveda B, Amores-Sanchez MI, Quesada AR. Hyperforin: more than an antidepressant bioactive compound? *Life Sci*. 2006;79(2):105-11.
196. Di Carlo G, Borrelli F, Ernst E, Izzo AA. St John's wort: Prozac from the plant kingdom. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2001;22(6):292-7.
197. Quiney C, Billard C, Salanoubat C, Fourneron JD, Kolb JP. Hyperforin, a new lead compound against the progression of cancer and leukemia? *Leukemia*. 2006;20(9):1519-25.
198. S3-Leitlinie/Nationale Versorgungsleitlinie Unipolare Depression, Lngfassung, 2. Auflage, (2015).
199. Bilia AR, Gallori S, Vincieri FF. St. John's wort and depression: Efficacy, safety and tolerability-an update. *Life Sciences*. 2002;70(26):3077-96.
200. Bouron A, Chauvet S, Dryer S, Rosado JA. Second Messenger-Operated Calcium Entry Through TRPC6. *Adv Exp Med Biol*. 2016;898:201-49.
201. Guo C, Ma Y, Ma S, Mu F, Deng J, Duan J, et al. The Role of TRPC6 in the Neuroprotection of Calycosin Against Cerebral Ischemic Injury. *Scientific reports*. 2017;7(1):3039-.
202. Nair A, Vaidya VA. Cyclic AMP response element binding protein and brain-derived neurotrophic factor: molecules that modulate our mood? *J Biosci*. 2006;31(3):423-34.
203. Leuner K, Li W, Amaral MD, Rudolph S, Calfa G, Schuwald AM, et al. Hyperforin modulates dendritic spine morphology in hippocampal pyramidal neurons by activating Ca<sup>2+</sup>-permeable TRPC6 channels. *Hippocampus*. 2013;23(1):40-52.
204. Segal M. Dendritic spines, synaptic plasticity and neuronal survival: activity shapes dendritic spines to enhance neuronal viability. *Eur J Neurosci*. 2010;31(12):2178-84.
205. Treiber K, Singer A, Henke B, Müller WE. Hyperforin activates nonselective cation channels (NSCCs). *Br J Pharmacol*. 2005;145(1):75-83.
206. Thiel G, Rossler OG. Hyperforin activates gene transcription involving transient receptor potential C6 channels. *Biochem Pharmacol*. 2017;129:96-107.
207. Tu P, Gibon J, Bouron A. The TRPC6 channel activator hyperforin induces the release of zinc and calcium from mitochondria. *Journal of Neurochemistry*. 2010;112(1):204-13.
208. Wiechmann K, Müller H, Fischer D, Jauch J, Werz O. The acylphloroglucinols hyperforin and myrtucommulone A cause mitochondrial dysfunctions in leukemic cells by direct interference with mitochondria. *Apoptosis*. 2015;20(11):1508-17.
209. Tao R, Lu R, Wang J, Zeng S, Zhang T, Guo W, et al. Probing the therapeutic potential of TRPC6 for Alzheimer's disease in live neurons from patient-specific iPSCs. *J Mol Cell Biol*. 2020.
210. Wang J, Lu R, Yang J, Li H, He Z, Jing N, et al. TRPC6 specifically interacts with APP to inhibit its cleavage by  $\gamma$ -secretase and reduce A $\beta$  production. *Nat Commun*. 2015;6:8876-.
211. Popugaeva E, Chernyuk D, Zhang H, Postnikova TY, Pats K, Fedorova E, et al. Derivatives of Piperazines as Potential Therapeutic Agents for Alzheimer's Disease. *Mol Pharmacol*. 2019;95(4):337-48.

212. Zhang H, Sun S, Wu L, Pchitskaya E, Zakharova O, Fon Tacer K, et al. Store-Operated Calcium Channel Complex in Postsynaptic Spines: A New Therapeutic Target for Alzheimer's Disease Treatment. *J Neurosci*. 2016;36(47):11837-50.
213. Jiang X, Kumar M, Zhu Y. Protective Effect of Hyperforin on  $\beta$  Amyloid Protein Induced Apoptosis in PC12 Cells and Colchicine Induced Alzheimer's Disease: An Anti-oxidant and Anti-inflammatory Therapy. *J Oleo Sci*. 2018;67(11):1443-53.
214. Wang H, Shao B, Yu H, Xu F, Wang P, Yu K, et al. Neuroprotective role of hyperforin on aluminum maltolate-induced oxidative damage and apoptosis in PC12 cells and SH-SY5Y cells. *Chem Biol Interact*. 2019;299:15-26.
215. Albert D, Zündorf I, Dingermann T, Müller WE, Steinhilber D, Werz O. Hyperforin is a dual inhibitor of cyclooxygenase-1 and 5-lipoxygenase. *Biochemical Pharmacology*. 2002;64(12):1767-75.
216. Koeberle A, Rossi A, Bauer J, Dehm F, Verotta L, Northoff H, et al. Hyperforin, an Anti-Inflammatory Constituent from St. John's Wort, Inhibits Microsomal Prostaglandin E(2) Synthase-1 and Suppresses Prostaglandin E(2) Formation in vivo. *Front Pharmacol*. 2011;2:7.
217. Lee S-K, Kim J-E, Kim Y-J, Kim M-J, Kang T-C. Hyperforin attenuates microglia activation and inhibits p65-Ser276 NF $\kappa$ B phosphorylation in the rat piriform cortex following status epilepticus. *Neuroscience Research*. 2014;85:39-50.
218. Zhou L-F, Chen Q-Z, Yang C-T, Fu Z-D, Zhao S-T, Chen Y, et al. TRPC6 contributes to LPS-induced inflammation through ERK1/2 and p38 pathways in bronchial epithelial cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2017;314(3):C278-C88.
219. Chen JY, Yu Y, Yuan Y, Zhang YJ, Fan XP, Yuan SY, et al. Enriched housing promotes post-stroke functional recovery through astrocytic HMGB1-IL-6-mediated angiogenesis. *Cell Death Discov*. 2017;3:17054.
220. Ma L, Pan X, Zhou F, Liu K, Wang L. Hyperforin protects against acute cerebral ischemic injury through inhibition of interleukin-17A-mediated microglial activation. *Brain Res*. 2018;1678:254-61.
221. Verbraucherschutz BdJuf. Tierschutzgesetz in der Fassung der Bekanntmachung vom 18. Mai 2006 (BGBl. I S. 1206, 1313), das zuletzt durch Artikel 105 des Gesetzes vom 10. August 2021 (BGBl. I S. 3436) geändert worden ist, [zitiert am 23.10.2021] URL: <https://www.gesetze-im-internet.de/tierschg/BJNR012770972.html#BJNR012770972BJNG000103377>. 2006.
222. Verbraucherschutz BdJuf. Tierschutz-Versuchstierverordnung vom 1. August 2013 (BGBl. I S. 3125, 3126), die zuletzt durch Artikel 1 der Verordnung vom 11. August 2021 (BGBl. I S. 3570) geändert worden ist, [zitiert am 23.10.2021]; URL: <https://www.gesetze-im-internet.de/tierschversv/BJNR312600013.html#BJNR312600013BJNG000100000>. 2013.
223. Tsenter J, Beni-Adani L, Assaf Y, Alexandrovich AG, Trembovler V, Shohami E. Dynamic changes in the recovery after traumatic brain injury in mice: effect of injury severity on T2-weighted MRI abnormalities, and motor and cognitive functions. *J Neurotrauma*. 2008;25(4):324-33.
224. Sebastiani A, Gölz C, Sebastiani PG, Bobkiewicz W, Behl C, Mittmann T, et al. Sequestosome 1 Deficiency Delays, but Does Not Prevent Brain Damage Formation Following Acute Brain Injury in Adult Mice. *Frontiers in Neuroscience*. 2017;11(678).
225. Franklin K PG. *Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*, 3. Auflage, Cambridge: Academic Press, 2008.
226. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951;193(1):265-75.
227. Feroze-Merzoug F, Berquin IM, Dey J, Chen YQ. Peptidylprolyl isomerase A (PPIA) as a preferred internal control over GAPDH and beta-actin in quantitative RNA analyses. *Biotechniques*. 2002;32(4):776-8, 80, 82.
228. Timaru-Kast R, Herbig EL, Luh C, Engelhard K, Thal SC. Influence of Age on Cerebral Housekeeping Gene Expression for Normalization of Quantitative Polymerase Chain Reaction after Acute Brain Injury in Mice. *J Neurotrauma*. 2015;32(22):1777-88.



229. Gnaiger E, Kuznetsov AV. Mitochondrial respiration at low levels of oxygen and cytochrome c. *Biochem Soc Trans.* 2002;30(2):252-8.
230. Puchowicz MA, Varnes ME, Cohen BH, Friedman NR, Kerr DS, Hoppel CL. Oxidative phosphorylation analysis: assessing the integrated functional activity of human skeletal muscle mitochondria—case studies. *Mitochondrion.* 2004;4(5):377-85.
231. Lanza IR, Nair KS. Functional assessment of isolated mitochondria in vitro. *Methods Enzymol.* 2009;457:349-72.
232. Nagamoto-Combs K, Kulas J, Combs CK. A novel cell line from spontaneously immortalized murine microglia. *J Neurosci Methods.* 2014;233:187-98.
233. Sahnoun Z, Jamoussi K, Zeghal KM. [Free radicals and antioxidants: physiology, human pathology and therapeutic aspects (part II)]. *Therapie.* 1998;53(4):315-39.
234. Allen Mouse Brain Atlas, Allen Institute for Brain Science (2004); [zitiert am 23.10.2021], URL: <http://mouse.brain-map.org> [Suchbegriff: TRPC6].
235. Appel D, Hummel R, Weidemeier M, Endres K, Gölz C, Schäfer MKE. Pharmacologic Inhibition of ADAM10 Attenuates Brain Tissue Loss, Axonal Injury and Pro-inflammatory Gene Expression Following Traumatic Brain Injury in Mice. *Front Cell Dev Biol.* 2021;9:661462.
236. Hummel R, Ulbrich S, Appel D, Li S, Hirnet T, Zander S, et al. Administration of all-trans retinoic acid after experimental traumatic brain injury is brain protective. *Br J Pharmacol.* 2020;177(22):5208-23.
237. Zhang Z, Larner SF, Liu MC, Zheng W, Hayes RL, Wang KK. Multiple alphaII-spectrin breakdown products distinguish calpain and caspase dominated necrotic and apoptotic cell death pathways. *Apoptosis.* 2009;14(11):1289-98.
238. Ahmad A, Crupi R, Campolo M, Genovese T, Esposito E, Cuzzocrea S. Absence of TLR4 reduces neurovascular unit and secondary inflammatory process after traumatic brain injury in mice. *PLoS one.* 2013;8(3):e57208-e.
239. Okun E, Griffioen KJ, Lathia JD, Tang SC, Mattson MP, Arumugam TV. Toll-like receptors in neurodegeneration. *Brain Res Rev.* 2009;59(2):278-92.
240. Liu T, Zhang L, Joo D, Sun S-C. NF- $\kappa$ B signaling in inflammation. *Signal Transduction and Targeted Therapy.* 2017;2(1):17023.
241. Zhao J, Bi W, Xiao S, Lan X, Cheng X, Zhang J, et al. Neuroinflammation induced by lipopolysaccharide causes cognitive impairment in mice. *Sci Rep.* 2019;9(1):5790.
242. Chen Q, Zhou Y, Zhou L, Fu Z, Yang C, Zhao L, et al. TRPC6-dependent Ca<sup>2+</sup> signaling mediates airway inflammation in response to oxidative stress via ERK pathway. *Cell Death Dis.* 2020;11(3):170.
243. Fleiss B, Chhor V, Rajudin N, Lebon S, Hagberg H, Gressens P, et al. The Anti-Inflammatory Effects of the Small Molecule Pifithrin- $\mu$  on BV2 Microglia. *Dev Neurosci.* 2015;37(4-5):363-75.
244. Kaushik DK, Mukhopadhyay R, Kumawat KL, Gupta M, Basu A. Therapeutic targeting of Krüppel-like factor 4 abrogates microglial activation. *J Neuroinflammation.* 2012;9:57.
245. Zhong LM, Zong Y, Sun L, Guo JZ, Zhang W, He Y, et al. Resveratrol inhibits inflammatory responses via the mammalian target of rapamycin signaling pathway in cultured LPS-stimulated microglial cells. *PLoS One.* 2012;7(2):e32195.
246. Liu N, Zhuang Y, Zhou Z, Zhao J, Chen Q, Zheng J. NF- $\kappa$ B dependent up-regulation of TRPC6 by A $\beta$  in BV-2 microglia cells increases COX-2 expression and contributes to hippocampus neuron damage. *Neurosci Lett.* 2017;651:1-8.
247. Minghetti L. Cyclooxygenase-2 (COX-2) in Inflammatory and Degenerative Brain Diseases. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology.* 2004;63(9):901-10.
248. Teather LA, Packard MG, Bazan NG. Post-training cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibition impairs memory consolidation. *Learn Mem.* 2002;9(1):41-7.
249. Drachman DB, Frank K, Dykes-Hoberg M, Teismann P, Almer G, Przedborski S, et al. Cyclooxygenase 2 inhibition protects motor neurons and prolongs survival in a transgenic mouse model of ALS. *Ann Neurol.* 2002;52(6):771-8.

250. Reder AT, Thapar M, Sapugay AM, Jensen MA. Prostaglandins and inhibitors of arachidonate metabolism suppress experimental allergic encephalomyelitis. *J Neuroimmunol.* 1994;54(1-2):117-27.
251. Minghetti L, Levi G. Microglia as effector cells in brain damage and repair: focus on prostanoids and nitric oxide. *Prog Neurobiol.* 1998;54(1):99-125.
252. Harris SG, Padilla J, Koumas L, Ray D, Phipps RP. Prostaglandins as modulators of immunity. *Trends Immunol.* 2002;23(3):144-50.
253. Erta M, Quintana A, Hidalgo J. Interleukin-6, a major cytokine in the central nervous system. *International journal of biological sciences.* 2012;8(9):1254-66.
254. Swartz KR, Liu F, Sewell D, Schochet T, Campbell I, Sandor M, et al. Interleukin-6 promotes post-traumatic healing in the central nervous system. *Brain Res.* 2001;896(1-2):86-95.
255. Conroy SM, Nguyen V, Quina LA, Blakely-Gonzales P, Ur C, Netzeband JG, et al. Interleukin-6 produces neuronal loss in developing cerebellar granule neuron cultures. *J Neuroimmunol.* 2004;155(1-2):43-54.
256. Penkowa M, Giralt M, Lago N, Camats J, Carrasco J, Hernández J, et al. Astrocyte-targeted expression of IL-6 protects the CNS against a focal brain injury. *Exp Neurol.* 2003;181(2):130-48.
257. Dehlaghi Jadid K, Davidsson J, Lidin E, Hånell A, Angéria M, Mathiesen T, et al. COX-2 Inhibition by Diclofenac Is Associated With Decreased Apoptosis and Lesion Area After Experimental Focal Penetrating Traumatic Brain Injury in Rats. *Frontiers in neurology.* 2019;10:811-.
258. Gnaiger E. Mitochondrial Pathways and Respiratory Control, An Introduction to OXPHOS Analysis, Mitochondrial Physiology Network, 4. Auflage, 2014.
259. Courtes AA, Gonçalves DF, Hartmann DD, da Rosa PC, Cassol G, Royes LFF, et al. Guanosine protects against behavioural and mitochondrial bioenergetic alterations after mild traumatic brain injury. *Brain Research Bulletin.* 2020;163:31-9.
260. Normoyle KP, Kim M, Farahvar A, Llano D, Jackson K, Wang H. The emerging neuroprotective role of mitochondrial uncoupling protein-2 in traumatic brain injury. *Transl Neurosci.* 2015;6(1):179-86.
261. Sullivan PG, Dubé C, Dorenbos K, Steward O, Baram TZ. Mitochondrial uncoupling protein-2 protects the immature brain from excitotoxic neuronal death. *Ann Neurol.* 2003;53(6):711-7.
262. Mattiasson G, Shamloo M, Gido G, Mathi K, Tomasevic G, Yi S, et al. Uncoupling protein-2 prevents neuronal death and diminishes brain dysfunction after stroke and brain trauma. *Nat Med.* 2003;9(8):1062-8.
263. Kilbaugh TJ, Karlsson M, Byro M, Bebee A, Ralston J, Sullivan S, et al. Mitochondrial bioenergetic alterations after focal traumatic brain injury in the immature brain. *Exp Neurol.* 2015;271:136-44.
264. Vogel A, Wilken-Schmitz A, Hummel R, Lang M, Gurke R, Schreiber Y, et al. Low brain endocannabinoids associated with persistent non-goal directed nighttime hyperactivity after traumatic brain injury in mice. *Sci Rep.* 2020;10(1):14929.
265. Hummel R, Lang M, Walderbach S, Wang Y, Tegeder I, Götz C, et al. Single intracerebroventricular progranulin injection adversely affects the blood-brain barrier in experimental traumatic brain injury. *J Neurochem.* 2021;158(2):342-57.
266. Wu YL, Xie J, An SW, Oliver N, Barrezueta NX, Lin MH, et al. Inhibition of TRPC6 channels ameliorates renal fibrosis and contributes to renal protection by soluble klotho. *Kidney Int.* 2017;91(4):830-41.
267. Szewczyk B, Pochwat B, Muszyńska B, Opoka W, Krakowska A, Rafał-Ulińska A, et al. Antidepressant-like activity of hyperforin and changes in BDNF and zinc levels in mice exposed to chronic unpredictable mild stress. *Behav Brain Res.* 2019;372:112045.

## Danksagung

Zuallererst bedanke ich mich bei meinem Doktorvater \_\_\_\_\_ für die Überlassung dieses interessanten Themas für meine Promotion und die Möglichkeit, diese in seiner Arbeitsgruppe umsetzen zu können. Ich bedanke mich weiterhin dafür, dass er für alle Fragen, Unklarheiten und Probleme immer ein offenes Ohr hatte, für sein großes Interesse an seinen Doktoranden und deren Vorhaben, für seine Fähigkeit zu motivieren und anzutreiben, aber auch für seine Geduld und sein Verständnis.

Darüber hinaus danke ich \_\_\_\_\_ für die Möglichkeit der Durchführung meines Promotionsvorhabens in der Klinik für Anästhesiologie.

Ich danke zudem herzlich \_\_\_\_\_ in ihrer Funktion als Zweitgutachterin meiner Dissertation, für ihre bisherigen Forschungsarbeit bzgl. Hyperforin, Hyp-Derivaten und TRPC6, auf denen ein großer Teil meiner Arbeit aufbaut, für den fachlichen Austausch sowie das freundliche Zurverfügungstellen des verwendeten Wirkstoffs Hyp1.

Mein besonderer Dank gilt zudem \_\_\_\_\_, der mich in die Kunst der respirometrischen Untersuchung eingeführt und einen Großteil meiner Versuche mit Rat und Tat begleitet hat sowie \_\_\_\_\_, die mir von Grund auf die praktische Arbeit im Labor nähergebracht und zum Gelingen vieler Versuche maßgeblich beigetragen hat.

Weiterhin bedanke ich mich bei allen - auch ehemaligen - Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Neuroprotektion, insbesondere bei \_\_\_\_\_ für das Begleiten meiner Experimente, für jede unkomplizierte Hilfe, für alle Tipps und Tricks sowie für viele schöne Gespräche, die die Arbeit im Labor angenehm und besonders gemacht haben. Besonders hervorheben möchte ich an dieser Stelle \_\_\_\_\_, der mir während der ganzen Zeit fachlich wie persönlich eine große Stütze war.

Mein Dank gilt weiterhin allen Studenten und Doktoranden, denen ich während der letzten Jahre in der Arbeitsgruppe begegnen und mit denen ich mich regelmäßig austauschen durfte.

Danke auch an all meine Kommilitonen und Freunde in Mainz und zu Hause im Saarland fürs Zuhören und ihr Interesse, wenn ich begeistert von meiner Doktorarbeit erzählt habe - aber auch bei Klagen meinerseits in schwierigeren und anstrengenden Zeiten. Insbesondere gilt hier mein Dank meinem Mitsstreiter \_\_\_\_\_ sowie meinen langjährigen Mitbewohnern \_\_\_\_\_.

Zu guter Letzt möchte ich meinen Eltern \_\_\_\_\_ sowie meiner Freundin \_\_\_\_\_ danken. Ohne deren vielfältige Unterstützung in allen Bereichen hätte ich mein Studium und meine Dissertation in dieser Form sicher nicht abschließen können. Danke!

# Lebenslauf