

Alexander Bauer
Dr. sc. hum.

Molekulare Mechanismen hypoxie-induzierter Permeabilitätserhöhung an der Blut-Hirn-Schranke

Geboren am 14.05.1978 in Mannheim
Diplom der Fachrichtung Biologie am 21.07.2004 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Physiologie
Doktorvater: Prof. Dr. med. Hugo H. Marti

Der Ausgangspunkt für die hier vorliegende Arbeit war das Interesse an den molekularen Mechanismen, die an der hypoxie-induzierten Permeabilitätserhöhung an der Blut-Hirn-Schranke (BHS) beteiligt sind. Die BHS wird *in vivo* von mikrovaskulären zerebralen Kapillarendothelzellen gebildet und hält die Gewebshomöostase des Gehirns aufrecht, indem sie relativ undurchlässig für Ionen, viele Aminosäuren, Peptide und Proteine ist. Entscheidend für diese Eigenschaften ist neben den *Tight junctions* (TJ), welche die Endothelzellen fest miteinander verbinden, auch die Basallamina, die extrazelluläre Matrix des mikrovaskulären Endothels. Im Verlauf hypoxie-assoziiierter Erkrankungen des Zentralnervensystems (ZNS), wie der Höhenkrankheit oder der zerebralen Ischämie, können Fehlfunktionen der BHS auftreten, woraus klinisch gesehen eine Ödembildung resultiert. Die Entstehung eines Hirnödems beim Schlaganfall ist durch das Zusammenwirken verschiedener pathophysiologischer Mechanismen gekennzeichnet, wobei neben hypoxischem Stress auch zytokin-induzierte Inflammationskaskaden zu einer physischen Öffnung der BHS beitragen. Die genauen Mechanismen, wie normobare Hypoxie eine Öffnung der BHS vermittelt, sind bis heute nur in Ansätzen verstanden.

Um den Einfluss von Hypoxie auf die Permeabilität der BHS zu charakterisieren, wurden Mäuse in einer Kammer einer Hypoxie ausgesetzt und die Ödembildung mittels eines Permeabilitätsmarkers quantifiziert. Hierbei konnte *in vivo* gezeigt werden, dass eine Sauerstoffkonzentration von 8% für 48 Stunden zu einer Erhöhung der vaskulären Permeabilität führt. Basierend auf der Annahme, dass hierbei TJ eine zentrale Rolle übernehmen, wurden als nächstes die TJ-Proteine Occludin, Claudin-5 und *zonula occludens-1* (ZO-1) untersucht. Durch Bestimmung der Proteinexpression zeigte sich, dass die totale Proteinmenge von Occludin in hypoxischen Gehirnen abnahm, während die Expression von Claudin-5 und ZO-1 unverändert blieb. Durch Immunfluoreszenz-Färbungen wurde nachgewiesen, dass Occludin und ZO-1 gleichmäßig an der Zellperipherie lokalisiert sind und

Hypoxie eine diskontinuierliche Verteilung bewirkt. Dabei entstehende Brüche in den TJ-Strängen wurden durch dreidimensionale Rekonstruktionen nach konfokalmikroskopischen Analysen genauer charakterisiert und quantifiziert. Folglich führt Hypoxie *in vivo* zu einer erhöhten BHS-Permeabilität, was auf einer Lockerung interendothelialer Zell-Zell-Kontakte beruht.

Da Matrix-Metalloproteinasen (MMPs), insbesondere MMP-2 und MMP-9, maßgeblich am pathophysiologischen Umbau der Basallamina beteiligt sind, wurde in der Folge die Rolle dieser Gelatinasen bei der hypoxie-induzierten Gefäßpermeabilität analysiert.

Mit Hilfe von *in situ* Zymographien wurde im Rahmen dieser Arbeit zunächst gezeigt, dass mikrovaskuläre Endothelzellen in zerebralem Gewebe hypoxischer Tiere eine deutliche Induktion gelatinolytischer Aktivität aufweisen. Gel-Zymographien identifizierten schließlich MMP-9 als enzymatische Quelle der Gelatine-Degradierung mit einer deutlichen Aktivitätszunahme sowohl der Proform als auch der aktivierten Form des Enzyms. Im Gegensatz dazu war die enzymatische Aktivität von MMP-2 und dessen Aktivierungsstatus im Vergleich von normoxisch zu hypoxisch nicht modifiziert. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass eine Vorbehandlung mit einem MMP-Inhibitor die enzymatische Aktivität von MMP-9 signifikant unterdrückte. In den behandelten Tieren der hypoxischen Gruppe war sie sogar deutlich niedriger als in normoxischen Kontrollen. So lag die Vermutung nahe, dass MMP-9 direkt an der hypoxie-induzierten Hyperpermeabilität beteiligt sein könnte. Dies wurde dadurch bekräftigt, dass nicht nur das parallel auftretende Ödem, sondern auch die Dislokalisierung der TJ-Proteine Occludin und ZO-1 durch MMP-Hemmung reduziert wurden.

Der Aspekt, dass der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF) über verschiedene Signaltransduktionswege eine zentrale Rolle bei BHS-Störungen spielt, führte als nächstes zur Untersuchung intrazellulärer Signalwege. Durch gezielte Hemmung der unterschiedlichen Reaktionswege konnte gezeigt werden, dass Hypoxie die Permeabilität *in vivo* über die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) bewirkt. Entsprechende Hemmung der mitogen-aktivierten Proteinkinase p38 (p38 MAPK) hingegen konnte die vaskuläre Permeabilität nicht verringern. Auch eine Behandlung mit Erythropoietin (EPO), das *in vitro* in der Lage ist, die VEGF-vermittelte Permeabilität zu inhibieren, zeigte keinen Effekt auf die hypoxie-induzierte Ödembildung. Aus diesen Resultaten ergab sich die Frage, ob sich die Hemmung einzelner Signalwege von VEGF für die Behandlung von Hirnödemen eignet. Da VEGF aber nicht nur für hypoxie-bedingte Permeabilitätsänderungen verantwortlich ist, sondern auch ein wichtiger neuroprotektiver und angiogener Faktor ist, müssten Strategien entwickelt werden, um die Ödembildung zu inhibieren ohne neuroprotektive oder angiogene Funktionen zu hemmen.

Somit konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die hypoxie-induzierte Permeabilitätserhöhung an der BHS über eine Aktivierung von MMP-9 vermittelt wird, was die subzelluläre Organisation von TJ moduliert und die Bildung interzellulärer Lücken begünstigt. Durch Modulation mittels synthetischer Inhibitoren könnte es gelingen MMP-9 spezifisch zu hemmen, was eine neue Therapieoption zur Behandlung von Hirnödemen infolge eines Höhengaufenthaltes oder Schlaganfalls darstellen könnte.