Philipp Barteczek
Dr. med.

Neuronale Deletion des Hypoxie-induzierten Faktors verbessert das akute Ergebnis nach zerebraler Ischämie

Fach/Einrichtung: Physiologie
Doktorvater: Prof. Dr. med. Hugo H. Marti

Hypoxie-induzierte Faktoren (= HIF) sind Transkriptionsfaktoren, welche die zelluläre Antwort auf Hypoxie und Ischämie vermitteln. In den Neuronen des Gehirns werden nach ischämischem Schlaganfall insbesondere HIF-1 und HIF-2 stabilisiert. Beide bestehen jeweils aus einer α -Untereinheit und einer β -Untereinheit. Die α -Untereinheit wird unter Normoxie hydroxyliert und im Proteasom abgebaut. Unter ischämisch-hypoxischen Bedingungen wird die α -Untereinheit stabilisiert und wandert zusammen mit der β -Untereinheit in den Zellkern, um dort die Expression der HIF-assoziierten Zielgene zu induzieren. Zu diesen gehören unter anderem neuroprotektive Gene wie beispielsweise Erythropoetin (= EPO) und Vascular endothelial growth factor (= VEGF), aber auch proapoptotische und pronekrotische Zielgene wie BNIP3 und BNIP3L. Dadurch sollen Neuronen vor hypoxischem Zellschaden geschützt, aber auch vorgeschädigte Zellen abgetötet werden. Zwar zeigen mehrere Studien protektive oder schädliche Effekte von HIF nach ischämischem Schlaganfall, jedoch ist aufgrund dieser gegensätzlichen Ergebnisse der Einfluss von HIF auf das Überleben von Neuronen nach Ischämie nicht abschließend geklärt. Diese Arbeit soll die Effekte eines neuronalen Knockouts von Hif-1 α und/oder Hif-2 α auf neuronales Überleben nach zerebraler Ischämie untersuchen. Zu diesem Zweck wurde zunächst das Ausmaß des HIF-Verlusts in den Neuronen von Knockout Tieren bestimmt. Ein neuronaler Knockout von Hif-1 α reduzierte die Proteinmenge von HIF-1 α im Vorderhirn um mehr als 80 %, während ein neuronaler Knockout von Hif-2 α die Menge von HIF-2 α im Vorderhirn um 30 % verminderte. Der Verlust der einen α -Untereinheit führte jedoch *nicht* zur kompensatorischen Hochregulation der anderen α -Untereinheit. Trotz fehlender quantitativer Kompensation wurden die meisten HIF-assoziierten Zielgene auch im Vorderhirn von Mäusen *ohne* Hif-1 α oder Hif-2 α durch Hypoxie induziert. Damit scheinen sich HIF- α -Untereinheiten *funktionell* zu kompensieren. Von diesem Kompensationsmechanismus ausgenommen sind die Expression von Erythropoetin und BNIP3. Ein neuronaler Verlust von HIF-1 verminderte die Expression von BNIP3 und ein neuronaler Verlust von HIF-2 verminderte die Expression von Erythropoetin. Damit sind HIF-1 und HIF-2 für die Induktion von BNIP3 und Erythropoetin essenziell. Um die Effekte eines HIF-Verlusts *ohne* gegenseitige Kompensation der α -Untereinheiten zu untersuchen, wurden Mäuse mit einem neuronalen Hif-1 α /Hif-2 α Doppel-Knockout genutzt. Dieser führte unter Hypoxie zu einer generellen verminderten Expression von protektiven und proapoptotischen Zielgenen, insbesondere von VEGF und BNIP3. Anschließend wurden die Auswirkungen eines HIF Knockouts auf das Überleben von Neuronen nach Ischämie untersucht. Neuronales Überleben nach zerebraler Ischämie wurde anhand von Infarkt- und Ödemgrößen nach Verschluss der Middle cerebral artery (= MCA) bestimmt. Ein neuronaler Single-Knockout von Hif-1 α oder Hif-2 α besaß aufgrund der gegenseitigen Kompensation der α -Untereinheiten keinen Einfluss auf das neuronale Überleben nach zerebraler Ischämie. Ein neuronaler Hif-1 α /Hif-2 α Doppel-Knockout hingegen zeigte ein reduziertes Infarkt- und Ödemvolumen 24 h nach ischämischem Schlaganfall, während nach 72 h zwischen Wildtyp und Knockout Tieren kein Unterschied mehr sichtbar war. Folglich wirkt ein Doppel-Knockout von HIF-1 und HIF-2 24 h nach Ischämie neuroprotektiv. Auch in den sensomotorischen Verhaltenstests präsentierten Doppel-Knockout Mäuse 24 h nach

Schlaganfall bessere Resultate als Mäuse in der Kontrollgruppe. Zusätzlich erlitten Mäuse mit Doppel-Knockout bis zu diesem Zeitpunkt einen geringeren Gewichtsverlust als Tiere, die weiterhin HIF-1 und HIF-2 exprimierten. In den Verhaltenstests stellte sich allerdings auch heraus, dass Tiere mit Doppel-Knockout 72 h nach Ischämie schließlich schlechtere Ergebnisse zeigen als Mäuse in der Kontrollgruppe. Insbesondere die Testung anhand eines Neurodefizit Scores offenbarte eine signifikante neurologische Beeinträchtigung bei Verlust von HIF-1 und HIF-2 im späten Verlauf. Das funktionelle Defizit des Doppel-Knockouts nach 72 h korrelierte mit einer verstärkten Apoptose im gesamten Ischämiegebiet. Folglich zeigen sich HIF-1 und HIF-2 nach zerebraler Ischämie für Funktion und Überleben von Neuronen primär schädlich, später jedoch neuroprotektiv. Ursächlich für diese Effekte könnte das Expressionsmuster der HIF-assoziierten Zielgene sein. Tiere mit neuronalem Knockout von Hif-1 α und Hif-2 α exprimierten unter hypoxischen Bedingungen weniger VEGF und weniger BNIP3. Während VEGF in Wildtyp Tieren innerhalb der ersten 24 h nach Ischämie die Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke erhöht und auf diese Weise ein Gehirnödem mit verstärktem Zelluntergang verursacht, wirkt es im späteren Verlauf durch Angiogenese und direkte antiapoptotische Effekte neuroprotektiv. Zusätzlich wird in Wildtyp Tieren innerhalb der ersten 24 h nach Ischämie proapoptotisches und pronekrotisches BNIP3 exprimiert. Bei neuronalem HIF-Verlust könnte demnach die verminderte Induktion von VEGF und BNIP3 für die frühe Neuroprotektion und die späten schädlichen Effekte verantwortlich sein. Daher könnte eine pharmakologische Inhibition von HIF unmittelbar nach Ischämie einen neuen Ansatz zur Therapie des ischämischen Schlaganfalls darstellen. Eine langfristige Stabilisierung von HIF hingegen könnte ein wichtiger Mechanismus für pharmakologische Neuroprotektion sein.