

Jiemeng Lin-Holderer
Dr. med.

Fumarsäureester schützen Neurone unter ischämischen Bedingungen durch Aktivierung des Nrf2- (Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2) Signalweges

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

Der Schlaganfall zeichnet sich durch eine akute Durchblutungsstörung des Gehirns aus, die strukturelle und funktionelle Schäden zur Folge hat. Zur Familie der kardiovaskulären Erkrankungen gehörend, zählt der Schlaganfall zu einer der führenden Todesursachen weltweit. Aufgrund der hohen Mortalitäts- und Morbiditätsrate, dem demographischen Wandel und seiner Bedeutung hinsichtlich Klinik und Kosten im Gesundheitswesen nimmt der Schlaganfall stetig an Bedeutung zu. Bis heute sind effektive Therapieoptionen eingeschränkt, sodass der Bedarf an weiterer Forschung und neuen Behandlungsmöglichkeiten sehr hoch ist.

Dimethylfumarat (DMF) und Monomethylfumarat (MMF) sind die wichtigsten Vertreter der Fumarsäureester (FAEs). Ihnen werden antioxidative, antiinflammatorische und immunmodulatorische Eigenschaften zugesprochen. Eine Reihe von Studien zeigte, dass FAEs *in vitro* und *in vivo* den *nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2* (Nrf2)-Signalweg induzieren. Auch wird ein Zusammenhang mit *hypoxia inducible factors 1 α* (HIF-1 α) und *hydroxycarboxylic acid receptor 2* (HCAR2) diskutiert. Der genaue Wirkmechanismus ist jedoch noch nicht vollständig aufgeklärt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde einerseits untersucht, ob FAEs Neurone vor Ischämie schützen. Dabei wurde überprüft, ob sie antioxidative, antiinflammatorische oder immunmodulatorische Eigenschaften zeigen. Andererseits wurde angeschaut, welche Signalwege (Nrf2, HIF-1 α oder HCAR2) dabei involviert sind. Außerdem wurden DMF und MMF in ihrer Wirkungsweise miteinander verglichen.

Es wurden *ex vivo*- und *in vitro*-Experimente durchgeführt: An OTC und den neuronalen Zelllinien HT-22 und SH-SY5Y wurde der FAE-Effekt auf das Überleben der Neurone nach OGD analysiert. Dabei wurde die PI-Färbung zur Detektion der toten Zellen verwendet. Für die Untersuchung der Signalwege von Nrf2, HIF-1 α und HCAR2 auf Protein- und mRNA-Ebene wurden Immunfluoreszenzfärbungen, Westernblots und real-time PCRs durchgeführt. Außerdem wurde mit Hilfe der RNA-Interferenz-Technik (siRNA) in HT-22 Zellen das Nrf2-Gen ausgeschaltet, um die Abhängigkeit des DMF-Effektes von Nrf2 zu untersuchen.

Dabei ergaben sich folgende Ergebnisse: *Ex vivo* im OTC-Modell unter OGD und 24-stündiger Reperfusion erwies sich die Behandlung mit DMF als neuroprotektiv. Dabei wirkte die Konzentration von 30 μ M in der Nachbehandlung am effektivsten. *In vitro* zeigte die PI-Färbung nach DMF- und MMF-Stimulation – sowohl unter Basal- als auch unter OGD-Bedingungen – ebenfalls weniger tote Zellen als in der Kontrollgruppe, was für eine Neuroprotektion beider Moleküle spricht. Westernblots und Immunfärbungen ergaben, dass DMF in der Lage ist, in Neuronen (HT-22, SH-SY5Y) die Proteinexpression von Nrf2 zu

steigern. Auch auf mRNA-Level wurden die antioxidativen Nrf2-Zielgene Hämoxigenase-1 (HO1), *NAD(P)H quinone oxidoreductase 1* (Nqo1), Glutamatcysteinligase - katalytische Untereinheit (Gclc) und Glutamatcysteinligase - regulatorische Untereinheit (Gclm) durch DMF induziert. Obwohl sich MMF ebenfalls neuroprotektiv unter OGD gezeigt hatte, konnte keine Aktivierung von Nrf2 – weder auf Protein- noch auf Genexpressionsebene – nachgewiesen werden. Das Nrf2-Knockdown-Experiment bewies, dass die Neuroprotektion von DMF tatsächlich Nrf2-abhängig ist, wohingegen der Schutz durch MMF trotz des Nrf2-knockdowns weiterhin bestand. Deswegen wird vermutet, dass MMF auf eine andere Art und Weise als DMF wirkt. Sein Wirkmechanismus ist, wie auch einige anderen Studien zeigten, noch ungeklärt.

Hinsichtlich des HIF-1 α -Signalweges konnte lediglich eine Proteinstabilisierung von HIF-1 α durch hochdosiertes DMF (> 50 μ M) in humanen Neuronen (SH-SY5Y) nachgewiesen werden. MMF und niedrigdosiertes DMF waren nicht in der Lage, in Neuronen HIF-1 α zu aktivieren. Dagegen ließ sich VEGF HIF-1-unabhängig von DMF (konzentrationsabhängig) induzieren. Dies lässt vermuten, dass die Regulationsmechanismen hinter FAEs, VEGF, HIF und Nrf2 äußerst komplex sind. Diskutiert werden Regulierungen über HO1 oder durch Co-Aktivierung von Nrf2 und PGC α . Auch hier besteht noch Forschungsbedarf.

Die Neuroprotektion der FAEs über einen antiinflammatorischen Effekt konnte ebenso ausgeschlossen werden: In Neuronen ließen sich einerseits kaum HCAR2 Rezeptoren exprimieren oder durch LPS induzieren. Andererseits ergaben sich keine schlüssigen Ergebnisse über die Zytokinproduktion nach DMF-Behandlung, was darauf hindeutet, dass DMF kaum antiinflammatorische Effekte auf Neurone ausübt.

Ziel dieser Arbeit ist, die Rolle der FAEs als Therapieoption für den Schlaganfall zu beleuchten. Hier erwiesen sich sowohl DMF als auch MMF mit ihrer neuroprotektiven Eigenschaft als geeignet. Für den genauen Wirkmechanismus hinter MMF bedarf es noch weiterer Klärung. Für DMF konnte jedoch gezeigt werden, dass seine schützende Wirkung hauptsächlich auf die antioxidative Eigenschaft mit Aktivierung des Nrf2-Signalweges zurückzuführen ist. Diese Eigenschaft setzt günstig an die Pathogenese des Schlaganfalls an, in welcher der oxidative Stress eine wichtige Rolle spielt. Zusätzlich gibt das OTC-Experiment Hinweise darauf, dass die Behandlung mit DMF nach dem Schlaganfall eine bessere Wirkung erzielt. Für den klinischen Gebrauch besteht ein großer Vorteil der FAEs darin, dass sie bereits als erfolgreich erprobtes Medikament mit guter Verträglichkeit gegen MS und Psoriasis eingesetzt werden. So ist zu empfehlen, ihr Einsatzgebiet zu erweitern und in weiteren Studien ihre Wirkung auf Schlaganfall näher zu erforschen. Aber nicht nur für Schlaganfall, sondern auch in der Therapie anderer neurodegenerativer Erkrankungen können sie durch ihre antioxidative Eigenschaft vielversprechend sein.