



**Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg**  
**Medizinische Fakultät Mannheim**  
**Dissertations-Kurzfassung**

**Dysfunktionale Signaltransduktion zwischen Endothelzellen und Perizyten bei Kavernomen des Zentralnervensystems**

Autor: Gerald Bastian Schulz  
Institut / Klinik: Zentrum für Biomedizin und Medizintechnik Mannheim (CBTM)  
Doktorvater: Priv.-Doz. Dr. A. Fischer

Kavernome des zentralen Nervensystems bestehen aus dilatierten Kapillarproliferationen, welche sich histopathologisch durch teilthrombosierte Lumina, das Fehlen von Perizyten sowie eine ausgeprägte Fragilität mit konsekutiven Mikroblutungen auszeichnen. Im Gegensatz zu sporadischen Kavernenomen ist die autosomal-dominant vererbte familiäre Variante mit dem Verlust eines der drei Gene *CCM1*, *CCM2*, oder *CCM3* assoziiert. Hierbei kommt es häufiger zu multiplem Auftreten und damit zu insgesamt schwereren Verläufen, welche einer neurochirurgischen Exstirpation oftmals nicht zugänglich sind. Klinisch manifestieren sich Kavernome durch Kompression benachbarter Hirnareale, Blutungen sowie epileptische Anfälle. Das Ziel dieser Arbeit ist gewesen, die Interaktion zwischen Endothelzellen und Perizyten innerhalb der Pathogenese von Kavernenomen zu erforschen.

Die immunhistochemische Analyse von murinen zerebralen Kavernenomen, welche durch endothelspezifische Deletion von *Ccm1* oder *Ccm2* induziert worden sind, ergab eine Reduktion der Perizytdichte. Ein kausaler Zusammenhang zwischen dem Verlust von *CCM1* und einer Verminderung periendothelialer Perizyten konnte zusätzlich durch die immunhistochemische Auswertung von Kapillaren bestätigt werden, welche sich nach muriner Xenotransplantation humaner Endothelzellen mit einer stabilen Herunterregulation der Genexpression von *CCM1* ausgebildet haben. Die reduzierte Perizytdichte zeigt eine Übereinstimmung mit dem histopathologischen Befund humaner Kavernenome. Die Bedeutung von Perizyten für die Pathogenese von Kavernenomen wird durch Studien untermauert, welche nach Perizytenverlust eine Endothelhyperplasie und eine erhöhten Gefäßpermeabilität zeigen konnten, was für Kavernenome jeweils zentrale Charakteristika darstellen.

*CCM1* reguliert im Endothel den DELTA/NOTCH-Signalweg durch den Liganden DLL4. NOTCH3 ist in periendothelialen Zellen der mit Abstand am besten charakterisierte NOTCH-Rezeptor, welcher vor allem bei der Pathogenese von CADASIL (*Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy*) von großer Relevanz ist. Immobilisiertes, rekombinantes DLL4 Protein erhöhte Proteinlevel der transaktivierenden intrazellulären Domäne von NOTCH3 in Perizyten 3-fach und aktivierte die NOTCH3 Signaltransduktion. Im weiteren experimentellen Vorgehen konnte durch qRT-PCR und Western-Blot-Analysen verschiedener Kokulturen humaner Perizyten mit humanen Endothelzellen eine funktionelle Verbindung zwischen endothelialeem DLL4 und NOTCH3 in Perizyten nachgewiesen werden.

Der Verlust von NOTCH3 in periendothelialen Zellen bedingt verschiedenen Studien nach einen Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke, eine Dilatation von Gefäßlumina, Hämorrhagien, sowie morphologische Defekte und Apoptose von Perizyten. Diese Effekte lassen sich auch bei Kavernenomen beobachten, was die pathogenetische Relevanz von NOTCH3 in Perizyten bei Kavernenomen untermauert.

Die funktionelle Charakterisierung von NOTCH3 in humanen Perizyten erfolgte durch diverse *in vitro* Kokultur-Assays. Es konnte gezeigt werden, dass NOTCH3 in Perizyten die Adhäsion auf Endothelzellen reguliert. Diese Störung der unmittelbaren interzellulären Interaktion zwischen Endothelzellen und Perizyten ist in Übereinstimmung mit der direkten Signaltransduktion zwischen DELTA-Liganden und NOTCH-Rezeptoren. Die Neoangiogenese wurde durch eine Kokultur von Perizyten und Endothelzellen in einer Mischung von extrazellulären Proteinen imitiert. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Reduktion der Expression von NOTCH3 in Perizyten die Kapillarproliferation induziert. Des Weiteren wurde eine erhöhte Migration von Perizyten nach Herunterregulation von NOTCH3 in Perizyten gemessen.

Mögliche durch NOTCH3 in Perizyten beeinflusste Signaltransduktionswege wie N-Cadherin, S1P, NG2, PDGFRB, TGF $\beta$  und HBEGF konnten durch Western-Blot-Analyse und qRT-PCR identifiziert werden. Die Bedeutung dieser Gene für die bidirektionale Interaktion zwischen dem Endothel und Perizyten konnte durch verschiedene Studien in den vergangenen Jahren herausgestellt werden, wobei die Bedeutung der einzelnen Genen innerhalb der Kavernompathogenese durch weitere Forschungsansätze bewerten werden sollten.

Dem auf den dargelegten Ergebnissen basierenden Modell der Pathogenese von Kavernomen zur Folge führt der endotheliale CCM1-Verlust mit konsekutiv verminderter Expression des endothelialen NOTCH-Liganden DLL4 zu einer reduzierten Signaltransduktion von NOTCH3 in Perizyten. Dieses Modell wird durch die Ergebnisse der funktionellen Charakterisierung von NOTCH3 unterstützt. Die Verminderung der NOTCH3-Expression in Perizyten zeigte weniger Adhäsion zum Endothel, eine erhöhte Gefäßproliferation und eine verstärkte Motilität der Perizyten. Dies wiederum ist in Übereinstimmung mit der Histopathologie von Kavernomen, deren wichtigste Merkmale eine unkontrollierte Neovaskulogenese und eine verminderte Assoziation der Gefäße mit Perizyten darstellen.

Ein tieferes Verständnis der molekularen Pathomechanismen von Kavernomen kann zu der Entwicklung von konservativen Therapieansätzen beitragen. Zukünftige Forschungsansätze könnten die weitgehend unbekannt Pathogenetik der im Vergleich zu familiären Kavernomen häufigeren sporadischen Kavernome beispielsweise durch Methoden wie dem *next generation sequencing* untersuchen. Praktisch komplett ungeklärt ist die Frage, warum Kavernome ausschließlich im Gefäßsystem des zentralen Nervensystems lokalisiert sind. Es ist zu erwarten, dass die zukünftige Forschung neue Therapieoptionen für Patienten mit Kavernomen bieten wird. Aber auch das Verständnis anderer Erkrankungen, welche mit einer Störung der Blut-Hirn-Schranke einhergehen, wird durch die Erforschung der Interaktion zwischen dem Endothel und Perizyten mit Sicherheit erweitert werden.