

Felipe Andrés Montellano Vera

Dr. med.

The role of neuronal Factor Inhibiting Hypoxia-Inducible-Factor 1 (FIH-1) on the pathophysiology of ischemic stroke.

Fach: Physiologie

Doktorvater: Prof. Dr. Hugo Marti

Der Schlaganfall ist eine der Hauptursachen für Todesfälle und Behinderungen weltweit. Trotz der Relevanz dieses Krankheitsbildes sind wirksame Akuttherapien nur begrenzt verfügbar. Ein detailliertes Verständnis der Pathophysiologie des ischämischen Schlaganfalls könnte eine wertvolle Hilfe bei der Entwicklung neuer Therapien sein.

Wichtige Anpassungen an Hypoxie und Ischämie werden durch die Aktivierung der HIF-Achse vermittelt. HIF ist ein Heterodimer, welches aus einer konstitutiv exprimierten β Untereinheit und einer α Untereinheit besteht. Die Stabilität und transkriptionelle Aktivität von HIF werden durch niedrige Sauerstoffkonzentration erhöht. Unter normoxischen Bedingungen wird HIF- α an zwei Prolin Aminosäurenresten von PHDs hydroxyliert, was zu proteolytischem Abbau führt, wohingegen die Asparagin-Hydroxylierung durch FIH die Bindung des transkriptionellen Coaktivators p300/CBP verhindert und somit die transkriptionelle Aktivität der C-TAD blockiert. Neben seiner Rolle als Sauerstoffsensor konnte nachgewiesen werden, dass FIH neben HIF- α andere Ziele hydroxilieren kann, die funktionelle Implikationen haben können und eine wichtige Rolle im Stoffwechsel spielen. Daher kommt die Frage auf, welche spezifische Rolle FIH in der Pathophysiologie der zerebralen Ischämie spielt.

Zu diesem Zweck wurde eine Mauslinie mit Neuronen-spezifischen Deletion von *Fih* generiert. Mäuse wurden zunächst einem Protokoll zur Verhaltensphänotypisierung unterzogen. Zerebrale Ischämie wurde bei jungen und alten Mäusen beider Geschlechter durch den Verschluss der mittleren Zerebralarterie induziert. Infarkt- und Ödemgrößen wurden durch stereologische Analyse Cresylviolett-gefärbter Schnitte beurteilt. Immunfluoreszenzfärbungen wurden genutzt, um die Dichte von Neuronen und Endothelzellen zu bestimmen. Darüber hinaus wurden TUNEL und Fluoro Jade C Färbungen verwendet, um die Rolle des Neuronen-spezifischen *Fih* Knockouts bei

unterschiedlichen Prozessen, die an Zelltod-Signalwegen beteiligt sind, zu untersuchen. Das Verhalten wurde durch Bederson's neuroscore, latency to move and corner test geprüft. Vorzeitige Mortalität der Mäuse wurde registriert und falls die Möglichkeit bestand, wurden diese Gehirne ebenfalls analysiert. Die Gesamt-RNA des Hirngewebes nach Schlaganfall wurde extrahiert und die entsprechende cDNA wurde durch RT-PCR hergestellt. Die Expression der Zielgene wurde durch qPCR quantifiziert.

Zum Untersuchungsbeginn zeigten sich bei Neuronen-spezifischen *Fih* Knockout-Mäusen keine Unterschiede in der Expression klassischer HIF-Zielgene, wie z.B. *Epo* und *Vegf*. Es wurde zwar eine geringe Abnahme des Körpergewichts bei männlichen Mäusen festgestellt, diese Beobachtung konnte jedoch beim Weiterverfolgen eines *ad-hoc* Batches von Mäusen beider Geschlechter nicht nachgewiesen werden. Auf morphologischer Ebene beeinflusst das neuronale *Fih* Defizit die Dichte von Neuronen und Endothelzellen nicht und auch nicht deren räumliche Beziehung zueinander, gemessen an der kürzesten Distanz zwischen einem Neuron und der jeweils am nächsten gelegenen vaskulären Struktur. In der Verhaltensphänotypisierung zeigte sich eine erhöhte Prävalenz von Urininkontinenz bei weiblichen Tieren und eine Tendenz dazu bei männlichen Mäusen.

Zum Untersuchungszeitpunkt nach dem Schlaganfall hatte ein Defizit an Neuronen-spezifischem *Fih* keinen Einfluss auf das histologische Outcome, gemessen an Infarkt- oder Ödemgröße. Dem gegenüberstehend wurde eine verminderte Mortalität bei weiblichen und männlichen KO Tieren und ein verbessertes Verhaltens-Outcome festgestellt. Daher kann man davon ausgehen, dass die Deletion von *Fih* in Neuronen eine neuroprotektive Wirkung aufweist. Interessanterweise wurde die Expression von klassischen HIF-Zielgenen wie z.B. *Epo* or *Vegf* nicht durch das neuronale Defizit an *Fih* beeinflusst. Dies suggeriert, dass die neuroprotektive Wirkung HIF-unabhängig ist. Die Hydroxylierung des Kanals TRPV3 könnte ein vermeintlicher Mechanismus sein, der diesem Phänomen zugrunde liegt. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass FIH tendenziell eine geringe Rolle in der Pathophysiologie des ischämischen Schlaganfall spielt, und man kann mit hoher Wahrscheinlichkeit ausschließen, dass FIH in den ersten Stunden nach einem Schlaganfall relevant ist.