

Emil Nasyrov
Dr. med.

Die Rolle der Prolyl-4-Hydroxylase 2 - Hypoxie-induzierter Faktor-Achse in Neuronen für die Vaskularisierung des postnatalen Gehirns

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

Das adulte Gehirn ist aufgrund der neuronalen Aktivität und des damit verbundenen hohen O₂-Bedarfs auf die Ausbildung eines Gefäßsystems angewiesen, das eine adäquate O₂-Bereitstellung gewährleistet. Gewebhypoxie stellt über den Hypoxie-induzierten Faktor (HIF) Signalweg den primären Stimulus für die Angiogenese dar. HIFs sind Transkriptionsfaktoren, die aus einer HIF α - und HIF β -Untereinheit aufgebaut sind. Unter Normoxie wird HIF α O₂-abhängig durch die Prolyl-4-Hydroxylase 2 (PHD2) hydroxyliert und anschließend proteasomal abgebaut. Unter Hypoxie akkumuliert HIF α , bindet HIF β und induziert als Dimer Zielgene. So regulieren HIF-1 und HIF-2 zahlreiche angiogene Faktoren wie z. B. vascular endothelial growth factor A (VEGF), welche die Gefäßdichte steigern und so Normoxie herstellen. Embryonal bilden sich im avaskulären Gehirn initial Gefäßgeflechte, indem hypoxische neurale Vorläuferzellen über HIF-1 und VEGF das angiogene Einsprossen von perineuralen Gefäßen steuern. Postnatal nimmt der relative O₂-Bedarf des Gehirns aufgrund der ansteigenden neuroelektrischen Aktivität zu. Die Dichte des spärlichen Gefäßnetzes wird in der frühen postnatalen Phase angepasst. Die Vaskularisierung scheint der Reifung neuronaler Strukturen räumlich zu folgen und mit einer unspezifischen Aktivierung von HIF-1 und VEGF zu korrelieren. Zusätzliche Hypoxie und auch eine erhöhte neuronale Aktivität steigern die Gefäßdichte über physiologische Verhältnisse hinaus. Im Gegensatz zum embryonalen ist für das postnatale Gehirn jedoch nur unvollständig verstanden, inwiefern der HIF-Signalweg mechanistisch beteiligt ist und welcher Zelltyp die Adaptation der Gefäßdichte vermittelt. Da Neurone den zunehmenden O₂-Bedarf bedingen und Hypoxie gegenüber besonders vulnerabel werden, untersucht diese Arbeit, welche funktionelle Rolle das O₂-Sensing in Neuronen für die Vaskularisierung des postnatalen Gehirns hat. Hierzu wurde der negative HIF-Regulator *Phd2* und / oder *Hif1a/Hif2a* in Mäusen spezifisch in postnatalen Neuronen deletiert. Die neuronale Deletion von *Hif1a/Hif2a* führte zu einer Reduktion der neuronalen HIF-Antwort, indem die HIF-1 α -Proteinmenge im gesamten Gehirn um zwei Drittel vermindert wurde. Der neuronale Verlust von *Phd2* verdoppelte HIF-1 α und steigerte ebenfalls HIF-2 α . Der gleichzeitige Knockout von *Phd2* und *Hif1a/Hif2a* verhinderte einen Anstieg von HIF-1 α , nicht jedoch von HIF-2 α . Die Proteinmenge von HIF-1 α war wie bei alleinigem *Hif1a/Hif2a*-Verlust reduziert, im Vergleich zu diesem jedoch aufgrund der zusätzlichen *Phd2*-Deletion verdoppelt. Somit stellt diese Arbeit zum ersten Mal fest, dass eine neuronale PHD2-Defizienz den HIF-1-Signalweg hauptsächlich in Neuronen aktiviert, überraschenderweise jedoch über einen neuartigen Mechanismus ebenfalls HIF-1 und HIF-2 in weiteren Nachbarzellen stabilisiert. Als Nächstes wurde untersucht, inwiefern sich veränderte HIF-Aktivitätsmuster auf die zerebrale Gefäßstruktur auswirken. Die Inaktivierung von neuronalem HIF-1 reduzierte die funktionelle Gefäßdichte im adulten Gehirn um etwa 20 %. Die gleichzeitige Aktivierung von HIF-1 in Neuronen als auch HIF-1/2 in Nachbarzellen verdoppelte hingegen in etwa die Gefäßdichte. Die Gefäßstruktur von *Phd2/Hif1a/Hif2a*-defizienten Gehirnen war annähernd unverändert zur Wildtypkontrolle. Veränderte Gefäßsysteme aller transgenen Linien wiesen Anzeichen funktioneller und morphologischer Reife auf. Untersuchungen in juvenilen Tieren zeigten, dass die Modifikation der neuronalen PHD2-HIF-Achse das frühe postnatale Gefäßwachstum und die Gefäßdichte sequenziell beeinflusst. Hierbei war die Gefäßdichte zuerst in tiefen,

dann in oberflächlichen Hirnstrukturen verändert. Veränderte Gefäßverhältnisse, die am Ende der ersten Lebenswoche ausgeprägt waren, blieben im weiteren Verlauf weitestgehend festgelegt. Ein zusätzlicher *Phd2*-Verlust in *Hifa*-defizienten Neuronen hob die initial reduzierte Gefäßdichte kompensatorisch auf das Wildtypniveau an, erhöhte die Dichte aber nicht wie bei alleiniger *Phd2*-Deletion über dieses hinaus. Dazu passend wurde die zerebrale Endothelzellproliferation durch PHD2-Defizienz teilweise abhängig von neuronalem *Hifa* gesteigert. Diese Resultate zeigen, dass die PHD2-HIF-Achse in Neuronen die funktionelle Gefäßdichte des postnatalen Gehirns kontrolliert. Dem Gefäß-induzierenden Effekt durch neuronalen PHD2-Verlust liegen unterschiedliche Komponenten zugrunde, die teilweise von *Hifa* in Neuronen abhängig sind. Zusammengenommen deutet dies darauf hin, dass hypoxische Neurone den postnatalen Vaskularisierungsprozess über den zelleigenen HIF-1-, aber auch über Aktivierung des HIF-1/2-Signalweges in Nachbarzellen steuern könnten. Um festzustellen, welche Mechanismen der Gefäßinduktion bei PHD2-Verlust über neuronales HIF-1 bzw. mutmaßlich über HIF-1/2 in Nachbarzellen zugrunde liegen, wurde die Expression Angiogenese-assoziiierter Mediatoren untersucht. *Adrenomedullin* (ADM), *Osteopontin* und *Erythropoietin* wurden abhängig von funktionellem HIF-1 in Neuronen gesteigert. *Vegfa* wurde hingegen unabhängig von neuronalem *Hifa* induziert. Durch mRNA Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung wurden Astrozyten als Quelle der *Vegfa*-Hochregulation in juvenilen *Phd2*- als auch *Phd2/Hif1a/Hif2a*-defizienten Gehirnen identifiziert, was nahelegt, dass Astrozyten HIF-1/2 stabilisieren. Weiterhin wurde *in vitro* festgestellt, dass von den neuronal hochregulierten Mediatoren nur ADM eine angiogene Wirkung auf zerebrale Endothelzellen hat, die zu der von VEGF vergleichbar ist. Bei Ko-Applikation von ADM und VEGF zeigte sich ein additiver angiogener Effekt. Die vorliegende Arbeit identifiziert somit den hypoxischen Signalweg in Neuronen als zentrale Determinante für die Vaskularisierung und die Gefäßdichte im postnatalen Gehirn. Die neuronale PHD2-HIF-1-ADM-Achse stellt hierbei ein kritisches Stellglied für den postnatalen Gefäßbildungsprozess dar. Die Beobachtung, dass Neurone über PHD2 die HIF-1/2-VEGF-Achse in Astrozyten aktivieren, um die Gefäßdichte kooperativ mit neuronalem ADM zu steuern, legt eine funktionelle Integration der astrozytären Hypoxie-Antwort über das neuronale O₂-Sensing nahe. Auf Basis dieser Arbeit wird ein Modell des Neurons als zentraler O₂-Sensor im Hirnparenchym vorgeschlagen. Die dargestellten Erkenntnisse könnten dazu beitragen, neue Therapiestrategien z. B. im Rahmen des ischämischen Schlaganfalls zu entwickeln, um physiologische Adaptationsmechanismen der Gefäßdichte zu verstärken und die Gewebeoxygenierung zu optimieren.