

Wolf Kersten Christoph Tripps

Dr. med. dent.

mRNA-Expression von VEGF und der VEGF-Rezeptoren in adulten neuronalen Stammzellen von Ratten unter Normoxie und Hypoxie in vitro

Geboren am 07.08.1973 in Heilbronn

Reifeprüfung am 14.05.1993 in Heilbronn

Studiengang der Fachrichtung Zahnmedizin vom WS 1993 bis WS 2001

Naturwissenschaftliche Vorprüfung am 20.03.1995 an der Universität Heidelberg

Zahnärztliche Vorprüfung (Physikum) am 31.03.1999 an der Universität Heidelberg

Klinisches Studium in Heidelberg

Zahnärztliche Prüfung (Staatsexamen) am 19.12.2001 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Physiologie

Doktorvater: Prof. Dr. med. Wolfgang Kuschinsky

Über die Expression von VEGF und seinen Rezeptoren in adulten neuronalen Stammzellen ist zur Zeit nichts bekannt. Deshalb sollte in in vitro Versuchen die mRNA-Expression von VEGF und seinen Rezeptoren VEGF-R1, VEGF-R2, VEGF-R3, Neuropilin-1 und Neuropilin-2 in neuronalen Stammzellen untersucht werden, die aus drei verschiedenen Regionen (Hippokampus, subventrikuläre Zone und Bulbus olfaktorius) von Rattenhirnen isoliert wurden, in denen spontane Neurogenese stattfindet.

Die jeweilige mRNA-Expression wurde unter 5 verschiedenen Versuchsbedingungen untersucht: 1. bei optimaler Sauerstoff- und Glukoseversorgung, 2. nach 24 Stunden Hypoxie 3. mit exogener VEGF-Gabe während 24 Stunden bei optimaler Sauerstoff- und Gukoseversorgung, 4. während 24 Stunden Hypoxie. Im 5. Versuchsansatz wurden die Stammzellen 24 Stunden Hypoxie und anschließend 24 Stunden optimaler Sauerstoffversorgung ausgesetzt, danach die Überlebensrate der drei Stammzellunterarten sowie ihre mRNA-Expression bestimmt und versucht, sie während einer Dauer von 3 Wochen wieder anzuzüchten.

Die Bestimmung der mRNA-Expression erfolgte mittels Reverser Transkriptions-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) und Agarose-Gelelektrophorese.

Es wurden folgende Ergebnisse erhalten: 1. Bei optimaler Sauerstoff- und Glukoseversorgung: Die drei Stammzellunterarten exprimierten mRNA für VEGF und VEGF-R2, jedoch keine für VEGF-R1 und VEGF-R3. Im Gegensatz zu den Stammzellen des Hippokampus und des Bulbus olfaktorius synthetisierten die Stammzellen der subventrikulären Zone keine mRNA für die Neuropiline. 2. Nach 24 Stunden Hypoxie: Alle Stammzellen exprimierten mRNA für VEGF. Nur die hippokampalen Stammzellen hielten die Synthese der mRNA von VEGF-R2 und der Neuropiline aufrecht, es kam bei ihnen auch zur Induktion der Synthese von VEGF-R3-mRNA. 3. Mit exogener VEGF-Gabe während 24 Stunden bei optimaler Sauerstoff- und Gukoseversorgung: Sie exprimierten alle mRNA für VEGF und die Neuropiline. 4. Mit exogener VEGF-Gabe während 24 Stunden bei Hypoxie: Die drei Stammzelltypen exprimierten mRNA für VEGF und Neuropilin-2. Die Stammzellen des Hippokampus hielten die Synthese der mRNA für VEGF-R2 aufrecht, die des Bulbus olfaktorius die der mRNA für Neuropilin-1. 5. Nach 24 Stunden Hypoxie und anschließend 24 Stunden Normoxie: Die drei Stammzellen exprimierten nur noch mRNA für VEGF. Die Überlebensrate betrug zwischen 10.2 % und 14.5 %. Die Wiederanzüchtung der Stammzellen zeigte nach drei Wochen sowohl undifferenzierte oder mäßig differenzierte Einzelzellen als auch Neurosphären.

Es war möglich, unter verschiedenen Versuchsbedingungen in den Stammzelltypen sowohl eine Angleichung der Rezeptorenexpression (Versuch 3), als auch eine Unterschiedlichkeit derselben zu erreichen (Versuch 1, 2 und 4). So hing ihr mRNA-Expressionsmuster mehr von den Umweltbedingungen (Versuchsbedingungen) als von der eigenen Entwicklungsstufe ab.

Wie die Bestimmung der Überlebensrate in Versuch 5 zeigte, widerstanden die hippokampalen Stammzellen der Hypoxie durch die Synthese der mRNA von VEGF-R2 und VEGF-R3 (vgl. Versuch 2) im Sinne eines Zellschutzes nicht besser als die beiden anderen Unterarten. Auch konnte in allen drei Stammzellunterarten, wie Versuch 5 durch den Stopp der mRNA-Synthese für VEGF-R2 und die geringe Überlebensrate der Stammzellen bewies, kein signifikanter Schutz vor Hypoxie mit Hilfe von VEGF-R2 vermittelt werden.

Dies läßt den Schluß zu, daß die Zellen unter Minderversorgung, wie Hypoxie, ihren Stoffwechsel drosseln. Sie synthetisieren die mRNA, die für das Überleben der Zellen notwendig ist. So blieb neben der Synthese der VEGF-mRNA auch die Synthese der GAPDH-mRNA erhalten, die für die Glykolyse in der Zelle und ihr Überleben essentiell ist. Hingegen wurde die Bildung der VEGF-Rezeptoren mit zunehmendem Grad der Schädigung eingestellt. Möglicherweise ergibt sich für die Stammzellen daraus folgendes: Sie können die eingesparte Energie zur Aufrechterhaltung der VEGF-Synthese verwenden und bei durch die

Hypoxie eingeschränktem Stoffwechsel die Synthese von VEGF auf hohem Niveau aufrecht erhalten. Der Stopp der VEGF-Rezeptor-mRNA-Synthese verhindert gleichzeitig den Verbrauch von VEGF durch autokrine Stimulation der VEGF-Rezeptoren während der Hypoxie. Indem keine Induktion der Synthese von VEGF-R1-mRNA sowie zudem ein Stopp der mRNA-Synthese der Neuropiline stattfindet, erfolgt keine Begünstigung der Apoptose der Stammzellen. Auf Grund dieser Mechanismen kann man von einer Erhöhung der VEGF-Konzentration im Gewebe ausgehen, womit eine Aktivierung der Makrophagen möglich wird, die in das geschädigte Gewebe einwandern, die geschädigten Zellen phagozytieren und den Weg für die Endothelzellen zur Gefäßeinsprossung und Beseitigung der Minderversorgung bahnen, die ebenfalls durch VEGF stimuliert werden.

Wie Versuch 5 nach dem Wiederanzüchten der Zellen desweiteren aufzeigte, könnten die Einzelzellen ein Depot für die Bildung von Neurosphären oder für den Ersatz von zugrunde gegangenem neuronalem Gewebe darstellen.