

Zizi Zhou

Dr. med.

## **In vitro sprout formation is mediated by endothelial connexin43 independently of gap Junction communication**

Fach/Einrichtung: Chirurgie

Doktorvater: Prof. Dr. med. Ulrich Kneser

Die molekularen Grundlagen der sogenannten „axialen Vaskularisation“ innerhalb bioartifizieller Gewebskonstrukte im Tissue Engineering unterscheidet sich fundamental von onkologischen und pathophysiologischen Angiogeneseprozessen. Vorarbeiten der Arbeitsgruppe weisen auf eine signifikante und funktionelle Transaktivierung von endotheliale Connexin43 (Cx43), innerhalb des Mikrozirkulationssystems von bioartifiziellen Gewebskonstrukte hin. Dabei wirkt die anfängliche Ischämie innerhalb der Konstrukte komplementär mit der anfänglichen Shear Stress Stimulation des Endothels. Connexinproteine bilden die Grundlage für interzelluläre Kanäle, sogenannte Gap Junctions. Interessanterweise wurde endotheliales Cx43 auch in vitro als positiver Regulator für Zellmigration und Angiogenese identifiziert. Dabei ist es unklar, inwiefern endotheliales Cx43 diese Rolle durch einen Gap Junction-abhängigen Effekt oder durch einen Gap Junction-unabhängigen Effekt vermittelt. Zwischen diesen beiden Möglichkeiten der Signalvermittlung zu differenzieren, war Hautfragestellung der Forschungsarbeit. Dabei wurde die pharmakologische Inhibition von Cx43-spezifischen Gap Junctions hinsichtlich sprout formations, Cx43 Expressionslevels, Gap Junction-vermitteltem Dye Transfer und endothelialer Zellproliferation mit den jeweiligen Effekten im Rahmen einer Modifizierung der Cx43-Expressionslevel verglichen. Dafür wurden Endothelzellen aus humanen Nabelschnurvenen (HUVECs) entweder mit humaner Connexin43 cDNA bzw. siRNA transfiziert und mit Wildtyp Zellen bzw. mit Zellen nach Kontrollvektor-Transfektion verglichen. Pharmakologisch wurde der Cx43-spezifische Gap Junction-Disruptor Gap27 eingesetzt, um eine extrazelluläre Inhibition und damit eine Reduktion der Gap Junction-Bildung, unabhängig von dessen Expressionsstärke zu erzielen. Die Überexpression von humanem Cx43 in HUVECs führte zu einer signifikanten Stimulation der Tube Formation. Die Inhibition von endotheliale Cx43 durch siRNA-Transfektion, resultierte dagegen in einer

korrespondierenden signifikanten Reduktion. Wird die Cx43-spezifische Gap Junction-Aktivität durch den pharmakologischen Disruptor Gap27 reduziert, zeigte sich keine Veränderung der Tube Formation im Vergleich zu den Kontrollen bzw. zu den Wildtypzellen. Die Effektivität von Gap27 als Disruptor wurde mittels Lucifer Yellow Dye Transfer validiert und die allgemeine und nicht Isoform-spezifische Gap Junction-Aktivität in den jeweiligen Gruppen verglichen. Die Effizienz der Transfektionen und die Auswirkung einer Gap27-Inkubation auf die Cx43 Expressionslevel wurden mittels RT-qPCR verglichen. Die Inkubation von Gap27 führt zu keiner signifikanten Veränderung der Cx43 Expressionslevel. Weder die siRNA- oder cDNA-Transfektionen, noch die Gap27 Inkubationen hatten einen Effekt auf die Proliferationsaktivität der Zellen. Die Daten sprechen dafür, dass die stimulierende Wirkung von endothelialelem Cx43 im Tube Formation Assay, zumindest im HUVEC Zellmodell, unabhängig von Gap Junctions vermittelt werden. Nur die Modifikation der Cx43 Expressionlevel hatte Auswirkungen auf die Tube Formation. Diese Differenzierung hinsichtlich der proangiogenen Wirkungsweise von Cx43 war bisher unbekannt und kann eine die Grundlage für zukünftige pharmakologische oder gentherapeutische Therapieansätze bilden.