

Zusammenfassung

Die Bildung und Reifung von Blutgefäßen wird durch Aktivierung perivaskulärer Zellen (perivascular cells; PVC) und Endothelzellen induziert. Die molekularen Mechanismen dieser Aktivierung konnten bislang jedoch nicht vollständig aufgeklärt werden. Aktuelle Studien deuten darauf hin, dass microRNAs (miRNAs) die Aktivierung von Endothelzellen und deren Interaktion mit PVC beeinflussen und somit zur Bildung neuer Gefäße beitragen können. Die Bedeutung von miRNAs in PVC hingegen ist noch weitgehend unerforscht und es sind wenige miRNAs beschrieben, die in PVC exprimiert werden und möglicherweise deren Aktivierungsstatus während der Gefäßentwicklung beeinflussen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten daher PVC-spezifische miRNAs identifiziert, deren Funktion für die PVC-abhängige Angiogenese beschrieben und die zu Grunde liegenden molekularen Mechanismen der miRNA Wirkung detailliert charakterisiert werden. Mit Hilfe eines in vitro Angiogenesemodells und einer umfassenden miRNA Transkriptionsanalyse konnten aus ~700 beschriebenen miRNAs miR-126-3p, miR-146a und miR-155-5p identifiziert werden, die in aktivierten PVC verstärkt exprimiert wurden. miR-126-3p besaß mit einer hundertfach erhöhten Expression die deutlichste Expressionsänderung und könnte demnach eine wichtige Funktion in der Aktivierung der PVC übernehmen. In Gegenwart erhöhter miR-126-3p Konzentrationen bildeten PVC auf einem komplexen basalmembranähnlichen Substrat vermehrt gerichtete Zellfortsätze und Zell-Zell Kontakte aus, während dieses Verhalten auf den Einzelkomponenten der vaskulären Basalmembran wie Laminin 511, Kollagen IV, Nidogen 1 nicht beobachtet werden konnte. Die miR-126-3p förderte auch die Interaktion der PVC mit HUVEC in einem zweidimensionalen Kokultursystem. Auf molekularer Ebene konnten in Luziferasebindungsstudien und Protein-expressionsanalysen Spred1, Plk2 und Irs1 als Zielgene der miR-126-3p identifiziert werden. Die gezielte Expressionsverringering der einzelnen Zielgene mittels siRNAs zeigte, dass sowohl die Reduktion der Spred1 als auch der Plk2 Expression die Zell-Zell und Zell-Matrix Wechselwirkungen der PVC verstärkten und damit einen ähnlichen Phänotyp wie die miR-126-3p Expressionserhöhung hervorriefen. Außerdem konnte in Immunoblotanalysen ein direkter Zusammenhang zwischen der verringerten Spred1 und Plk2 Expression und der beobachteten Aktivierung der ERK1/2 und AKT Signalwege gezeigt werden. Die Übertragbarkeit der erhaltenen Ergebnisse auf die in vivo Angiogenese wurde durch zwei Versuchsansätze überprüft. In Expressionsanalysen deutete eine verstärkte Expression der miR-126-3p in isolierten primären PVC zu Embryonalstadium 11.5 und 13.5 auf eine Funktion der miRNA während der Angiogenese in vivo hin. In Überexpressionsstudien induzierte die gezielte Erhöhung der miR-126-3p in perivaskulären Vorläuferzellen der Neuralleiste die Anlagerung dieser Zellen an kraniale Gefäße in ovo und trägt vermutlich zur Gefäßstabilisierung bei. Zusammenfassend konnte in dieser Dissertation zum ersten Mal eine Funktion der miR-126-3p in PVC belegt werden. miR-126-3p wird in PVC nach Interaktion mit HUVEC verstärkt exprimiert, stimuliert über Inhibierung der Zielgene Spred1 und Plk2 die Aktivierung der ERK1/2 und AKT Signalwege und fördert dadurch interzelluläre Kontakte und die Wechselwirkungen der Zellen mit einer komplexen Basalmembran. Bezüglich der Angiogenese lässt sich daraus ableiten, dass erhöhte miR-126-3p Mengen die neugebildeten Gefäße stabilisieren, während verringerte miR-126-3p Mengen die Zell-Zell und Zell-Matrix Wechselwirkungen lösen und die Gefäße destabilisieren.