



# ***Vasculaire greffes, celoverleving en connexines***

***Saskia Baert***

Verhandeling ingediend tot  
het verkrijgen van de graad van  
Master in de Biomedische Wetenschappen

Promotor: Prof. Dr. Luc Leybaert  
Begeleidster: Mélissa Bol  
Vakgroep Medische Basiswetenschappen - Fysiologiegroep

**Academiejaar 2011-2012**





# ***Vasculaire greffes, celoverleving en connexines***

***Saskia Baert***

Verhandeling ingediend tot  
het verkrijgen van de graad van  
Master in de Biomedische Wetenschappen

Promotor: Prof. Dr. Luc Leybaert  
Begeleidster: Mélissa Bol  
Vakgroep Medische Basiswetenschappen - Fysiologiegroep

**Academiejaar 2011-2012**

*“De auteur en de promotor geven de toelating deze masterproef voor consultatie beschikbaar te stellen en delen ervan te kopiëren voor persoonlijk gebruik. Elk ander gebruik valt onder de beperkingen van het auteursrecht, in het bijzonder met betrekking tot de verplichting uitdrukkelijk de bron te vermelden bij het aanhalen van resultaten uit deze masterproef.”*

Datum

(handtekening student)

(handtekening promotor)

(Naam student)

(Naam promotor)

## VOORWOORD

Bij aanvang wil ik graag nog een woordje van dank richten aan enkele personen die mij met raad en daad bijstonden bij het tot stand brengen van deze masterproef.

Graag wil ik mijn promotor, Prof. Dr. Luc Leybaert, van harte bedanken omdat hij mij de kans heeft gegeven om dit boeiend onderzoek uit te voeren. Dit was een zeer leerrijke ervaring voor mij waar ik mij ten volle in kon vinden. Ook kreeg ik regelmatig positieve feedback, wat me nog meer motiveerde om deze taak tot een goed einde te brengen.

Niet in het minst wil ik ook mijn begeleidster, Méliissa Bol, hartelijk bedanken. Telkens opnieuw kreeg ik vakkundige uitleg en antwoorden op mijn vragen. Zij heeft me ook heel wat praktische ervaring bijgebracht waardoor ik de kneepjes van het experimenteel werk snel onder de knie kreeg. Zij stond altijd voor mij klaar om mij te helpen en bij te staan waar nodig. Dankjewel Méliissa, voor de twee voorbije toffe jaren!

Verder wil ik Elke, Marijke, Nan, Ashish en de collega's van de dienst Histologie graag bedanken voor de aangename sfeer in het labo, alsook de collega's van de Weefselbank waarop we steeds een beroep konden doen. Ook Yana, mijn medethesisgenoot verdient een woord van dank. Ook al waren we maar met twee studenten op onze afdeling, toch was het een leuk jaar met nu en dan een ontspannende babbel tussendoor. Mijn medestudenten en treingenoeten Astrid en Lien wil ik ook graag in de bloemetjes zetten. We zijn samen aan deze opleiding begonnen en maken deze ook samen af. Dank voor jullie vriendschap en steun gedurende de vijf voorbije jaren.

Tot slot wil ik ook nog mijn mama, zus en grootouders bedanken. Telkens opnieuw stonden zij klaar om mij te steunen en aan te moedigen. Bedankt allemaal om tijdens deze drukke periode volledig achter mij te staan, dit betekende zeer veel voor mij!

Als laatste wil ik ook nog mijn vriend, Harold, heel erg bedanken. Hij had steevast 100% vertrouwen in mijn kunnen en zorgde tijdig voor de nodige ontspanning. Dankjewel om er te zijn voor mij!

Bedankt allemaal voor jullie steun, begrip en vertrouwen in mij!

Saskia

# INHOUDSTAFEL

## LIJST MET GEBRUIKTE AFKORTINGEN

<b>SAMENVATTING</b> .....	1
<b>1. INLEIDING</b> .....	2
1.1    VASCULAIRE GREFFES .....	2
1.1.1    ALGEMENE BOUW VAN BLOEDVATEN .....	3
1.2    CELDOOD .....	4
1.2.1    APOPTOSE .....	4
1.2.1.1    Morfologische kenmerken .....	4
1.2.1.2    Apoptotische pathways .....	6
1.2.2    NECROSE .....	7
1.2.2.1    Morfologische kenmerken .....	8
1.2.3    AUTOFAGIE .....	9
1.3    INTERCELLULAIRE COMMUNICATIE VIA CONNEXINEKANALEN .....	9
1.3.1    CONNEXINES .....	10
1.3.2    CONNEXINE HEMIKANALEN OF CONNEXONS .....	12
1.3.3    GAP JUNCTIES .....	12
1.4    CONNEXINE KANALEN EN CELDOOD .....	13
1.4.1    GAP JUNCTIES EN CELDOOD .....	14
1.4.2    CONNEXINE HEMIKANALEN EN CELDOOD .....	15
1.5    CONNEXINE MIMETISCHE PEPTIDEN .....	16
1.6    DOELSTELLING EN BELANG VAN HET ONDERZOEK .....	17
<b>2. MATERIALEN EN METHODEN</b> .....	18
2.1    CRYOPRESERVATIE .....	18
2.2    ONTDOOIEN EN PARAFFINE .....	18
2.3    IMMUNOFLUORESCENTIE KLEURING .....	21
2.4    HAEMATOXILINE-EOSINE KLEURING .....	22
2.5    TUNEL-KLEURING .....	23
2.6    STATISTISCHE ANALYSE .....	25
<b>3. RESULTATEN</b> .....	26
3.1    Cx37, Cx40 EN Cx43 EXPRESSIE IN ARTERIA FEMORALIS EN VENA SAFENA MAGNA .....	26
3.2    MORFOLOGISCHE ANALYSE TUNICA INTIMA .....	30
3.3    STUDIE APOPTOTISCHE CELFRACTIE IN BLOEDVATEN .....	31

3.3.1	VALIDATIE TUNEL-KLEURING.....	31
3.3.2	BEPALEN APOPTOTISCHE CELINDEX.....	33
3.3.3	IMPACT TIJDSTIP VAN TOEDIENING VAN GAP27 OP CELDOOD.....	37
<b>4.</b>	<b>BESPREKING.....</b>	<b>41</b>
<b>5.</b>	<b>REFERENTIELIJST.....</b>	<b>45</b>

## LIJST MET GEBRUIKTE AFKORTINGEN

Apaf1	apoptotic protease-activating factor 1
ATP	adenosine trifosfaat
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BSA	bovine serum albumin
cAMP	cyclisch adenosinemonofosfaat
Caspase	cysteinyl aspartate-specific protease
CL	cytoplasmatische lus
CT	C-terminale regio
Cx	connexine
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DMSO	dimethylsulfoxide
dUTP	deoxyuridinetrifosfaat
EL	extracellulaire lus
ET	endothelcellen + subendotheliale laag of tunica intima
Fas	fatty acid synthetase
FITC	fluoresceïne-isothiocyanaat
GJ	gap junctie
GJIC	gap junctionele intercellulaire communicatie
HBSS-Hepes	Hank's buffered salt solution - 4-(2-hydroxyethyl)-1- piperazine-ethaansulfonzuur
HE	haematoxiline-eosine
IgG	immunoglobuline G
IP3	inositol 1,4,5-trisfosfaat
MAPK	mitogen-activated protein kinase
NAD <sup>+</sup>	nicotinamide adenine dinucleotide
NT	N-terminale regio
PBS	phosphate-buffered saline
PKC	proteïne kinase C
PTFE	polytetrafluoroethyleen
ROS	reactive oxygen species
SEM	standard error of the mean of standaardfout
SMC	gladde spierlaag of tunica media



Src	Rous sarcoma tyrosinekinase
TdT	terminal deoxynucleotidyl transferase
TNF	tumor necrosis factor
TRAIL	TNF-related apoptosis inducing ligand
TRITC	tetramethyl-rhodamine-isothiocyanaat
TUNEL	terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridinetrifosfaat nick end-labeling

## **SAMENVATTING**

Onderzoek toont aan dat geprogrammeerde celdood, meer bepaald apoptose, een rol speelt bij het falen van vasculaire greffes in individuen. Intercellulaire communicatie via kanalen die opgebouwd zijn uit transmembranaire connexine (Cx) eiwitten blijken een cruciale rol te spelen in het apoptotisch proces. Zo werd aangetoond dat gap juncties een directe communicatieweg vormen voor het verspreiden van celdood- en overlevingssignalen tussen het cytoplasma van naburige cellen. Anderzijds kunnen hemikanalen, die het intracellulaire milieu verbinden met het extracellulaire milieu, fungeren als toxische poriën. In deze studie werd de rol van Cx kanalen verder onderzocht met behulp van Cx kanaal blokkers, meer bepaald het Cx mimetisch peptide Gap27 dat correspondeert met een sequentie van de tweede extracellulaire lus van de vasculaire connexines 37 en 43. Dit peptide werd aan de bloedvaten toegevoegd, ofwel tijdens het invriezen én gradueel uitwassen, ofwel tijdens deze twee procedures afzonderlijk. Vervolgens werd de apoptotische celfractie bepaald in de arteria femoralis en de vena safena magna door gebruik te maken van de TUNEL-kleuring.

De resultaten tonen aan dat apoptose in cryogepreserveerde greffes meer verspreid is in de endotheliale laag dan in de gladde spierlaag. De aanwezigheid van Gap27 resulteerde in een afname van de apoptotische celindex zowel in de endotheliale laag als in de gladde spierlaag. Deze daling werd waargenomen wanneer Gap27 aanwezig was tijdens het invriezen en gradueel uitwassen, of enkel tijdens het invriezen. Daarnaast had Gap27 geen effect op het al dan niet bewaren van de endotheliale omlijsting van de bloedvaten. Opmerkelijk is dat er veel meer endotheelloslating geobserveerd werd bij arteriën in vergelijking met venen, bovendien was de apoptotische celindex hoger bij deze bloedvaten.

Uit deze studie kunnen we afleiden dat de aanwezigheid van connexine mimetische peptiden tijdens het cryopreserveren van bloedvaten celdood reduceren. Dit zou van essentieel belang kunnen zijn voor een langere levensduur van de bloedvaten wanneer ze getransplanteerd worden bij de patiënt.

# 1. INLEIDING

## 1.1 VASCULAIRE GREFFES

Vasculaire greffes, arteriële en veneuze, worden voornamelijk gebruikt voor revascularisatie bij cardiovasculaire aandoeningen. Vervanging van een aangetast bloedvat door een goedwerkend bloedvat zorgt voor herstel van de doorbloeding. Verse allogreffes (i.e. humane weefsels en organen) zouden sneller uiteenvallen en afgestoten worden in tegenstelling tot geconserveerde allogreffes. Als gevolg hiervan werden weefselbanken opgericht waar bloedvaten, na prelevatie uit donoren, ingevroren kunnen worden [1]. Cryopreservatie, invriezen, is een belangrijk proces waarbij de cellulaire elementen in het biologische materiaal vernietigd worden, waardoor de antigeniciteit van het weefsel vermindert. Dit proces zorgt er voor dat bepaalde cellulaire functies bewaard blijven omdat de afkoeling en de preventie van ijsvorming nauwkeurig kan gecontroleerd worden. Het biedt tenslotte ook het voordeel dat weefsels op deze manier makkelijker gepreserveerd kunnen worden [1]. Cryogepreserveerde greffes bieden bovendien het voordeel dat ze meer resistent zijn tegen infecties in vergelijking met synthetische alternatieven [2]. Synthetische polytetrafluoroethyleen (PTFE) greffes hebben een slechtere outcome wat betreft de ontwikkeling van intimale hyperplasie<sup>1</sup> en trombose én door het gebruik van synthetisch materiaal is er een verhoogde kans op afstotingsgevaar [4].

Echter, het rendement van cryogepreserveerde vasculaire greffes is tot op heden nog niet ideaal, voornamelijk door de spontane scheuren die verschijnen tijdens het ontdooien of terug inplanten. De huidige methoden van cryopreservatie in de meeste weefselbanken leiden tot een verlies van endotheel. Het loskomen van het endotheel speelt echter een hoofdrol in het falen van vasculaire cryogepreserveerde greffes [5].

Wanneer de bloedvaten chirurgisch nodig zijn, bijvoorbeeld voor het plaatsen van een coronaire bypass of bij lidmaatschemie, zullen ze ontdooid moeten worden [1, 6]. Tijdens en na het ontdooien van deze bloedvaten treedt er echter veel celdood op. Dit kan het gevolg zijn van ofwel prelevatie, cryopreservatie en/of het ontdooien zelf. Gedurende de preparatie van de greffes kunnen ze onderworpen worden aan bijvoorbeeld hypoxie. Dit kan tot celdood leiden afhankelijk van de tijd waarin ze blootgesteld worden aan deze omstandigheden [6].

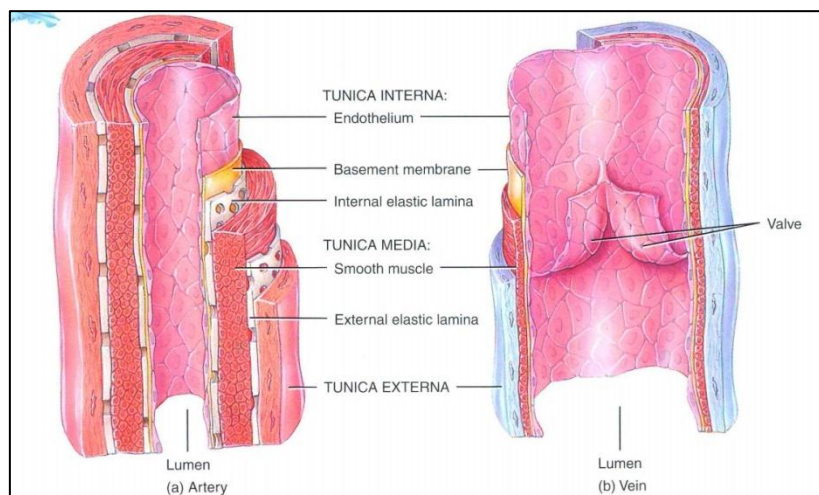
---

<sup>1</sup> Intimale hyperplasie: proliferatie van de onderliggende gladde spiercellen en afzetting van matrix in de bloedvatwand, met restenose tot gevolg [3].

### 1.1.1 ALGEMENE BOUW VAN BLOEDVATEN

Bloedvaten zijn opgebouwd uit drie verschillende lagen, namelijk de tunica intima, de tunica media en de tunica externa of tunica adventitia (Figuur 1). Arteriën kunnen onderscheiden worden van venen door hun dikkere wand en door hun kleiner en regelmatig lumen. Hun wand bestaat uit meer elastische en musculaire elementen dan van de overeenkomstige venen. Bij de arteriën bestaat de tunica intima uit een doorlopende laag endotheel gelegen op een dunne subendotheliale laag. Onder deze subendotheliale laag bevindt zich een lamina elastica interna. Deze laag zal de tunica intima en de tunica media van elkaar onderscheiden en de overgang naar de tunica adventitia wordt op zijn beurt gevormd door de aanwezigheid van de lamina elastica externa. De tunica media is opgebouwd uit concentrische lagen van gladde spiercellen waartussen bindweefsel ligt, meestal rijk aan elastinevezels. De tunica adventitia bestaat uit bindweefsel [7].

Bij de venen bestaat de wand uit dezelfde tunicae als de arteriën maar de lamina elastica interna en externa ontbreekt steeds. Hierdoor is de grens tussen de tunicae minder duidelijk [7].



**Figuur 1: Histologische opbouw van een arterie (A) en een vene (B) [8].** Arteriën en venen bestaan uit drie verschillende lagen, namelijk: de tunica intima (interna), tunica media en tunica externa of adventitia. De eerste twee lagen worden van elkaar onderscheiden door de lamina elastica interna en de laatste twee door de lamina elastica externa. Dit duidelijk onderscheid tussen de lagen is enkel terug te vinden bij de arteriën. Bij de venen zijn deze overgangen minder duidelijk door afwezigheid van deze lamina elastica interna en externa [7].

## 1.2 CELDOOD

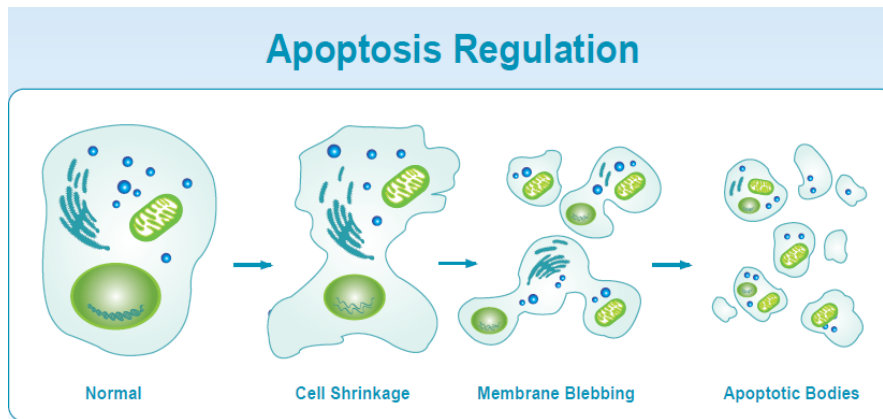
In multicellulaire organismen hangt de weefselhomeostase af van de balans tussen celgroei en celdood [9]. Celdood speelt hierbij een belangrijke rol in de ontwikkeling van weefsels en staat in voor het onderhouden van de weefselhomeostase in het volwassen individu. Het is een strikt gecontroleerd proces en de deregulatie is geassocieerd met diverse ziekten. Gereguleerde celdood enerzijds is een belangrijk proces in de bloedvatontwikkeling alsook in het herstellen van de vaten na verwonding. Anderzijds speelt gedereguleerde celdood een rol bij ziekten zoals atherosclerose, aneurysmavorming, een ischemische en gedilateerde hartspier en infarcten. Celdood kan opgedeeld worden in verschillende soorten processen, namelijk apoptose, necrose en autofagie, waarbij de twee eerstgenoemde de belangrijkste zijn [10].

### 1.2.1 APOPTOSE

Apoptose is een belangrijk fysiologisch proces dat instaat voor het elimineren van cellen tijdens de ontwikkeling en speelt ook een belangrijke rol in het onderhouden van de weefselhomeostase [11]. Het is een geprogrammeerd en zorgvuldig georganiseerd proces van selectieve celdeletie dat optreedt in alle weefsels als een deel van de normale cel turnover [9] en resulteert in een geordende en efficiënte verwijdering van beschadigde of overbodige cellen [12]. Het is een energie-afhankelijk proces dat betrokken is in de ontwikkeling en vernieuwing van verschillende weefsels en organen. Voorts komt apoptose tot uiting bij het geven van een antwoord bij stress-condities [10] en is ten slotte ook betrokken in het toenemend aantal pathologische condities, zoals ischemie-gerelateerde celschade volgend op een cerebrovasculair accident [9].

#### 1.2.1.1 Morfologische kenmerken

Apoptose wordt gekenmerkt door een aantal veranderingen in de nucleaire morfologie, zoals chromatine condensatie (pyknose) en fragmentatie (karyorhexis), kleine veranderingen in de cytoplasmatische organellen, algemene afname/inkrimping van cellen, blebbing van de plasmamembraan en vorming van apoptotische blaasjes welke nucleair of cytoplasmatisch materiaal bevatten (Figuur 2). Het geheel van deze veranderingen zal plaatsvinden vooraleer de integriteit van de plasmamembraan verloren gaat [13].



**Figuur 2: Regulatie van apoptose [14].** Apoptose zal in eerste instantie aanleiding geven tot het krimpen van de cel. Vervolgens zal blebbing van de plasmamembraan resulteren in afscheiding van verschillende celfragmenten in apoptotische blaasjes, ook wel apoptotic bodies genoemd. Apoptose zal geen aanleiding geven tot inflammatie [11, 15].

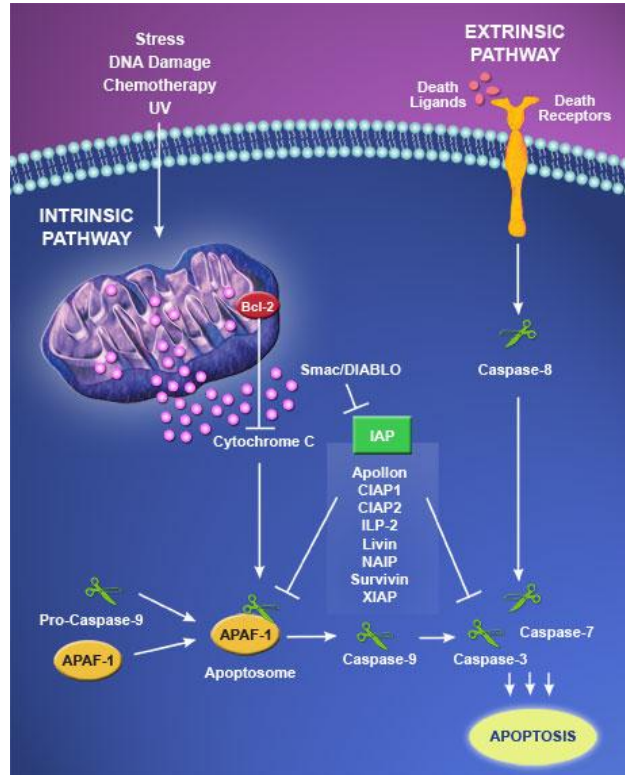
Tijdens het vroege stadium van apoptose zal de cel krimpen en kleiner worden wat aanleiding zal geven tot een dichter cytoplasma en een dichtere stapeling van de organellen in de cel. Een typisch kenmerk voor het apoptotisch proces is pyknose (reductie cellulair volume) wat het resultaat is van de chromatine condensatie onder de nucleaire membraan [15]. Vervolgens treedt er ook karyorrhexis (nucleaire fragmentatie) en afscheiding van verschillende celfragmenten in apoptotische blaasjes op, ook wel apoptotic bodies genoemd. Dit proces van afscheiding heet 'budding'. De apoptotische lichaampjes bestaan uit cytoplasma met dicht gepakte organellen, waarbij de integriteit van de organellen bewaard is gebleven en er zich rond dit alles nog steeds een intacte plasmamembraan bevindt. De apoptotische blaasjes die afgescheiden zijn, zullen gefagocyteerd worden door gespecialiseerde fagocyten, zoals macrofagen/monocyten en neutrofielen, en op deze manier lysosomaal gedegradeerd worden [11, 15]. Wanneer deze degradatie echter afwezig is zal dit aanleiding geven tot secundaire necrose. In vivo vindt secundaire necrose plaats wanneer apoptose in enorme hoeveelheden aanwezig is zodat de fagocyterende mechanismen onvoldoende of verzwakt zijn om alles op te ruimen [11].

Kenmerkend voor apoptose is dat er geen inflammatie optreedt doordat de apoptotische cellen geen cellulaire bestanddelen vrijstellen in het omgevende interstitiële weefsel. De apoptotische cellen worden hierbij heel snel gefagocyteerd door omgevende cellen en op deze manier wordt secundaire necrose vermeden. Tot slot treedt apoptose slechts op in enkele cellen of in kleinere clusters van cellen in tegenstelling tot necrose (Zie §1.2.2) [15].

### 1.2.1.2 Apoptotische pathways

Twee belangrijke apoptotische pathways kunnen onderscheiden worden, namelijk de mitochondria-gemedieerde intrinsieke cascade en de dood-receptor-gemedieerde extrinsieke cascade (Figuur 3). Beide steunen op de proteolytische activiteit van een evolutionair geconserveerde familie van cysteine proteasen, de caspasen. Deze caspasen vormen de biochemische basis van het apoptotisch fenotype [9] en zijn verantwoordelijk voor de snelle gecoördineerde afbraak van de cel [10]. Ze staan ook in voor het splitsen van een groot aantal cellulaire eiwitten, zoals belangrijke cytoplasmatische en nucleaire elementen [9].

Caspasen (Cysteiny ASPartate-specific proteASE) zijn cysteine proteasen welke betrokken zijn in celdood. Alle caspasen zijn opgebouwd uit drie structurele domeinen, namelijk een pro-domein, een grote subunit en een kleine subunit. De actieve enzymen worden gevormd door proteolytische verknipping van de subunits, waarbij de verknippingsplaatsen van de caspase substraten aangeduid zijn door de posities P4, P3, P2 en P1. Kenmerkend hierbij is dat de P1-positie steeds een aspartaatzuur (D) is. De aminozuren op de andere posities zijn zeer variabel. Uiteindelijk resulteert de caspase-activatie in een volledige afbraak met celdood als resultaat [16].



**Figuur 3:** Twee belangrijke apoptotische signaalcascades. Namelijk: de intrinsieke mitochondriaal gemedieerde pathway en de extrinsieke dood-receptor gemedieerde pathway [17].

Een eerste belangrijke apoptotische signaalcascade is de *intrinsieke mitochondriaal gemedieerde pathway*. Deze intrinsieke signaalweg wordt tot stand gebracht door de mitochondriën en omvat een uiteenlopende collectie van niet-receptor gemedieerde stimuli, zoals stress of DNA schade, die intracellulaire signalen produceren welke direct inwerken op een doelwit in de cel. Deze signaalbaan wordt gereguleerd door de B-cel lymfoma-2 (Bcl-2) familie welke zowel pro- als anti-apoptotische eiwitten zijn [9]. Als antwoord op verschillende types stress en schade zullen bepaalde pro-apoptotische leden van de Bcl-2 familie geactiveerd worden en aanleiding geven tot de vrijstelling van cytochroom C uit de mitochondriën. Cytochroom C zal, na vrijstelling, binden op de apoptose protease-activating factor 1 (Apaf1) wat op zijn beurt zal resulteren in de vorming van het Apaf1-caspase 9 apoptosoom complex met de activatie van het initiator caspase 9 (Figuur 3) [18, 19].

Daarnaast wordt een tweede signaalweg, de *extrinsieke signaalweg*, op gang gebracht door de binding van een extracellulair dood-ligand, zoals Fas-ligand, tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) of TNF-gerelateerd apoptose-inducerend ligand (TRAIL), op hun overeenkomstige receptoren op de plasmamembraan [9]. Triggering van de receptoren van de TNF superfamilie zal aanleiding geven tot de vorming van een receptor-ligand complex, wat op zijn beurt zal instaan voor de activatie van het initiator caspase 8. De geactiveerde initiator caspases 8 en 9 zullen vervolgens de effector caspases 3 en 7 activeren, welke verantwoordelijk zijn voor het verknippen van belangrijke cellulaire substraten. Dit laatste resulteert in de klassieke biochemische en morfologische veranderingen welke geassocieerd zijn met het apoptotische fenotype (Figuur 3) [19].

### 1.2.2 NECROSE

Het alternatief van apoptotische celdood is necrotische celdood. Het wordt beschouwd als een passief proces zonder onderliggende signalen en treedt op onder extreme fysicochemische condities, zoals plotseling zuurstofgebrek, onverwacht tekort aan voedingsstoffen, hitte of detergenten [9]. Het is een toxisch proces waarbij de cel het slachtoffer is en een energie-onafhankelijke manier van celdood ondergaat [15]. Het kan voorkomen bij pathologische processen zoals inflammatie na weefselschade en wordt gekenmerkt door zwelling van de organellen en ruptuur van de plasmamembraan (Figuur 4). In tegenstelling tot apoptose resulteert necrose wel in de vrijstelling van verscheidene inflammatoire moleculen, die aanleiding zullen geven tot een inflammatoire respons [10].

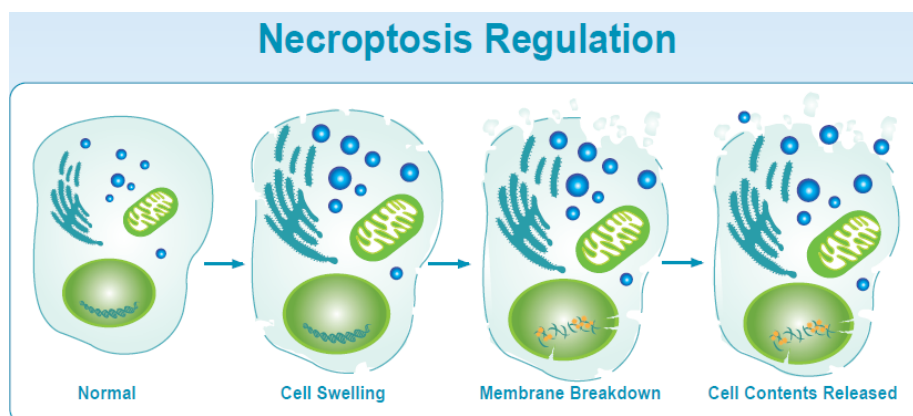


Naast deze ongecontroleerde vorm van necrose kan necrotische celdood ook gereguleerd worden door een reeks van signaaltransductie pathways en catabolische (weefsel afbrekende) mechanismen. Deze vorm van gereguleerde celdood wordt necroptosis genoemd [20]. Zowel necrose als necroptosis zullen aanleiding geven tot eenzelfde cellulaire morfologie (Figuur 4) (zie §1.2.2.1) [21].

Tot slot is het niet altijd makkelijk om necrose en apoptose van elkaar te onderscheiden. Necrose kan beschreven worden als een (on)gecontroleerd, passief proces dat meestal grote zones van cellen zal aantasten, terwijl apoptose een gecontroleerd en energie-afhankelijk proces is waarbij er individuele cellen of clusters van cellen aangetast zijn [15].

#### 1.2.2.1 Morfologische kenmerken

Zowel necrose als necroptosis kunnen gekenmerkt worden door een aantal belangrijke morfologische veranderingen, zoals: zwellen van de cel, vorming van cytoplasmatische vacuolen, zwelling van het endoplasmatisch reticulum, vorming van cytoplasmatische bellen, gecondenseerd/gezwollen of gescheurde mitochondriën, disaggregatie en loskomen van ribosomen, gescheurde organelmembranen, gezwollen en gescheurde lysosomen en eventueel een gescheurde celmembraan. Dit verlies van de celmembraanintegriteit resulteert in de vrijstelling van de cytoplasmatische inhoud in het omgevende weefsel met het uitzenden van chemotactische signalen die aanleiding kunnen geven tot het rekruteren van inflammatoire cellen (Figuur 4) [15].



**Figuur 4: Regulatie necrose/necroptosis [14].** Zowel necrose als necroptosis gaan gepaard met het zwellen van de cel en het scheuren van de celmembraan, wat aanleiding zal geven tot de vrijstelling van de cytoplasmatische inhoud in het omgevende weefsel. Dit zal inflammatie in de hand werken [15].

### 1.2.3 *AUTOFAGIE*

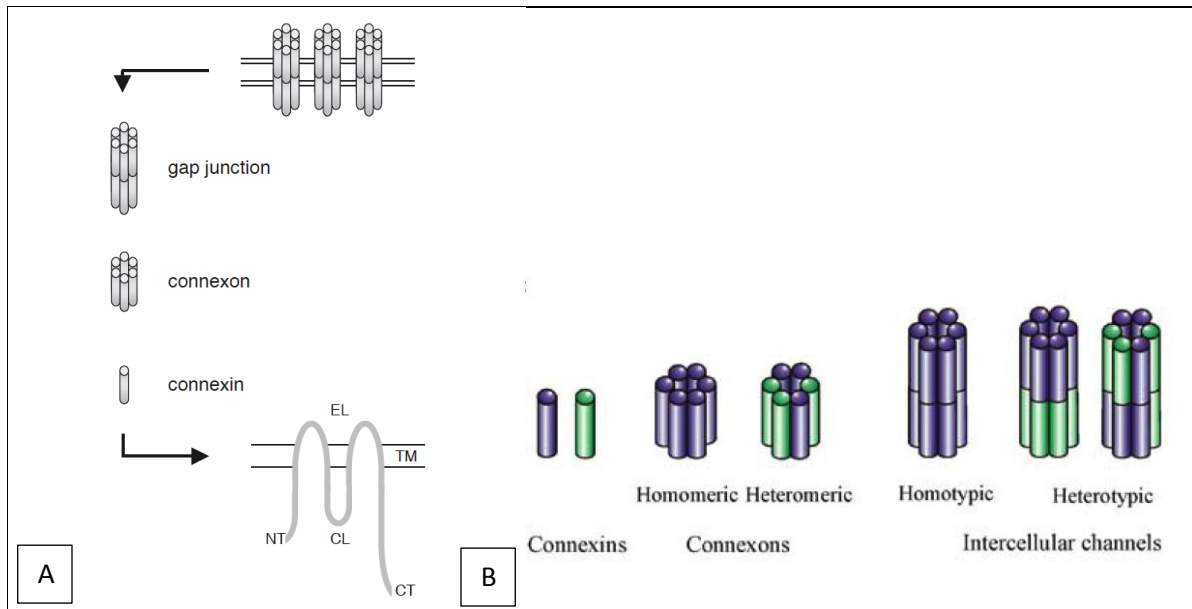
Autofagie is een evolutionair geconserveerd proces dat actief aanwezig is in alle cellen. Dit proces speelt zowel een rol in de normale turnover van proteïnen en organellen als in het antwoord op cellulaire stress. Inductie van autofagie zal niet enkel de degradatie van beschadigde cellulaire componenten in de hand werken maar het zal ook de cel voorzien van moleculaire bouwstenen en energie. Kenmerkend hierbij is dat autofagie zowel celdood kan bevorderen als tegengaan, afhankelijk van de context waarin het voorkomt [10, 22].

Autofagie zal enerzijds de cel ondersteunen in stress-condities door opruiming van beschadigde proteïnen, organellen en pathogenen of anderzijds door de cel te voorzien van energie en anabolische bouwstenen wanneer er een tekort is aan voedingsstoffen. Het is doorgaans een pro-survival mechanisme waarbij één van de belangrijkste functies het recycleren is van beschadigde proteïnen en organellen, om zo de cel op te ruimen en vervolgens te voorzien van nieuwe bouwstenen. Dit laatste heeft als doel de beschadigde en verminderde cellulaire componenten te vervangen, waarbij dit proces fungeert als een beschermend mechanisme. Karakteristiek voor autofagie is de aanwezigheid van autofagische vacuolen (autofagosomen) die fuseren met lysosomen om uiteindelijk autofagolysosomen te vormen [10, 22].

### 1.3 INTERCELLULAIRE COMMUNICATIE VIA CONNEXINEKANALEN

Een goed georganiseerde wisselwerking tussen extracellulaire, intracellulaire en intercellulaire signalering is een eerste vereiste voor het onderhouden van de weefselhomeostase. Directe intercellulaire communicatie wordt hoofdzakelijk tot stand gebracht door gap juncties (GJs). Deze communicerende cel juncties komen voort uit de koppeling, ‘docking’, van twee hemikanalen (connexons) van nabij gelegen cellen, welke op hun beurt opgebouwd zijn uit 6 connexine (Cx) subunits (Figuur 5A) [23].

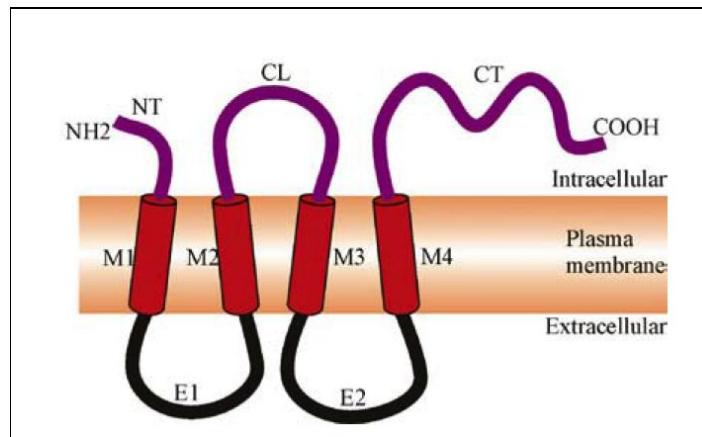
GJs bestaan meestal uit meer dan één type connexine. Op deze manier kunnen dus homo- of heteromere connexine hemikanalen gevormd worden en zo ook homo- en heterotypische GJs [24] (Figuur 5B).



**Figuur 5:** (A) **Anatomie van de gap junctions.** Gap junctions zijn gegroepeerd in plaques aan het membraanoppervlak en zijn opgebouwd uit twaalf connexine eiwitten, welke georganiseerd zijn in twee hexamere hemikanalen (connexons) [25]. (B) **Mogelijke schikkingen van connexine hemikanalens om gap junctions te vormen.** Connexine hemikanalen kunnen homomeren zijn (opgebouwd uit 6 identieke connexine subunits) of heteromeren (opgebouwd uit meer dan 1 connexine type). Connexines zullen associëren met elkaar met hun uiteinde om een gap junctie te vormen. Deze gap junctions kunnen homotypisch (connexine hemikanalen identiek) zijn of heterotypisch (twee connexine hemikanalen zijn verschillend) [24].

### 1.3.1 CONNEXINES

Connexines (Cx) zijn aanwezig in een groot aantal organismen. Bij mensen zijn meer dan twintig soorten connexines gekend [24-26]. Ze delen allemaal dezelfde structuur, namelijk: 4 hydrofobe membraire alfa-helices (M1-M4), een cytoplasmatisch N-terminaal (NT) en C-terminaal domein (CT), twee extracellulaire lussen (EL) en één cytoplasmatische lus (CL) (Figuur 6) [24-30]. De twee geconserveerde extracellulaire domeinen (EL) worden gebruikt bij het koppelen van connexines, gelegen in aangrenzende membranen [24] en variabiliteit tussen de leden van de connexine familie is te wijten aan structurele verschillen in de cytosolische zones [24, 25]. Voorts kan het CT-uiteinde variëren in lengte en is op deze manier een belangrijke determinant voor de moleculaire massa. Het CT-uiteinde bevat bovendien ook verschillende fosforylatieplaatsen voor proteïne kinase C (PKC), het mitogen-activerend proteïne kinase (MAPK) en het Rous sarcoma tyrosinekinase (Src). Daarnaast is het NT-uiteinde sterk geconserveerd bij alle connexines [30].



**Figuur 6: Topologie van een connexine molecule [24].** Connexines hebben allemaal dezelfde structuur: namelijk: 4 hydrofobe membraire alfa-helices (M1-M4), een cytoplasmatisch N-terminaal (NT) en C-terminaal domein (CT), twee extracellulaire lussen (EL) en één cytoplasmatische lus (CL) [24-30].

De oligomerisatie van connexines tot hemikanalen vangt aan in het endoplasmatisch reticulum en is voltooid in het golgi-complex. Van daaruit zullen vesikels, die de hemikanalen bevatten, getransporteerd worden om zo samen te smelten met de plasmamembraan [24, 30]. Eens in de plasmamembraan aanwezig kunnen twee hemikanalen van naburige cellen koppelen (docking) en vormen ze een gap junctie [30]. Afhankelijk van het connexine type, varieert de porie diameter tussen 6.5 en 15 Ångström (Å), wat breed genoeg is om de passage van moleculen kleiner dan 1.5 kilodalton (kDa) toe te laten, zoals water, individuele aminozuren of korte peptiden, kationen en anionen ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ) en boodschappermoleculen zoals inositol 1,4,5-trisfosfaat ( $\text{IP}_3$ ) en cyclisch adenosinemonofosfaat (cAMP) [24].

Twee nomenclatuur systemen worden aangewend om verschillende soorten connexines te benoemen. Een eerste systeem zal de connexines indelen op basis van hun moleculair gewicht [25]. Ze worden hierbij benoemd in overeenstemming met hun moleculair gewicht, variërend van 25 tot 62 kDa, met Cx43 als meest voorkomende connexine in het menselijk lichaam [26, 30]. In vasculaire weefsels worden Cx37, Cx40, Cx43 en Cx45 teruggevonden [9, 31].

Een tweede systeem zal connexines onderverdelen in subklassen ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  of  $\delta$ ) naargelang de sequentie similariteit en lengte van de cytoplasmatische domeinen. Men maakt hier gebruik van het voorvoegsel 'GJ' en een nummer dat wijst naar de volgorde van ontdekking. In dit systeem wordt Cx43, GJA1 genoemd omdat dit het eerste connexine was van de  $\alpha$ -subklasse [25, 32]. De verdeling op basis van moleculair gewicht is het meest gebruikte systeem om de

verschillende connexines te classificeren [25], deze nomenclatuur zal dan ook verder gebruikt worden.

### 1.3.2 *CONNEXINE HEMIKANALEN OF CONNEXONS*

Recent werd duidelijk dat connexine hemikanalen meer zijn dan slechts de voorlopers van gap juncties. Hemikanalen komen voor in de plasmamembraan van verschillende celtypen, waar ze functioneren als transmembranaire kanalen. Er wordt verondersteld dat hemikanalen gesloten blijven gedurende het merendeel van de tijd en dat de opening kan geïnitieerd worden door verschillende stimuli, zoals lage extracellulaire  $\text{Ca}^{2+}$  concentraties, membraan depolarisatie, mechanische stress en activatie van purinerge receptoren [25]. Ook andere signalen of condities, zoals cytoplasmatische veranderingen in  $\text{Ca}^{2+}$ , verandering in fosforylatie en redox status, reactive oxygen species (ROS), nitrosylatie van het connexine eiwit, ischemie/hypoxie en bepaalde connexine mutaties kunnen de opening van connexine hemikanalen induceren [9, 26].

Het openen van de hemikanalen zal de influx van substanties kleiner dan 1-1.5 kDa toelaten (zoals  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^{2+}$ ), alsook de lekkage van essentiële metabolieten zoals nicotinamide adenine dinucleotide ( $\text{NAD}^+$ ), adenosine trifosfaat (ATP), glutamaat, prostaglandines, glutathione en  $\text{IP}_3$  [26].

Connexine hemikanalen spelen een belangrijke rol bij de vorming van een porie tussen het intracellulaire en extracellulaire milieu en zijn bovendien betrokken in een aantal cellulaire processen, zoals de propagatie van  $\text{Ca}^{2+}$  golven. In dit proces wordt ATP vrijgesteld door hemikanalen in de extracellulaire ruimte en activeert P2Y purinerge receptoren op de cel zelf (autocriene signalisatie) en op naburige cellen (paracriene signalisatie) [25, 26, 33]. Deze ligand-receptor binding resulteert in een gestegen cytosolische productie van  $\text{IP}_3$  wat op zijn beurt de intracellulaire  $\text{Ca}^{2+}$  concentratie doet stijgen. Dit laatste laat dan paracriene vrijstelling van ATP toe, waardoor de propagatie van de  $\text{Ca}^{2+}$  golf van cel naar cel bevordert wordt [25].

### 1.3.3 *GAP JUNCTIES*

GJs kunnen beschreven worden als intercellulaire, membraanbare kanalen die typisch voorkomen in groepen aan het membraanoppervlak, de zogenaamde 'plaques' [25, 26] en hebben een poriediameter van ongeveer 6.5-15 Å [24, 26]. Ze zorgen bovendien voor het

doorgeven van intercellulaire signalen en zijn daarnaast ook essentieel voor de propagatie van elektrische impulsen in exciteerbare weefsels [9, 27, 28, 34, 35].

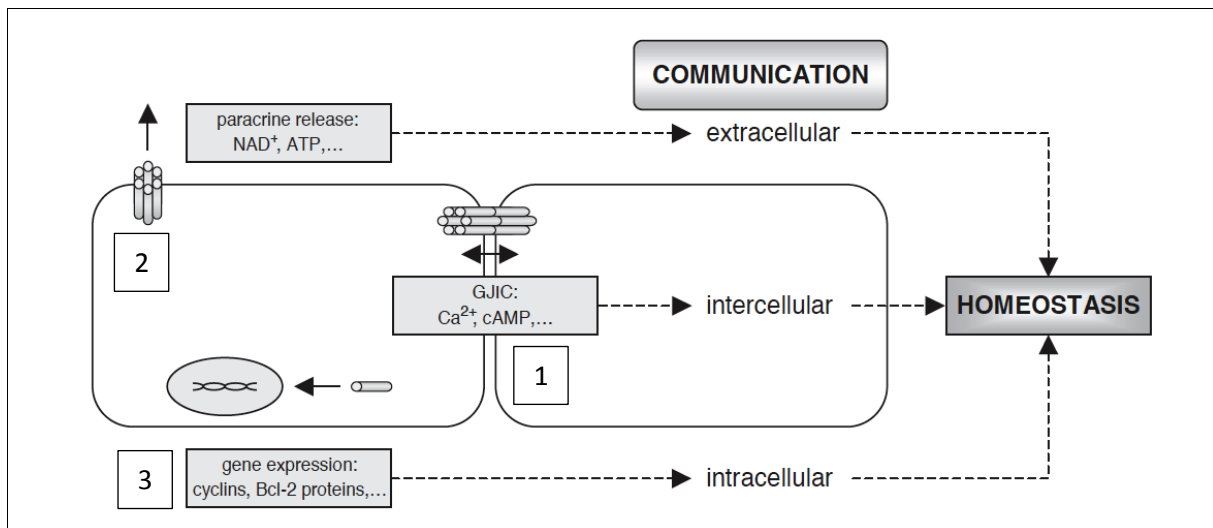
Voorts kan de stroom van moleculen doorheen de kanalen beschreven worden als de gap junctionele intercellulaire communicatie (GJIC) en omvat de passieve diffusie van kleine (<1 – 1.5 kDa) en hydrofiele moleculen, zoals metaboliëten (ATP), voedingsstoffen (glucose) en boodschappermoleculen (IP<sub>3</sub> en Ca<sup>2+</sup>). Hierdoor kan de gap junctionele activiteit gezien worden als een sleutelmechanisme in de controle van de homeostase [9, 25].

Het openen en sluiten (gating) van GJs wordt gecontroleerd door een aantal factoren. De belangrijkste factoren hierbij zijn: transmembranaire elektrische spanning over de plasmamembraan, transjunctionele elektrische spanning over de GJs, Ca<sup>2+</sup> en de fosforylatiestatus. Tijdens het openen zullen de extracellulaire lussen met elkaar interageren en zo een functionele GJ vormen [9].

#### 1.4 CONNEXINE KANALEN EN CELDOOD

Celdood wordt niet enkel bepaald door de wisselwerking tussen extracellulaire en intracellulaire signalen, maar wordt ook beïnvloed door intercellulaire communicatieve netwerken, zoals GJs en connexine hemikanalen [9]. GJs zullen hierbij het cytoplasma van de naburige cellen direct met elkaar in contact brengen, terwijl hemikanalen gepositioneerd zijn als poriën die het cytoplasma verbinden met de extracellulaire zijde [9]. Hemikanalen kunnen hierbij beschouwd worden als potentiële toxische poriën [9], die de homeostatische balans kunnen beïnvloeden onafhankelijk van de gap junctionele intercellulaire communicatie (GJIC) [25] en zo een mogelijke rol spelen in het celdoodproces [3].

Connexines en hun kanalen zijn betrokken in celgroei en celdood op 3 manieren (Figuur 7). Ten eerste mediëren gap juncties directe intercellulaire uitwisseling van celgroei- en celdoodsignalen (1). Ten tweede voorzien connexine hemikanalen pathways voor de extracellulaire vrijstelling van ATP en NAD<sup>+</sup> (2) en ten derde kunnen connexine eiwitten dienen als intracellulaire boodschappers die de genexpressie van eiwitten op gang brengen, welke betrokken zijn in de regulatie van celgroei en celdood (3) [25]. Connexines kunnen dus gezien worden als platformen voor multipole cellulaire signaal cascades, die de homeostatische balans controleren. Homeostatisch onevenwicht wordt hierbij dikwijls geassocieerd met de disregulatie van connexines en hun kanalen [25].



**Figuur 7: Mechanismen betrokken in connexine-gerelateerde communicatie.** Connexines en hun kanalen controleren de cellulaire homeostatische balans via 3 communicatieve netwerken. (1) *Intercellulaire communicatie (GJIC)*: gap junctie gemedieerde doorlating van signaalmoleculen tussen cellen. (2) *Extracellulaire communicatie*: hemikanalen controleren de paracrine vrijstelling van cellulaire metabolieten. (3) *Intracellulaire communicatie*: connexine eiwitten beïnvloeden de genexpressie van homeostase regulerende eiwitten [25].

#### 1.4.1 GAP JUNCTIES EN CELDOOD

Communicatie via GJs is frequent de oorzaak van het doorgeven van celdood tussen stervende cel en een gezonde naburige cel. De initiële fasen van apoptose vereisen GJIC. De aanzet van apoptose is over het algemeen geassocieerd met drastische veranderingen in  $\text{Ca}^{2+}$  concentratie, een ion dat intercellulair wordt doorgegeven via GJs. Hierdoor worden deze ionen gezien als de ‘killing messengers’, welke de signalen voor het sterven van de cel doorgeven van cel naar cel [25]. Er blijkt bovendien een tweerichtingsverkeer te zijn tussen (vroege) apoptotische en niet-apoptotische cellen. Afhankelijk van de balans kunnen er twee tegenovergestelde biologische effecten bereikt worden, namelijk: celdood of celoverleving [9, 25].

$\text{Ca}^{2+}$  wordt voorgesteld als de belangrijkste boodschapper van celdood namelijk de ‘master in celdood’. Deze molecule is betrokken in de regulatie van een groot aantal cellulaire processen, zoals genexpressie, secretie, proliferatie, fertilisatie, ontwikkeling, contractie en celdood. Op elk moment wordt het niveau van het intracellulaire  $\text{Ca}^{2+}$  gereguleerd door een evenwicht tussen de ‘aan’ reacties die  $\text{Ca}^{2+}$  introduceren in het cytoplasma en de ‘uit’ reacties waardoor deze signalen worden verwijderd door een gecombineerde actie van buffers, pompen en uitwisselaars. Ondanks de gecontroleerde stijging in intracellulair  $\text{Ca}^{2+}$  door vrijstelling vanuit intracellulaire opslagplaatsen en influx vanuit de extracellulaire omgeving,

welke onmisbaar zijn voor de  $\text{Ca}^{2+}$  signalisatie, zal de aangehouden hoge intracellulaire  $\text{Ca}^{2+}$  concentratie aanleidingen geven tot celdood, zowel via necrose als apoptose [26]. In dit opzicht zal het patroon van  $\text{Ca}^{2+}$  veranderingen bepalen of er celdood (langdurige  $\text{Ca}^{2+}$  verandering) of cel overleving ( $\text{Ca}^{2+}$  schommelingen) optreedt. Bovendien kunnen deze intracellulaire  $\text{Ca}^{2+}$  veranderingen doorgegeven worden als een golf van cel naar cel, welke zal bijdragen tot de onstabiele van de  $\text{Ca}^{2+}$  signalisatie [26].

Latere studies hebben aangetoond dat een ander niet-gekoppeld, paracrien mechanisme ook zal bijdragen tot de voortplanting van de  $\text{Ca}^{2+}$  golven, namelijk: connexine hemikanalen [26].

#### 1.4.2 *CONNEXINE HEMIKANALEN EN CELDOOD*

Hemikanalen, de helft van een GJ, zijn functionele kanalen die gecontroleerd worden door verschillende extracellulaire en intracellulaire signalen. Deze signalen zorgen voor een unieke pathway voor transport en signalering. Veel van deze signalen, welke de opening van hemikanalen reguleren, zijn ook betrokken in signaalcascades die aanleiding geven tot celdood, zoals cytoplasmatische  $\text{Ca}^{2+}$  veranderingen en oxidatie of nitrosylatie reacties. De opening van hemikanalen kan bovendien helpen in het proces van celdood door het veroorzaken van membraandepolarisatie, een plotse val in ionische gradiënten, verlies van kleine metabolieten en stijging van de cytoplasmatische  $\text{Ca}^{2+}$  concentratie [9].

Verlengde opening van connexine hemikanalen, veroorzaakt door condities zoals metabolische inhibitie, kan bijdragen tot celdood. Doordat hemikanalen de extracellulaire vrijstelling van essentiële metabolieten controleren kan hun ongepaste activatie een onevenwichtigheid van ionische gradiënten veroorzaken wat op zijn beurt de propagatie van celdood zal versnellen [25].

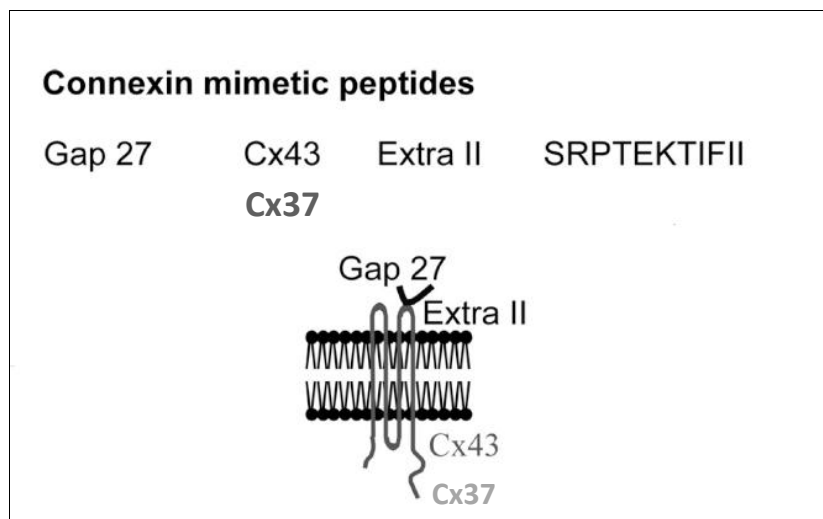
Hemikanalen hebben een lage kans op openen onder normale omstandigheden om verlies van ionen, metabolieten en nutritionele moleculen te vermijden, wat aanleiding zou kunnen geven tot celdood. Er bestaan ten minste 4 mechanismen waarbij hemikanalen een effect kunnen uitoefenen op celdood of celoverleving: (1) via vrijstelling van paracriene celdoodmoleculen, (2) via opname of vrijstelling van respectievelijk toxische of essentiële moleculen, (3) als een signaaltransductie pathway of (4) via een effect op de mitochondriën [26].



## 1.5 CONNEXINE MIMETISCHE PEPTIDEN

Celdoodsignalen kunnen mogelijks worden tegengegaan door het gebruik van connexine mimetische peptiden. Dit zijn peptiden welke identiek zijn aan een korte aminozuursequentie van een connexine eenheid [30]. Ze hebben de eigenschap dat ze connexine kanalen snel en reversibel kunnen inhiberen en kunnen binden op connexine hemikanalen. Dit zal de kanaaleigenschappen beïnvloeden zoals een verlaging van de elektrische geleidbaarheid en een potentiële blokkering van de doorgang van kleine moleculen en de vrijstelling van ATP door cellen [29, 36].

Gap27 is een connexine mimetisch peptide dat een sequentie (SRPTEKTIFII) heeft dat identiek is aan de tweede extracellulaire loop van Cx37 en Cx43 (Figuur 8) [30, 36]. De geselecteerde sequentie bevat een sterk geconserveerd domein waarmee Gap27 correspondeert, namelijk SRPTEK, en is aanwezig in de meeste connexines [30]. Binding van Gap27 zal de intercellulaire communicatie van GJs verminderen door bepaalde cruciale extracellulaire loop sequenties te simuleren en heel vroeg te interageren met connexine hemikanalen in de plasmamembraan. Op deze manier zullen ze de aaneenhechting van connexine hemikanalen verhinderen en de hoeveelheid functionele GJs verminderen [29]. Gap27 zal bij korte incubatie (orde van minuten) connexine hemikanalen inhiberen en bij lange incubatie (orde van uren) zullen ook de GJs geblokkeerd worden [30, 36].



**Figuur 8:** Connexine mimetisch peptide Gap27. Gap27 bestaat uit 11 aminozuren en bootst een sequentie na op de twee extracellulaire loop van Cx37 en Cx43 die de geconserveerde sequentie SRPTEK bevatten [37].

Een mogelijke verklaring voor het verschil in incubatietijd kan toegeschreven worden aan het feit dat bij connexine hemikanalen, die nog niet werden geïncorporeerd in GJs, de extracellulaire lussen beschikbaar zijn voor interactie met mimetische peptiden. Hierbij zullen korte incubatietijden voldoende zijn voor de blokkering van de kanalen. In het geval van GJs zijn de extracellulaire lussen van de connexine eenheden gekoppeld aan de lussen van de tegenoverliggende connexine eenheden. Hierdoor zijn de extracellulaire lussen minder toegankelijk voor interacties met exogene mimetische peptiden en zijn langere incubatietijden noodzakelijk voor de blokkering [37].

## 1.6 DOELSTELLING EN BELANG VAN HET ONDERZOEK

Vasculaire greffes worden frequent gebruikt bij het plaatsen van een coronaire bypass en bij lidmaatschemie. Literatuur toont echter aan dat een groot deel van de cellen, aanwezig in vasculaire cryogepreserveerde greffes, te maken heeft met celdood. Omdat deze celdood een nefaste invloed heeft op de revascularisatie bij cardiovasculaire aandoeningen en op de levensduur van de greffes is de nood aan verbeterde vasculaire greffes sterk gestegen [6].

In deze studie zal onderzocht worden of connexine mimetische peptiden, door het blokkeren van de connexine kanalen, celdood kunnen verminderen. Om deze celdood in vasculaire greffes na te gaan zal de TUNEL-methode gebruikt worden, een kleuring die voornamelijk apoptose zal detecteren.

## 2. MATERIALEN EN METHODEN

### 2.1 CRYOPRESERVATIE

Personen tussen 18-65 jaar komen in aanmerking voor het donoren van vasculaire greffes. In deze studie bedraagt de gemiddelde leeftijd 46 jaar.

De bloedvaten (arteria femoralis en vena safena magna) worden 's nachts gepreleveerd en 's ochtends op de weefselbank in Hank's buffered salt solution-Hepes (HBSS-Hepes) (0,81 mM  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,95 mM  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 137 mM NaCl, 0,18 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 5,36 mM KCl, 0,44 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 5,55 mM D-glucose en 25 mM Hepes (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine-ethaansulfonzuur (pH 7,4)) afgeleverd. De arteria femoralis en de vena safena magna worden op de weefselbank cryogepreserveerd als volgt: van elke arterie/vene worden 2 (*studie 1*) of 3 (*studie 2*) stukjes van +/- 1cm genomen, in een cryotube geplaatst met 15% DMSO (Dimethylsulfoxide) en HBSS-Hepes (controle) of 15 % DMSO, HBSS-Hepes en 200  $\mu\text{M}$  Gap27. Na deze behandeling worden de weefsels 2 weken bewaard in een isomobox in een  $-80^\circ\text{C}$  diepvriezer voor graduele cryopreservatie waarna ze zullen bewaard worden in vloeibare stikstof ( $\text{N}_2$ ,  $-196^\circ\text{C}$ ).

### 2.2 ONTDOOIEN EN PARAFFINE

De cryotube met het bloedvat wordt ontdooid au bain-marie in een warmwaterbad. Het bloedvat wordt vervolgens onder aseptische omstandigheden overgebracht in recipiënt 1 dat naast HBSS-Hepes ook 10 % DMSO bevat. Vervolgens zal het na 4 minuten overgebracht worden in recipiënt 2 (5 % DMSO), 3 (2.5 % DMSO) en 4 (geen DMSO) met telkens 4 minuten incubatietijd. In deze verschillende stappen wordt het DMSO er gradueel uitgewassen mét of zonder toevoeging van Gap27.

In een *eerste studie* zullen de bloedvaten, ingevroren in het controle medium, na het ontdooien ook gradueel uitgewassen worden onder controle condities (zonder toevoeging van Gap27) terwijl er bij de andere groep Gap27 zal toegevoegd worden. Hier verblijven de bloedvaten steeds in dezelfde omstandigheden wanneer ze ingevroren en uitgewassen worden (Figuur 9). Als controle voor de werking van Gap27 zullen ook een aantal bloedvaten ingevroren en uitgewassen worden met scrambled Gap27. Hierbij wordt er geen effect verwacht op de reductie in celdood.

In een *tweede studie* daarentegen zullen de invries- en uitwasprocedures aangepast worden. Het eerste bloedvat, ingevroren in het controle medium, zal hierin ook gradueel uitgewassen worden en zal dienen als algemene controle. Een tweede bloedvat, ingevroren in controle medium, zal uitgewassen worden in medium met Gap27 en een derde bloedvat, ingevroren met Gap27, zal uitgewassen worden in het controle medium (Figuur 9). Deze tweede studie zal dienen om na te gaan wanneer Gap27 het meest efficiënt celdood zal reduceren.

### Studie 1

<u>Invriezen</u>	<u>Gradueel uitwassen</u>
Controle	Controle
Gap27	Gap27

### Studie 2

<u>Invriezen</u>	<u>Gradueel uitwassen</u>
Controle	Controle
Controle	Gap27
Gap27	Controle

**Figuur 9:** Invries- en uitwasprocedure bij studie 1 en 2. In de *eerste studie* verblijven de bloedvaten tijdens het invriezen en het gradueel uitwassen steeds in dezelfde conditie. Bloedvaten ingevroren in controle omstandigheden worden hierin ook uitgewassen. Hetzelfde gebeurt voor bloedvaten ingevroren met Gap27. In een *tweede studie* daarentegen zullen er andere invries- en uitwasprocedures toegepast worden. Een eerste bloedvat zal continu in controle omstandigheden gehouden worden en zal dienen als algemene controle. Bij een tweede en derde bloedvat zal Gap27 respectievelijk enkel tijdens het uitwassen of enkel tijdens het invriezen toegevoegd worden.

Nadien worden de bloedvaten 24 uur geïncubeerd in neutraal gebufferde formol 4 %.

Om met de lichtmicroscopie gevisualiseerd te kunnen worden dienen de weefsels in dunne coupes gesneden te worden zodat de lichtbundel kan worden doorgelaten. Alvorens men de weefsels kan snijden dienen ze echter eerst ontwaterd en ingebed te worden. Inbedden is het inbrengen van een weefsels in een stof, een inbedmiddel, dat in het weefsel binnendringt en vervolgens verhardt zodat het mogelijk wordt het weefsel te snijden. Daar inbedmiddelen meestal hydrofoob zijn en het weefsel veel water bevat, dienen de weefsels eerst ontwaterd te

worden. Ontwateren gebeurt door de weefsels over te brengen in een stijgende reeks alcoholbaden: alcohol 30%, alcohol 50%, alcohol 70%, alcohol 96%, isopropanol, toluol/isopropanol, toluol. De verdunningen alcohol 30%, 50%, 70% worden zelf gemaakt gebruik makende van gedestilleerd alcohol 96% (Fiers, Kuurne, België) en gedestilleerd water of aquadest. Isopropanol en toluol zijn als dusdanig beschikbaar (Fiers, Kuurne, België). Het mengsel toluol/isopropanol wordt bereid in een verhouding 1/1. De bloedvaten worden in elk van de alcoholbaden 1 uur overgebracht, met uitzondering van de laatste stap, toluol, waar het bloedvat slechts 30 minuten moet ingebracht worden. Na de ontwatering worden de fragmenten ingebed in paraffine (Prosan, Merelbeke, België). De paraffine wordt eerst vloeibaar gemaakt in een oven van 56°C zodat plastic cupjes gevuld kunnen worden met de paraffine, waarna het fragment erin kan gebracht worden. Deze cupjes worden vervolgens overnacht in de oven geplaatst zodat de toluol, die eventueel nog in de openingen van bloedvaten zit, volledig kan verdampen. De volgende dag worden de fragmentjes georiënteerd in de cupjes en in een koelkast met een temperatuur van 4°C geplaatst zodat de paraffine kan verharden. Met het oriënteren van de bloedvaten wordt bedoeld dat de opening van het bloedvat evenwijdig met de onderkant van het cupje wordt geplaatst. Dit maakt het eenvoudiger om later het blokje paraffine correct op het houten blokje te plaatsen zodat het bloedvat dwars gesneden kan worden. Wanneer de paraffine verhard is kunnen 5 µm dunne coupes gesneden worden. De cupjes worden eerst opengebroken, indien mogelijk wordt overtollige paraffine rond het bloedvat verwijderd en de resulterende blokjes paraffine met daarin het fragment worden op houten blokjes gemonteerd. Hiertoe smelt men de onderrand van het blokje paraffine even waarna het op het houten blokje aangedrukt wordt. Dit houten blokje, met daarop het fragment ingebed in paraffine, kan dan gemonteerd worden op de microtoom (Draai microtoom Reichert Jung type 2040, Depew, New York, USA) waarna er dwarse doorsneden van de bloedvaten kunnen gesneden worden. De weefselcoupes worden vervolgens op draagglaasjes (Klinipath, Duiven, Nederland) gebracht en 24 uur in een oven op 37°C geplaatst.

Voor aanvang van elke kleuring zullen de paraffinecoupes eerst gedeparaffineerd worden. Dit gebeurt door ze achtereenvolgens verschillende baden te laten doorlopen: toluen 1, toluen 2, toluen 3, isopropanol, alcohol 96%, alcohol 70%, spoelen van de preparaten en in gedestilleerd water brengen. Nadien zijn de weefselcoupes klaar om gekleurd te worden.

### 2.3 IMMUNOFLUORESCENTIE KLEURING

De aanwezigheid van Cx37, Cx40 en Cx43, alsook de lokalisatie ervan, kan nagegaan worden aan de hand van een immunokleuring. Voor aanvang van de immunokleuring zullen de paraffinecoupes gedeparaffineerd worden en vervolgens 20 minuten rusten in H<sub>2</sub>O. Nadien zullen de preparaten ondergedompeld worden in 'antigen retrieval solution'. Deze oplossing wordt gemaakt door 2.34 mL 'Antigen Unmasking Solution'(Vector Labs, Labconsult, Brussel, België), bewaard in de koelkast op 4°C, te mengen met 250 mL H<sub>2</sub>O. Wanneer deze oplossing gemaakt is worden de preparaten in een rekje geplaatst en 11 minuten in de microgolfoven opgewarmd. Deze voorbehandeling zal ervoor zorgen dat de aanwezige antigenen opnieuw aan het oppervlak komen. Na het opwarmen worden de preparaten in het rekje 30 minuten afgedekt in de koelkast geplaatst (4°C).

Na deze voorbehandeling worden de preparaten geïncubeerd met blokkingsbuffer (50 mg bovine serum albumin (BSA, Sigma, Bornem, België), 500 µL bovine skin gelatin (Sigma, Bornem, België), 25 µL Triton X-100 in 9 mL PBS) gedurende een half uur op kamertemperatuur. Deze stap zal er voor zorgen dat de aspecifieke binding van antilichamen voorkomen wordt. Tijdens deze incubatie wordt het primaire antilichaam (anti-Cx 37,40 of 43 konijn antilichaam, respectievelijke verdunningen: 1/100, 1/10 en 1/250) verdund in deze blokkingsbuffer waarna het primaire antilichaam op de coupes gebracht wordt en deze overnacht in de koelkast geplaatst worden. De volgende dag worden deze eerst drie maal gewassen met PBS en vervolgens geïncubeerd (2 uur) met een fluorescent secundair antilichaam (Alexa 594 geconjugeerd geit-anti-konijn IgG antilichaam, verdunning: 1/500, Sigma). Tot slot worden de coupes drie maal gewassen met PBS. Om de connexines te kunnen lokaliseren worden de celkernen gekleurd met 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Vector Labs, Labconsult, Brussel, België). De preparaten worden zodoende gemonteerd met Vectashield en DAPI en de coupes kunnen bekeken worden onder de omgekeerde epifluorescentiemicroscoop met een x 20 lens. Ter controle worden eveneens bloedvaten enkel met het secundair antilichaam geïncubeerd om eventuele aspecifieke binding na te gaan en dit gaf geen aankleuring. De beelden worden opgenomen met een tetramethyl-rhodamine-isothiocyanaat filter (TRITC, excitatiemaximum bij 556 nm en emissiemaximum bij 575 nm).

## 2.4 HAEMATOXILINE-EOSINE KLEURING

### Protocol:

Wanneer de coupes gesneden zijn wordt op de eerste coupe telkens een haematoxiline-eosine (HE)- kleuring uitgevoerd (Tabel 1). Deze kleuring wordt hier gebruikt om het al dan niet afscheuren van de tunica intima te detecteren.

**Tabel 1: Verloop haematoxiline-eosine kleuring.** Opeenvolgende baden die doorlopen worden bij het uitvoeren van een HE-kleuring met de respectievelijke incubatietijden.

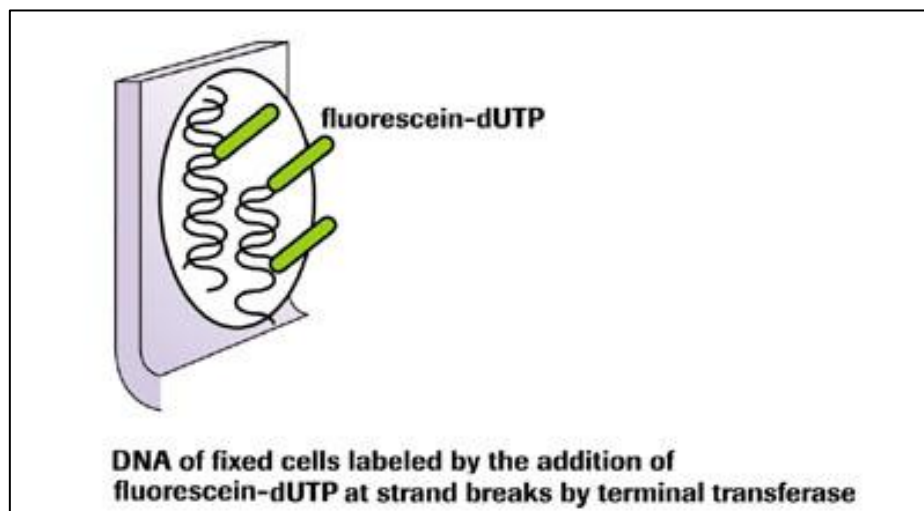
Bad 1	tolueen	5'	Bad17	bluing reagent	1'
Bad2	tolueen	5'	Bad29	leidingwater	1'
Bad3	tolueen	5'	Bad19	aqua dest.	1'
Bad4	isopropanol	2'	Bad18	eosine+phloxine	30''
Bad5	isopropanol	2'	Bad29	leidingwater	2'
Bad6	alcohol 96%	2'	Bad20	alcohol 96%	2'
Bad7	alcohol 96%	2'	Bad21	alcohol 96%	2'
Bad29	leidingwater	2'	Bad22	isopropanol	2'
Bad19	aqua dest.	1'	Bad8	isopropanol	2'
Bad15	haematoxiline	15''	Bad9	tolueen	2'
Bad29	leidingwater	2'	Bad23	tolueen	2'
Bad16	clarifier I	1'	Bad38	tolueen	1'
Bad29	leidingwater	1'			

Na het doorlopen van deze verschillende baden worden de preparaten afgedekt met Mounting Medium (Prosan, Merelbeke, België) en kunnen ze bekeken worden onder de lichtmicroscop.

## 2.5 TUNEL-KLEURING

### Principe:

TUNEL of terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) -mediated deoxyuridinetrifosfaat (dUTP) nick end-labeling wordt gebruikt voor snelle identificatie en kwantificatie van de apoptotische celfractie in weefsels (Figuur 10) [38, 39]. DNA breuken, het target van de TUNEL, zijn aanwezig in alle cellen en zijn hoofdzakelijk verborgen door apoptotische DNA condensaties. Het succes van de TUNEL-methode komt voort uit het feit dat bij apoptose het aantal breuken verhoogd is [39]. Breuken in genomisch DNA tijdens apoptose zal dubbelstrengige, laag moleculair gewicht DNA fragmenten opleveren alsook enkelstrengige breuken (“nicks”) in hoog moleculair gewicht DNA. Deze breuken in de DNA strengen kunnen geïdentificeerd worden door de labeling van vrije 3’OH uiteinden met gemodificeerde nucleotiden in een enzymatische reactie. De TUNEL reactie zal bij voorkeur DNA breuken labelen die gegenereerd worden tijdens apoptose [40].



**Figuur 10: Principe TUNEL-kleuring.** De In Situ Cell Death Detection Kit Fluorescein is gebaseerd op de detectie van enkel en dubbelstrengige DNA breuken die ontstaan in vroege stadia van apoptose [40].

### Protocol:

Apoptose kan gedetecteerd worden aan de hand van een TUNEL-kleuring (Roche, Vilvoorde, België) [6]. Als voorbereiding op de TUNEL-kleuring, worden de paraffine coupes eerst gedeparaffineerd en gepermeabiliseerd met 0.1% Triton X-100 gedurende 8 minuten. Hierna

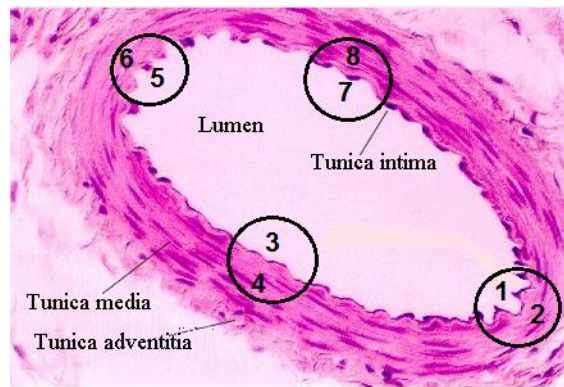


worden de coupes twee maal gewassen met PBS (Phosphate-buffered saline (PBS) (137 mM NaCl, 2,68 mM KCl, 1,47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 6,46 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O, pH 7.4) en worden vervolgens geïncubeerd op 37 °C met de TUNEL-reactiemengeling dat TdT (terminal deoxynucleotidyl transferase) bevat en fluoresceïn-dUTP. Gedurende deze incubatieperiode (1 uur, 37 °C) in een donkere en vochtige omgeving, katalyseert TdT het toegevoegde fluoresceïn-dUTP aan de vrije 3'-OH groepen in het enkel- en dubbelstrengig DNA. Tot slot worden de coupes drie maal gewassen met PBS.

Om de totale celpopulatie te meten wordt 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Vector Labs, Labconsult, Brussel, België), wat een blauwe kernkleuring is, gebruikt. De preparaten worden zodoende gemonteerd met Vectashield en DAPI en de coupes kunnen bekeken worden onder de omgekeerde epifluorescentiemicroscoop (Nikon TE300 epifluorescentie microscoop en Nikon DS-Ri1 camera (Nikon Belux, Zaventem, Belgium) met een x 20 lens (Plan Apo, NA 0.75 – Nikon). Voor de DAPI-kleuring wordt gebruik gemaakt van een filter met een excitatiemaximum bij 361 nm en een emissiemaximum bij 400 nm, terwijl bij de detectie van de TUNEL-kleuring een fluoresceïne-isothiocyanaat (FITC) filter gebruikt wordt met een excitatiemaximum bij 470 nm en een emissiemaximum bij 505 nm.

#### Kwantificatie:

Van elk bloedvat worden 5 paraffinecoupes gesneden waarbij er per coupe in 4 zones het aantal TUNEL positieve cellen (TUNEL<sup>+</sup>, groene kleuring) ten opzichte van de totale celpopulatie (zichtbaar door DAPI, blauwe kernkleuring) wordt geteld. Hierbij wordt telkens onderscheid gemaakt tussen de tunica intima en de tunica media waarin de apoptotische celindex, meer bepaald: percentage TUNEL<sup>+</sup> op DAPI positieve (DAPI<sup>+</sup>) cellen, zal bepaald worden. Op deze manier kan gekwantificeerd worden hoeveel celdood in het bloedvat aanwezig is (Figuur 11).



**Figuur 11: Kwantificatie van TUNEL-kleuring.** Er worden beeldjes genomen in 4 verschillende zones van het bloedvat waarbij telkens een beeld opgenomen wordt van de tunica intima (endotheel, subendotheliaal bindweefsel en lamina elastica interna) en van de tunica media (gladde spiercellen). Van elk beeldje wordt telkens een opname gemaakt van de DAPI-kleuring en een opname van de TUNEL-kleuring.

## 2.6 STATISTISCHE ANALYSE

Verkregen data worden uitgedrukt als gemiddelde  $\pm$  standaardfout (SEM), met  $n$  = aantal bloedvaten. Vervolgens wordt de Student's t-test gebruikt voor gepaarde experimenten waarbij een waarde van  $P < 0,05$  gezien wordt als statistisch significant. De statistische significantie wordt hierbij aangeduid met symbolen, waarbij \*, \*\* en \*\*\* staan voor respectievelijk  $P < 0,05$ ,  $P < 0,01$  en  $P < 0,001$ .

### 3. RESULTATEN

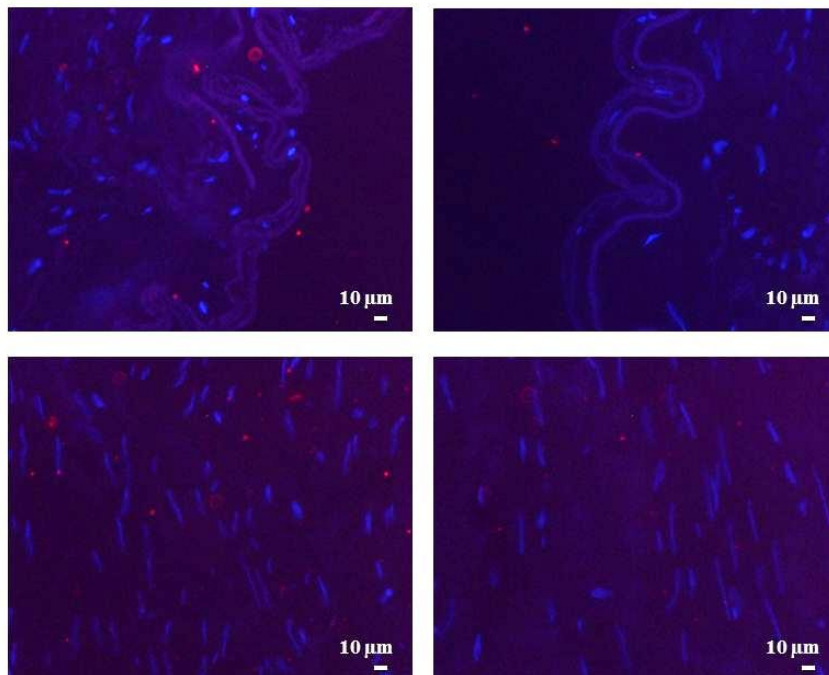
#### 3.1 Cx37, Cx40 EN Cx43 EXPRESSIE IN ARTERIA FEMORALIS EN VENA SAFENA MAGNA

De aanwezigheid van Cx37, Cx40 en Cx43 wordt nagegaan door middel van een immunokleuring. Hierbij wordt gebruik gemaakt van primaire anti-Cx37, Cx40 en Cx43 konijn antilichamen gevolgd door het secundaire geit-anti-konijn Alexa 594 geconjugeerd IgG antilichaam. Op deze manier wordt de Cx-expressie en de lokalisatie ervan in de bloedvaten nagegaan. De immunokleuring toont aan dat de drie vasculaire connexines aanwezig zijn in zowel de tunica intima als in de tunica media van arteriën en venen. Daarnaast worden er wel verschillen in expressiepatroon gezien tussen enerzijds arteriën en venen en anderzijds de tunica intima en media.

Cx37 wordt in deze studie bij de venen voornamelijk teruggevonden in de tunica intima, terwijl het bij de arteriën ongeveer gelijk verdeeld is tussen de twee lagen (Figuur 12).

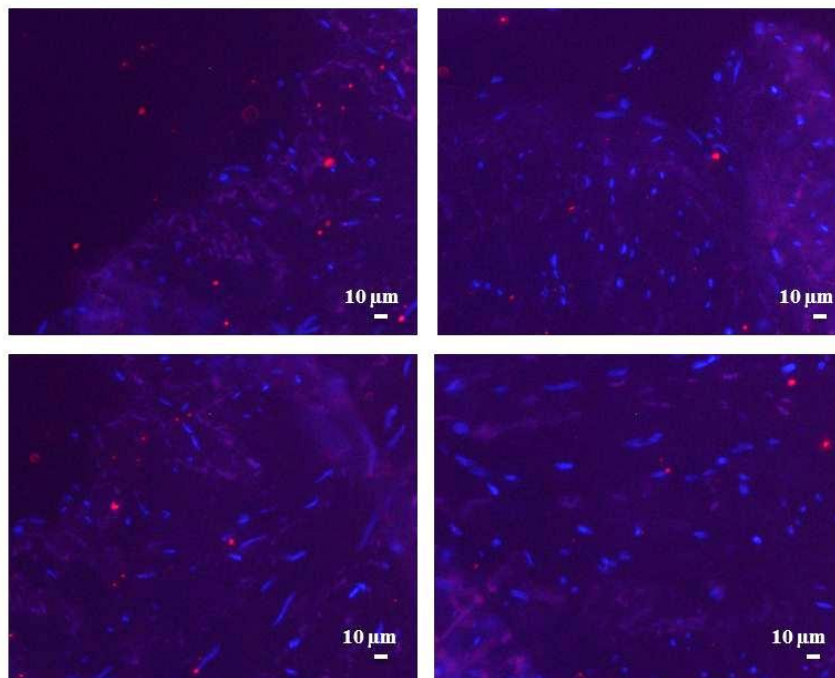
A

#### Cx37 - Arterie



**B**

### Cx37 - Vene

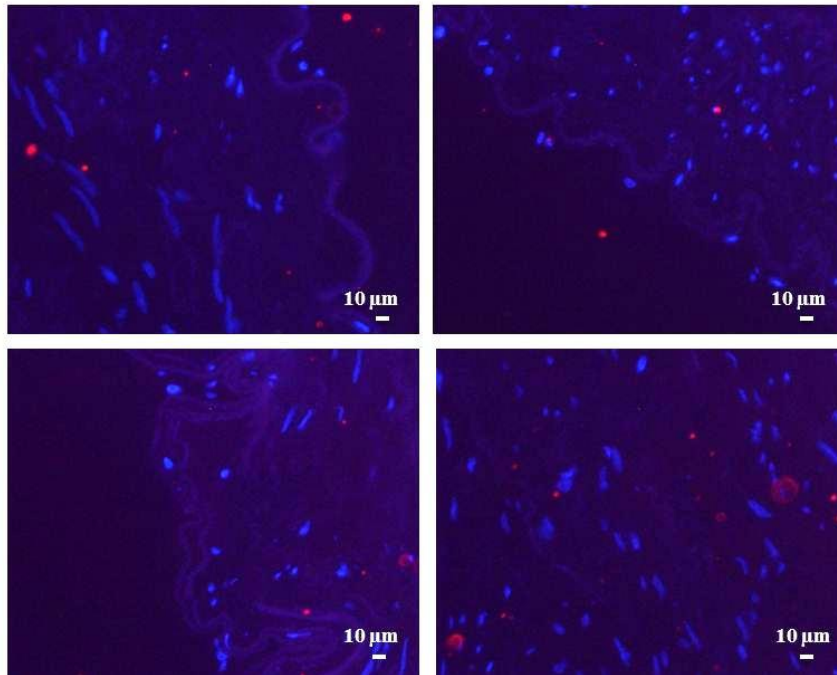


**Figuur 12: Immunokleuring van Cx37 in arteriën (A) als venen (B).** De expressie van Cx37 is bij de arteriën ongeveer gelijk verdeeld in de tunica intima en tunica media terwijl het bij de venen vooral voorkomt ter hoogte van de tunica intima (x 20 lens).

Voorts vertoont Cx40 een gelijkaardig expressiepatroon zowel in de venen en arteriën, als in de tunica intima en media (Figuur 13). De algemene expressie van Cx40 is echter wel kleiner dan de expressie van Cx37 in bloedvaten.

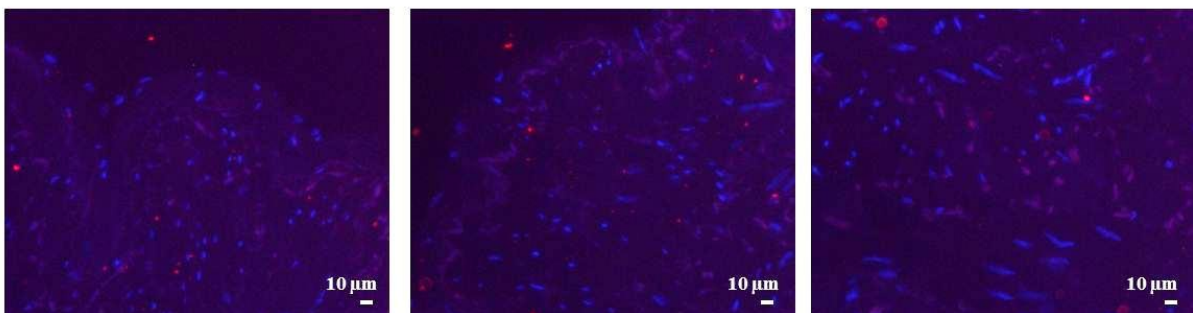
A

### Cx40 - Arterie



B

### Cx40 - Vene

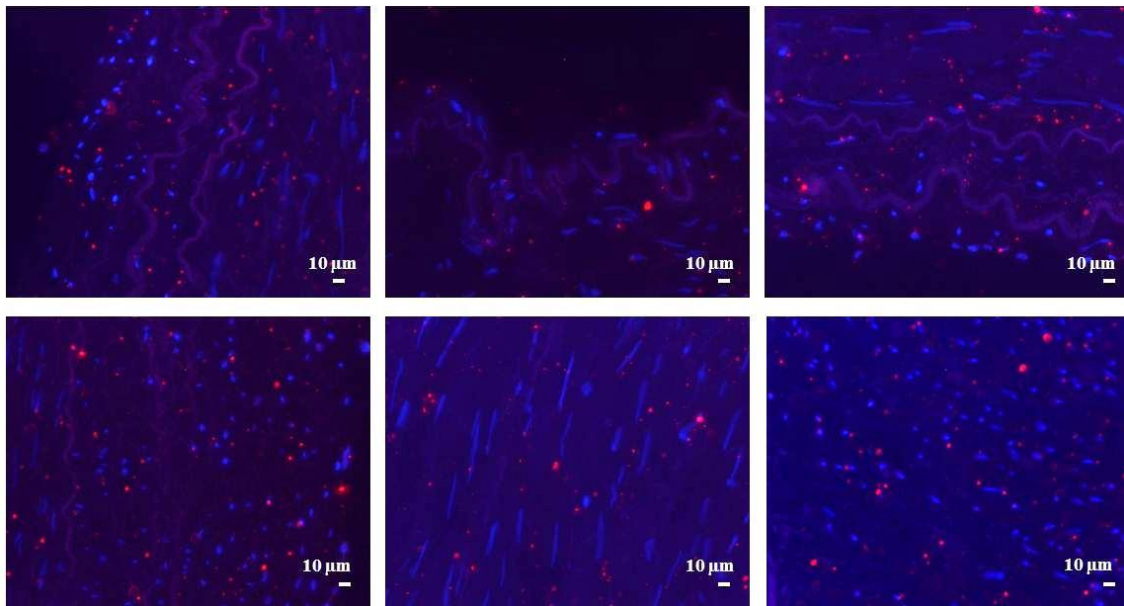


**Figuur 13: Immunokleuring van Cx40 in arteriën (A) als venen (B).** Cx40 expressie is in beide bloedvaten ongeveer gelijk aanwezig, alhoewel de algemene expressie van Cx40 kleiner is dan de expressie van Cx37 in bloedvaten. De Cx40 expressie in de tunica intima en tunica media is ongeveer gelijk verdeeld (x 20 lens).

Opvallend in deze kleuringen is dat beide connexines (Cx37 en Cx40) in geringere mate aanwezig zijn in vergelijking met Cx43. Dit connexine wordt vooral teruggevonden in de tunica media van de arteriën. Bij de venen is dit expressiepatroon minder uitgesproken (Figuur 14).

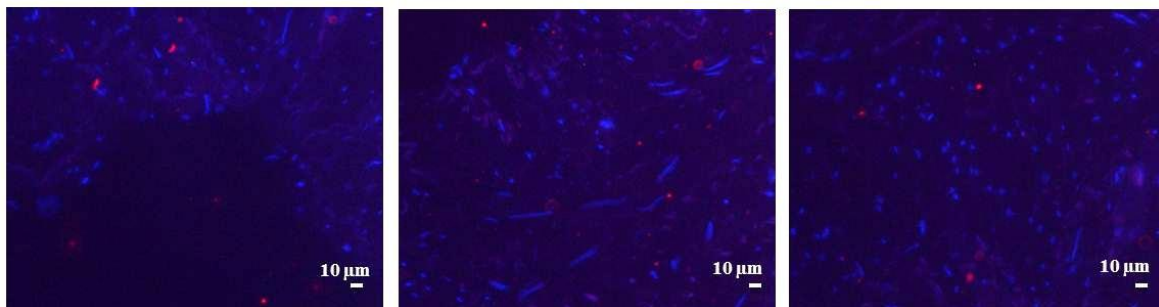
A

### Cx43 - Arterie



B

### Cx43 - Vene



**Figuur 14: Immunokleuring van Cx43 in arteriën (A) en in venen (B).** Deze kleuring toont aan dat Cx43 abundant aanwezig is in arteriën (A). Ook in de venen (B) komt het voor maar wel in mindere mate. Wanneer deze beelden vergeleken worden met Cx37 en Cx40 expressie kan gezegd worden dat dit connexine duidelijk meer aanwezig is in bloedvaten. Cx43 komt zowel voor in de tunica intima als in de tunica media maar er wordt toch een grotere expressie gezien ter hoogte van de tunica media (x 20 lens).

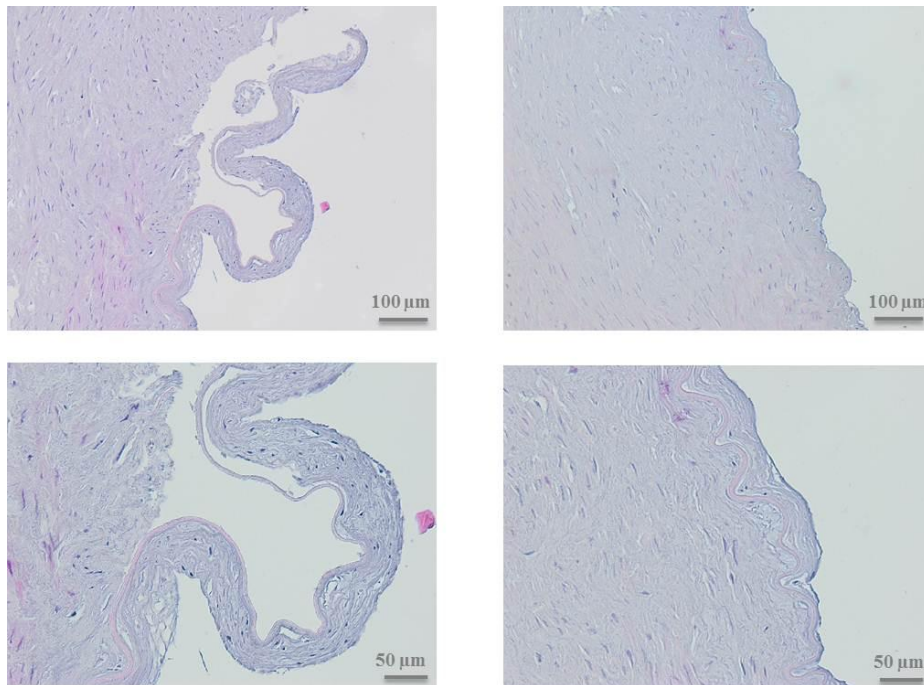
Uit deze immunokleuringen kan besloten worden dat de drie vasculaire connexines aanwezig zijn in zowel arteriën en venen, alhoewel het expressiepatroon van ieder connexine verschillend is. Zo komt Cx40 het minst voor in bloedvaten, gevolgd door Cx37. Als laatste vertoont Cx43 het grootste expressiepatroon in de bloedvaten.



### 3.2 MORFOLOGISCHE ANALYSE TUNICA INTIMA

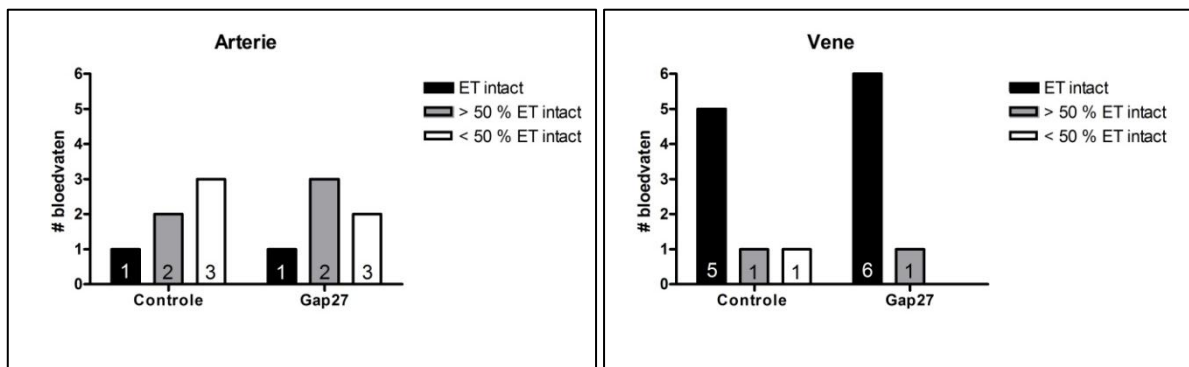
Morfologische analyse van de tunica intima met behulp van een HE-kleuring, toont aan dat arteriën een meer uitgesproken verlies hebben van de endotheliale omlijsting (Figuur 15) in vergelijking met venen. In zowel studie 1 als studie 2 is veel meer endotheelloslating te zien in de arteriën als in de venen (Figuur 16).

De connexine mimetische peptiden hebben hier geen uitgesproken effect op het al dan niet loskomen van het endotheel (Figuur 15, 16).

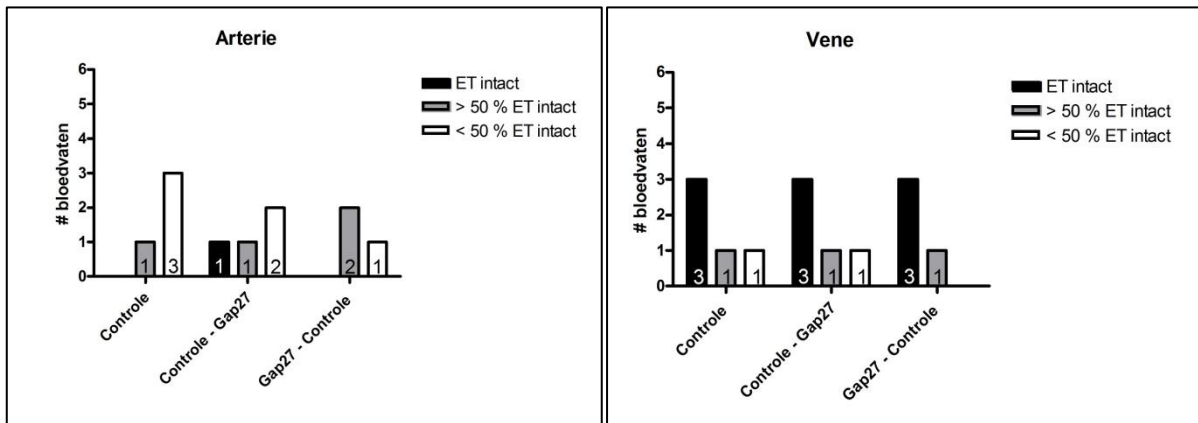


**Figuur 15: Loskomen van de endotheliale omlijsting in een arterie.** De beelden werden opgenomen met de virtuele microscoop, waarbij de twee bovenste beelden opgenomen werden met een x 10 lens en de onderste beelden met een x 20 lens. Linkerzijde: arterie geïncubeerd in controle medium, rechterzijde: zelfde arterie geïncubeerd met Gap27.

A



## B



**Figuur 16: Bloedvaten uit de eerste studie (A) en tweede studie (B).** Uit deze grafieken kan afgeleid worden dat er bij de arteriën een meer uitgesproken verlies is van de endotheliale omlijsting in vergelijking met de venen. Voorts kan hieruit geconcludeerd worden dat Gap27 geen effect heeft op het al dan niet loskomen van de tunica intima bij arteriën en venen in de eerste (A) en tweede studie (B). (ET: endotheelcellen + subendotheliaal bindweefsel of tunica intima, SMC: gladde spierlaag of tunica media)

### 3.3 STUDIE APOPTOTISCHE CELFRACTIE IN BLOEDVATEN

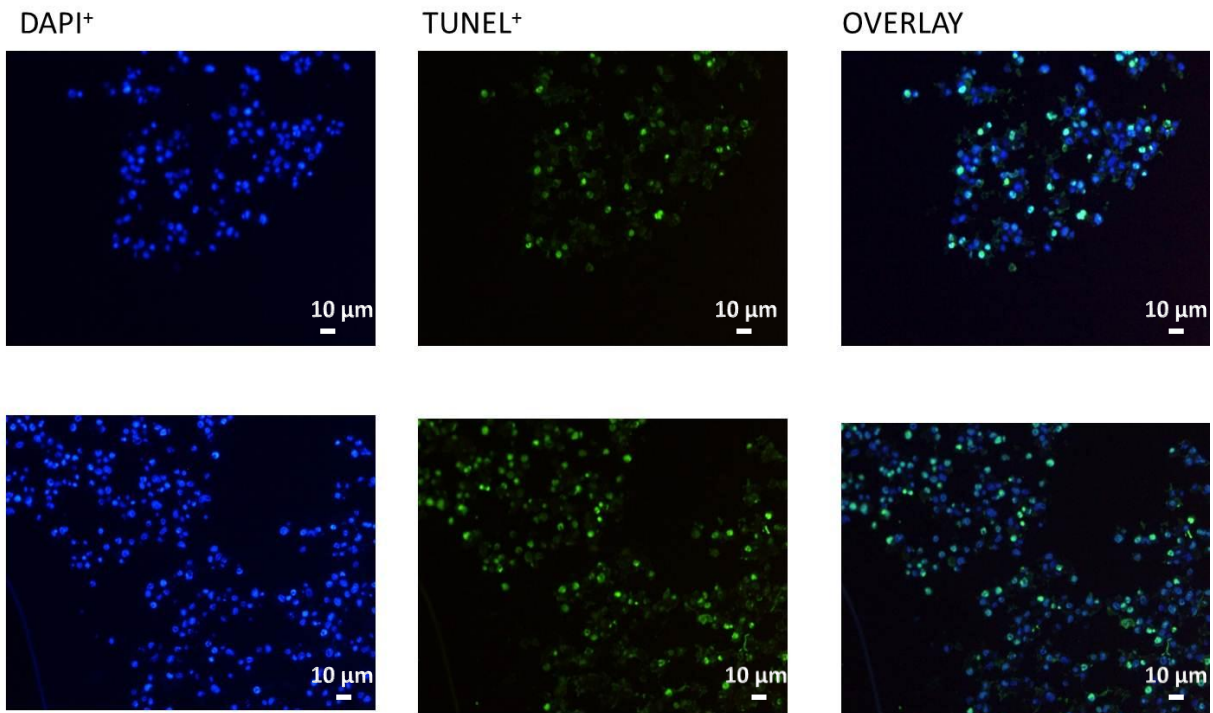
Na het cryopreserveren, het ontdooien, het inbedden in paraffine en het snijden van coupes kan een TUNEL-kleuring uitgevoerd worden op de bloedvaten. Deze kleuring zal een beeld geven over het aantal apoptotische cellen in de weefsels. Vooraleer van start te gaan met het uitvoeren van de TUNEL-kleuring, wordt de kleuring getest met behulp van een positieve controle. Hierbij wordt gebruik gemaakt van een pellet van C6-Cx43 cellen behandeld met staurosporine (2  $\mu$ M). Staurosporine (*Streptomyces staurospores*) is een niet-selectieve proteïne kinase inhibitor die frequent gebruikt wordt om apoptose te induceren [41]. Na incubatie met staurosporine wordt een positieve aankleuring verwacht met de TUNEL-reactiemengeling. Als negatieve controle wordt gebruik gemaakt van het solvent DMSO.

#### 3.3.1 VALIDATIE TUNEL-KLEURING

Cellen behandeld met staurosporine tonen een positieve aankleuring met de TUNEL-kleuring (Figuur 17A), terwijl experimenten met het solvent DMSO geen TUNEL-positieve aankleuring vertonen (Figuur 17B).

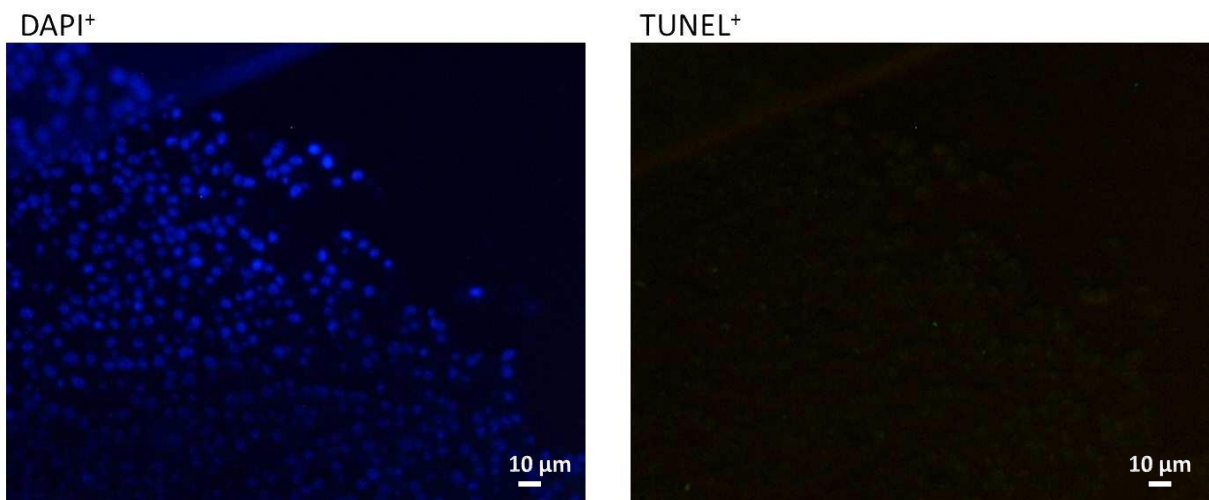


### Staurosporine cel pellet C6-Cx43



**Figuur 17A:** C6-Cx43 cel pellet behandeld met staurosporine. Uitvoering van de TUNEL-kleuring toont aan dat een groot deel van de cellen een apoptotische celdood ondergingen (x 20 lens).

### DMSO cel pellet C6-Cx43



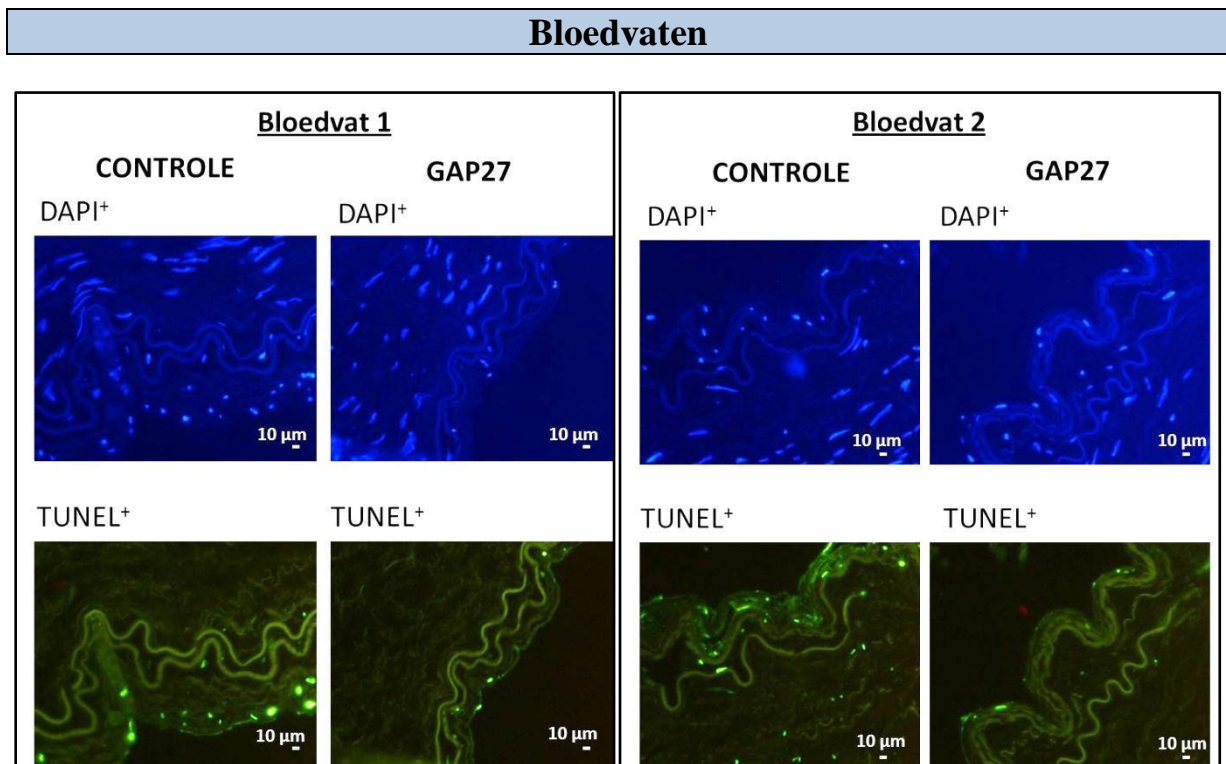
**Figuur 17B:** C6-Cx43 cellen behandeld met het solvent DMSO. Hierbij zullen de cellen, in tegenstelling tot cellen behandeld met staurosporine, geen apoptotische celdood ondergaan. Na het uitvoeren van de TUNEL-kleuring wordt geen aankleuring gezien (x 20 lens).

Uit deze studie kan besloten worden dat de TUNEL-kleuring een goede indicator is voor de apoptotische celfractie in weefsels.

### 3.3.2 BEPALEN APOPTOTISCHE CELINDEX

De TUNEL-kleuring wordt vervolgens verder toegepast op bloedvaten die ingebed zijn in paraffine, waarbij zal gekeken worden naar het aantal apoptotische cellen in de tunica intima (endotheelcellen + subendotheeliaal bindweefsel) en in de tunica media (gladde spiercellen). In deze *eerste studie* zullen alle bloedvaten in dezelfde omstandigheden, hetzij in controle conditie of met Gap27, ingevroren en gradueel uitgewassen worden.

Na de uitvoering van de TUNEL-kleuring worden beeldjes opgenomen met de omgekeerde epifluorescentiemicroscoop (Figuur 18). Na het opnemen van de beeldjes worden de cellen geteld waarbij gebruik gemaakt wordt van het programma *Image Dot Counter*. De apoptotische celindex wordt berekend door het aantal TUNEL<sup>+</sup> cellen te delen door het aantal DAPI<sup>+</sup> cellen.



**Figuur 18:** DAPI- en TUNEL-kleuring van twee verschillende arteriën. Incubatie met Gap27 vermindert het aantal TUNEL-positieve cellen (x 20 lens).

Zowel arteriën (a. femoralis) als venen (v. safena magna) worden gepreleveerd voor cryopreservatie in de weefselbank. Beide bloedvaten worden bekeken en vergeleken en er wordt een onderscheid gemaakt in tunica intima (endotheellaag + subendotheliale laag) als tunica media (gladde spierlaag). Vooreerst wordt er een grotere celdood gezien in de tunica

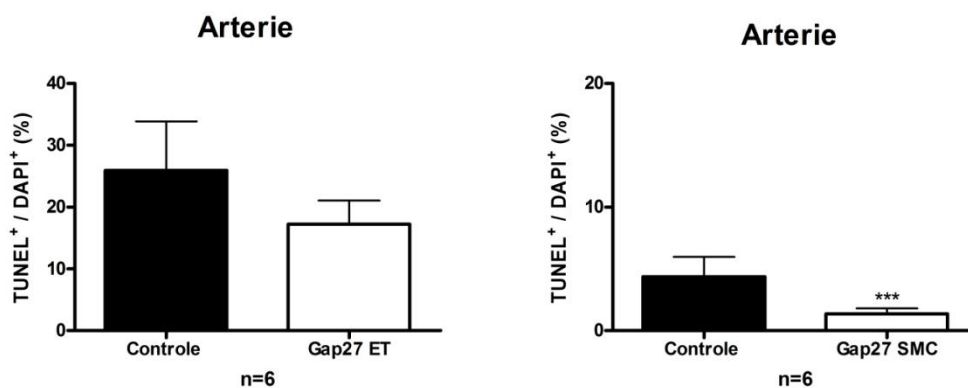
intima ( $19.87 \% \pm 5.05$ ) ten opzichte van de tunica media ( $5.10 \% \pm 1.54$ ) van de arteriën en venen samen.

Bij de arteriën wordt verder een grotere apoptotische celindex (i.e.  $\sim 25\%$ ) in de tunica intima waargenomen dan bij de venen (i.e.  $\sim 15\%$ ) (Figuur 19, 20). In de tunica media is er geen verschil in apoptotische celindex tussen beide bloedvaten.

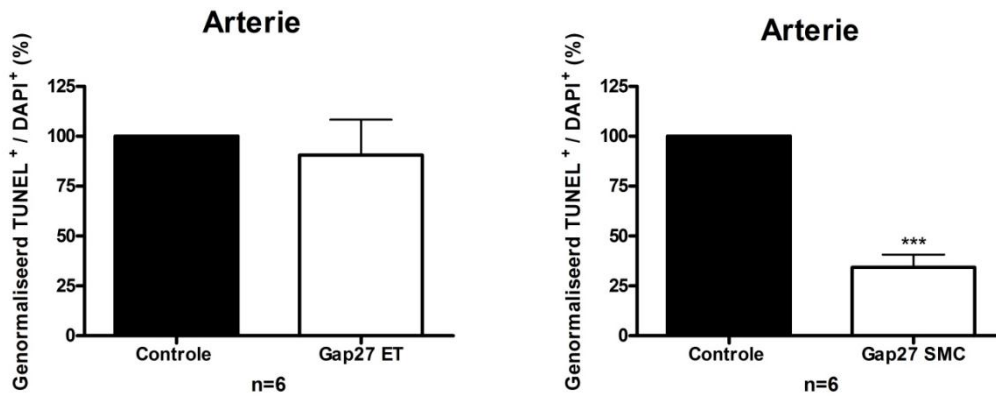
Bij de *arteriën* afzonderlijk wordt een daling in de apoptotische celindex gezien van  $25.5 \% \pm 7.8$  naar  $17.2 \pm 3.9$  in de tunica intima (Figuur 19A). Gezien de grote variatie in celdood tussen de bloedvaten onderling, worden de data genormaliseerd ten opzichte van de controles. Waarbij er, na normalisatie, een reductie in celdood is van  $100\%$  (controle) naar  $90.5 \% \pm 17.8$  (Gap27) in de tunica intima van de arteriën (niet significant) (Figuur 19B).

Voorts wordt in de tunica media van de arteriën een daling gezien van  $4.4 \% \pm 1.6$  naar  $1.3 \pm 0.5$  (Figuur 19A). Deze reductie geeft een significantie van  $P < 0.001$ . Na normalisatie wordt een significante daling gezien van ongeveer  $66\%$  ( $P < 0.001$ ) in de tunica media (Figuur 19B).

A



**B**

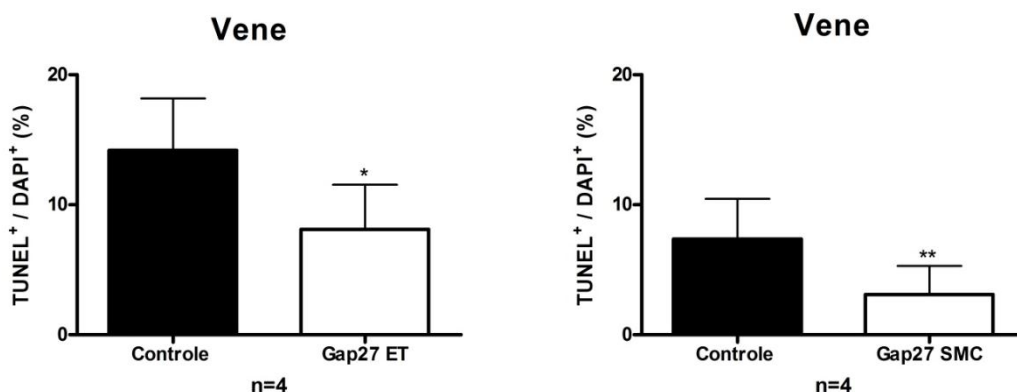


**Figuur 19: Ruwe data (A) en genormaliseerde data (B) van de arteriën.** Incubatie met Gap27 in arteriën heeft geen significant effect op de apoptotische celindex in de tunica intima, maar wel in de tunica media. \*\*\*:  $P < 0.001$ . (ET: endotheelcellen + subendotheliaal bindweefsel of tunica intima, SMC: gladde spierlaag of tunica media)

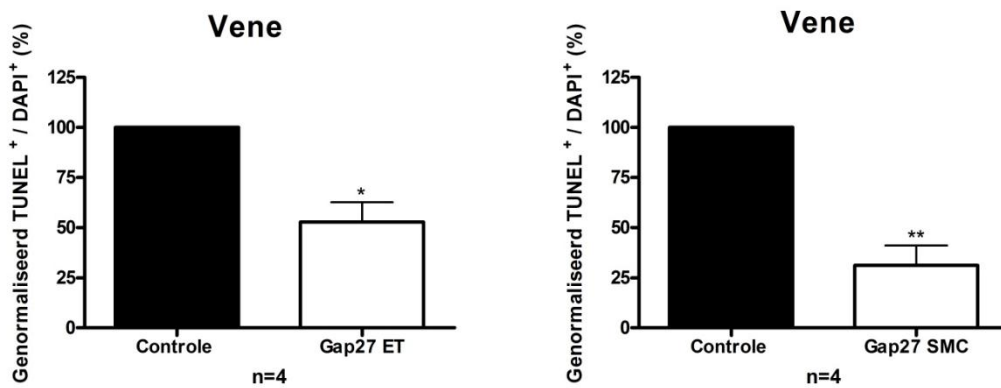
Samengevat had het connexine mimetisch peptide, Gap27, in de arteriën geen duidelijk effect op de apoptotische celindex in de tunica intima. In de tunica media daarentegen vertoont Gap27 wel een significant effect ( $P < 0.001$ ). Incubatie met Gap27 resulteert hier in een reductie van de apoptotische celindex (Figuur 19).

Bij de *venen* vertoont Gap27 een significant effect op de reductie van apoptose in de tunica intima én tunica media, respectievelijk  $P < 0.05$  en  $P < 0.01$  (Figuur 20). Vóór normalisatie werd een reductie gezien van  $14.2 \% \pm 4.0$  naar  $8.1 \pm 3.4$  in de tunica intima en van  $7.4 \pm 3.1$  naar  $3.1 \pm 2.2$  in de tunica media (Figuur 20A). Dit komt, na normalisatie, overeen met een daling van ongeveer 47 % in de tunica intima en een daling van ongeveer 69 % in de tunica media (Figuur 20B).

**A**



**B**

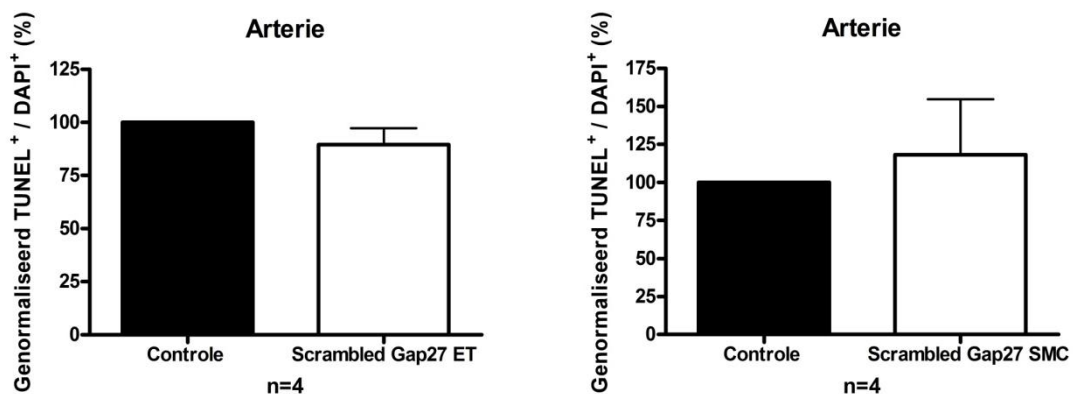


**Figuur 20: Ruwe data (A) en genormaliseerde data (B) van de venen.** Incubatie met Gap27 in venen heeft een significant effect op de apoptotische celindex in de tunica intima en in de tunica media. \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ . (ET: endotheelcellen + subendotheliaal bindweefsel of tunica intima, SMC: gladde spierlaag of tunica media)

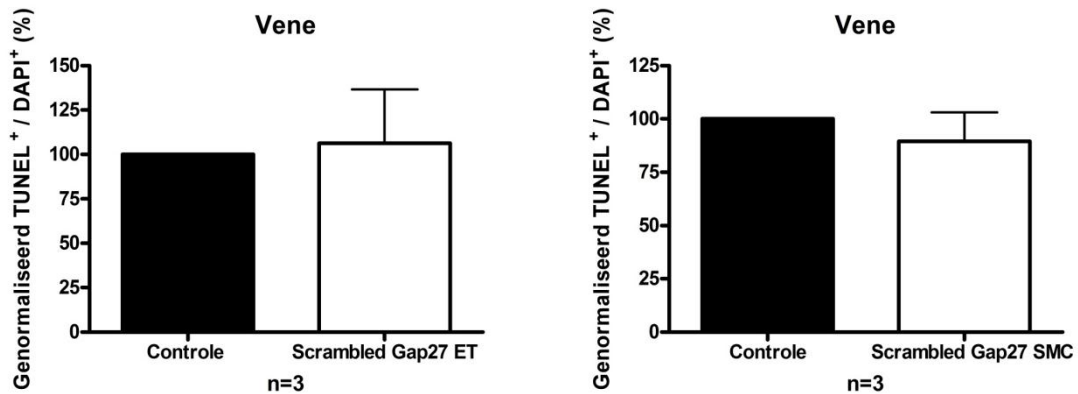
Bovenstaande resultaten tonen aan dat Gap27 een positief effect zou hebben op het bewaren van de bloedvaten. Het zorgt ervoor dat de apoptotische celindex in de weefsels gereduceerd wordt.

Scrambled Gap27 heeft geen enkel effect op het reduceren van celdood in de bloedvaten (Figuur 21).

**A**



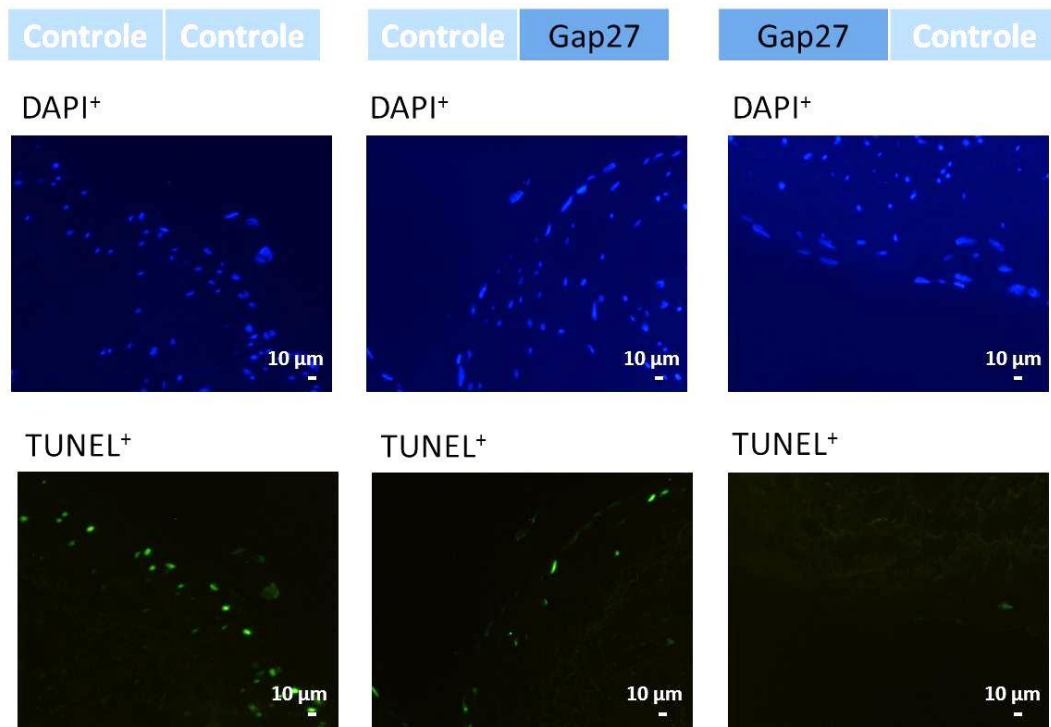
**B**



**Figuur 21: Scrambled Gap27.** Toevoeging van scrambled Gap27 aan arteriën (A) en venen (B) vertoont geen daling in de apoptotische celindex van de bloedvaten. (ET: endotheelcellen + subendotheliaal bindweefsel of tunica intima, SMC: gladde spierlaag of tunica media)

### 3.3.3 IMPACT TIJDSTIP VAN TOEDIENING VAN GAP27 OP CELDOOD

In een *tweede studie* wordt er onderzocht of het tijdstip van toediening van het connexine mimetisch peptide Gap27 een effect heeft op de reductie in celdood. Hierbij werd Gap27 ofwel enkel tijdens het invriezen toegediend ofwel enkel tijdens het gradueel uitwassen (Figuur 9). De resultaten tonen aan dat er een significante daling is in het aantal apoptotische cellen wanneer de bloedvaten enkel ingevroren worden met Gap27 (Gap27 – Controle). Bloedvaten die enkel uitgewassen worden met Gap27, en niet tijdens het invriezen (Controle – Gap27), vertonen geen daling in apoptotische celindex (Figuur 22, 23). Hieruit kan geconcludeerd worden dat Gap27 het best direct voor cryopreservatie wordt toegevoegd en niet pas in tweede instantie bij het gradueel uitwassen.



**Figuur 22: DAPI- en TUNEL-kleuring van een vene.** Incubatie met Gap27, enkel tijdens het invriezen (figuur rechts), reduceert de graad van celdood in bloedvaten het meest (x 20 lens).

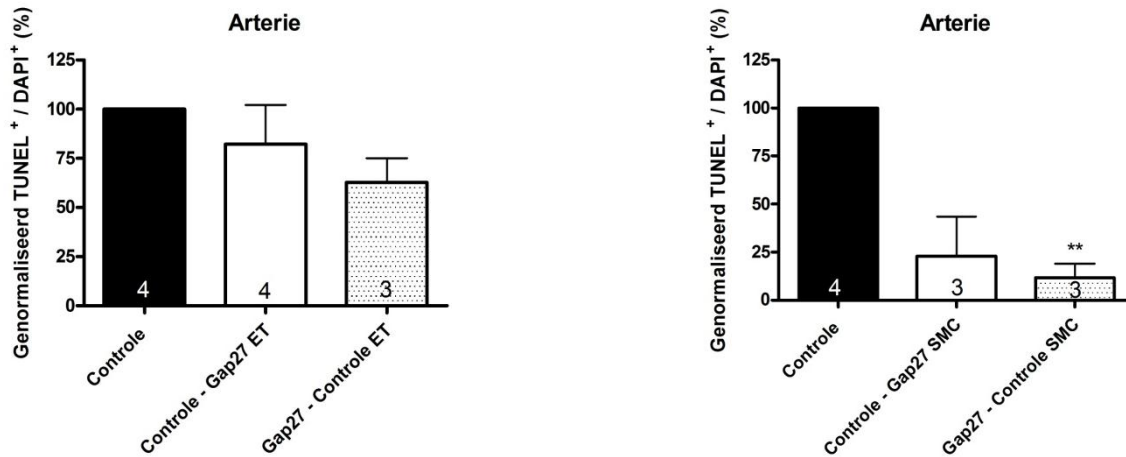
Toevoeging van Gap27, enkel tijdens het invriezen (Gap27 – Controle), zal aanleiding geven tot een significante daling in celdood in de tunica media van *arteriën* ( $P < 0.01$ ) (Figuur 23). Er is een daling van ongeveer 88 % in de tunica media. De resultaten van de tunica intima leunen ook aan naar significantie, maar door het beperkte aantal bloedvaten wordt dit niet bekomen. Hier is er een daling van de apoptotische celindex van ongeveer 37 % (Figuur 23A). Hetzelfde geldt voor de tunica media in de andere conditie (Controle – Gap27), waar de *arteriën* ingevroren worden in controle medium en uitgewassen in Gap27. Hierbij is er een daling van ongeveer 77 % waardoor de reductie in celdood in de tunica media net niet significant is (Figuur 23A).

Daarnaast worden ongeveer dezelfde resultaten gezien bij de *venen*. Hierbij wordt een significante reductie gezien in de tunica media, wanneer de bloedvaten ingevroren worden met Gap27 en uitgewassen in controle medium (Gap 27 – Controle) ( $P < 0.01$ ) (Figuur 23B). Er is een reductie van de apoptotische celindex van ongeveer 74 %. In de tunica intima is de daling van de apoptotische celindex in deze conditie net niet significant. Er wordt een daling gezien van ongeveer 47 %. In de andere omstandigheden, invriezen in controle medium en

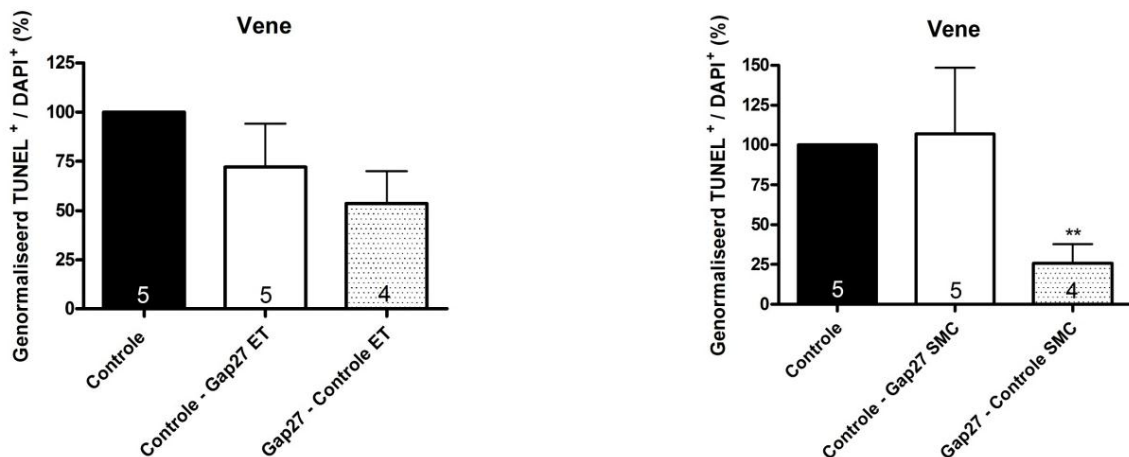


uitwassen met Gap27 (Controle – Gap27), wordt er geen significante daling gezien (Figuur 23B).

**A**



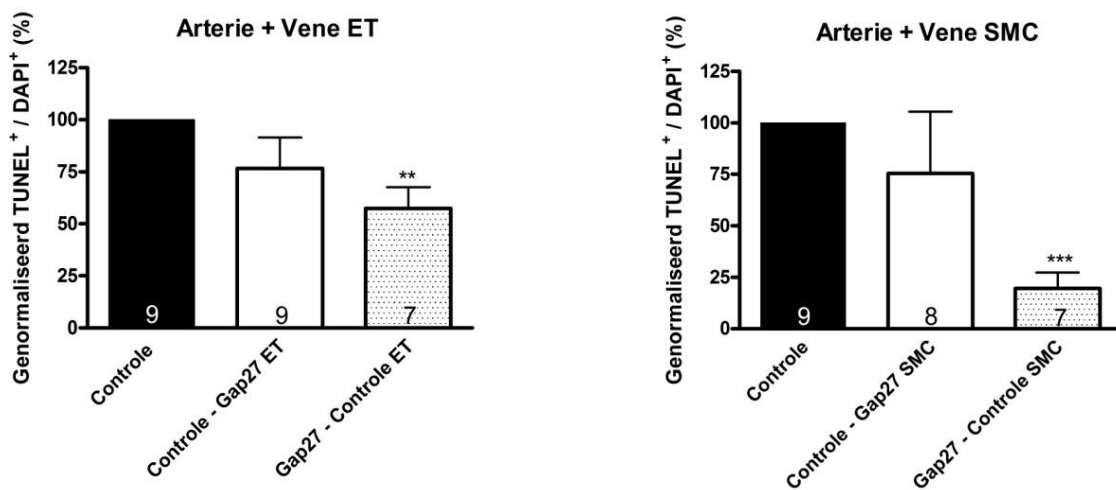
**B**



**Figuur 23: Genormaliseerde data van de arteriën (A) en venen (B) uit de tweede studie.** (A) Incubatie met Gap27, enkel tijdens het invriezen (Gap27 – Controle), vertoont een significantie daling in apoptotische celindex in de tunica media van de arteriën. Dit effect wordt (net) niet gezien in de tunica intima (Gap27 – Controle) en in de tunica media van de andere conditie (Controle – Gap27) . \*\*: P<0.01. (B) Incubatie met Gap27 enkel tijdens het invriezen (Gap27 – Controle), vertoont bij de venen in de tunica media een significante daling in apoptotische celindex. \*\*: P<0.01. In de tunica intima wordt net geen significante bekomen. (ET: endotheelcellen + subendotheliaal bindweefsel of tunica intima, SMC: gladde spierlaag of tunica media)



Wanneer alle gegevens samen genomen worden, dit wil zeggen arteriën en venen samen, wordt er wel een significante daling bekomen in zowel de tunica intima als de tunica media (Figuur 24). Hieruit kan afgeleid worden dat Gap27 het grootste effect heeft wanneer het tijdens het invriezen toegevoegd wordt. Deze resultaten tonen aan dat er in de tunica intima een reductie is van ongeveer 43 % ( $P < 0.01$ ) en in de tunica media van ongeveer 80 % ( $P < 0.001$ ).



**Figuur 24:** Genormaliseerde data van arteriën en venen samen uit de tweede studie. Incubatie van de bloedvaten met Gap27 tijdens het invriezen resulteert in een significante daling van de apoptotische celindex in de tunica intima en tunica media (Gap27 – Controle). \*\*:  $P < 0.01$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ . (ET: endotheelcellen + subendotheliaal bindweefsel of tunica intima, SMC: gladde spierlaag of tunica media)

#### 4. BESPREKING

Onderzoek toont aan dat geprogrammeerde celdood, meer bepaald apoptose, een rol speelt bij het falen van vasculaire greffes in individuen. In deze studie blijkt dat de aanwezigheid van Gap27 tijdens het cryopreserveren en ontdooien celdood kan reduceren in zowel de endotheliale laag als gladde spierlaag in vasculaire greffes. Daarnaast heeft Gap27 geen effect op het al dan niet bewaren van de endotheliale omlijsting van de bloedvaten. Opmerkelijk is dat er veel meer endotheelloslating geobserveerd wordt bij arteriën in tegenstelling tot venen.

Directe cellulaire communicatie is een essentieel mechanisme voor het onderhouden van de weefselhomeostase in multicellulaire organismen [42]. Deze communicatie kan tot stand gebracht worden door gap juncties (GJs) en connexine hemikanalen, welke aanwezig zijn in de plasmamembraan van cellen [30]. GJs staan in voor het doorgeven van celdoodsignalen tussen een stervende cel en gezonde naburige cellen. Dit zal vervolgens aanleiding geven tot het verspreiden van celdood in een weefsel, ook wel 'bystander death' of 'the kiss of death' genoemd [9, 15, 25], en wordt bijvoorbeeld gezien in ischemie-gerelateerde celschade zoals in het geval van een herseninfarct [25]. Daarenboven tonen indirecte data aan dat er een positieve correlatie bestaat tussen de GJIC en de apoptotische activiteit [9]. Deze data werden bekomen door observaties waarbij de toevoeging van chemische gap junctionele inhibitoren, zoals carbenoxolone, apoptose zullen voorkomen [9]. Naast deze GJs kunnen ook connexine hemikanalen gezien worden als toxische poriën. Wanneer deze kanalen gedurende een langere tijd openstaan, kunnen ze aanleiding geven tot het ontstaan van celdood door de vrijstelling van bepaalde essentiële metabolieten, zoals  $\text{NAD}^+$  en ATP. Deze ongepaste activatie zal onder andere een onevenwicht veroorzaken van ionische gradiënten en de propagatie van celdood versnellen (zie verder) [25]. GJs en connexine hemikanalen zijn betrokken in het ontstaan van celschade onder pathologische omstandigheden [43] zoals het ontstaan van kanker [25], ischemische celschade [24, 34], myocardiale schade en cardiale aritmie na ischemie [43].

Deze studie toont de aanwezigheid aan van Cx37, Cx40 en Cx43 in zowel de tunica intima als in de tunica media van humane arteriën (arteria femoralis) en venen (vena saphena magna). Wel worden er verschillen in expressiepatroon gezien tussen enerzijds arteriën en venen en anderzijds tussen de tunica intima en tunica media. Cx37 wordt bij de venen voornamelijk teruggevonden in de tunica intima, terwijl bij de arteriën Cx37 ongeveer evenredig verdeeld is tussen de twee lagen. Cx40 toont een uniforme distributie aan in zowel de venen en arteriën

als in beide lagen. Opvallend is dat beide connexines (Cx37 en Cx40) in geringere mate aanwezig zijn in vergelijking met Cx43. Dit connexine wordt vooral teruggevonden in de tunica media van de arteriën. Bij de venen is dit expressiepatroon minder uitgesproken. Ook andere studies demonstreerden dat de connexine expressie in de bloedvatwand geen uniform patroon vertoont [44]. De connexine expressie zou variëren afhankelijk van de grootte van het bloedvat én species. Cx37 wordt voornamelijk teruggevonden ter hoogte van de tunica intima, alhoewel er ook enige expressie te zien is ter hoogte van de tunica media [31, 44]. Cx40 komt overwegend in de endotheelcellen voor en Cx43 hoofdzakelijk in de gladde spiercellen [31, 44].

In deze studie wordt onderzocht of incubatie met Gap27, een peptide dat identiek is aan een sequentie van de tweede extracellulaire loop van Cx37 en Cx43 [30, 36], celdood kan reduceren in vasculaire greffes door het blokkeren van connexine kanalen. Dit peptide heeft de eigenschap dat ze connexine hemikanalen en GJ snel en omkeerbaar kunnen inhiberen [30, 36]. De resultaten tonen aan dat de aanwezigheid van Gap27 de apoptotische celindex reduceert in vasculaire greffes. Eerder vond Decrock E. et al. [45] dat incubatie met Gap27 apoptose kan verhinderen in C6-Cx43 cellen.

In de *eerste studie* heeft het invriezen en uitwassen met Gap27 een significant effect op de apoptotische celindex bij arteriën in de tunica media en bij de venen in zowel de tunica intima als tunica media. Het effect van Gap27 op de apoptotische celindex in de arteriële endotheellaag is minder uitgesproken - mogelijks is de geringe expressie van Cx43 in de tunica intima hier een verklaring voor.

Daarnaast vertoont de tunica intima meer celdood (~20 %) dan de tunica media (~5 %). Dit zou kunnen te wijten zijn aan het preleveren (studies bevelen het 'no touch' principe aan om dit te reduceren [46]), het cryopreserveren of het ontdooien van de bloedvaten [6]. Eerder toonden Kouzi-Koliakou K. et al. [6] aan dat arteriële en veneuze greffes vóór implantatie bij coronaire arteriële bypass al tekenen van uitgebreide apoptose vertonen in het endotheel en in de gladde spiercellen. Voorts leidt cryopreservatie tot loslating van de tunica intima, wat op zijn beurt aanleiding kan geven tot het falen van de vasculaire greffes [5].

In de *tweede studie*, wanneer het peptide enkel tijdens het invriesproces (Gap27 – Controle) werd toegevoegd, is er eveneens een significante reductie van de apoptotische celindex in de tunica media van arteriën en venen te zien. Dit effect wordt niet gezien wanneer Gap27 enkel tijdens het gradueel uitwassen wordt toegevoegd (Controle – Gap27). Uit deze resultaten

blijkt dat de verspreiding van celdood in het weefsel voornamelijk plaatsvindt tijdens het invriezen van het weefsel en het ontdooien ervan. Dit is mogelijk te wijten aan effecten zoals ischemie en hypoxie. Ischemische omstandigheden resulteren in het openen van hemikanalen. Hierdoor zullen  $\text{NAD}^+$  en ATP vrijgesteld worden in de extracellulaire ruimte en aanleiding geven tot celdepolarisatie, een val in ionische gradiënten, verlies van kleine metaboliëten en verhoging van intracellulair calcium [9, 42, 43]. Deze hoge intracellulaire  $\text{Ca}^{2+}$  concentratie zal uiteindelijk aanleiding geven tot het ontstaan van celdood (Zie § 1.4.1) [26]. Dit vindt bijvoorbeeld plaats in het hart gedurende myocardiale ischemie [43, 47]. Hawat G. et al. [47] toonden reeds aan dat het connexine mimetisch peptide 'Gap26', een peptide dat correspondeert met een sequentie van de eerste extracellulaire loop van Cx43, in staat is het openen van Cx43 hemikanalen te inhiberen tijdens ischemische condities. Toevoeging van dit peptide zou bescherming bieden tegen ischemische schade in het hart, zowel wanneer de toevoeging gebeurt vóór als na het ontstaan van ischemie [47]. Bovendien kunnen greffes gedurende de preparatie onderhevig zijn aan hypoxie, hetgeen ook aanleiding kan geven tot het openen van hemikanalen en resulteren in celdood [6, 9]. Verder werd ook aangetoond dat Gap26 en carbenoxolone in staat zijn de neo-intima formatie te blokkeren, via inhibitie van Cx43, waardoor de proliferatie van gladde spiercellen zal verminderd worden. Dit is van belang omdat deze proliferatie aan de basis zou liggen van het ontstaan van atherosclerose [35].

Naast de gladde spiercellen speelt ook het endotheel een belangrijke rol bij het onderhouden van de normale structuur en functie van de bloedvatwand. Het heeft antitrombogene eigenschappen en bevordert bovendien de plaatjesaggregatie en coagulatie wanneer er schade is [48]. Wanneer celdood optreedt in endotheelcellen, door bijvoorbeeld ischemie, zal dit ervoor zorgen dat de endotheelcellen hun normale functie niet meer kunnen uitoefenen, zoals inhibitie van stolling en inflammatie [49]. In deze studie wordt aangetoond dat de apoptotische celindex hoger ligt in de tunica intima en dat toevoeging van Gap27 geen effect heeft op het al dan niet loskomen van de tunica intima. Wel wordt er een meer uitgesproken verlies gezien van de endotheliale omlijsting in arteriën in vergelijking met venen. Bovendien is er percentageel meer celdood in de tunica intima bij arteriën dan bij venen. Dit zou klinische implicaties kunnen hebben door te kiezen voor venen, wanneer het behoud van de tunica intima vereist is, of voor arteriën, wanneer de tunica intima juist niet vereist is (infectie, afstoting...).

Uit de resultaten van de *eerste* en *tweede studie* kan besloten worden dat Gap27 het meest effectief is wanneer het wordt toegevoegd tijdens de cryopreservatie en het ontdooien. Tijdens deze fases is het gebruik van Gap27 dus het meest aangewezen. Verder zou Gap27 direct na prelevatie aan het bloedvat kunnen toegevoegd worden vooraleer het op de weefselbank aankomt, zodat bloedvaten net vóór, tijdens en ná implantatie, met Gap27 geïncubeerd worden, om zo de graad van celdood optimaal te reduceren. Met behulp van een dosis-respons curve zou bovendien de ideale concentratie kunnen bepaald worden om het beste resultaat te bereiken. Daarnaast zou het meten van de klinische outcome na het terug implanteren een waardevolle parameter kunnen zijn om het cryopreservatieproces te optimaliseren. Bijvoorbeeld het opduiken van complicaties zoals trombose en ‘late graft failure’ zou kunnen vergeleken worden met de huidige invriesprocedures in de weefselbank.

Samenvattend tonen de resultaten uit deze studie aan dat het connexine mimetisch peptide Gap27 een potentieel therapeutisch effect heeft op de graad van celdood in vasculaire greffes. Dit peptide zou kunnen toegevoegd worden aan bloedvaten tijdens het invriezen én het gradueel uitwassen of enkel tijdens het invriezen zelf. Connexine mimetische peptiden zouden een belangrijke ‘tool’ kunnen zijn in het optimaliseren van het rendement van cryogepreserveerde greffes en zouden op deze manier een positieve outcome kunnen bevorderen.

## 5. REFERENTIELIJST

- [1] Callow AD (1996). Arterial homografts. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery* 12(3): 272-281.
- [2] Desgranges P, Beaujan F, Brunet S, Cavillon A, Qvarfordt P, Mellièrè D, Becquemin JP (1998). Cryopreserved arterial allografts used for the treatment of infected vascular grafts. *Annals of Vascular Surgery* 12(6): 583-588.
- [3] Kohler TR, Kirkman TR, Kraiss LW, Zierler BK, Clowes AW (1991). Increased blood flow inhibits neointimal hyperplasia in endothelialized vascular grafts. *Circulation Research* 69(6): 1557-1565.
- [4] Pascual G, Martinez S, Garcia-Honduvilla N, Corrales C, Bellon JM, Bujan J (2004). Long-term behaviour of cryopreserved arterial grafts versus prosthetic micrografts. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery* 27(4): 423-431.
- [5] Pascual G, Rodriguez M, Corrales C, Turegano F, Garcia-Honduvilla N, Bellon JM, Bujan J (2004). New approach to improving endothelial preservation in cryopreserved arterial substitutes. *Cryobiology* 48(1): 62-71.
- [6] Kouzi-Koliakou K, Kanellaki-Kyparissi M, Marinov G, Kovachev D, knyazev V (2004). The role of apoptosis in the failure of vascular grafts. *Hellenic journal of cardiology* 45: 391-400.
- [7] Vral A, Mione S (2009). Bijzondere weefselleer. *Cursus Faculteit Geneeskunde en Gezondheidswetenschappen, Gent*, p. 1-9.
- [8] Tortora GJ, Derrickson B (2006). *Principles of anatomy and physiology*. John Wiley and Sons, Hoboken.
- [9] Decrock E, Vinken M, De Vuyst E, Krysko DV, D'Herde K, Vanhaecke T, Vandenaabeele P, Rogiers V, Leybaert L (2009). Connexin-related signaling in cell death: to live or let die? *Cell Death and Differentiation* 16(4): 524-536.
- [10] Clarke M, Bennett M, Littlewood T (2007). Cell death in the cardiovascular system. *Heart* 93(6): 659-664.
- [11] Silva MT, do Vale A, dos Santos NM (2008). Secondary necrosis in multicellular animals: an outcome of apoptosis with pathogenic implications. *Apoptosis* 13(4): 463-482.
- [12] Ashe PC, Berry MD (2003). Apoptotic signaling cascades. *Progress in Neuro-psychopharmacology & Biological Psychiatry* 27(2): 199-214.
- [13] Golstein P, Kroemer G (2007). Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends Biochemical Sciences* 32(1): 37-43.
- [14] Imgenex Corporation. Imgenex. Pathway profiling antibodies & reagents. Internetreferentie: <http://www.imgenex.com/download.php?id=2>. (geconsulteerd op 25 februari 2012).
- [15] Elmore S (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology* 35(4): 495-516.
- [16] Hernandez LD, Houde C, Hoek M, Butts B, Nicholson DW, Mehmet H (2009). Caspases and cell death. *Encyclopedia of life sciences (ELS)*. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester. doi: 10.1002/9780470015902.a0021562
- [17] Imgenex Corporation. Imgenex. Pathway profiling antibodies & reagents. Internetreferentie: [http://imgenex.com/view\\_data\\_page.php?id=168](http://imgenex.com/view_data_page.php?id=168). (geconsulteerd op 25 februari 2012).
- [18] Brunelle JK, Letai A (2009). Control of mitochondrial apoptosis by the Bcl-2 family. *Journal of Cell Science* 122(Pt 4): 437-441.
- [19] MacFarlane M, Williams AC (2004). Apoptosis and disease: a life or death decision. *EMBO Reports* 5(7): 674-678.
- [20] Kroemer G, Galluzzi L, Vandenaabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, El-Deiry WS, Golstein P, Green DR, Hengartner M, Knight RA, Kumar S, Lipton SA, Malorni W, Nunez G, Peter ME, Tschopp J, Yuan J, Piacentini M, Zhivotovsky B, Melino G (2009). Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differentiation* 16(1): 3-11.

- [21] Berghe TV, Vanlangenakker N, Parthoens E, Deckers W, Devos M, Festjens N, Guerin CJ, Brunk UT, Declercq W, Vandenabeele P (2010). Necroptosis, necrosis and secondary necrosis converge on similar cellular disintegration features. *Cell Death and Differentiation* 17(6): 922-930.
- [22] Gump JM, Thorburn A (2011). Autophagy and apoptosis: what is the connection? *Trends in Cell Biology* 21(7): 387-392.
- [23] Vinken M, Decrock E, Leybaert L, Bultynck G, Himpens B, Vanhaecke T, Rogiers V (2011). Non-channel functions of connexins in cell growth and cell death. *Biochimica et Biophysica Acta*. doi: 10.1016/j.bbamem.2011.06.011
- [24] Krysko DV, Leybaert L, Vandenabeele P, D'Herde K (2005). Gap junctions and the propagation of cell survival and cell death signals. *Apoptosis* 10(3): 459-469.
- [25] Vinken M, Vanhaecke T, Papeleu P, Snykers S, Henkens T, Rogiers V (2006). Connexins and their channels in cell growth and cell death. *Cell Signalling* 18(5): 592-600.
- [26] Decrock E, Vinken M, Bol M, D'Herde K, Rogiers V, Vandenabeele P, Krysko DV, Bultynck G, Leybaert L (2011). Calcium and connexin-based intercellular communication, a deadly catch? *Cell Calcium* 50(3): 310-321.
- [27] Maeda S, Tsukihara T (2011). Structure of the gap junction channel and its implications for its biological functions. *Cellular and molecular life sciences (CMLS)* 68(7): 1115-1129.
- [28] Rodriguez-Sinovas A, Cabestrero A, Lopez D, Torre I, Morente M, Abellan A, Miro E, Ruiz-Meana M, Garcia-Dorado D (2007). The modulatory effects of connexin 43 on cell death/survival beyond cell coupling. *Progress in Biophysics & Molecular Biology* 94(1-2): 219-232.
- [29] Evans WH, Boitano S (2001). Connexin mimetic peptides: specific inhibitors of gap-junctional intercellular communication. *Biochemical Society Transactions* 29(Pt 4): 606-612.
- [30] Evans WH, De Vuyst E, Leybaert L (2006). The gap junction cellular internet: connexin hemichannels enter the signalling limelight. *The Biochemical Journal* 397(1): 1-14.
- [31] Haefliger JA, Nicod P, Meda P (2004). Contribution of connexins to the function of the vascular wall. *Cardiovascular Research* 62(2): 345-356.
- [32] Sohl G, Willecke K (2004). Gap junctions and the connexin protein family. *Cardiovascular Research* 62(2): 228-232.
- [33] De Bock M, Culot M, Wang N, Bol M, Decrock E, De Vuyst E, da Costa A, Dauwe I, Vinken M, Simon AM, Rogiers V, De Ley G, Evans WH, Bultynck G, Dupont G, Cecchelli R, Leybaert L (2011). Connexin channels provide a target to manipulate brain endothelial calcium dynamics and blood-brain barrier permeability. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 31(9): 1942-1957.
- [34] Contreras JE, Sanchez HA, Veliz LP, Bukauskas FF, Bennett MVL, Saez JC (2004). Role of connexin-based gap junction channels and hemichannels in ischemia-induced cell death in nervous tissue. *Brain Research Reviews* 47(1-3): 290-303.
- [35] Song MB, Yu XJ, Cui X, Zhu GX, Zhao G, Chen JF, Huang L (2009). Blockade of connexin 43 hemichannels reduces neointima formation after vascular injury by inhibiting proliferation and phenotypic modulation of smooth muscle cells. *Experimental Biology and Medicine* 234(10): 1192-1200.
- [36] Evans WH, Leybaert L (2007). Mimetic peptides as blockers of connexin channel-facilitated intercellular communication. *Cell Communication and Adhesion* 14(6): 265-273.
- [37] Leybaert L, Braet K, Vandamme W, Cabooter L, Martin PEM, Evans WH (2003). Connexin channels, connexin mimetic peptides and ATP release. *Cell Communication and Adhesion* 10(4-6): 251-257.
- [38] Negoescu A, Lorimier P, labatMoleur F, Azoti L, robert C, Guillermet C, brambilla C, brambilla E (1997). TUNEL: Improvement and evaluation of the method for in situ apoptotic cell identification. *Biochemica* 2: 12-17.
- [39] Negoescu A, Guillermet C, Lorimier P, Robert C, Lantuejoul S, Brambilla E, labatMoleur F (1998). TUNEL apoptotic cell detection in archived paraffin-embedded tissues. *Biochemica* 3: 36-41.

- [40] Roche Diagnostics. Roche Applied Science. Internetreferentie: <https://www.roche-applied-science.com/servlet/RCProductDisplay?storeId=10305&catalogId=10304&langId=-1&countryId=be&forCountryId=be&productId=3.5.3.21.2.4>. (geconsulteerd op 26 februari 2012)
- [41] Kabir J, Lobo M, Zachary I (2002). Staurosporine induces endothelial cell apoptosis via focal adhesion kinase dephosphorylation and focal adhesion disassembly independent of focal adhesion kinase proteolysis. *The Biochemical Journal* 367(Pt 1): 145-155.
- [42] Mese G, Richard G, White TW (2007). Gap junctions: basic structure and function. *Journal of Investigative Dermatology* 127(11): 2516-2524.
- [43] Ebihara L (2003). New roles for connexons. *News in Physiological Sciences* 18: 100-103.
- [44] Figueroa XF, Duling BR (2009). Gap junctions in the control of vascular function. *Antioxidants & Redox Signaling* 11(2): 251-266.
- [45] Decrock E, De Vuyst E, Vinken M, Van Moorhem M, Vranckx K, Wang N, Van Laeken L, De Bock M, D'Herde K, Lai CP, Rogiers V, Evans WH, Naus CC, Leybaert L (2009). Connexin 43 hemichannels contribute to the propagation of apoptotic cell death in a rat C6 glioma cell model. *Cell Death and Differentiation* 16(1): 151-163.
- [46] Davies MG, Hagen PO (2011). Pathophysiology of vein graft failure: A Review (Reprinted from *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*, vol 9, pg 7-18, 1995). *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery* 42: S19-S29.
- [47] Hawat G, Benderdour M, Rousseau G, Baroudi G (2010). Connexin 43 mimetic peptide Gap26 confers protection to intact heart against myocardial ischemia injury. *Pflugers Archiv* 460(3): 583-592.
- [48] Steen S (2001). Preservation of the endothelium in cardiovascular surgery--some practical suggestions--a review. *Scandinavian Cardiovascular Journal* 35(5): 297-301.
- [49] Holzknicht ZE, Kuypers KL, Plummer TB, Williams J, Bustos M, Gores GJ, Brunn GJ, Platt JL (2002). Apoptosis and cellular activation in the pathogenesis of acute vascular rejection. *Circulation Research* 91(12): 1135-1141.



