

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität  
München

## **Charakterisierung von Perizyten im alternden Herzen**

von  
Marie-Christine Hartmann  
aus Diez

München 2020



**Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der  
Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität  
München**

Lehrstuhl für Physiologie

**Arbeit angefertigt unter der Leitung von:** Univ.-Prof. Dr. Thomas W. Göbel

**Angefertigt am:** Institut für Kardiovaskuläre Regeneration der Goethe  
Universität Frankfurt am Main

**Mentor:** Prof. Dr. Stefanie Dimmeler



**Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-  
Maximilians Universität München**

**Dekan:** Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

**Berichterstatter:** Univ.-Prof. Dr. Thomas W. Göbel

**Korreferent:** Univ.-Prof. Dr. Rüdiger Wanke

Tag der Promotion: 25. Juli 2020



**Meinen Eltern**





# Inhaltsverzeichnis

<b>1. EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 DAS KARDIOVASKULÄRE SYSTEM</b> .....	<b>1</b>
1.1.1 HERZ .....	1
1.1.2 VASKULÄRES SYSTEM.....	2
<b>1.2 DER ALTERUNGSPROZESS</b> .....	<b>3</b>
1.2.1 DAS ALTERNDE HERZ .....	4
1.2.2 DAS ALTERNDE GEFÄßSYSTEM.....	5
<b>1.3 PERIZYTEN</b> .....	<b>6</b>
1.3.1 MORPHOLOGIE UND LOKALISATION.....	6
1.3.2 IDENTIFIKATION VON PERIZYTEN .....	8
1.3.3 FUNKTION.....	9
1.3.4 HERZPERIZYTEN .....	10
<b>1.4 NOTCH3</b> .....	<b>11</b>
<b>1.5 PDGFRB</b> .....	<b>12</b>
<b>2. ZIEL DER ARBEIT</b> .....	<b>15</b>
<b>3. MATERIALIEN</b> .....	<b>17</b>
<b>4. METHODEN</b> .....	<b>25</b>
<b>4.1 LABORTIERE</b> .....	<b>25</b>
<b>4.2 PERIZYTENISOLATION AUS DEM HERZEN VON MÄUSEN</b> .....	<b>25</b>
<b>4.3 ZELLKULTUR</b> .....	<b>27</b>
<b>4.4 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN</b> .....	<b>29</b>
4.4.1 RNA-ISOLATION AUS ZELLEN .....	29
4.4.2 RNA-QUANTIFIZIERUNG.....	30
4.4.3 cDNA SYNTHESE .....	30
4.4.4 QUANTITATIVE POLYMERASE KETTENREAKTION (qPCR).....	31
4.4.5 siRNA TRANSFEKTION.....	32
<b>4.5 IN-VITRO-VERSUCHE UND FUNKTIONELLE EXPERIMENTE</b> .....	<b>32</b>
4.5.1 ZELL-MATRIX ADHÄSIONSVERSUCH.....	32
4.5.2 MATRIGEL VERSUCH: PERIZYT-ENDOTHEL-ADHÄSION .....	33
4.5.3 MTT-TEST .....	34
4.5.4 PERMEABILITÄTSVERSUCH.....	35
4.5.5 BOYDEN-KAMMER-MIGRATIONS-VERSUCH .....	37
<b>4.6 IMMUNOLOGISCHE UND HISTOLOGISCHE METHODEN</b> .....	<b>38</b>
4.6.1 KRYOKONSERVIERUNG UND KRYOSEKTIONIERUNG VON HERZEN .....	38
4.6.2 IMMUNFÄRBUNG.....	39
<b>4.7 BIOINFORMATIK</b> .....	<b>39</b>
4.7.1 ZELLKERNISOLATION .....	40
4.7.2 EINZELZELKERN-cDNA-PROBENAUFBEREITUNG UND -SEQUENZIERUNG .....	40
4.7.3 EINZELZELL-RNA-SEQUENZIERUNGS-DATENANALYSE .....	40
4.7.4 ZELLPOPULATIONSDFINIERUNG .....	41
4.7.5 GENONTOLOGIE-ANALYSE.....	41

4.7.6 UNTERGRUPPIERUNG BASIEREND AUF DEN DEGS .....	41
<b>4.8 STATISTIK .....</b>	<b>41</b>
<b><u>5. ERGEBNISSE .....</u></b>	<b><u>43</u></b>
5.1 REDUKTION DER PERIZYTENBEDECKUNG IM ALTERNDEN HERZEN .....	43
5.2 CHARAKTERISIERUNG VON ALTERNDEN KARDIALEN PERIZYTEN .....	46
5.3 NOTCH3 UND PDGFRB SIND IN ALTERNDEN PERIZYTEN RUNTERREGULIERT.....	51
5.4 FUNKTIONELLE ANALYSE VON HUMANEN PERIZYTEN NACH NOTCH3- UND PDGFRB- REPRESSION .....	53
5.5 MECHANISTISCHE ANALYSE DES siNOTCH3-/ siPDGFRB-PHÄNOTYPEN IN PERIZYTEN: ZEB1 ALS POTENZIELLER MASTER-REGULATOR.....	59
<b><u>6. DISKUSSION .....</u></b>	<b><u>63</u></b>
6.1 DER PERIZYTENPHÄNOTYP VERÄNDERT SICH WÄHREND DES KARDIALEN ALTERNS .....	63
6.2 DIE PERIZYTEN-SPEZIFISCHE GENEXPRESSION IST IM ALTER REGULIERT .....	64
6.3 AUSWIRKUNGEN DER RUNTERREGULATION VON NOTCH3 UND PDGFRB IM ALTER .....	66
6.3.1 EINFLUSS AUF DIE ADHÄSION .....	66
6.3.2 EINFLUSS AUF DIE MIGRATION.....	67
6.3.3 EINFLUSS AUF DIE DIFFERENZIERUNG .....	68
6.4 DIE GENREGULATION VON <i>NOTCH3</i> UND <i>PDGFRB</i> WIRD DURCH DEN TRANSKRIPTIONS-FAKTOR ZEB1 BEEINFLUSST .....	68
6.5 DIE ORGANSPEZIFITÄT VON PERIZYTEN.....	70
6.6 AUSBLICK .....	70
<b><u>7. FAZIT.....</u></b>	<b><u>73</u></b>
<b><u>8. ZUSAMMENFASSUNG .....</u></b>	<b><u>75</u></b>
<b><u>9. SUMMARY .....</u></b>	<b><u>77</u></b>
<b><u>10. QUELLENVERZEICHNIS .....</u></b>	<b><u>79</u></b>
<b><u>11. ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</u></b>	<b><u>89</u></b>
<b><u>12. DANKSAGUNG .....</u></b>	<b><u>91</u></b>

## Abkürzungsverzeichnis

ATPasen	Adenosintriphosphatasen
BBE	Bovine Brain Extract
BCECF, AM	2',7'-bis-(2-carboxyethyl)-5-(and-6) carboxyfluorescein,acetoxymethyl ester
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
Ca	<i>Calcium</i> , Kalzium
CCA	Canonical Correlation Algorithmus
cDNA	<i>complementary DNA</i> , komplementäre DNA
cm <sup>2</sup>	Quadratzentimeter
Col1a1	Alpha-1-Typ-I-Kollagen
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DEG(s)	<i>differentially expressed gene</i> , differentiell exprimierte Gene
DMEM	Dulbeccos modified eagle's medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleotid-Phosphat
DPBS	Dulbecco's phosphate buffered saline
EBM	Endothelial Basal Medium
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Endothelial Growth Factor
EGM	Endothelial Cell Growth Medium
et al.	et alii; lat. für "und andere"
FACS	<i>fluorescence- activated cell scanning</i>
FCS/FBS	fetal calve serum / fetal bovine serum
g	Gramm
GFP	Grünes fluoreszierendes Protein
GO	Genontologie
HBSS	Hank's balanced salt solution
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HUVEC	human umbilical vein endothelial cells
IB4	Isolektin B4
JAG1	JAGGED-1
kg	Kilogramm
Klf2	Krüppel-like Factor 2
KO	<i>knockout</i>
l	Liter
m	Meter
M	Molar

MAML	Mastermind-like
MCAM	<i>melanoma cell adhesion molecule</i>
Mg	Magnesium
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
min	Minuten
ml	Milliliter
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
n	nano
NADH(P)	Nicotinamidadenindinukleotid(phosphate)
NECD	Notch extrazelluläre Domäne
NG2	<i>neural glial antigen 2</i>
NICD	Notch intrazelluläre Domäne
n.s.	nicht signifikant
p	Überschreitungswahrscheinlichkeit
PAI-1	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1
PCA	<i>Principal Component Analysis</i>
PDGF	platelet-derived growth factor
PDGFR $\alpha$	platelet-derived growth factor receptor alpha
PDGFR $\beta$	platelet-derived growth factor receptor beta
PFA	phosphatgepuffertes Formaldehyd
PM	Perizytenmedium
PBS	phosphate buffered saline
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
qPCR	quantitative PCR
rhFGF	<i>r Human Fibroblast Growth Factor</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Reverse Transkription
R <sup>3</sup> -IGF-1	<i>Recombinant Long R Insulin Like Frowth Factor1</i>
s	Sekunden
SD	standard deviation
SEM	Standardfehler
siRNA	small interfering RNA
SMC(s)	smooth muscle cell(s)
TGF $\beta$	transforming growth factor $\beta$
t-SNE	t-distributed stochastic neighbor embedding
U	<i>units</i> , Einheiten
VEGF	vascular endothelial growth factor
VEGFR	VEGF receptor
WGA	Wheat germ agglutinin
WHO	World Health Organization
$\alpha$ -SMA	alpha-smooth muscle actin
$\mu$	Mikro

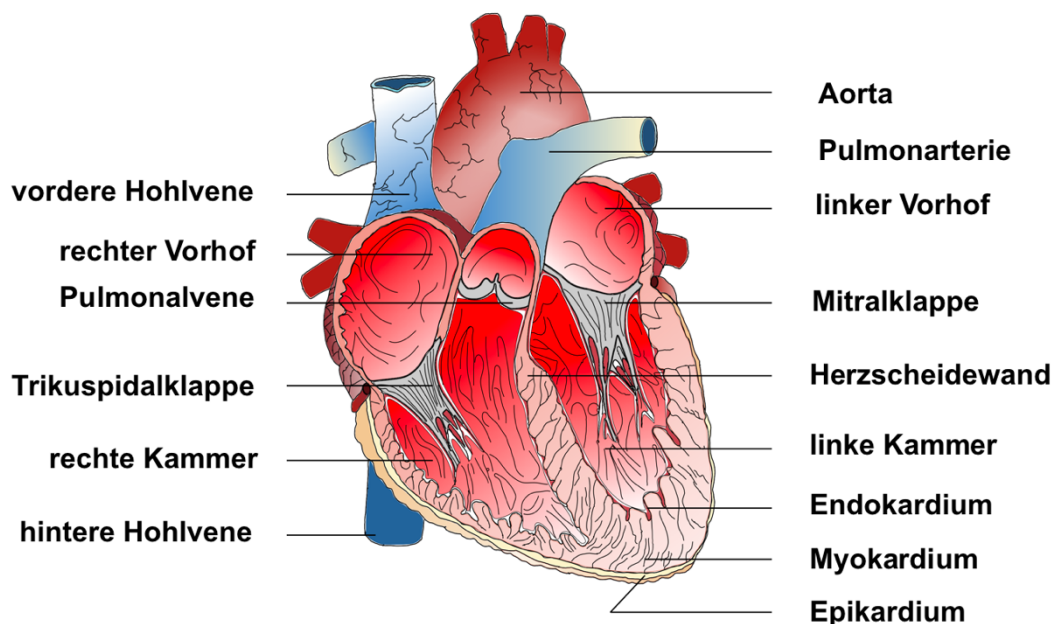
# 1. Einleitung

## 1.1 Das Kardiovaskuläre System

### 1.1.1 Herz

Das Herz ist der Motor des Herz-Kreislauf-Systems, welches Blut mit Hilfe von Gefäßen im Umlauf hält. Somit wird jede Zelle des Körpers zum einen mit lebensnotwendigen Nährstoffen versorgt und dient zum anderen dem Abtransport von Stoffwechselprodukten.

Als Hohlmuskel arbeitend, nimmt das Herz Blut aus den Hohlvenen auf und pumpt es über Arterien wieder in den Körper. Durch die Herzscheidewand (Septum) wird das Herz in eine rechte und in eine linke Herzseite unterteilt. Jede Herzhälfte wiederum besteht aus einem muskelschwachen Vorhof und einer muskelstarken Kammer. Es lassen sich zwei Kreisläufe unterscheiden, der Körperkreislauf und der Lungenkreislauf. Das sauerstofffreie Blut des Körperkreislaufs sammelt sich im rechten Vorhof. Über die Trikuspidalklappe gelangt es in die rechte Kammer von wo es über den *Truncus pulmonalis* dem Lungenkreislauf zugeführt wird. Der linke Vorhof nimmt das nun mit Sauerstoff beladene Blut wieder auf. Von hier aus wird es über die Mitralklappe in die linke Kammer geleitet, welche es über die Aortenklappe wieder in den Körperkreislauf entlässt (Abbildung 1.1).



**Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der Herzanatomie.** Die Abbildung wurde mit freundlicher Genehmigung von Julian Wagner zur Verfügung gestellt.

Der Aufbau der Herzwand lässt sich in drei Schichten unterteilen. Ausgekleidet wird sie durch das Endokard, welches ebenfalls die Herzklappen bildet. Dieses besteht aus einer kontinuierlichen Einzelschicht aus Endothelzellen. Die mittlere Schicht bildet der Herzmuskel, der als Myokard bezeichnet wird und in der linken Kammer am stärksten ausgebildet ist. Aufgebaut wird das Myokard aus Kardiomyozyten, welche in eine Kollagenmatrix eingebettet sind<sup>1</sup>. Kardiomyozyten machen einen Anteil von 25-30% aller Herzzellen aus und stehen in engem Kontakt mit Kapillaren<sup>2</sup>. Das Verhältnis zwischen Endothelzellen und Kardiomyozyten beträgt im Herzen 3:1 und weist darauf hin, dass Kardiomyozyten eine besonders starke Interaktion mit Blutgefäßen eingehen. Zudem zeigt dies, dass das Herz eines der am stärksten vaskularisierten Organe ist<sup>3,4</sup>. Das Epikard bildet die Außenschicht und ist gleichzeitig die Innenschicht des Perikards, sprich des Herzbeutels. Hauptbestandteil des Epikards sind vor allem Zellen des Bindegewebes. Das Perikard schützt das Herz vor mechanischer Reibung, Infektionen und hält es in seiner Position<sup>1</sup>. Lange Zeit wurde angenommen, dass sich das Epikard aus dem Myokard entwickelt. Neuere Studien haben jedoch gezeigt, dass der Ursprung außerhalb des Herzens liegt. Die Vorläuferzellen des sogenannten Proepikardiums werden als multipotente Zellen eingeordnet<sup>5</sup>.

### 1.1.2 Vaskuläres System

Der Aufbau einzelner Bestandteile des Blutgefäßsystems ist neben den unterschiedlichen Bedürfnissen einzelner Zellen und Geweben, für deren Versorgung es verantwortlich ist, auch vom örtlichen hydrostatischen Druck abhängig<sup>6</sup>. Vom Herzen weg wird das sauerstoffreiche Blut über große Arterien in den Körper transportiert. Diese verzweigen sich in immer kleiner werdende Arteriolen, die letztlich als Kapillaren ein dichtes Netzwerk bilden. Aus den Kapillaren gehen Venolen hervor, welche sich zu großen Venen zusammenschließen und das nun sauerstoffarme Blut wieder zurück zum Herzen führen<sup>7</sup>.

Arterien und Venen bestehen aus drei Schichten. Die innere Schicht ist die sogenannte *Tunica intima*, welche aus Endothelzellen aufgebaut ist. Angeheftet an Matrixproteine bilden diese zusammen die Basalmembran. Gefäßmittig liegt die *Tunica media*, welche auch als Muskelschicht bezeichnet wird, da deren Hauptbestandteil glatte Muskelzellen sind. In Arterien können diese durch Kontraktion und Dilatation den

Blutfluss regulieren, weshalb diese Schicht in Arterien auch stärker ausgeprägt ist als in Venen. Die Außenschicht *Tunica externa*, oder auch *Tunica adventitia* genannt, besteht aus faserigem Bindegewebe, welches aus kollagenen und elastischen Fasern aufgebaut ist und dem Gefäß Stabilität gibt. Diese Schicht ist in Venen dominanter ausgeprägt. Dies ist für die Venenfunktion, um das Blut wieder zurück zum Herzen transportieren zu können, von wichtiger Bedeutung. Würde die Venenwand zu stark gedehnt werden, könnte sie dem hydrostatischen Druck nicht standhalten und die Vene würde durch Bildung von Varizen insuffizient werden<sup>7</sup>. Unter dem allmählichen Verlust der glatten Muskelzellschicht und einer sich reduzierenden *Tunica adventitia* erfolgt der Übergang in die Mikrostrombahn. Dadurch sinkt der Druck bereits im Bereich der Arteriolen. Zum völligen Wandverlust kommt es in der terminalen Strombahn. Diese wird von Kapillaren gebildet, deren wesentliche Funktion der Stoffaustausch mit dem Gewebe darstellt. Der Durchmesser ist hier so gering, dass der Transport von Erythrozyten nur noch im verformten Zustand erfolgen kann. Geformt werden diese kleinsten Gefäße von Endothelzellen, die zusammen mit Perizyten die Basalmembran bilden<sup>8</sup>. Je nach Lokalisation auf den Kapillaren können auch glatte Muskelzellen am Endothel anhaften. Es werden im Bereich der Kapillaren drei verschiedene Typen unterschieden: eine ununterbrochene Endothelauskleidung, eine unterbrochene Endothelauskleidung, sowie ein Endothel, welches intrazelluläre Poren besitzt und als fenestriertes Endothel bezeichnet wird<sup>6</sup>. Das Endothel von Kapillaren im Herzen ist aus einem ununterbrochenen Endothel aufgebaut.

## 1.2 Der Alterungsprozess

Das Altern ist nach Lakatta als eine Manifestation von progressiven Dysfunktionen molekularer Mechanismen definiert, die mit der Zeit das Genom und dessen Umwelt ins Ungleichgewicht bringen<sup>9</sup>. Somit stellt es einen nicht unerheblichen Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen dar<sup>10</sup>. Kardiovaskuläre Krankheiten gelten global als häufigste Todesursache<sup>11</sup>, was deren Erforschung eine besondere Bedeutung beimisst. Charakteristisch ist der Verlust der physiologischen Integrität und der physiologischen Funktion, welches in gesteigertem Maße zum Tod führt. Gründe seien nach López-Otín beispielsweise genomische Instabilität, Verkürzung von Telomeren, epigenetische Veränderungen, der Verlust der Proteostasis, mitochondriale Dysfunktion, zelluläre Seneszenz oder auch eine gealterte intrazelluläre Kommunikation<sup>12</sup>.

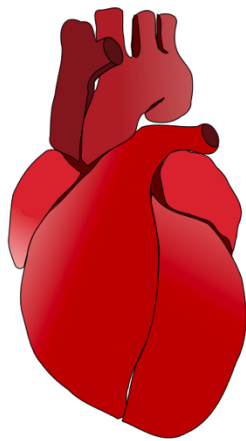
Oftmals wird der Begriff des „Alterns“ mit dem Begriff „Krankheit“ gleichgesetzt, obwohl viele Menschen ein hohes Alter erreichen ohne zu erkranken. Trotzdem steigt das Risiko von pathophysiologischen Manifestationen<sup>13</sup>. Veränderungen finden sowohl extrazellulär als auch intrazellulär statt und führen letztlich zu altersbedingten Umbauvorgängen<sup>14</sup>.

### 1.2.1 Das alternde Herz

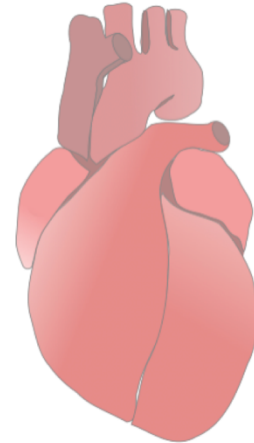
Die Folge des Alterungsprozesses ist eine Veränderung der Anatomie, wie zum Beispiel eine veränderte Geometrie der Herzkammern, die die kardiale Funktion beeinflussen kann<sup>14</sup>. Dies resultiert beispielsweise in einem dilatierten linken Vorhof<sup>15</sup> oder der Hypertrophie des linken Ventrikels, welches zu Einbußen der diastolischen Funktion führen kann<sup>16</sup>. Die Herzwand ist verdickt und es kommt zu einem Anstieg von interstitieller Fibrose<sup>9</sup>. Der Verlust der physiologischen Funktion beinhaltet im Genauen den Verlust an Flexibilität und Robustheit<sup>17</sup>. Auf Zellebene sinkt die Fähigkeit für Regeneration und Proliferation<sup>18</sup>, wohingegen die Anfälligkeit für Apoptose steigt. Hierfür verantwortlich können neben oxidativem Stress, zumeist ausgelöst durch reaktive oxidative Spezies, auch eine veränderte Kalziumregulation oder der Verlust von Kardiomyozyten sein<sup>19</sup>. Zu den kardiovaskulären Krankheiten zählen zum Beispiel Arteriosklerose, Bluthochdruck, Herzfehler oder Vorhofflimmern<sup>9</sup> (Abbildung 1.2). Molekulare Mechanismen, die den Alterungsprozess in den Gefäßen beeinflussen, sind allerdings noch wenig erforscht und sollen in dieser Arbeit genauer untersucht werden.



Autophagie	Gealterte intrazelluläre Kommunikation	Genomische Instabilität	Epigenetische Veränderungen
Verlust Proteostasis	Zelluläre Seneszenz	Telomerverkürzung	Mitochondriale Dyfunktion



Alterungsprozess



Hypertrophie	Fibrose	Versteifung	Bluthochdruck
Dilatation	Kalzifizierung	Arteriosklerose	Vorhofflimmern

Abbildung 1.2: Altersabhängige Veränderungen des Herzens auf zellulärer und anatomischer Ebene.

### 1.2.2 Das alternde Gefäßsystem

Von alterungsbedingten Umbauvorgängen ist der gesamte Gefäßapparat betroffen. Sowohl im Bereich der großen Arterien als auch in der Mikrostrombahn kommt es zu Wandverdickungen und einem vergrößerten Lumendurchmesser<sup>20</sup>. In großen Arterien reduziert sich die Proliferationseigenschaft von Endothelzellen, wodurch glatte Muskelzellen in die *Tunica intima* eindringen und in ihrer Zellzahl rapide ansteigen können. Durch den Anstieg von Kollagen und weiterer fibroblastischer Komponenten, verliert das Gefäß an Flexibilität und es kommt folglich zu dessen Versteifung<sup>21</sup>.

## 1.3 Perizyten

### 1.3.1 Morphologie und Lokalisation

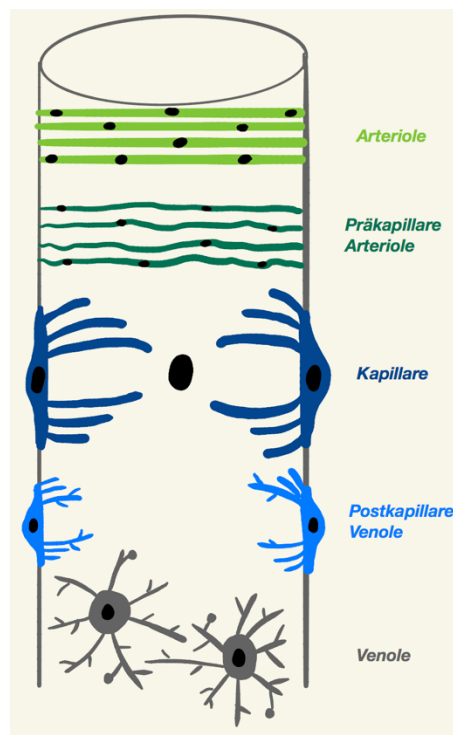
Perizyten wurden erstmals 1871 von Although Ebert erwähnt und zwei Jahre später vom französischen Forscher Charles-Marie Benjamin Rouget als Population kontraktile Zellen im Zusammenhang mit kleinen Blutgefäßen beschrieben. Basierend auf ihrem Entdecker erhalten sie den Namen „*Rouget cells*“. Zimmermann führt im Jahre 1923 den Namen „Perizyten“ ein, zurückzuführen auf deren eng benachbarte Lokalisation zu Endothelzellen<sup>22</sup>.

Perizyten sind kapillar-assoziierte Zellen, welche in vielen verschiedenen Geweben vorkommen. Abhängig von ihrer Lokalisation zeigen sie eine unterschiedliche Morphologie und Funktion<sup>23</sup>. Die höchste Perizyten-dichte ist in der Retina und dem zentralen Nervensystem vorzufinden. Grund hierfür ist deren wichtige Funktion im Zusammenhang mit der Blut-Hirn-Schranke und Blut-Retina-Schranke<sup>24,25</sup>.

Ein Perizyt besitzt einen großen zentralen Zellkern mit einem kleinen Anteil an Zytoplasma. Neben dem Nukleus ist ein Golgi-Apparat, Mitochondrien und ein raues Endoplasmatisches Retikulum vorzufinden. An der inneren und äußeren Plasmamembran sind dichte Filamentbanden lokalisiert, welche Actin, Myosin und Tropomyosin beinhalten. Es liegen verschiedene Isoformen von Myosin vor. Die sogenannte „Smooth-Muscle-Isoform“ findet sich vorwiegend in Arteriolen und Venolen, wohingegen die „Non-Smooth-Muscle-Isoform“ in hoher Konzentration in Kapillaren vorzufinden ist<sup>26</sup>. Perizyten sind in die Basalmembran kleiner Blutgefäße eingebettet, welche neben Perizyten auch aus Endothelzellen aufgebaut sind<sup>8</sup>. Das Perizyten-Endothel-Verhältnis der gestreiften Muskulatur beträgt 1:100, wohingegen das Verhältnis im Gehirn nur 1:3 beträgt<sup>27</sup>. Die beiden Zelltypen stehen in engem Kontakt miteinander. Zum einen penetrieren die Zellfortsätze der einen Zelle jeweils mit den Zellfortsätzen der anderen, was unter dem Begriff „*peg and socket contacts*“ definiert ist und zum anderen stehen die Zytoplasmen über *Tight Junctions* in direktem Kontakt miteinander<sup>26</sup>. Es werden noch viele weitere Kontakte beschrieben, beispielsweise der Kontakt über Desmosomen<sup>28</sup>.

Mit ihren langen zytoplasmatischen Ausläufern treten Perizyten nicht nur mit einer Vielzahl von Endothelzellen in Kontakt, sondern können auch Signale über die gesamte Länge eines Blutgefäßes weiterleiten<sup>29</sup>. Es ist möglich, dass ein Perizyt mehr als eine Kapillare des Gefäßsystems umspannen kann<sup>30</sup>. Im Allgemeinen können nach der Klassifikation von Zimmermann drei verschiedene Perizyten-typen differenziert

werden: Präkapillare Perizyten, welche am distalen Ende von Arteriolen zu finden sind, besitzen einen ovalen Zellkörper und können mit ihren asymmetrischen fingerartigen Fortsätzen das Endothelium umhüllen. Kapillare Perizyten haben dagegen einen länglichen Zellkörper mit zwei schmalen Fortsätzen auf jeder Seite. Postkapillare Perizyten finden sich auf der venolen Seite von Kapillaren und sind spinnenartig. Mit ihren Fortsätzen bilden sie somit ein dichtes Netzwerk<sup>31</sup>. Die Perizyten-dichte steht ebenfalls im Zusammenhang mit dem örtlichen Blutdrucklevel. Im distalen Bereich der Beine und in den Füßen, wie zum Beispiel beim Menschen und bei Pferden, wird ein erhöhter Blutdruck benötigt, um das Blut aufwärts zu pumpen, weshalb die Perizytenanzahl in dieser Region besonders hoch ist<sup>32</sup>. Letztlich handelt es sich bei Perizyten um einen sehr heterogenen Zelltyp. Je nach Organ liegen spezifische Perizytensubpopulationen vor, welche neben einem veränderten Phänotyp auch unterschiedliche funktionelle Rollen einnehmen können. Diese Heterogenität ist bisher noch in sehr geringem Maße erforscht<sup>33</sup> (Abbildung 1.3).



**Abbildung 1.3: Unterschiedliche Perizytenarten im jeweiligen Blutgefäßsystem.** Die Heterogenität von Perizyten ist gefäß- und organspezifisch. Abhängig von der Funktion und dem daraus resultierenden Phänotyp kommt es auch zur Expression unterschiedlicher Marker.

### 1.3.2 Identifikation von Perizyten

Aufgrund der geringen Verfügbarkeit von spezifischen Perizytenmarkern sind Perizyten ein kaum definierter Zelltyp<sup>22</sup>. Somit können die im Folgenden aufgezählten Marker für Perizyten genutzt werden, allerdings variieren diese Marker aufgrund der hohen Heterogenität von Perizyten in Abhängigkeit von der Lokalisation in verschiedenen Organen<sup>30,34</sup>. Außerdem ist zu berücksichtigen, dass diese Marker auch von anderen Zellarten, wie zum Beispiel Fibroblasten oder Endothelzellen, exprimiert werden. Ein wichtiger molekularer Marker für Perizyten ist *Chondroitin sulfate proteoglycan4/neural glial antigen 2* (NG2), welcher auf der Zelloberfläche exprimiert wird und im Zusammenhang mit Angiogeneseprozessen steht<sup>35,36</sup>. Dieses Transmembranprotein stimuliert durch die Bindung an Endothelzellen deren Motilität und Gefäßneubildung<sup>37</sup>. Sehr intensiv erforscht wurde bereits der *Platelet-derived growth factor receptor beta* (PDGFR $\beta$ )<sup>38,39</sup>, welcher in Kapitel 1.4 näher beschrieben wird. Neben Desmin<sup>40</sup> und Vimentin<sup>41</sup> gehört auch *alpha smooth muscle actin* ( $\alpha$ SMA) zu den Perizytenmarkern, die der Gruppe der kontraktilen Filamente zugeordnet werden können.  $\alpha$ SMA wird neben Perizyten auch von glatten Muskelzellen exprimiert, allerdings findet die Expression nicht in kapillaren Perizyten statt<sup>42</sup>. Hierbei handelt es sich um globuläre Proteine, welche in Zusammenarbeit mit Myosinen in der Muskulatur Kontraktionen hervorrufen können<sup>43</sup>. CD146, welches auch als *melanoma cell adhesion molecule* (MCAM) bekannt ist, gehört als membranöses Glykoprotein zu den Adhäsionsmolekülen. Somit trägt es zur Interaktion zwischen den Zellen bei<sup>44</sup>. Neben Perizyten wird es auch von glatten Muskelzellen und Endothelzellen exprimiert<sup>45</sup>. Eine wichtige Funktion besteht in der Aktivierung von PDGFR $\beta$  und der Integrität der Blut-Hirn-Schranke<sup>46</sup>.

Neben der Art des Organs haben immunhistochemische Verfahren bewiesen, dass die Expression unter anderem auch abhängig ist von dem Gefäßtyp, dem Entwicklungszustand, den pathologischen Umständen und *in vitro* beziehungsweise *in vivo* Bedingungen. Deshalb sollten neben der Berücksichtigung der anatomischen Zusammenhänge mindestens zwei verschiedene Marker zur Perizytenidentifikation herangezogen werden<sup>47</sup>.

### 1.3.3 Funktion

Die Perizytenfunktion wird vornehmlich mit der Stabilisation und der Hämodynamik des Blutdruckes assoziiert<sup>30</sup>. Perizyten sind in der Lage die Gefäßkonstriktion und Gefäßdilataion zu beeinflussen, um den Blutdruck regulieren zu können<sup>23</sup>. Hierfür mitverantwortlich sind die kontraktile Proteine Actin, Myosin und Tropomyosin<sup>48,49</sup>. Beispielsweise ist Actin in der Lage die Myosin Mg<sup>2+</sup>-ATPase zu aktivieren<sup>50</sup>. Außerdem besitzen Perizyten cholinerge und adrenerge Rezeptoren. Die Ligandenbindung am  $\alpha$ 2-Rezeptor führt zu einer Kontraktion<sup>51</sup>, wohingegen die  $\beta$ -adrenerge Antwort antagonistisch eine Dilatation zur Folge hat<sup>52</sup>.

Im Bereich der Blut-Hirn-Schranke interagieren Perizyten mit Astrozyten, Neuronen und auch Endothelzellen, welche alle zusammen eine neurovaskuläre Einheit bilden<sup>53</sup>. Im Vergleich zu Perizyten aus anderen Organen, besitzen Gehirnperizyten neben einem mesodermalen auch einen neuroektodermalen Ursprung. Die Blut-Hirn-Schranke reguliert den parazellulären Durchfluss zwischen Zellen und schützt vor dem Eindringen schädigender Substanzen. Hier erfüllen Perizyten wichtige Funktionen, wie zum Beispiel die Unterstützung der Homöostase oder die Aufrechterhaltung der Stabilisierung der Barrierefunktion. Ein Verlust von Perizyten in diesem Bereich führt bewiesenermaßen zu einer erhöhten Permeabilität und somit zum Austritt vom Plasmaproteinen und dem Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke<sup>34</sup>.

Eine weitere Charaktereigenschaft von Perizyten ist die Fähigkeit, die Gefäßentwicklung aktiv beeinflussen zu können. Während der Embryogenese entwickeln sich Blutgefäße in einem sehr frühen Stadium aus mesodermalen Vorläuferzellen, den sogenannten Angioblasten. Die genaue Herkunft ist noch nicht eindeutig geklärt. Es ist anzunehmen, dass Endothelzellen und hämatopoetische Zellen beide aus Hämangioblasten entspringen, was durch die Tatsache zu untermauern ist, dass sich beide einige gemeinsame molekulare Marker teilen<sup>54</sup>. Die Ontogenese von Perizyten ist sehr breit. Abhängig von ihrer Lokalisation im Organismus können sie sich aus verschiedenen Zellen entwickeln. Am besten erforscht ist deren Ursprung aus mesenchymalen Stammzellen<sup>55</sup>. Beispielsweise existiert ein VEGFR2-exprimierender Vorläuferzelltyp, der sich bei Anwesenheit von VEGF in Endothelzellen oder bei Vorhandensein von PDGF-B in glatten Muskelzellen weiter differenzieren kann<sup>56</sup>. Nachdem die Bildung des primären Kapillarplexus abgeschlossen ist, entsteht ein funktionelles Gefäßnetzwerk durch Angiogenese. Der Prozess ist unter anderem durch Angiogenesefaktoren, wie zum Beispiel VEGF,

gekennzeichnet, welche zur Proliferation und Migration von Endothelzellen führen<sup>57</sup>. Auch Perizyten sind zum Teil zur Expression dieser Faktoren in der Lage<sup>58</sup>. Das von Endothelzellen exprimierte PDGF-B bindet an den PDGFR $\beta$ , welcher an den Perizyten lokalisiert ist<sup>59</sup>. Da angenommen wird, dass Perizyten Angiogenesesignale über den Kontakt zahlreicher Endothelzellen entlang des gesamten Gefäßes übertragen können, kann von einer parakrinen Signalübertragung gesprochen werden<sup>60</sup>. Es ist bereits dokumentiert, dass Perizyten die temporäre Lücke zwischen zwei keimenden Endothelzellen überbrücken können, was den Angiogeneseprozess unterstützt<sup>35</sup>.

#### 1.3.4 Herzperizyten

Die Perizytenforschung im 20. Jahrhundert war relativ unterrepräsentiert. Mit steigenden Standards im Bereich von Technologien und Techniken hat diese jedoch die letzten 15 Jahren exponentiell zugenommen. Publikationen beschäftigten sich mit Perizyten in verschiedenen Organen. Für *in vitro* Versuche eigneten sich besonders Gehirnperizyten, die diesbezüglich als Modellperizyt etwa 25% aller Publikationen ausmachen<sup>61</sup>.

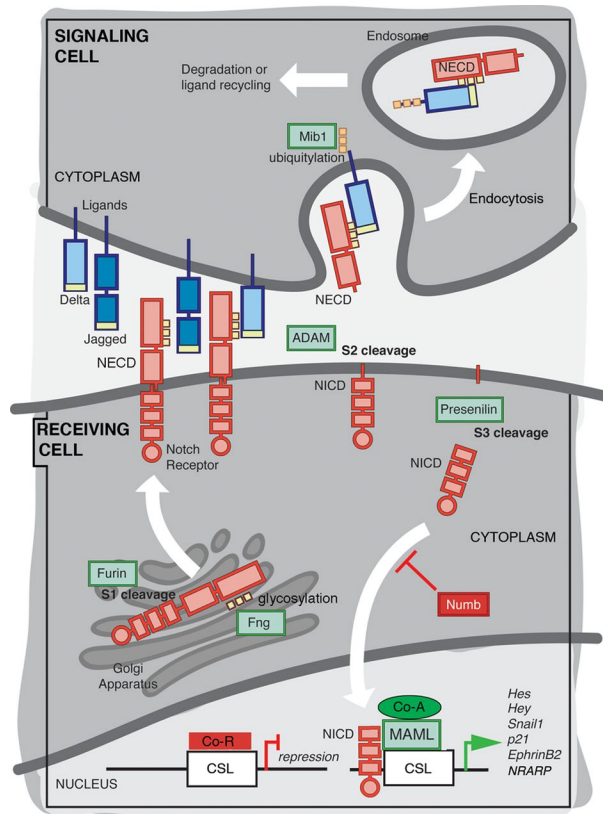
Wie in Abschnitt 1.3.3 erwähnt, besitzen Perizyten eine pleiotrope Aktivität, was sie für die regenerative Medizin sehr interessant macht. Da das Herz ein extrem vaskularisiertes Organ ist, ist die kardiale Perizytenforschung von besonderem Interesse. Eine Dysfunktion kann somit zu verschiedenen pathologischen Erkrankungen des Herzens, wie zum Beispiel arterieller Hypertonie oder myokardialen Ödemen führen<sup>62</sup>. Die bisher am häufigsten vorkommenden Zellpopulationen im Herzen sind Endothelzellen, gefolgt von Fibroblasten<sup>2</sup>. Verschiedene Arbeitsgruppen haben Perizyten bereits aus dem Herzen isolieren können. Beispielsweise durch eine Dichtegradientenzentrifugation nach enzymatischem Verdau des Herzgewebes<sup>63</sup>. Im Vergleich zu mikrovaskulären Perizyten, konnten Herzperizyten auch an der Gefäßwand von präkapillären Arteriolen und postkapillären Venolen identifiziert werden<sup>64</sup>. Funktionell ist bei Herzperizyten die Endothelzell-Perizyten- und Perizyten-Matrix-Barriere von besonderer Bedeutung. Durch deren Regulation kann der Durchfluss nutritiver Substanzen und somit auch die Aufrechterhaltung des Kardiomyozyten-Metabolismus gewährleistet werden<sup>62</sup>.

## 1.4 Notch3

Notch ist eine Familie von Signalproteinen, die für die Herzentwicklung von besonderer Bedeutung sind<sup>65</sup>. Der Grund für verschiedene kongenitale kardiovaskuläre Erkrankungen können auf Mutationen einzelner, dem Notch-Signalweg angehöriger Elemente zurückgeführt werden<sup>66</sup>.

Notch Proteine sind Transmembranproteine, welche neben einer großen extrazellulären Domäne (NECD) auch eine intrazelluläre Domäne (NICD) besitzen, die unter anderem auch eine Transkriptions-Aktivierungs-Domäne beinhalten<sup>67</sup>. Hierbei dient die intrazelluläre Domäne als Transkriptionsfaktor<sup>68</sup>. In Säugetieren können vier verschiedene Notch Proteine (Notch 1 bis 4) unterschieden werden<sup>69</sup>. Deren extrazelluläre Domäne ist in der Zellmembran verankert und interagiert mit membrangebundenen Liganden, welche der Delta- oder Jagged-Familie angehören. Durch eine Bindung zwischen Rezeptor und Ligand kommt es zu einem Zell-Zell-Kontakt und somit zur Signalübertragung<sup>67</sup>. Nach Ligandenbindung wird die intrazelluläre Domäne mobil und wandert zum Zellkern der Empfängerzelle<sup>69</sup>. Im Zellkern bindet die intrazelluläre Domäne direkt am Transkriptionsfaktor RBPJK<sup>70</sup>, was die Rekrutierung des Ko-Aktivators Mastermind-like (MAML) bewirkt. Der so entstandene RBPJK-NICD-MAML-Komplex führt zu einer Aktivierung verschiedener Zielgene, welche beispielsweise der Hey-Familie angehören<sup>71</sup>. Im Allgemeinen ist das Spektrum an Notch-Zielgenen sehr groß (Abbildung 1.4).

Der Notch3 Rezeptor ist auf der Oberfläche von Perizyten und glatten Muskelzellen lokalisiert<sup>72</sup>. Verschiedene Studien liegen bereits vor, die zeigen, dass beispielsweise Notch3 vor kardialer Fibrose schützt<sup>73</sup>. Eine Mutation kann das Risiko eines myokardialen Infarkts erhöhen<sup>74</sup> und reduziert, wie bereits bewiesen, die kapillare Dichte im Gehirn<sup>75</sup>.



**Abbildung 1.4: Schematische Darstellung des Notch-Signalwegs.** Abbildung ist entnommen aus Luxán et al, 2015<sup>76</sup>. Mit freundlicher Genehmigung von Wolters Kluwer Health, Inc. (Wolters Kluwer Health, Inc. Licence erlaubt Verwendung).

## 1.5 PDGFR $\beta$

Die *platelet-derived growth factor receptor* (PDGFR) -Familie ist sowohl wichtig für die Migration als auch für die Proliferation von Perizyten<sup>77</sup>. Als Ligand dienen vier verschiedene Faktoren: PDGF-A, PDGF-B, PDGF-C und PDGF-D. Diese sind auf verschiedenen Chromosomen lokalisiert und bilden jeweils Dimere, die aus zwei gleichen Untereinheiten bestehen können. Durch proteolytische Prozesse kommt es zur Aktivierung von verschiedenen Isoformen. Bei PDGF-B findet dieser Prozess intrazellulär statt<sup>78</sup>. Manche PDGFs werden als latente Form aus der Zelle ausgeschieden und mit Hilfe von verschiedenen Proteasen, zum Beispiel Plasminogen, aktiviert<sup>79</sup>. Neben den oben genannten vier Homodimeren existiert auch das Heterodimer PDGF-AB.

Für die PDGF-Rezeptoren existieren zwei Gene: PDGFR-alpha (PDGFRa) und PDGFR-beta (PDGFRb). Hierbei handelt es sich um einen Tyrosin-Kinase-Rezeptor, welcher aus einer extrazellulären Domäne besteht, der für die Ligandenbindung



verantwortlich ist und einem intrazellulären Teil mit Tyrosin-Kinase-Aktivität. Durch die Bindung des Liganden PDGF an den Rezeptor kommt es zur Aktivierung und somit zur Phosphorylierung des Tyrosins, was letztlich eine intrazelluläre Signalkaskade in Gang setzt<sup>80,81</sup>. Beide Rezeptoren üben unterschiedliche Funktionen aus, wodurch ein jeweiliger Defekt oder eine Mutation auch zu meist unterschiedlichen Entwicklungsstörungen führen kann<sup>82,83</sup>. Veränderungen von PDGFRb beeinflussen bewiesenermaßen verschiedene tumoröse Prozesse, beispielsweise im Bereich der Tumorangiogenese oder -regulation<sup>84</sup>. Im Rahmen der Gefäßentwicklung können Hämorrhagien oder Ödeme die Folge sein<sup>38</sup>.



## 2. Ziel der Arbeit

Während sich in den letzten Jahrzehnten der Fokus der Perizytenforschung vor allem auf das Gehirn zentrierte, stand die Erforschung von Herzperizyten noch nicht im Vordergrund. Vorangegangene Arbeiten haben bereits gezeigt, dass perivaskuläre Zellen eine hohe Organspezifität aufweisen. Da kardiovaskuläre Erkrankungen weltweit als eine der häufigsten Todesursachen gelten und das Altern einen großen Risikofaktor für pathologische Manifestationen darstellt, soll das Ziel dieser Arbeit sein, einen tieferen Einblick auf molekulare Mechanismen zu geben, welche alternde Perizyten im Herzen regulieren. Hierbei sollen die im Folgenden aufgeführten Punkte genauer untersucht werden:

- Verändert sich der Perizytenphänotyp während des Alterungsprozesses im Herzen und falls ja, inwiefern?
- Welche Perizyten-exprimierten Gene werden im Alter beeinflusst?
- Welchen funktionellen Effekt hat die Genregulation auf die Perizytenbiologie?
- Etablierung eines Isolationsprotokolls für kardiale, murine Perizyten

Die Versuchstierkunde, als Zweig der Veterinärmedizin, dient in der Wissenschaft als Grundlage für die Erforschung von Krankheiten und einer darauf aufbauenden Therapiefindung für den veterinärmedizinischen als auch den humanmedizinischen Bereich. Hierbei werden vor allem auf die Spezies Maus und Schwein aufgrund physiologischer Gemeinsamkeiten zurückgegriffen. Da die westliche Gesellschaft stetig älter wird, ist es von fundamentaler Bedeutung die Physiologie des Alterns in Tiermodellen zu erforschen. Dies zeigt sich insbesondere in der Prävalenz von koronaren Herzkrankheiten, deren Auftreten durch fortgeschrittenes Altern erhöht ist und daher das Erforschen der Physiologie des alten Herzens unumgänglich macht.



### 3. Materialien

<b>Zelllinien</b>		
<b>Material</b>	<b>Typ</b>	<b>Herkunft</b>
Humane Endothelzellen	HUVEC	Katalog-Nr.: CCCC-2519 Lonza, Basel, Schweiz
Humane Gehirnperizyten	Primary Cell 4DxKit L	Katalog-Nr.: V4XP-5024 Lonza, Basel, Schweiz

<b>Antikörper</b>	
<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>
Alexa Fluor 488 donkey-anti-rabbit IgG (H+L)	Katalog-Nr.: A21206 Invitrogen, Eugene, Oregon
Alexa Fluor 594 donkey-anti-rat IgG (H+L)	Katalog-Nr.: A21209 Invitrogen, Eugene, Oregon
Alexa Fluor 488 donkey-anti-rat IgG (H+L)	Katalog-Nr.: A21208 Thermo Fisher Scientific, Dreieich; Deutschland
Alexa Fluor 405 conjugate, streptavidin	Katalog-Nr.: S32351 Invitrogen, Eugene, Oregon
Alexa Fluor 647 conjugate, streptavidin	Katalog-Nr.: S0-142 Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland
Anti-Actin alpha smooth muscle Antibody, mouse monoclonal Cy3, Clone: 1A4	Katalog-Nr.: C6198 Sigma Aldrich; Missouri, USA
Anti-Mo CD31 (PECAM-1), Clone: 390	Katalog-Nr.: 14-03111-82 Invitrogen, Kalifornien, USA
Anti-Mo CD45, Clone: 30-F11	Katalog-Nr.: 14-0451-82 Invitrogen, Kalifornien, USA
Anti-Mo CD140b (PDGFRB), Clone: APB5	Katalog-Nr.: 14-1402-82 Invitrogen, Kalifornien, USA
Biotinylated Griffonia Simplicifolia Lectin 1Isolectin B4	Katalog-Nr.: B-1205 Vector, Buringame, Kalifornien
NG2 monoclonal Antibody (546N30)	Katalog-Nr.: MA5/24247 Invitrogen, Roxckford, Illinois, USA
Anti-NG2 Chondroitin Sulfate Proteoglycan	Katalog-Nr.: ab5320 Milipore, Darmstadt, Deutschland
Höchst 33342	Katalog-Nr.: A583218 Ana Spec.Inc., Fremont, Kalifornien
Monoclonal Rat IgG <sub>2B</sub> Clone # TER-119	Katalog-Nr.: MAB1125 R&D Systems, Minneapolis, Minnesota
Notch 3 (M-134) rabbit polyclonal IgG	Katalog-Nr.: sc-5593 Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA
Rat-mAb to PDGFRalpha (APA5)	Katalog-Nr.: ab90967 Abcam, Cambride, Vereinigtes Königreich

Primer			
Name	Art	Sequenz	
		Forward	Reverse
Po	human	5'TCGACAATGGCAGCATCTAC	5'ATCCGTCTCCACAGACAAGG
Notch3	human	5'CGCGTGGCTTCTTTCTACTG	5'AGATAGCATCCTCGTGGCAG
Pdgfrb	human	5'GGTCCAGCTCTCCTTCCAG	5'ACTGTCTGTTCCCCACTGTC
Zeb1	human	5'CAGGGAGGAGCAGTGAAAGA	5ACATCCTGCTTCATCTGCCT

Chemikalien und Reagenzien	
Name	Hersteller
BCECF, AM	Katalog-Nr.: B1150 Fisher Scientific, Loughborough, UK
Bovine Serum Albumin	Katalog-Nr: A7030-10G Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Chloroform	Katalog-Nr.: BP1145-1 Fisher BioReagents, Geel, Belgien
Destilliertes Wasser	Katalog-Nr.: 10977-035 Gibco, Paisley, UK
Dil acetylated low-density lipoprotein (LDL)	Katalog-Nr.: L3484 Life technology, Oregon, USA
Dimethyl sulfoxide Cell culture grade	Katalog-Nr.: A367,0100 AppliChem, Darmstadt, Deutschland
dNTP Mix 100mM	Katalog-Nr.: 362271 AB, Warrington, UK
0.1M DTT	Katalog-Nr.: P/NY00147 Invitrogen, Kanada
Dynabeads Sheep anti-Rat IgG	Katalog-Nr.: 11035 Invitrogen, Vilnius, Litauen
0.5 M EDTA	Katalog-Nr.: 15575-038 Invitrogen, New York, USA
Ethanol >99.8%	Katalog-Nr.: E/0650DF/C17 Fisher Scientific, Loughborough, UK
Fast SYBR Green Master Mix	Katalog-Nr.: 00685503 Applied Biosystems by ThermoFisher Scientific, Dreiech, Deutschland
Fibronectin human plasma	Katalog-Nr.: F0895 Sigma Aldrich, Missouri, USA
5X First Strand Buffer	Katalog-Nr.: P/NY02321 Invitrogen, Kalifornien, USA
Fluorescein isocyanatdextran 70kDa	Katalog-Nr.: FD70S-100MG Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Fluoromount-G	Katalog-Nr.: 00-4958-02 Invitrogen, Kalifornien, USA
Gelatin solution	Katalog-Nr. G1393-100ML Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Histamin	Katalog-Nr.: H7125 Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Isofluran	Katalog-Nr.: G37C18A

	Piramal, Nothumberland, UK
Kontaktöl	Katalog-Nr.: 518 F Carl Zeiss Jena, Oberkochen, Deutschland
Lipofectamin RNAiMAX	Katalog-Nr.: P/N56532 Invitrogen, Litauen
Matrigel Matrix	Katalog-Nr.: 354230 Corning, Bedford, USA
MTT	Katalog-Nr.: M6494 Thermo Fisher Scientific, Dreieich; Deutschland
Normal Donkey Serum	Katalog-Nr.: 017-000-121 Jackson Immuno Research
O.C.P. Compound	Katalog-Nr.: 4583 Sakura, Tokio, Japan
Penicillin-Streptomycin (500x)	Katalog-Nr.: 11074440001 Roche, Mannheim, Deutschland
Poly-L-lysine solution	Katalog-Nr.: P4707 Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Random Hexamer Primer	Katalog-Nr.: S0-142 Thermo Fisher Scientific, Dreieich; Deutschland
Reagent A100 – Lysis Buffer	Katalog-Nr.: 910-0003 ChemoMetec A/S, Allerød, Dänemark
Reagent B – Stabilizing Buffer	Katalog-Nr.: 910-0002 ChemoMetec A/S, Allerød, Dänemark
RNase Inhibitor, 2000U	Katalog-Nr.: N8080 Thermo Fisher Scientific, Dreieich; Deutschland
Roti-Histofix 4%	Katalog-Nr.: P087.4 Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
Quiazol Lysis Reagent	Katalog-Nr.: 217004 Qiagen, Maryland, USA

<b>Zellisolation, Zellkulturmedien und Ergänzungen</b>	
<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>
DPBS - Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (1X)	Katalog-Nr.: 14190-094 Gibco® by Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
EBM - Endothelial Cell Basal Medium	Katalog-Nr.: CC-3121 Lonza, Verviers, Belgien
EGM SingleQuots – Endothelial Growth Medium	Katalog-Nr.: CC-4176 Lonza, Verviers, Belgien
DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium + GlutaMAX	Katalog-Nr.: 31966-021 Gibco® by Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
FBS - Fetal bovine serum	Katalog-Nr.: 10270-106

	Gibco® by Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham USA
FBS – Fetal bovine serum	Katalog-Nr.: 0010 Sciencell Research Laboratories, Carlsbad USA
HBSS - Hanks´Balanced Salt Solution (1X)	Katalog-Nr.: 14025-050 Gibco, Paisley, UK
HBSS - Hanks´Balanced Salt Solution (1X)	Katalo-Nr.: 14175-053 Gibco, Paisley, UK
Opti-MEM (1X) + GlutaMAX	Katalog-Nr.: 51985-026 Gibco, Paisley, UK
PM - Pericyte Medium	Katalog-Nr.: 1201 Sciencell Research Laboratories, Carlsbad USA
PGS	Katalog-Nr.: 1252 Sciencell Research Laboratories, Carlsbad USA
P/S Solution	Katalog-Nr.: 0503 Sciencell Research Laboratories, Carlsbad USA

<b>Verbrauchsmaterialien</b>		
<b>Material</b>	<b>Typ</b>	<b>Herkunft</b>
Braunüle	24G	Katalog-Nr.: 4657675 B-Braun, Melsungen, Deutschland
C-Tube	Gentle Macs C Tubes	Katalog-Nr.: 130-096-334 Miltenyi Biotech
Deckgläser	24x60mm	Katalog-Nr.: 24X60-1W-YO Thermo Scientific, Waltham USA
Einsätze	Thincert Cell Culture Insert for 24-Well-Plate, 1 $\mu\text{m}$	Katalog-Nr.: 662610 Greiner Bio-one International GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Falcon 15ml	Cellstar Tubes	Katalog-Nr.: 188271 Greener-bio one, Frickenhausen, Deutschland
Falcon 50ml	Cellstar Tubes	Katalog-Nr.: 227261 Greener-bio one, Frickenhausen, Deutschland
Filter	200 $\mu\text{m}$ Nylon	Katalog-Nr.: 43-50200-01 pluriSelect, Leipzig, Deutschland
Filter	70 $\mu\text{m}$ Nylon	Katalog-Nr.: 352350 Corning, New York, USA
NucleoCassette		Katalog-Nr.: 941-0001 ChemoMetec A/S, Allerød, Dänemark



Objektträger	Superfrost Plus	Katalog-Nr.: J1810AMNZ Thermo Scientific, Braunschweig, Deutschland
Parafilm	M	Katalognummer-Nr.: PM-996 Bemis, Neenah, Wisconsin
Petrischale	60x15mm	Katalog-Nr.: 628 160 Greiner Bio-one International GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Pipettenspitzen	10/20 $\mu$ l	Katalog-Nr.: S1180-3710 Starlab, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen	100 $\mu$ l	Katalog-Nr.: S1180-1840 Starlab, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen	1000 $\mu$ l	Katalog-Nr.: S1182-1730 Starlab, Hamburg, Deutschland
Reaktionsgefäß	1.5ml	Katalog-Nr.: 616 201 Greiner Bio-one International GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Reaktionsgefäß	2.0ml	Katalog-Nr.: 0030 120.094 Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Reaktionsplatte	MicroAmp Fast 96- Well (0.1ml)	Katalog-Nr.: 4346907 Applied Biosystems, China
Reaktionsplatte	Microplate 96 Well, PS, F-Bottom	Katalog-Nr. 655097 Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Reaktionsplatte	12-Well-Plate	Katalog-Nr.: 665180 Greiner Bio-one International GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Reaktionsplatte	24-Well-Plate	Katalog-Nr.: 662160 Greiner Bio-one International GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Reaktionplatte	48-Well-Platte	Katalog-Nr.: 150687 Thermo Scientific, Braunschweig, Deutschland
Spritze	Inject 5ml	Katalog-Nr.: 4606051V B-Braun, Melsungen, Deutschland
Spritze	Inject 10ml	Katalog-Nr.: 4606108V B-Braun, Melsungen, Deutschland
Spritze	Inject 20ml	Katalog-Nr.: 4606205V B-Braun, Melsungen, Deutschland
Stripetten	5ml	Katalog-Nr.: 4487 Corning, New York, USA
Stripetten	10ml	Katalog-Nr.: 4488 Corning, New York, USA

Stripetten	25ml	Katalog-Nr.: 4489 Corning, New York, USA
Zellkulturflasche	75cm <sup>2</sup>	Katalog-Nr.: F010013 Greiner Bio-one International GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturplatte	24 Well Cell Culture Plate	Katalog-Nr.: 662 160-01 Greiner Bio-one International GmbH, Frickenhausen, Deutschland

<b>Enzyme</b>	
<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>
Kollagenase Typ II	Katalog-Nr.: 17101015 Gibco® by Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
M-MLV Reverse Transcriptase, 40000U	Katalog-Nr.: 28025-013 Invitrogen, Kalifornien, USA
2,5% Trypsin	Katalog-Nr.: 15090-046 gibco, Paisley, UK

<b>siRNA</b>		
<b>Gen</b>	<b>Art</b>	<b>Herkunft</b>
Control	ON-TARGETplus Control –Pool, Non-Targeting-Pool	Katalog-Nr.: D-001810-10-05 Dharmacon, US
Notch3	ON-TARGETplus Human siRNA – SMART Pool	Katalog-Nr.: L-011093-00-0005 Dharmacon, US
PDGFRB	ON-TARGETplus Human siRNA – SMART Pool	Katalog-Nr.: L-003163-00-0005 Dharmacon, US
Zeb1	Zeb1 Silencer Select Pre-designed siRNA	Katalog-Nr.: 4392420 Ambion, USA
Control	Silencer Select Negative Control '1 siRNA	Katalog-Nr.: 4390843 Ambion, USA

<b>Kommerzielle Kits</b>	
<b>Kit</b>	<b>Hersteller</b>
miRNeasy Mini Kit	Katalog-Nr.: 217004 Qiagen, Hilden, Deutschland
RNase-Free DNase Set	Katalog-Nr.: 79254 Qiagen, Hilden, Deutschland

<b>Geräte</b>		
<b>Material</b>	<b>Typ</b>	<b>Herkunft</b>
Brutschrank	Rechne Hybridiser HB-1D	Kinesis Scientific Experts, Wertheim, Deutschland
cDNA-Synthese-Gerät	GeneAmp PCR System 9700	PE Applied Biosystems, Kalifornien, USA
Durchlichtmikroskop	Axiovert 100	Zeiss, Jena, Deutschland
Inkubator	New Brunswick, Galaxy 170 S	Eppendorf, New York, USA
Gefrierschrank	GNP4166 Premium Nonfrost, -25°C	Liebherr, Bulle, Deutschland
gentleMACS Dissociator		Katalog-Nr.: 130-093-235 Mitenye Biotech, Bergisch Gladbach, Deutschland
Kühlschrank	Comfort, 3°C	Liebherr, Bulle, Deutschland
Kryoschneider	Leica CM3050 S	Leica, Wetzlar, Deutschland
Lasermikroskop	Nikon Eclipse Ti2 Lasermikroskop	Nikon Instruments Europe BV, Amsterdam, Niederlande
Magnetic Particle Concentrator	Dynal MPS-S	Katalog-Nr.: 120.20 Dynal Biotech ASA, Oslo, Norwegen
Mikroplattenlesegerät	Synergy HAT Fluorometer	BioTek Instruments, Vermont, USA
Mikroplattenlesegerät	Glomax Multi Detection System	Promega, Wisconsin, USA
Multipipette	Pipetboy	Integra Biosciences GmbH, Biebertal, Deutschland
Multipipette	Multipipette Xstream	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipetten	Eppendorf Reference autoclavable: 10µl, 100µl, 200µl, 1000µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Plattenrüttler	KS 130 Basic	IKA, Staufen, Deutschland
Rotierender Mischer	VWR® Tube Rotator	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Sterile Sicherheitswerkbank	Herasafe	Heraeus instruments, Hanau, Deutschland
Sicherheitswerkbank	Waldner	Waldner Laboreinrichtung, Wangen, Deutschland
Spektrophotometer	SmartSpec Plus	Bio-Rad,
Vortex Geräte	Vortex Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, USA
Zellzähler	NucleoCounter NC-100 - Mammalian Cell Counter	ChemoMetec A/S, Allerød, Dänemark

Zentrifuge	Multifuge 3S	Heraeus, Hanau, Deutschland
Zentrifuge	Mikro 200R	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland

<b>Software</b>		
<b>Material</b>	<b>Typ</b>	<b>Herkunft</b>
Berechnung RNA-Konzentration	NanoDrop 2000	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland
Berechnung qPCR	StepOne™ Software v2.3	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland
All-in-One Microplate Reader Software	Gen5	BioTek Instruments, Vermont, USA
Bilderfassung	Leica Application Suite X	Leica, Wetzlar, Deutschland
Bilderfassung	NIS Elements AR 5.02.00	Nikon, Amsterdam, Niederlande
Bild-Analyse	Volocity	Quorum Tech, Ontario, Kanada
Diagramm-Erstellung	Venny 2.0	BioinfoGP
Genontologie-Analyse	Enrichr	Ma'ayan Laboratory, Icahn School of Medicine at Mount Sinai
Grafik-Erstellung	BioRender Software	BioRender
Statistik	Prism 8	GraphPad Software, San Diego, Kalifornien
Tabellenkalkulation	Excel	Microsoft, Washington, USA

## 4. Methoden

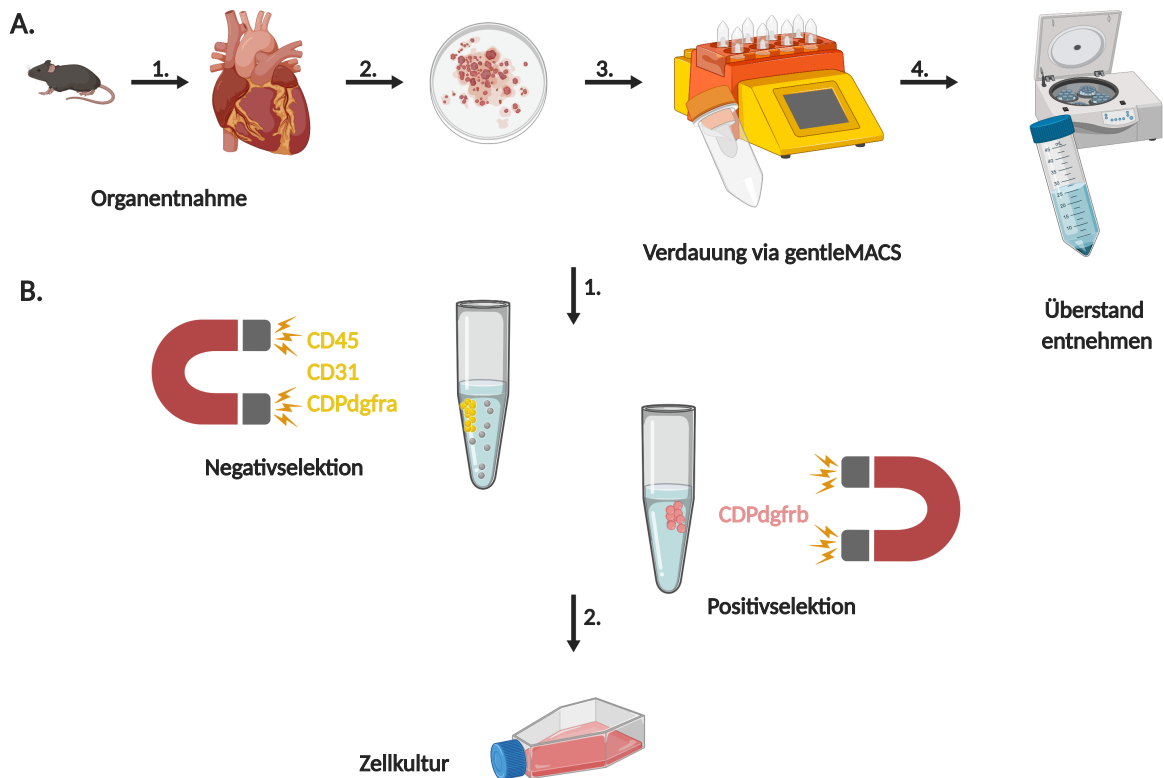
### 4.1 Labortiere

In der folgenden Arbeit wurden zwölf Wochen sowie 18 bis 20 Monate alte C57Bl/6J Mäuse verwendet. Die Tiere wurden von den Firmen Janvier sowie Charles River bezogen und gemäß der GV-SOLAS von entsprechend geschultem Personal (FELASAB) getötet. Da zur Zellisolation aus dem Herzen keine Tierexperimente, sondern lediglich eine Organentnahme erforderlich ist, ist das Verwenden der Tiere anzeige- aber nicht genehmigungspflichtig.

### 4.2 Perizytenisolation aus dem Herzen von Mäusen

Herzperizyten (cPCs – cardiac pericytes) wurden aus jungen (zwölf Wochen) und alten (18 bis 20 Monate) C57BL/6J Mäusen isoliert. Die Maus wurde zuerst mittels Isoflurannarkose anästhesiert und anschließend mittels cervikaler Dislokation getötet. Nach Eröffnung des Thorax wurde das rechte Herzohr angeschnitten und der linke Ventrikel mit 8 ml kalter HBSS (*Hank's Buffered Saline Solution*) -Lösung (ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$ ) gespült. Das Herz wurde entnommen und von Fett- und Geweberesten befreit. Auf einer Petrischale wurde es in 2x2 mm große Stücke geschnitten. Die Stücke wurden in ein C-Tube überführt, in welches ebenfalls 5 ml Verdauungspuffer (HBSS mit  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  und 600 U Kollagenase Typ II) gegeben wurde. Es folgten Inkubationszeiten von 30 Minuten, 20 Minuten und 10 Minuten bei 37 °C und 5 %  $\text{CO}_2$ . Nach jeder Inkubationszeit folgte ein vorsichtiges Auf- und Abpipettieren sowie das Zerkleinern des Herzgewebes mittels des gentleMACS (Milteny BioTec) und dem Programm m\_neohart\_01\_01. Durch Zugabe von 500 µl fetalem bovines Serum (FBS) wurde der Verdauungsprozess der Kollagenase gestoppt. Das C-Tube wurde zweimal mit Waschpuffer (HBSS ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$ , 2 nM EDTA und 10 % Bovines Serum Albumin (BSA)) ausgewaschen. Dies wurde ebenfalls zur Zellsuspension dazugegeben. Über einen 200 µm Filter wurde die Zellsuspension in ein 15 ml Falcon überführt und bei 80 x g und 4°C eine Minute lang zentrifugiert. Dabei sedimentierten die schweren Kardiomyozyten und bildeten ein Zellpellet. Das Pellet wurde im Anschluss verworfen. Der Überstand wurde mit einem 70 µm Filter in ein neues 50 ml Falcon gefiltert und in ein 15 ml Falcon überführt. Es folgte eine Zentrifugation über 20 Minuten bei 4 °C und 300 x g. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde

in 1 ml Waschpuffer resuspendiert und in ein 1,5 ml Eppendorf Gefäß überführt, welches bei 4 °C und 300 x g 10 Minuten lang zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde in 1 ml der Negativselektion-Antikörperlösung (CD45- Antikörper, CD31-Antikörper, PDGFR alpha-Antikörper) aufgenommen. Über eine Negativselektion sollten so Immunzellen (über CD45), Endothelzellen (CD31) und ein Großteil der Fibroblasten (PDGFRa) aus dem Zellpellet entfernt werden, bei der die jeweiligen Antikörper an magnetische *beads* gekoppelt sind. Die Antikörper inkubierten zusammen mit den Zellen für 30 Minuten bei 4 °C auf einem rotierenden Mixer. Anschließend wurde das Gefäß für eine Minute auf einem Magnet Rack inkubiert. Das Magnetelement zieht die magnetischen *beads* an die Gefäßwand und nimmt dabei die an den Antikörpern gebundenen Zellen mit. Die übrige Zellsuspension wurde in ein 15 ml Falcon gegeben und in einer Zentrifuge pelletiert. Das Pellet wurde zwei weitere Male mit 1 ml Waschpuffer resuspendiert und für eine Minute auf den Magneten gestellt. Die Zellsuspension wurde ebenfalls in dem 15 ml Falcon gesammelt. Für die Positivselektion wurde der zuvor gesammelte Überstand 10 Minuten lang bei 300 x g und 4 °C zentrifugiert. Das dabei entstandene Pellet wurde in 1 ml Positivselektion-Antikörperlösung (CD140b-Antikörper gekoppelt an magnetische *beads*) aufgenommen und für 40 Minuten bei 4 °C auf einem rotierenden Mixer inkubiert. Das Gefäß wurde wieder für eine Minute auf einem Magnet Rack inkubiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde zweimal mit 1 ml Waschpuffer resuspendiert und für eine Minute auf das Magnet Rack gegeben. Das nach dem zweiten Waschschrift entstandene Pellet wurde in 500 µl TripLE zum Lösen der *beads* aufgenommen und für 10 Minuten bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Es wurde 1 ml Endothelial Cell Basal Medium (EBM) zum Stoppen der Enzymaktivität hinzugeben. EBM enthält den Zusatz Penicillin/Streptomycin im Verhältnis 1:500. Die Zellsuspension wurde drei Mal mittels des Mediums auf dem Magnetic Rack gewaschen. Der Überstand wurde in einem Falcon gesammelt und 5 Minuten lang bei 300xg zentrifugiert. Die *beads* wurden mit 750 µl Medium resuspendiert und bereits auf ein Well einer 48-Well-Platte ausbracht. Das Well wurde zuvor mit Gelatine (1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt) beschichtet. Der nach der Zentrifugation entstandene Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde ebenfalls mit 750 µl Medium resuspendiert und auf ein Well einer 48-Well-Platte ausbracht. Die Well-Platte wurde bei 37 °C und einer 5 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre zur Kultivierung gelagert.



**Abbildung 4.1: Schematische Darstellung des Perizytenisolationsprotokoll. (A.)** Die erste Phase der Zellisolation dient der Herstellung einer Zellsuspension, welche noch alle Zelltypen beinhaltet. Nach der Organentnahme wird das Herz gespült und in kleine Stücke geschnitten. Mittels des gentleMACS erfolgt der Zellverdau. Durch eine Zentrifugation gruppieren sich Kardiomyozyten als Pellet an, welches entfernt wird. **(B.)** Die zweite Phase dient der Selektion unerwünschter Zelltypen. Bei der Negativselektion werden hämatopoetische Zellen (CD45), Endothelzellen (CD31) und Fibroblasten (CDPdgfra) isoliert und verworfen. Mit Hilfe des Antikörpers CDPdgfrb können Perizyten von der verbleibenden Zellsuspension isoliert und zum Schluss kultiviert werden. Erstellt mit BioRender.com.

### 4.3 Zellkultur

#### HUVEC Zellkultur

Humane Endothelzellen aus der Nabelvene (HUVEC) wurden von der Firma Lonza bezogen. Sie wurden in Endothelial basal medium (EBM) kultiviert, das mit 10% Fetalem Bovinen Serum (FBS), Amphotericin-B, Ascorbinsäure, Bovine Brain Extract (BBE), Endothelial Growth Factor (EGF), Gentamycinsulfat und Hydrocortison substituiert ist. Für die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen funktionellen Experimente wurden Zellen der zweiten oder dritten Passage verwendet.

## **Primäre kardiale Mausperizyten Zellkultur**

Primäre Perizyten wurden zuerst in Endothelial Cell Growth Medium (EGM) kultiviert. Diesem Medium wurden folgende Substituenten zugefügt: 10 ml FBS, 0,5 ml R<sup>3</sup>-IGF- 1 (*Recomb. Long R Insulin Like Frowth Factor1*), 0,2 ml Hydrocortison, 0,5 ml VEGF (*Endothelial Growth Factor Vascular Human Recombinant*), 0,5 ml Ascorbinsäure, 0,5 ml Gentamycinsulfat – Amphothericin B, 2 ml rhFGF-b (*r Human Fibroblast Growth Factor – B*), 0,5 ml Heparin, 0,5 ml rhEGF (*Epidermal Growth Factor*). Nach der zweiten bis dritten Passagen fand ein Mediumwechsel statt. Das zweite Medium ist das Perizytenmedium (PM), welches mit 10 ml FBS, 5 ml Penicillin-Streptavidin-Lösung und 5 ml PGS (*pericyte growth supplement*) substituiert wurde.

## **Humane Gehirnperizyten Zellkultur**

Humane Gehirnperizyten wurden in DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) kultiviert, welches mit 50 ml FBS und 1 ml Penicillin-Streptavidin substituiert wurde.

## **Zellablösung und Zellzählung**

Nachdem das Zellmedium entfernt wurde, wurden die Zellen mit PBS (*Phosphate Buffered Saline*), welches weder Ca<sup>2+</sup> noch Mg<sup>2+</sup> beinhaltet, gewaschen. Zum Ablösen der Zellen inkubierte 0.25%iges Trypsin zusammen mit den Zellen bei 32 °C und 5 % CO<sub>2</sub> für drei Minuten. Zum Neutralisieren der Trypsinaktivität wurde anschließend die doppelte Menge an Medium hinzugefügt. Zur Erfassung der Zellzahl wurde der automatisierte Zellzähler Nucleocounter (ChemoMetec) genutzt. 50 µl der Zellsuspension wurden mit 50 µl Lysispuffer und 50 µl Neutralisationspuffer gemischt und auf eine Nucleocounter Kasette (ChemoMetec) aufgezogen. Durch eine Färbung des Zellkerns ist das Gerät in der Lage die Anzahl der mononukleären Zellen zu erfassen



## Beschichtung von Zellkulturschalen

Zur Perizytenkultivierung wurde der Boden des Zellkulturgeschirrs mit Gelatine, welche 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt ist, beschichtet. Die verdünnte Gelatine inkubierte für mindestens eine Stunde bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> auf dem Zellkulturgeschirr und wurde unmittelbar vor dem Ausbringen von Perizyten entfernt.

## 4.4 Molekularbiologische Methoden

### 4.4.1 RNA-Isolation aus Zellen

Zum Isolieren der gesamten zellulären RNA wurde das miRNeasy Mini kit (Quiagen) genutzt. Es wurde das vom Hersteller beschriebene Protokoll befolgt, welches zum Teil modifiziert wurde. Zu Beginn werden 700 µl Quiazol zu den Zellen gegeben und resuspendiert. Nach fünf Minuten Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurden 140 µl Chloroform hinzugefügt und 15 Sekunden lang vorsichtig geschüttelt. Es folgte eine Inkubationszeit von zwei bis drei Minuten mit einer anschließenden Zentrifugation bei 12000 x g und 4 °C über 15 Minuten. Die obere Phase, welche die RNA beinhaltet, wurde in 530 µl 100%iges Ethanol überführt. Nach vorsichtiger Resuspendierung erfolgte die Überführung in ein RNeasy® Column. Durch einen Zentrifugationsschritt bei 12000 x g für 15 Sekunden bei Raumtemperatur bindet die RNA an die Matrix der Kolumne, während die Mixtur durch die Matrix hindurch in einem 2 ml *Collection Tube* aufgefangen wurde. Im nächsten Schritt wurde die RNA mit 350 µl RWT-Puffer, welcher dem Kit beigelegt ist, durch Zentrifugation gewaschen. 10 µl DNase und 80 µl RDD Puffer wurden auf die Matrix gegeben und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend folgte wieder ein Waschschrift mit 350 µl RWT-Puffer und einer Zentrifugation bei 12000 x g über 15 Sekunden. Am Ende folgten nochmals zwei Waschschriffe, jeweils mit 500 µl RPE-Puffer über 15 Sekunden bei 12000 x g. Zum vollständigen Trocknen der Membran wurde die Kolumne bei maximaler Geschwindigkeit eine Minute lang zentrifugiert. Die Eluierung der RNA erfolgte durch Zugabe von 30 µl RNase-freiem Wasser und einer Zentrifugation über eine Minute mit 12000 x g.

#### 4.4.2 RNA-Quantifizierung

Zur Quantifizierung der RNA-Konzentration wurde die Absorption zwischen 260 und 280 nm mittels des NanoDrop ®ND 2000-spectrophotometer (PeqLab) bestimmt. Zum Blankieren wurde 1 µl RNase- und DNase-freies Wasser verwendet. Zur Quantifizierung der RNA wurde 1 µl auf die Messstelle gegeben und anschließend gemessen.

#### 4.4.3 cDNA Synthese

Die RNA muss zur Quantifizierung der mRNA (*messenger RNA*) mittels quantitativer Polymerase Kettenreaktion (qPCR) umgeschrieben werden. In der Regel werden 500 ng RNA pro cDNA Synthese-Reaktion umgeschrieben. Für den ersten Syntheseschritt ergibt sich ein Reaktionsvolumen aus folgenden Komponenten:

Reagenz	Volumen (µl)
RNase-freies Wasser	4,6
Random Hexamer	1,0
dNTPs (100 mM)	0,4
RNA	Volumen in 500ng
RNase-freies Wasser	20µl abzüglich Volumen RNA

Dieses Reaktionsvolumen von insgesamt 26 µl wurde fünf Minuten bei 65 °C prä-inkubiert. Anschließend wurden folgende Reagenzien hinzugegeben:

Reagenz	Volumen (µl)
5x First Strand Buffer	8
DTT (100 nM)	4
Reverse Transkriptase	1
Rnase Inhibitor	1

Mit einem Gesamtvolumen von 40 µl wird folgendes Reverse Transkriptionsprogramm durchlaufen:

1. 10 Minuten bei 20 °C
2. 75 Minuten bei 43 °C
3. 5 Minuten bei 95 °C
4. Abkühlen auf 4 °C

Die am Ende entstandene cDNA wurde mit 60 µl RNase-freiem Wasser auf ein Volumen von 100 µl verdünnt.

#### 4.4.4 Quantitative Polymerase Kettenreaktion (qPCR)

Als Polymerase Kettenreaktion bezeichnet man ein *in-vitro* Verfahren, bei dem mittels enzymatischer Aktivität ein bestimmtes DNA-Segment amplifiziert wird. An der Reaktion beteiligt sind eine doppelsträngige DNA, welche amplifiziert werden soll, einzelstränge Primer, bestehend aus Oligonukleotiden, eine DNA-Polymerase, passende Desoxyribonukleotid-Phosphate (dNTPs), Puffer und Salze. Nach Denaturierung der DNA in zwei Einzelstränge können mittels der DNA-Polymerase und den dNTPs die Primer binden und die gewünschte neue DNA synthetisieren. Das Produkt des ersten Zyklus besitzt charakteristisch eine unbestimmte Länge. Nach dem zweiten Zyklus liegt die gewünschte Sequenz vor, welche ab dem dritten Zyklus nun exponentiell vervielfältigt wird. Nach 20 bis 30 Zyklen können somit mehrere Millionen Amplifikationen hergestellt werden<sup>85</sup>.

Zum Durchführen der qPCR wurde von Applied Biosystems sowohl die Applied Biosystems StepOnePlus machine als auch das Fast SYBR Green verwendet. Alle Primer-Sequenzen wurden mittels des NCBI Primer-Blast-Programms online kreiert und von Sigma-Aldrich bezogen. Die jeweiligen Sequenzen können der Materialliste entnommen werden. Als endogene Kontrolle diente die humane ribosomale P0-mRNA. Es wurden Duplikate angefertigt um die Analyse mit folgender Formel durchzuführen:  $2^{-\Delta CT}$ , mit  $\Delta CT = CT_{\text{Gen}} - CT_{\text{endogene Kontrolle}}$

Reaktionsvolumen	
Reagenz	Volumen (µl)
2x fast SYBR Green	10
Forward Primer	1
Reverse Primer	1
Wasser	3
cDNA	5

Das Reverse-Transkriptase-qPCR-Reaktionsprogramm besteht aus folgenden Phasen:

1. 20 Sekunden bei 95 °C
2. 3 Sekunden bei 95 °C (40 Zyklen)
3. 30 Sekunden bei 60 °C
4. 15 Sekunden bei 95 °C
5. 30 Sekunden bei 60 °C
6. 15 Sekunden bei 95 °C

#### 4.4.5 siRNA Transfektion

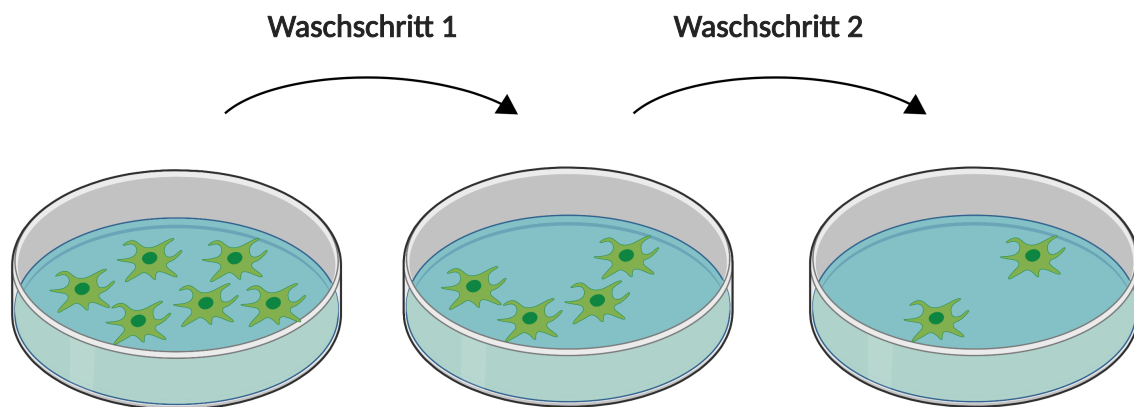
Humane Perizyten wurden mit siRNA von Dharmacon transfiziert. Am ersten Tag wurden 500000 Zellen auf 5 cm-Schalen ausgebracht, welche zuvor mit Gelatine (1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt) beschichtet wurden. Eine 24-stündige Inkubationszeit erfolgte bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>. Für die Transfektion wurden zwei siRNA-Mischungen hergestellt. Die erste beinhaltet 300 µl Opti-MEM und 1,5 µl siRNA für eine finale Konzentration von 5 nM. Die zweite Mischung bestand aus 300 µl Opti-MEM und 6 µl Lipofectamin RNAiMax. Nach der Herstellung folgte eine Inkubationszeit von fünf Minuten bei Raumtemperatur. Dann wurden beide Mischungen durch vorsichtiges Resuspendieren zusammengefügt und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Währenddessen wurde das Kulturmedium in den Schalen abgesaugt, die Zellen wurden mit PBS gewaschen und 4 ml Opti-MEM hinzugefügt. Anschließend wurden 600 µl der siRNA-Lipofectamin-Mischung tropfenweise auf jede Schale gegeben. Nach vier Stunden Inkubationszeit bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> wurde die Mischung entfernt und Zellmedium hinzugegeben. Die Zellen blieben für 48 Stunden in Kultur, um eine optimale Wirkung der siRNA zu erreichen.

### 4.5 *In-vitro*-Versuche und funktionelle Experimente

#### 4.5.1 Zell-Matrix Adhäsionsversuch

Die Adhäsion von Perizyten gegenüber Gelatine kann mittels des Zell-Matrix-Adhäsionsversuches analysiert werden. Pro Kondition wurden zwei Wells einer 96-Well-Platte mit Gelatine, welche 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt ist, beschichtet. Ebenfalls wurden zwei Wells mit Gelatine bedeckt, die später als Blank dient. Es folgte eine Inkubationszeit von einer Stunde bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>. Humane Perizyten wurden währenddessen mit 0.26 µL BCECF-AM (2', 7'-bis-(2-carboxyethyl)-5-(and-6)-carboxyfluorescein, acetoxymethyl ester) in 1 ml DMEM ohne Supplementierung markiert und für 30 Minuten bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Im Folgenden wurde die Platte zweimal mit 200 µl vorgewärmtem 0 % DMEM + 0,05 % BSA gewaschen. 50 µl 0% DMEM + 0,05 % BSA wurden dann in jedes Well gegeben. Nach Beendigung der Inkubationszeit wurden, wie bereits oben beschrieben, die markierten Zellen von der Platte gelöst und gezählt. Für fünf Minuten wurden die Zellen bei 300 x g zentrifugiert. 50000 humane Perizyten wurden in 50 µl DMEM + 0,05 % BSA aufgenommen und in jedes Well ausgebracht. Die Wells, welche als Kontrolle

dienen, wurden mit 50  $\mu$ l 0% DMEM + 0,05 % BSA gefüllt. Es folgte eine Inkubationszeit von einer Stunde bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>. Die initiale Fluoreszenzintensität der markierten Perizyten wurde mit Hilfe des Mikroplattenlesegerätes Synergy HAT Fluorometer (BioTek) gemessen. Nach jeder Messung wurde das Medium mitsamt aller gelösten Zellen entfernt und mit 100  $\mu$ l Medium neu aufgefüllt. Das Experiment ist beendet, wenn die Intensität der Perizyten die Intensität der Kontrolle erreicht hat. Um den finalen Wert der Matrix-spezifischen Adhäsion zu erreichen, wurde der Wert der Kontrolle von dem Wert der Matrix subtrahiert. Das Ergebnis wird als Prozentsatz der Matrix-spezifischen Adhäsion nach der dritten Messung auf den initialen Adhäsionswert normalisiert.

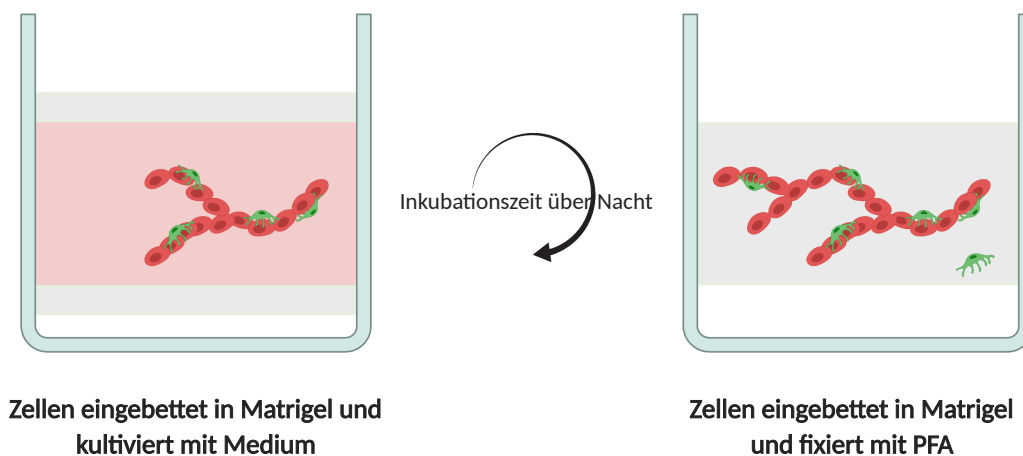


**Abbildung 4.2: Schematische Darstellung des Zell-Matrix-Adhäsions-Versuches.** Mittels BCECF-AM fluoreszierende Perizyten haften auf einer mit Gelatine-beschichteten Well-Platte. Vor jedem Waschschritt erfolgt die Messung der von den Perizyten ausgehenden Fluoreszenz. Die Anzahl der Perizyten nimmt je nach Kondition und Adhäsionsvermögen nach jedem Waschschritt unterschiedlich schnell ab. Erstellt mit BioRender.com.

#### 4.5.2 Matrigel Versuch: Perizyt-Endothel-Adhäsion

Der Matrigel Versuch dient der Bestimmung der Adhäsion von Perizyten gegenüber HUVECS, welche modellhaft für Endothelzellen stehen. Am Tag nach der Transfektion werden HUVECS mit einer Konzentration von 10  $\mu$ g/ml Dil acetylated LDL markiert. Einen Tag später wurde 150  $\mu$ l Matrigel in jedes Well einer zuvor gekühlten 48-Well Platte gegeben und 30 Minuten bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> polymerisiert. Währenddessen wurden die am Tag zuvor markierten HUVECS trypsiniert und gezählt. Pro Well wurden 100000 HUVECS zugegeben, welche in 500  $\mu$ l supplementiertem EBM-Medium resuspendiert sind und für drei Stunden für 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. GFP-

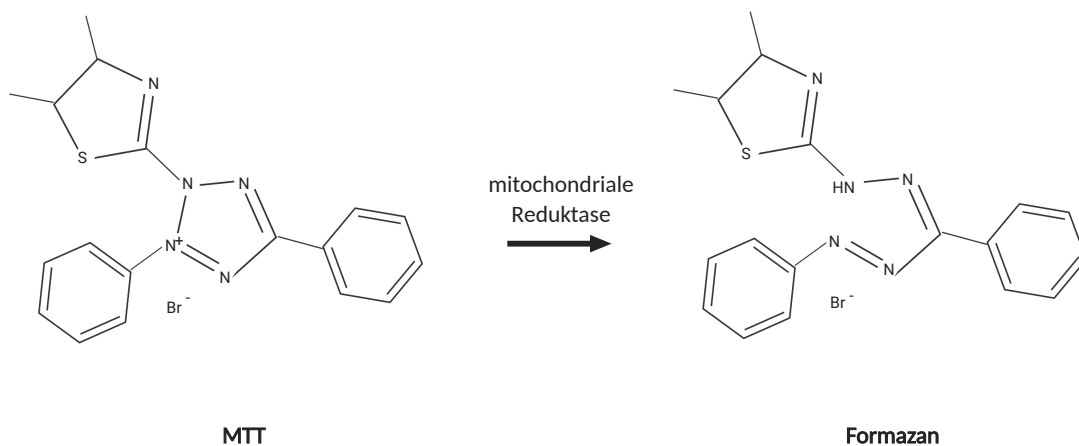
transduzierte Perizyten wurden während der Inkubationszeit ebenfalls trypsinisiert und gezählt. Pro Well wurden 10.000 GFP-markierte Perizyten in 500 µl substituiertem DMEM aufgenommen und für drei Stunden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> auf den HUVECs inkubiert. Anschließend wurde das Medium entfernt und eine zweite Schicht von 150 µl Matrigel hinzugegeben, welches unter gleichen Bedingungen für 30 Minuten inkubiert wurde. Zum Schluss wurden 50 µl HUVEC-Medium und 50 µl Perizyten-Medium in jedes Well gegeben und über Nacht inkubiert. Am darauffolgenden Tag erfolgte eine Fixation mit 500 µl 4%igem Formaldehyd. Zuvor wurde das Medium entfernt und es folgte ein Waschschritt mit 1 ml PBS pro Well. Nach der Fixation wurden pro Well 1 ml PBS dazugegeben, um ein Austrocknen zu verhindern. Aufgenommen wurden acht randomisierte Bilder pro Well unter Verwendung des Leica SP8 Konfokalmirkoskops.



**Abbildung 4.3: Schematische Darstellung des Matrigel-Versuches.** HUVECs, welche mittels Dil acetylated LDL farblich markiert wurden (rot) und GFP-markierte Perizyten (grün) sind in zwei Matrigelschichten eingebettet. Zur Kultivierung über Nacht wurde Medium für beide Zelltypen substituiert. Am nächsten Tag wurde das Medium entfernt und die Zellen wurden mit PFA fixiert. Mittels des Lasermikroskopes von Leica erfolgte die Bildaufnahme. Erstellt mit BioRender.com.

#### 4.5.3 MTT-Test

Der MTT-Test dient neben der Bestimmung der metabolischen Aktivität auch der Bestimmung der Viabilität von Zellen. Der namensgebende gelbe Farbstoff MTT wird während des Versuches zum violetten Formazan reduziert. Grundlage der Reduktion bilden die Reduktionsäquivalente NADH und NADPH, womit der Farbumschlag die Glykolyserate der Zelle darstellt (Abbildung 4.4).



**Abbildung 4.4: Schematische Darstellung der Reaktion von MTT zu Formazan.** Erstellt mit BioRender.com.

Am Tag nach der Transfektion wurden 40000 Zellen in 500 µl Medium auf einer 24-Well-Platte ausgebracht, welche vorher mit 1:10 verdünnter Gelatine beschichtet wurde. Am darauffolgenden Tag wurde MTT im Verhältnis 1:10 mit Perizytenmedium verdünnt. 1 ml dieser Verdünnung wurde jedem Well hinzugefügt und es folgte eine Inkubationszeit von drei Stunden. Anschließend wurde das Medium aspiriert und die Zellen mit 1 ml PBS gewaschen. In jedes Well wurde 1 ml Perizytenmedium gegeben und eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Das MTT-Medium wurde aspiriert und es folgte wieder ein Waschschriff mit 1 ml PBS. 1 ml DMSO (Dimethylsulfoxid) wurde pro Well addiert und zur Lösung der Kristalle wurde die 24-Well-Platte leicht geschüttelt. Die Platte wurde anschließend 15 Minuten auf einer Rüttelplatte (160 pro Minute) inkubiert. Zur Messung wurden 900 µl in eine Küvette überführt. Als Kontrollprobe diente 900 µl DMSO, welches ebenfalls in eine Küvette gegeben wurde. Die Messung erfolgte am Photometer bei einer Wellenlänge von 550 nm.

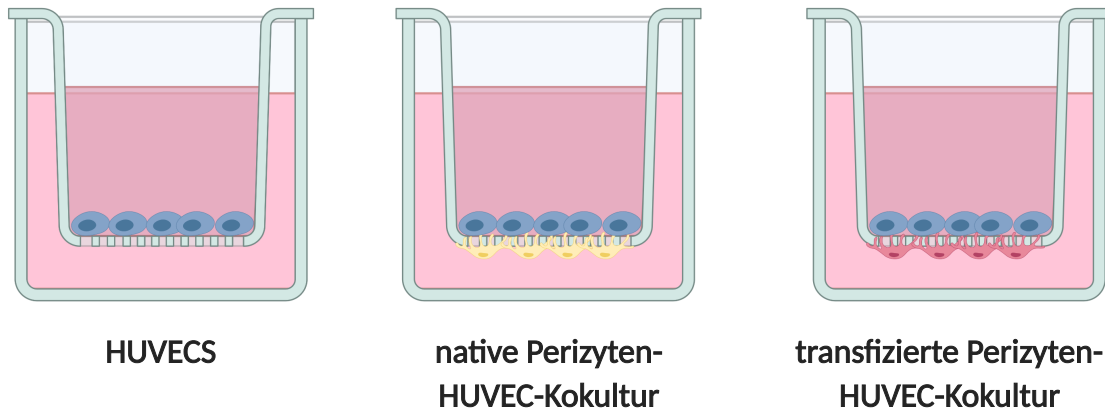
#### 4.5.4 Permeabilitätsversuch

Mit dem Permeabilitätsversuch wird in einem Ko-Kulturversuch untersucht, ob die jeweiligen Transfektionen in Perizyten die Permeabilität von HUVECs für Dextran verändern. Am Tag nach der Transfektion wurden TC-Einsätze (ThinCerts, greiner bio-one) mit der Membran nach oben in eine 12-Well-Platte überführt. 70 µl Poly-L-Lysine-Solution, welche im Verhältnis 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt wurde, wird

vorsichtig auf die Membran gegeben. Wells, welche keinen Einsatz beinhalten, wurden mit PBS aufgefüllt. Es folgt eine Inkubationszeit von 45 Minuten unter der Sterilbank. Anschließend wurden 450 µl PBS in jedes Well einer 24-Well-Platte gegeben. Die Einsätze wurden um 180° auf den Kopf gedreht und mit der beschichteten Fläche nach unten in jedes Well der 24-Well-Platte überführt. Bei einer Membranfläche von 0,336 cm<sup>2</sup> wurden nun 5 µg Fibronectin pro cm<sup>2</sup> aufgetragen. Es werden 150 µl Fibronectin auf die Membran in die Einsätze gegeben und es folgt eine weitere Inkubationszeit von 45 Minuten. Währenddessen wurden die transfizierten Perizyten als auch die unbehandelte Perizyten, welche als Kontrolle dienen, von den Zellkulturschalen gelöst und gezählt. Es wurden Zellsuspensionen mit dem oben beschriebenen humanen Gehirnperizytenmedium hergestellt, in denen in einem Volumen von 70 µl 40.000 Perizyten für die jeweilige Kondition resuspendiert wurden. Nach der Inkubationszeit wurden die Einsätze wieder um 180° über den Kopf gedreht und in die zuvor benutzte 12-Well-Platte gesetzt. Die Perizyten-Zellsuspension wurde nun auf die Membran aufgetragen. Nach einer Stunde erfolgte eine weitere 180°-Wendung über den Kopf. Die Einsätze wurden nun zurück in die Wells der 24-Well-Platte überführt, welche jeweils 950 µl humanes Perizytenmedium beinhalten. Auf die Membran wurde zum Schluss 250 µl Zellsuspension aufgetragen, in der 80000 HUVECs in dem oben beschriebenen HUVEC-Medium resuspendiert wurden. Die Well-Platte wurde über Nacht bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> aufbewahrt. Am darauffolgenden Tag erfolgte ein Mediumwechsel für beide Zellarten. Am zweiten Tag nach der Transfektion wurde das gesamte Medium entfernt und sowohl die Wells als auch das Innere der Einsätze mit PBS gewaschen. Die 950 µl humanes Perizytenmedium wurden durch 500 µl Opti-MEM ersetzt. Als fluoreszierende Reagenz wurde Fluzorescein isocyanatdextran 70 kDA verwendet. Für die Stammlösung wird 1 mg Dextran FITC in 100 µl destilliertem Wasser gelöst. Die Stammlösung wurde dann für die Arbeitslösung im Verhältnis 1:10 mit OptiMEM verdünnt. Hierbei muss die Lichtempfindlichkeit von Dextran berücksichtigt werden. Es wurden nun 200 µl Dextran in jeden Einsatz gegeben und es folgt eine Inkubationszeit über eine Stunde bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>. Für die Messung wurden nach Beendigung der Inkubationszeit die Einsätze entfernt und pro Kondition zwei Mal 100 µl Flüssigkeit aus der unteren Kammer, sprich direkt aus dem Well der 24-Well-Platte, entnommen und als Duplikate in eine 96-Well-Platte überführt. Als Kontrolle dienend, wurden je 100 µl OptiMEM



ebenfalls in zwei Wells gegeben. Zur Messung der Fluoreszenz diente das „Glomax Multi Detection System“ von Promega.

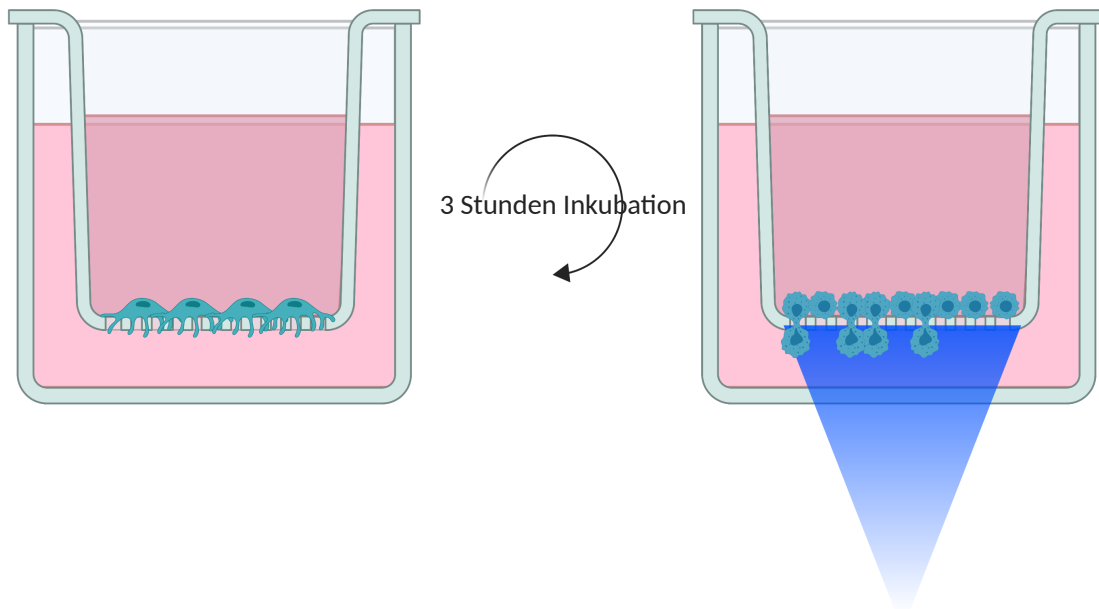


**Abbildung 4.5: Schematische Darstellung des Permeabilitätsversuches.** Gemessen wird die Adhäsion von drei verschiedenen Konditionen. Nach Zugabe von Dextran in den Gefäßeinsatz und einer Inkubationszeit von einer Stunde erfolgt die Entnahme des sich am Boden befindenden Mediums einschließlich des durch die Membran gesickerten Dextrans. Die Durchflussmenge wird mittels Fluoreszenzmessung erfasst. Erstellt mit BioRender.com.

#### 4.5.5 Boyden-Kammer-Migrations-Versuch

Mit dem Boyden-Kammer-Migrations-Versuch sollte analysiert werden, ob das Ausschalten bestimmter Gene die Transmigration von Perizyten in Kultur verändert. Hierbei wurden zwei Tage nach Transfektion Boyden-Kammer-Einsätze in eine 24-Well-Platte überführt. Es folgte die Beschichtung mittels Gelatine, welche im Verhältnis 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt wurde. Hierfür wurden 600  $\mu$ l direkt in das Well gegeben und 100  $\mu$ l in die Boyden-Kammer. Die Gelatine inkubierte für 24 Stunden bei 4 °C. Am nächsten Tag wurden die Zellen gelöst und eine Zellsuspension von 50.000 Zellen pro 200  $\mu$ l hergestellt. Auf den Boden der Wellplatte wurde 800  $\mu$ l Perizytenmedium gegeben und in die Boyden-Kammer direkt 200  $\mu$ l der Zellsuspension. Es folgt eine Inkubation über drei Stunden bei 37 °C. Die Migration wurde gestoppt, indem die Boyden-Kammer-Einsätze anschließend in eine 24-Well-Platte übertragen wurden, die PBS beinhalten. Dann erfolgte die Überführung der Kammern in Wells, welche mit 600  $\mu$ l HistoFix befüllt wurden. Dort wurden sie für zehn Minuten fixiert. Es folgte ein dreimaliger Waschschritt mit PBS und eine Färbung mit DAPI (verdünnt 1:1000 in PBS) über zehn Minuten. Zum Schluss wurden die Kammern

in PBS überführt und fünf zufällig ausgewählte Bilder pro Well mit dem Nikon Eclipse Ti2 Lasermikroskop aufgenommen.



**Abbildung 4.6: Schematische Darstellung des Boyden-Kammer-Migration-Versuches.** Transfizierte Perizyten werden auf das Innere der Membran der Boyden-Kammer ausgebracht. Nach einer Stunde Inkubationszeit erfolgt die Anfärbung der Zellkerne mit DAPI und die Fixierung der Zellen. Die Membran ist blickdicht, wodurch die Zellkernerfassung der nur durch die Membran migrierten Zellen mittels Mikroskop erfolgen kann. Erstellt mit BioRender.com.

## 4.6 Immunologische und Histologische Methoden

### 4.6.1 Kryokonservierung und Kryosektionierung von Herzen

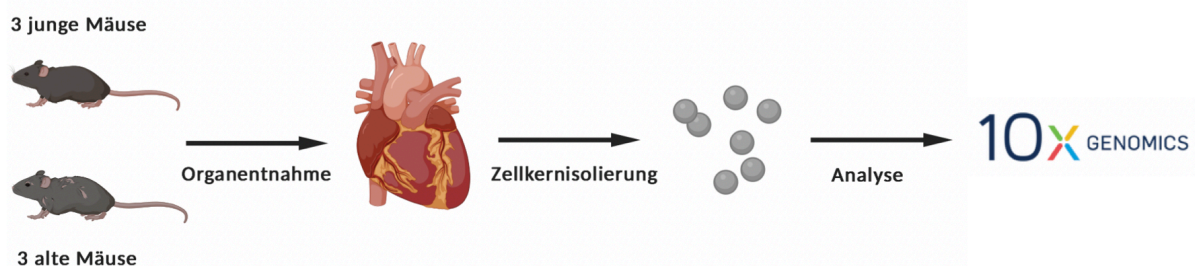
Nach Organentnahme wurden die Herzen in 4 % PFA (phosphatgepufferte Formaldehydlösung, HistoFix) und bei 4 °C über Nacht fixiert. Zur Kryokonservierung wurde das Herz in 10 % Saccharose gegeben, am nächsten Tag in 20 % Saccharose und an Tag 3 in 30 % Saccharose. Die Saccharose wurde mittels PBS verdünnt. Die Inkubation erfolgte jeweils bei 4 °C mit Rüttelbewegungen.

Zum Schneiden der in *O.C.P. Compound* eingebetteten Herzschnitte wurde sich dem Leica CM3050 S bedient. Hierbei wurden 50 µm dicke Herzschnitte angefertigt.

## 4.6.2 Immunfärbung

Zu Beginn wurden die eingefrorenen Schnitte fünf bis zehn Minuten bei Raumtemperatur aufgetaut. Es folgt eine fünfminütige Rehydratation in PBS, welche ein weiteres Mal wiederholt wurde. Die Schnitte wurden drei Mal für je zehn Minuten in 0,3 %igem Triton in PBS permeabilisiert. Während der Inkubationszeiten wurde eine Lösung zum Blocken hergestellt. 10 ml dieser Lösung beinhalten 9170 ml PBS, 0,3 g BSA, 100  $\mu$ l 10 %iges Triton, 200  $\mu$ l  $MgCl_2$  (1M) und 500  $\mu$ l *Donkey Serum*. Pro Objektträger wurde 1 ml der Blocklösung aufgetragen und für eine Stunde in einer geschlossenen Objektträgerbox inkubiert. Um ein Austrocknen zu verhindern, wurden angefeuchtete Tücher in die Box gelegt. Die primären Antikörper wurden in der hergestellten Blocklösung verdünnt und pro Objektträger zu je 150  $\mu$ l aufgetragen. Um die Präparate vor dem Austrocknen zu bewahren, wurden die sich auf dem Objektträger befindenden Schnitte mit Parafilm abgedeckt. Die Antikörper inkubierten bei 4 °C über Nacht. Am darauffolgenden Tag wurde mit einem Waschschrift in PBS über vier Minuten begonnen, welcher insgesamt vier Mal wiederholt wurde. Um die Reste des PBS zu entfernen, wurden die Schnitte für wenige Sekunden in 0,3 % Triton gegeben. Die sekundären Antikörper wurden in PBS/ 5 % BSA verdünnt und 150  $\mu$ l pro Objektträger für eine Stunde aufgetragen. Zum Schutz wurde wieder Parafilm zum Abdecken benutzt. Nach der einstündigen Inkubationszeit erfolgten vier Waschriffe á fünf Minuten. Zum Abschluss wurden drei Tropfen Fluormount auf die Präparate aufgetragen und mit einem Deckglas abgedeckt. Nach einer 30-minütigen Aushärtung bei Raumtemperatur wurden die Präparate bei 4 °C aufbewahrt. Die Bilderfassung wurde mit dem Konfokalmikroskop SP8 von Leica durchgeführt.

## 4.7 Bioinformatik



**Abbildung 4.7: Schematische Darstellung des Arbeitsverlaufes der Einzelzellkern-Sequenzierung.** Es werden drei Herzen aus jungen, 12 Wochen alten Mäusen und drei Herzen aus 18 Monate alten Mäusen entnommen. Es folgt eine Zellkernisolierung und die anschließende Analyse mittels der 10X Genomics Plattform. Erstellt mit BioRender.com.

#### 4.7.1 Zellkernisolation

Drei jungen, 12 Wochen alten Mäusen und drei 18 Monate alten Mäusen wurde das komplette Herz entnommen und mit einem Pistill in einem Mörser in flüssigem Stickstoff zerstoßen. Es folgte der Transfer in einen *Dounce* Homogenisierer. Die Organentnahme wurde von Julian Wagner durchgeführt. Die Zellisolation wurde von der Arbeitsgruppe von Dr. Sascha Sauer in Berlin durchgeführt. Die einzelnen Versuchsschritte können der Publikation von Vidal et al., 2019<sup>86</sup> entnommen werden.

#### 4.7.2 Einzelzellkern-cDNA-Probenaufbereitung und -Sequenzierung

Zur Erstellung der cDNA Bibliothek wurden die Proben mit dem Chromium Single Cell 3'Protokoll (10x Genomics) aufbereitet. Zusammenfassend wurde die Einkapselung der Zellkerne, deren Lyse und die Erstellung einer indizierten 3' mRNA Sequenzierungsbibliothek gemäß dem "Single-Cell 3' v2 Reagents Kit" Protokoll von 10X Genomics durchgeführt. Diese cDNA Bibliotheken wurden anschließend auf einem HiSEQ 4000 Sequenzierer von Illumina sequenziert.

#### 4.7.3 Einzelzell-RNA-Sequenzierungs-Datenanalyse

Die Cell Ranger Single Cell Software (v2.1.1) wurde für die Qualitätskontrolle, die Probenentmultiplexierung, die Strichcode-Verarbeitung und die Einzelzell-Zählung der 3'Gene verwendet. Die sequenzierten RNA-Fragmente wurden mit Hilfe der Cell Ranger Suite mit Standardparametern an das menschliche Referenzgenom GRCh38 aligniert. Insgesamt wurden 14827 Einzelzellkerne aus jungen Herzen und 12981 Einzelzellkerne aus alten Herzen analysiert. Die Datenintegration wurde von Seurat (v2.3) mit dem Canonical Correlation Algorithmus (CCA) durchgeführt. Zellen mit über 10 % Mitochondriengehalt oder Zellen mit weniger als 500 exprimierten Genen pro Zelle wurden entfernt. Die Gen-Zell-Matrix der Proben wurde log-transformiert und durch die Anzahl der UMI's pro Zelle normalisiert. Die 2PCA wurde auf der normalisierten Gen-Zell-Matrix durchgeführt. Um die Zellen in einem zweidimensionalen Raum zu visualisieren, wurde eine „*T-distributed Stochastic Neighbor Embedding*“ (t-SNE) an den ersten 20 Hauptkomponenten der PCA durchgeführt.

#### 4.7.4 Zellpopulationsdefinierung

Um spezifische Marker einer Zellkerngruppierung zuordnen und somit die Zelltypen der verschiedenen Cluster zu identifizieren zu können, wurde sich bei Seurat der Funktion „*Find All Markers*“ mit der AUC-basierten Score Klassifizierung bedient. Für die spezifische Analyse wurde der Mann-Whitney-Test hinzugezogen.

Um letztlich jeder Gruppierung einen Zelltyp zuordnen zu können, hat man sich bereits publizierter Gene bedient und deren Expressionsstärke manuell in der Gruppe getestet.

#### 4.7.5 Genontologie-Analyse

Um Rückschlüsse auf die zelluläre Funktion ziehen zu können, wurde mittels Enrichr (<https://amp.pharm.mssm.edu/Enrichr/>) eine GO-Analyse (Genontologie-Analyse) durchgeführt. Hierbei wurden alle signifikant hoch- und runterregulierten Gene, deren Signifikanzschwelle bei  $p < 0,05$  lag, in die Analyse mit einbezogen. Enrichr ist eine webbasierte Software Anwendung und wird in folgenden Publikationen näher beschrieben: Chen et al. 2013<sup>87</sup>, Kuleshov et al., 2016<sup>88</sup>.

#### 4.7.6 Untergruppierung basierend auf den DEGs

DEGs zwischen jungen und alten Perizyten wurden zum einen für die Bildung von Untergruppierungen und zum anderen zum Nachweis von Zellpopulationen von Perizyten verwendet. Dies basiert auf dem von den Genen ausgehendem Signal. Monocle2 diente dem Sortieren von Zellfunktionen. Um die Dimension verkleinern zu können, wurden Ordnungsgene eingerichtet. Mittels der „importCDS“-Funktion in Monocle, konnten Seurat-Objekte umgewandelt werden. Als Algorithmus zur zweidimensionalen Reduktion wurde der t-SNE genutzt.

### 4.8 Statistik

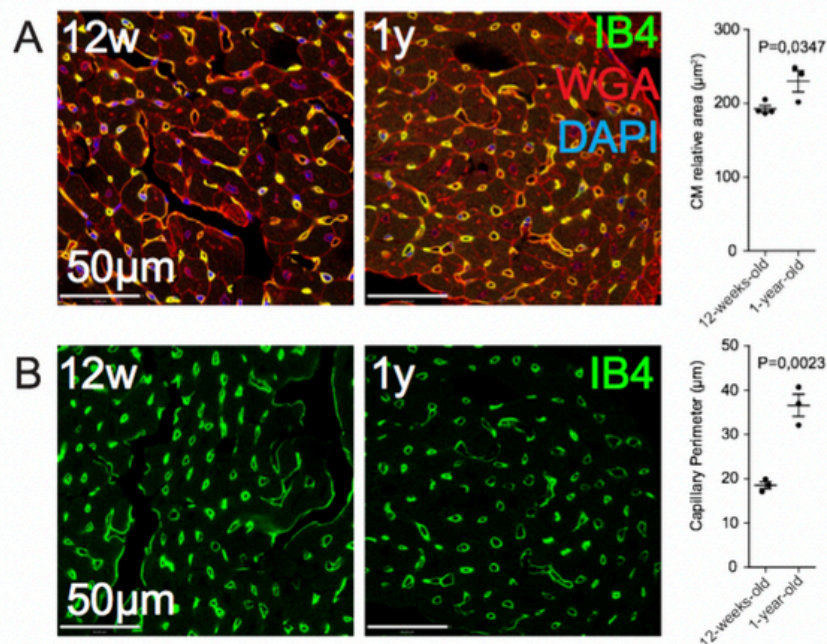
Die in der vorliegenden Thesis erhobenen Daten werden als Mittelwert mit entsprechender Standardabweichung dargestellt. Die Daten wurden mathematisch mittels Shapiro-Wilk- und Kolmogorov-Smirnov-Test auf Normalverteilung überprüft. Die statistische Signifikanz wurde dabei wie folgt analysiert: zwei Datengruppen

wurden über einen zweiseitigen, ungepaarten t-Test oder Welch's t-Test (normal verteilte Daten) oder einem Mann-Whitney-Test (nicht normal verteilte Daten) überprüft. Während Daten, die aus mehr als zwei Gruppen bestanden über eine ANOVA mit einem post hoc Bonferroni-Test (normal verteilt) oder einem Kruskal-Wallis-Test mit einer Dunn-Korrektur (nicht normal verteilt) analysiert wurden. Das Ergebnis wurde entsprechend abgekürzt: n.s. = nicht signifikant; \*p < 0,05; \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001; \*\*\*\*p < 0,0001.

## 5. Ergebnisse

### 5.1 Reduktion der Perizytenbedeckung im alternden Herzen

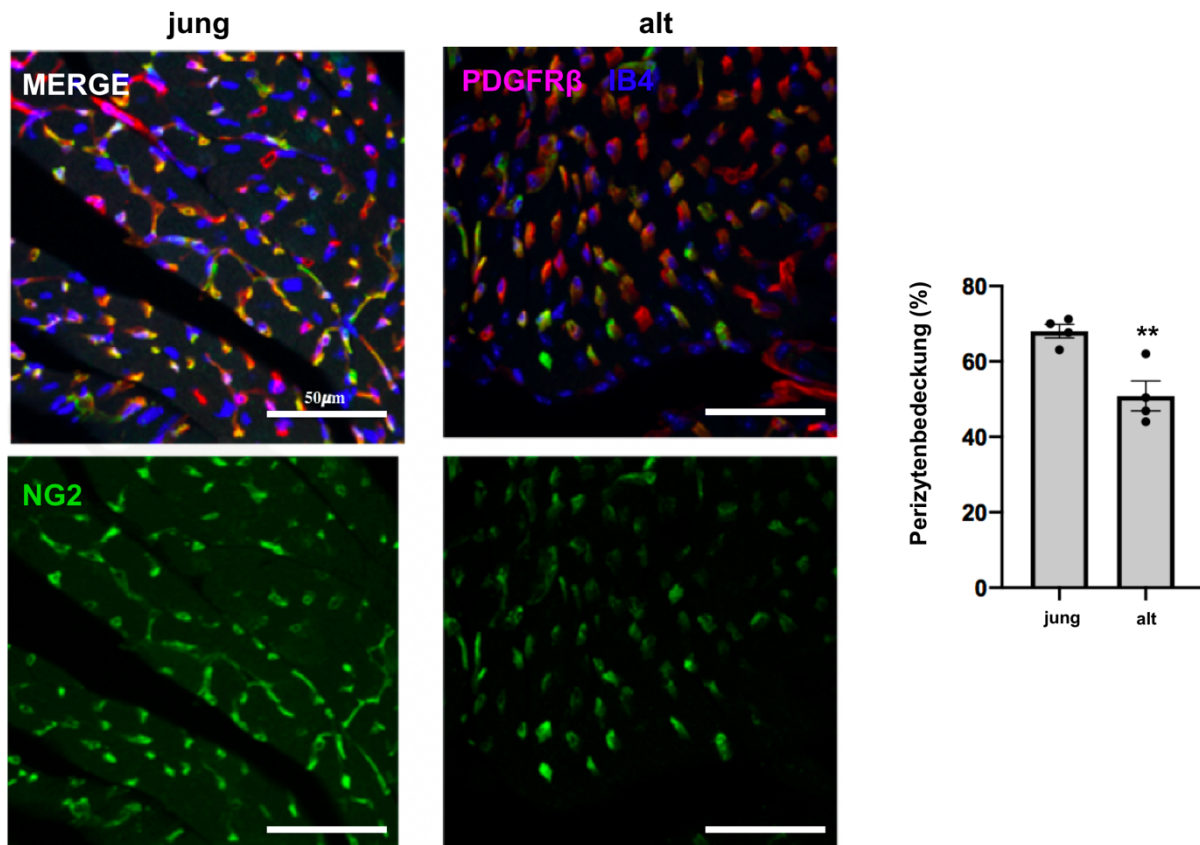
Vorangegangenen Arbeiten, wie zum Beispiel die in Abbildung 5.1.1 von Herrn Dr. Guillermo Luxán zur Verfügung gestellte Färbung zeigen, dass während des kardialen Altern Veränderungen auftreten, die unterschiedliche Zelltypen in einen veränderten Zustand übergehen lassen. In der gezeigten Vorarbeit werden 50 µm dicke Herzschnitte von 12 Wochen jungen Mäusen mit 12 Monate alten Mäusen verglichen. Wie in der folgenden Abbildung ersichtlich, sind Kardiomyozyten hypertrophiert und Kapillargefäße dilatiert. Fraglich bleibt jedoch, inwiefern sich das Altern auch auf kardiale Perizyten auswirkt und wie sich das Altern in ihrer Funktion widerspiegelt.



**Abbildung 5.1.1: Effekte des Alterungsprozesses auf Kardiomyozyten und Kapillaren.** Dargestellt sind immunhistologische Herzschnitte von 12 Wochen jungen Mäusen verglichen mit 12 Monate alten Mäusen. **(A)** zeigt neben grün angefarbten Endothelzellen (Isolektin B4-Marker IB4) auch rot gefärbte Zellmembranen (*Wheat germ agglutinin* - WGA) und blau eingefärbte Zellkerne (DAPI). Die relativ gemessene Oberfläche von Kardiomyozyten ist im alten Herzen signifikant erhöht. In **(B)** werden Kapillargefäße mit dem Endothelzellmarker IB4 grün angefarbt und zeigen im alten Herzen einen signifikant vergrößerten Gefäßdurchmesser. (Versuch und Datenauswertung durchgeführt durch Dr. Guillermo Luxán).

Zur Beantwortung dieser Frage wurden jeweils vier Herzen von 12 Wochen jungen und 18 Monate alten männlichen C57Bl/6 Mäusen entnommen und 50 µm dicke immunhistologische Schnitte angefertigt. Pro Herz wurden neun zufällig ausgewählte

mikroskopische Areale aufgenommen, die Perizytenmarker-positive Oberfläche gemessen und mit der Gefäßoberfläche verglichen. Wie in Abbildung 5.1.2 erkenntlich, ist die Bedeckung der Kapillargefäße mit Perizyten im alten gegenüber dem jungen Herzen signifikant reduziert.

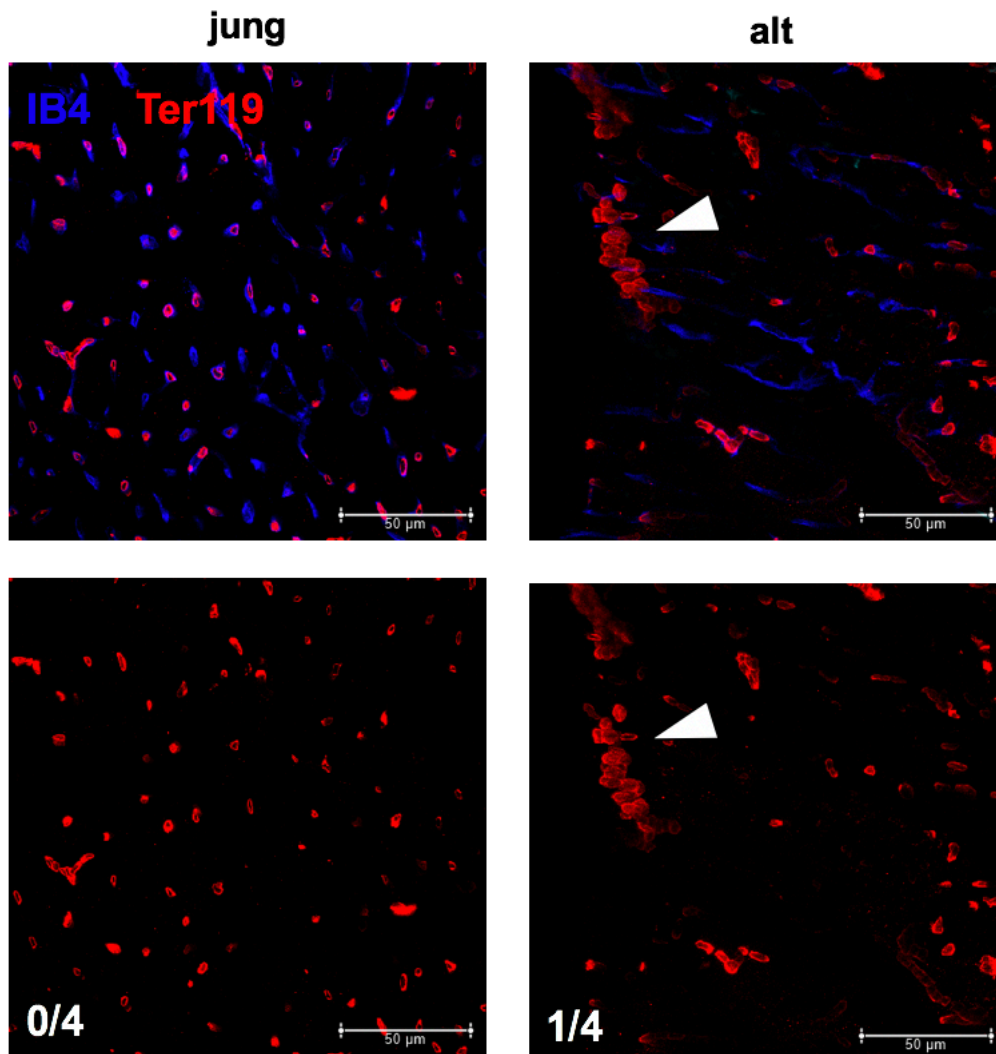


**Abbildung 5.1.2: Altersabhängige Ko-Lokalisation von Perizyten und Kapillaren.** Gezeigt ist die Lokalisation von Perizyten (NG2; grün, sowie PDGFRβ; rot) und Kapillargefäßen (Isolektin B4 = IB4; blau) in 12 Wochen alten (jung) und 18 Monaten alten (alt) Mäuserherzen (links) und die dazugehörige Quantifizierung (rechts). Während IB4 als Endothelzellmarker dient, wurden Perizyten sowohl durch NG2 als auch PDGFRβ angefärbt (Messbalken = 50 µm). Die Perizytenbedeckung wurde durch Messung der Perizytenpositiven-Oberfläche ermittelt. Gezeigt ist jeweils eine repräsentative Aufnahme aus insgesamt 36 mikroskopischen Aufnahmen. Die statistische Signifikanz ( $p = 0,0075$ ) wurde durch einen zweiseitigen, ungepaarten t-Test bestimmt. ( $n = 4$  pro Alter).

Basierend auf der Entdeckung, dass die Perizytenbedeckung in Kapillaren im Alter reduziert zu sein scheint, wurden die Kapillaren auf ihre Integrität untersucht, da diese womöglich im alten Herzen beeinflusst sein kann. Um diesen Verdacht zu bestätigen, wurde eine weitere immunhistochemische Färbung zur Untersuchung auf Mikrohämmorrhagien vorgenommen. Abermals wurden jeweils 50 µm-dicke Schnitte aus vier 12-Wochen alten Mäuserherzen (jung) und vier 18 Monate alten Mäuserherzen



(alt) hergestellt. Die Gefäße wurden mittels Isolektin Biotin 4 (IB4) blau angefärbt. Als Erythrozytenmarker diente Ter119 und färbt diese rot (Abbildung 5.1.3). Pro Herz wurden neun Schnitte angefertigt. Jeder dieser Schnitte wurde auf hämorrhagische Bereiche untersucht. In einem von vier der alten Herzen wurden Ansammlungen von Erythrozyten außerhalb von Gefäßen analysiert. In den jungen Herzen konnten jedoch solche Hämorrhagien nicht gefunden werden.

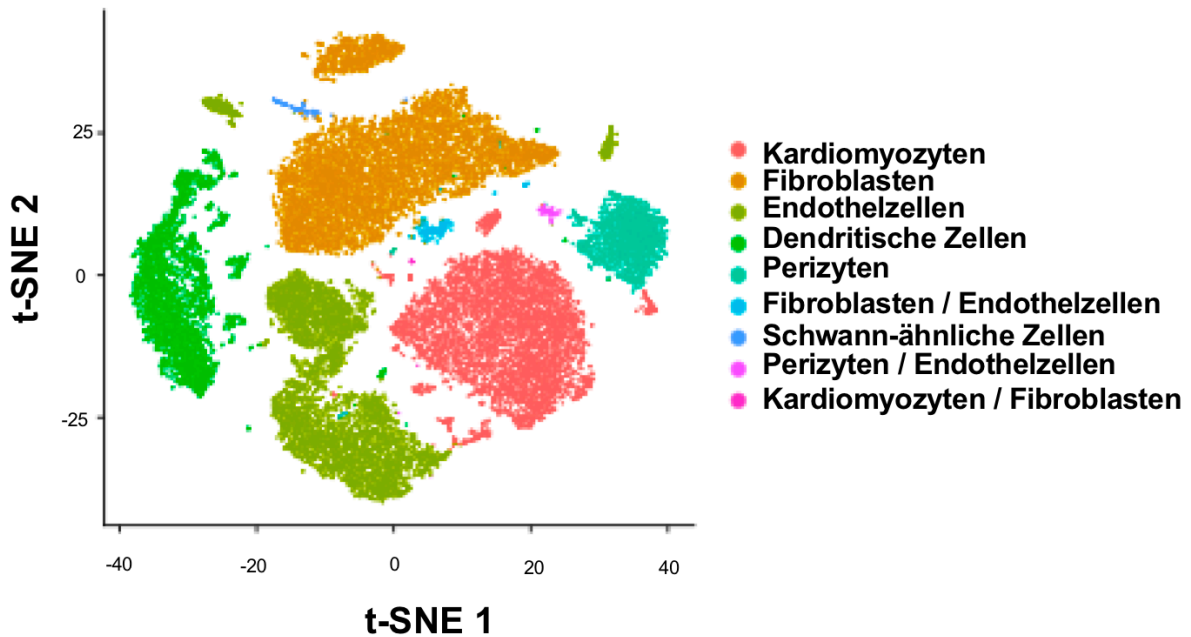


**Abbildung 5.1.3: Altersbedingte Mikrohämorrhagien im alten Herzen.** Gezeigt werden Kapillare (IB4; blau) und Erythrozyten (Ter119; rot) in 12 Wochen alten (jung) und 18 Monaten alten (alt) Mauserherzen. Abgebildet ist jeweils eine repräsentative Aufnahme aus insgesamt 20 mikroskopischen Aufnahmen. In keinem der jungen Herzen konnten Erythrozytenansammlungen außerhalb des Herzens festgestellt werden. In einem der vier alten Herzen wurden interstitielle Erythrozytenansammlungen analysiert (Pfeil). (n= 4 pro Alter)

## 5.2 Charakterisierung von alternden kardialen Perizyten

Um die durch physiologisches Altern bedingten Veränderungen in kardialen Perizyten zu entschlüsseln, wurde eine Einzel-Zellkern-RNA-Sequenzierung durchgeführt. Hierfür wurden die Herzen von drei männlichen jungen (12 Wochen alten Mäusen) und drei männlichen alten (18 Monate alten Mäusen) verwendet. Im Folgenden wurden insgesamt 14827 Zellkerne aus jungen Herzen und 12981 Zellkerne aus alten Herzen isoliert und deren Transkriptom analysiert. Sowohl die Isolation der Zellkerne als auch die Kernprozessierung mittels der „10X Genomics“-Plattform wurden in Kooperation mit der Gruppe von Dr. Sascha Sauer am Max-Delbrück Center in Berlin durchgeführt. Der Datensatz wurde bereits in einer vorangegangenen Publikation des Instituts generiert und publiziert<sup>86</sup>, jedoch lag dort der Fokus nicht auf perivaskulären Zellen.

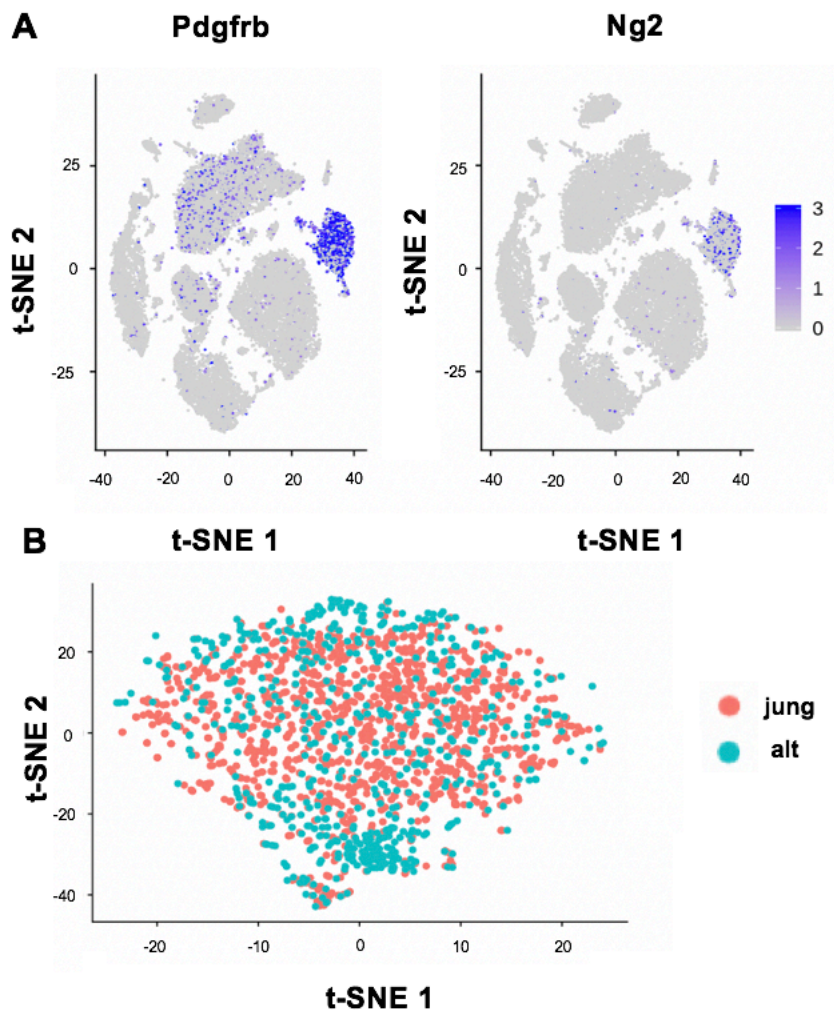
In Zusammenarbeit mit Dr. David John (Institut für Kardiovaskuläre Regeneration) wurde mit dem R-basierten Seurat 3 Paket der Einzel-Zellkern-Datensatz bioinformatisch analysiert. Um die Daten zu kategorisieren und optisch darzustellen, wurde zunächst eine Hauptkomponentenanalyse, englisch *Principal Component Analysis* (PCA), durchgeführt und anschließend eine sogenannte *t-distributed stochastic neighbour embedding* Karte (t-SNE Karte) erstellt. Diese t-SNE Karte stellt die Daten als zweidimensionale „Landkarte“ dar, in der jeder Punkt einen Zellkern beschreibt. Je näher die Zellkerne beieinanderliegen, desto ähnlicher sind die jeweiligen Expressionsprofile und je verschiedener die Expressionsprofile sind, desto weiter sind die Punkte voneinander entfernt. So können verschiedene Hauptgruppen (*Cluster*) von Zelltypen dargestellt werden, deren Identität durch die Genexpression jedes Zellkerns beschrieben werden kann. Wie in der Arbeit von Vidal & Wagner et al.<sup>86</sup> beschrieben, konnten verschiedene *Cluster* den Kardiomyozyten (*Tnnt2*-positive Zellen), Fibroblasten (*Pdgfra*-positive Zellen), Endothelzellen (*Cdh5*-positive Zellen) und Immunzellen (*CD45*-positive Zellen) zugeordnet werden (Abb. 5.2.1). Wie bereits zuvor erwähnt, liegt der Fokus dieser Arbeit auf der Heterogenität von alternden kardialen Perizyten (Abb. 5.2.1, türkises *Cluster*), welche im Folgenden näher betrachtet werden.



**Abbildung 5.2.1: Zell-spezifische Anordnung von jungen und alten Mauserzen.** Dargestellt ist der Einzel-Zellkern-Datensatz in einer *t-SNE* Karte, die die Zellkerne aus 3 jungen (12 Wochen) und 3 alten (18 Monate) Mauserzen beinhaltet. Die Bildung der einzelnen Zellgruppen ist abhängig von den zellspezifischen Markern, welche sie exprimieren. Perizyten werden in Türkis dargestellt.

In der Literatur werden *Ng2* und *Pdgfrb* als Perizyten-typische Marker beschrieben<sup>89,90</sup> und in Abbildung 5.2.2 A zur Identifikation von Perizyten genutzt. Alle *Ng2*-beziehungsweise *Pdgfrb*-positiven Zellkerne sind blau markiert. Die Perizytengruppierung aus Abbildung 5.2.1 wird als solche nun deutlich hervorgehoben. Da festzustellen ist, dass neben Perizyten auch Fibroblasten und Endothelzellen *Pdgfrb* in geringerem Maße exprimieren, wurde *Ng2* als Kontrolle hinzugezogen, um Perizyten mit Bestimmtheit zu identifizieren.

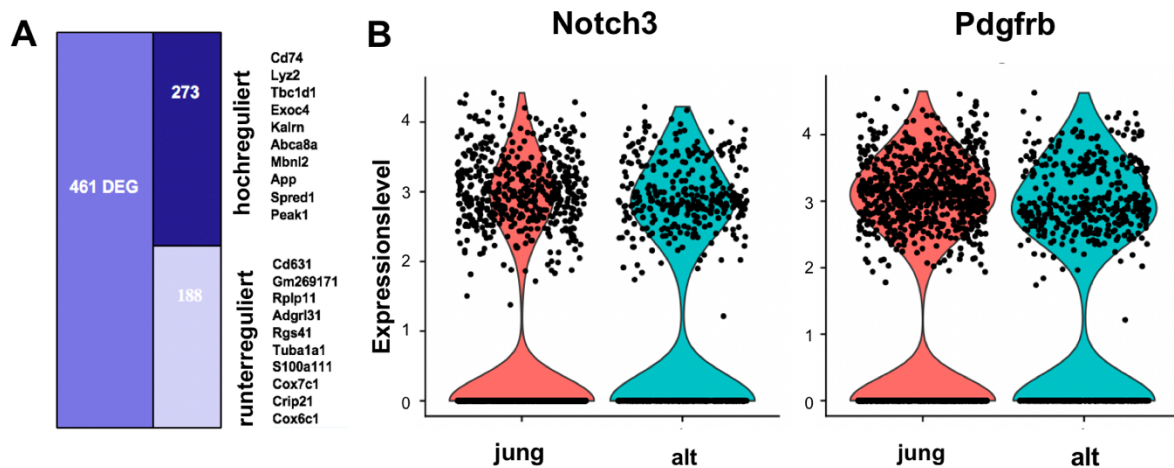
Durch Verwendung einer separaten *t-SNE* Karte wurden die als Perizyten identifizierten Zellkerne gesondert betrachtet und zwischen jungen (rot) und alten (blau) Zellkernen unterschieden (Abb. 5.2.2 B). Da die jungen Kerne sich nicht absolut identisch mit den alten Kernen gruppieren, sondern sich stellenweise kleinere Bereiche finden lassen, die sich ausschließlich aus alten Kernen zusammensetzen, erkennt man bereits in der *t-SNE* Karte, dass sich die Genexpression von kardialen Perizyten im Alter verändert.



**Abbildung 5.2.2: Charakterisierung von Perizyten.** (A) *Pdgrfb*- und *Ng2*- Expression in jungen und alten Zellkernen. Blau eingefärbte Zellen zeigen eine erhöhte Expression von *Pdgrfb* beziehungsweise *Ng2*. Die in Abb. 5.2.1 definierte Perizytengruppe wird nun als solche hervorgehoben. (B) Die Perizyten-spezifischen Zellkerne werden abhängig ihren exprimierten Genen nach jung (rot) und alt (blau) gruppiert.

Um ein genaueres Verständnis für die alterungsabhängige Genexpression zu erhalten, wurden Gene betrachtet, die zwischen jungen und alten Kernen differentiell exprimiert sind (DEG: *differentially expressed gene(s)*, differentiell exprimierte Gene). Es wurden insgesamt 461 Gene gefunden, die während des Alterungsprozesses einen veränderten Expressionsspiegel aufweisen. 273 davon zeigten eine signifikant gesteigerte Expression und 188 eine signifikant reduzierte Expression im Alter. Die in Abbildung 5.2.3 A dargestellte *Heatmap* zeigt jeweils die zehn am stärksten hoch- bzw. runterregulierten Gene.

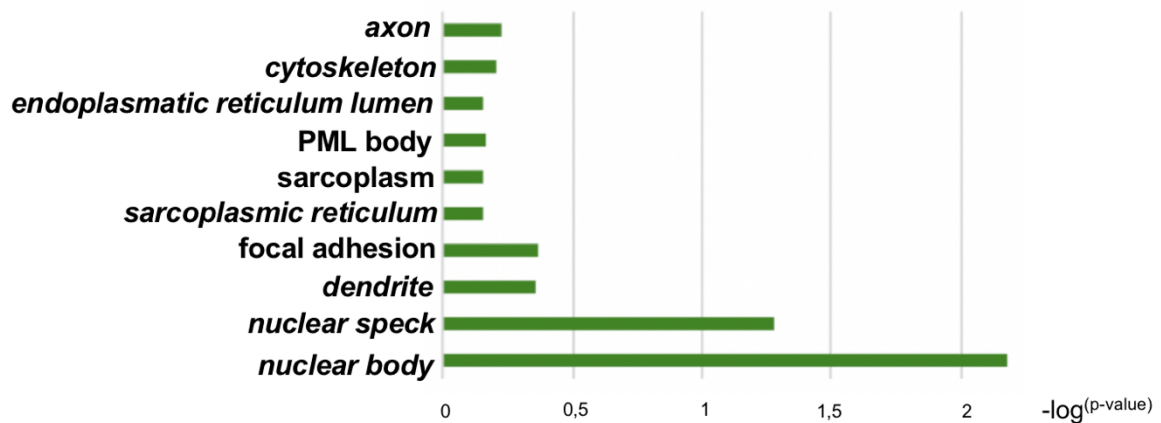
Unter den runterregulierten Genen waren *Notch3* und *Pdgfrb* zu finden, deren Expression in Abbildung 5.2.3 B als *Violin-Plot* dargestellt ist. Dies ist besonders von Bedeutung, da die Regulation von *Pdgfrb* als Perizyten-typisches Gen nicht zu erwarten war. *Notch3* hingegen spielt in der Angiogenese eine zentrale Rolle in der Endothellinteraktion<sup>7</sup> und erscheint daher als potentiell interessantes Gen.



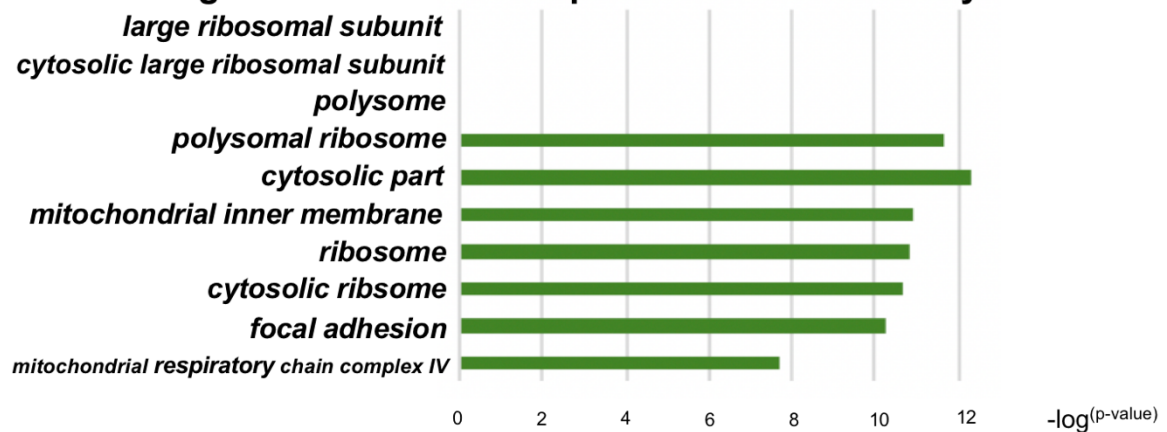
**Abbildung 5.2.3: Veränderte Genregulation während des Alterns.** (A) 461 differentiell exprimierte Gene sind im Alter reguliert. Davon sind 273 hochreguliert und 188 runterreguliert. (B) *Notch3* und *Pdgfrb* sind im alternden Herzen runterreguliert. Die y-Achse ist ein Maßstab für das Expressionslevel. Die dargestellten „violine plots“ der Zellen des jungen Herzens sind rot, die des alten Herzens sind blau dargestellt.

Um die differentiell exprimierte Gene zu bewerten, wurde sich einer GO-Analyse (Genontologie-Analyse) bedient. Eine GO-Analyse gibt Rückschlüsse auf zelluläre Funktionen, indem die regulierten Gene einzelnen Signalwegen zugeordnet werden. Je mehr Gene einem Signalweg zugesprochen werden, desto stärker ist dieser im (in diesem Fall) Alter betroffen. In Abbildung 5.3.4 ist die GO-Analyse aller in Perizyten differentiell exprimierten Genen abgebildet, welche im Alter reguliert sind. Auffällig ist, dass vor allem der Signalweg der fokalen Adhäsion im Alter beeinträchtigt zu sein scheint. Dies kann auf eine verminderte Perizyten-Endothelzell- beziehungsweise Perizyten-Matrix-Adhäsion zurückzuführen sein. Dies deckt sich mit der anfänglichen Beobachtung, dass die Perizytenbedeckung in kardialen Kapillargefäßen im Alter abnimmt.

## A Hochregulierte zelluläre Komponenten in alten Perizyten



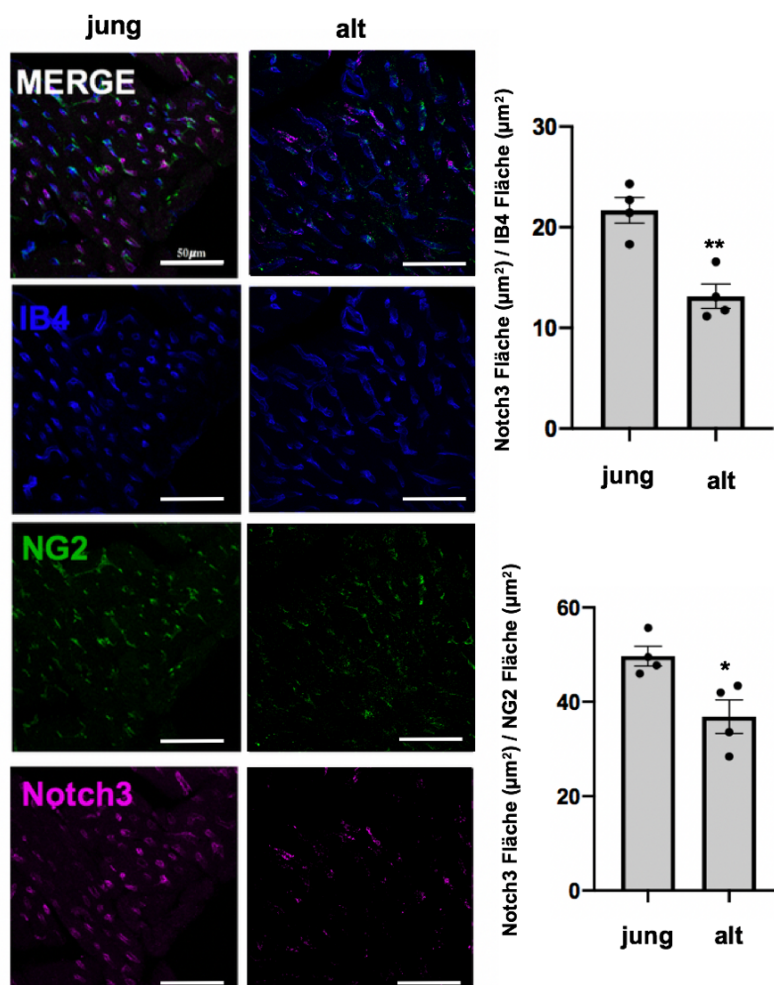
## B Runterregulierte zelluläre Komponenten in alten Perizyten



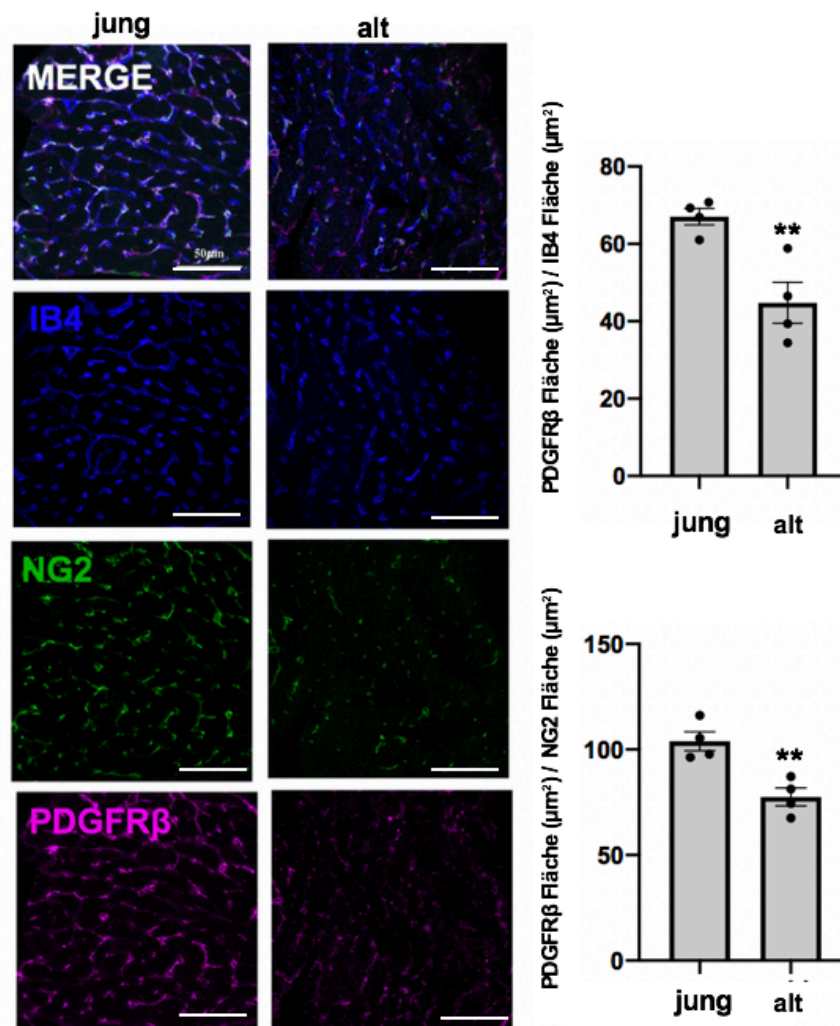
**Abbildung 5.2.4: GO-Analysen zeigen reduzierte Perizyten-Adhäsion im Alter. (A)** Die Signalwege von im Alter hochregulierten Genen liegen vor allem im Bereich des Zellkörpers. **(B)** Im Alter runterregulierte Gene zeigen in der Analyse verschiedene Signalwege im Bereich des Ribosoms auf. Eine weitere wichtige zelluläre Funktion stellt die fokale Adhäsion dar.

### 5.3 Notch3 und PDGFR $\beta$ sind in alternden Perizyten runterreguliert

Zur Validierung der Runterregulation von Notch3 und PDGFR $\beta$  auf Proteinebene wurde eine immunhistochemische Färbung von Herzsektionen aus 12 Wochen jungen Mäusen und 18 Monate alten Mäusen vorgenommen. Pro Herz wurden drei 50  $\mu$ m starke Schnitte hergestellt. Pro Schnitt wurden unter Verwendung des Leica TCS SP8 Konfokalmikroskops und der dazugehörigen LASX Software wiederum drei randomisierte Felder aufgenommen, sodass insgesamt pro Herz neun Bilder ausgewertet werden konnten. Isolektin Biotin 4 (IB4) dient als Endothelzellmarker, ein NG2-Antikörper dient der Markierung von Perizyten. Da der Notch-Signalweg bei Endothelzellen nachweislich eine große Rolle spielt, von diesen auch exprimiert wird<sup>91</sup> und PDGFR $\beta$ , wie in Abbildung 5.2.2 A, auch von anderen Zelltypen exprimiert wird, ist es hier von besonderer Bedeutung sich einem weiteren Perizyten-typischen Marker, dem NG2, zu bedienen. Wie in Abbildung 5.3.1 und 5.3.2 zu sehen, nimmt die Notch3- und PDGFR $\beta$ -Expression, normalisiert auf NG2 und IB4, in beiden Fällen signifikant ab.



**Abbildung 5.3.1: Notch3-Expression ist im Alter runterreguliert.** Gezeigt ist das Expressionsverhalten von Perizyten (NG2; grün, sowie Notch3; rot) und Kapillargefäßen (Isolektin B4 = IB4; blau) in 12 Wochen alten (jung) und 18 Monaten alten (alt) Mausherzen (links) und die dazugehörige Quantifizierung (rechts). Während IB4 als Endothelzellmarker dient, wurden Perizyten über NG2 farblich markiert (Messbalken = 50 µm). Dargestellt ist jeweils eine repräsentative Aufnahme aus insgesamt 36 mikroskopischen Aufnahmen. Die statistische Signifikanz ( $p = 0,0028$  für NOTCH3 normiert zu IB4;  $p = 0,0209$  für NOTCH3 normiert zu NG2) wurde durch einen zweiseitigen, ungepaarten t-Test bestimmt. ( $n = 4$  pro Alter).

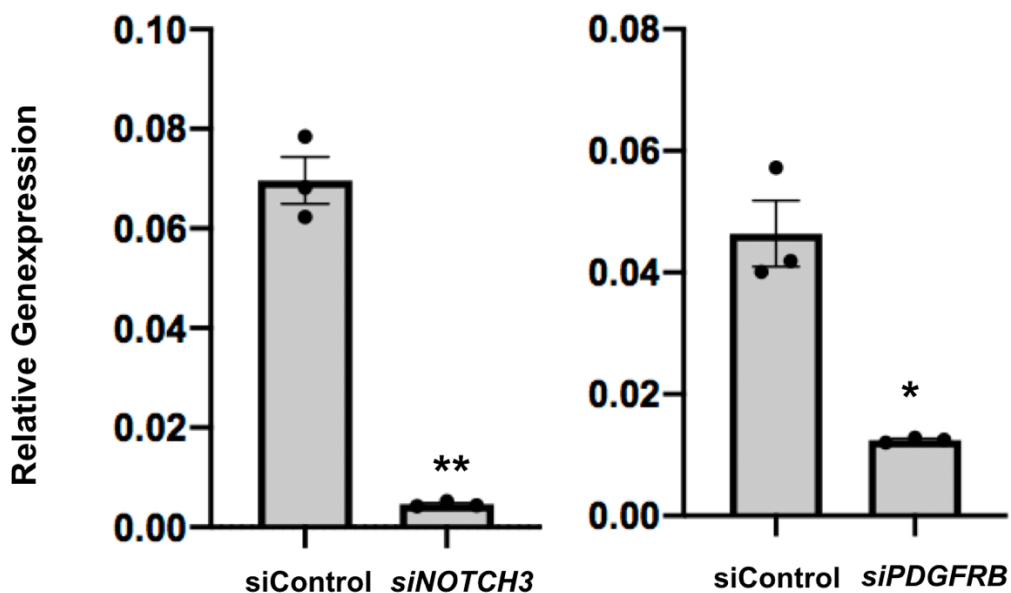


**Abbildung 5.3.2: PDGFRβ-Expression ist im Alter runterreguliert.** Gezeigt ist das Expressionsverhalten von Perizyten (NG2; grün, sowie PDGFRβ; rot) und Kapillargefäßen (Isolektin B4 = IB4; blau) in 12 Wochen alten (jung) und 18 Monaten alten (alt) Mausherzen (links) und die dazugehörige Quantifizierung (rechts). Während IB4 als Endothelzellmarker dient, wurden Perizyten sowohl durch NG2 als auch PDGFRβ angefärbt (Messbalken = 50 µm). Dargestellt ist jeweils eine repräsentative Aufnahme aus insgesamt 36 mikroskopischen Aufnahmen. Die statistische Signifikanz ( $p = 0,008$  für PDGFRβ normiert zu IB4;  $p = 0,0054$  für PDGFRβ normiert zu NG2) wurde durch einen t-Test bestimmt. ( $n = 4$  pro Alter).



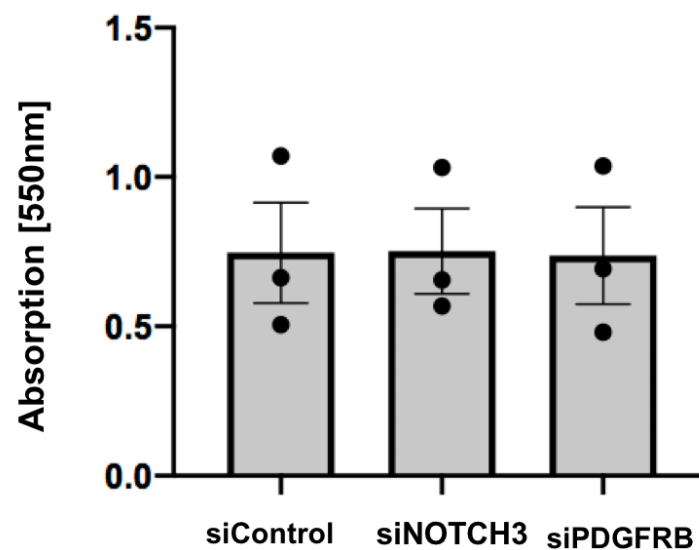
## 5.4 Funktionelle Analyse von humanen Perizyten nach NOTCH3- und PDGFR $\beta$ -Repression

Nachdem die Reduktion der Notch3- beziehungsweise PDGFR $\beta$ -Expression in alternden kardialen Perizyten validiert wurde, sollte im Anschluss deren zelluläre Funktion in Perizyten ermittelt werden. Um dies zu tun, wurden *in-vitro* Experimente durchgeführt, bei denen humane Gehirnperizyten kultiviert wurden. Zum einen dient diese Perizytenart bereits seit Jahrzehnten als Modellperizyt<sup>61</sup>, zum anderen sollen sie später dem Vergleich von isolierten kardialen Perizyten dienen, da diese nicht käuflich erwerblich sind. Um einen möglichen Einfluss von NOTCH3 und PDGFRB auf die Perizyten-Funktion genauer untersuchen zu können, wurde mittels siRNA (*small interfering RNA*)-vermittelter Gen-Repression jeweils die Translation der *NOTCH3*- und *PDGFRB*-mRNA unterbunden. Hierfür wurde sich des käuflich erwerblichen siRNA-SMARTPools von Dharmacon Horizon bedient. Wie in Abbildung 5.4.1 zu entnehmen, ist das Expressionslevel in den transfizierten Perizyten von *NOTCH3* auf 6,6 %  $\pm$  0,0002 % und von *PDGFRB* auf 26,8 %  $\pm$  0,0002 % gesunken.



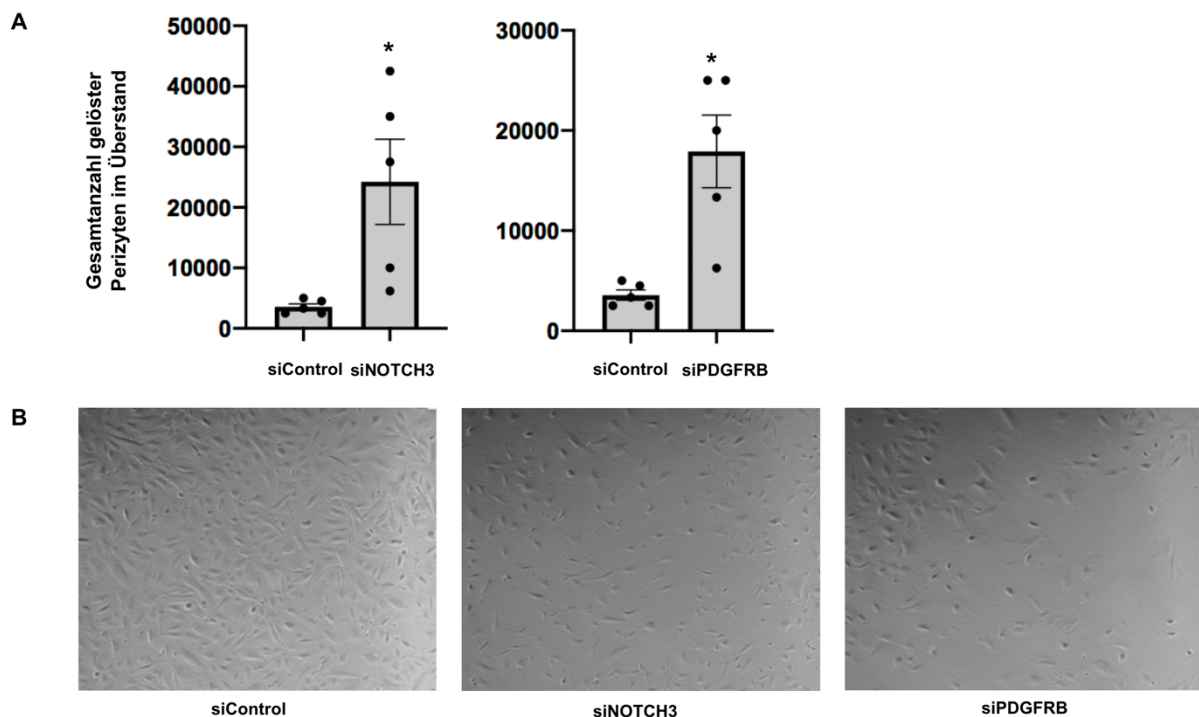
**Abbildung 5.4.1: NOTCH3- und PDGFR $\beta$ -Expression nach Genausaltung reduziert.** Die Genexpression von NOTCH3 ist nach Ausschaltung auf 6,6 % und bei PDGFRB auf 26,8 % im Vergleich zu Kontrolle reduziert. Angegeben wird die Genexpression in Prozent. Die Signifikanz der Daten wurde mittels t-Test ermittelt. Die statistische Signifikanz ( $p = 0,0051$  für siNOTCH3 und  $p = 0,0244$  für siPDGFRB) wurde durch einen ungepaarten Welch's t-Test bestimmt. ( $n = 3$ ).

Zur Messung der metabolischen Aktivität und der Viabilität der transfizierten Zellen wurde ein MTT-Experiment durchgeführt. Mit diesem Versuch soll kontrolliert und gewährleistet werden, dass die Genausschaltung keinen Einfluss auf den Metabolismus der Zelle hat, beziehungsweise nicht zytotoxisch ist. Wie in Abbildung 5.4.2 demonstriert, hat weder die Stilllegung von *PDGFRB* noch von *NOTCH3* einen Einfluss auf den Perizytenmetabolismus.



**Abbildung 5.4.2: *NOTCH3* und *PDGFRB* Ausschaltung hat keinen Effekt auf die metabolische Aktivität und Viabilität in Perizyten *in-vitro*.** Gezeigt ist die Stärke der Absorption, welche durch den Farbstoff Formazan hervorgerufen wird und die Glykolyserate der Zelle widerspiegelt. Gemessen wurde bei einer Wellenlänge von 550 nm. Die Absorptionsstärke von *NOTCH3* und *PDGFRB* gleicht der Kontrolle. Die Daten wurden statistisch ( $p = 0,9807$  für *siNOTCH3* und  $p = 0,9690$  für *siPDGFRB*) durch einen ungepaarten t-Test bestimmt ( $n=3$ ).

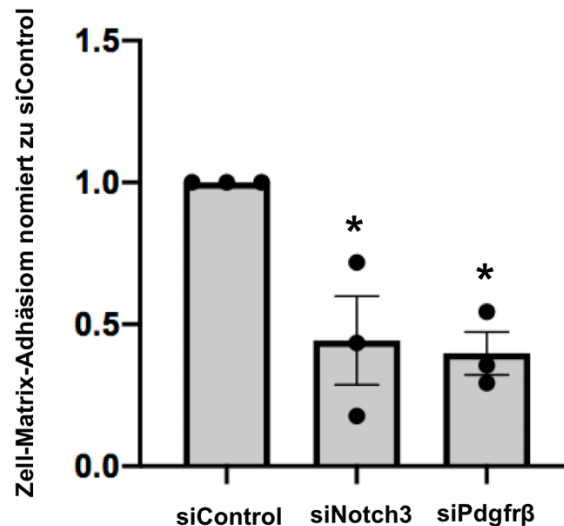
Auffällig war, dass sowohl durch die *NOTCH3*- als auch *PDGFRB*-Repression die Perizyten-dichte in der Zellkulturschale abnahm. Dies wurde vor allem dadurch bewiesen, dass sich mehr Perizyten im Zellkulturüberstand von *NOTCH3*- und *PDGFRB*-reprimierten Perizytenkulturen befanden als in der Kontrollkultur (Abbildung 5.3.3).



**Abbildung 5.4.3: Perizyten lösen sich vermehrt nach Ausschaltung von *NOTCH3* und *PDGFRB* *in-vitro* von der Zellkulturplatte. (A)** Angegeben wird die totale Anzahl an Perizyten, welche sich zwei Tage nach Transfektion von der Zellkulturplatte gelöst und im Zellkulturmedium befanden. **(B)** Mikroskopische Aufnahmen von der Kulturschale vier Tage nach Transfektion zeigen eine verminderte Perizyten-dichte nach Ausschaltung von *NOTCH3* und *PDGFRB*. Die statistische Signifikanz ( $p = 0,0422$  für siControl vs. siNOTCH3 und  $p = 0,0159$  für siControl vs. siPDGFRB) wurde durch einen zweiseitigen Welch's t-Test bestimmt. ( $n = 5$ ).

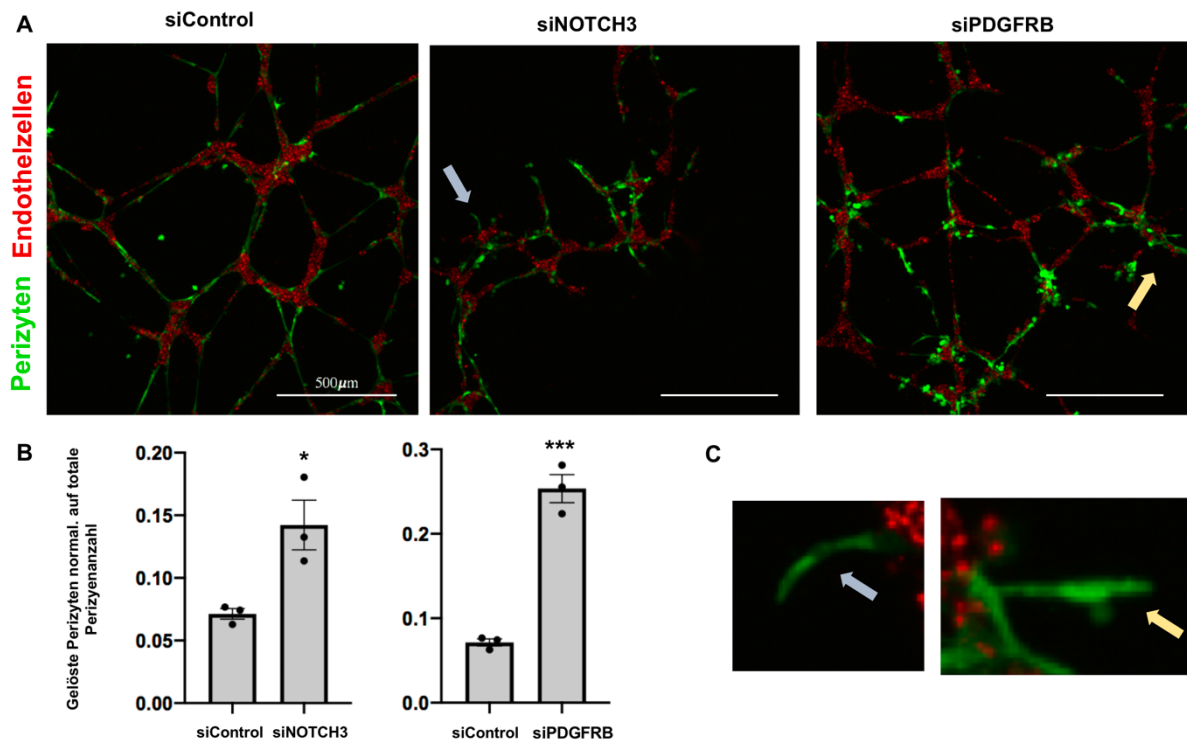
Diese Beobachtung deckt sich mit den initialen GO-Analysen, die implizierten, dass die Zell-Adhäsion in alternden Perizyten abnimmt. Um im weiteren Verlauf die Perizytenadhäsion zu analysieren, wurden zwei verschiedene Experimente durchgeführt. Bei dem ersten Versuch handelt es sich um einen Perizyten-Matrix-Adhäsions-Versuch. Hierbei wurden humane Perizyten jeweils mit einer Kontroll-siRNA (die keinen Einfluss auf die mRNA-Translation hat), einem *NOTCH3*- und einem *PDGFRB*-gerichteten siRNA-Pool (siNOTCH3 bzw. siPDGFRB) transfiziert. Die Zellen wurden mit BCECF-AM angefärbt und auf eine mit Gelatine beschichtete 96-Lochplatte ausgebracht. Nach einer Stunde in serumfreiem Medium wurde die Zellzahl mittels Spektrophotometer jeweils vor (initiale Messung) und nach zweimaligem Waschen bestimmt. Die relative Perizyten-Matrix-Adhäsion wurde dann durch das jeweilige Verhältnis der initialen Messung und der Messung nach dem Waschen errechnet. Ersichtlich ist, dass die Adhäsion von Perizyten zur Gelatinematrix nach

Ausschaltung von *NOTCH3* und *PDGFRB*, verglichen zur siRNA-Kontrolle, deutlich reduziert ist (Abbildung 5.4.4).



**Abbildung 5.4.4: Zell-Matrix-Adhäsion ist nach *NOTCH3* und *PDGFRB* Ausschaltung reduziert.** Die Perizytdichte wurde mittels des Farbstoffs BCECF-AM ermittelt. Gemessen wurde dessen Absorption vor dem ersten und nach dem letzten, dritten Waschschrift. Normalisiert zu siControl wird in der Abbildung ersichtlich, dass die Perizytdichte nach Ausschaltung des jeweiligen Gens reduziert ist, da das Signal sowohl bei *NOTCH3* um 55,6 % +/- 0,1 %, als auch bei *PDGFRB* um 60,2 % +/- 0,1 % reduziert ist. Die statistische Signifikanz ( $p = 0,01$ ) wurde mit einer ANOVA und anschließend dem post hoc Bonferroni-Test bestimmt. ( $n = 3$ )

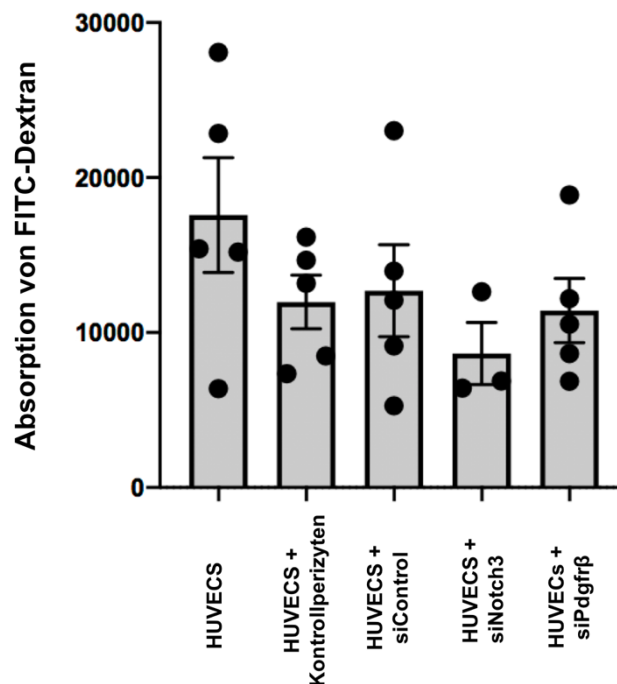
Bei einem zweiten Adhäsionsversuch, dem sogenannten „Matrigel-Adhäsions-Versuch“ wurde die Perizyten-Endothelzell-Adhäsion untersucht. Mittels dieses Versuches konnte die Adhäsion über einen physiologischen Weg getestet werden, indem Perizyten mit Endothelzellen in einem simulierten Gefäßbett kokultiviert wurden. Dabei wurden Perizyten mit einem GFP-Virus transduziert und somit mit GFP markiert. Humane Endothelzellen aus der Nabelvene (*human umbilical endothelial cells*; HUVECs), die als Modellendothelzelle dienen, wurden mit *Dil acetylated LDL* ebenfalls angefärbt. In Abbildung 5.4.5 A ist deutlich zu erkennen, dass nach Ausschaltung von *NOTCH3* und *PDGFRB* die Perizyten-HUVEC-Adhäsion vermindert ist, beziehungsweise die Perizyten keinen Kontakt zu Endothelzellen finden können. Dies lässt sie als verdickte grüne Punkte darstellen. Perizyten bilden zudem nach siNOTCH3- / siPDGFRB -Transfektion Filopodien-ähnliche Ausläufer aus, die den Kontroll-Perizyten fehlen (Abb. 5.4.5 C).



**Abbildung 5.4.5: Die Anzahl sich gelöster Perizyten nach Ausschaltung von *NOTCH3* und *PDGFRB* ist *in-vitro* erhöht. (A)** Gezeigt ist die Netzbildung von Perizyten (in grün gefärbt, GFP) und den als Modellendothelzellen dienenden HUVECs (in rot gefärbt mit Dil acetylated LDL), welche in eine Matrix eingebettet sind. Das Netzwerk ist bei siControl deutlich besser ausgeprägt. Bei siNotch3 und siPdgfrb ist neben einem reduzierten Netzwerk die Anzahl der sich gelösten Perizyten signifikant erhöht, was in (B) näher dargestellt wird. (C) Perizyten bilden in beiden Genausschaltungen Filopoden-ähnliche Ausläufer. Gezeigt ist jeweils eine repräsentative Aufnahme aus insgesamt 24 Bildern pro Kondition. Die statistische Signifikanz ( $p = 0,0251$  für siControl vs. siNOTCH3 und  $p = 0,0004$  für siControl vs. siPDGFRB) wurde mit einem ungepaarten t-Test bestimmt ( $n=3$ ).

Um daraufhin zu untersuchen, ob NOTCH3 beziehungsweise PDGFR $\beta$  zudem die Permeabilität von Endothelzellen beeinflusst, wurde ein *in vitro*-Permeabilitätsversuch durchgeführt. HUVECs dienen als Modellendothelzellen. Gemessen wird die Absorption von FITC-Dextran, welches auf die Membran gegeben wird und je nach Permeabilität des Zellverbandes unterschiedlich stark durchgelassen wird. Die Messung erfolgte eine Stunde nach Zugabe der Perizyten. Wie in Abbildung 5.4.6 zu erkennen, ist die Permeabilität für FITC-Dextran von HUVECs in Kombination mit Perizyten im Vergleich zu HUVECs ohne Zugabe von Perizyten erniedrigt. Der Perizyten-Wildtyp (unbehandelte Perizyten) dient als Kontrolle und entspricht in etwa der Permeabilitätsstärke von siControl. Die Permeabilität von siNOTCH3 und siPDGFRB ist nicht signifikant beeinflusst, was zeigt, dass zumindest im *in-vitro*

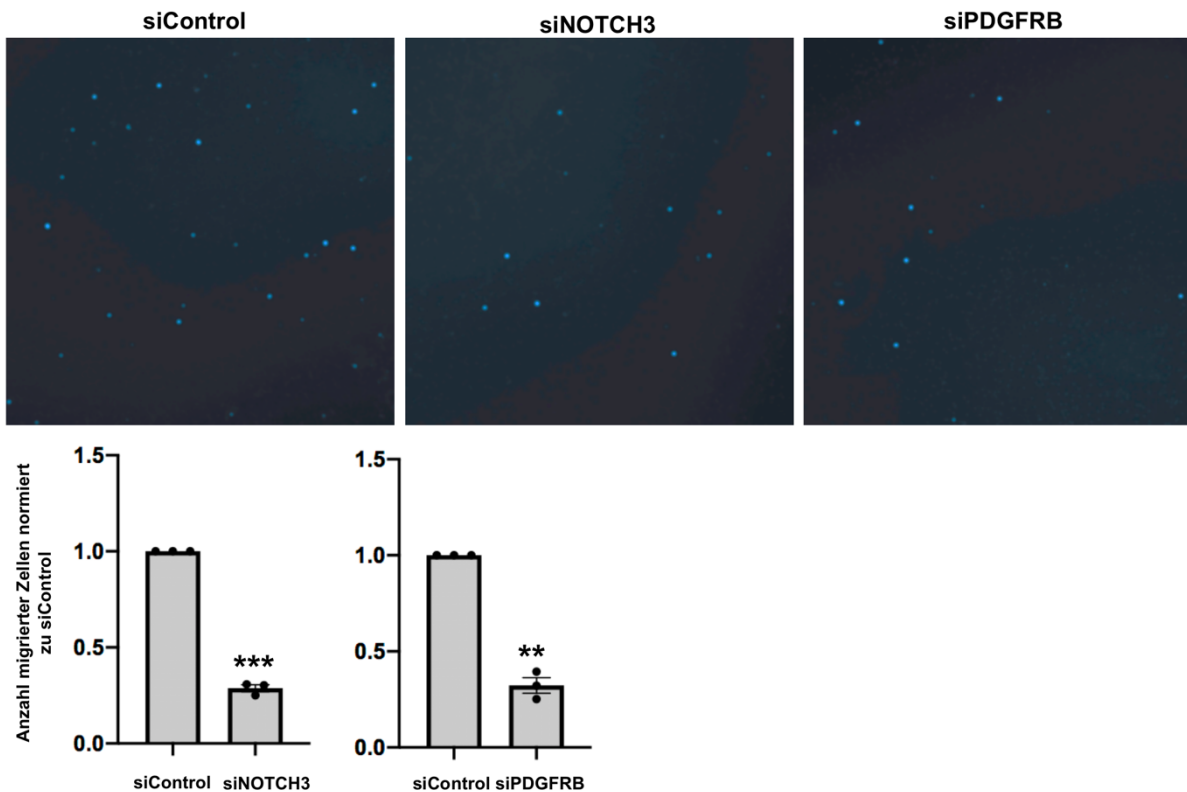
Versuch die Notch3- und Pdgrfb-Expression keinen Einfluss auf die Permeabilität von Endothelzellen hat.



**Abbildung 5.4.6: Das Ausschalten von *NOTCH3* und *PDGFRB* zeigt keinen Einfluss auf die Permeabilität.** Die Permeabilität des als Kontrolle dienenden Wildtyps gleicht der von siControl. HUVECs zeigen mit dem Wegfall von Perizyten eine erhöhte Permeabilität an. SiNotch3 und siPdgrfb sind nicht signifikant verändert. Der statistische Wert ist nicht signifikant und wurde mit einer ANOVA und anschließend dem post hoc Bonferroni-Test bestimmt. (alle Gruppen n = 5, außer HUVECS + siNotch3 n=3)

In der Literatur ist es bereits hinlänglich bekannt, dass PDGFR $\beta$  und dessen Liganden PDGF-B für die Zellmigration eine wichtige Rolle spielen<sup>92</sup>. Um nun auch den Einfluss von PDGFR $\beta$  und NOTCH3 auf die Migration von Perizyten zu untersuchen, wurde ein *in-vitro*-Perizyten-Migrationsversuch durchgeführt. Hierzu wurde ein Boyden-Chamber-Experiment verwendet. Bei diesem Versuch bringt man Zellen in einem Kammereinsatz, welcher mit kleinen Poren durchsetzt ist, aus. Nach drei Stunden Inkubation werden die Zellen mit PFA fixiert und die Zellkerne mit DAPI kenntlich gemacht. Anschließend zählt man die Zellkerne auf der Unterseite des Kammereinsatzes, also diejenigen Zellen, die durch den Einsatz migriert sind. Zur Untersuchung der Perizytenmigration, wurden humane Perizyten abermals mit einer Kontroll-siRNA, siNOTCH3 und siPDGFRB transfiziert. Zwei Tage nach Transfektion wurden die Perizyten jeweils in einem *Boyden-Chamber*-Einsatz ausgebracht und für

drei Stunden kultiviert. Wie zuvor beschrieben, wurden die Perizyten fixiert und mit DAPI gefärbt. Wie in Abbildung 5.4.7 gezeigt, ist die Perizytenmigration nach Ausschaltung von Notch3 und Pdgfrb signifikant reduziert. Die Zellzahlen liegen bezogen auf siControl prozentual für Notch3 durchschnittlich bei 28,77 % und für Pdgfrb bei 32,26 %.



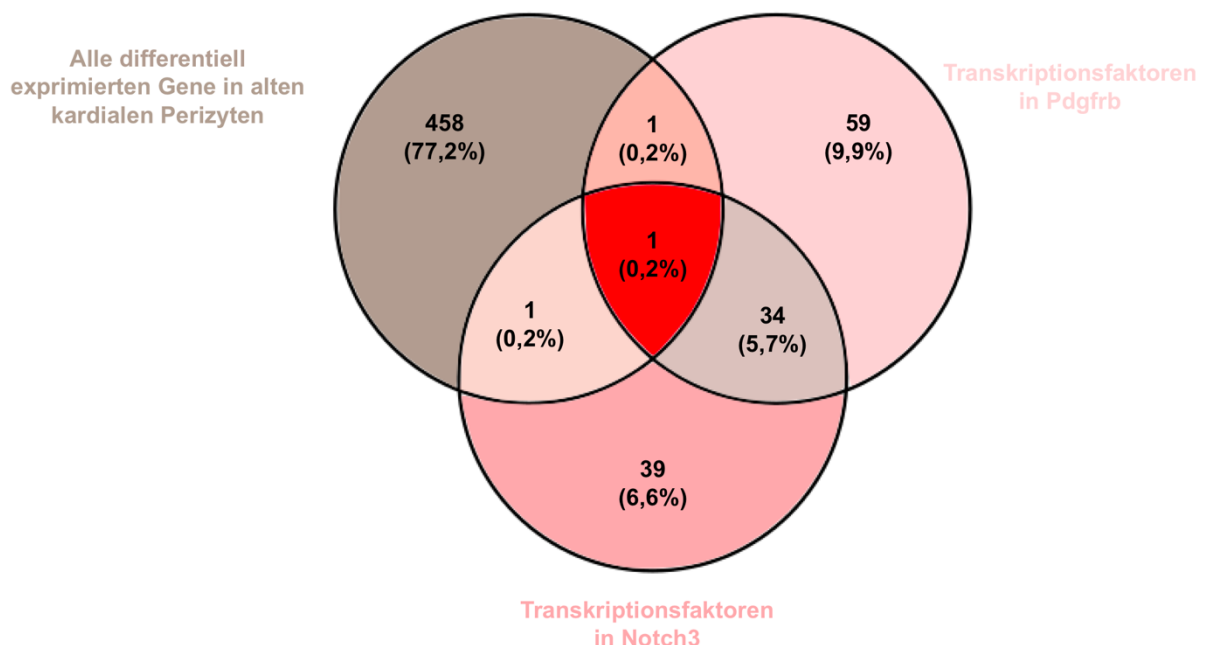
**Abbildung 5.4.7: Die Zellmigration ist nach Genausschaltung reduziert.** Jeder blaue Punkt stellt einen mit DAPI-angefärbten Perizytenzellkern dar. Die Migration ist bei siNOTCH3 um 71,23 % und bei siPDGFRB um 67,74 % reduziert. Gezeigt ist jeweils eine repräsentative Aufnahme aus insgesamt 20 Bildern pro Kondition. Die statistische Signifikanz ( $p = 0,00007$  für siControl vs. siNOTCH3 und  $p = 0,0036$  für siControl vs. siPDGFRB) wurde mit einem Welch's t-Test bestimmt. ( $n = 3$ )

## 5.5 Mechanistische Analyse des siNotch3-/ siPdgfrb-Phänotypen in Perizyten: Zeb1 als potenzieller Master-Regulator

Nachdem gezeigt wurde, dass sowohl Notch3, als auch PDGFR $\beta$  die Adhäsion und Migration von Perizyten regulieren, lag die Frage nach dem molekularen Mechanismus nahe. Um einen potenziellen *Master-Regulator* auf transkriptioneller Ebene zu finden, wurden erneut die DEGs aus dem Einzel-Kern-Datensatz betrachtet und mit den

Transkriptionsfaktoren verglichen, die jeweils *Notch3* und *Pdgfrb* regulieren. Mit einem Venn-Diagramm wurde die Schnittmenge dieser Faktoren gebildet und grafisch in Abbildung 5.5.1 dargestellt. Erstaunlicherweise ergab sich nur ein einziger gemeinsamer Faktor: *Zeb1*. Bei *Zeb1*, auch bekannt als „zinc finger E-box binding homeobox 1“, handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor, der sowohl als Aktivator als auch als Repressor agieren kann<sup>93</sup>. Verschiedene Arbeitsgruppen haben sich bereits mit *Zeb1* im Zusammenhang mit der Differenzierung von Endothelzellen zu Mesenchymalzellen auseinandergesetzt<sup>94</sup> und unter anderem auch eine onkogene Wirkung festgestellt<sup>95</sup>.

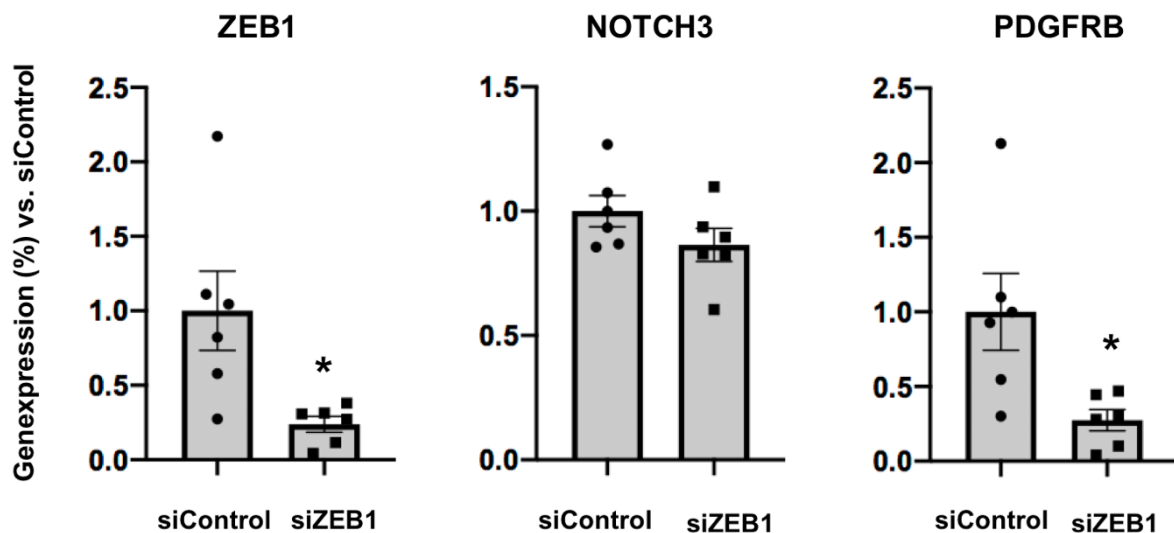
Es ist bereits bekannt, dass *Zeb1* eine hemmende Wirkung auf Gene ausübt, die mit Zelladhäsion in Verbindung stehen<sup>96</sup>. In Zusammenhang mit *Notch3* haben verschiedene *in-vitro* Versuche bereits gezeigt, dass in der Lunge eine Hemmung von *Zeb1* zu einer erhöhten Expression von *Notch3* führt und somit ein Regulationsmechanismus vorliegen muss<sup>97</sup>. Ebenfalls liegen bereits verschiedene Arbeiten vor, die besagen, dass *Zeb1* eine reprimierende Wirkung auf *Pdgfra* ausübt<sup>96</sup>, welches wie *Pdgfrb* in der Tumordinvasion eine entscheidende Rolle einzunehmen scheint<sup>98</sup>.



**Abbildung 5.5.1: Der Transkriptionsfaktor *Zeb1* zeigt eine mögliche regulatorische Funktion auf die *Notch3*- und *Pdgfrb*-Expression.** Gezeigt ist ein Venn-Diagramm, dass die DEGs des Einzel-Kern-Datensatzes und jeweils eine Liste mit Transkriptionsfaktoren, die *in-silico* vorhergesagt sind und *Notch3* oder *PDGFRB* regulieren, beinhaltet. Das Diagramm wurde mit der frei zugänglichen Software *Venny 2.0* erstellt.



Um die Rolle von Zeb 1 in der *Notch3*- und *Pdgfrb*-Regulation näher überprüfen zu können, wurde eine Zeb1-Translation in Perizyten über siRNA-vermittelter Gen-Repression durchgeführt. Als siRNA diente die *Zeb1 Silencer Select Pre-designed siRNA* von Ambion. Die in Abbildung 5.5.2 angezeigte Expression zeigt eine bei 23,84 % runterregulierte Zeb1-Expression, eine nicht signifikante runterregulierte Expression von Notch3 auf 86,44 % und eine deutlich signifikant gesunkene Expression von Pdgfrb auf 27,37 % auf. Diese Daten implizieren, dass Zeb1 als übergeordneter Regulator fungiert, durch dessen verringerte Expression in gealterten kardialen Perizyten die altersbedingte *Pdgfrb*-Repression möglicherweise zu erklären ist.



**Abbildung 5.5.2: Nach Ausschaltung des ZEB1-Gens sinkt die PDGFRB-Genexpression signifikant.** Die Genexpression von ZEB1 ist nach Ausschaltung auf 23,84% reduziert. Durch die Genausschaltung von Zeb1 reduziert sich die Expression von NOTCH3 auf 86,44% und von PDGFRB auf 27,37%. Angegeben wird die Genexpression in Prozent. Die Signifikanz der Daten ( $p = 0,0186$  für Zeb1,  $p = \text{n.s.}$  für NOTCH3 und  $p = 0,0241$  für PDGFB) wurde mittels zweiseitigem, ungepaarten t-Test ermittelt. ( $n = 6$ )



## 6. Diskussion

Die vorliegende Arbeit gibt Aufschluss über neue Erkenntnisse bezüglich der veränderten Morphologie und Funktion von Perizyten im alternden Herzen. Es wurde gezeigt, dass die Anzahl an Perizyten, welche Kapillare bedecken, im Alter abnimmt. Diese Veränderung ist von verschiedenen Faktoren abhängig. Ursache hierfür ist unter anderem eine differenzielle Expression von Perizyten-spezifischen Genen, welche auch in RNA-Sequenzierungsdaten dargestellt werden konnten (Abbildung 5.2.3. B). Zugleich wurde ein übergeordneter Regulator - Zeb1 - gefunden, der als Transkriptionsfaktor Einfluss auf die Expression, insbesondere von *Pdgfrb* einnimmt (Abbildung 5.5.1). Es wurde nachgewiesen, dass Notch3 und PDGFR $\beta$  im gealterten Herzen reduziert sind, was letztlich auch einen Einfluss auf die biologische Funktion von Perizyten ausübt. Neben einer *in-vitro* gezeigten, reduzierten Perizyten-Matrix-Adhäsion, Transmigration und einem verminderten intrazellulären Kontakt mit Endothelzellen, ist ebenfalls *in-vivo* die Gefäßintegrität gestört. Es kommt zu Mikrohämorrhagien und dem Austritt von Blutbestandteilen ins Interstitium. Ebenfalls zeigt diese Arbeit, dass der Alterungsprozess nicht nur, wie bereits bekannt, anatomische Veränderungen am Herzen mit sich bringt, sondern auch auf zellulärer Ebene die Perizyten betroffen sind. Dies ist von fundamentaler Bedeutung für die Gefäßbiologie, da die Alterung der kardialen Perizyten in der aktuellen Literatur verhältnismäßig unterrepräsentiert ist. Zu guter Letzt wurde ein Protokoll etabliert, das die Isolation von Perizyten aus Mäuseherzen ermöglicht. Ein wichtiger Punkt, der während der gesamten Arbeit festgestellt wurde, ist, dass Perizyten sehr spezifisch sind, was nicht nur die Lokalisation direkt am Gefäß betrifft, sondern auch die Organspezifität.

### 6.1 Der Perizytenphänotyp verändert sich während des kardialen Alterns

Es ist bereits bekannt, dass der Alterungsprozess im Herzen die einzelnen Zelltypen auf verschiedene Art und Weise beeinflusst. Viele Forschungsarbeiten fokussierten sich bereits auf Kardiomyozyten, Fibroblasten und Endothelzellen<sup>99</sup>. Wie in Abbildung 5.5.1 bereits dargestellt, steigt die Anzahl hypertrophierter Kardiomyozyten, was beispielsweise auf erhöhtes Angiotensin II zurückzuführen ist<sup>100</sup>. Fibroblasten bilden verstärkt quervernetzte Matrixproteine, die zu Fibrosen führen. Sie

nehmen im Epikard teilweise einen Osteoblasten-ähnlichen Phänotypen an und hemmen Angiogenese über PAI-1<sup>99,86</sup>. Auch die Integrität von Endothelzellen ist im Alter unter anderem durch oxidativen Stress gestört<sup>101</sup>. Diese und viele weitere Beispiele lassen deshalb bereits vermuten, dass auch Perizyten im Alter für pathologische Manifestationen anfällig sind. Dies ist besonders interessant, da Perizyten ein enormes therapeutisches Potential aufweisen<sup>102,103</sup>. Der grundlegende molekulare Mechanismus ist jedoch leider noch nicht bekannt. Mit dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Alterungsprozess Einfluss auf den Phänotypen und die Morphologie von Perizyten nimmt. Zudem ist die Anzahl von Perizyten im alten Mäuseherzen deutlich reduziert. Verschiedene Forschungsarbeiten haben sich bereits mit dem Verlust von Perizyten im Bereich der Kapillare auseinandergesetzt. Sei es während eines Krankheitsgeschehens, wie zum Beispiel bei der diabetischen Retinopathie, die ein erhöhtes Glukoselevel als Ursache aufweist<sup>104</sup>, im zentralen Nervensystem durch Alzheimer<sup>105</sup> oder HIV-assoziierte Funktionsstörungen<sup>106</sup>. Der Prozess der Alterung stand bisher noch nicht im Vordergrund und wird mit dieser Arbeit beleuchtet.

## 6.2 Die Perizyten-spezifische Genexpression ist im Alter reguliert

Eine große Anzahl von Genen zeigt im Alter ein verändertes Expressionsprofil auf, was anhand der RNA-Sequenzierungsdaten zu erkennen ist. Von den 461 differenziell exprimierten Genen, welche im Alter eine Regulation aufweisen, machen *Notch3* und *Pdgfrb* besonders auf sich aufmerksam.

Im Hinblick auf die in der Genontologie gefundenen Gene, die mit Adhäsion assoziiert sind und damit in Zusammenhang mit der reduzierten Perizytenbedeckung gesetzt werden könnten, wurde das Gen *Notch3* aufgrund seiner Funktion näher betrachtet. Notch3 ist dafür bekannt im Bereich der Zell-Zell-Regulation und der Vaskulogenese eine wichtige Rolle einzunehmen<sup>107</sup>. Es liegen bereits Studien vor, die sich mit dem Notch-Signalweg in Endothelzellen beschäftigt haben. Hier gilt Notch als ein Regulator für Proliferation und Regeneration<sup>108</sup>. Wenn man den Fokus tiefer und zwar direkt auf die Interaktion zwischen Endothelzellen und perivaskulären Zellen, wie Perizyten und glatten Muskelzellen legt, wird ersichtlich, dass auch hier der Notch-Rezeptor im Bereich der direkten Kommunikation verschiedene Rollen einnimmt<sup>109</sup> und so Migration<sup>110</sup> oder Proteinsekretion<sup>111</sup> von perivaskulären Zellen reguliert.

Interessanterweise beeinflusst sowohl der Notch-Signalweg, als auch das von Endothelzellen sekretierte Molekül PDGF die Migration<sup>112</sup> und Differenzierung<sup>113</sup> perivaskulärer Zellen. PDGF ist der Ligand des im Folgenden beschriebenen PDGFR $\beta$ <sup>78</sup>.

PDGFR $\beta$  gilt als einer der bedeutendsten Markerproteine für Perizyten, vor allem im Bereich von Kapillargefäßen<sup>114</sup>. Wie unter 4.2.2.A beschrieben, exprimieren die meisten der als Perizyten-identifizierten Zellkerne *Pdgfrb*. An diesem Punkt stellte sich die Frage, ob *Pdgfrb* wirklich runterreguliert ist oder aufgrund einer gesunkenen Perizytenanzahl in einem reduzierteren Maße gemessen wurde. Um diese Frage zu beantworten, wurde *in-vivo* auf einen zweiten Perizytenmarker (NG2), zurückgegriffen. Die NG2-positiven Zellen zeigten ebenfalls eine reduzierte PDGFR $\beta$ -Expression (Abbildung 5.3.2). Dies gibt Aufschluss darüber, dass die verminderte Expression nicht nur auf eine reduzierte Perizytenanzahl zurückzuführen ist, sondern auch eine zell-intrinsische Regulation der Genexpression beobachtet werden kann. Basierend auf dieser Beobachtung muss sich mit der Frage beschäftigt werden, ob ein im Alter runterregulierter Marker als zellspezifischer Marker genutzt werden sollte. Im alternden Herzen könnte dies beispielsweise bei einer Perizytenquantifizierung zu falsch-negativen Ergebnissen führen. Neben seiner Relevanz als Perizytenmarker, spielt dieses Gen ebenfalls eine zentrale Rolle für die Endothelzell-Perizyten-Barriere. Er ist somit für den Durchfluss nutritiver Substanzen, beziehungsweise für die Aufrechterhaltung des Herzmetabolismus verantwortlich<sup>62</sup>. Es ist bereits beschrieben, dass Veränderungen an PDGFR $\beta$  Hämorrhagien als Folge haben können<sup>38</sup>, was mit Abbildung 5.4.5 nun auch im Herzen bewiesen werden konnte. Durch die reduzierte Matrix-/ Endothelzelladhäsion lösen sich vermutlich Perizyten aus der Gefäßwand und lassen das Gefäß „brechen“, wodurch es zur Bildung von Mikrohämorrhagien kommen kann. Es stellt sich die Frage, ob dies die Herzfunktion beeinträchtigt. Sind Perizyten für die Unterstützung des gesamten Herzmetabolismus im Alter mitverantwortlich? Ist der im Alter vorliegende Perizytenverlust eventuell auch eine Mitursache für dilatierte Kapillaren und hypertrophierte Kardiomyozyten aufgrund fehlender nutritiver Versorgung? Die im alten Herzen auftretenden Mikrohämorrhagien und der Verlust von Blutbestandteilen machen diese Tatsache wahrscheinlich.

## 6.3 Auswirkungen der Runterregulation von Notch3 und PDGFR $\beta$ im Alter

### 6.3.1 Einfluss auf die Adhäsion

Neben der Genontologieanalyse und der Tatsache, dass die Anzahl an Perizyten im alternden Herzen abnimmt, konnte die Vermutung einer reduzierten Perizytenadhäsion in drei Experimenten untermauert werden. Es fiel bereits mikroskopisch auf, dass Perizyten in der Zellkulturschale nach Ausschaltung des *PDGFRB*- und *NOTCH3*-Gens weniger dicht besiedelt waren. Eine Zählung der Zellen im Zellmedium brachte die Gewissheit, dass die Ursache nicht allein in einer reduzierten Zellteilung, sondern einer erhöhten Zellablösung lag, da im Vergleich zur Kontrolle die gemessene Perizytenanzahl stark erhöht war. Mit Hilfe des Zell-Matrix Adhäsionsversuches konnte die Anhaftung von Perizyten auf Gelatine nochmals genauer quantifiziert werden und brachte ein ähnliches Ergebnis. Da sowohl Notch3 als auch PDGFR $\beta$  einen erheblichen Einfluss auf die Endothelzell-Perizyten-Interaktion haben<sup>108,62</sup>, sollte mittels des Matrigel Versuchs die Perizyt-Endothel-Adhäsion analysiert werden. Hierbei ist erstaunlich, dass sich neben einer reduzierten Perizytenanzahl auch die Gestalt der Perizyten veränderte. Neben kugeligen Perizyten, welche den als Modellendothelzellen dienenden HUVECs nur noch oberflächlich auflagen oder auch zum Teil frei in der Matrix vorzufinden waren, bildeten einige wenige Perizyten in beiden Genausschaltungen Filopoden-ähnliche Ausläufer. In letzterem Fall stellt sich die Frage, ob die Perizyten ohne das jeweilige Gen nicht mehr in der Lage sind, Kontakt mit den Endothelzellen aufzunehmen, da das von der Endothelzelle ausgehende Signal in Form des Liganden Jagged1 oder PDGFB nicht mehr aufgrund fehlender Rezeptoren bei dem Perizyt ankommt, aber dennoch gewillt ist, Kontakt zu haben.

Die im gealterten Herzen reduzierte Perizyten-dichte, die Bildung von Mikrohämorrhagien und eine reduzierte Adhäsion lassen die Frage nach einer veränderten Gefäßpermeabilität aufkommen. Um dies *in-vitro* zu überprüfen, wurde ein Permeabilitätsversuch (Abbildung 5.4.6) durchgeführt, der jedoch keine veränderte Permeabilität nach *NOTCH3*- oder *PDGFRB*-Hemmung lieferte. Der Grund hierfür kann vielschichtig sein. Einerseits ist der Versuchsaufbau sehr artifiziell. Zwischen HUVECs und Perizyten befindet sich im Versuchsaufbau eine Membran, die *in-vivo* nicht vorkommt. Diese Membran vermindert die Größe der Kontaktfläche zwischen HUVECs und Perizyten. Zudem war in dem beschriebenen Experiment, anders als im

Blutgefäß, kein Blutfluss. Die Strömung des Blutes, die Endothelzellen über Klf2 dazu veranlasst dichte Zellkontakte zu knüpfen, fehlte schlichtweg<sup>7</sup>. Andere Gründe, fernab der experimentellen Annäherung lassen sich allerdings auch in der aktuellen Literatur finden. Wie in der Publikation von Thorin et al.<sup>115</sup> beschrieben, beginnt bereits mit dem ersten Herzschlag die Alterung des Gefäßendothels. Jeder Herzschlag übt mechanischen Druck auf die Gefäße aus und schädigt somit das Endothel. Eine irreparable Schädigung der Endothelzellen während des Alterns führt zu einer gesteigerten Seneszenz. Somit stellt sich die Frage, ob Herzperizyten, ähnlich wie im Gehirn, eine Blut-Herz-Schranke bilden und den Folgen des mechanischen Druckes entgegenwirken. Ihre Rolle würde somit auch in bedeutendem Maße dem Schutz der Kapillaren vor mechanischem Stress und einem weniger stark beeinflussten Stoffaustausch dienen, was den Grund dafür liefern würde, warum kein Effekt auf die Permeabilität zu sehen ist.

### 6.3.2 Einfluss auf die Migration

Perizyten sind dafür bekannt eine wichtige Rolle in der Gefäßstabilisierung einzunehmen. Letztlich ist die Gefäßentwicklung und somit auch die Gefäßfunktion mitunter von der Perizytenpräsenz abhängig<sup>116</sup>. Da sowohl Notch3 als auch PDGFR $\beta$  Angiogenese induzieren<sup>117</sup> und zelluläre Migration und Proliferation vorantreiben<sup>118</sup>, lag der Verdacht nahe, dass eine Genausschaltung auch Einfluss auf das Migrationsverhalten von Perizyten nimmt. Während des Angiogeneseprozesses binden die Liganden PDGF-BB und PDGF-AB an PDGFR $\beta$ , was folglich zur Aktivierung und zu einer verstärkten Migration und Proliferation führt<sup>92</sup>. Ist dieser Prozess aufgrund einer reduzierten Rezeptordichte gestört, kann es zu einem Perizytenverlust kommen, der nicht behoben werden kann. Mikroaneurysmen können die Folge sein<sup>38</sup>. Es ist bereits beschrieben, dass Notch3 proangiogenetische Fähigkeiten besitzt, was in Experimenten in Zusammenhang mit einer Endothelzellen-Ko-Kultur bewiesen wurde<sup>119</sup>. Um dies genauer analysieren zu können, wurde ein Migrationsversuch (Abbildung 5.4.7) durchgeführt. Sowohl nach Genausschaltung von *NOTCH3* als auch von *PDGFRB* war die Migration von Perizyten im Vergleich zur Kontrolle signifikant reduziert. Hier lässt sich eine Verbindung zu dem Matrigel-Adhäsionsversuch ziehen. Sowohl eine reduzierte Adhäsion als auch Migration erschweren es den Perizyten aufgrund fehlender Rezeptoren mit Endothelzellen zu interagieren und den Kontakt aufrechtzuerhalten.

### 6.3.3 Einfluss auf die Differenzierung

Wie bereits beschrieben, entwickeln sich Perizyten während der Embryogenese aus mesenchymalen Stammzellen. Die Variabilität der Stammzellen, die als Ursprung dienen können, ist jedoch sehr groß<sup>120</sup>. Im Hinblick auf die Tatsache, dass Perizyten kein stabiles Expressionsmuster aufweisen<sup>22</sup> und dass das Herz im Alter einer gesteigerten Fibrose ausgesetzt ist<sup>9</sup>, liegt die Möglichkeit nahe, dass Perizyten im alternden Herzen vermehrt fibroblastische Marker exprimieren beziehungsweise zu Fibroblasten differenzieren. Es liegen bereits Arbeiten vor, welche besagen, dass Perizyten als mesenchymale Vorläuferzelle agieren und zu einer lokalen Fibrosebildung beitragen können<sup>121</sup>. Unter Berücksichtigung bereits vorliegender Publikationen kann angenommen werden, dass eine Runterregulation von *Notch3* eine im Alter gesteigerte Fibrose unterstützt. *Notch3* gilt als Gen, welches vor Fibrose schützen soll<sup>73</sup>. Es ist bereits bekannt, dass der Notch1-Rezeptor Einfluss auf eine gesteigerte Differenzierung bei perivaskulären Zellen ausübt<sup>111</sup>. Dies wirft die Frage auf, ob durch eine inhibierte Notch3-Expression ebenfalls das Fibrose-Risiko steigt. Durch die Messung der Expression fibroblasten-typischer Marker, wie zum Beispiel *Pdgfra*, *Col1a1*, *Vimentin* oder *Calponin*, könnte diese Vermutung untermauert werden. Zudem besteht die Möglichkeit mittels immunhistologischer Färbungen an jungen und alten murinen Herzschnitten, angelehnt an die Experimente in Abschnitt 5.3, weitere Erkenntnisse *in-vivo* zu erhalten.

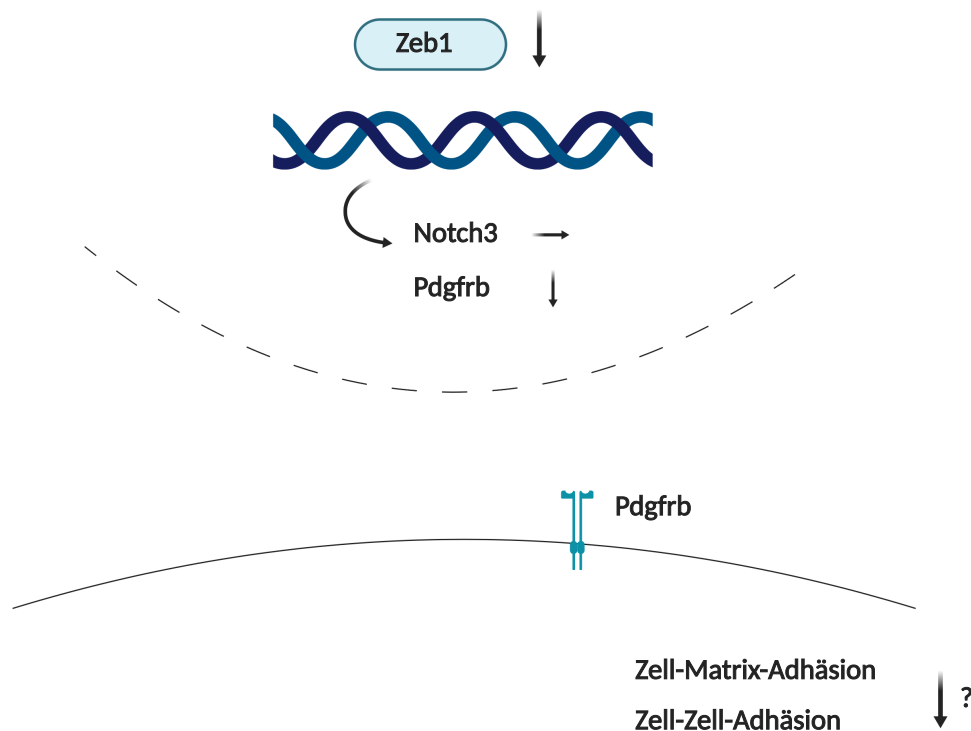
### 6.4 Die Genregulation von *Notch3* und *Pdgfrb* wird durch den Transkriptionsfaktor Zeb1 beeinflusst

Wie in der Publikation von Liu et al. bereits beschrieben, nimmt Zeb1 in der Lunge einen reprimierenden Einfluss auf *Notch3*<sup>97</sup> (Abbildung 5.5.2). Auch *Pdgfra* und *Pdgfrb* zeigen bei Anwesenheit von Zeb1 eine geringere Expression im Bereich der Tumordiagnostik auf<sup>96</sup>. Die Ausschaltung von *Zeb1* führte zu einer weitgehend unbeeinflussten *Notch3*-Expression. Die Expression von *Pdgfrb* reduzierte sich interessanterweise nach der Zeb1-Genausschaltung. Es ist bekannt, dass Zeb1 als Aktivator und Repressor wirken kann<sup>93</sup>. Bezogen auf die Organspezifität ist es somit durchaus möglich, dass Zeb1 in diesem Fall gegenüber *Pdgfrb* eine aktivierende Wirkung ausübt. Es wäre in diesem Zusammenhang von Bedeutung das gleiche Experiment mit kardialen Perizyten durchzuführen, um zu prüfen, ob Zeb1 im Herzen



auf die beiden Gene aktivierend oder inhibierend wirkt. Zeb1 spielt neben der Epithelialen-Mesenchymalen-Umwandlung auch eine Rolle in der Bildung von Tumoren<sup>122</sup>. Im Bereich des Epithels ist Zeb1 in der Lage, onkogene Veränderungen zu unterdrücken, indem eine miRNA (*microRNA*) inhibiert wird. Diese miRNA-Familie kann jedoch über einen negativen *Feedback*-Mechanismus Zeb1 unterdrücken und somit die epitheliale Differenzierung regulieren<sup>123</sup>. Da die *Pdgfrb*-Repression in Gehirnperizyten wie oben beschrieben durch Zeb1 reguliert scheint, kommt hier die Frage auf, ob auch eine Gegenregulierung mitwirkt.

In einer weiteren Versuchsreihe könnte getestet werden, ob die Ausschaltung von Zeb1 auch Einfluss auf die Perizyten-Matrix-Adhäsion nimmt. Wenn diese im Alter durch eine verminderte Aktivierung seitens *Pdgfrb* das Adhäsionsverhalten weiter reduziert, könnte durch Einflussnahme auf den Masterregulator Zeb1 vielleicht eine Lösung geschaffen werden (Abbildung 6.4.1).



**Abbildung 6.4: Transkriptionsfaktor Zeb1 reguliert die Expression von *Pdgfrb* im Alter.** Zeb1 wirkt aktivierend auf *Pdgfrb*, zeigt hingegen kaum einen Einfluss auf Notch3. Eine möglich reduzierte Perizyten-Adhäsion könnte durch eine reduzierte Expression die Folge sein. Erstellt mit BioRender.com.

## 6.5 Die Organspezifität von Perizyten

Wie bereits in der Arbeit von Holm et al.<sup>33</sup> beschrieben, besitzen Perizyten als eine sehr heterogene Zellgruppe eine große Organspezifität. Demnach können bestimmte Muster auf Seiten der Morphologie oder Funktion nicht als allgemeingültig angesehen werden. Die in dieser Arbeit angewandten *in-vitro* Experimente wurden mit humanen Gehirnperizyten durchgeführt. Diese haben in den letzten Jahrzehnten der Perizytenforschung vielfach Anwendung gefunden und werden deshalb aufgrund bereits vieler bestehender Erfahrungswerte als Modellperizyten verwendet. Unabhängig davon, dass aufgrund der Organspezifität eine Versuchsreihe mit Herzperizyten notwendig ist, muss der *in-vivo* Versuch an sich genauer betrachtet werden. Wie beispielsweise am Permeabilitätsversuch zu erkennen, bringt der *in-vitro* Versuch auch Grenzen mit sich und muss unbedingt, basierend auf Erfahrungswerten und der Literatur, hinterfragt werden. Nichtsdestotrotz kann mit den hier durchgeführten *in-vitro* Experimenten somit ein erster Eindruck beziehungsweise eine Tendenz bezüglich Morphologie und Funktion geschaffen werden.

## 6.6 Ausblick

Die in dieser Arbeit vorgestellten Daten wurden in Gehirnperizyten erhoben, welche als etablierter Modellstandard gelten<sup>61</sup>. Basierend auf der Tatsache, dass Perizyten, wie bereits diskutiert, eine sehr hohe Organspezifität aufweisen, müssen diese Daten in Herzperizyten validiert werden, um weitere Einblicke in die Morphologie und Funktion von kardialen Perizyten erhalten zu können. Wie in dem Methodenabschnitt beschrieben (Abschnitt 4.2), wurde als Grundlage weiterer Forschungsarbeiten im Bereich der kardialen Perizyten ein Isolationsprotokoll in dieser Arbeit etabliert. Dieses Protokoll muss weiter optimiert werden, da hier noch molekularbiologische Methoden ausstehen. Mit der Züchtung einer *NG2-CreERT2;Rosatomato*-Mauslinie kann ein Tracer generiert werden. Die Besonderheit dieser Mauslinie liegt in der roten Fluoreszenz aller NG2-positiven Zellen. Da NG2 als einer der bedeutendsten Perizytenmarker gilt<sup>35</sup>, können Perizyten als solche identifiziert und mittels bestimmter Verfahren, beispielsweise einer Durchflusszytometrie, auch isoliert werden.

Um sich der Perizytenisolation im Hinblick auf weitere Untersuchungen der Pdgfrb-beziehungsweise Notch3-Ausschaltung *in-vivo* zu Nutze machen zu können, könnte

eine *NG2-CreERT2;Pdgfrb-fl/fl*-Mauslinie oder eine *NG2-CreERT2;Notch3-fl/fl*-Mauslinie generiert werden. Hypothetisch würde mit dieser Zuchtstrategie durch die jeweilige Genausschaltung ein vorzeitig alternder Phänotyp geschaffen werden. Dies ermöglicht eine Validierung der bereits *in-vivo* und *in-vitro* erhobenen Daten in Bezug auf Notch3 und Pdgfrb. Mittels immunhistologischer Färbungen an Herzschnitten könnte überprüft werden, ob, wie in Abbildung 5.5.1 und 5.1.2 dargestellt, die Genausschaltung das Auftreten hypertrophierter Kardiomyozyten, dilatierter Kapillaren und einen Verlust von Perizyten hervorruft. Dies würde bedeuten, dass der Phänotyp dieser Mäuse dieselben pathologischen Veränderungen aufweist, wie sie bereits in dieser Arbeit in alten Mauserzen analysiert wurden, und somit eine beschleunigte Alterung induziert.



## 7. Fazit

Der Alterungsprozess im Herzen gilt als Risikofaktor und bringt, neben vielen kardiovaskulären Erkrankungen, pathologische Veränderungen mit sich. Perizyten sind im alternden Herzen, wie in dieser Arbeit ersichtlich, deutlich verändert.

Im Alter erfährt das Herz im Bereich der Kapillaren einen Perizytenverlust. Dies ist assoziiert mit dem Auftreten von Mikrohämmorrhagien in einzelnen Mäusen. Durch die im Alter runterregulierten Gene *Notch3* und *Pdgfrb* sinkt die Fähigkeit der Adhäsion und Migration von Perizyten. Die zelluläre Permeabilität von Perizyten bleibt jedoch unbeeinflusst. Dies führt zu der Hypothese, ob das Herz eine Blut-Herz-Barriere besitzt und Perizyten somit für die Herzfunktion eine entscheidende Rolle spielen können.

In dieser Arbeit wurde ein zellulärer Regulationsmechanismus identifiziert, welcher eine aktivierende Wirkung auf *Pdgfrb* im Herzen bewirkt. Es handelt sich dabei um den Transkriptionsfaktor Zeb1. Dieser könnte ein Masterregulator für die Perizytenfunktion und möglicherweise -identität im Herzen sein.

Zusammenfassend gibt diese Arbeit Einblicke in die Perizytenbiologie und -funktion im alternden Herzen und identifiziert neue regulatorische Prinzipien.



## 8. Zusammenfassung

### Charakterisierung von Perizyten im alternden Herzen

Herz-Kreislauf-Erkrankungen gelten in der westlichen Welt als eine der Haupttodesursachen. Neben Erkrankungen wie dem Herzinfarkt, Herzinsuffizienz, Bluthochdruck oder auch Arteriosklerose bringt der Alterungsprozess auch weitere pathologische Veränderungen mit sich. Da die heutige Gesellschaft dem Trend zu Folge ein immer höheres Alter erreicht, ist auch ein vermehrtes Auftreten kardiovaskulärer Erkrankungen zu verzeichnen. Das Herz ist als Kreislumpumpe für die Versorgung des gesamten Organismus, einschließlich sich selbst, mit Sauerstoff und nutritiven Substanzen mitverantwortlich. Der Fokus beruhte in den letzten Jahrzehnten vor allem auf der Erforschung alternder Kardiomyozyten und Endothelzellen. Alternde, kardiale Perizyten hingegen, standen bisher nicht im Vordergrund.

Perizyten sind perivaskuläre Zellen, welche zusammen mit Endothelzellen die Basalmembran von Kapillaren bilden. Perizyten weisen eine hohe Spezifität in ihrer Morphologie und Funktion hinsichtlich ihrer Lokalisation am Gefäß und im Organ auf. Dies spiegelt sich auch in ihrer Genexpression wider. Hauptfunktionen von Perizyten sind neben der Aufrechterhaltung der Gefäßstabilität die Regulation des Blutflusses, die Gefäßregeneration und -reparatur und Phagozytose. Außerdem stellen sie einen wichtigen Bestandteil der Blut-Hirn- und Blut-Retina-Schranke dar.

Der erste Teil dieser Arbeit widmet sich der Charakterisierung von alternden Perizyten. Festgestellt wurde ein Verlust von Perizyten in alternden Kapillaren als auch die Bildung von Mikrohämmorrhagien. Um die molekularen Mechanismen hinter der sich veränderten Perizytenbiologie analysieren zu können, wurde mittels einer RNA-Sequenzierung das Transkriptom alternder Perizyten analysiert und 461 Gene gefunden, welche im Alter eine Regulation aufweisen. Besonders interessant erschienen hierbei *Notch3* und *Pdgfrb*, welche beide als klassische Perizytenmarker gelten und im Alter runterreguliert sind. Sie spielen beide eine besondere Rolle in der Perizyten-Endothelzell-Interaktion und nehmen unter anderem Einfluss auf die Migration und Differenzierung von Zellen. In dieser Arbeit wurden weiterführende *in-vitro* Versuche mittels Gehirnpelizyten nach Genausschaltung von *Notch3* und *Pdgfrb* durchgeführt. Die Perizyten-Matrix- und Perizyten-Endothelzell-Adhäsion als auch

Perizytenmigration ist nach ausgeschalteter Genexpression reduziert. Die Permeabilität hingegen blieb unbeeinflusst.

Zeb1, ein Transkriptionsfaktor welcher während des Alterungsprozesses im Herzen reguliert wird, kontrolliert nachweislich die Expression von *Pdgfrb in-vitro*. Diese Feststellung legt nahe, dass Zeb1 möglicherweise als Hauptregulator der Perizytenfunktion und -identität im alternden Herzen fungieren könnte.

Das Verständnis molekularer Schaltkreise, welche die Alterung von Perizyten steuern, wird neue Forschungswege in der Herz-Kreislauf-Forschung eröffnen, um die durch Alter-induzierte Veränderungen im Herzen besser zu verstehen und damit möglicherweise auch neue therapeutische Ansätze aufzuzeigen.



## 9. Summary

### Charakterization of pericytes in the aging heart

Cardiovascular diseases are one of the main causes of death in the western world. In addition to diseases such as heart attack, heart failure, high blood pressure or arteriosclerosis, the aging process induces further pathological changes in the heart and it is a major risk associated with cardiovascular disease. The continuous ageing of our society results in an increasing cardiovascular burden. As a circulatory pump, the heart is jointly responsible for supplying the entire organism, including itself, with nutrients and oxygen. In recent decades, the research effort on cardiac aging has been mainly directed into the research of aging cardiomyocytes and endothelial cells, while cardiac pericytes remain understudied in the aging heart.

Pericytes are perivascular cells, which together with endothelial cells form the basal membrane of capillaries. Pericytes are highly specialized in their morphology and function depending on which type of vessel and in which organ they are located in. This is reflected in their gene expression. The main functions of pericytes are the maintenance of vascular stability, the regulation of blood flow, vascular regeneration and repair and phagocytosis. They also represent an important component of the blood-brain and blood-retina barrier.

The first part of this work is devoted to characterization of the aged pericyte. Capillaries in the aged heart present a reduction of the pericyte coverage, accompanied by microhemorrhages within the wall of the ventricle. In order to analyze the molecular mechanisms behind the altered pericyte biology, we analyzed the transcriptome of the aged heart and found 461 dysregulated genes in pericytes. Of particular interest are *Notch3* and *Pdgfrb*, both classical pericyte markers that are down regulated in the aged heart. They both play a special role in pericyte-endothelial cell interaction and influence, among other processes, migration and differentiation of cells. In this work we have used a line of human brain pericytes to test cellular adhesion, migration and permeability upon knockdown of *Notch3* and *Pdgfrb*. Cellular adhesion and migration were reduced upon gene expression knockdown, however, cellular permeability remained unaffected.

The results of this work confirm a reduction of pericyte adhesion upon the loss of *Notch3* and *Pdgfrb* which affects the interaction of the mural cells with the endothelial cells. These findings mimic the phenotype observed in the aged heart where the loss

of pericytes probably leads to an increase vascular fragility, ruptures and the formation of microhemorrhages.

Zeb1, a transcription factor regulated in the aged heart, was shown to control the expression of *Pdgfrb* *in-vitro*. This finding suggest that Zeb1 may act as a master regulator of the pericyte function and potentially identity in the aged heart.

Understanding the molecular circuits that control pericyte ageing will open new research avenues in cardiovascular research to study and hopefully to better understand the age-induced changes in the heart and thus, potentially provide new therapeutic approaches.

## 10. Quellenverzeichnis

1. Schünke M., Schulte, E. & S. *PROMETHEUS Innere Organe*. (2018).
2. Pinto, A. R. *et al.* Revisiting Cardiac Cellular Composition. *Circ. Res.* **118**, 400–409 (2016).
3. Brutsaert, D. L. Cardiac Endothelial-Myocardial Signaling: Its Role in Cardiac Growth, Contractile Performance, and Rhythmicity. *Physiol. Rev.* **83**, 59–115 (2003).
4. Hsieh, P. C. H., Davis, M. E., Lisowski, L. K. & Lee, R. T. ENDOTHELIAL-CARDIOMYOCYTE INTERACTIONS IN CARDIAC DEVELOPMENT AND REPAIR. *Annu. Rev. Physiol.* **68**, 51–66 (2006).
5. Manasek, F. J. Embryonic development of the heart. II. Formation of the epicardium. *J. Embryol. Exp. Morphol.* **22**, 333–48 (1969).
6. Fred Sinowatz, H. H. *Histologie Kurzlehrbuch der Zytologie und mikroskopischen Anatomie*. (Fred Sinowatz, 2012).
7. Potente, M. & Mäkinen, T. Vascular heterogeneity and specialization in development and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **18**, 477–494 (2017).
8. Mandarino, L. J., Sundarraj, N., Finlayson, J. & Hassell, H. R. Regulation of fibronectin and laminin synthesis by retinal capillary endothelial cells and pericytes in vitro. *Exp. Eye Res.* **57**, 609–21 (1993).
9. Lakatta, E. G. So! What's aging? Is cardiovascular aging a disease? *J. Mol. Cell. Cardiol.* **83**, 1–13 (2015).
10. North, B. J. & Sinclair, D. A. The Intersection Between Aging and Cardiovascular Disease. *Circ. Res.* **110**, 1097–1108 (2012).
11. Arnett, D. K. *et al.* 2019 ACC/AHA Guideline on the Primary Prevention of Cardiovascular Disease. *J. Am. Coll. Cardiol.* **74**, e177–e232 (2019).
12. López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M. & Kroemer, G. The hallmarks of aging. *Cell* **153**, 1194–217 (2013).
13. Lakatta, E. G. & Levy, D. Arterial and Cardiac Aging: Major Shareholders in Cardiovascular Disease Enterprises. *Circulation* **107**, 139–146 (2003).
14. Obas, V. & Vasan, R. S. The aging heart. *Clin. Sci. (Lond)*. **132**, 1367–1382 (2018).
15. McManus, D. D. *et al.* Longitudinal Tracking of Left Atrial Diameter Over the Adult Life Course: Clinical Correlates in the Community. *Circulation* **121**, 667–

- 674 (2010).
16. Eisenberg, T. *et al.* Cardioprotection and lifespan extension by the natural polyamine spermidine. *Nat. Med.* **22**, 1428–1438 (2016).
  17. Nakayama, H., Nishida, K. & Otsu, K. Macromolecular Degradation Systems and Cardiovascular Aging. *Circ. Res.* **118**, 1577–1592 (2016).
  18. Kuilman, T., Michaloglou, C., Mooi, W. J. & Peeper, D. S. The essence of senescence. *Genes Dev.* **24**, 2463–2479 (2010).
  19. Upadhyya, B., Taffet, G. E., Cheng, C. P. & Kitzman, D. W. Heart failure with preserved ejection fraction in the elderly: scope of the problem. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **83**, 73–87 (2015).
  20. Rizzoni, D. *et al.* Vascular Aging and Disease of the Small Vessels. *High Blood Press. Cardiovasc. Prev.* **26**, 183–189 (2019).
  21. Jakovljevic, D. G. Physical activity and cardiovascular aging: Physiological and molecular insights. *Exp. Gerontol.* **109**, 67–74 (2018).
  22. Armulik, A., Genové, G. & Betsholtz, C. Pericytes: Developmental, Physiological, and Pathological Perspectives, Problems, and Promises. *Dev. Cell* **21**, 193–215 (2011).
  23. Rucker, H. K., Wynder, H. J. & Thomas, W. E. Cellular mechanisms of CNS pericytes. *Brain Res. Bull.* **51**, 363–9 (2000).
  24. Daneman, R., Zhou, L., Kebede, A. A. & Barres, B. A. Pericytes are required for blood–brain barrier integrity during embryogenesis. *Nature* **468**, 562–566 (2010).
  25. Frank, R. N., Dutta, S. & Mancini, M. A. Pericyte coverage is greater in the retinal than in the cerebral capillaries of the rat. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **28**, 1086–91 (1987).
  26. Sims, D. E. The pericyte—a review. *Tissue Cell* **18**, 153–74 (1986).
  27. Shepro, D. & Morel, N. M. Pericyte physiology. *FASEB J.* **7**, 1031–1038 (1993).
  28. Sims, D. E. Recent advances in pericyte biology—implications for health and disease. *Can. J. Cardiol.* **7**, 431–43 (1991).
  29. Mazanet, R. & Franzini-Armstrong, C. Scanning electron microscopy of pericytes in rat red muscle. *Microvasc. Res.* **23**, 361–9 (1982).
  30. Bergers, G. & Song, S. The role of pericytes in blood-vessel formation and maintenance. *Neuro. Oncol.* **7**, 452–464 (2005).
  31. Zimmermann, K. W. *Der feine Bau der Blutkapillaren.* (Anat

- Entwicklungsgesch, 1923).
32. Sims, D. E. Diversity within pericytes. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **27**, 842–6 (2000).
  33. Holm, A., Heumann, T. & Augustin, H. G. Microvascular Mural Cell Organotypic Heterogeneity and Functional Plasticity. *Trends Cell Biol.* **28**, 302–316 (2018).
  34. Trost, A. *et al.* Brain and Retinal Pericytes: Origin, Function and Role. *Front. Cell. Neurosci.* **10**, (2016).
  35. Ozerdem, U., Grako, K. A., Dahlin-Huppe, K., Monosov, E. & Stallcup, W. B. NG2 proteoglycan is expressed exclusively by mural cells during vascular morphogenesis. *Dev. Dyn.* **222**, 218–227 (2001).
  36. Stallcup, W. B. The NG2 proteoglycan: past insights and future prospects. *J. Neurocytol.* **31**, 423–35
  37. Fukushi, J., Makagiansar, I. T. & Stallcup, W. B. NG2 Proteoglycan Promotes Endothelial Cell Motility and Angiogenesis via Engagement of Galectin-3 and  $\alpha 3\beta 1$  Integrin. *Mol. Biol. Cell* **15**, 3580–3590 (2004).
  38. Lindahl, P. Pericyte Loss and Microaneurysm Formation in PDGF-B-Deficient Mice. *Science (80-. ).* **277**, 242–245 (1997).
  39. Winkler, E. A., Bell, R. D. & Zlokovic, B. V. Pericyte-specific expression of PDGF beta receptor in mouse models with normal and deficient PDGF beta receptor signaling. *Mol. Neurodegener.* **5**, 32 (2010).
  40. Nehls, V., Denzer, K. & Drenckhahn, D. Pericyte involvement in capillary sprouting during angiogenesis in situ. *Cell Tissue Res.* **270**, 469–474 (1992).
  41. Bandopadhyay, R. *et al.* Contractile proteins in pericytes at the blood-brain and blood-retinal barriers. *J. Neurocytol.* **30**, 35–44 (2001).
  42. Nehls, V. & Drenckhahn, D. Heterogeneity of microvascular pericytes for smooth muscle type alpha-actin. *J. Cell Biol.* **113**, 147–54 (1991).
  43. R., L.-R. *Taschenlehrbuch Histologie.* (Georg Thieme Verlag KG, 2006).
  44. Shih, I.-M. The role of CD146 (Mel-CAM) in biology and pathology. *J. Pathol.* **189**, 4–11 (1999).
  45. Crisan, M. *et al.* A Perivascular Origin for Mesenchymal Stem Cells in Multiple Human Organs. *Cell Stem Cell* **3**, 301–313 (2008).
  46. Chen, J. *et al.* CD146 coordinates brain endothelial cell–pericyte communication for blood–brain barrier development. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **114**, E7622–E7631 (2017).

47. Yamazaki, T. & Mukoyama, Y. Tissue Specific Origin, Development, and Pathological Perspectives of Pericytes. *Front. Cardiovasc. Med.* **5**, (2018).
48. DeNofrio, D. Functional sorting of actin isoforms in microvascular pericytes. *J. Cell Biol.* **109**, 191–202 (1989).
49. Joyce, N. C. Contractile proteins in pericytes. I. Immunoperoxidase localization of tropomyosin. *J. Cell Biol.* **100**, 1379–1386 (1985).
50. Chan, L. S., Li, W. Y., Khatami, M. & Rockey, J. H. Actin in cultured bovine retinal capillary pericytes: morphological and functional correlation. *Exp. Eye Res.* **43**, 41–54 (1986).
51. Ferrari-Dileo, G., Davis, E. B. & Anderson, D. R. Effects of cholinergic and adrenergic agonists on adenylate cyclase activity of retinal microvascular pericytes in culture. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **33**, 42–7 (1992).
52. Kelley, C., D'Amore, P., Hechtman, H. B. & Shepro, D. Vasoactive hormones and cAMP affect pericyte contraction and stress fibres in vitro. *J. Muscle Res. Cell Motil.* **9**, 184–94 (1988).
53. Santos, G. S. P., Magno, L. A. V., Romano-Silva, M. A., Mintz, A. & Birbrair, A. Pericyte Plasticity in the Brain. *Neurosci. Bull.* **35**, 551–560 (2019).
54. Carmeliet, P. Manipulating angiogenesis in medicine. *J. Intern. Med.* **255**, 538–61 (2004).
55. Creazzo, T. L., Godt, R. E., Leatherbury, L., Conway, S. J. & Kirby, M. L. ROLE OF CARDIAC NEURAL CREST CELLS IN CARDIOVASCULAR DEVELOPMENT. *Annu. Rev. Physiol.* **60**, 267–286 (1998).
56. Yamashita, J. *et al.* Flk1-positive cells derived from embryonic stem cells serve as vascular progenitors. *Nature* **408**, 92–6 (2000).
57. Gerhardt, H. *et al.* VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *J. Cell Biol.* **161**, 1163–77 (2003).
58. Ozerdem, U. & Stallcup, W. B. Early contribution of pericytes to angiogenic sprouting and tube formation. *Angiogenesis* **6**, 241–9 (2003).
59. Enge, M. *et al.* Endothelium-specific platelet-derived growth factor-B ablation mimics diabetic retinopathy. *EMBO J.* **21**, 4307–16 (2002).
60. Gerhardt, H. & Betsholtz, C. Endothelial-pericyte interactions in angiogenesis. *Cell Tissue Res.* **314**, 15–23 (2003).
61. Brown, L. S. *et al.* Pericytes and Neurovascular Function in the Healthy and Diseased Brain. *Front. Cell. Neurosci.* **13**, (2019).

62. Avolio, E. & Madeddu, P. Discovering cardiac pericyte biology: From physiopathological mechanisms to potential therapeutic applications in ischemic heart disease. *Vascul. Pharmacol.* **86**, 53–63 (2016).
63. Nees, S. *et al.* Isolation, bulk cultivation, and characterization of coronary microvascular pericytes: the second most frequent myocardial cell type in vitro. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* **302**, H69–H84 (2012).
64. Nees, S. *et al.* Wall structures of myocardial precapillary arterioles and postcapillary venules reexamined and reconstructed in vitro for studies on barrier functions. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* **302**, H51–H68 (2012).
65. Kokubo, H., Miyagawa-Tomita, S. & Johnson, R. L. Hesr, a Mediator of the Notch Signaling, Functions in Heart and Vessel Development. *Trends Cardiovasc. Med.* **15**, 190–194 (2005).
66. High, F. A. & Epstein, J. A. The multifaceted role of Notch in cardiac development and disease. *Nat. Rev. Genet.* **9**, 49–61 (2008).
67. de la Pompa, J. L. & Epstein, J. A. Coordinating Tissue Interactions: Notch Signaling in Cardiac Development and Disease. *Dev. Cell* **22**, 244–254 (2012).
68. Kopan, R. Notch: a membrane-bound transcription factor. *J. Cell Sci.* **115**, 1095–7 (2002).
69. Kopan, R. & Ilagan, M. X. G. The Canonical Notch Signaling Pathway: Unfolding the Activation Mechanism. *Cell* **137**, 216–233 (2009).
70. Jarriault, S. *et al.* Signalling downstream of activated mammalian Notch. *Nature* **377**, 355–358 (1995).
71. Iso, T., Kedes, L. & Hamamori, Y. HES and HERP families: Multiple effectors of the notch signaling pathway. *J. Cell. Physiol.* **194**, 237–255 (2003).
72. Tao, Y.-K. *et al.* Notch3 deficiency impairs coronary microvascular maturation and reduces cardiac recovery after myocardial ischemia. *Int. J. Cardiol.* **236**, 413–422 (2017).
73. Zhang, M. *et al.* Notch3 Ameliorates Cardiac Fibrosis After Myocardial Infarction by Inhibiting the TGF- $\beta$ 1/Smad3 Pathway. *Cardiovasc. Toxicol.* **16**, 316–324 (2016).
74. Lesnik Oberstein, S. A. J. *et al.* Myocardial Infarction in Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy (CADASIL). *Medicine (Baltimore)*. **82**, 251–256 (2003).
75. Joutel, A. *et al.* Cerebrovascular dysfunction and microcirculation rarefaction

- precede white matter lesions in a mouse genetic model of cerebral ischemic small vessel disease. *J. Clin. Invest.* **120**, 433–445 (2010).
76. Luxán, G., D'Amato, G., MacGrogan, D. & de la Pompa, J. L. Endocardial Notch Signaling in Cardiac Development and Disease. *Circ. Res.* **118**, (2016).
  77. Kazlauskas, A. PDGFs and their receptors. *Gene* **614**, 1–7 (2017).
  78. Fredriksson, L., Li, H. & Eriksson, U. The PDGF family: four gene products form five dimeric isoforms. *Cytokine Growth Factor Rev.* **15**, 197–204 (2004).
  79. Lewandowski, S. A., Fredriksson, L., Lawrence, D. A. & Eriksson, U. Pharmacological targeting of the PDGF-CC signaling pathway for blood–brain barrier restoration in neurological disorders. *Pharmacol. Ther.* **167**, 108–119 (2016).
  80. Kazlauskas, A. Receptor tyrosine kinases and their targets. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **4**, 5–14 (1994).
  81. Heldin, C.-H., Östman, A. & Rönstrand, L. Signal transduction via platelet-derived growth factor receptors. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer* **1378**, F79–F113 (1998).
  82. Soriano, P. Abnormal kidney development and hematological disorders in PDGF beta-receptor mutant mice. *Genes Dev.* **8**, 1888–1896 (1994).
  83. Soriano, P. The PDGF alpha receptor is required for neural crest cell development and for normal patterning of the somites. *Development* **124**, 2691–700 (1997).
  84. Östman, A. PDGF receptors-mediators of autocrine tumor growth and regulators of tumor vasculature and stroma. *Cytokine Growth Factor Rev.* **15**, 275–286 (2004).
  85. Frederick M. Ausubel, Roger Brent, Robert E. Kingston, David D. Moore, J.G. Seidman, John A. Smith, K. S. (eds. . *Current Protocols in Molecular Biology*. (2003).
  86. Vidal, R. *et al.* Transcriptional heterogeneity of fibroblasts is a hallmark of the aging heart. *JCI Insight* **4**, (2019).
  87. Chen, E. Y. *et al.* Enrichr: interactive and collaborative HTML5 gene list enrichment analysis tool. *BMC Bioinformatics* **14**, 128 (2013).
  88. Kuleshov, M. V. *et al.* Enrichr: a comprehensive gene set enrichment analysis web server 2016 update. *Nucleic Acids Res.* **44**, W90–W97 (2016).
  89. Stallcup, W. B. The NG2 proteoglycan: past insights and future prospects. *J.*



*Neurocytol.* **31**, 423–35

90. Miners, J. S., Schulz, I. & Love, S. Differing associations between A $\beta$  accumulation, hypoperfusion, blood–brain barrier dysfunction and loss of PDGFRB pericyte marker in the precuneus and parietal white matter in Alzheimer’s disease. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **38**, 103–115 (2018).
91. Mack, J. J. & Iruela-Arispe, M. L. NOTCH regulation of the endothelial cell phenotype. *Curr. Opin. Hematol.* **25**, 212–218 (2018).
92. Aguilera, K. Y. & Brekken, R. A. Recruitment and retention: factors that affect pericyte migration. *Cell. Mol. Life Sci.* **71**, 299–309 (2014).
93. Sánchez-Tilló, E. *et al.* EMT-activating transcription factors in cancer: beyond EMT and tumor invasiveness. *Cell. Mol. Life Sci.* **69**, 3429–3456 (2012).
94. Larsen, J. E. *et al.* ZEB1 drives epithelial-to-mesenchymal transition in lung cancer. *J. Clin. Invest.* **126**, 3219–35 (2016).
95. Dohadwala, M. *et al.* Cyclooxygenase-2–Dependent Regulation of E-Cadherin: Prostaglandin E 2 Induces Transcriptional Repressors ZEB1 and Snail in Non–Small Cell Lung Cancer. *Cancer Res.* **66**, 5338–5345 (2006).
96. Zhang, L. *et al.* SHP-2-upregulated ZEB1 is important for PDGFR $\alpha$ -driven glioma epithelial–mesenchymal transition and invasion in mice and humans. *Oncogene* **35**, 5641–5652 (2016).
97. Liu, L. *et al.* Notch3 is important for TGF- $\beta$ -induced epithelial–mesenchymal transition in non-small cell lung cancer bone metastasis by regulating ZEB-1. *Cancer Gene Ther.* **21**, 364–372 (2014).
98. Meng, F. *et al.* PDGFR and Play Critical Roles in Mediating Foxq1-Driven Breast Cancer Stemness and Chemoresistance. *Cancer Res.* **75**, 584–593 (2015).
99. Wagner, J. U. G. & Dimmeler, S. Cellular cross-talks in the diseased and aging heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **138**, 136–146 (2020).
100. Domenighetti, A. A. *et al.* Angiotensin II–Mediated Phenotypic Cardiomyocyte Remodeling Leads to Age-Dependent Cardiac Dysfunction and Failure. *Hypertension* **46**, 426–432 (2005).
101. Chang, F., Flavahan, S. & Flavahan, N. A. Superoxide inhibition restores endothelium-dependent dilatation in aging arteries by enhancing impaired adherens junctions. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* **314**, H805–H811 (2018).
102. Alvino, V. V. *et al.* Transplantation of Allogeneic Pericytes Improves Myocardial

- Vascularization and Reduces Interstitial Fibrosis in a Swine Model of Reperfused Acute Myocardial Infarction. *J. Am. Heart Assoc.* **7**, (2018).
103. Cathery, W., Faulkner, A., Maselli, D. & Madeddu, P. Concise Review: The Regenerative Journey of Pericytes Toward Clinical Translation. *Stem Cells* **36**, 1295–1310 (2018).
  104. Haribalaganesh, R., Sheikpranbabu, S., Elayappan, B., Venkataraman, D. & Gurunathan, S. Pigment epithelium–derived factor down regulates hyperglycemia-induced apoptosis via PI3K/Akt activation in goat retinal pericytes. *Angiogenesis* **12**, 381–389 (2009).
  105. Halliday, M. R. *et al.* Accelerated pericyte degeneration and blood–brain barrier breakdown in apolipoprotein E4 carriers with Alzheimer’s disease. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **36**, 216–227 (2016).
  106. Niu, F., Yao, H., Zhang, W., Sutliff, R. L. & Buch, S. Tat 101-Mediated Enhancement of Brain Pericyte Migration Involves Platelet-Derived Growth Factor Subunit B Homodimer: Implications for Human Immunodeficiency Virus-Associated Neurocognitive Disorders. *J. Neurosci.* **34**, 11812–11825 (2014).
  107. Aburjania, Z. *et al.* The Role of Notch3 in Cancer. *Oncologist* **23**, 900–911 (2018).
  108. Tian, D.-Y., Jin, X.-R., Zeng, X. & Wang, Y. Notch Signaling in Endothelial Cells: Is It the Therapeutic Target for Vascular Neointimal Hyperplasia? *Int. J. Mol. Sci.* **18**, 1615 (2017).
  109. Rostama, B., Peterson, S. M., Vary, C. P. H. & Liaw, L. Notch signal integration in the vasculature during remodeling. *Vascul. Pharmacol.* **63**, 97–104 (2014).
  110. Zhou, X. *et al.* Soluble Jagged-1 inhibits restenosis of vein graft by attenuating Notch signaling. *Microvasc. Res.* **100**, 9–16 (2015).
  111. Lin, C.-H. & Lilly, B. Notch signaling governs phenotypic modulation of smooth muscle cells. *Vascul. Pharmacol.* **63**, 88–96 (2014).
  112. Palumbo, R. *et al.* Different Effects of High and Low Shear Stress on Platelet-Derived Growth Factor Isoform Release by Endothelial Cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **22**, 405–411 (2002).
  113. Thomas, J. A. *et al.* PDGF-DD, a novel mediator of smooth muscle cell phenotypic modulation, is upregulated in endothelial cells exposed to atherosclerosis-prone flow patterns. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* **296**, H442–H452 (2009).

114. Smyth, L. C. D. *et al.* Markers for human brain pericytes and smooth muscle cells. *J. Chem. Neuroanat.* **92**, 48–60 (2018).
115. Thorin, E. & Thorin-Trescases, N. Vascular endothelial ageing, heartbeat after heartbeat. *Cardiovasc. Res.* **84**, 24–32 (2009).
116. McCarty, M. F. *et al.* Overexpression of PDGF-BB decreases colorectal and pancreatic cancer growth by increasing tumor pericyte content. *J. Clin. Invest.* **117**, 2114–2122 (2007).
117. Ribatti, D., Nico, B. & Crivellato, E. The role of pericytes in angiogenesis. *Int. J. Dev. Biol.* **55**, 261–268 (2011).
118. Hellström, M., Kalén, M., Lindahl, P., Abramsson, A. & Betsholtz, C. Role of PDGF-B and PDGFR-beta in recruitment of vascular smooth muscle cells and pericytes during embryonic blood vessel formation in the mouse. *Development* **126**, 3047–55 (1999).
119. Liu, H., Kennard, S. & Lilly, B. NOTCH3 Expression Is Induced in Mural Cells Through an Autoregulatory Loop That Requires Endothelial-Expressed JAGGED1. *Circ. Res.* **104**, 466–475 (2009).
120. Xu, J., Gong, T., Heng, B. C. & Zhang, C. F. A systematic review: differentiation of stem cells into functional pericytes. *FASEB J.* **31**, 1775–1786 (2017).
121. Dulauroy, S., Di Carlo, S. E., Langa, F., Eberl, G. & Peduto, L. Lineage tracing and genetic ablation of ADAM12+ perivascular cells identify a major source of profibrotic cells during acute tissue injury. *Nat. Med.* **18**, 1262–1270 (2012).
122. Zhang, Y., Xu, L., Li, A. & Han, X. The roles of ZEB1 in tumorigenic progression and epigenetic modifications. *Biomed. Pharmacother.* **110**, 400–408 (2019).
123. Brabletz, S. & Brabletz, T. The ZEB/miR-200 feedback loop—a motor of cellular plasticity in development and cancer? *EMBO Rep.* **11**, 670–677 (2010).



## 11. Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1.1:** Schematische Darstellung der Herzanatomie
- Abbildung 1.2:** Altersabhängige Veränderungen des Herzens auf zellulärer und anatomischer Ebene
- Abbildung 1.3:** Unterschiedliche Perizytentypen im jeweiligen Blutgefäßsystem
- Abbildung 1.4:** Schematische Darstellung des Notch-Signalwegs
- Abbildung 4.1:** Schematische Darstellung des Perizytenisoliationsprotokoll
- Abbildung 4.2:** Schematische Darstellung des Zell-Matrix-Adhäsion-Versuches
- Abbildung 4.3:** Schematische Darstellung des Matrigel-Versuches
- Abbildung 4.4:** Schematische Darstellung der Reaktion von MTT zu Formazan
- Abbildung 4.5:** Schematische Darstellung des Permeabilitätsversuches
- Abbildung 4.6:** Schematische Darstellung des Boyden-Kammer-Migration-Versuches
- Abbildung 4.7:** Schematische Darstellung des Arbeitsverlaufes der Einzelzellkern-Sequenzierung
- Abbildung 5.1.1:** Effekte des Alterungsprozesses auf Kardiomyozyten und Kapillaren
- Abbildung 5.1.2:** Altersabhängige Ko-lokalisierung von Perizyten und Kapillaren
- Abbildung 5.1.3:** Altersbedingte Mikrohämmorrhagien im alten Herzen
- Abbildung 5.2.1:** Zell-spezifische Anordnung von jungen und alten Mausherzen
- Abbildung 5.2.2:** Charakterisierung von Perizyten
- Abbildung 5.2.3:** Veränderte Genregulation während des Alterns
- Abbildung 5.2.4:** GO-Analysen zeigen reduzierte Perizyten-Adhäsion im Alter
- Abbildung 5.3.1:** *NOTCH3*-Expression ist im Alter runterreguliert
- Abbildung 5.3.2:** *PDGFRβ*-Expression ist im Alter runterreguliert
- Abbildung 5.4.1:** Notch3- und *Pdgfrβ*-Expression nach Genausschaltung reduziert
- Abbildung 5.4.2:** *NOTCH3* und *PDGFRB* Ausschaltung hat keinen Effekt auf die metabolische Aktivität und Viabilität in Perizyten *in-vitro*
- Abbildung 5.4.3:** Perizyten lösen sich vermehrt nach Ausschaltung von *NOTCH3* und *PDGFRB in vitro* von der Zellkulturplatte
- Abbildung 5.4.4:** Zell-Matrix-Adhäsion ist nach *NOTCH3* und *PDGFRB* Ausschaltung reduziert
- Abbildung 5.4.5:** Die Anzahl sich gelöster Perizyten nach Ausschaltung von *NOTCH3* und *PDGFRB* ist *in vitro* erhöht
- Abbildung 5.4.6:** Das Ausschalten von *NOTCH3* und *PDGFRB* zeigt keinen Einfluss auf die Permeabilität
- Abbildung 5.4.7:** Die Zellmigration ist nach Genausschaltung reduziert
- Abbildung 5.5.1:** Der Transkriptionsfaktor Zeb1 reguliert Notch3 und *Pdgfrb*
- Abbildung 5.5.2:** Nach Ausschaltung des *ZEB1*-Gens sinkt die *PDGFRB*-Genexpression signifikant
- Abbildung 6.4:** Transkriptionsfaktor Zeb1 reguliert die Expression von *Pdgfrb* im Alter



## 12. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all den Menschen danken, welche mich in jeglicher Form bei der Durchführung und Anfertigung dieser Dissertation unterstützt haben.

An erster Stelle möchte ich Prof. Dr. Stefanie Dimmeler und Prof. Dr. Andreas Zeiher danken. Dafür, dass ich die Möglichkeit bekommen habe an diesem tollen Projekt arbeiten zu dürfen. Danke für die Unterstützung in jeglicher Phase der Dissertation, für das Engagement, die Genialität, die Zuversicht und das viele großartige Input.

Ich möchte meinem Doktorvater Prof. Dr. Thomas Göbel danken. Dafür, dass Sie an mich und mein Projekt geglaubt haben. Vielen Dank für jegliche Unterstützung und dafür, dass Sie jederzeit als Ansprechpartner zur Verfügung standen.

Ich möchte mich bei meinen Betreuern Dr. Guillermo Luxán und Julian Wagner bedanken. Ich hätte mir keine besseren Betreuer als euch zwei wünschen können. Danke, für all die großartigen Ideen, für eure Geduld, euer Wissen, das ihr mit mir geteilt habt und für die unergründliche Leidenschaft, die ihr mit in mein Projekt gesteckt habt.

Ich möchte mich bei Dr. Eva-Maria Rogg, Ariane Fischer und Felix Vetter bedanken, die mich so wunderbar in den *in-vivo* Bereich eingearbeitet haben.

Ich danke Dr. David John für all die großartige Hilfe im bioinformatischen Bereich.

Danke außerdem an all die anderen lieben Kollegen für die wunderschöne und vor allem humorvolle Zeit mit euch.

Der größte Dank gilt meinen Eltern Michael Hartmann und Sabine Kugel-Hartmann. Danke dafür, dass ihr mir das Studium der Veterinärmedizin ermöglicht und somit meinen Kindheitstraum erfüllt habt. Für eure Unterstützung in jeder Lebensphase und dass ihr immer an mich glaubt und hinter mir steht. Ich bin unendlich dankbar, dass es euch gibt!