

Aus dem Institut für Inflammation und Neurodegeneration

der Medizinischen Fakultät

der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

Charakterisierung von Perizyten und ihren Mikrovesikeln in einem Modell für zerebrale Mikroangiopathie

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. med.

(doctor medicinae)

an der Medizinischen Fakultät

der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

vorgelegt von Martin Morenz

aus Magdeburg

Magdeburg, 2021

Dokumentationsblatt

Bibliographische Beschreibung:

Morenz, Martin:

Charakterisierung von Perizyten und ihren Mikrovesikeln in einem Modell für zerebrale Mikroangiopathie. - 2021. - 80 Bl., 15 Abb., 10 Tab.

Kurzreferat:

Perizyten sind perivaskuläre Zellen, die engen Kontakt zu den kleinsten Gefäßen aller Organe haben. An Gehirngefäßen sind sie besonders hoch konzentriert und haben eine essentielle Funktion in der Aufrechterhaltung der schützenden Bluthirnschranke sowie eine zentrale Stellung im neuartigen Konzept der neurovaskulären Einheit. Die zerebrale Mikroangiopathie ist die Ursache eines großen Anteils aller Schlaganfälle, ist aber pathophysiologisch nicht vollständig verstanden und verbleibt ohne bewährte Therapieansätze. In dieser Arbeit wurden 6 und 25 Wochen alte SHRSP, ein Rattenmodell für zerebrale Mikroangiopathie, per primärer Perizytenzellkultur und direkter Untersuchung der Gehirne und Seren mit Kontrollratten verglichen. Es wird eine Reduktion in der Genexpression von Perizytenmarkern sowie in der Produktion von Mikrovesikeln, einer Art kommunikativer extrazellulärer Vesikel, in der SHRSP-Kultur festgestellt. Mikrovesikel der SHRSP-Perizyten haben im Gegensatz zu denen der Kontrollgruppe keinen proliferatorischen Effekt in einem Wundheilungs-Assay. Analyse der Gehirne zeigt eine Reduktion von Perizytenmarkern und Tight-Junction-Proteinen in den alten SHRSP-Ratten. Erhöhte Zytokinkonzentrationen im Serum der SHRSP-Ratten sprechen für eine systemische Entzündungskomponente. Insgesamt suggerieren diese Daten, dass Perizyten eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie der zerebralen Mikroangiopathie spielen, und einen potentiellen therapeutischen Angriffspunkt darstellen könnten.

Schlüsselwörter:

Perizyten, Bluthirnschranke, Neurovaskuläre Einheit, zerebrale Mikroangiopathie, CSVD, SHRSP, extrazelluläre Vesikel, Mikrovesikel

Inhaltsverzeichnis

	Dokumentationsblatt	I
	Inhaltsverzeichnis	II
	Abkürzungsverzeichnis	IV
	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	VI
1	Einleitung	1
	1.1 Perizyten	1
	1.2 Neurovaskuläre Einheit	8
	1.3 Zerebrale Mikroangiopathie	11
	1.4 Extrazelluläre Vesikel	14
	1.5 Fragestellung	17
2	Material und Methoden	18
	2.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien	18
	2.2 Chemikalien	18
	2.3 Versuchskits	18
	2.4 Lösungen und Medien	18
	2.5 Antikörper	19
	2.6 Primer	20
	2.7 Versuchstiere	20
	2.8 Perizytenkulturen	21
	2.9 Immunfluoreszenz der Zellkulturen	22
	2.10 Apoptose-Assay	22
	2.11 Polymerase-Kettenreaktion	23
	2.12 Mikrovesikelisolation	24
	2.13 Wundheilungs-Assay	25
	2.14 Zytokinmessung	26
	2.15 Immunfluoreszenz der Gehirne	26
	2.16 Durchflusszytometrie	27
	2.17 Statistik	28
3	Ergebnisse	29
	3.1 Etablierung der primären Perizytenkulturen	29
	3.2 Apoptose der Perizytenkulturen	32
	3.3 Genexpression der Perizytenkulturen	34

3.4	Produktion von Mikrovesikeln in den Perizytenkulturen.....	35
3.5	Wundheilungs-Assays der Perizytenkulturen.....	37
3.6	Genexpression der Rattengehirne.....	40
3.7	Zytokinkonzentrationen der Rattenserum.....	42
3.8	Immunfluoreszenz der Hirnschnitte.....	44
3.9	Durchflusszytometrie der Gehirnzellen.....	47
4	Diskussion.....	50
4.1	Unterschiede der Wistar- und SHRSP-Perizyten <i>in vitro</i>	50
4.2	Produktion und Effekt von Mikrovesikeln.....	53
4.3	Untersuchungen der Rattengehirne und -serum.....	54
4.4	Fazit.....	57
5	Zusammenfassung.....	58
	Literaturverzeichnis.....	59
	Anhang.....	68
	Danksagungen.....	71
	Ehrenerklärung und Erklärung der Straffreiheit.....	72
	Bildungsweg.....	73

Abkürzungsverzeichnis

7-AAD	7-Aminoactinomycin
AF	Alexa Fluor
APC	Allophycocyanin
α SMA	<i>Alpha smooth muscle actin</i>
Ang	Angiopoetin
AQP4	Aquaporin 4
BDNF	<i>Brain-derived neurotrophic factor</i>
BHS	Bluthirnschranke
BSA	Bovines Serumalbumin
BV	Brilliant Violet
CADASIL	<i>Cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy</i>
CCL	Chemokin der CC-Familie
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CFSE	Carboxyfluoresceinsuccinimidylester
CSVD	<i>Cerebral small vessel disease</i>
CXCL	Chemokin der CXC-Familie
Cy7	Cyanin 7
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
EV	Extrazelluläre Vesikel
EZM	Extrazelluläre Matrix
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
Fc	<i>Fragment crystallizable</i>
FKS	Fetales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
ICAM-1	Interzelluläres Zelladhäsionsmolekül 1
IFN γ	Interferon-gamma
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
iNOS	Induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
LPS	Lipopolysaccharide
miRNA	<i>Micro ribonucleic acid</i>
MMP	Matrix-Metalloproteinase

mRNA	<i>Messenger ribonucleic acid</i>
MRT	Magnetresonanztomographie
MSC	<i>Mesenchymal stem cell, medicinal signaling cells</i>
MV	Mikrovesikel
NG2	Neuron/Glia-Antigen 2
NGF	<i>Nerve growth factor</i>
NO	Stickstoffmonoxid
ns	Nicht signifikant
NT-3	Neurotrophin-3
NVE	Neurovaskuläre Einheit
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PDGFB	<i>Platelet-derived growth factor subunit B</i>
PDGFR β	<i>Platelet-derived growth factor receptor beta</i>
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein
PFA	Paraformaldehyd
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
qRT-PCR	<i>Real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
rpm	<i>Revolutions per minute</i>
SEM	<i>Standard error of the mean</i>
SHR	<i>Spontaneously hypertensive rat</i>
SHRSP	<i>Spontaneously hypertensive stroke prone rat</i>
SMC	<i>Smooth muscle cell</i>
TGF β	<i>Transforming growth factor beta</i>
Tie 2	<i>Tyrosine kinase with Ig and EGF homology domains 2</i>
TIMP	<i>Tissue inhibitors of metalloproteinases</i>
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
ZBF	Zerebraler Blutfluss
ZNS	Zentralnervensystem
ZO-1	Zonula occludens-1

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Illustration des Übergangs von SMC und Perizyten entlang der Gefäßlaufbahn.....	1
Abbildung 2:	Die zentrale Stellung der Perizyten in der neurovaskulären Einheit.....	9
Abbildung 3:	Biogenese, Inhalt und Kommunikationswege von Exosomen und Mikrovesikeln.....	15
Abbildung 4:	Etablierung der primären Perizytenkulturen.....	29
Abbildung 5:	Immunfluoreszenz der Perizytenkulturen.....	31
Abbildung 6:	Apoptose der Perizytenkulturen.....	33
Abbildung 7:	Genexpression der Perizytenkulturen.....	35
Abbildung 8:	Produktion von Mikrovesikeln in den Perizytenkulturen.....	37
Abbildung 9:	Wundheilungs-Assays der Perizytenkulturen.....	39
Abbildung 10:	Genexpression der Rattengehirne.....	41
Abbildung 11:	Zytokinkonzentrationen der Rattenserum.....	43
Abbildung 12:	Immunfluoreszenz der Hirnschnitte.....	45
Abbildung 13:	ZO-1-Färbung der Hirnschnitte.....	46
Abbildung 14:	Gating-Strategie für die Durchflusszytometrie.....	48
Abbildung 15:	Durchflusszytometrie der Gehirnzellen.....	49

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 – Versuchskits.....	18
Tabelle 2 – Lösungen und Medien.....	18
Tabelle 3 – Antikörper für die Durchflusszytometrie.....	19
Tabelle 4 – Primäre Antikörper für die Immunfluoreszenz.....	19
Tabelle 5 – Sekundäre Antikörper für die Immunfluoreszenz.....	19
Tabelle 6 – Primerkits für die Polymerase-Kettenreaktion.....	20
Tabelle 7 – Einstellungen für die Polymerase-Kettenreaktion.....	23
Tabelle 8 – Geräte.....	68
Tabelle 9 – Verbrauchsmaterialien.....	69
Tabelle 10 – Chemikalien.....	70

1 Einleitung

1.1 Perizyten

Perizyten sind perivaskuläre Zellen, die in direktem Kontakt mit der Basalmembran von kleinsten Arteriolen, Kapillaren und Venolen stehen. Von Rouget erstmals 1873 beschrieben, gab ihnen Zimmermann im Jahr 1923 ihren definitiven Namen (Zimmermann 1923). Trotz ihrer frühzeitigen Entdeckung wurde die Funktion der Zellen lange nicht vollständig verstanden und ist auch heute noch Objekt intensiver Forschung. Mittlerweile ist bekannt, dass Perizyten in jedem menschlichen Organ vorkommen, wobei sich die Dichte, Funktion und Morphologie je nach Ort unterscheiden (Birbrair 2018). Diese Variationen machen eine eindeutige Identifikation der Perizyten anhand von Oberflächenproteinen, Transkriptionsfaktoren und dem Vorkommen von kontraktilen Filamenten schwierig. Obwohl sie traditionell in der Mikroskopie durch ihre Nähe zum Endothel von anderen Zellen unterschieden wurden, zeigt sich durch aktuelle Veröffentlichungen eine Heterogenität der als Perizyten definierten Zellen. Selbst über grundlegende Funktionen wie Kontraktilität herrscht noch Uneinigkeit (Hill et al. 2015; Attwell et al. 2016). Ein Grund für diese Diskrepanzen ist der scheinbar fließende Übergang von den glatten perivaskulären Muskelzellen (*Smooth muscle cells*, SMC) der größeren Gefäße zu den Perizyten der kleinsten Gefäße (Abbildung 1). Lange Zeit wurde für die Perizyten lediglich eine das Endothel unterstützende Rolle angenommen. Durch moderne Methoden wurden jedoch vielfältige Funktionen der Zelle aufgedeckt. Mäuse, bei denen der für Perizyten essentielle PDGFB (*Platelet derived growth factor subunit B*)-Signalweg defekt ist, sind nicht lebensfähig und weisen in verschiedenen Organsystemen pathologische Veränderungen auf (Levéen et al. 1994). Neben dem PDGF Rezeptor beta (PDGFR β) sind andere typische Marker für Perizyten das Neuron/Glia-Antigen 2 (NG2), CD13 (*Cluster of differentiation* 13, auch Aminopeptidase N), und Alpha-Actin-2 (*Alpha smooth muscle actin*, α SMA) (Smyth et al. 2018; Bhattacharya et al. 2020).

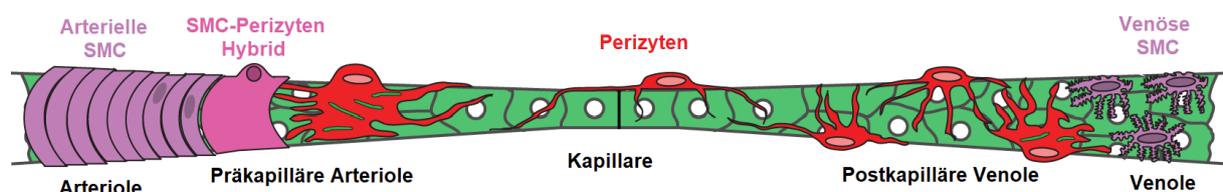


Abbildung 1: Illustration des Übergangs von SMC und Perizyten entlang der Gefäßlaufbahn. Übernommen und übersetzt nach (Hartmann et al. 2015).

Dabei ist keines dieser Oberflächenproteine auf allen Perizyten vorhanden oder spezifisch, und eine genaue Identifikation gelingt oft nur mit einer Kombination von diesen Markern oder anderen Methoden. Das Verhältnis von Perizyten zu Endothelzellen schwankt stark von Organ zu Organ. Während in Skelettmuskulatur zwischen 10 und 100 Endothelzellen für jeden Perizyt beschrieben wurden, besteht im Gehirngewebe etwa ein Eins-zu-eins-Verhältnis (Armulik et al. 2011). Es liegt somit nahe, dass Perizyten im zentralen Nervensystem (ZNS) eine besondere Rolle einnehmen. Tatsächlich wurden über die Jahre wichtige neurovaskuläre Funktionen gefunden (Sweeney et al. 2016; Bhattacharya et al. 2020; Armulik et al. 2011).

So sind Perizyten essentiell für den Aufbau und die Erhaltung der Bluthirnschranke (BHS) (Liu et al. 2012; Kamouchi et al. 2012). Ein für Perizyten und SMC spezifisches Laminin-Knockout-Modell zeigte eine Reduktion der Perizytdichte in 8 bis 15 Monaten alten Mäusen (Gautam et al. 2019). Hier wurden ebenfalls vermehrte Ablagerungen von Immunglobulin G (IgG) und Dextran-Fluoresceinisothiocyanat (FITC) gefunden, welche in der Kontrollgruppe aufgrund der intakten BHS ausblieben (Gautam et al. 2019). Ebenso zeigte sich eine Reduktion der Tight-Junction-Proteine Claudin-5 und Zonula occludens-1 (ZO-1), die eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der BHS spielen (Gautam et al. 2019). Mit einem neuartigen Mausmodell, welches die Promotoren der zwei Perizytenmarker PDGFR β und NG2 kombiniert, konnten (Nikolakopoulou et al. 2019) die Zellen gezielt ansteuern. Nach Ablation mit Diphtherietoxin wurde nach 15 Tagen eine signifikante Reduktion der Perizytdichte von etwa 60 % im Kortex der Mäuse demonstriert (Nikolakopoulou et al. 2019). In Folge dessen wurden in Magnetresonanztomographie (MRT)-Analysen eine erhöhte Durchlässigkeit der BHS sowie neu aufgetretene Hirnödemen gefunden (Nikolakopoulou et al. 2019). Erneut wurde eine Anlagerung von IgG entlang der Gefäße und eine Reduktion von Tight-Junction-Proteinen Claudin-5, Occludin und ZO-1 beschrieben (Nikolakopoulou et al. 2019).

Zusätzlich spielen Perizyten eine wichtige Rolle bei der Regulation des Blutstroms im Gehirn (zerebraler Blutfluss, ZBF). Die Zwei-Photonen-Mikroskopie des Mausekortex ergab, dass sich der Kapillardurchmesser nach elektrischer Stimulation der Schnurrhaare erweitert (Hall et al. 2014). Dabei reagierten die Perizyten schneller auf den Reiz als die SMC der vorgeschalteten Arteriolen, von denen lange angenommen wurde, dass sie den größten Einfluss auf die Steuerung des ZBF haben (Hall et al. 2014). Basierend auf den neuen Erkenntnissen schätzen die Autoren der Studie, dass

Perizyten nach neuronaler Stimulation für über 80% des vermehrten ZBF verantwortlich sind (Hall et al. 2014). Gleichzeitig wurde in Hirnschnitten von Ratten gezeigt, dass Stimulation mit Noradrenalin zur Perizytenkonstriktion und Stimulation mit Glutamat zur Dilatation führt (Hall et al. 2014). Ob die Neurotransmitter direkt an Perizyten wirken oder umgebende Neuronen oder Gliazellen daraufhin für Perizyten bestimmte Mediatoren freisetzen, wurde hier nicht festgestellt. Mit dem in (Nikolakopoulou et al. 2019) etablierten Modell wurde gezeigt, dass nach Ablation von Perizyten die Regulation des ZBF als Antwort auf elektrische Stimulation der Hinterbeine von Mäusen ebenfalls reduziert ist (Kisler et al. 2020). Kontroverserweise berichteten jedoch (Hill et al. 2015), dass lediglich SMC für die Veränderung des ZBF verantwortlich sein. Weiterhin stellten die Autoren in Widerspruch zur einschlägigen Literatur fest, dass SMC, nicht aber Perizyten das für Kontraktibilität wichtige Alpha-Actin-2 besitzen (Hill et al. 2015). Die Autoren benutzten dabei einen relativ unspezifischen NG2-Reporter, der neben Perizyten unter anderem auch SMC und Oligodendrozyten färbt, und definierten Perizyten als NG2-positive Zellen mit typischer Morphologie in der Zwei-Photonen-Mikroskopie (Hill et al. 2015). Dieser Ansatz wurde für die Verwechslung von kontraktile Perizyten mit SMC verantwortlich gemacht und kritisiert (Attwell et al. 2016). Eine wiederum auf dem Doppel-Promotor-Modell von (Nikolakopoulou et al. 2019) basierende Studie zeigte bei ähnlicher Photostimulation im Gegensatz zu (Hill et al. 2015) eine perizytengesteuerte Kontraktion von Kapillaren, aus der eine deutliche Reduktion des Blutflusses resultiert (Nelson et al. 2020). Solche Diskrepanzen in der Literatur illustrieren, wie wichtig eine einheitliche und präzise Definition von Perizyten ist.

Eine weitere entscheidende Funktion der Perizyten liegt in der Angiogeneese. Dabei ermöglichen sie sowohl durch Entkopplung vom Endothel dessen freie Bewegung, als auch die Anlagerung an neue Gefäße deren Stabilisierung (Sweeney et al. 2016; Bhattacharya et al. 2020; Herbert und Stainier 2011). Hier spielt der Angiopoetin-Rezeptor Tie 2 (*Tyrosine kinase with Ig and EGF homology domains 2*) eine wichtige Rolle. Bisher wurde angenommen, dass sich dieser ausschließlich auf Endothelzellen befindet und von Angiopoetin 1 (Ang1) der unmittelbar umgebenden Perizyten angeregt wird (Herbert und Stainier 2011). Dies führt zu einem ruhenden Zustand des Endothels mit vermehrter Anlagerung von Perizyten und verbesserter Barrierefunktion der Gefäßwand. Über den als Antagonisten wirkenden Liganden Ang2 können Endothelzellen autokrin Perizytenablösung, Destabilisierung und Angiogeneese

bewirken (Herbert und Stainier 2011; Teichert et al. 2017). Interessanterweise wurde zuletzt demonstriert, dass Perizyten selbst auch den Angiopoetin-Rezeptor Tie2 exprimieren und somit durch ihre Ang1-Produktion ebenfalls eine autokrine Regulation bewirken (Teichert et al. 2017). Auch der Endothelwachstumsfaktor (*Vascular endothelial growth factor*, VEGF) spielt eine essentielle Rolle in der Angiogeneese. Der vor allem durch VEGF-A aktivierte VEGF-Rezeptor 2 (VEGFR-2) auf dem Endothel begünstigt dessen Wachstum sowie den Abbau der extrazellulären Matrix (EZM) (Herbert und Stainier 2011). Durch die Herstellung von VEGF-A haben Perizyten somit parakrin Einfluss auf die Gefäßneubildung (Gaceb und Paul 2018; Sweeney et al. 2016). Endothelzellen selbst können ebenfalls VEGF-A herstellen und regulieren sich damit autokrin (Sweeney et al. 2016). Auch Matrix-Metalloproteinasen (MMP) sind wichtig für den Abbau der EZM und Lockerung der BHS, beides Voraussetzungen für Angiogeneese (Gaceb und Paul 2018; Saunders et al. 2006). Die Produktion von MMP durch Perizyten wurde sowohl *in vitro* (Thanabalasundaram et al. 2010) als auch *in vivo* (Underly et al. 2017) nachgewiesen. So konnte gezeigt werden, dass die Gefäßdurchlässigkeit besonders im Bereich der Perizytenomata erhöht ist und nur dort durch gezielte Hemmung von MMP-9 reversiert werden kann (Underly et al. 2017). Gleichzeitig stellen Perizyten auch Inhibitoren der Metalloproteinasen (*Tissue inhibitors of metalloproteinases*, TIMP) her, welche unter anderem MMP-9 hemmen und damit einen stabilisierenden Einfluss auf die EZM und BHS haben (Saunders et al. 2006; Persidsky et al. 2015; Stratman et al. 2009). Der transformierende Wachstumsfaktor Beta (*Transforming growth factor beta*, TGF β) wird von Perizyten und Endothelzellen gebildet und hat eine protektive Wirkung auf die BHS (Dohgu et al. 2005; Gaceb et al. 2018a).

Neben diesen klassischen und eng mit der Regulation des Blutstromes und der Gefäße verknüpften Funktionen wurden in neuerer Forschung überraschende Rollen der Perizyten in der Immunmodulation entdeckt. Einerseits haben sie in Ruhe eine antiinflammatorischen Wirkung, mit der sie zum immunprivilegierten Status des Gehirns beitragen (Bhattacharya et al. 2020; Pachter et al. 2003). Botenstoffe wie Ang1, TGF β und TIMP3 wirken stabilisierend auf die BHS und verhindern so das Einschwämmen von Entzündungsmediatoren und Leukozyten (Pachter et al. 2003). Weiterhin produzieren Perizyten einen großen Anteil des neuroprotektiven Wachstumsfaktor Pleiotrophin *in vivo*, dessen Mangel einer der Gründe für den beobachteten Neuronenuntergang nach Perizytenablation ist (Nikolakopoulou et al.

2019). *In vitro* konnten Perizyten als wichtige Produzenten des Nervenwachstumsfaktors (*Nerve growth factor*, NGF) sowie von BDNF (*Brain-derived neurotrophic factor*) und Neurotrophin-3 (NT-3) identifiziert werden, welche unter anderem das Überleben von Neuronen unterstützen (Ishitsuka et al. 2012; Skaper 2018). Zudem konnte *in vitro* die Produktion des wichtigen antiinflammatorischen Interleukins 10 (IL-10) sowohl in Ruhe als auch vermehrt nach Stimulation mit Lipopolysacchariden (LPS) festgestellt werden (Kovac et al. 2011). Durch den Toll-like-Rezeptor 4 können Perizyten, ähnlich wie klassische Immunzellen, auf Membranbestandteile von Bakterien reagieren und so eine Entzündungsreaktion auslösen (Rustenhoven et al. 2017). In einem Mausmodell wurde nach LPS-Injektion der Zerfall der BHS nach Ablösung der Perizyten von der Basalmembran des Endothels demonstriert (Nishioku et al. 2009). *In vitro* konnte nach LPS-Stimulation von Perizyten die vermehrte Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-1 α und Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α) sowie der Chemokine CCL3 und CCL4 nachgewiesen werden (Kovac et al. 2011). Die Produktion von Chemokinen wurde *in vivo* bestätigt, wobei gezeigt wurde, dass Perizyten und nicht Endothelzellen, Mikrogliazellen oder Astrozyten nach LPS-Stimulation Hauptproduzenten von CCL2 sind und so frühzeitig eine neuroinflammatorische Antwort vermitteln (Duan et al. 2018). Nach einem PDGFR β -abhängigen Knockout von CCL2 waren sowohl Boten-Ribonukleinsäure (*Messenger ribonucleic acid*, mRNA)-Level als auch die Konzentration des Chemokins reduziert und die Entzündungsreaktion des ZNS vermindert (Duan et al. 2018). Überraschenderweise zeigten Perizyten *in vitro* eine stärkere Produktion proinflammatorischer Mediatoren wie IL-1 α , IL-6, CCL2, CCL5 und Interferon-gamma (IFN γ) nach Stimulation mit TNF- α als Mikrogliazellen, die residenten Immunzellen des ZNS (Matsumoto et al. 2014). Andere von Perizyten hergestellte immunwirksame Verbindungen beinhalten unter anderem das interzelluläre Zelladhäsionsmolekül 1 (ICAM-1) und das vaskuläre Zelladhäsionsmolekül 1 (VCAM-1), die Chemokine CXCL1 und CXCL10, den Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierende Faktor (GM-CSF) sowie das Sauerstoffradikal Stickstoffmonoxid (NO), welches durch die induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) produziert wird (Gaceb und Paul 2018; Rustenhoven et al. 2017). Zusammengefasst sind Perizyten somit in der Lage, durch proinflammatorische Zytokine sowohl benachbarte Zellen immunologisch zu aktivieren, als auch mit Chemokinen Leukozyten zu rekrutieren und ihnen durch den Abbau der BHS Passage

zu gewähren (Rustenhoven et al. 2017). Weiterhin ergaben *in-vitro*-Versuche, dass Perizyten wie andere antigenpräsentierende Zellen Haupthistokompatibilitätskomplex-Moleküle (*Major histocompatibility complex*, MHC) auf ihrer Oberfläche besitzen, diese nach Stimulation mit IFN γ vermehrt exprimieren und T-Lymphozyten antigenabhängig zur Proliferation anregen können (Balabanov et al. 1999). Ob Perizyten die notwendigen kostimulierenden Faktoren für eine Aktivierung dieser Zellen *in vivo* besitzen, oder eher zu deren Hemmung beitragen, ist noch Gegenstand aktueller Forschung (Pober et al. 2017; Rustenhoven et al. 2017).

Die Endozytose wird in die klassische Clathrin-abhängigen Endozytose, die unspezifische Pinozytose und die Phagozytose größerer Partikel unterteilt, wobei Perizyten alle drei ausüben können (Rustenhoven et al. 2017; Bhattacharya et al. 2020). In elektronenmikroskopischen Aufnahmen menschlicher Gehirne nach Trauma konnte sowohl Pinozytose zur Beseitigung von Ödemen bei leichter BHS-Verletzung als auch Phagozytose von ganzen Erythrozyten bei schweren Schäden der BHS beobachtet werden (Castejón 2011). *In-vitro*-Versuche bestätigten die Phagozytose von Perizyten und konnten diese mit IFN γ und TNF- α zusätzlich stimulieren (Pieper et al. 2014). Im menschlichen Gehirn konnten Amylinablagerungen, die vor allem bei Patienten mit Diabetes Typ II und Morbus Alzheimer akkumulieren, in Perizyten festgestellt werden (Schultz et al. 2017).

Es besteht Uneinigkeit darüber, ob Perizyten in der Lage sind, als sogenannte mesenchymale Stammzellen (*Mesenchymal stem cells*, MSC) die BHS zu verlassen und sich in verschiedene Zellen wie Neuronen, Oligodendrozyten und Mikroglia zu differenzieren (Geranmayeh et al. 2019; Sweeney et al. 2016; Cai et al. 2017). Perizyten könnten demnach ein Reservoir für postmitotische Neuronen darstellen, die normalerweise keine oder sehr geringe Zellteilung eingehen (Frade und Ovejero-Benito 2015). So nahmen Perizyten in einem Ischämiemodell *in vitro* durch ein von Endothel oder Neuronen konditioniertes Medium den Phänotyp vaskulärer beziehungsweise neuronaler Zellen an (Nakagomi et al. 2015). In Perizyten aus menschlichen Gehirnen ließ sich *in vitro* eine ähnliche Differenzierung in Osteoblasten, Chondrozyten, Adipozyten, Gliazellen und unreife Neuronen nach Behandlung mit entsprechenden Wachstumsfaktoren feststellen (Paul et al. 2012). Mit einem Mausmodell für Schlaganfall konnte eine RGS5 (*Regulator of G protein signaling 5*)-positive Perizytenpopulation demonstriert werden, die im Infarktareal zunimmt, teilweise die Kapillarwand verlässt und den Mikroglia marker CD11b exprimiert (Özen

et al. 2014). In einer der eingängigen Meinung der Literatur widersprechenden Studie konnten (Guimarães-Camboa et al. 2017) zunächst eine Differenzierung von Perizyten *in vitro* nach Zugabe entsprechender Wachstumsfaktoren zu Adipozyten, Osteoblasten und Chondrozyten reproduzieren. Es wurde demonstriert, dass sich ein murines PDGFR β -Cre-Modell anderer Arbeitsgruppen nicht zur Verfolgung einer Perizytenpopulation (*Lineage tracing*) eignet, da PDGFR β in adulten Zellen zwar fast nur von perivaskulären Zellen exprimiert wird, während der Embryogenese allerdings diverse Zellen verschiedener Organe markiert (Guimarães-Camboa et al. 2017). Das von den Autoren etablierte Tbx18-CreERT2-Modell markiert dagegen spezifisch Perizyten und SMC und kann durch Induktion mit Tamoxifen die Zellen und deren Nachfolger stabil fluoreszent kennzeichnen (Guimarães-Camboa et al. 2017). Anhand dieses Modells wurde festgestellt, dass Perizyten auch über ein Jahr nach Induktion in verschiedenen Geweben nicht die Gefäßwand verlassen und nicht in andere Zellen differenzieren (Guimarães-Camboa et al. 2017). Auch in pathologischen Umständen wie einer fetthaltigen Diät oder einer Verletzung des Herzens oder Gehirns wurde keine Umwandlung in Adipozyten, Fibroblasten, Makrophagen oder Neuronen beobachtet (Guimarães-Camboa et al. 2017). In Folge der neuen Erkenntnisse, dass Perizyten *in vivo* scheinbar keine echten Stammzellen darstellen, wurde vorgeschlagen, die Bedeutung der Abkürzung MSC in medizinische Signalzellen (*Medicinal signaling cells*) abzuwandeln (Caplan 2017). Auch wenn Perizyten somit nicht in andere Zelllinien transdifferenzieren, nehmen sie durch die Kommunikation mit ihren Nachbarzellen in vielen physiologischen und pathologischen Prozessen eine wichtige Rolle ein.

1.2 Neurovaskuläre Einheit

Die neurovaskuläre Einheit (NVE) ist ein Konzept, das dazu dient, den komplexen Zusammenhang zwischen den Neuronen und der Blutversorgung des Gehirns zu verstehen. Seit der Begriff zuerst auf einem Treffen des US-Amerikanischen *National Institute of Neurological Disorders and Stroke* im Jahre 2001 vorgeschlagen wurde, hat das Modell zunehmendes Interesse generiert (Iadecola 2017). Dabei baut die NVE auf der BHS auf, welche aus Endothelzellen, Perizyten und den Endfüßen umgebender Astrozyten zusammengesetzt ist. Bereits Ende des 19. Jahrhunderts konnten Rückschlüsse auf die selektive semipermeable Membran im ZNS gezogen werden (Ehrlich 1885). Der endgültige Nachweis der Tight Junctions als essentieller Bestandteil der BHS gelang erst viel später mithilfe der Elektronenmikroskopie (Reese und Karnovsky 1967). Diese unterscheiden das mehrere hundert Kilometer lange Kapillarnetz des menschlichen Gehirns von allen anderen Organen (Daneman und Prat 2015; Wong et al. 2013; Zlokovic 2005). Da das Gehirn über keinen eigenen Nährstoffspeicher verfügt und sehr empfindlich auf Ischämie und Hypoxie reagiert, muss es zu jeder Zeit über das Blut mit Nährstoffen und Sauerstoff versorgt werden (Iadecola 2017). Gleichzeitig wird es durch enge Kontrolle der importierten Ionen, Moleküle und Zellen als immunprivilegiertes Organ geschützt (Daneman und Prat 2015). Entgegen der lange angenommenen These, dass die Verteilung des Blutes lediglich aus dem systemischen Kreislauf resultiert (Friedland und Iadecola 1991), kann der Blutstrom dynamisch in Bereichen mit erhöhter neuraler Aktivität angepasst werden (Logothetis et al. 2001), was das Modell der BHS alleine nicht erklären kann. Die NVE erweitert nun den Fokus, indem sie neben Endothel, Perizyten und Astrozyten auch Mikroglia, Neuronen und die umgebende EZM beinhaltet (Yang et al. 2017; Rustenhoven et al. 2017) (Abbildung 2). Als ausführende Zelle der Vasodilatation und Vasokonstriktion haben kontraktile Perizyten bereits einen wichtigen Stellenwert in diesem System, doch auch durch ihre Kommunikation mit den anderen Zellen sind sie ein bedeutender Faktor in Gesundheit und Krankheit sowie ein potenzieller Angriffspunkt für therapeutische Strategien.

Perizyten haben direkten Kontakt zu Endothelzellen von Kapillaren, in deren Basalmembran sie als einzige Zelle eingebettet sind (Dahl 1973). Teilweise ist die Basalmembran unterbrochen und ermöglicht so den Kontakt zytoplasmatischer Ausläufer der Perizyten zu Einstülpungen der Endothelzellen in der sogenannten

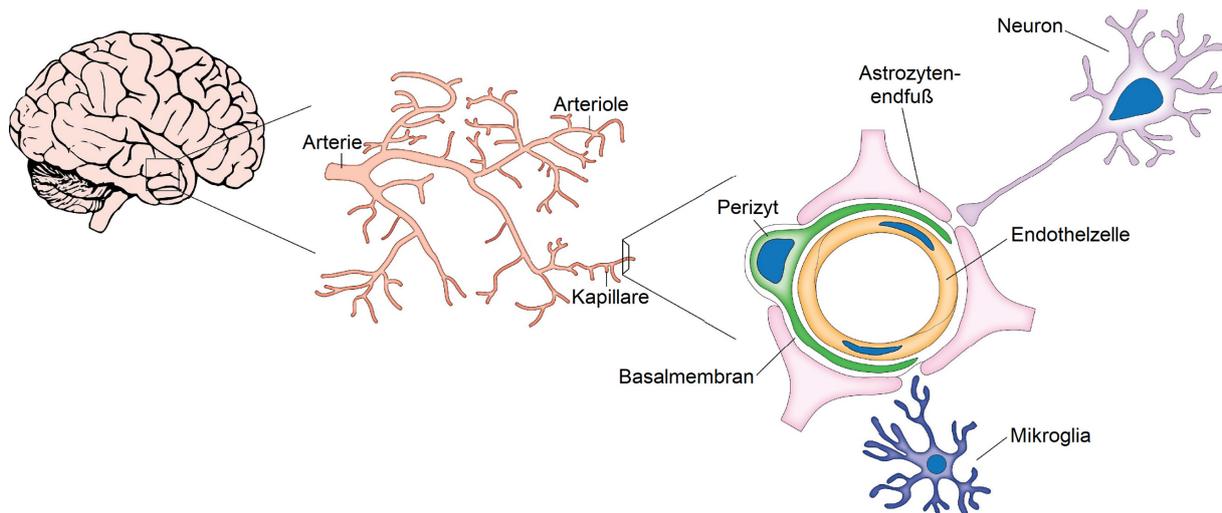


Abbildung 2: Die zentrale Stellung der Perizyten in der neurovaskulären Einheit.
Übernommen und übersetzt nach (Rustenhoven et al. 2017).

Peg-and-socket-Struktur (Leeson 1979; Armulik et al. 2011). Endothelzellen stellen PDGF-BB, den homodimeren Liganden des PDGFR β , her und rekrutieren Perizyten damit zu ihrer Position an der Gefäßwand (Thijssen et al. 2018). Eine Stimulation mit PDGF-BB führte *in vitro* zu vermehrter Genexpression der Neurotrophine NGF, NT-3 und BDNF (Arimura et al. 2012). TGF β sowie dessen Rezeptor T β RI wurden sowohl in Perizyten als auch Endothelzellen gefunden und sind essentiell zur normalen Gefäßbildung und der Differenzierung beider Zellarten (Larsson et al. 2001). Von Perizyten hergestelltes Ang1 regt über Tie2 Endothelzellen zur Herstellung des Tight-Junction-Proteins Occludin *in vitro* an (Hori et al. 2004). Während auch Astrozyten in einer Kokultur die Genexpression von Occludin in Endothelzellen erhöhten, ließ sich dieser Effekt im Gegenteil zu den Perizyten nicht mit einem anti-Ang1-Antikörper reversieren, was nahelegt, dass sich die Kommunikation von Astrozyten und Perizyten zum Endothel unterscheidet (Hori et al. 2004). Neue Erkenntnisse über das Ang1/Ang2/Tie2-System gaben Hinweise auf eine komplexe Wechselwirkung (Teichert et al. 2017).

Zwischen Perizyten und Astrozyten herrscht ebenfalls eine rege Kommunikation, welche bis dato allerdings weniger ausführlich erforscht wurde (Giannoni et al. 2018). So wurde eine erhöhte Dichte des Wasserkanals Aquaporin 4 (AQP4) an jenen Astrozytenendfüßen festgestellt, die in der Nähe von Perizyten münden, wobei der unterliegende Mechanismus dafür nicht geklärt ist (Gundersen et al. 2014). Die Autoren vermuten, dass Perizyten so den Flüssigkeitstransport vom perivaskulären Raum in das Parenchym anregen, oder dass der AQP4-Komplex selbst Signalfunktion

hat (Gundersen et al. 2014). Astrozyten reagierten im Gegensatz zu Perizyten nicht direkt auf Hypoxie mit einer erhöhten Produktion von Nervenwachstumsfaktoren, sondern wurden von Perizyten mittels NT-3 zur Herstellung von NGF angeregt (Ishitsuka et al. 2012). Es wurde demonstriert, dass von Astrozyten hergestelltes Apolipoprotein E4 Perizyten über die Aktivierung eines Cyclophilin A-Signalwegs zur Herstellung von MMP-9 anregt, welches die Integrität der BHS verletzt (Bell et al. 2012).

Perizyten sekretieren die Nervenwachstumsfaktoren NT-3, NGF und BDNF, welche das Überleben von Neuronen fördern (Arimura et al. 2012; Ishitsuka et al. 2012). Feinstrukturelle Untersuchungen ergaben, dass etwa 9 % aller noradrenergen Nervenenden im Rattenkortex an Gefäßen münden, und dabei mehrheitlich an Kapillaren (Cohen et al. 1997). Somit sind Neuronen in der Lage, durch Noradrenalin eine kalziumabhängige Kontraktion der Perizyten zu bewirken (Peppiatt et al. 2006). Mit Glutamat kann eine NO-abhängige Vasodilatation bewirkt werden (Hall et al. 2014). Eine Gabe von gamma-Aminobuttersäure-Antagonisten führte ebenfalls zu einer Vasokonstriktion durch Perizyten in der Retina von Ratten und deutet auf eine Rolle dieses Neurotransmitters in der Regulation des Blutstroms hin (Peppiatt et al. 2006). In einem Kokulturmodell wurde gezeigt, dass Perizyten besser als Astrozyten in der Lage sind, Mikrogliazellen nach Stimulation mit TNF- α zur Herstellung von iNOS und IL-1 β anzuregen (Matsumoto et al. 2014).

Während eine intakte NVE dem Gehirn die korrekte Blutversorgung, die Barrierefunktion und das Immunprivileg ermöglicht, ist eine Störung der NVE beziehungsweise der Perizyten bei der neurodegenerativen Alzheimer-Krankheit, aber auch bei Enzephalitis, Tumorwachstum und Schlaganfall festgestellt worden (Liu et al. 2012; Iadecola 2017; Kamouchi et al. 2012; Hu et al. 2017; Ozden et al. 2002; Thijssen et al. 2018; Gibby et al. 2012). Zum Beispiel ist die Rekrutierung von Perizyten an Tumorgefäße wichtig für dessen Wachstum, was durch die Blockierung von PDGFR β therapeutisch genutzt werden kann (Thijssen et al. 2018). In der Tat wirken Imatinib und andere Tyrosinkinase-Inhibitoren unter anderem an diesem Rezeptor und sind für die Behandlung verschiedener Krebsarten bereits zugelassen (Buchdunger et al. 2000). Während die Perizyten bei Tumoren als therapeutischer Angriffspunkt genutzt werden können, ist dies bei anderen Erkrankungen wie der zerebralen Mikroangiopathie aktuell noch nicht möglich.

1.3 Zerebrale Mikroangiopathie

Ein Schlaganfall ist eine akute, gefäßbedingte Schädigung von Gehirngewebe aufgrund einer Störung in der Blutversorgung. Dabei wird die Hirnblutung von dem ischämischen Schlaganfall unterschieden, der mit Abstand den größten Anteil der Insulte ausmacht (Hankey 2017). Trotz intensiver Forschung und Suche nach neuen Therapieoptionen stellt der Schlaganfall in Deutschland die zweithäufigste Todesursache dar und ist aufgrund von chronischen Beschwerden eine Hauptursache für den Verlust von Lebensqualität (Plass et al. 2014; Busch und Kuhnert 2017). In Deutschland gibt es jährlich über 250.000 Schlaganfälle (Heuschmann et al. 2010). Als zugelassene Therapieoptionen stehen zur Zeit lediglich die Thrombolyse mit Alteplase und die mechanische Thrombektomie mittels *Stent Retriever* zur Verfügung (Hankey 2017). Beide Möglichkeiten zeichnet jedoch eine begrenzte Eignung für bestimmte Formen des Schlaganfalls, ein kurzes Zeitfenster der Wirksamkeit, diverse Kontraindikationen und ein erhebliches Risiko für Komplikationen aus. Dementsprechend stellt eine Vermeidung von Risikofaktoren der potentiellen Schlaganfallpatienten wie Bluthochdruck, Hypercholesterinämie, Vorhofflimmern, Rauchen und Diabetes Mellitus einen wichtigen Faktor im Umgang mit der Krankheit dar (Hankey 2017). Die häufigsten Ursachen des ischämischen Schlaganfalls sind kardiale Embolien, Embolien der großen Arterien und die zerebrale Mikroangiopathie (Hankey 2017).

Die zerebrale Mikroangiopathie (*Cerebral small vessel disease*, CSVD) ist ein Überbegriff für verschiedene pathologische Prozesse der kleinsten Gehirngefäße (Li et al. 2018a). Patienten mit CSVD haben ein erhöhtes Risiko für Schlaganfall, Demenz, Depression und Gesamtmortalität im Vergleich zu gesunden Kontrollgruppen (Rensma et al. 2018). In einer MRT-Studie wurde in über 90 % von gesunden Patienten zwischen 60 und 90 Jahren eine für CSVD typische Schädigung der weißen Substanz festgestellt (Leeuw et al. 2001). Ursachen für die Krankheit sind unter anderem die hypertensive Arteriosklerose, Amyloidangiopathien und genetische Veränderungen wie die zerebrale autosomal-dominante Arteriopathie mit subkortikalen Infarkten und Leukenzephalopathie (*Cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy*, CADASIL) (Li et al. 2018a). Es wird geschätzt, dass etwa ein Viertel aller Schlaganfälle aufgrund von CSVD entstehen, wobei sie vor allem mit lakunären Infarkten vergesellschaftet ist (Pantoni 2010). Obwohl lakunäre Infarkte

mit einer niedrigeren Mortalität als kardioembolische oder atherothrombotische Schlaganfälle einhergehen, beeinträchtigen sie dennoch die Lebensqualität aufgrund von dauerhaften neurologischen Ausfällen und kognitiver Verschlechterung (Lund 2014; Pantoni 2010). Eine spezielle Therapie der lakunären Schlaganfälle gibt es nicht, auch hier hat die Reduktion der den anderen Schlaganfällen ähnlichen Risikofaktoren einen großen Stellenwert (Telgte et al. 2018).

Die Pathophysiologie der CSVD ist noch nicht vollständig verstanden. Es wird angenommen, dass bei Schädigung der Gefäßwand oder Amyloidablagerungen ein Verlust perivaskulärer Zellen entsteht und sich der Gefäßdurchmesser verkleinert (Pantoni 2010; Telgte et al. 2018; Li et al. 2018a). Dadurch resultieren ein reduzierter ZBF, Schaden der BHS und eine Entzündungsreaktion, die zu einer chronischen Minderperfusion mit Schäden der weißen Substanz, Ruptur von Gefäßen mit Mikroblutungen und kompletter, akuter Ischämie mit daraus resultierenden lakunären Infarkten führen können (Pantoni 2010). Die Rolle von Perizyten in der Pathophysiologie des CSVD wurde in der Erforschung ihrer häufigsten genetischen Ursache CADASIL gezeigt (Wang 2018). CADASIL ist eine autosomal dominant vererbte Mutation von Notch3, die durch die Aggregation des fehlerhaften Proteins zur Degeneration der Gefäße führt und schon bei jüngeren Patienten die typische Klinik der CSVD verursacht (Wang 2018). Notch3 spielt eine wichtige Rolle in der Differenzierung von Gefäßen und der Reifung perivaskulärer Zellen und wird vor allem von Perizyten und SMC hergestellt (Vanlandewijck et al. 2018; Domenga et al. 2004). In einem Mausmodell von CADASIL wurde mit zunehmender Notch3-Ablagerung eine Reduktion von Perizyten, nicht aber SMC, gefunden, die mit einer Störung der Funktion der BHS und anderer Zellen der NVE einhergeht (Ghosh et al. 2015).

Ein weiteres etabliertes Modell für CSVD, vaskuläre Demenz und lakunäre Infarkte ist die spontan hypertensive, zu Schlaganfällen neigende Ratte (*Spontaneously hypertensive stroke prone rat*, SHRSP) (Omote et al. 2014; Mustapha et al. 2019; Hazama et al. 1995). Dieses Modell wurde basierend auf der spontan hypertensiven Ratte (*Spontaneously hypertensive rat*, SHR) entwickelt (Okamoto et al. 1974). Durch selektive Zucht der SHR konnte mit der SHRSP ein Stamm mit noch höherem Blutdruck, der sich bereits im jüngeren Alter manifestiert und vermehrte zerebrovaskuläre Läsionen zur Folge hat, generiert werden (Shibota et al. 1979). SHRSP haben im Erwachsenenalter einen systolischen Blutdruck zwischen 220 und 240 mmHg verglichen mit 180 und 200 mmHg der SHR, und etwa 80 % der SHRSP

entwickeln im Laufe ihres Lebens einen Schlaganfall, im Gegensatz zu unter 10 % der SHR (Nabika et al. 2012). Obwohl die SHRSP durch selektive Zucht lange vor der Erfindung moderner genetischer Methoden generiert wurde, hat sie dennoch großen Nutzen in der Erforschung der erblichen Grundlagen der essentiellen Hypertonie des Menschen, da für diese eine komplexe Interaktion vieler Gene verantwortlich ist, die nach wie vor nicht vollständig verstanden wird (Nabika et al. 2012). *In-vivo*-Aufnahmen suggerieren eine pathophysiologische Kaskade der SHRSP, die mit Schädigung der Gefäßwand und BHS beginnt, zu einer Reduktion des ZBF und nicht-okklusiven Erythrozytenthromben führt, und in der vollständigen Obstruktion der Gefäßabschnitte endet (Jandke et al. 2018; Schreiber et al. 2013). Interessanterweise konnte in der Wand von geschädigten Gefäßen eine pathologische Akkumulation von Amyloid nachgewiesen werden, obwohl die SHRSP als Modell der nicht-amyloidalen CSVD gilt und keine genetischen Veränderungen im Amyloid-Stoffwechsel der Ratte bekannt ist (Jandke et al. 2018; Mustapha et al. 2019). Dies weist auf eine Amyloidakkumulation als Folge der CSVD-Pathologie in SHRSP hin, ausgelöst als Reaktion auf Hypoxie und Verletzung der BHS (Jandke et al. 2018). Elektronenmikroskopische Untersuchungen in SHRSP ergaben einen erhöhten Anteil von abnormalen Perizyten im Striatum und einen entsprechenden Trend im Kortex im Vergleich zu Wistar-Kontrollen (Held et al. 2017). In einer anderen Studie wurde eine signifikante Reduktion der Perizyten-dichte in Kortex und Hippocampus in SHRSP festgestellt (Nakazaki et al. 2019). Nach einer Infusion mit aus Knochenmark gewonnenen MSC wurde eine Erhöhung der Perizyten-dichte beobachtet, die mit verbesserter BHS-Funktion, Reduktion der Amyloid-Plaques, einer Wiederherstellung von Neuronen und einer kognitiven Verbesserung einherging (Nakazaki et al. 2019). Eine Therapie von SHRSP mit dem Phosphodiesterasehemmer Cilostazol schützte die NVE unter anderem durch einen Anstieg von proliferativen, NG2-positiven Perizyten und einer Reduktion der MMP-9-Aktivität (Omote et al. 2014). Dennoch sind die Erkenntnisse über die Rolle der Perizyten in der Pathophysiologie der CSVD aktuell noch begrenzt. Ziel dieser Arbeit ist es deswegen, inflammatorische und proliferatorische Unterschiede in Perizyten von SHRSP und einer gesunden Kontrolle zu untersuchen.

1.4 Extrazelluläre Vesikel

Extrazelluläre Vesikel (EV) sind eine Gruppe von kleinen Partikeln, die von diversen Zellen hergestellt werden und eine doppelipidschichtige Membran besitzen, jedoch über keinen Nukleus verfügen und somit nicht selbst teilungsfähig sind (Maas et al. 2017; Théry et al. 2018). Sie wirken als auto- oder parakrine Kommunikationsmittel und kontrollieren diverse zelluläre Prozesse (Maas et al. 2017). Die Partikel können anhand ihrer Größe und Biogenese unterschieden werden. Generell wird in drei Hauptgruppen unterschieden, dabei machen Exosome mit einem Durchmesser von 50 bis 100 oder 200 nm die kleinsten EV aus, es schließen sich Mikrovesikel (MV) mit einer Größe bis zu 1000 nm an, und Apoptosekörper stellen mit 1 bis 5 μm die größten EV dar (Buzas et al. 2014; Li et al. 2018b; van der Pol et al. 2012; Pocsfalvi et al. 2016). Dabei variieren die exakten Größenangaben in der Literatur, selbst die Nomenklatur ist nicht immer einheitlich. So werden Exosome in älteren Veröffentlichungen oft synonym mit dem Oberbegriff der EV benutzt. Auch in der Methodik der Isolierung und Charakterisierung gibt es große Diskrepanzen, deshalb hat die *International Society for Extracellular Vesicles* Vorschläge zur Standardisierung und Qualitätssicherung veröffentlicht (Théry et al. 2018; Lötvall et al. 2014). Obwohl die Ultrazentrifugation als Isolationsmethode am weitesten verbreitet ist und den Goldstandard darstellt, versprechen neue Techniken wie beispielsweise die Asymmetrischer-Fluss-Feldflussfraktionierung bessere Spezifität, stehen aber nicht an allen Standorten zur Verfügung (Shao et al. 2018; Théry et al. 2018). Die Messung und Charakterisierung der EV per Durchflusszytometrie ist prinzipiell möglich, aufgrund der kleinen Größe besonders der Exosomen aber limitiert und abhängig von dem verwendeten Gerät (van der Pol et al. 2018). Andere Methoden zur EV-Analyse sind beispielsweise Elektronenmikroskopie, *Western Blot* und Massenspektrometrie (Théry et al. 2018).

Während Exosome vor allem aus endosomalen Einstülpungen entstehen, welche in multivesikulären Körpern intrazellulär gespeichert, verarbeitet, und dann mithilfe von Mikrotubuli freigesetzt werden, werden Mikrovesikel durch direkte Ausstülpung der Zellmembran hergestellt (Maas et al. 2017; Słomka et al. 2018; Shao et al. 2018). Durch Liganden-Rezeptor-Interaktion, Oberflächenproteine und Übertragung ihrer Ladung via Endozytose oder Fusion der Membranen kommunizieren die EV mit den Empfängerzellen (Li et al. 2018b) (Abbildung 3).

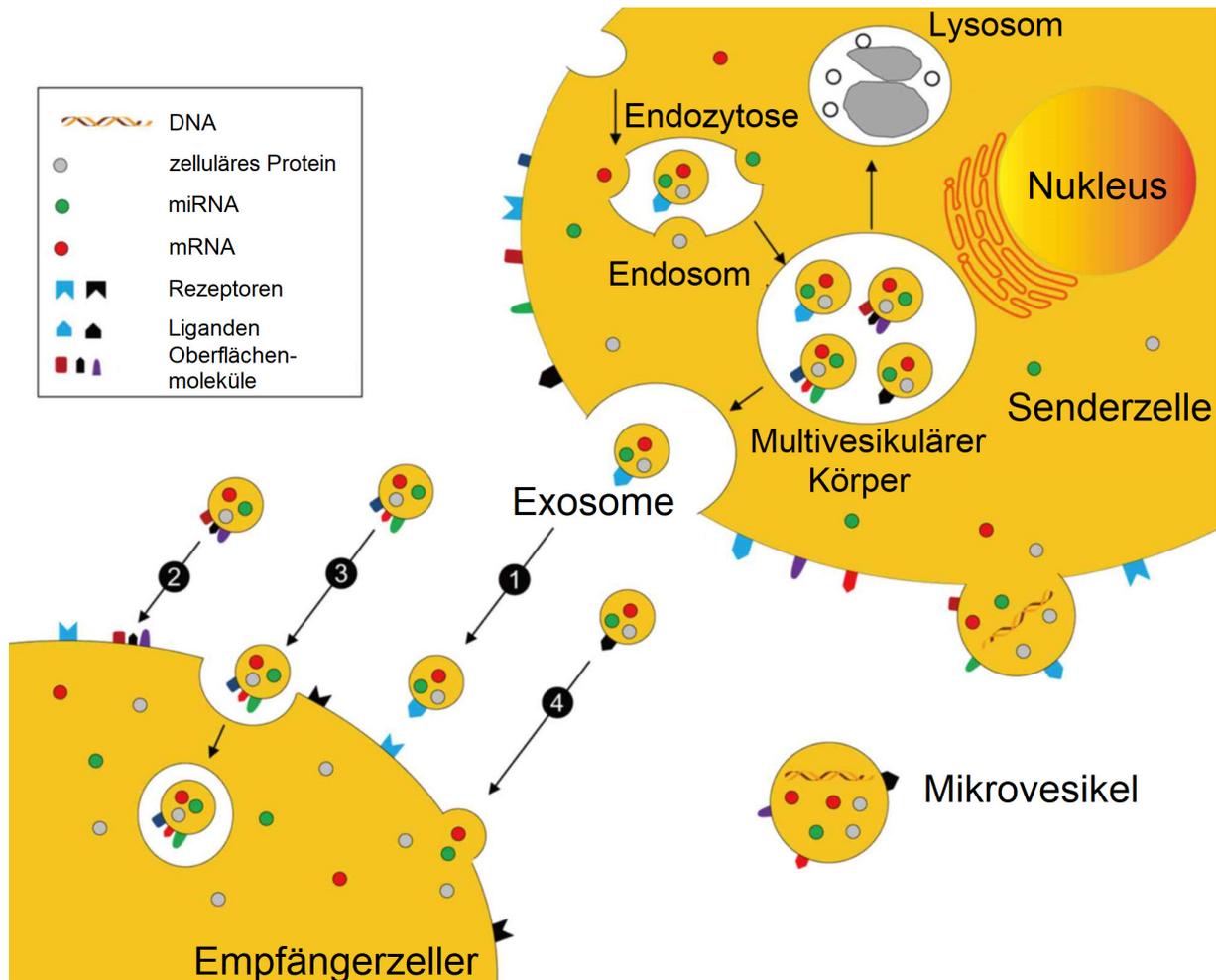


Abbildung 3: Biogenese, Inhalt und Kommunikationswege von Exosomen und Mikrovesikeln. EV können Desoxyribonukleinsäure (*Deoxyribonucleic acid*, DNA), zelluläre Proteine, miRNA (*Micro ribonucleic acid*) und mRNA, oberflächliche Liganden und Oberflächenproteine enthalten. Übernommen und übersetzt nach (Li et al. 2018b).

Bereits in den 1940er-Jahren konnte indirekt auf die Existenz von EV geschlossen werden. Blutplasma, das einer starken Zentrifugation ausgesetzt war, wies eine verzögerte Gerinnung auf, und das Plasma einer Hämophiliepatientin zeigte nach Zugabe des Sedimentes dieser Zentrifugation wieder eine normale Gerinnungszeit (Chargaff und West 1946). Obwohl die genaue Identifikation erst Jahrzehnte später mithilfe der Elektronenmikroskopie gelingen sollte, wurde hier die Grundlage für die Erforschung subzellulärer Partikel gelegt (van der Pol et al. 2012). Durch moderne Methoden konnten die EV in den letzten Jahren genauer charakterisiert werden und haben seitdem zunehmendes Interesse geweckt (Pocsfalvi et al. 2016; Théry et al. 2018; Li et al. 2018b). So wurden Funktionen der EV in Prozessen wie Entzündung, Tumorwachstum und -metastasierung und neurodegenerativen Erkrankungen aufgedeckt (Maas et al. 2017; Słomka et al. 2018; Buzas et al. 2014; Hill 2019). Gleichzeitig haben EV auch Potential als Biomarker und in der Therapie, da sie

möglicherweise in der Zukunft selbst als Behandlungsmethode oder als Transporter für andere Therapeutika genutzt werden könnten (Hill 2019; Słomka et al. 2018; Urabe et al. 2020; Wiklander et al. 2019).

Auch beim Schlaganfall spielen EV eine Rolle. Exosome aus dem Serum von Apoplexpatienten, besonders denen mit CSVD, zeigten eine erhöhte Expression diverser regulatorischer miRNA, die auch in den Exosomen von SHRSF im Vergleich zu Wistar-Kontrollen erhöht waren (van Kralingen et al. 2019). In einer MRT-Studie wurde ein Zusammenhang zwischen der Konzentration von CD14 und Cystatin C in Exosomen und vermehrten Schaden der weißen Substanz bei CSVD-Patienten festgestellt (Kanhai et al. 2014). Gleichzeitig konnte in Tiermodellen für Schlaganfall ein therapeutischer Erfolg von EV aus MSC verzeichnet werden. In Ratten, bei denen ein subkortikaler Infarkt induziert wurde, konnte 28 Tage nach intravenöser Injektion mit EV zwar kein Unterschied in der Größe der Läsion, allerdings eine funktionelle Verbesserung und vermehrtes axonales Aussprossen im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden (Otero-Ortega et al. 2017). In einem Mausmodell konnte die Infusion von MSC oder deren EV gleichermaßen die Neuronendichte und Zellproliferation sowie die funktionelle Beeinträchtigung nach Schlaganfall verbessern (Doepfner et al. 2015).

Zahlreiche Zellen sind in der Lage, EV herzustellen, und Perizyten sind hier keine Ausnahme. Perizyten, welche in einem *in-vitro*-Modell für Hypoxie stimuliert wurden, regen exosomabhängig die Wundheilung in einer Kokultur mit Endothelzellen an und ein konditioniertes Medium, das von EV befreit wurde, zeigte verlangsamte Wundheilung in der Kokultur (Mayo und Bearden 2015). Gleichzeitig nehmen Perizyten *in vitro* EV von stimulierten Endothelzellen auf und werden so zur Produktion von VEGF-B angeregt (Yamamoto et al. 2015). Die Behandlung mit EV aus einer Perizytenkultur reduziert in einem Mausmodell für Rückenmarksverletzung die Schädigung der Blut-Rückenmark-Schranke und Apoptose der betroffenen Zellen und verbessert im Verlauf die Erholung der motorischen Fähigkeiten (Yuan et al. 2019). Im geschädigten Gewebe ist durch die Therapie die Expression von MMP-2 und AQP4 reduziert und die Expression von Claudin-5 erhöht (Yuan et al. 2019). Der Großteil der Forschung zu EV hat sich in der Vergangenheit auf Exosome konzentriert und obwohl durch neuere Veröffentlichungen weitere Aspekte der Mikrovesikel aufgedeckt wurden, ist über diese noch vieles unbekannt (Tricarico et al. 2017). Auch das Wissen über von Perizyten hergestellte Mikrovesikel ist begrenzt. Es konnte gezeigt werden,

dass Perizyten in der Tat Mikrovesikel *in vitro* produzieren, die Produktion durch Gabe von PDFB-BB, aber nicht LPS, angeregt wird, und dass die Mikrovesikel nach PDGF-BB-Stimulation mit Wachstumsfaktoren wie BDNF und VEGF angereichert sind (Gaceb et al. 2018b). Nach Stimulation mit LPS sind in den Mikrovesikeln dagegen proinflammatorische Zytokine wie IL-6 oder CCL2 erhöht nachweisbar (Gaceb et al. 2018b). Somit stellen die EV eine interessante, noch nicht vollständig verstandene Art und Weise dar, mit der Perizyten mit sich selbst und anderen Zellen der NVE kommunizieren. In dieser Arbeit soll überprüft werden, wie SHRSP-Perizyten im Vergleich zu der Wistar-Kontrolle Mikrovesikel produzieren und welchen Effekt diese auf die Proliferation der Zellen haben.

1.5 Fragestellung

Die CSVD stellt eine häufige, nicht vollständig verstandene Ursache für Schlaganfall dar. Effektive Therapieansätze dieser weit verbreiteten Erkrankung stehen aktuell noch aus. Perizyten des Gehirns sind ein essentieller Bestandteil der NVE, doch das Wissen über ihre Beteiligung an der Pathophysiologie der CSVD ist lückenhaft. In letzter Zeit haben Mikrovesikel als wichtige Kommunikationsmittel und potentielle Therapeutika großes Interesse erregt. Ziel dieser Arbeit ist es, einen Beitrag zum Verständnis der Zusammenhänge dieser Themengebiete zu leisten. Dafür wurden SHRSP-Ratten, ein Tiermodell für hypertensive CSVD, im Alter von 6 und 25 Wochen untersucht.

Folgende Fragestellungen sollen beantwortet werden:

1. Gibt es Unterschiede in der Morphologie, Genexpression und Mikrovesikel-Produktion zwischen Perizyten der Wistar-Ratten und SHRSP *in vitro*?
2. Welchen Einfluss haben Mikrovesikel auf die Proliferation von Perizyten in einem Wundheilungs-Assay?
3. Unterscheiden sich Perizytenmarker und Tight-Junction-Proteine in Gehirnen von Wistar-Ratten und SHRSP in Genexpression und Immunfluoreszenz?
4. Lassen sich *ex vivo* Unterschiede von Perizyten und Endothelzellen junger und alter Wistar-Ratten und SHRSP in der Durchflusszytometrie nachweisen?

2 Material und Methoden

2.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Die verwendeten Geräte und Verbrauchsmaterialien sind den Tabellen 8 und 9 im Anhang zu entnehmen.

2.2 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien sind der Tabelle 10 im Anhang zu entnehmen.

2.3 Versuchskits

Tabelle 1 - Versuchskits

Kit	Hersteller	Katalognummer
FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit with 7-AAD	BioLegend	640922
Flow Cytometry Sub-Micron Particle Size Reference Kit	Invitrogen	F13839
LEGENDplex Rat Inflammation Panel	BioLegend	740401
peqGOLD Total RNA Kits	PEQLAB	12-6834-02
Taq PCR Master Mix Kit	Qiagen	201443
TaqMan RNA-zu-CT Einstufiges Kit	Applied Biosystems	4392653
Zombie NIR Fixable Viability Kit	BioLegend	423106

2.4 Lösungen und Medien

Tabelle 2 – Lösungen und Medien

Lösung oder Medium	Zusammensetzung
Erste Homogenisationslösung für die Perizytenkultur	DMEM/F-12, GlutaMAX supplement 10 % (v/v) 10 mg/mL Kollagenase II-Lösung 1,5 % (v/v) 1 mg/mL DNase I-Lösung
Blockpuffer für Immunfluoreszenz der Hirnschnitte	PBS 10 % (v/v) Normal Goat Serum 0,3 % (v/v) Triton X
Blockpuffer für Immunfluoreszenz der Perizytenkultur	PBS 5 % (v/v) Normal Horse Serum 2 % (w/v) BSA
DNase I-Lösung für Durchflusszytometrie	PBS 4,8 % (v/v) 10 mg/mL DNase I Lösung 1,9 % (v/v) FKS
FACS-Puffer	PBS 2 % (v/v) FKS 0,1 % (w/v) Natriumazid
Kollagenase/Dispase-Lösung für Durchflusszytometrie	PBS 3,3 % (v/v) 10 mg/mL Kollagenase/Dispase-Lösung 1,9 % (v/v) FKS

Perizytenmedium	VLE DMEM 10 % (v/v) FKS 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin 1 % (v/v) Nichtessentielle Aminosäuren
Zitratpuffer zur Antigenmaskierung	dH ₂ O 2,4 % (w/v) Tri-Natriumcitrat Dihydrat 1 % (v/v) TWEEN 20 0,35 % (w/v) Citronensäure
Zweite Homogenisationslösung für die Perizytenkultur	DMEM/F-12, GlutaMAX supplement 10 % (v/v) 10 mg/mL Kollagenase/Dispase-Lösung 0,67 % (v/v) 1 mg/mL DNase I-Lösung

2.5 Antikörper

Tabelle 3 – Antikörper für die Durchflusszytometrie

Ziel	Fluorochrom	Verdünnung	Hersteller	Katalognummer
CD11b	APC	3:100	eBioSciences	17-0112-82
CD11b/c	PE	3:100	Invitrogen	12-0110-82
CD13	BV510	1:4	BD Biosciences	740127
CD13	BV421	6:100	BD Biosciences	564354
CD31	PE-Cy7	1:20 oder 3/100	Invitrogen	25-0310-80
CD32	(Fc-Rezeptor-Block)	1:2,5	BD Biosciences	550271
CD45	PerCPCy5.5	1:20 oder 1:16	Biolegend	202220
CD86	BV421	1:4	Biolegend	105032
CD86	AF700	1:10	Biolegend	105024
Ki-67	BV605	1:20	Biolegend	652413

Tabelle 4 – Primäre Antikörper für die Immunfluoreszenz

Ziel	Klon	Wirt	Verdünnung	Hersteller	Katalognummer
CD31	390	Ratte	1:200	Invitrogen	14-0311-85
NG2	D120.43	Maus	1:200	Invitrogen	37-2700
PDGFRβ	R.140.4	Hase	1:100	Invitrogen	MA5-14851
ZO-1	R26.4C	Ratte	1:200	Invitrogen	1972330

Tabelle 5 – Sekundäre Antikörper für die Immunfluoreszenz

Ziel	Fluorochrom	Klon	Verdünnung	Hersteller	Katalognummer
Anti-Hase IgG	AF488	Polyklonal	1:500	Invitrogen	A32731
Anti-Maus IgG	AF555	Polyklonal	1:500	Abcam	Ab150118
Anti-Ratte IgG	AF647	Polyklonal	1:500	Invitrogen	A21247

2.6 Primer

Tabelle 6 – Primerkits für die Polymerase-Kettenreaktion

Protein	Gen	Spezies	Hersteller	Katalognummer
CCL-2	<i>Ccl2</i>	Ratte	Applied Biosystems	Rn00580555_m1
CD11b	<i>Itgam</i>	Ratte	Applied Biosystems	Rn00709342_m1
CD13	<i>Anpep</i>	Ratte	Applied Biosystems	Rn00578763_m1
Claudin-5	<i>Cldn5</i>	Ratte	Applied Biosystems	Rn01753146_s1
GAPDH	<i>Gapdh</i>	Ratte	Applied Biosystems	Rn01775763_g1
ICAM-1	<i>Icam1</i>	Ratte	Applied Biosystems	Rn00564227_m1
IL-6	<i>Il6</i>	Ratte	Applied Biosystems	Rn01410330_m1
Occludin	<i>Ocln</i>	Ratte	Applied Biosystems	Rn00580064_m1
PDGFR β	<i>Pdgfrb</i>	Ratte	Applied Biosystems	Rn00709573_m1
TNA- α	<i>Tnf</i>	Ratte	Applied Biosystems	Rn99999017_m1
α SMA	<i>Acta2</i>	Ratte	Applied Biosystems	Rn01759928_g1

2.7 Versuchstiere

Alle Experimente wurden in Übereinstimmung mit der deutschen Tierschutzverordnung (Stand: August 2013) für wissenschaftliche Versuchstiere durchgeführt. Die Tierversuche wurden mit der Genehmigung des Tierschutzausschusses Sachsen-Anhalts (Kennziffer der Lizenz 42502-2-1277 sowie 42502-2-1561 für die Universität Magdeburg) durchgeführt. Es wurden insgesamt 15 männliche SHRSP (Charles River Laboratories, Wilmington, Massachusetts, Vereinigte Staaten) im Alter von 6 (n = 10) und 25 Wochen (n = 5) und 15 männliche Wistar-Ratten (Charles River Laboratories, Research Models and Services, Germany GmbH, Sulzfeld, Deutschland) im Alter von 6 (n = 10) und 25 Wochen (n = 5) als Kontrollstamm verwendet. Alle Tiere wurden unter Standardbedingungen bei Raumtemperatur, Wasser und Futter (Futtermittel für Ratten und Mäuse, ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest) *ad libitum* und einem naturgemäßen Tag-Nacht-Rhythmus in Käfigen vom Typ IV (entspricht 1820 cm², 2 Ratten pro Käfig) gehalten. Um die Gesundheit der Tiere zu überprüfen, wurden sowohl die Fellbeschaffenheit als auch der grobe neurologische Status (spontane Aktivität, Koordination und Körperhaltung) täglich und ihr Gewicht wöchentlich kontrolliert. Alle Tiere waren in der Beobachtungsdauer neurologisch unauffällig.

2.8 Perizytenkulturen

Von sechs Wochen alten Wistar-Ratten ($n = 4$) und SHRSP ($n = 4$) wurden Mikrogefäße der grauen Substanz isoliert und jeweils eine reine Wistar- und SHRSP-Perizytenprimärkultur durch selektive Wachstumsbedingungen erzeugt. Das Protokoll basiert auf der Methodik von (Nakagawa et al. 2009). Die Ratten wurden durch die Inhalation von Isofluran (CP-Pharma) in Tiefschlaf versetzt und dekapitiert, die Gehirne entfernt, halbiert und durch Rollen auf Filterpapier (Macherey-Nagel) von den Meningen befreit. Weiße Substanz wurde per Skalpell (Feather) abgetragen und die verbleibende graue Substanz in kleine Teile geschnitten. Es wurde nun in einer Lösung aus *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM/F-12, Gibco), Kollagenase II (Sigma-Aldrich) und DNase I (Sigma-Aldrich) via Pipette homogenisiert und anschließend bei 37 °C und 200 Umdrehungen pro Minute (*Revolutions per minute*, rpm) für 55 Minuten inkubiert. Es wurde DMEM/F12 hinzugegeben, bei 1000 g für 8 Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen, DMEM/F12 mit 20 % (w/v) bovines Serumalbumen (BSA, Sigma-Aldrich) hinzugegeben, für 20 Minuten bei 1000 g zentrifugiert, die Myelinschicht entfernt und das Pellet gesammelt. In einer Lösung mit Kollagenase/Dispase (Roche) sowie DNase I werden die Mikrogefäße erneut per Pipette homogenisiert und dann für 35 Minuten bei 37 °C und 200 rpm inkubiert und anschließend mit DMEM/F12 bei 700 g für 6 Minuten gewaschen. Aus einem Percoll-Gradienten (33% in phosphatgepufferter Salzlösung (*Phosphate-buffered saline*, PBS, Gibco), Sigma-Aldrich) wurde die pure Mikrogefäßfraktion gesammelt, erneut mit DMEM/F12 gewaschen und auf beschichtete Zellkulturschalen transferiert. Nach etwa zwei Wochen in Kultur in Perizytenmedium (DMEM mit Glutamin (Biochrom), nichtessentielle Aminosäuren (Gibco), Penicillin-Streptomycin (Sigma-Aldrich) und fetales Kälberserum (FKS, Corning)) verdrängten Perizyten durch vermehrtes Wachstum andere Zellen, sodass nach einigen Passage eine reine Perizytenkultur entstand. Zellen wurden in Inkubatoren (Heraeus) bei 37 °C und 5 % CO₂ gelagert. Lichtmikroskopische Bilder zur Veranschaulichung wurden per Mikroskop mit dem Axiovert 25 (Zeiss) und Mobiltelefon (Apple) mit Mikroskopadapter (Aomekie) oder mit dem Axiovert 200 (Zeiss) aufgenommen. Wistar- und SHRSP-Kulturen wurden bei vollständiger Konfluenz mithilfe von Accutase (BioLegend) passagiert. Die Überprüfung der Perizytenkulturen erfolgte durch Untersuchung auf die Perizytenmarker PDGFR β und NG2 und Abwesenheit des Endothelmarkers CD31 per Immunfluoreszenz.

2.9 Immunfluoreszenz der Zellkulturen

Perizyten wuchsen auf beschichteten Deckgläsern auf 50 bis 70 % Konfluenz, wurden mit PBS gewaschen und anschließend bei Raumtemperatur mit vierprozentigen Paraformaldehyd (PFA, Thermo Scientific) für 15 Minuten fixiert. Danach wurde für 10 Minuten mit 0,3 % Triton X (Carl Roth) in PBS gewaschen und mit Pferdeserum (Vector Laboratories) und BSA (Carl Roth) für 2 Stunden geblockt. Anschließend wurden die Perizyten mit den primären Antikörpern für PDGFR β , NG2 und CD31 (alle Invitrogen) in Blockpuffer über Nacht bei 4 °C inkubiert, dann mehrmals mit PBS gewaschen und mit den sekundären Antikörpern (Abcam oder Invitrogen) für 2 Stunden bei 4 °C inkubiert. Die Deckgläser wurden erneut mehrmals mit PBS gewaschen und mithilfe eines Eindeckungsmittels mit Zellkernfärbung (Invitrogen) auf die Objektträger (Thermo Scientific) befestigt. Die Objektträger wurden bei Raumtemperatur über Nacht getrocknet. Immunfluoreszenzbilder wurden per Axiovert 100M Konfokalmikroskop (Zeiss) mit 20x Objektiv aufgenommen, wobei zwischen Aufnahmen zur besseren Vergleichbarkeit keine Einstellungen verändert wurden. Die Bedienung erfolgt mit der LSM 510 Software (Zeiss) im Expertenmodus. Bilder wurden mit der Zen lite Software (Zeiss) Version 3.2 erstellt. Die durchschnittliche Fluoreszenz der abgebildeten Zellen wurde mit dem Bildbearbeitungsprogramm ImageJ (Schneider et al. 2012) Version 1.52a ermittelt, wobei Zellen manuell ausgewählt und die absolute Fluoreszenz der jeweiligen Zelle von der Hintergrundfluoreszenz subtrahiert wurde.

2.10 Apoptose-Assay

Die Apoptose der Perizyten wurde nach Stimulation mit 50 ng/mL Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) und 1 μ g/mL Ionomycin (Standardkonzentration) für 6 oder 12 Stunden ($n = 4$ oder 5 Wells pro Kultur, Gruppe und Zeitpunkt) mit einem Apoptose-Kit (Biolegend) ermittelt. Die Zellen wurden mit Accutase gelöst und PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 100 μ L Annexin-Bindepuffer resuspendiert und mit je 5 μ L FITC-konjugierten Annexin V und 7-Aminoactinomycin (7-AAD) für 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln gefärbt. Es wurde mit Bindepuffer aufgefüllt und in dem Attune NxT Durchflusszytometer (Invitrogen) die FITC- und 7-AAD-Intensitäten in den entsprechenden Kanälen gemessen. Die Daten werden in der FlowJo Software (Becton Dickinson) Version 10 ausgewertet, indem Zellen in die Annexin V-positive, 7-AAD-positive, doppelpositive oder doppelnegative Gruppe eingeordnet werden.

2.11 Polymerase-Kettenreaktion

Es wurde quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion mit reverser Transkriptase (*Real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction*, qRT-PCR) durchgeführt, um die Genexpression in Perizytenkulturen (n = 4 Wells pro Kultur und Gruppe) und Gehirnhomogenat der 6 (n = 5 pro Rattenstamm) und 25 Wochen alten (n = 4 pro Rattenstamm) Wistar-Ratten und SHRSP zu überprüfen. Die Zellkulturen wurden 12 Stunden vor RNA-Isolation mit PMA und Ionomycin in Standardkonzentrationen stimuliert oder in normalen Perizytenmedium belassen. Die Zellen wurden anschließend mit Lysepuffer des PeqGOLD Gesamt-RNA-Kits (PEQLAB) aufgelöst und die RNA entsprechend den Anweisungen des Herstellers des Kits isoliert. Die Konzentration und Reinheit der RNA wurde mit dem NanoDrop 2000 Spektralphotometer (Thermo Scientific) kontrolliert und anschließend mit RNase-freiem destilliertem Wasser (Invitrogen) auf 30 ng/μL verdünnt und bei -80 °C gelagert.

Rechte Gehirnhemisphären der Ratten wurden mithilfe des Beadbug 6 Homogenisators (Benchmark Scientific) in Trifast-Lösung (PEQLAB) homogenisiert, RNA wiederum entsprechend den Anweisungen des Kits isoliert und ebenfalls auf 30 ng/μL verdünnt und bei -80 °C gelagert. Es wurde qRT-PCR mit den Taq PCR Master Mix (Qiagen) und TaqMan RNA-zu-CT (Applied Biosystems) Kits durchgeführt und die den untersuchten Genen entsprechenden Primer (alle Applied Biosystems) verwendet. Die Messung wurde mit dem LightCycler 96 PCR-System (Roche) und den Tabelle 7 zu entnehmenden Einstellungen durchgeführt. Die Qualitätssicherung sowie die Berechnung des *Quantification cycle* (Cq) und der relativen Expression zum Haushaltsgen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) erfolgte mit der LightCycler Software (Roche) Version 1.1.

Tabelle 7 – Einstellungen der Polymerase-Kettenreaktion

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
Reverse Transkription	48 °C	30 Minuten	1
Aktivierung	95 °C	10 Minuten	1
Denaturierung	95 °C	15 Sekunden	55
Hybridisierung und Elongation	60 °C	60 Sekunden	

2.12 Mikrovesikelisolation

Es wurde die Produktion von Mikrovesikeln der Wistar- und SHRSP-Zellkultur (n = 5 oder 6 Wells pro Kultur und Gruppe) nach zwölfstündiger Stimulation mit PMA und Ionomycin in Standardkonzentration oder in normalen Wachstumsbedingungen ermittelt. Um auszuschließen, dass gemessene Mikrovesikel bereits in dem Perizytenmedium vorhanden waren, wurde durch Ultrazentrifugation ein von EV befreites Medium hergestellt. Dafür wurde das normale Perizytenmedium erneut gefiltert und anschließend für 18 Stunden bei 110.000 g in der Discovery 90 (Sorvall) oder Optima XPN-80 (Beckman Coulter) Ultrazentrifuge zentrifugiert und der nun von Exosomen, Mikrovesikeln und Apoptosomen gereinigte Überstand als Medium für die Mikrovesikelisolation genutzt. Wistar- und SHRSP-Perizyten wurden auf 6-Well-Platten passagiert, die gleiche Zeit wachsen gelassen und bei ausreichender Konfluenz für 12 Stunden entweder mit PMA und Ionomycin in ultrazentrifugiertem Medium stimuliert oder in ultrazentrifugiertem Medium belassen. Die Mikrovesikel wurden anschließend per differenzieller Zentrifugation gesammelt, basierend auf dem Protokoll von (Pospichalova et al. 2015). Dafür wurden 1,5 von 2 mL Mediumüberstand jedes Wells zunächst von Zellen befreit und anschließend von Zelltrümmern und Apoptosomen gereinigt. Nun wurde bei 14.000 g für 70 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, und das Mikrovesikel enthaltende Pellet wurde in gefiltertem PBS resuspendiert. Zur Verbesserung der Reinheit wurde dieser Schritt wiederholt. Anschließend wurde in 200 µL gefiltertem PBS resuspendiert, wobei 100 µL jeder Probe für Kontrollen gesammelt wurden. Bei 37 °C wurde im Dunkeln erst für 20 Minuten mit 0,5 µL einer 100 µmol/L Carboxyfluoresceinsuccinimidylester-Stammlösung (CFSE, eBioscience) und anschließend für weitere 10 Minuten mit 1 µL einer 20 µg/mL FM 4-64FX-Stammlösung (Invitrogen) gefärbt. Nun wurden die Mikrovesikel im Attune NxT Durchflusszytometer in den entsprechenden Kanälen gemessen, wobei 50 µL jeder Probe verwendet und zwischen jeder Messung mit einer Bleichelösung gereinigt wurde. Ergebnisse werden mit der FlowJo Software ausgewertet. CFSE- und FM 4-64FX-positive Events mit der richtigen Größe wurden als Mikrovesikel gewertet. Die korrekten Größenfelder mit entsprechenden Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht (*Forward* und *side scatter*, FSC und SSC) wurden zunächst mit Polyesterol (Invitrogen)- und dann mit Silikapartikeln (Creative Diagnostics) ermittelt.

2.13 Wundheilungs-Assay

Mit einem Scratch-Assay wurde die Wundheilung der Perizyten *in vitro* getestet. Zellen wurden 6 Stunden vor dem Kratzen mit PMA und Ionomycin in Standardkonzentrationen stimuliert oder in normalem Perizytenmedium belassen und anschließend mit EV-befreitem oder Mikrovesikel-angereicherter Medium behandelt. Aus zuvor ultrazentrifugiertem Medium, welches anschließend für 96 Stunden zu Wistar- oder SHRSP-Perizyten in T75-Zellkulturflaschen (10 mL pro Flasche) gegeben wurde, wurden wie bereits beschrieben Mikrovesikel isoliert und in einem Viertel des ursprünglichen Volumens resuspendiert, um ein mit Mikrovesikeln angereichertes Medium zu erhalten. Wistar- und SHRSP-Perizyten wurden in 6- oder 12-Well-Platten ($n = 3$ Wells pro Kultur und Gruppe) zu 100 % Konfluenz wachsen gelassen. Die Wells wurden den Versuchsgruppen per Zufallsgenerator zugewiesen. Mit der Spitze einer 200 μ L-Pipette wurde sanft ein vertikaler Kratzer in der Mitte der Wells gemacht, anschließend die Platte um 90° gedreht und erneut ein vertikaler Kratzer gemacht, sodass in jedem Well eine kreuzförmige Wunde entstand. Das jeweilige Medium wurde entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen, und es wurde entweder ultrazentrifugiertes oder mit Mikrovesikeln angereichertes Medium hinzugegeben. Die Platten wurden mit Axiovert 200 Mikroskop mit der *ZEN 2.3 pro* Software (Zeiss) mit 10x Objektiv abgebildet, dabei wurde das Kreuz der Wunde in jedem Well aufgesucht und oberhalb davon drei Bildausschnitte entlang des Kratzers aufgenommen. Die Zellen wurden für 12 Stunden in ihrem jeweiligen Medium belassen, anschließend wurden dieselben Bildausschnitte wieder abgebildet. Der Phasenkontrast, die Vergrößerung, die Belichtungsdauer und andere Einstellungen wurden zur besseren Vergleichbarkeit gleich gelassen. Die Bilder wurden mit ImageJ und dem *Macro Wound Healing Tool* (Baecker 2012), welches die Wundfläche zwischen den Zellen ermittelt, ausgewertet. Das Erkennen dieser Fläche erfolgte zum Teil automatisch und zum Teil nach manueller Entfernung von Artefakten. Es wurde die Fläche direkt nach dem Kratzer und die Fläche nach zwölfstündigem Wachstum in Pixeln gemessen und das relative (Verkleinerung der ursprünglichen Wunde in Prozent) und absolute Wachstum (Differenz zwischen der ursprünglichen Fläche und der Fläche nach 12 Stunden in Pixeln) berechnet.

2.14 Zytokinmessung

Das Blut von Wistar- und SHRSP-Ratten im Alter von 6 (n = 8 pro Rattenstamm) und 25 Wochen (n = 4 pro Rattenstamm) wurde auf Zytokine untersucht. Dafür wurde nach der Verabreichung von Isofluran und Dekapitation der Ratte die Bauchhöhle eröffnet, aus der *Vena cava inferior* Blut entnommen, und für mindestens 30 Minuten bei Raumtemperatur koagulieren gelassen. Nach zehninütiger Zentrifugation bei 1000 g wurde das klare Serum entfernt und bei -80 °C gelagert. Die Bestimmung erfolgte mit einem Bead-basierten Kit (BioLegend) und nach Anweisungen des Herstellers. Es wurde ein Standard-Cocktail mit festen Zytokinkonzentrationen rekonstituiert und in verschiedenen Verdünnungsschritten auf die Messplatte aufgetragen. Die Serumproben wurden ebenfalls verdünnt und aufgetragen. Anschließend wurden die Mess-Beads hinzugefügt, die Platte versiegelt und über Nacht bei 4 °C geschüttelt. Am nächsten Tag wurde die Platte für 5 Minuten bei 500 g zentrifugiert, der Überstand abgegossen und die Beads gewaschen. Nun wurden die biotinylierten, sekundären Antikörper hinzugefügt und schüttelnd für eine Stunde bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde Streptavidin-Phycoerythrin hinzugegeben und schüttelnd für 30 Minuten bei 4 °C inkubiert. Es wurde ein letztes Mal gewaschen, die Beads resuspendiert und mit dem Autosampler des Attune NxT Durchflusszytometers nach korrekter Kalibrierung gemessen. Die Daten wurden mit der LEGENDPlex Data Analysis Software (BioLegend) ausgewertet. Zytokine, bei denen mehr als zwei Messwerte in einer Gruppe unter der minimal messbaren Schwelle lag, wurden nicht ausgewertet.

2.15 Immunfluoreszenz der Gehirne

Es wurden Gehirne der 6 und 25 Wochen alten Wistar-Ratten und SHRSP (n = 1 pro Rattenstamm und Alter) entfernt, koronare Schnitte hergestellt, und per Immunfluoreszenz analysiert. Die Tiere wurden durch die Inhalation von Isofluran in Tiefschlaf und Herzstillstand versetzt, der Brustkorb eröffnet und der rechte Herzvorhof punktiert. Die linke Herzkammer wurde mit einer Kanüle sondiert, und zunächst mit PBS (80 mL für die jungen und 140 mL für die alten Ratten) und anschließend vierprozentiger PFA-Lösung (40 mL für die jungen und 60 mL für die alten Ratten) perfundiert. Die Ratten wurden dekapitiert, das Gehirn entnommen und für 24 Stunden bei 4 °C in vierprozentiger PFA-Lösung fixiert. Anschließend wurde es in dreißigprozentiger Saccharose-Lösung (Carl Roth) für 2 bis 3 Tage gelagert. Die Gehirne wurden nun in Einbettungsformen (Polysciences) platziert und in *Optimal*

cutting temperature compound (OCT, Tissue-Tek) mit gekühltem 2-Methylbutan (Carl Roth) eingefroren und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Zur weiteren Verarbeitung werden die Gehirne auf $-13\text{ }^{\circ}\text{C}$ erwärmt, mit dem CryoStar NC50 (Thermo Scientific) Kryostat in $50\text{ }\mu\text{m}$ dünne koronare Schnitte geschnitten und auf Objektträger transferiert. Zur Antigendemaskierung werden diese für 30 Minuten bei $75\text{ }^{\circ}\text{C}$ in Zitratpuffer belassen. Nachdem sie für 30 Minuten bei Raumtemperatur kühlten, wurde mit einem Flüssigkeitsbarrieremarker (Carl Roth) ein Kreis um die Hirnschnitte gezogen, um Färbe- und Waschschrte zu erleichtern. Nach dreimaligen waschen mit PBS wurde zunächst für 2 Stunden geblockt (PBS mit Ziegen Serum und Triton X). Danach werden die primären Antikörper für PDGFR β , NG-2 und CD31 oder ZO-1 (alle Invitrogen) für 24 Stunden bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ in Blockpuffer inkubiert. Anschließend wurde erneut mit PBS gewaschen und für 2 Stunden bei Raumtemperatur mit den sekundären Antikörpern inkubiert. Nach einem letzten Waschschrte wurde die Flüssigkeitsbarriere entfernt, mit einem Eindeckungsmittel das Deckglas aufgebracht und anschließend über Nacht getrocknet. Die Bilder wurden per Axiovert 100M Konfokalmikroskop mit 20x Objektiv aufgenommen, wobei zwischen Aufnahmen zur besseren Vergleichbarkeit keine Einstellungen verändert wurden. Der Bildausschnitt wurde in allen Abbildungen gleich gewählt und entspricht einem der *Fissura longitudinalis cerebri* anliegenden Bereich des Neokortex der rechten Hemisphäre. Die Bedienung erfolgte mit der LSM 510 Software im Expertenmodus. Die Bilder wurden mit der Zen lite Software erstellt.

2.16 Durchflusszytometrie

Zur Charakterisierung von Perizyten und Endothelzellen wurden Kortexzellen von 6 und 25 Wochen alten Wistar-Ratten und SHRSP ($n = 4$ pro Rattenstamm und Alter) isoliert. Das Protokoll basiert auf der Methodik von (Crouch und Doetsch 2018) und wurde für Rattengehirne adaptiert. Die Tiere wurden durch die Inhalation von Isofluran in Tiefschlaf versetzt und anschließender dekapitiert, die Gehirne entnommen, halbiert und die linke Hemisphäre durch Rollen auf Filterpapier von den Meningen befreit. Der Kortex wurde per Skalpell isoliert und in zweiprozentigem FKS in PBS aufbewahrt, bis alle Kortexes zum Zerkleinern bereitstanden. Die kleingeschnittenen Stücke wurden bei 300 g und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in einer Kollagenase/Dispase-Lösung resuspendiert. Anschließend wurde bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ unter ständiger Rotation für 30 Minuten inkubiert. Nach dieser Inkubation wurde das Gewebe bei 300 g für 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand abgegossen und eine

DNase I-Lösung hinzugegeben. Mit einer 1000 µL-Pipette wurde etwa einhundertmal schnell pipettiert, um die Masse zu zerkleinern. Diese wurde auf einen Percoll-Gradienten (22 % in PBS) übertragen, mit dem Myelin und andere Verunreinigungen entfernt wurden. Die verbleibenden Zellen werden gezählt, zentrifugiert, resuspendiert und zum Färben ausplattiert. Als Kontrollen wurden ungefärbte Zellen, *Fluorescence minus one* (FMO)- und Einzelfärbungskontrollen mit Kompensationsbeads (Invitrogen) genutzt. Zunächst wurde für 15 Minuten bei 4 °C mit einem Zombie-Farbstoff (Biolegend) für die Identifikation toter Zellen und einem Fc-Rezeptor-Blocker (BD Biosciences) zur Verhinderung unspezifischer Bindungen inkubiert. Dann wurde die Fluorophor-konjugierten Antikörper gegen CD11b (eBioSciences oder Invitrogen), CD13 (BD Biosciences), BD31, BD45 und BD86 (alle Biolegend) für 30 Minuten hinzugegeben. Anschließend wurde mit FACS-Puffer gewaschen, 10 Minuten bei 400 g zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen mit vierprozentiger PFA-Lösung fixiert, bevor erneut gewaschen und in FACS-Puffer resuspendiert wurde. Am Folgetag werden die Zellen wieder gewaschen und dann mit einem Perm/Wash-Puffer (Biolegend) für 10 Minuten bei 400 g permeabilisiert, bevor bei den alten Ratten zusätzlich mit einem Antikörper gegen Ki-67 (BioLegend) für 30 Minuten intrazellulär gefärbt wurde. Nach einem letzten Waschschrift wurden die Zellen in FACS-Puffer resuspendiert und an dem Attune NxT Durchflusszytometer gemessen. Die Ergebnisse wurden mit der FlowJo Software ausgewertet.

2.17 Statistik

Die statistische Analyse und das Erstellen der Diagramme wurde mit der Prism Software (GraphPad) Version 9 durchgeführt. Alle Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler des arithmetischen Mittels (*Standard error of the mean*, SEM) dargestellt. Zur Überprüfung der Normalverteilung der Stichproben wurde der Shapiro-Wilk-Test genutzt. Statistische Signifikanz zwischen zwei Gruppen wurde mithilfe eines zweiseitigen Welch-Tests berechnet. Für mehr als zwei Gruppen wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse (Analysis of variance, ANOVA) mit anschließendem Šídák-Test für relevante Vergleiche verwendet. Ein p-Wert $\leq 0,05$ wurde als statistisch signifikant angenommen und in allen Abbildungen folgendermaßen dargestellt: * für einen p-Wert $\leq 0,05$, ** für einen p-Wert $\leq 0,01$, *** für einen p-Wert $\leq 0,001$.

3 Ergebnisse

3.1 Etablierung der primären Perizytenkulturen

Aus 6 Wochen alten Wistar-Ratten und SHRSP wurden jeweils eine primäre Wistar- und SHRSP-Perizytenkultur generiert. Dazu erfolgte die Isolation von Mikrogefäßen der kortikalen grauen Substanz, die eine typische perlenschnurartige Morphologie (Perizyten, deren Somata vom Endothel abstehen) zeigen (Abbildung 4 A). Nach einigen Tagen in Kultur sprießen die Perizyten von den Gefäßstämmen aus (Abbildung 4 B) und formten eine Zellschicht. Nach ein paar Passagen wachsen die Zellen aufgrund der bevorzugenden Kulturbedingungen zu einer reinen Perizytenkultur. Sowohl Wistar- als auch SHRSP-Perizyten zeigen einen typischen Phänotyp mit rhomboider, flacher Form (Abbildung 4 C, D). Die Wistar-Kultur wächst regelmäßig schneller als ihr SHRSP-Pendant zu vollständiger Konfluenz und muss dementsprechend früher passagiert werden. In demselben Zeitraum erreicht die Wistar-Kultur Passage 22 und die SHRSP-Kultur Passage 18, wobei die durchschnittliche Wachstumszeit bis zur Konfluenz bei SHRSP-Perizyten signifikant länger ist (Abbildung 4 E). Morphologie oder Wachstumseigenschaften veränderten sich mit zunehmender Passage nicht und die Kulturen waren frei von Kontaminationen.

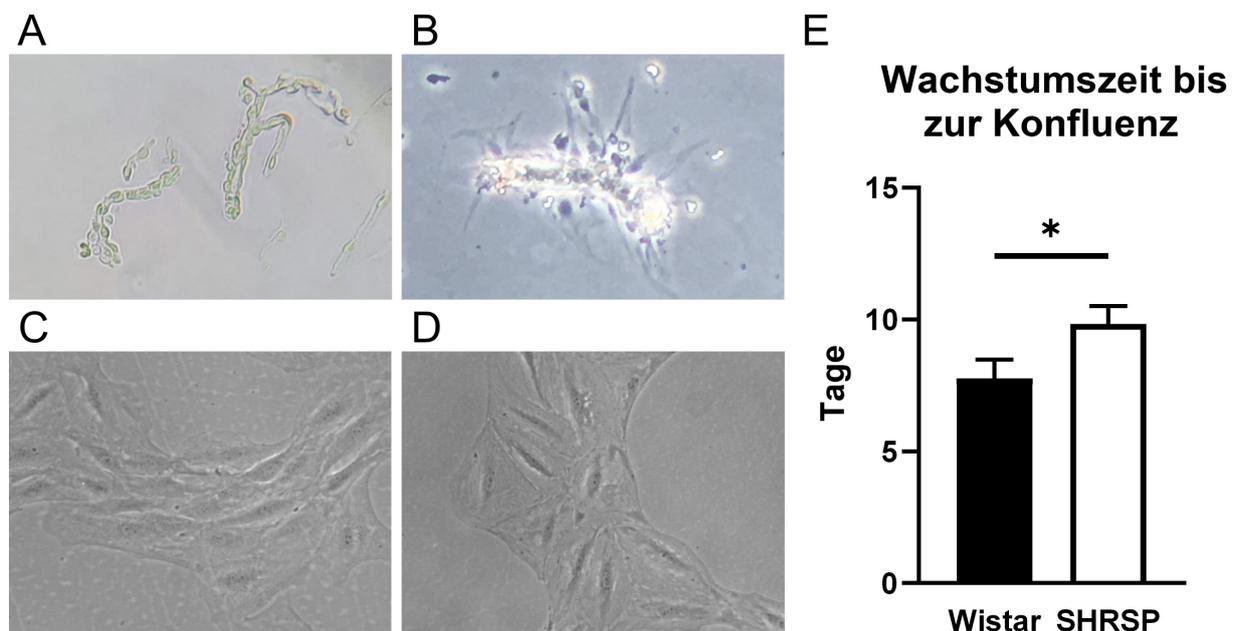


Abbildung 4: Etablierung der primären Perizytenkulturen. Die Isolierten Mikrogefäße zeigen die typische Perlenschnur-Morphologie (A). Anschließend wachsen die Perizyten aus den Gefäßstämmen heraus (B) und nach mehreren Passagen bilden sowohl die Wistar- (C) als auch die SHRSP-Kultur (D) homogene Zellschichten mit typischer Morphologie. Die Zeit zwischen den Passagen wurde ermittelt (E). Das Balkendiagramm zeigt die durchschnittliche Wachstumszeit bis zur Konfluenz in Tagen \pm SEM.

Um die Reinheit der Perizytenkulturen zu überprüfen, wurde diese per Immunfluoreszenz gefärbt und mit 20x Objektiv abgebildet. Dabei wurden die Perizytenmarker PDGFR β und NG2 sowie der Endothelmarker CD31 verwendet. Nach einigen Passagen sollten keine CD31-positiven Zellen, sondern nur noch PDGFR β - oder NG2-positive Perizyten in der Kultur existieren. Wistar- und SHRSP-Perizyten wurden zur selben Zeit nach ursprünglicher Isolation auf Objektträger isoliert und identisch gefärbt und abgebildet. Exemplarisch werden Wistar- und SHRSP-Zellen in Bereichen vergleichbarer Konfluenz abgebildet (Abbildung 5 A, B). In beiden Kulturen färben sämtliche Zellen für PDGFR β positiv, wobei sich der Marker auf der Zellmembran und perinukleär konzentriert und viele der SHRSP-Perizyten deutlich weniger intensiv erscheinen (Abbildung 5 A', B'). Bei den SHRSP-Perizyten fällt zudem eine zackig begrenzte Morphologie im Gegensatz zu den glattrandigen Perizyten der Wistar-Kultur auf (Abbildung 5 C, D). Beide Zellkulturen enthalten NG2-positive Zellen, wobei sich der Marker auf die Zellmembran konzentriert (Abbildung 5 A'', B''). Während die SHRSP-Perizyten fast uniform NG2 exprimieren, scheint es bei den Wistar-Perizyten eine NG2-positive und eine NG2-negative Subpopulation zu geben. In beiden Zellkulturen sind keine CD31-positive Endothelzellen zu sehen, sondern lediglich Artefakte des Farbstoffs (Abbildung 5 A''', B'''). Die mittleren Fluoreszenzintensitäten der Marker der abgebildeten Perizyten gegenüber dem Hintergrund wurden berechnet. Während die SHRSP-Zellen eine signifikant niedrigere Intensität für PDGFR β als die Wistar-Perizyten zeigen (Abbildung 5 E), wird eine im Durchschnitt höhere Intensität für NG2 als bei der Wistar-Kontrolle ermittelt (Abbildung 5 F). Die Intensitäten der einzelnen Zellen werden als Punkte in den Diagrammen dargestellt. Beide Kulturen zeigen eine relativ uniforme Verteilung der PDGFR β -Intensität mit wenigen Ausreißern. Im Gegensatz zu den SHRSP-Perizyten weist jedoch die Wistar-Kultur auf eine NG2-positive und eine NG2-negative Gruppe hin. Es gibt somit Unterschiede in der Expression von Perizytenmarkern zwischen den Zellkulturen.

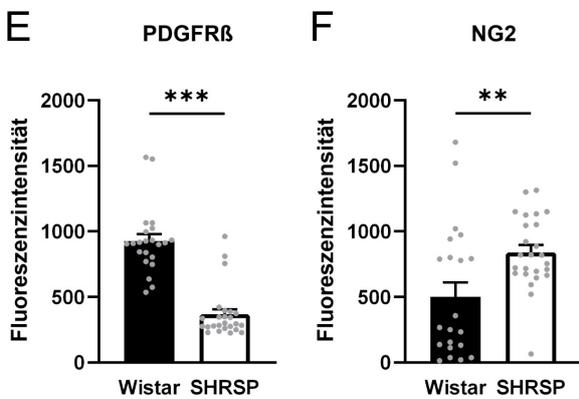
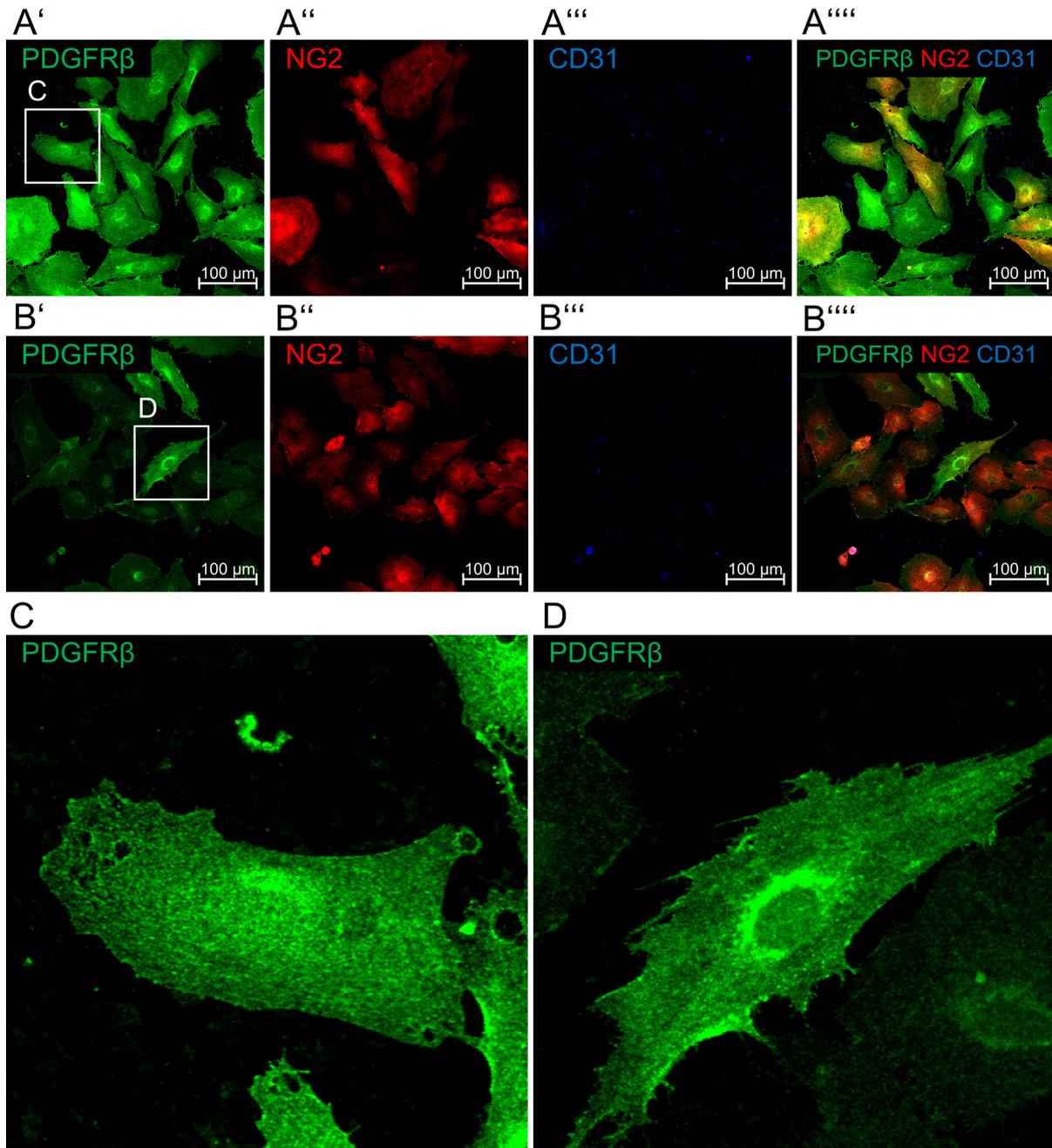


Abbildung 5: Immunfluoreszenz der Perizytenkulturen. Immunfluoreszenz der Wistar- (A) und SHRSP-Zellen (B) zeigt die Abwesenheit von CD31-positiven Zellen und Unterschiede in der Perizytenmarkerexpression. Die Vergrößerung von einzelnen Wistar- (C) und SHRSP-Perizyten (D) verdeutlicht Unterschiede in der Morphologie. Die mittlere Intensität der Perizytenmarker PDGFRβ (E) und NG2 (F) wurde ermittelt. Die Intensitäten der einzelnen Zellen sind als graue Punktwolken dargestellt. Die Balkendiagramme zeigen die mittlere Fluoreszenzintensität der Zellen ± SEM.

3.2 Apoptose der Perizytenkulturen

Perizyten wurden für 6 oder 12 Stunden mit 50 ng/mL Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) und 1 µg/mL Ionomycin stimuliert (Standardkonzentrationen) oder in normalem Perizytenmedium belassen, um zu überprüfen, ob diese Stimulation Apoptose auslöst, und ob es hier Unterschiede zwischen den Zellkulturen gibt. Anschließend wurden die Zellen gelöst und mit FITC-Annexin V und 7-Aminoactinomycin (7-AAD) gefärbt. Annexin V bindet an Phosphatidylserin, welches nur in apoptotischen Zellen an der äußeren Zellmembran zu finden ist. 7-AAD interkaliert zwischen Basenpaaren der DNA, kann allerdings nur in bereits geschädigte Zellmembranen eintreten. Gesunde Perizyten werden somit von beiden Stoffen nicht markiert. Zellen, welche positiv für Annexin V und negativ für 7-AAD färben, entsprechen Zellen im frühen Stadium der Apoptose während Zellen, die für beide Marker positiv sind, spätapoptotischen oder nekrotischen Zellen entsprechen. Zellen, die nur für 7-AAD, nicht aber Annexin V färben, sind Messfehler ohne biologische Relevanz und machten in jeder Messung weniger als 1 % der Ergebnisse aus. Die Perizyten wurden per Durchflusszytometrie gemessen, wobei erst durch FSC-A und SSC-A Ereignisse mit der Größe von Zellen ausgewählt wurden, und dann durch FSC-A und FSC-H einzelne Zellen selektiert wurden (Abbildung 7 A). Anschließend wurden die Zellen anhand ihrer Intensität von Annexin V-FITC und 7-AAD als gesunde, frühapoptotische oder spätapoptotische Zellen klassifiziert (Abbildung 7 B).

Überraschenderweise zeigen sich nach sechsständiger Stimulation deutlich mehr gesunde und dementsprechend weniger früh- und spätapoptotische SHRSP-Perizyten als in der Kontrollgruppe (Abbildung 7 C-E). Dies trifft sowohl für die stimulierten als auch nicht stimulierten Perizyten zu. Ähnliche Ergebnisse lassen sich nach zwölfständiger Behandlung nicht finden, wo es keinerlei Unterschiede zwischen den Gruppen gibt (Abbildung 7 F-H). Die Wistar-Zellen zeigen weder nach 6 noch nach 12 Stunden Unterschiede zwischen der stimulierten und unstimulierten Gruppe. Interessanterweise gibt es bei den für 6 Stunden stimulierten SHRSP-Perizyten einen höheren Anteil an gesunden Zellen (Abbildung 7 C) und einen kleineren Anteil der frühapoptotischen Zellen (Abbildung 7 D) als bei den SHRSP-Perizyten in normalen Wachstumsbedingungen. Ein ähnlicher Effekt kann nach zwölfständiger Stimulation nicht nachgewiesen werden (Abbildung 7 F, H). Insgesamt ist festzustellen, dass

weder 6 noch 12 Stunden lange Stimulation mit PMA und Ionomycin mit diesen Konzentrationen in den Perizytenkulturen Apoptose induziert.

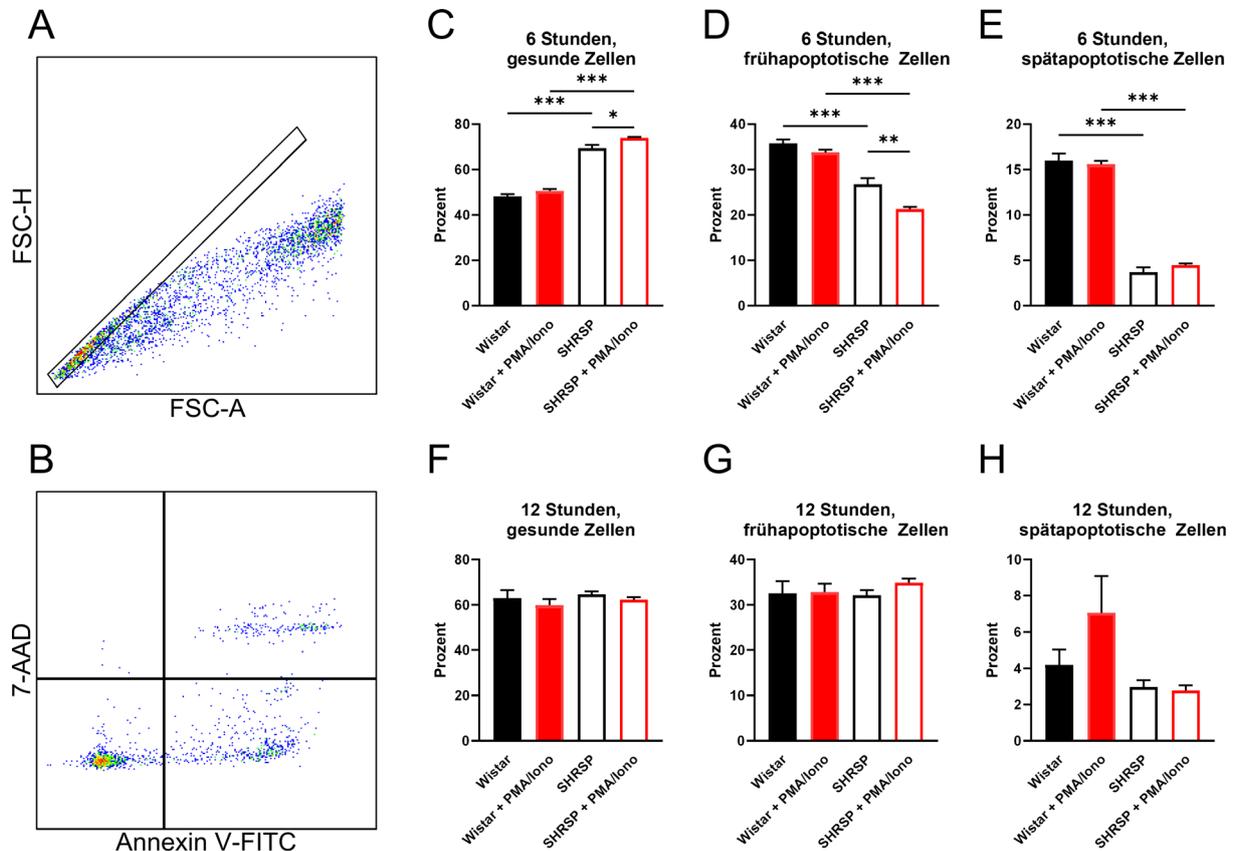


Abbildung 6: Apoptose der Perizytenkulturen. Die gemessenen Ereignisse wurden zunächst nach einzelnen Zellen sortiert (**A**) und dann anhand von FITC-Annexin V- und 7-AAD-Intensität in gesunde, frühapoptotische und spätapoptotische Zellen unterteilt (**B**). Die Abbildungen zeigen exemplarisch die Ereignisse von stimulierten Wistar-Zellen in der FlowJo Software. Wistar- und SHRSP-Perizyten wurden für 6 (**C-E**) oder 12 (**F-H**) Stunden mit PMA und Ionomycin (PMA/Iono) stimuliert oder in normalem Medium belassen, gelöst und auf Apoptose untersucht. Die Balkendiagramme zeigen den mittleren Anteil der entsprechenden Zellpopulation \pm SEM.

3.3 Genexpression der Perizytenkulturen

Perizyten der Wistar- und SHRSP-Kulturen für 12 Stunden entweder mit PMA und Ionomycin in Standardkonzentrationen stimuliert oder in normalem Perizytenmedium belassen. Um die Genexpression typischer Perizytenmarker zu vergleichen, wurde anschließend die RNA isoliert und per qRT-PCR analysiert. In Ruhe zeigt sich eine signifikant niedrigere Expression von PDGFR β in den SHRSP-Perizyten (Abbildung 6 A). Nach Stimulation der Wistar-Zellen sinkt die Expression im Gegensatz zu den SHRSP-Perizyten jedoch signifikant, sodass kein Unterschied zwischen den stimulierten Kulturen festzustellen ist. Der Perizytenmarker CD13 zeigt ein ähnliches Verhalten (Abbildung 6 B). In Ruhe ist die Expression von CD13 in der SHRSP-Kultur signifikant niedriger als in der Wistar-Kontrolle, fällt aber im Gegensatz zur Wistar-Gruppe nach Stimulation nicht ab und unterscheidet sich nun erneut nicht von den stimulierten Wistar-Zellen. Die Expression des Perizytenmarkers α SMA der SHRSP-Zellen ist in Ruhe ebenfalls geringer als die Kontrolle, und ist hier in beiden Gruppen nach Stimulation reduziert (Abbildung 6 C). Die SHRSP-Perizyten zeigen allerdings eine kleinere Reduktion, sodass die Expression von α SMA nach Stimulation zwischen den Kulturen nicht signifikant unterschiedlich ist. Diese Ergebnisse suggerieren eine verminderte Expression der Perizytenmarker der SHRSP-Zellen in Ruhe, jedoch eine erhöhte Resilienz gegenüber der PMA/Ionomycin-Stimulation im Vergleich zur Kontrolle.

Um zu testen, ob Perizyten zu der Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-6 und CCL2 oder zu einer Veränderung des Phänotyps durch Expression des Mikroglia markers CD11b (Integrin α -M, ITGAM) angeregt werden können, wurden diese Genexpressionen ebenfalls gemessen. In Ruhe ist die Genexpression von IL-6 der SHRSP-Perizyten niedriger als die der Kontrolle, sinkt aber im Gegensatz zu dieser nach Stimulation nicht und ist damit nun höher als die der Wistar-Zellen (Abbildung 6 D). Sowohl in Ruhe als auch nach Stimulation produzieren die SHRSP-Zellen mehr CCL2-mRNA (Abbildung 6 E). In Ruhe ist die Expression des Mikroglia markers CD11b in beiden Kulturen sehr gering, was die Reinheit der Perizytenkultur unterstreicht (Abbildung 6 F). Nach der Stimulation mit PMA und Ionomycin exprimieren die SHRSP-Perizyten mehr CD11b, wobei es keinen signifikanten Unterschied zur stimulierten Kontrollgruppe gibt.

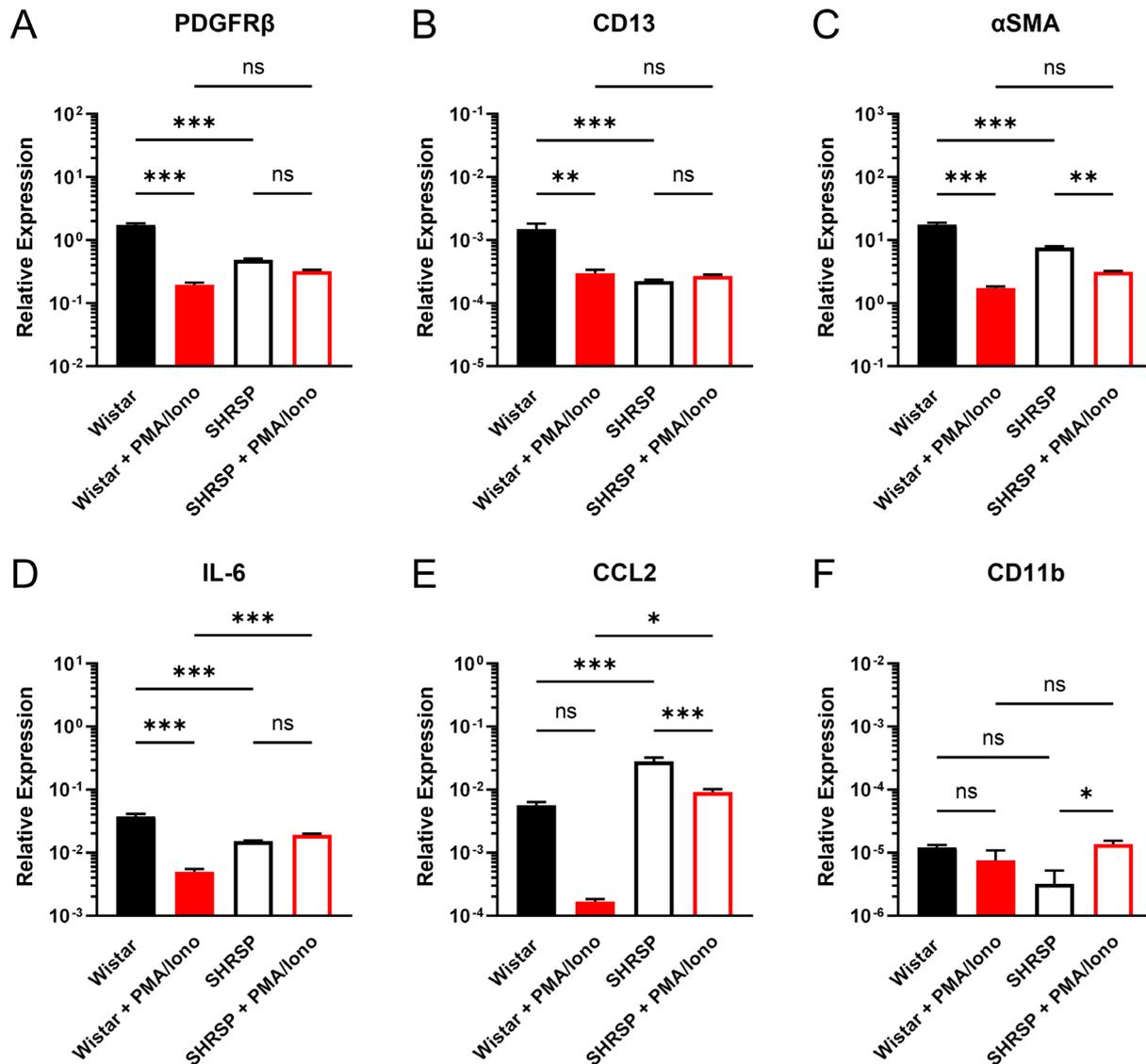


Abbildung 7: Genexpression der Perizytenkulturen. Wistar- und SHRSP-Perizyten wurden für 12 Stunden mit PMA und Ionomycin (PMA/Iono) stimuliert oder in normalem Medium belassen. Die Balkendiagramme zeigen die per PCR ermittelte mittlere Genexpression von PDGFRβ (A), CD13 (B), αSMA (C), IL-6 (D), CCL2 (E) und CD11b (F) in Relation zum Haushaltsgen GAPDH ± SEM.

3.4 Produktion von Mikrovesikeln in den Perizytenkulturen

Um die Mikrovesikel-Produktion von Wistar- und SHRSP-Perizyten *in vitro* zu überprüfen, wurden diese isoliert, gefärbt und per Durchflusszytometrie gemessen. Die Zellen wurden dafür in zuvor durch Ultrazentrifugation von EV befreitem Medium belassen. Nach 12 Stunden wurde der Überstand entfernt, durch differenzielle Zentrifugation wurden Mikrovesikel isoliert, und anschließend mit Carboxyfluoresceinsuccinimidylester (CFSE) und FM 4-64FX-Farbstoff gefärbt. CFSE wird durch in Zellen und Mikrovesikeln vorkommende Esterasen gespalten und erst

dann fluoreszent, während FM 4-64FX durch Bindung mit Membranen fluoreszent wird. Ereignisse, die im Durchflusszytometer positiv für CFSE und FM 4-64FX waren, werden als potentielle EV gewertet. Zunächst wird als Kontrolle ultrazentrifugiertes Medium analysiert (Abbildung 8 A). Dieses enthält sehr wenige doppelt positive Ereignisse, was zeigt, dass das Medium erfolgreich von EV befreit wurde und für die Isolation von Perizyten-Mikrovesikeln geeignet ist. Exemplarisch wird das Ergebnis einer Mikrovesikelisolation von Wistar-Perizyten gezeigt, die eine große Anzahl doppelt positiver Ereignisse demonstriert (Abbildung 8 B). Um als Mikrovesikel zu gelten, muss das gemessene Partikel allerdings eine Größe von unter 1000nm besitzen. Zunächst wurde mit Polyesterol-Beads versucht, das korrekte Größenfeld einzustellen. Das dadurch erzeugte Feld stellte sich jedoch als relativ groß und ungenau zur Eingrenzung der potentiellen EV dar (Abbildung 8 C). Tatsächlich hat Polyesterol einen höheren Brechungsindex als biologische Vesikel und erzeugt somit deutlich höhere FSC- und SSC-Werte als Mikrovesikel vergleichbarer Größe (Parida et al. 2015). Deswegen wurden nun Silikapartikel genutzt, welche einen ähnlichen Brechungsindex wie Mikrovesikel aufweisen und deshalb besser die korrekte Größe abbilden können. Weiterhin wurden statt den für Zellen üblichen Parametern FSC-A und SSC-A die für kleine Objekte akkurateren Parameter FSC-H und SSC-H genutzt. So konnte nun ein präziseres Größenfeld etabliert werden, welches einem Durchmesser zwischen 300 und 1000 nm entspricht (Abbildung 8 D). CFSE- und FM 4-64FX-positive Ereignisse in diesem Größenfeld wurden als Mikrovesikel gewertet.

Nun wurden Wistar- oder SHRSP-Perizyten für die gleiche Zeit wachsen gelassen und anschließend für 12 Stunden entweder in ultrazentrifugiertem Medium belassen oder in ultrazentrifugiertem Medium mit PMA und Ionomycin in Standardkonzentrationen stimuliert. Anschließend wurde der Mediumüberstand entfernt und daraus Mikrovesikel isoliert, gemessen und die Konzentration im Medium berechnet (Abbildung 8 E). Es zeigt sich, dass sowohl Wistar- als auch SHRSP-Perizyten in Ruhe Mikrovesikel produzieren. Sowohl in Ruhe als auch nach Stimulation produzieren die SHRSP-Perizyten jedoch signifikant weniger Mikrovesikel als die Kontrolle. Durch die Stimulation mit PMA und Ionomycin wurden Wistar-Zellen zu vermehrter Produktion von Mikrovesikel angeregt, bei den SHRSP-Zellen ist der Unterschied nicht signifikant.

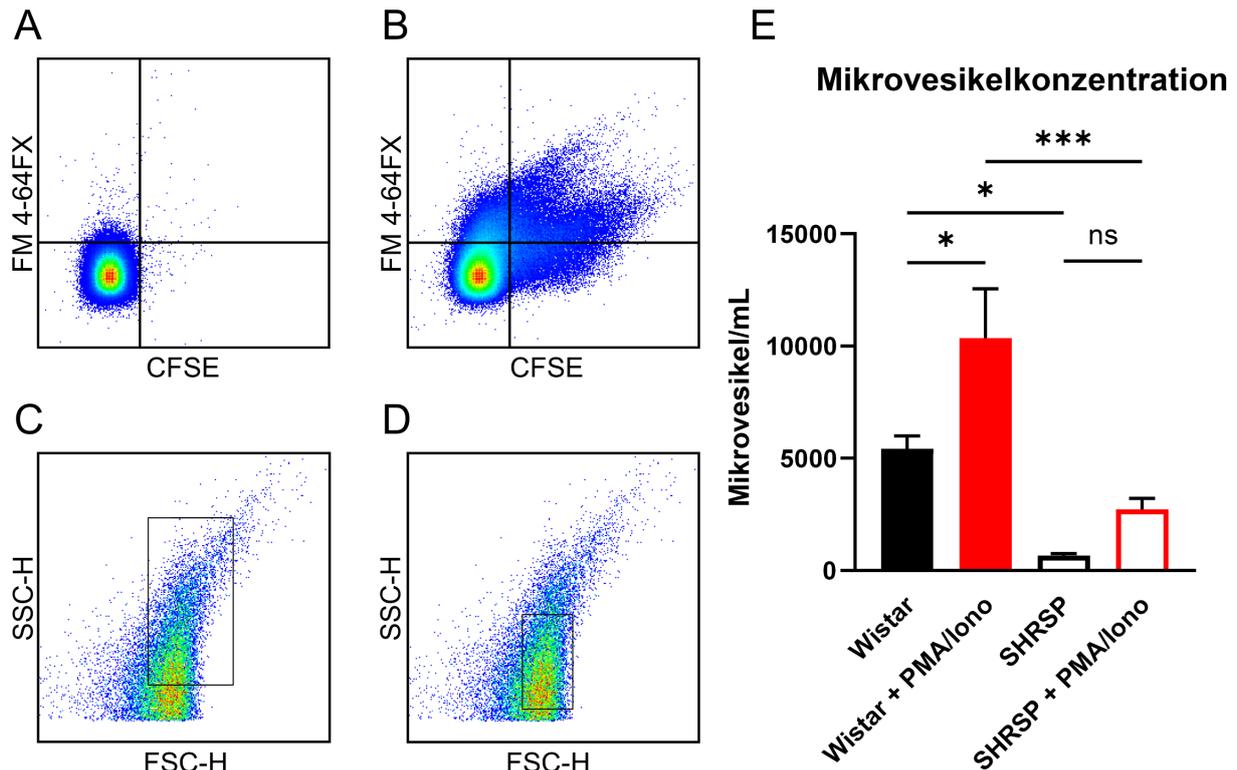


Abbildung 8: Produktion von Mikrovesikeln in den Perizytenkulturen. Exemplarisch werden für CFSE und FM 4-64 doppelt positive Ereignisse des ultrazentrifugierten Mediums (A) und einer Mikrovesikelisolation aus der Wistar-Kultur (B) gezeigt. Die von Polysterol- (C) und Silikapartikeln (D) generierten Größenfelder werden auf die doppelt positiven Ereignisse dieser exemplarischen Mikrovesikelisolation angewandt. Wistar- und SHRSP-Perizyten wurden für 12 Stunden mit PMA und Ionomycin (PMA/Iono) in ultrazentrifugiertem Medium stimuliert oder in ultrazentrifugiertem Medium belassen. Aus dem Mediumüberstand werden Mikrovesikel isoliert und deren Konzentration im Medium berechnet (E). Das Balkendiagramm zeigt die Konzentration der Mikrovesikel pro Milliliter Medium \pm SEM.

3.5 Wundheilungs-Assays der Perizytenkulturen

Um die Wundheilung der Wistar- und SHRSP-Perizyten *in vitro* zu beurteilen, wurden Scratch-Assays durchgeführt (Abbildung 9 A). Die Zellen wurden dafür bis zur vollständigen Konfluenz wachsen gelassen und 6 Stunden vor dem Kratzen entweder in normalem Medium belassen oder mit PMA und Ionomycin in Standardkonzentrationen stimuliert. Die Wunde wird anschließend in der Zellschicht abgebildet (Abbildung 9 B), die Zellen gewaschen und für 12 Stunden entweder in von EV gereinigtem oder mit Mikrovesikeln angereichertem Medium belassen. Die Mikrovesikel stammten dabei jeweils aus der entsprechenden Zellkultur. Nach der Wachstumszeit wurden dieselben Stellen wieder aufgesucht und erneut abgebildet (Abbildung 9 C). Es wurde die Wundfläche zwischen den Zellen vor und nach dem zwölfstündigen Wachstum ermittelt.

Die ursprüngliche Wundfläche ist abhängig von der Genauigkeit und Stärke des Kratzens und sollte in allen Wells, unabhängig von der experimentellen Gruppe, vergleichbar groß sein (Abbildung 9 D, G). Um trotzdem Abweichungen in der ursprünglichen Wundfläche zu kompensieren, wurde nicht nur das relative Wachstum der Zellen, sondern auch die absolute Verkleinerung der Wunde, welche weniger von der Größe des ursprünglichen Kratzers abhängig ist, berechnet.

Bei den Wistar-Zellen gab es wie erwartet keinen Unterschied bezüglich der Scratch-Fläche zwischen den einzelnen Gruppen (Abbildung 9 D). Nach 12 Stunden zeigte sich in allen Gruppen Wachstum, wobei die vorrausgehende Stimulation mit PMA und Ionomycin diesen signifikant reduziert (Abbildung 9 E). Interessanterweise bewirkte das mit Mikrovesikeln angereicherte Medium sowohl in den ruhenden als auch in den zuvor stimulierten Wistar-Perizyten signifikant erhöhte Wundheilung. Die Berechnung des relativen Wachstums zeigt das gleiche Ergebnis, da die ursprüngliche Wundfläche in den Wistar-Zellen sehr ähnlich war (Abbildung 9 F).

Überraschenderweise gab es bei SHRSP-Perizyten in den Wells, die später das mit Mikrovesikeln angereicherte Medium erhielten, einen Trend zu einer kleineren Wundfläche (Abbildung 9 G). Zwischen den vorher stimulierten und nicht stimulierten Gruppen gab es keinen entsprechenden Trend. Wiederum führt eine vorherige Stimulation mit PMA und Ionomycin zu einer Reduktion der absoluten Wundheilung (Abbildung 9 H). Hier hat das mit SHRSP- Mikrovesikeln angereicherte Medium weder bei den unstimulierten noch bei den stimulierten Zellen einen positiven Effekt auf die Wundheilung, diese Gruppen tendieren tatsächlich zu weniger Wachstum. Aufgrund der Varianz der ursprünglichen Wundflächen lässt sich solch ein Trend im relativen Wachstum nicht wiederfinden (Abbildung 9 I). Zusammenfassend ist festzustellen, dass sechsstündige Stimulation mit PMA und Ionomycin in diesen Konzentrationen bei beiden Kulturen die Wundheilung einschränkt. Des Weiteren haben Wistar-Mikrovesikel einen positiven Effekt auf das Wachstum der Wistar-Perizyten, während SHRSP- Mikrovesikel in diesem Versuch keinen signifikanten Effekt auf das Wachstum der SHRSP-Zellen zeigen.

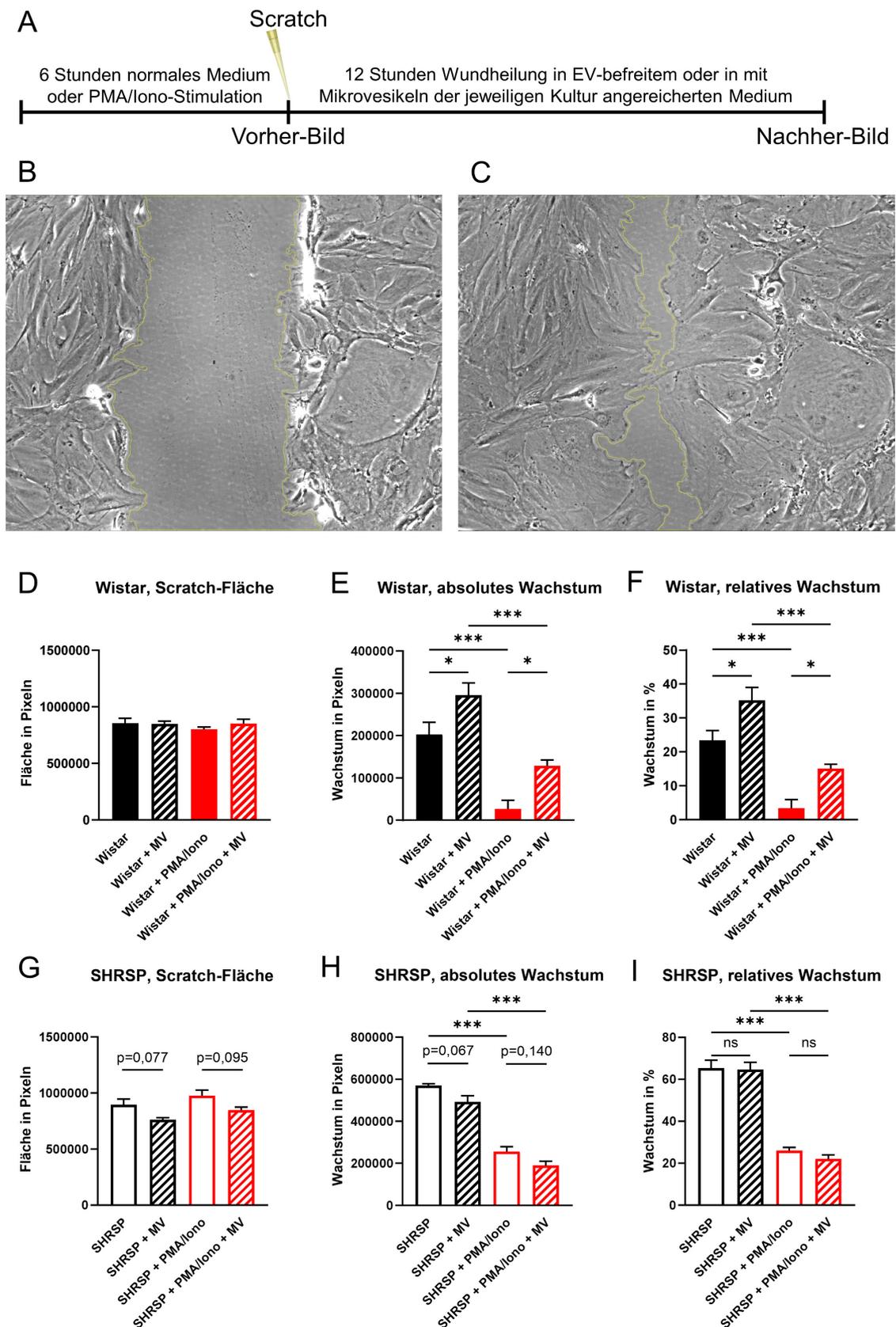


Abbildung 9: Wundheilungs-Assays der Perizytenkulturen. Der schematische Versuchsaufbau (A) und exemplarische Wundflächen (gelb begrenzt) von SHRSP-Perizyten vor (B) und nach (C) zwölfstündigen Wachstum werden gezeigt. Die Fläche des ursprünglich zugefügten Kratzers (D, G) und des absoluten (E, H) sowie relativen Wachstums (F, I) der Wistar- und SHRSP-Zellen wurde bestimmt. Die Balkendiagramme zeigen die ursprüngliche Scratch-Fläche oder das absolute Wachstum in Pixeln beziehungsweise das relative Wachstum in Prozent \pm SEM.

3.6 Genexpression der Rattengehirne

Um die Expression von Perizytenmarkern und anderen relevanten Genen zu überprüfen, wurden Gehirnhemisphären der 6 (junge Ratten) und 25 Wochen alten (alte Ratten) Wistar-Ratten und SHRSP homogenisiert, RNA isoliert und qRT-PCR durchgeführt. Junge SHRSP unterscheiden sich nicht von der Kontrolle in ihrer Expression von PDGFR β (Abbildung 10 A). Während die alten Wistar-Ratten aber einen Trend zu höherer Expression des Perizytenmarkers zeigen, ist er in den alten SHRSP signifikant niedriger exprimiert. Somit zeigen die alten SHRSP im Vergleich zu den alten Wistar-Ratten eine niedrigere Expression von PDGFR β . Bei CD13 gibt es ähnliche Ergebnisse, hier ist die Expression in den jungen SHRSP noch signifikant höher als in der Kontrollgruppe (Abbildung 10 B). In den alten SHRSP ist sie jedoch reduziert und damit erneut kleiner als bei den gleichaltrigen Wistar-Ratten.

Die Untersuchung des Mikrogliamarkers CD11b ergibt eine höhere Expression in den jungen SHRSP als in der Kontrollgruppe, welche jedoch mit zunehmendem Alter abnimmt (Abbildung 10 C). Die alten Wistar-Ratten zeigen eine signifikant höhere Expression im Vergleich zu den jungen Wistar-Ratten und den alten SHRSP. Um die Integrität der BHS zu überprüfen, werden die Tight-Junction-Proteinen Claudin-5 und Occludin untersucht. Es gab es keinen Unterschied zwischen den jungen SHRSP und Wistar-Ratten (Abbildung 10 D, E). Während in der Kontrollgruppe jedoch mit zunehmendem Alter die Expression zunimmt, gibt es bei den alten SHRSP bei Claudin-5 keinen Unterschied und bei Occludin sogar einen Trend zu niedriger Expression im Vergleich zu den jungen Tieren. Beide sind in den alten SHRSP signifikant niedriger exprimiert als in den gleichaltrigen Wistar-Ratten, was auf eine mögliche Störung der BHS hinweist.

Das Zelladhäsionsmolekül ICAM-1 wurde ebenfalls analysiert und zeigt bei den jungen SHRSP einen Trend zu höherer Expression im Vergleich zu den Wistar-Ratten (Abbildung 10 F). Die Kontrollgruppe zeigt allerdings im Alter eine vermehrte Expression, wohingegen diese bei den alten SHRSP abnimmt und nun kleiner als in der alten Kontrollgruppe ist. Der proinflammatorische TNF- α ist zwischen jungen Wistar-Ratten und SHRSP sowie jungen und alten Wistar-Ratten nicht signifikant unterschiedlich (Abbildung 10 G). Seine Genexpression nimmt in den alten SHRSP allerdings ab und ist deswegen signifikant kleiner als bei den alten Wistar-Ratten. Das ebenfalls proinflammatorisch wirkende Chemokin CCL2 zeigt auch keinen Unterschied

zwischen den jungen Rattengruppen (Abbildung 10 H). Während bei den SHRSP im zunehmenden Alter kein Unterschied festzustellen ist, nimmt die Expression in der alten Wistar-Kontrolle zu und ist signifikant höher als die der gleichaltrigen SHRSP.

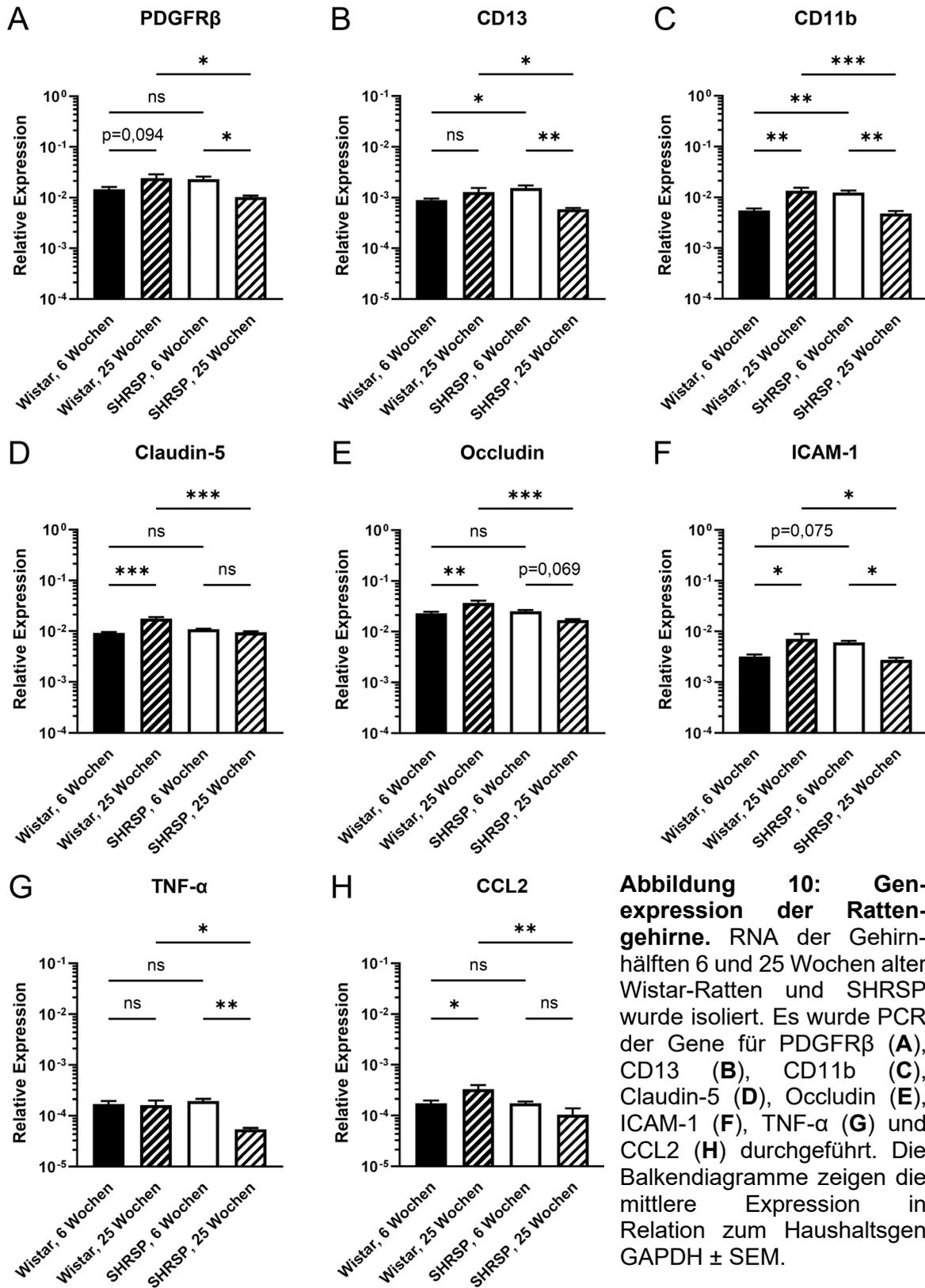


Abbildung 10: Genexpression der Rattengehirne. RNA der Gehirnhälften 6 und 25 Wochen alter Wistar-Ratten und SHRSP wurde isoliert. Es wurde PCR der Gene für PDGFR β (A), CD13 (B), CD11b (C), Claudin-5 (D), Occludin (E), ICAM-1 (F), TNF- α (G) und CCL2 (H) durchgeführt. Die Balkendiagramme zeigen die mittlere Expression in Relation zum Haushaltsgen GAPDH \pm SEM.

3.7 Zytokinkonzentrationen der Rattenserum

Um systemische Aspekte der Inflammation in Wistar-Ratten und SHRSP zu vergleichen, wurde Blut der 6 oder 25 Wochen alten Tiere entnommen, das Serum isoliert und die Konzentration von Zytokinen mittels eines Bead-basierten Assays bestimmt. Junge Wistar-Ratten und SHRSP zeigen keinen signifikanten Unterschied in der Konzentration des immunmodulatorischen Glykoproteins IFN γ (Abbildung 11 A). Im Gegensatz zu den SHRSP zeigen die 25 Wochen alten Wistar-Ratten eine Reduktion, sodass die Konzentration bei den alten SHRSP signifikant höher als die der Kontrolle ist. Bei dem proinflammatorischen TNF- α gibt es keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen (Abbildung 11 B). Das Chemokin CXCL1 zeigt keinen Unterschied zwischen den jungen Versuchsgruppen (Abbildung 11 C). Bei den alten SHRSP nahm die Konzentration jedoch zu und war höher als in der entsprechenden Wistar-Kontrolle. Das ebenfalls proinflammatorische CCL2 zeigt keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen (Abbildung 11 D). IL-10, ein vor allem antiinflammatorisch wirkendes Zytokin, ist im Serum der SHRSP im Alter von 25 Wochen höher konzentriert als bei den Wistar-Ratten (Abbildung 11 E). Im Serum der jungen Wistar-Ratten und SHRSP gibt es keinen Unterschied in der IL-10-Konzentration. Für die proinflammatorisch geltenden IL-1 α , IL-1 β , IL-12p70 und IL-17A können keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen festgestellt werden (Abbildung 11 F, G, H, I). Lediglich bei IL-12p70, dem aktiven Heterodimer von Interleukin 12, findet sich ein Trend zu höherer Konzentration im Serum der 25 Wochen alten SHRSP im Vergleich zur gleichaltrigen Wistar-Gruppe (Abbildung 11 H). Zusammengefasst gibt es also Unterschiede bei manchen, aber nicht allen untersuchten Zytokinen, besonders im Vergleich der 25 Wochen alten SHRSP mit der gleichaltrigen Kontrollgruppe.

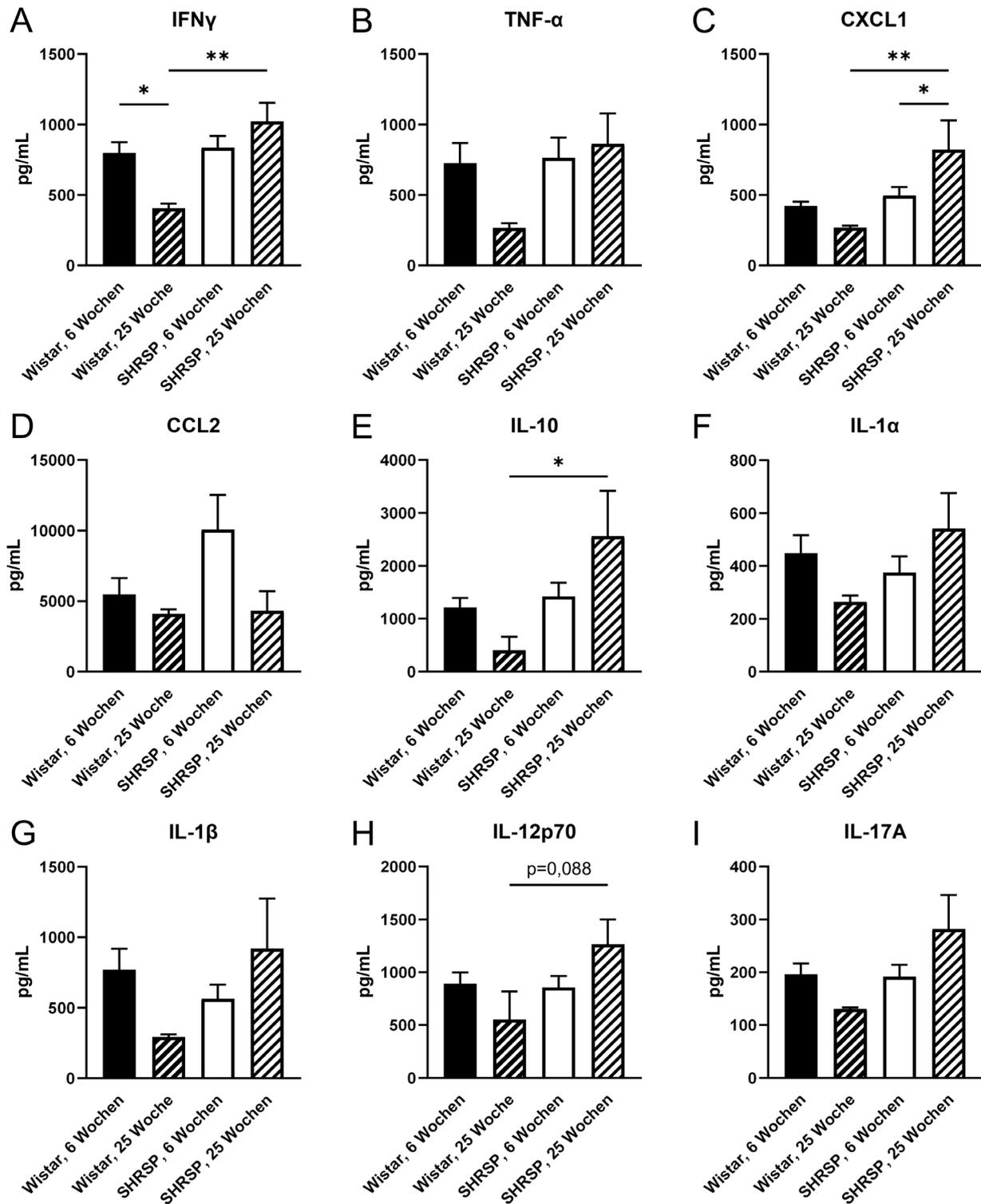


Abbildung 11: Zytokinkonzentrationen der Rattenserum. Per Bead-basierten Assay wurde die Konzentration von IFN γ (A), TNF- α (B), CXCL1 (C), CCL2 (D), IL-10 (E), IL-1 α (F), IL-1 β (G), IL-12p70 (H) und IL-17A (I) im Serum 6 und 25 Wochen alter Wistar-Ratten und SHRSP bestimmt. Die Balkendiagramme zeigen die ermittelte Konzentration in pg/mL \pm SEM.

3.8 Immunfluoreszenz der Hirnschnitte

Um die Struktur der Gehirngefäße abzubilden, wurden koronare Kortexschnitte der 6 und 25 Wochen alten Wistar-Ratten und SHRSP angefertigt und per Immunfluoreszenz für die Perizytenmarker PDGFR β und NG2 sowie den Endothelmarker CD31 oder das Tight-Junction-Protein ZO-1 gefärbt und mit 20x Objektiv abgebildet. Exemplarisch ist in einem Schnitt der jungen Wistar-Ratten die typische Morphologie der Kapillare zu sehen, wobei die Perizyten somata von dem schlanken Endothel abstehen (Abbildung 12 A). Ähnlich wie in der Perizytenkultur zeigen sich dabei NG2-negative und NG2-positive Perizyten (Abbildung 12 B, C). Interessanterweise gibt es viele Zellen, die positiv für NG2 färben und eine stark verzweigte Form haben, allerdings nicht in Kontakt mit dem Gefäßsystem stehen (Abbildung 12 D). Obwohl Perizyten prinzipiell in der Lage sind, sich von dem Endothel zu lösen, scheint dies hier aufgrund der Menge und Morphologie der NG2-positiven Zellen unwahrscheinlich, zumal keine einzige dieser Zellen für PDGFR β positiv färbt. Somit liegt es nah, dass es sich bei diesen Zellen nicht um Perizyten handelt. Visuell wurden in den Färbungen mit PDGFR β , NG2 und CD31 keine Unterschiede zwischen den 6 und 25 Wochen alten Wistar- und SHRSP-Schnitten festgestellt (Daten nicht gezeigt).

Die Färbungsmuster des Tight-Junction-Proteins ZO-1 entspricht dem Verlauf der Gefäße, und wurde genutzt, um Rückschlüsse auf die BHS zu ziehen (Abbildung 13). In den abgebildeten Kortexbereichen fällt auf, dass die 6 und 25 Wochen alten SHRSP (Abbildung 13 C, D) eine niedrigere Dichte an ZO-1-positiven Gefäßen zeigen als die gleichaltrigen Wistar-Kontrollen (Abbildung 13 A, B). Das Signal der alten Wistar-Ratten wirkt stärker als das der jungen Tiere, bei den SHRSP ist visuell kein entsprechender Unterschied festzustellen. Dies deutet auf eine mögliche Schädigung der BHS in den 25 Wochen alten SHRSP hin.

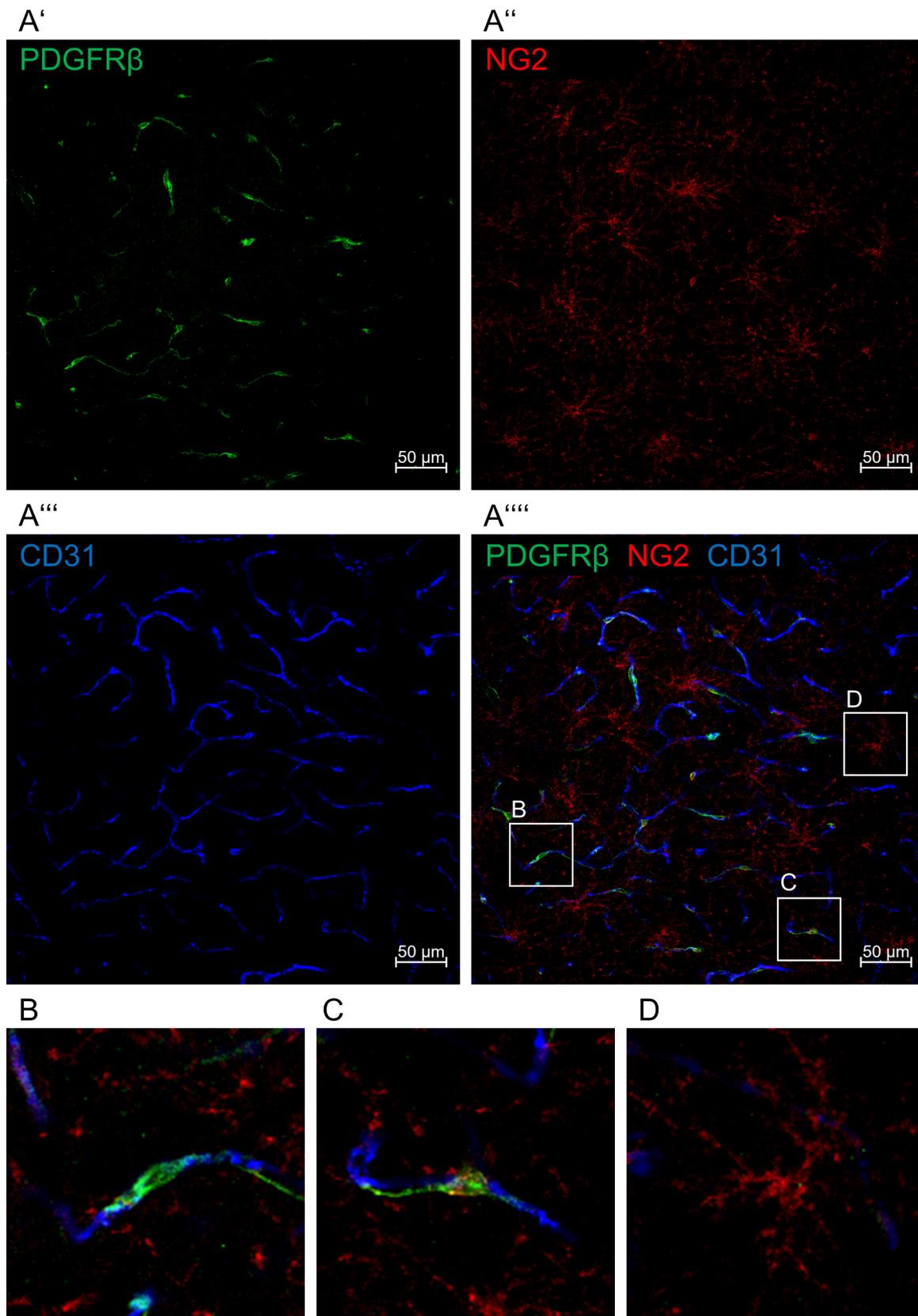


Abbildung 12: Immunfluoreszenz der Hirnschnitte. Exemplarisch wird ein Kortexchnitt der 6 Wochen alten Wistar-Ratten gezeigt, der für die Perizytenmarker PDGFR β und NG2 sowie den Endothelmarker CD31 gefärbt wurde. Gut erkennbar ist das System kleinster Gefäße mit angelagerten Perizyten (**A**). Dabei gibt es sowohl NG2-negative (**B**) als auch NG2-positive Perizyten (**C**). Außerdem fallen stark verzweigte, von dem Gefäßverlauf unabhängige NG2-Zellen auf (**D**).

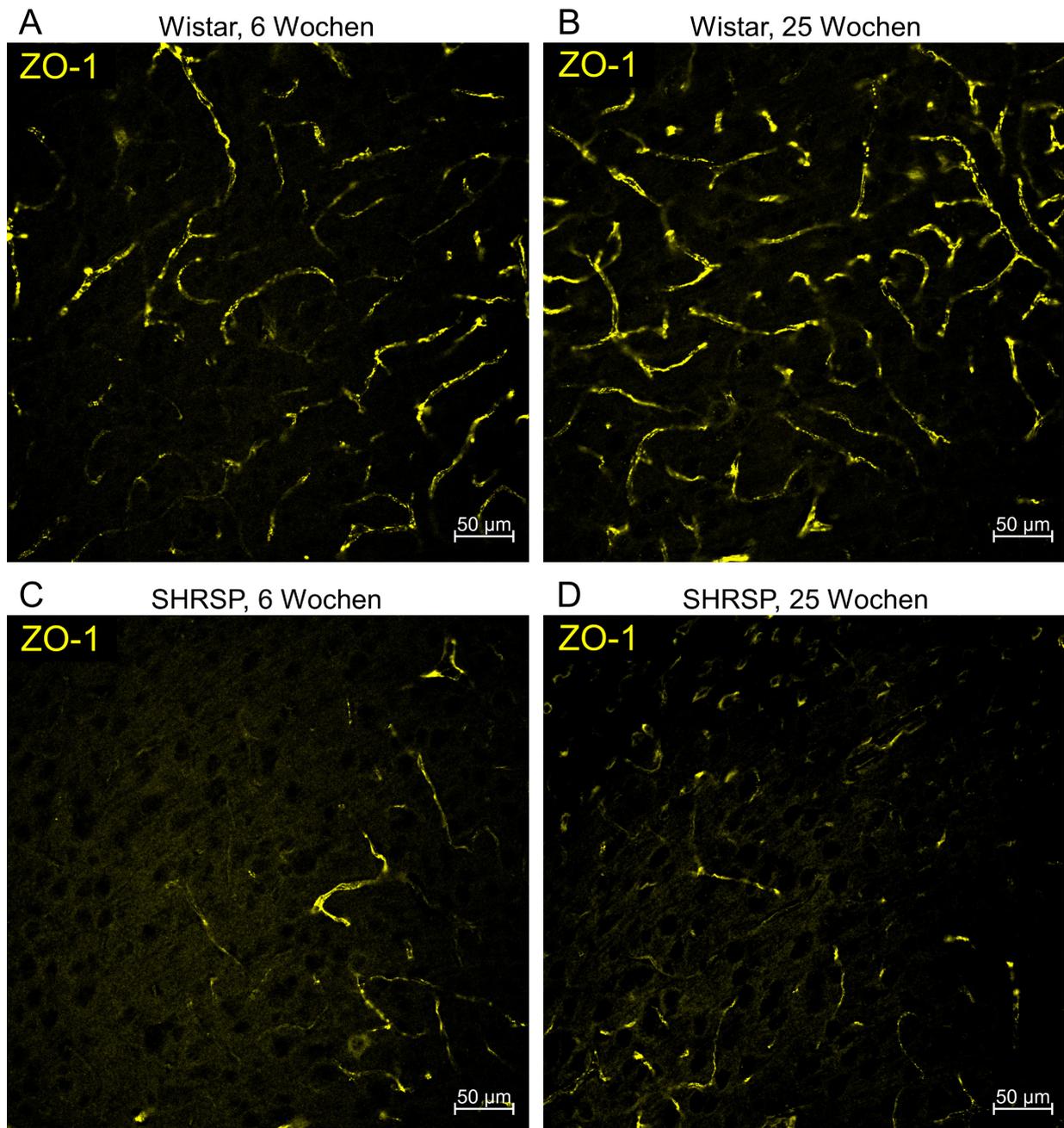


Abbildung 13: ZO-1-Färbung der Hirnschnitte. Anatomisch vergleichbare Kortexschnitte der 6 (A) und 25 Wochen alten (B) Wistar-Ratten und SHRSP (C, D) wurden für ZO-1 gefärbt.

3.9 Durchflusszytometrie der Gehirnzellen

Zellen aus den Kortexen 6 und 25 Wochen alter Wistar-Ratten und SHRSP wurden isoliert, gefärbt und per Durchflusszytometrie gemessen. Die Gating-Strategie ist in Abbildung 14 dargestellt. Dabei wurden zunächst Ereignisse mit der Größe von Zellen markiert und anschließend einzelne Zellen ausgewählt (Abbildung 14 A, B). Nun wurden lebendige Zellen durch ihre fehlende Markierung mit einem Zombie-Farbstoff identifiziert (Abbildung 14 C). Für die Untersuchung von Perizyten und Endothelzellen wurde erst die CD11b- und CD45-negative Population eingegrenzt, um Mikrogliazellen und Zellen der hämatopoetischen Stammlinie auszuschließen (Abbildung 14 D). Nun wurde in dieser Population nach CD13 und CD31 sortiert, wobei CD13-positive Zellen als Perizyten und CD31-positive Zellen als Endothelzellen gewertet wurden (Abbildung 14 E). Ereignisse, die sowohl für CD13 als auch CD31 positiv waren, wurden als Messfehler interpretiert und machten in keiner Messung einen Anteil von mehr als 0,2 % aus. Um Perizyten und Endothelzellen wurden sie auf das Oberflächenprotein CD86 überprüft, welches zur Kostimulation von T-Lymphozyten beiträgt und generell von antigenpräsentierenden Zellen exprimiert wird (Abbildung 14 F). Die Perizyten und Endothelzellen der 25 Wochen alten Ratten wurden zusätzlich auf ihre Proliferation untersucht, indem intrazellulär für Ki-67 gefärbt wurde.

Der Anteil der Perizyten und Endothelzellen an den isolierten Zellen wurde ermittelt. Bezüglich des Anteils der Perizyten gibt es keine signifikanten Unterschiede zwischen den 6 und 25 Wochen alten SHRSP und Wistar-Ratten (Abbildung 15 A). Bei den Endothelzellen gibt es ebenfalls keine Unterschiede zwischen den gleichaltrigen Tieren (Abbildung 15 B). Interessanterweise nimmt jedoch der Anteil der isolierten Endothelzellen sowohl bei den Wistar-Ratten als auch bei den SHRSP mit dem Alter signifikant zu. Überraschenderweise zeigt sich bei den sechs Wochen alten Ratten ein hoher Anteil von etwa 75 % CD86-positiven Perizyten, während dieser bei den 25 Wochen alten Ratten bei unter 3 % liegt (Abbildung 15 C). Zwischen den gleichaltrigen SHRSP und Kontroll-Ratten sind keine Unterschiede festzustellen. Bei den Endothelzellen gibt es ein umgekehrtes Verhältnis, hier ist der Anteil CD86-positiver Zellen bei jungen Wistar-Ratten und SHRSP unter 3 %, während es bei den 25 alten Tieren jeweils etwa 20 und 15 % sind (Abbildung 15 D). Die 25 Wochen alten SHRSP haben einen signifikant niedrigeren Anteil an CD86-positiven Endothelzellen als die gleichaltrigen Wistar-Ratten. Zuletzt wurden Perizyten und Endothelzellen der 25

Wochen alten Ratten auf den Proliferationsmarker Ki-67 überprüft. Bei den Perizyten stellt der Ki-67-positive Anteil etwa 45 % dar (Abbildung 15 E). Die Endothelzellen weisen mit unter 3 % einen deutlich geringeren Anteil auf (Abbildung 15 F). Zwischen Kontrollratten und SHRSP bestehen jeweils keine signifikanten Unterschiede.

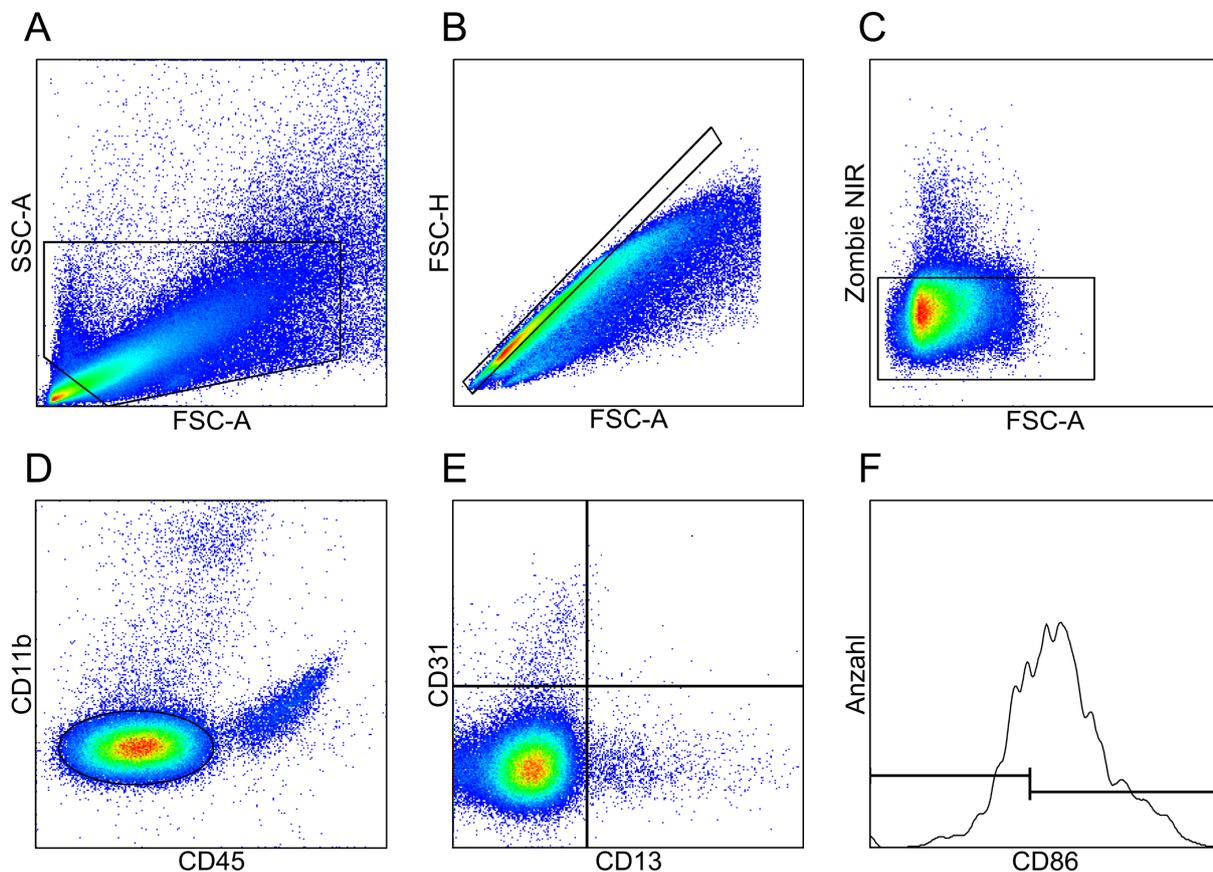


Abbildung 14: Gating-Strategie für die Durchflusszytometrie. Es wurden Ereignisse mit der Größe einer Zelle ausgewählt (**A**), dann wurden daraus einzelne (**B**), lebendige (**C**) und CD45- und CD11b-negative (**D**) Zellen selektiert. Innerhalb dieser Population wurde in CD31-positive Endothelzellen und CD13-positive Perizyten unterschieden (**E**). Diese wurden anhand von Histogrammen in CD86-positive und -negative Zellen eingeteilt (**F**). Die Abbildungen zeigen exemplarisch die Ereignisse einer 6 Wochen alten Wistar-Ratte in der FlowJo Software.

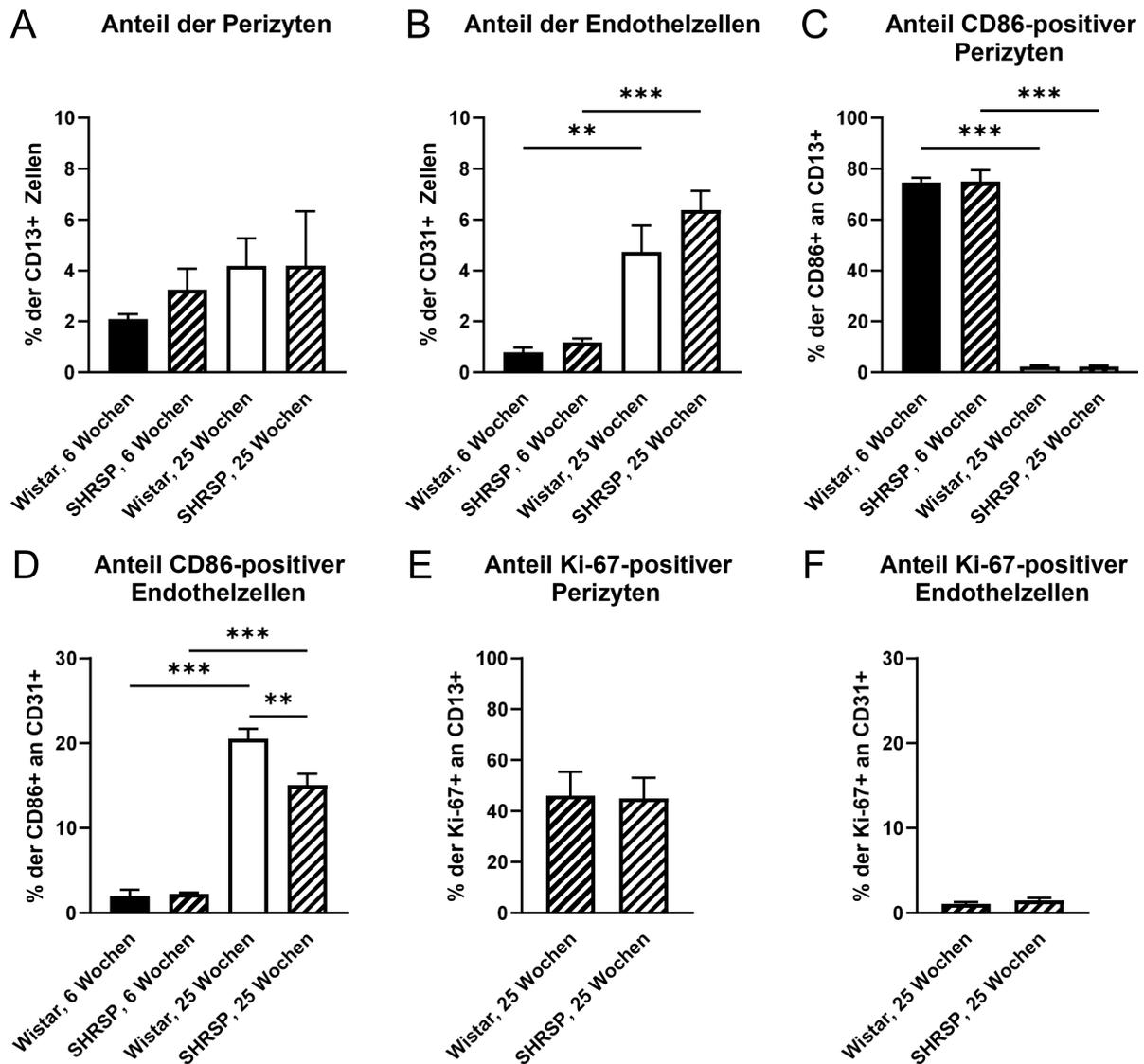


Abbildung 15: Durchflusszytometrie der Gehirnzellen. Wistar-Ratten und SHRSP wurden im Alter von 6 und 25 Wochen auf den Anteil von CD13-positiven Perizyten (A) und CD31-positiven Endothelzellen (B) in CD45- und CD11b-negativen Kortexzellen untersucht. Der Anteil der CD86-positiven Perizyten (C) und Endothelzellen (D) wurde berechnet. Für die 25 Wochen alten Ratten wurde zusätzlich der Anteil der Ki-67-positiven Perizyten (E) und Endothelzellen (F) ermittelt. Die Balkendiagramme zeigen den prozentuellen Anteil an der jeweiligen Grundgesamtheit \pm SEM.

4 Diskussion

Perizyten haben einen zentralen Einfluss auf die BHS und die NVE, welche wiederum sehr bedeutsam in der Pathophysiologie von Erkrankungen wie der zerebralen Mikroangiopathie sind. EV allgemein und Mikrovesikel im speziellen sind interzelluläre Kommunikationsmittel, über die noch viel unbekannt ist. Das Ziel dieser Arbeit war es, Zusammenhänge zwischen diesen Forschungsschwerpunkten zu finden.

4.1 Unterschiede der Wistar- und SHRSP-Perizyten *in vitro*

Basierend auf der Methodik von (Nakagawa et al. 2009) wurden primäre Perizytenkulturen aus der grauen Substanz von Wistar-Ratten und SHRSP generiert. Während diverse immortalisierte Zelllinien bequem erhältlich sind und generell weniger anspruchsvolle Kulturbedingungen benötigen, kann es erhebliche Unterschiede zwischen diesen Zelllinien und der Realität *in vivo* geben (Pan et al. 2009). Zelllinien verlieren im Gegensatz zu Primärkulturen teilweise wichtige Marker der Zellen *in vivo*, zeigen eine veränderte Morphologie oder können falsch identifiziert oder kontaminiert sein (Alge et al. 2006; Lorsch et al. 2014). Gleichzeitig könnte durch ein Kokulturmodell, beispielsweise mit Perizyten, Endothelzellen und Astrozyten, die BHS *in vitro* modelliert werden (Fujimoto et al. 2019).

Die primären Perizytenkulturen sind regelrecht und ohne Kontamination gewachsen, zeigen typische Morphologie und bleiben für mindestens 18 Passagen vital, wie bei ähnlichen primären Perizytenkulturen bereits beschrieben (Boroujerdi et al. 2014; Tigges et al. 2012). SHRSP-Perizyten zeigen ein langsames Wachstum bis zur vollständigen Konfluenz als die Wistar-Kontrolle und haben so eine signifikant längere Zeit zwischen den Passagen. Dies könnte auf ein unterschiedliches Wachstumsverhalten *in vivo* hindeuten. Ähnliche Beobachtungen konnten in der Literatur nicht gefunden werden. Die Untersuchung der Zellen mit Immunfluoreszenz beweist die Reinheit der Perizytenkultur und demonstriert unterschiedliche Expressionsmuster der Perizytenmarker. PDGFR β wird in allen untersuchten Zellen exprimiert, der Endothelmarker CD31 färbt dagegen keine einzige Zelle. Die SHRSP-Perizyten zeigen in vergleichbaren Aufnahmen eine niedrigere Intensität von PDGFR β und eine höhere Intensität von NG2 als die Kontrolle. Während zusätzlich bei den SHRSP-Zellen alle Zellen NG2-positiv färben, lässt sich bei den Wistar-Perizyten eine distinkte NG2-negative Population ausmachen. Ein ähnliches Expressionsmuster von

NG2 in vollständig PDGFR β -positiven Zellen wurde bei einer primären Kultur von Perizyten aus dem Mausgehirn beschrieben (Tigges et al. 2012). NG2 ist ein wichtiger Faktor für die Motilität und Proliferation von Perizyten, und eine erhöhte Expression könnte ein Zeichen für die Neigung von SHRSP-Perizyten sein, das Endothel zu verlassen (Stallcup 2018).

In Ruhe besitzt die SHRSP-Kultur ebenfalls eine niedrigere Genexpression von PDGFR β , was die Ergebnisse der Immunfluoreszenz unterstützt, sowie der Perizytenmarker CD13 und α SMA. PDGFR β ist essentiell für die Rekrutierung und Stabilisierung von Perizyten an die Gefäßwand und eine Störung in diesem Signalweg führt zu Undichtigkeit der BHS und Akkumulation von Schadstoffen im Gehirn (Sweeney et al. 2016). Eine gestörte Funktion der Perizyten könnte somit Anteil an der Pathophysiologie der SHRSP haben (Nakazaki et al. 2019). SHRSP-Perizyten zeigen eine höhere Genexpression des Chemokins CCL2 als die Wistar-Kontrolle, was einen immunmodulatorischen Aspekt der Zelle suggeriert. CCL2 fördert nicht nur die Einwanderung von Mono- und Lymphozyten in das Gehirn, sondern schädigt auch selbst die BHS (Dimitrijevic et al. 2006). Es wurde anderweitig demonstriert, dass Perizyten *in vivo* CCL2 herstellen und damit im Gehirn frühzeitig auf systemische Entzündung reagieren (Gaceb et al. 2018a; Duan et al. 2018). Das ebenfalls proinflammatorische Zytokin IL-6 zeigt allerdings eine niedrigere Genexpression als in der Kontrollgruppe. Der Mikroglia marker CD11b ist in beiden Kulturen in Ruhe sehr gering exprimiert, ohne signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen, was die Abwesenheit von Mikrogliazellen in der Kultur suggeriert. Die Perizyten wurden nun für 12 Stunden mit Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA), einem Aktivator der Proteinkinase-C-Familie und Ionomycin, einem Kalzium-Transporter, stimuliert. PMA- und Ionomycin-Stimulation wird vor allem in der Erforschung von T-Lymphozyten angewandt, wo sie diese aktivieren und zur Produktion von Zytokinen anregen, der Wirkungsmechanismus selbst ist jedoch unspezifisch und beinhaltet die synergistische Erhöhung von intrazellulärem Kalzium (Crawford et al. 2014). Kalziumeinstrom ist ein wichtiger Teil der Pathophysiologie des ischämischen Schlaganfalls, und Perizyten kontrahieren nach Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration sowie in Ischämie (Xing et al. 2012; Peppiatt et al. 2006; Hall et al. 2014). Es konnte in der Literatur keine vergleichbare Stimulation von Perizyten mit PMA und Ionomycin gefunden werden. Während Wistar-Perizyten nach Stimulation die Expression von PDGFR β und CD13 herunterregulieren, zeigt sich bei den SHRSP keine signifikante

Veränderung und kein Unterschied mehr verglichen mit der stimulierten Kontrollgruppe. Dies suggeriert eine erhöhte Resilienz der SHRSP-Perizyten gegenüber dem Stressor, möglicherweise aufgrund einer ähnlich pathologischen Umgebung *in vivo*. CD11b ist in der SHRSP-Kultur nach der Stimulation signifikant erhöht, ist allerdings immer noch sehr gering exprimiert. In einem Mausmodell von Schlaganfall wurde *in vivo* gezeigt, dass Perizyten die Blutgefäße verlassen, proliferieren, und einen Mikroglia-phenotyp mit Expression von CD11b annehmen können (Özen et al. 2014). Die vorliegende Stimulation hat *in vitro* also keinen vergleichbaren Effekt. Nach der Stimulation war die Expression von IL-6 und CCL2 in der SHRSP-Kultur höher als in der Wistar-Kontrolle, was suggeriert, dass SHRSP-Perizyten in adversen Situationen inflammatorische Funktionen ausüben könnten, indem sie Leukozyteninfiltration ermöglichen und selbst proinflammatorische Faktoren produzieren. Allerdings entspricht eine per PCR ermittelte Genexpression nicht immer der Proteinkonzentration, sodass diese in zukünftigen Untersuchungen ebenfalls gemessen werden könnte.

Es wird gezeigt, dass eine Stimulation mit PMA und Ionomycin für 6 und 12 Stunden in der Zellkultur keine Apoptose auslöst. Bei beiden Zeitpunkten gibt es keinen erhöhten Anteil an früh- oder spätapoptotischen Zellen in Wistar- und SHRSP-Perizyten. Andere Untersuchungen fanden erhöhten Zelltod nach einer 48-stündigen Stimulation, was in dieser Arbeit durch das kürzere Zeitfenster vermieden wurde (Han et al. 2013). Interessanterweise ist der Anteil der frühapoptotischen SHRSP-Zellen nach sechsständiger Stimulation sogar leicht vermindert, dieser Effekt lässt sich nach 12 Stunden Stimulation nicht wiederfinden. Dies könnte erneut auf eine erhöhte Resilienz der SHRSP-Perizyten hinweisen. Überraschenderweise zeigten Wistar-Perizyten in dem sechsständigen Experiment eine deutlich niedrigere Viabilität als ihr SHRSP-Pendant, unabhängig davon, ob sie zuvor stimuliert wurden oder nicht. Möglicherweise ist dies auf ihr schnelleres Wachstum zurückzuführen, das zu höherer Konfluenz führt und dadurch Apoptose auslöst. In MSC wurde ein Zusammenhang zwischen erhöhter Zelldichte und vermehrter Apoptose gefunden (Arimura et al. 2012; Song et al. 2009). In der zwölfständigen Stimulation gibt es keine Unterschiede im Anteil der apoptotischen Zellen zwischen Wistar- und SHRSP-Perizyten.

4.2 Produktion und Effekt von Mikrovesikeln

Zur Isolation und Messung von Mikrovesikeln aus den Perizytenkulturen wurde das Protokoll aus (Pospichalova et al. 2015) adaptiert. Um ein akkurates Größenfeld von 300 bis 1000nm zu generieren, wurden Silika- und Polyesterolpartikel verglichen. Silikapartikel eignen sich besser zur präzisen Eingrenzung von Mikrovesikeln, da sie aufgrund ihres refraktiven Indexes biologische Vesikel besser approximieren (Parida et al. 2015). Das Attune NxT Durchflusszytometer konnte Ereignisse in diesem Größenbereich erfolgreich auflösen. Ein Vergleich mehrerer Durchflusszytometer ergab zuvor, dass nicht alle Geräte bis zu einer Größe von 300 nm auflösen konnten (van der Pol et al. 2018). Es wird gezeigt, dass sowohl die Wistar- als auch die SHRSP-Perizytenkultur in Ruhe Mikrovesikel produzieren. (Gaceb et al. 2018b) zeigten, dass menschliche primäre Gehirnperizyten *in vitro* regenerative Mikrovesikel produzieren, und dies durch Gabe von PDGF-BB verstärkt werden kann. Durch Stimulation mit PMA und Ionomycin wird in dieser Arbeit eine vermehrte Produktion in Wistar-Perizyten ausgelöst, während in der SHRSP-Kultur der Effekt nicht signifikant ist. Sowohl die stimulierten als auch die nicht stimulierten SHRSP-Perizyten produzieren weniger Mikrovesikel als die jeweilige Kontrollgruppe. Dies könnte eine Ursache für das unterschiedliche Verhalten von SHRSP-Perizyten *in vivo* darstellen. Welchen Einfluss das schnellere Wachstum der Wistar-Zellen auf die Mikrovesikel-Produktion hat, sollte in weiteren Experimenten festgestellt werden.

Wistar- und SHRSP-Perizyten wurden in einem Wundheilungs-Assay auf den Einfluss von PMA- und Ionomycin-Stimulation sowie eines mit Mikrovesikeln der jeweiligen Kultur angereicherten Mediums untersucht. In beiden Gruppen führt die Stimulation zu signifikant reduziertem Wachstum. Interessanterweise wird eine verbesserte Wundheilung der Wistar-Perizyten nach Zugabe des mit Mikrovesikeln angereicherten Mediums festgestellt, unabhängig davon, ob zuvor mit PMA und Ionomycin stimuliert wurde oder nicht. Dies suggeriert einen autokrinen, proliferativen Effekt der Mikrovesikel von Wistar-Perizyten. In der SHRSP-Kultur zeigt sich überraschenderweise ein Trend zu unterschiedlich großen Wundflächen vor der Behandlung mit Mikrovesikel-angereichertem Medium. Da die Zellen zu diesem Zeitpunkt noch keine unterschiedliche Behandlung erfahren haben und die Wells den Gruppen randomisiert zugeordnet wurden, können diese Trends am ehesten mit Varianz beim Erzeugen des Kratzers erklärt werden. Nichtsdestotrotz zeigt sich kein

proliferativer Effekt des mit SHRSP-Mikrovesikel angereicherten Mediums, tatsächlich gibt es einen Trend zur Reduktion des absoluten Wachstums. Ob diese Unterschiede zwischen den Zellkulturen durch die Menge der verabreichten Mikrovesikel oder unterschiedliche Eigenschaften der Wistar- und SHRSP-Mikrovesikel zu erklären sind, kann durch diesen Versuch nicht entschieden werden. Weitere Experimente können Oberflächenmarker und Inhalte dieser Vesikel analysieren, um Gemeinsamkeiten und potentielle Unterschiede in der Wirkung der Partikel zu finden. Um den Empfehlungen der *International Society for Extracellular Vesicles* nachzukommen, könnte zusätzlich ein Nachweis von für EV typischen Proteinen wie beispielsweise den Tetraspaninen CD9 und CD81 oder eine Aufnahme der Mikrovesikel per Elektronenmikroskop erfolgen (Lötvall et al. 2014; Théry et al. 2018).

4.3 Untersuchungen der Rattengehirne und -seren

Es wurden Gehirne und Seren von 6 und 25 Wochen alten Wistar-Ratten und SHRSP untersucht. Während bei den jungen Ratten noch keine schwerwiegenden degenerativen Veränderungen zu erwarten sind, ist die pathophysiologische Kaskade bei den älteren Ratten schon fortgeschritten, ohne dass jedoch bereits ein manifester Schlaganfall zu erwarten ist (Henning et al. 2010; Schreiber et al. 2013). Alle Versuchstiere waren bis zum Tötungszeitpunkt neurologisch unauffällig.

Gehirnhomogenat der 6 und 25 Wochen alten Wistar-Ratten und SHRSP wurde per PCR auf die Expression von Perizytenmarkern, Tight-Junction-Proteinen und inflammatorische Faktoren untersucht. Bei den alten SHRSP-Ratten ist die Genexpression von PDGFR β und CD13 analog zu den Ergebnissen der Zellkultur im Vergleich zur gleichaltrigen Kontrolle signifikant niedriger. Dies ist entweder durch reduzierte Genexpression in den einzelnen Perizyten, durch Abnahme der Perizyten-dichte, oder durch eine Kombination der beiden Faktoren erklärbar. Die Tight-Junction-Proteine Occludin und Claudin-5 sind in den 25 Wochen alten SHRSP ebenfalls signifikant niedriger als in der gleichaltrigen Kontrolle exprimiert, was eine Schwächung der BHS suggeriert. Während die Kontrollgruppe mit zunehmendem Alter eine erhöhte Expression der beiden Proteine zeigt, ist bei den SHRSP kein signifikanter Unterschied oder sogar ein sinkender Trend festzustellen. In einer Blindstudie wurde in 5, 16 und 21 Wochen alten Ratten eine vergleichbare Stagnation der Immunfluoreszenz von Claudin-5 in verschiedenen Gehirnregionen von SHRSP gegenüber Wistar-Ratten demonstriert (Bailey et al. 2011). Überraschenderweise sind

die Mikroglia marker CD11b, das Leukozytenadhäsionsmolekül ICAM-1, und die proinflammatorischen Zytokine TNF- α und CCL2 in den 25 Wochen alten SHRSP ebenfalls niedriger exprimiert als in der gleichaltrigen Wistar-Kontrolle. Bei den jungen SHRSP war noch eine höhere beziehungsweise ein Trend zur höheren Genexpression in CD11b und ICAM-1 festgestellt worden, die Genexpression nahm im Alter jedoch für CD11b, ICAM-1 und TNF- α signifikant ab. Aufgrund der inflammatorischen Komponente der Pathophysiologie der SHRSP-Ratten wäre eine erhöhte Expression dieser Marker nachvollziehbar (Jandke et al. 2018). Gleichzeitig ist es vorstellbar, dass die Genexpression im Homogenat ganzer Gehirne nicht repräsentativ für die subtilen Veränderungen an den kleinsten Gefäßen ist und dass andere Anteile des Gehirns eine Schwächung des Immunsystems zeigen können. In einer Analyse von Zytokinen im Serum der Ratten ist die Konzentration des Immunmodulators IFN γ , des proinflammatorischen Chemokins CXCL1 und des antiinflammatorischen IL-10 in den 25 Wochen alten SHRSP erhöht, was eine systemische Entzündungskomponente vermuten lässt. Bluthochdruck hat bei SHRSP und Menschen ebenfalls einen schädlichen, inflammatorischen Effekt in anderen Organen, wie beispielsweise den Nieren (Schreiber et al. 2011; Mennuni et al. 2014). Eine vergleichende Analyse des *Liquor cerebrospinalis* wäre deswegen zur Untersuchung von speziellen Veränderungen des ZNS interessant.

Immunfluoreszenzschnitte der Kortizes zeigen die typische perlenschnurartige Struktur der Perizyten an den kleinsten Gefäßen, wobei erneut nur eine Teilmenge der PDGFR β -positiven Perizyten auch NG2-positiv ist. Diese Zellen sind dabei stets in direkten Kontakt mit der Gefäßwand. Es wurde jedoch eine große Anzahl verzweigender NG2-positiver und PDGFR β -negativer Zellen gefunden, die unabhängig vom Endothel sind und somit wahrscheinlich keine Perizyten sind. Sie entsprechen am ehesten oligodendrozytären Vorläuferzellen und NG2-positiven Oligodendrozyten (Polito und Reynolds 2005; Crouch und Doetsch 2018). Optisch können keine Unterschiede in den mit PDGFR β , NG2 und CD31 gefärbten Schnitten zwischen den jungen und alten SHRSP und Wistar-Ratten festgestellt werden. Insbesondere war kein Unterschied in der Perizyten-dichte erkennbar. In der Färbung von ZO-1 in vergleichbaren Kortexschnitten sich eine verminderte Intensität in den 6 und 25 Wochen alten SHRSP, die im Gegensatz zu den Wistar-Ratten auch nicht mit dem Alter zunimmt. Zusammen mit der verminderten Genexpression der anderen Tight-Junction-Proteine Claudin-5 und Occludin spricht dies für eine geschwächte

Barriere der BHS und deckt sich mit Immunfluoreszenzstudien von Claudin-5 in 5 und 21 Wochen alten SHRSP (Bailey et al. 2011). Eine andere Veröffentlichung fand jedoch keine signifikanten Unterschiede der Intensität und Lokalisierung von Tight-Junction-Proteinen in 13 Wochen alten SHRSP im Vergleich zur Wistar-Kontrolle (Lippoldt et al. 2000). Möglicherweise ist hier das Alter der Ratten entscheidend. Die Beobachtungen in der vorliegenden Arbeit stützen sich auf Hirnschnitte von einem Tier pro Rattenstamm und Altersgruppe, für eine quantitative Analyse könnte die Stichprobengröße erweitert werden.

In der Durchflusszytometrie wurde der Anteil isolierter CD13-positiver Perizyten und CD31-positiver Endothelzellen an den isolierten Gehirnzellen des Kortex ermittelt. Obwohl Perizyten nach einem Schlaganfall den Mikroglia marker CD11b exprimieren können, werden hier CD11b- und CD45-negative Zellen als Grundpopulation gewählt, da gezeigt wurde, dass die überwiegende Mehrheit der Perizyten vor einem Schlaganfall die beiden Marker nicht exprimieren (Özen et al. 2014). In weiteren Versuchen könnte dennoch untersucht werden, ob Perizyten von SHRSP im fortgeschrittenen Alter CD11b exprimieren. Es werden keine Unterschiede in dem Anteil der CD13-positiven Perizyten an den isolierten Gehirnzellen festgestellt, obwohl bei der qRT-PCR des Gehirnhomogenats eine Reduktion der Genexpression von CD13 gefunden wurde. Dies könnte aus einer kleineren Perizyten dichte in anderen Hirnregionen oder einer verminderten Expression der einzelnen Perizyten resultieren. In den 25 Wochen alten Ratten wurde ein höherer Anteil von CD31-positiven Endothelzellen festgestellt, wobei es keinen signifikanten Unterschied zwischen den Rattenstämmen gibt. Zuvor wurde ein höherer Anteil von dysfunktionalen, proliferativen Endothelzellen in SHRSP beschrieben (Rajani et al. 2018). Die Zunahme von Endothelzellen bei gleichbleibender oder sinkender Perizyten dichte könnte eine Ursache für Störungen in der NVE von CSVD-Patienten sein. Interessanterweise zeigte sich ein hoher Anteil von CD86-positiven Perizyten in den jungen Ratten, der mit dem Alter abnimmt. Unterschiede zwischen Wistar-Ratten und SHRSP gibt es hier nicht. Bei den Endothelzellen ist das Gegenteil der Fall, bei den jungen Ratten sind fast keine Endothelzellen CD86-positiv, während bei den alten Ratten signifikant mehr den Marker exprimieren, die SHRSP weniger als die Kontrollgruppe. Möglicherweise gibt es eine Verschiebung der immunregulatorischen Rolle von Perizyten zu Endothelzellen mit dem Alter, was die Kostimulation von T-Lymphozyten angeht. Die Expression von CD86 auf Endothelzellen wurde bereits beschrieben (Seino et al.

1995). Es wurde zuvor berichtet, dass menschliche Gehirnperizyten weder in Ruhe noch nach Stimulation mit IFN γ CD86 exprimieren (Domev et al. 2014). Perizyten, die aus Rattenkortex isoliert wurden, zeigten allerdings Genexpression für CD86, die nach Stimulation mit Semaphorin-4D erhöht ist (Zhou et al. 2018). Möglicherweise gibt es hier speziesabhängige Unterschiede zwischen Menschen und Ratten. Perizyten der 25 Wochen alten Ratten zeigen einen höheren Anteil Ki-67-positiver Zellen als Endothelzellen ohne Unterschiede zwischen SHRSP- und Wistar-Ratten. Dies deutet auf eine höhere mitotische Aktivität der Perizyten im Vergleich zu den eher ruhenden Endothelzellen hin. Es wurde gezeigt, dass Perizyten nach großflächigem Schlaganfall oder traumatischer Gehirnverletzung verstärkt proliferieren und entsprechend Ki-67 exprimieren (Zehendner et al. 2015; Özen et al. 2014). Da bei SHRSP im Alter von 25 Wochen noch kein Schlaganfall zu erwarten ist, regen die pathophysiologischen Veränderungen zu diesem Zeitpunkt vermutlich noch keine vermehrte Proliferation an (Henning et al. 2010).

4.4 Fazit

Insgesamt zeigen diese Ergebnisse Unterschiede zwischen Wistar- und SHRSP-Perizyten *in vitro* und *in vivo*. SHRSP-Perizyten haben in der Immunfluoreszenz und PCR eine niedrigere Expression von PDGFR β , zeigen eine höhere Genexpression von CCL2, und sind nach Stimulation mit PMA und Ionomycin resilienter als die Wistar-Kultur. SHRSP-Perizyten produzieren in derselben Zeit weniger Mikrovesikel, und diese zeigen in einem Wundheilungs-Assay im Gegensatz zu der Kontrollgruppe keinen proliferativen Effekt. PCR von Gehirnhomogenat der alten SHRSP ergab eine erniedrigte Perizytenmarker- und Tight-Junction-Genexpression im Vergleich zur Kontrolle, was Hinweise auf die Schwächung der BHS in diesem Modell für CSVD gibt. Immunfluoreszenz von Kortexschnitten suggeriert ebenfalls erniedrigte Expression eines Tight-Junction-Proteins in SHRSP. Diese Ergebnisse geben neue Einsichten und Ansätze für Untersuchungen, welche die Rolle von Perizyten und Mikrovesikeln in der CSVD weiter charakterisieren können. Aufgrund der Relevanz der Perizyten für die NVE könnten sie Ansatzpunkt therapeutischer Bestrebungen sein, den Fortschritt von CSVD in Menschen zu verlangsamen. Es wurde bereits gezeigt, dass die Transplantation von MSC einen neuroprotektiven Einfluss in SHRSP hat (Calió et al. 2014). Möglicherweise könnten auch Mikrovesikel von Perizyten oder MSC in Zukunft einen solchen Therapieansatz darstellen.

5 Zusammenfassung

Perizyten sind perivaskuläre Zellen und ein wichtiger Bestandteil der neurovaskulären Einheit. Über ihren Einfluss auf die Pathophysiologie der zerebralen Mikroangiopathie (CSVD), die einen erheblichen Anteil aller Schlaganfälle verursacht, ist bis dato wenig bekannt.

In dieser Arbeit wurden deshalb die Gehirnperizyten von 6 und 25 Wochen alte spontan hypertensive, zu Schlaganfällen neigende Ratten (SHRSP, ein Modell für CSVD) und Wistar-Kontrollratten *in vitro* und *in vivo* untersucht. Dafür wurden primäre Perizytenkulturen etabliert, wobei SHRSP-Perizyten ein langsames Wachstum zeigen. In der Immunfluoreszenz wird die Reinheit der Zellkulturen nachgewiesen und Unterschiede in der Intensität der Perizytenmarker PDGFR β und NG2 gezeigt. PCR der Zellen zeigt in den SHRSP-Perizyten die niedrigere Genexpression verschiedener Perizytenmarker, eine vermehrte Genexpression des Chemokins CCL2 sowie erhöhte Resilienz gegenüber der Stimulation mit PMA und Ionomycin. Es wird gezeigt, dass sowohl Wistar- als auch SHRSP-Perizyten in Ruhe Mikovesikel, eine Art extrazellulärer Vesikel, produzieren, und dass Wistar-Zellen nach PMA/Ionomycin-Stimulation signifikant mehr Vesikel produzieren. In einem Wundheilungs-Assay wurden die Perizyten ebenfalls mit PMA und Ionomycin stimuliert und anschließend mit einem an Mikovesikeln angereicherten Medium behandelt. Vorherige Stimulation verringert das Wachstum in beiden Perizytenkulturen, während Wistar-, aber nicht SHRSP-Perizyten nach Behandlung mit dem an Mikovesikeln angereicherten Medium vermehrte Proliferation zeigen. Im Homogenat der Rattengehirne zeigt sich verringerte Genexpression von mehreren Perizytenmarkern und Tight-Junction-Proteinen in den 25 Wochen alten SHRSP-Ratten im Vergleich zur gleichaltrigen Wistar-Kontrolle. Das Serum der Ratten wurde auf Zytokine untersucht und eine erhöhte Konzentration der Botenstoffe IFN γ , CXCL1 und IL-10 in den alten SHRSP festgestellt, was auf eine systemische, inflammatorische Pathologie der SHRSP hinweist. In der Immunfluoreszenz erscheint das Tight-Junction-Protein ZO-1 in den alten SHRSP-Ratten weniger stark exprimiert.

Zusammengefasst gewinnen diese Ergebnisse Einsichten in inflammatorische und proliferatorische Eigenschaften von Perizyten in diesem Modell für CSVD. Weiterhin zeigen sie Richtungen für weitere Untersuchungen und potentielle Therapieansätze der Zukunft auf.

Literaturverzeichnis

- 1 Alge, C. S.; Hauck, S. M.; Priglinger, S. G.; Kampik, A.; Ueffing, M.: Differential protein profiling of primary versus immortalized human RPE cells identifies expression patterns associated with cytoskeletal remodeling and cell survival. *J Proteome Res.* 5 (4). 862–878 (2006).
- 2 Arimura, K.; Ago, T.; Kamouchi, M.; Nakamura, K.; Ishitsuka, K.; Kuroda, J.; Sugimori, H.; Ooboshi, H.; Sasaki, T.; Kitazono, T.: PDGF receptor β signaling in pericytes following ischemic brain injury. *Curr Neurovasc Res.* 9 (1). 1–9 (2012).
- 3 Armulik, A.; Genové, G.; Betsholtz, C.: Pericytes: developmental, physiological, and pathological perspectives, problems, and promises. *Dev Cell.* 21 (2). 193–215 (2011).
- 4 Attwell, D.; Mishra, A.; Hall, C. N.; O'Farrell, F. M.; Dalkara, T.: What is a pericyte? *J Cereb Blood Flow Metab.* 36 (2). 451–455 (2016).
- 5 Baecker, V.: ImageJ Macro Tool Sets for Biological Image Analysis. ImageJ User and Developer Conference 2012. (2012).
- 6 Bailey, E. L.; Wardlaw, J. M.; Graham, D.; Dominicczak, A. F.; Sudlow, C. L. M.; Smith, C.: Cerebral small vessel endothelial structural changes predate hypertension in stroke-prone spontaneously hypertensive rats: a blinded, controlled immunohistochemical study of 5- to 21-week-old rats. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 37 (7). 711–726 (2011).
- 7 Balabanov, R.; Beaumont, T.; Dore-Duffy, P.: Role of central nervous system microvascular pericytes in activation of antigen-primed splenic T-lymphocytes. *J. Neurosci. Res.* 55 (5). 578–587 (1999).
- 8 Bell, R. D.; Winkler, E. A.; Singh, I.; Sagare, A. P.; Deane, R.; Wu, Z.; Holtzman, D. M.; Betsholtz, C.; Armulik, A.; Sallstrom, J. et al.: Apolipoprotein E controls cerebrovascular integrity via cyclophilin A. *Nature.* 485 (7399). 512–516 (2012).
- 9 Bhattacharya, A.; Kaushik, D. K.; Lozinski, B. M.; Yong, V. W.: Beyond barrier functions: Roles of pericytes in homeostasis and regulation of neuroinflammation. *J Neurosci Res.* 98 (12). 2390–2405 (2020).
- 10 Birbrair, A.: Pericyte Biology: Development, Homeostasis, and Disease. *Adv Exp Med Biol.* 1109. 1–3 (2018).
- 11 Boroujerdi, A.; Tigges, U.; Welser-Alves, J. V.; Milner, R.: Isolation and culture of primary pericytes from mouse brain. *Methods Mol Biol.* 1135. 383–392 (2014).
- 12 Buchdunger, E.; Cioffi, C. L.; Law, N.; Stover, D.; Ohno-Jones, S.; Druker, B. J.; Lydon, N. B.: Abl protein-tyrosine kinase inhibitor STI571 inhibits in vitro signal transduction mediated by c-kit and platelet-derived growth factor receptors. *J Pharmacol Exp Ther.* 295 (1). 139–145 (2000).
- 13 Busch, M. A.; Kuhnert, R.: 12-Monats-Prävalenz von Schlaganfall oder chronischen Beschwerden infolge eines Schlaganfalls in Deutschland. *J Health Monit.* 2. 70-76 (2017).
- 14 Buzas, E. I.; György, B.; Nagy, G.; Falus, A.; Gay, S.: Emerging role of extracellular vesicles in inflammatory diseases. *Nat Rev Rheumatol.* 10 (6). 356–364 (2014).
- 15 Cai, W.; Liu, H.; Zhao, J.; Chen, L. Y.; Chen, J.; Lu, Z.; Hu, X.: Pericytes in Brain Injury and Repair After Ischemic Stroke. *Transl Stroke Res.* 8 (2). 107–121 (2017).
- 16 Calió, M. L.; Marinho, D. S.; Ko, G. M.; Ribeiro, R. R.; Carbonel, A. F.; Oyama, L. M.; Ormanji, M.; Guirao, T. P.; Calió, P. L.; Reis, L. A. et al.: Transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells decreases oxidative stress, apoptosis, and

- hippocampal damage in brain of a spontaneous stroke model. *Free Radic Biol Med.* 70. 141–154 (2014).
- 17 Caplan, A. I.: Mesenchymal Stem Cells: Time to Change the Name! *Stem Cells Transl Med.* 1445–1451 (2017).
- 18 Castejón, O. J.: Ultrastructural pathology of cortical capillary pericytes in human traumatic brain oedema. *Folia Neuropathol.* 49 (3). 162–173 (2011).
- 19 Chargaff, E.; West, R.: The biological significance of the thromboplastic protein of blood. *J Biol Chem.* 166 (1). 189–197 (1946).
- 20 Cohen, Z.; Molinatti, G.; Hamel, E.: Astroglial and vascular interactions of noradrenaline terminals in the rat cerebral cortex. *J Cereb Blood Flow Metab.* 17 (8). 894–904 (1997).
- 21 Crawford, T. Q.; Jalbert, E.; Ndhlovu, L. C.; Barbour, J. D.: Concomitant evaluation of PMA+ionomycin-induced kinase phosphorylation and cytokine production in T cell subsets by flow cytometry. *Cytometry A.* 85 (3). 268–276 (2014).
- 22 Crouch, E. E.; Doetsch, F.: FACS isolation of endothelial cells and pericytes from mouse brain microregions. *Nat Protoc.* 13 (4). 738–751 (2018).
- 23 Dahl, E.: The fine structure of intracerebral vessels. *Z Zellforsch Mikrosk Anat.* 145 (4). 577–586 (1973).
- 24 Daneman, R.; Prat, A.: The blood-brain barrier. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* a020412 (2015).
- 25 Dimitrijevic, O. B.; Stamatovic, S. M.; Keep, R. F.; Andjelkovic, A. V.: Effects of the chemokine CCL2 on blood-brain barrier permeability during ischemia-reperfusion injury. *J Cereb Blood Flow Metab.* 26 (6). 797–810 (2006).
- 26 Doepfner, T. R.; Herz, J.; Görgens, A.; Schlechter, J.; Ludwig, A.-K.; Radtke, S.; Miroschedji, K. de; Horn, P. A.; Giebel, B.; Hermann, D. M.: Extracellular Vesicles Improve Post-Stroke Neuroregeneration and Prevent Postischemic Immunosuppression. *Stem Cells Transl Med.* 4 (10). 1131–1143 (2015).
- 27 Dohgu, S.; Takata, F.; Yamauchi, A.; Nakagawa, S.; Egawa, T.; Naito, M.; Tsuruo, T.; Sawada, Y.; Niwa, M.; Kataoka, Y.: Brain pericytes contribute to the induction and up-regulation of blood-brain barrier functions through transforming growth factor-beta production. *Brain Research.* 1038 (2). 208–215 (2005).
- 28 Domenga, V.; Fardoux, P.; Lacombe, P.; Monet, M.; Maciazek, J.; Krebs, L. T.; Klonjowski, B.; Berrou, E.; Mericskay, M.; Li, Z. et al.: Notch3 is required for arterial identity and maturation of vascular smooth muscle cells. *Genes Dev.* 18 (22). 2730–2735 (2004).
- 29 Domev, H.; Milkov, I.; Itskovitz-Eldor, J.; Dar, A.: Immuno-evasive pericytes from human pluripotent stem cells preferentially modulate induction of allogeneic regulatory T cells. *Stem Cells Transl Med.* 3 (10). 1169–1181 (2014).
- 30 Duan, L.; Zhang, X.-D.; Miao, W.-Y.; Sun, Y.-J.; Xiong, G.; Wu, Q.; Li, G.; Yang, P.; Yu, H.; Li, H. et al.: PDGFR β Cells Rapidly Relay Inflammatory Signal from the Circulatory System to Neurons via Chemokine CCL2. *Neuron.* 100 (1). 183-200.e8 (2018).
- 31 Ehrlich, P.: Über das Sauerstoffbedürfnis des Organismus. Eine farbenanalytische Studie. Hirschfeld-Verlag, Berlin (1885).
- 32 Frade, J. M.; Ovejero-Benito, M. C.: Neuronal cell cycle: the neuron itself and its circumstances. *Cell Cycle.* 14 (5). 712–720 (2015).
- 33 Friedland, R. P.; Iadecola, C.: Roy and Sherrington (1890): a centennial reexamination of "On the regulation of the blood-supply of the brain". *Neurology.* 41 (1). 10–14 (1991).

- 34 Fujimoto, T.; Nakagawa, S.; Morofuji, Y.; Watanabe, D.; Ujifuku, K.; Horie, N.; Izumo, T.; Niwa, M.; Banks, W. A.; Deli, M. A.; Matsuo, T.: Pericytes Suppress Brain Metastasis from Lung Cancer In Vitro. *Cell Mol Neurobiol.* (2019).
- 35 Gaceb, A.; Barbariga, M.; Özen, I.; Paul, G.: The pericyte secretome: Potential impact on regeneration. *Biochimie.* 155. 16–25 (2018a).
- 36 Gaceb, A.; Özen, I.; Padel, T.; Barbariga, M.; Paul, G.: Pericytes secrete pro-regenerative molecules in response to platelet-derived growth factor-BB. *J Cereb Blood Flow Metab.* 38 (1). 45–57 (2018b).
- 37 Gaceb, A.; Paul, G.: Pericyte Secretome. *Adv Exp Med Biol.* 1109. 139–163 (2018).
- 38 Gautam, J.; Cao, Y.; Yao, Y.: Pericytic Laminin Maintains Blood-Brain Barrier Integrity in an Age-Dependent Manner. *Transl Stroke Res.* (2019).
- 39 Geranmayeh, M. H.; Rahbarghazi, R.; Farhoudi, M.: Targeting pericytes for neurovascular regeneration. *Cell Commun Signal.* 17 (1). 26 (2019).
- 40 Ghosh, M.; Balbi, M.; Hellal, F.; Dichgans, M.; Lindauer, U.; Plesnila, N.: Pericytes are involved in the pathogenesis of cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy. *Ann Neurol.* 78 (6). 887–900 (2015).
- 41 Giannoni, P.; Badaut, J.; Dargazanli, C.; Maudave, A. F. de; Klement, W.; Costalat, V.; Marchi, N.: The pericyte-glia interface at the blood-brain barrier. *Clin Sci.* 132 (3). 361–374 (2018).
- 42 Gibby, K.; You, W.-K.; Kadoya, K.; Helgadottir, H.; Young, L. J.; Ellies, L. G.; Chang, Y.; Cardiff, R. D.; Stallcup, W. B.: Early vascular deficits are correlated with delayed mammary tumorigenesis in the MMTV-PyMT transgenic mouse following genetic ablation of the NG2 proteoglycan. *Breast Cancer Res.* 14 (2). R67 (2012).
- 43 Guimarães-Camboa, N.; Cattaneo, P.; Sun, Y.; Moore-Morris, T.; Gu, Y.; Dalton, N. D.; Rockenstein, E.; Masliah, E.; Peterson, K. L.; Stallcup, W. B. et al.: Pericytes of Multiple Organs Do Not Behave as Mesenchymal Stem Cells In Vivo. *Cell Stem Cell.* 20 (3). 345-359.e5 (2017).
- 44 Gundersen, G. A.; Vindedal, G. F.; Skare, O.; Nagelhus, E. A.: Evidence that pericytes regulate aquaporin-4 polarization in mouse cortical astrocytes. *Brain Struct. Funct.* 219 (6). 2181–2186 (2014).
- 45 Hall, C. N.; Reynell, C.; Gesslein, B.; Hamilton, N. B.; Mishra, A.; Sutherland, B. A.; O'Farrell, F. M.; Buchan, A. M.; Lauritzen, M.; Attwell, D.: Capillary pericytes regulate cerebral blood flow in health and disease. *Nature.* 508 (7494). 55–60 (2014).
- 46 Han, S.; Tie, X.; Meng, L.; Wang, Y.; Wu, A.: PMA and ionomycin induce glioblastoma cell death: activation-induced cell-death-like phenomena occur in glioma cells. *PLoS One.* 8 (10). e76717 (2013).
- 47 Hankey, G. J.: Stroke. *The Lancet.* 389 (10069). 641–654 (2017).
- 48 Hartmann, D. A.; Underly, R. G.; Grant, R. I.; Watson, A. N.; Lindner, V.; Shih, A. Y.: Pericyte structure and distribution in the cerebral cortex revealed by high-resolution imaging of transgenic mice. *Neurophotonics.* 2 (4). 41402 (2015).
- 49 Hazama, F.; Chue, C. H.; Kataoka, H.; Sasahara, M.; Amano, S.: Pathogenesis of lacuna-like cyst formation and diffuse degeneration of the white matter in the brain of stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol Suppl.* 22 (1). S260-1 (1995).
- 50 Held, F.; Morris, A. W. J.; Pirici, D.; Niklass, S.; Sharp, M. M. G.; Garz, C.; Assmann, A.; Heinze, H.-J.; Schreiber, F.; Carare, R. O.; Schreiber, S.: Vascular basement membrane alterations and β -amyloid accumulations in an animal model of cerebral small vessel disease. *Clin Sci.* 131 (10). 1001–1013 (2017).

- 51 Henning, E. C.; Warach, S.; Spatz, M.: Hypertension-induced vascular remodeling contributes to reduced cerebral perfusion and the development of spontaneous stroke in aged SHRSP rats. *J Cereb Blood Flow Metab.* 30 (4). 827–836 (2010).
- 52 Herbert, S. P.; Stainier, D. Y. R.: Molecular control of endothelial cell behaviour during blood vessel morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 12 (9). 551–564 (2011).
- 53 Heuschmann, P.; Busse, O.; Wagner, M.; Endres, M.; Villringer, A.; Röther, J.; Kolominsky-Rabas, P.; Berger, K.: Schlaganfallhäufigkeit und Versorgung von Schlaganfallpatienten in Deutschland. *Akt Neurol.* 37 (07). 333–340 (2010).
- 54 Hill, A. F.: Extracellular Vesicles and Neurodegenerative Diseases. *J Neurosci.* 39 (47). 9269–9273 (2019).
- 55 Hill, R. A.; Tong, L.; Yuan, P.; Murikinati, S.; Gupta, S.; Grutzendler, J.: Regional Blood Flow in the Normal and Ischemic Brain Is Controlled by Arteriolar Smooth Muscle Cell Contractility and Not by Capillary Pericytes. *Neuron.* 87 (1). 95–110 (2015).
- 56 Hori, S.; Ohtsuki, S.; Hosoya, K.; Nakashima, E.; Terasaki, T.: A pericyte-derived angiopoietin-1 multimeric complex induces occludin gene expression in brain capillary endothelial cells through Tie-2 activation in vitro. *J Neurochem.* 89 (2). 503–513 (2004).
- 57 Hu, X.; Silva, T. M. de; Chen, J.; Faraci, F. M.: Cerebral Vascular Disease and Neurovascular Injury in Ischemic Stroke. *Circ Res.* 120 (3). 449–471 (2017).
- 58 Iadecola, C.: The Neurovascular Unit Coming of Age: A Journey through Neurovascular Coupling in Health and Disease. *Neuron.* 96 (1). 17–42 (2017).
- 59 Ishitsuka, K.; Ago, T.; Arimura, K.; Nakamura, K.; Tokami, H.; Makihara, N.; Kuroda, J.; Kamouchi, M.; Kitazono, T.: Neurotrophin production in brain pericytes during hypoxia: a role of pericytes for neuroprotection. *Microvasc Res.* 352–359 (2012).
- 60 Jandke, S.; Garz, C.; Schwanke, D.; Sendtner, M.; Heinze, H.-J.; Carare, R. O.; Schreiber, S.: The association between hypertensive arteriopathy and cerebral amyloid angiopathy in spontaneously hypertensive stroke-prone rats. *Brain Pathol.* 28 (6). 844–859 (2018).
- 61 Kamouchi, M.; Ago, T.; Kuroda, J.; Kitazono, T.: The possible roles of brain pericytes in brain ischemia and stroke. *Cell Mol Neurobiol.* 32 (2). 159–165 (2012).
- 62 Kanhai, D. A.; Kleijn, D. P. V. de; Kappelle, L. J.; Uiterwaal, C. S. P. M.; van der Graaf, Y.; Pasterkamp, G.; Geerlings, M. I.; Visseren, F. L. J.: Extracellular vesicle protein levels are related to brain atrophy and cerebral white matter lesions in patients with manifest vascular disease: the SMART-MR study. *BMJ Open.* 4 (1). e003824 (2014).
- 63 Kisler, K.; Nikolakopoulou, A. M.; Sweeney, M. D.; Lazic, D.; Zhao, Z.; Zlokovic, B. V.: Acute Ablation of Cortical Pericytes Leads to Rapid Neurovascular Uncoupling. *Front Cell Neurosci.* 14. 27 (2020).
- 64 Kovac, A.; Erickson, M. A.; Banks, W. A.: Brain microvascular pericytes are immunoreactive in culture: cytokine, chemokine, nitric oxide, and LRP-1 expression in response to lipopolysaccharide. *J Neuroinflammation.* 139 (2011).
- 65 Larsson, J.; Goumans, M.-J.; Sjöstrand, L. J.; van Rooijen, M. A.; Ward, D.; Levéen, P.; Xu, X.; Dijke, P. ten; Mummery, C. L.; Karlsson, S.: Abnormal angiogenesis but intact hematopoietic potential in TGF- β type I receptor-deficient mice. *EMBO J.* 20 (7). 1663–1673 (2001).
- 66 Leeson, T. S.: Rat retinal blood vessels. *Can J Ophthalmol.* 14 (1). 21–28 (1979).
- 67 Leeuw, F. E. de; Groot, J. C. de; Achten, E.; Oudkerk, M.; Ramos, L. M.; Heijboer, R.; Hofman, A.; Jolles, J.; van Gijn, J.; Breteler, M. M.: Prevalence of cerebral white matter lesions in elderly people: a population based magnetic resonance imaging study. The Rotterdam Scan Study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 70 (1). 9–14 (2001).

- 68 Li, Q.; Yang, Y.; Reis, C.; Tao, T.; Li, W.; Li, X.; Zhang, J. H.: Cerebral Small Vessel Disease. *Cell Transplant.* 27 (12). 1711–1722 (2018a).
- 69 Li, Y.; Cheng, Q.; Hu, G.; Deng, T.; Wang, Q.; Zhou, J.; Su, X.: Extracellular vesicles in mesenchymal stromal cells: A novel therapeutic strategy for stroke. *Exp Ther Med.* 15 (5). 4067–4079 (2018b).
- 70 Lippoldt, A.; Kniesel, U.; Liebner, S.; Kalbacher, H.; Kirsch, T.; Wolburg, H.; Haller, H.: Structural alterations of tight junctions are associated with loss of polarity in stroke-prone spontaneously hypertensive rat blood-brain barrier endothelial cells. *Brain Research.* 885 (2). 251–261 (2000).
- 71 Liu, S.; Agalliu, D.; Yu, C.; Fisher, M.: The role of pericytes in blood-brain barrier function and stroke. *Curr Pharm Des.* 18 (25). 3653–3662 (2012).
- 72 Logothetis, N. K.; Pauls, J.; Augath, M.; Trinath, T.; Oeltermann, A.: Neurophysiological investigation of the basis of the fMRI signal. *Nature.* 412 (6843). 150–157 (2001).
- 73 Lorsch, J. R.; Collins, F. S.; Lippincott-Schwartz, J.: Cell Biology. Fixing problems with cell lines. *Science.* 346 (6216). 1452–1453 (2014).
- 74 Lötvall, J.; Hill, A. F.; Hochberg, F.; Buzás, E. I.; Di Vizio, D.; Gardiner, C.; Gho, Y. S.; Kurochkin, I. V.; Mathivanan, S.; Quesenberry, P. et al.: Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles. *J Extracell Vesicles.* 3. 26913 (2014).
- 75 Lund, R. W.: Lacunar infarction, mortality over time and mortality relative to other ischemic strokes. *J Insur Med.* 44 (1). 32–37 (2014).
- 76 Maas, S. L. N.; Breakefield, X. O.; Weaver, A. M.: Extracellular Vesicles: Unique Intercellular Delivery Vehicles. *Trends Cell Biol.* 27 (3). 172–188 (2017).
- 77 Matsumoto, J.; Takata, F.; Machida, T.; Takahashi, H.; Soejima, Y.; Funakoshi, M.; Futagami, K.; Yamauchi, A.; Dohgu, S.; Kataoka, Y.: Tumor necrosis factor- α -stimulated brain pericytes possess a unique cytokine and chemokine release profile and enhance microglial activation. *Neurosci Lett.* 578. 133–138 (2014).
- 78 Mayo, J. N.; Bearden, S. E.: Driving the Hypoxia-Inducible Pathway in Human Pericytes Promotes Vascular Density in an Exosome-Dependent Manner. *Microcirculation.* 22 (8). 711–723 (2015).
- 79 Mennuni, S.; Rubattu, S.; Pierelli, G.; Tocci, G.; Fofi, C.; Volpe, M.: Hypertension and kidneys: unraveling complex molecular mechanisms underlying hypertensive renal damage. *J Hum Hypertens.* 28 (2). 74–79 (2014).
- 80 Mustapha, M.; Nassir, C. M. N. C. M.; Aminuddin, N.; Safri, A. A.; Ghazali, M. M.: Cerebral Small Vessel Disease (CSVD) - Lessons From the Animal Models. *Front Physiol.* 10. 1317 (2019).
- 81 Nabika, T.; Ohara, H.; Kato, N.; Isomura, M.: The stroke-prone spontaneously hypertensive rat: still a useful model for post-GWAS genetic studies? *Hypertens Res.* 35 (5). 477–484 (2012).
- 82 Nakagawa, S.; Deli, M. A.; Kawaguchi, H.; Shimizudani, T.; Shimono, T.; Kittel, A.; Tanaka, K.; Niwa, M.: A new blood-brain barrier model using primary rat brain endothelial cells, pericytes and astrocytes. *Neurochem Int.* 54 (3-4). 253–263 (2009).
- 83 Nakagomi, T.; Kubo, S.; Nakano-Doi, A.; Sakuma, R.; Lu, S.; Narita, A.; Kawahara, M.; Taguchi, A.; Matsuyama, T.: Brain vascular pericytes following ischemia have multipotential stem cell activity to differentiate into neural and vascular lineage cells. *Stem Cells.* 1962–1974 (2015).

- 84 Nakazaki, M.; Sasaki, M.; Kataoka-Sasaki, Y.; Oka, S.; Suzuki, J.; Sasaki, Y.; Nagahama, H.; Hashi, K.; Kocsis, J. D.; Honmou, O.: Intravenous infusion of mesenchymal stem cells improves impaired cognitive function in a cerebral small vessel disease model. *Neuroscience*. 408. 361–377 (2019).
- 85 Nelson, A. R.; Sagare, M. A.; Wang, Y.; Kisler, K.; Zhao, Z.; Zlokovic, B. V.: Channelrhodopsin Excitation Contracts Brain Pericytes and Reduces Blood Flow in the Aging Mouse Brain in vivo. *Front Aging Neurosci*. 12. 108 (2020).
- 86 Nikolakopoulou, A. M.; Montagne, A.; Kisler, K.; Dai, Z.; Wang, Y.; Huuskonen, M. T.; Sagare, A. P.; Lazic, D.; Sweeney, M. D.; Kong, P. et al.: Pericyte loss leads to circulatory failure and pleiotrophin depletion causing neuron loss. *Nat Neurosci*. 22 (7). 1089–1098 (2019).
- 87 Nishioku, T.; Dohgu, S.; Takata, F.; Eto, T.; Ishikawa, N.; Kodama, K. B.; Nakagawa, S.; Yamauchi, A.; Kataoka, Y.: Detachment of brain pericytes from the basal lamina is involved in disruption of the blood-brain barrier caused by lipopolysaccharide-induced sepsis in mice. *Cell Mol Neurobiol*. 309–316 (2009).
- 88 Okamoto, K.; Yamori, Y.; Nagaoka, A.: Establishment of the stroke-prone spontaneously hypertensive rat (SHR). *Circ Res*. 34. 143–153 (1974).
- 89 Omote, Y.; Deguchi, K.; Kono, S.; Liu, N.; Liu, W.; Kurata, T.; Yamashita, T.; Ikeda, Y.; Abe, K.: Neurovascular protection of cilostazol in stroke-prone spontaneous hypertensive rats associated with angiogenesis and pericyte proliferation. *J Neurosci Res*. 92 (3). 369–374 (2014).
- 90 Otero-Ortega, L.; Laso-García, F.; Del Gómez-de Frutos, M. C.; Rodríguez-Frutos, B.; Pascual-Guerra, J.; Fuentes, B.; Díez-Tejedor, E.; Gutiérrez-Fernández, M.: White Matter Repair After Extracellular Vesicles Administration in an Experimental Animal Model of Subcortical Stroke. *Sci Rep*. 7. 44433 (2017).
- 91 Ozden, S.; Seilhean, D.; Gessain, A.; Hauw, J.-J.; Gout, O.: Severe demyelinating myelopathy with low human T cell lymphotropic virus type 1 expression after transfusion in an immunosuppressed patient. *Clin Infect Dis*. 855–860 (2002).
- 92 Özen, I.; Deierborg, T.; Miharada, K.; Padel, T.; Englund, E.; Genové, G.; Paul, G.: Brain pericytes acquire a microglial phenotype after stroke. *Acta Neuropathol*. 128 (3). 381–396 (2014).
- 93 Pachter, J. S.; Vries, H. E. de; Fabry, Z.: The blood-brain barrier and its role in immune privilege in the central nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol*. 62 (6). 593–604 (2003).
- 94 Pan, C.; Kumar, C.; Bohl, S.; Klingmueller, U.; Mann, M.: Comparative proteomic phenotyping of cell lines and primary cells to assess preservation of cell type-specific functions. *Mol Cell Proteomics*. 8 (3). 443–450 (2009).
- 95 Pantoni, L.: Cerebral small vessel disease: from pathogenesis and clinical characteristics to therapeutic challenges. *The Lancet Neurology*. 9 (7). 689–701 (2010).
- 96 Parida, B. K.; Garrastazu, H.; Aden, J. K.; Cap, A. P.; McFaul, S. J.: Silica microspheres are superior to polystyrene for microvesicle analysis by flow cytometry. *Thromb Res*. 135 (5). 1000–1006 (2015).
- 97 Paul, G.; Özen, I.; Christophersen, N. S.; Reinbothe, T.; Bengzon, J.; Visse, E.; Jansson, K.; Dannaeus, K.; Henriques-Oliveira, C.; Roybon, L. et al.: The adult human brain harbors multipotent perivascular mesenchymal stem cells. *PLoS One*. e35577 (2012).
- 98 Peppiatt, C. M.; Howarth, C.; Mobbs, P.; Attwell, D.: Bidirectional control of CNS capillary diameter by pericytes. *Nature*. 443 (7112). 700–704 (2006).

- 99 Persidsky, Y.; Hill, J.; Zhang, M.; Dykstra, H.; Winfield, M.; Reichenbach, N. L.; Potula, R.; Mukherjee, A.; Ramirez, S. H.; Rom, S.: Dysfunction of brain pericytes in chronic neuroinflammation. *J Cereb Blood Flow Metab.* 36 (4). 794–807 (2015).
- 100 Pieper, C.; Marek, J. J.; Unterberg, M.; Schwerdtle, T.; Galla, H.-J.: Brain capillary pericytes contribute to the immune defense in response to cytokines or LPS in vitro. *Brain Research.* 1–8 (2014).
- 101 Plass, D.; Vos, T.; Hornberg, C.; Scheidt-Nave, C.; Zeeb, H.; Krämer, A.: Trends in disease burden in Germany: results, implications and limitations of the Global Burden of Disease study. *Dtsch Arztebl Int.* 111 (38). 629–638 (2014).
- 102 Pober, J. S.; Merola, J.; Liu, R.; Manes, T. D.: Antigen Presentation by Vascular Cells. *Front Immunol.* 8. 1907 (2017).
- 103 Pocsfalvi, G.; Stanly, C.; Vilasi, A.; Fiume, I.; Capasso, G.; Turiák, L.; Buzas, E. I.; Vékey, K.: Mass spectrometry of extracellular vesicles. *Mass Spectrom Rev.* 35 (1). 3–21 (2016).
- 104 Polito, A.; Reynolds, R.: NG2-expressing cells as oligodendrocyte progenitors in the normal and demyelinated adult central nervous system. *J Anat.* 207 (6). 707–716 (2005).
- 105 Pospichalova, V.; Svoboda, J.; Dave, Z.; Kotrbova, A.; Kaiser, K.; Klemova, D.; Ilkovic, L.; Hampl, A.; Crha, I.; Jandakova, E. et al.: Simplified protocol for flow cytometry analysis of fluorescently labeled exosomes and microvesicles using dedicated flow cytometer. *J Extracell Vesicles.* 4. 25530 (2015).
- 106 Rajani, R. M.; Quick, S.; Ruigrok, S. R.; Graham, D.; Harris, S. E.; Verhaaren, B. F. J.; Fornage, M.; Seshadri, S.; Atanur, S. S.; Dominiczak, A. F. et al.: Reversal of endothelial dysfunction reduces white matter vulnerability in cerebral small vessel disease in rats. *Sci Transl Med.* 10 (448) (2018).
- 107 Reese, T. S.; Karnovsky, M. J.: Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase. *J Cell Biol.* 34 (1). 207–217 (1967).
- 108 Rensma, S. P.; van Sloten, T. T.; Launer, L. J.; Stehouwer, C. D. A.: Cerebral small vessel disease and risk of incident stroke, dementia and depression, and all-cause mortality: A systematic review and meta-analysis. *Neurosci Biobehav Rev.* 90. 164–173 (2018).
- 109 Rustenhoven, J.; Jansson, D.; Smyth, L. C.; Dragunow, M.: Brain Pericytes As Mediators of Neuroinflammation. *Trends Pharmacol Sci.* 38 (3). 291–304 (2017).
- 110 Saunders, W. B.; Bohnsack, B. L.; Faske, J. B.; Anthis, N. J.; Bayless, K. J.; Hirschi, K. K.; Davis, G. E.: Coregulation of vascular tube stabilization by endothelial cell TIMP-2 and pericyte TIMP-3. *J Cell Biol.* 175 (1). 179–191 (2006).
- 111 Schneider, C. A.; Rasband, W. S.; Eliceiri, K. W.: NIH Image to ImageJ: 25 years of Image Analysis. *Nat Methods.* 9 (7). 671–675 (2012).
- 112 Schreiber, S.; Bueche, C. Z.; Garz, C.; Braun, H.: Blood brain barrier breakdown as the starting point of cerebral small vessel disease? - New insights from a rat model. *Exp Transl Stroke Med.* 5 (1). 4 (2013).
- 113 Schreiber, S.; Bueche, C. Z.; Garz, C.; Kropf, S.; Kuester, D.; Amann, K.; Heinze, H.-J.; Goertler, M.; Reymann, K. G.; Braun, H.: Kidney pathology precedes and predicts the pathological cascade of cerebrovascular lesions in stroke prone rats. *PLoS One.* 6 (10). e26287 (2011).
- 114 Schultz, N.; Byman, E.; Fex, M.; Wennström, M.: Amylin alters human brain pericyte viability and NG2 expression. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1470–1482 (2017).

- 115 Seino, K.; Azuma, M.; Bashuda, H.; Fukao, K.; Yagita, H.; Okumura, K.: CD86 (B70/B7-2) on endothelial cells co-stimulates allogeneic CD4⁺ T cells. *Int Immunol.* 7 (8). 1331–1337 (1995).
- 116 Shao, H.; Im, H.; Castro, C. M.; Breakefield, X.; Weissleder, R.; Lee, H.: New Technologies for Analysis of Extracellular Vesicles. *Chem Rev.* 118 (4). 1917–1950 (2018).
- 117 Shibota, M.; Nagaoka, A.; Shino, A.; Fujita, T.: Renin-angiotensin system in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol.* 236 (3). H409-16 (1979).
- 118 Skaper, S. D.: Neurotrophic Factors: An Overview. *Methods Mol Biol.* 1727. 1–17 (2018).
- 119 Słomka, A.; Urban, S. K.; Lukacs-Kornek, V.; Żekanowska, E.; Kornek, M.: Large Extracellular Vesicles: Have We Found the Holy Grail of Inflammation? *Front Immunol.* 9 (2018).
- 120 Smyth, L. C. D.; Rustenhoven, J.; Scotter, E. L.; Schweder, P.; Faull, R. L. M.; Park, T. I. H.; Dragunow, M.: Markers for human brain pericytes and smooth muscle cells. *J Chem Neuroanat.* 92. 48–60 (2018).
- 121 Song, I.-H.; Caplan, A. I.; Dennis, J. E.: Dexamethasone inhibition of confluence-induced apoptosis in human mesenchymal stem cells. *J Orthop Res.* 27 (2). 216–221 (2009).
- 122 Stallcup, W. B.: The NG2 Proteoglycan in Pericyte Biology. *Adv Exp Med Biol.* 1109. 5–19 (2018).
- 123 Stratman, A. N.; Malotte, K. M.; Mahan, R. D.; Davis, M. J.; Davis, G. E.: Pericyte recruitment during vasculogenic tube assembly stimulates endothelial basement membrane matrix formation. *Blood.* 114 (24). 5091–5101 (2009).
- 124 Sweeney, M. D.; Ayyadurai, S.; Zlokovic, B. V.: Pericytes of the neurovascular unit: key functions and signaling pathways. *Nat Neurosci.* 19 (6). 771–783 (2016).
- 125 Teichert, M.; Milde, L.; Holm, A.; Stanicek, L.; Gengenbacher, N.; Savant, S.; Ruckdeschel, T.; Hasanov, Z.; Srivastava, K.; Hu, J. et al.: Pericyte-expressed Tie2 controls angiogenesis and vessel maturation. *Nat Commun.* 8. 16106 (2017).
- 126 Telgte, A. ter; van Leijsen, E. M. C.; Wiegertjes, K.; Klijn, C. J. M.; Tuladhar, A. M.; Leeuw, F.-E. de: Cerebral small vessel disease: from a focal to a global perspective. *Nat Rev Neurol.* 14 (7). 387–398 (2018).
- 127 Thanabalasundaram, G.; Pieper, C.; Lischper, M.; Galla, H.-J.: Regulation of the blood-brain barrier integrity by pericytes via matrix metalloproteinases mediated activation of vascular endothelial growth factor in vitro. *Brain Research.* 1347. 1–10 (2010).
- 128 Théry, C.; Witwer, K. W.; Aikawa, E.; Alcaraz, M. J.; Anderson, J. D.; Andriantsitohaina, R.; Antoniou, A.; Arab, T.; Archer, F.; Atkin-Smith, G. K. et al.: Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J Extracell Vesicles.* 7 (1) (2018).
- 129 Thijssen, V. L.; Paulis, Y. W.; Nowak-Sliwinska, P.; Deumelandt, K. L.; Hosaka, K.; Soetekouw, P. M.; Cimpean, A. M.; Raica, M.; Pauwels, P.; van den Oord, J. J. et al.: Targeting PDGF-mediated recruitment of pericytes blocks vascular mimicry and tumor growth. *J Pathol.* 246 (4). 447–458 (2018).
- 130 Tigges, U.; Welser-Alves, J. V.; Boroujerdi, A.; Milner, R.: A novel and simple method for culturing pericytes from mouse brain. *Microvasc Res.* 84 (1). 74–80 (2012).
- 131 Tricarico, C.; Clancy, J.; D'Souza-Schorey, C.: Biology and biogenesis of shed microvesicles. *Small GTPases.* 8 (4). 220–232 (2017).

- 132 Underly, R. G.; Levy, M.; Hartmann, D. A.; Grant, R. I.; Watson, A. N.; Shih, A. Y.: Pericytes as Inducers of Rapid, Matrix Metalloproteinase-9-Dependent Capillary Damage during Ischemia. *J Neurosci.* 37 (1). 129–140 (2017).
- 133 Urabe, F.; Kosaka, N.; Ito, K.; Kimura, T.; Egawa, S.; Ochiya, T.: Extracellular vesicles as biomarkers and therapeutic targets for cancer. *Am J Physiol Cell Physiol.* 318 (1). C29-C39 (2020).
- 134 van der Pol, E.; Böing, A. N.; Harrison, P.; Sturk, A.; Nieuwland, R.: Classification, functions, and clinical relevance of extracellular vesicles. *Pharmacol Rev.* 64 (3). 676–705 (2012).
- 135 van der Pol, E.; Sturk, A.; van Leeuwen, T.; Nieuwland, R.; Coumans, F.: Standardization of extracellular vesicle measurements by flow cytometry through vesicle diameter approximation. *J Thromb Haemost.* 16 (6). 1236–1245 (2018).
- 136 van Kralingen, J. C.; McFall, A.; Ord, E. N. J.; Coyle, T. F.; Bissett, M.; McClure, J. D.; McCabe, C.; Macrae, I. M.; Dawson, J.; Work, L. M.: Altered Extracellular Vesicle MicroRNA Expression in Ischemic Stroke and Small Vessel Disease. *Transl Stroke Res.* 10 (5). 495–508 (2019).
- 137 Vanlandewijck, M.; He, L.; Mäe, M. A.; Andrae, J.; Ando, K.; Del Gaudio, F.; Nahar, K.; Lebouvier, T.; Laviña, B.; Gouveia, L. et al.: A molecular atlas of cell types and zonation in the brain vasculature. *Nature.* 554 (7693). 475–480 (2018).
- 138 Wang, M. M.: CADASIL. *Handb Clin Neurol.* 148. 733–743 (2018).
- 139 Wiklander, O. P. B.; Brennan, M. Á.; Lötval, J.; Breakefield, X. O.; EL Andaloussi, S.: Advances in therapeutic applications of extracellular vesicles. *Sci Transl Med.* 11 (492) (2019).
- 140 Wong, A. D.; Ye, M.; Levy, A. F.; Rothstein, J. D.; Bergles, D. E.; Searson, P. C.: The blood-brain barrier: an engineering perspective. *Front Neuroeng.* 6. 7 (2013).
- 141 Xing, C.; Arai, K.; Lo, E. H.; Hommel, M.: Pathophysiologic cascades in ischemic stroke. *Int J Stroke.* 7 (5). 378–385 (2012).
- 142 Yamamoto, S.; Niida, S.; Azuma, E.; Yanagibashi, T.; Muramatsu, M.; Huang, T. T.; Sagara, H.; Higaki, S.; Ikutani, M.; Nagai, Y. et al.: Inflammation-induced endothelial cell-derived extracellular vesicles modulate the cellular status of pericytes. *Sci Rep.* 5. 8505 (2015).
- 143 Yang, S.; Jin, H.; Zhu, Y.; Wan, Y.; Opoku, E. N.; Zhu, L.; Hu, B.: Diverse Functions and Mechanisms of Pericytes in Ischemic Stroke. *Curr Neuropharmacol.* 15 (6). 892–905 (2017).
- 144 Yuan, X.; Wu, Q.; Wang, P.; Jing, Y.; Yao, H.; Tang, Y.; Li, Z.; Zhang, H.; Xiu, R.: Exosomes Derived From Pericytes Improve Microcirculation and Protect Blood-Spinal Cord Barrier After Spinal Cord Injury in Mice. *Front Neurosci.* 13. 319 (2019).
- 145 Zehendner, C. M.; Sebastiani, A.; Hugonnet, A.; Bischoff, F.; Luhmann, H. J.; Thal, S. C.: Traumatic brain injury results in rapid pericyte loss followed by reactive pericytosis in the cerebral cortex. *Sci Rep.* 5 (2015).
- 146 Zhou, Y.-F.; Li, Y.-N.; Jin, H.-J.; Wu, J.-H.; He, Q.-W.; Wang, X.-X.; Lei, H.; Hu, B.: Sema4D/PlexinB1 inhibition ameliorates blood-brain barrier damage and improves outcome after stroke in rats. *FASEB J.* 32 (4). 2181–2196 (2018).
- 147 Zimmermann, K. W.: Der feinere Bau der Blutcapillaren. *Z. Anat. Entwickl. Gesch.* 68 (1). 29–109 (1923).
- 148 Zlokovic, B. V.: Neurovascular mechanisms of Alzheimer's neurodegeneration. *Trends Neurosci.* 28 (4). 202–208 (2005).

Anhang

Tabelle 8 – Geräte

Gerät	Hersteller	Modell
Abzüge	Thermo Scientific	Safe 2020
	Kisher	UVC/T-M-AR
	Heraeus	LaminAIR Hb 2448
Durchflusszytometer	Invitrogen	Attune NxT Flow Cytometer
Homogenisator	Benchmark Scientific	Beadbug 6
Inkubator	New Brunswick	Innova 4230
Kryostat	Thermo Scientific	CryoStar NX50
Kühlschränke	Liebherr	Mediline, Frostline, Glassline
Mikroskopadapter	Aomekie	AO7020 Universal Adapter
Mikroskope	Zeiss	Axiovert 100 M
	Zeiss	Axiovert 200
	Zeiss	Axiovert 25
Mikrozentrifuge	VWR	MiniStar
Mobiltelefon	Apple	iPhone SE
Rotor	Labinco	LD79
Schüttler	IKA	Vibrax VXR
Spectrophotometer	Thermo Scientific	NanoDrop 2000
Thermomixer	Eppendorf	Thermomixer comfort
Thermozykler	Roche	LightCycler 96
Ultratiefkühlschrank	Eward	V86-600.1
Ultrazentrifugen	Thermo Scientific	Sorvall Discovery 90
	Beckman Coulter	Optima XPN-80
Vortexer	Scientific Industries	Vortex-Genie 2
Waage	Sartorius	MC1
Wärmeschrank	Memmert	400
Wasserbad	GFL	1083
Zellinkubatoren	Heraeus	Functionline BB 16
	Heraeus	Heracell
Zentrifugen	Fisher Scientific	accuSpin Micro 17R
	Thermo Scientific	Megafuge 40R
	Thermo Scientific	Sorvall RC-5C Plus
Zellzähltafel	Neubauer	Improved

Tabelle 9 – Verbrauchsmaterialien

Laborartikel	Hersteller	Modell, Katalognummer
Deckgläser	Carl Roth	Deckgläser 22 x 22 mm, H874.2
Einbettungsformen	Polysciences	Peel-A-Way Embedding Molds, 18646D-1
Einwegskalpell	Feather	Feather Disposable Scalpel No 10, 02.001.30.010
FACS-Röhrchen	Falcon	5 mL Round Bottom Polystyrene Tube, 352052
Filterpapier	Macherey-Nagel	Rundfilter, MN615, Glatt, 431012
Gefrierbehälter	Thermo Scientific	Mr. Frosty, 5100-0001
Handschuhe	Ansell	Micro-Touch Coated, Latex, M, 553304
Kanülen	Becton Dickinson	Microlance 3 Aufziehkanüle 18 G, BD304622
	Braun	Sterican 20G, 4657519
	Braun	Sterican 26G, 4657683
	Greiner	CellStar 6 Well, 657160
	Greiner	CellStar 12 Well, 665180
Multiwell-Platten	Greiner	CellStar 96 Well, 665161
	Thermo Scientific	SuperFrost, 10149870
Objektträger	Brand	Transferpette S -8 20 - 200 µl
Pipetten	Eppendorf	Research 20, 100, 200, 500 und 1000
	Sarstedt	200µL, 70.3030.020
Pipettenspitzen	Sarstedt	1000µL, 70.762.010
	Molecular Bio-Products	10µl Pure, 3500
	Brand	Accu-jet pro
Pipettierhelfer	Sarstedt	Safeseal, 72.704
Reagiergefäße, 0,5mL	Sarstedt	Safeseal, 72.706
Reagiergefäße, 1,5mL	Carl Roth	Multi SafeSeal, 7083
Reagiergefäße, 2mL	Greiner	Cellstar, 10mL, 607180
Serologische Pipetten	Greiner	Cellstar, 25mL, 760180
	Becton Dickinson	Discardit II 20mL, 300296
	Becton Dickinson	Discardit II 10mL, 309110
Spritzen	Becton Dickinson	Discardit II 20mL, 300928
	Millipore	Millex-GS, 0,22 µm, SLGL0250S
	Greiner	CellStar 250mL, 75cm ² , Filter, 658170
Steriler Filter	Greiner	CellStar 100/20mm, 664160
Zellkulturflasche	Falcon	40µm, 352340
Zellkulturschale	Zymo Research	ZR BashingBead Lysis Tubes, S6003-50
Zellsieb	Greiner	CellStar, 188271
Zellzerkleinerungsgefäß	Greiner	CellStar, 227261
Zentrifugenröhrchen, 15mL		
Zentrifugenröhrchen, 50mL		
Zerkleinerungskugeln	Bertin	Zirconium oxide beads, P000926-LYSK0-A

Tabelle 10 – Chemikalien

Chemikalie	Hersteller	Katalognummer
2-Methylbutan	Carl Roth	3927.1
Accutase Cell Detachment Solution	BioLegend	423201
BSA	Sigma-Aldrich	A7096
CFSE	eBioscience	65-0850-84
Chloroform	Carl Roth	7331.2
Citronensäure	Carl Roth	1818.1
Collagenase/Dispase	Roche	11097113001
D(+)-Glucose Monohydrat	Carl Roth	6887.1
D(+)-Saccharose	Carl Roth	4661
DMEM/F-12, GlutaMAX supplement	Gibco	31331028
DMSO	Sigma-Aldrich	D2650
Dnase I	Roche	DN25-1G
DNase/RNase-freies destilliertes Wasser	Invitrogen	10977-035
DPBS mit Kalzium und Magnesium	Gibco	14040-091
DPBS ohne Kalzium und Magnesium	Gibco	14190-094
Ethanol 96% V/V	Otto Fischar	27688
FKS	Corning	35-079-CV
FM 4-64FX	Invitrogen	F34653
Hanks' Balanced Salt Solution	Carl Roth	9122.1
Ionomycin	Sigma-Aldrich	I0634
Isofluran	CP-Phrama	1214
Isopropanol	Zentralapotheke Uni MD	200-661-7
Kollagenase II aus Clostridium histolyticum	Sigma Aldrich	C6885
L-Alanyl-L-Glutamine	Biochrom	K0302
MEM Non-Essential Amino Acids	Gibco	11140-050
Natriumazid	Carl Roth	K305
Natriumhypochloritlösung	Carl Roth	9062
Normal Goat Serum	Vector Laboratories	S-1000
Normal Horse Serum	Vector Laboratories	S-2000
O.C.T. Compound	Tissue Tek	4583
PBS (10x) ohne Kalzium und Magnesium	Lonza	BE17-517Q
Penicillin-Streptomycin	Sigma-Aldrich	P0781
Percoll	Sigma-Aldrich	GE17-0891-01
Permeabilization/Wash Buffer (10X)	BioLegend	421002
PFA, 4% in PBS	Thermo Scientific	J19943.K2
Phorbol-12-myristat-13-acetat	Sigma-Aldrich	P1585
ProLong Gold Antifade Mountant w/ DAPI	Invitrogen	P36931
RBC Lysis Buffer (10x)	BioLegend	420301
Red Fluorescent Silica Particles, 200nm	Creative Diagnostics	DNG-L017
Red Fluorescent Silica Particles, 300nm	Creative Diagnostics	DNG-L020
Red Fluorescent Silica Particles, 500nm	Creative Diagnostics	DNG-L025
Red Fluorescent Silica Particles, 1000nm	Creative Diagnostics	DNG-L026
RNAlater	Sigma-Aldrich	R0901
Roti Liquid Barrier Marker	Carl Roth	AN92.2
TriFast	PeqLab	30-2010
Tri-Natriumcitrat Dihydrat	Carl Roth	3580.1
Triton X 100	Carl Roth	3051.3
Trypan blue	Biochrom	L6323
TWEEN 20	Sigma-Aldrich	P1379
UltraComp eBeads Compensation Beads	Invitrogen	01-2222-42
Very Low Endotoxin-DMEM	Biochrom	FG-1445

Danksagungen

Zu allererst möchte ich mich herzlich bei meiner Betreuerin Prof. Dr. rer. nat. habil. Ildiko Rita Dunay bedanken, die mir das Thema dieser Arbeit gegeben hat und die Möglichkeiten, es zu erforschen. Sie hat mich in meiner Zeit im Institut unterstützt, meine Ideen gefördert, und sich persönlich um mein Stipendium gekümmert, wofür ich ihr immer dankbar sein werde. Besonderer Dank geht auch an Prof. Dr. med. Stefanie Schreiber, die mich zuerst in der Suche nach einer Promotionsstelle an das IIN vermittelt hat und mir dann die Tiere für die Versuche bereitstellte sowie Prof. Dr. rer. nat. Dunja Bruder, die mich freundlicherweise im Rahmen des SFB 854 mitbetreute.

Ein Riesendank geht an Lorena Morton, die mich mit Engagement und Geduld in die Perizytengruppe aufgenommen und mir die Arbeit im Labor beigebracht hat. Lorena war mein Fels in der Brandung und ich hoffe, dass ich sie auch so unterstützen konnte, wie sie es oft für mich tat. Vielen Dank auch an Rebecca Boer und Sarah Dybowski, mit denen ich das Privileg hatte, in einer Gruppe zusammenzuarbeiten. Ich möchte mich zusätzlich herzlich bei Petra Grüneberg und Dr. Abidat Schneider sowie Cornelia Garz des DZNE bedanken, die mir jederzeit hilfsbereit bei den Versuchen assistiert haben.

Ebenfalls unerlässlich für das Erstellen dieser Dissertation waren die wissenschaftlichen Mitarbeiter des IIN, die sich immer Zeit für meine Fragen genommen haben und den Arbeitsalltag (und die Falcon Fridays) im Labor sehr angenehm gemacht haben. Ich hoffe, euch noch lange nach meiner Promotion als Freunde zählen zu dürfen. Vielen Dank also an Henning Düsedau, Stefanie Ehrentraut, Caio Figueiredo, Timothy French, Alejandra Garza und Johannes Steffen.

Natürlich möchte ich auch meinen Freunden danken, die immer ein offenes Ohr für meine Sorgen und schlechten Witze gehabt haben und mich so unterstützten. Zu guter Letzt geht mein Dank an meine Familie, ohne die das alles nicht möglich gewesen wäre. An meine Eltern, die mir menschlich und materiell beistanden und mir so die Chance gaben, diesen Pfad im Leben zu gehen. An meine Großeltern, die mein Interesse in Medizin und Forschung weckten und mich zu dem Menschen machten, der ich heute bin.

Ehrenerklärung und Erklärung der Straffreiheit

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

Charakterisierung von Perizyten und ihren Mikrovesikeln in einem Modell für zerebrale Mikroangiopathie

im Institut für Inflammation und Neurodegeneration (IIN) mit Unterstützung durch Prof. Dr. rer. nat. habil. Ildiko Rita Dunay und den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des IIN und DZNE ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Bei der Abfassung der Dissertation sind Rechte Dritter nicht verletzt worden. Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Ich übertrage der Medizinischen Fakultät das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Diese Arbeit wurde durch die Graduiertenförderung des Sonderforschungsbereiches 854 der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg unterstützt.

Magdeburg, den

Unterschrift

Ich erkläre hiermit weiterhin, nicht wegen einer Straftat verurteilt worden zu sein, die Wissenschaftsbezug hat.

Magdeburg, den

Unterschrift

Bildungsweg

Studium der Humanmedizin an der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

10/2015 – 03/2021 Klinischer Teil des Medizinstudiums

3. Staatsexamen 11/2020, Note: sehr gut

Praktisches Jahr 11/2019 – 10/2020

Doktorandenstelle für 2 Freisemester im Institut für Inflammation
und Neurodegeneration 11/2018 – 11/2019

2. Staatsexamen 10/2018, Note: gut

10/2013 – 09/2015 Vorklinischer Teil des Medizinstudiums

1. Staatsexamen 10/2015, Note: gut

Allgemeine Hochschulreife

08/2005 – 07/2013 Werner-von-Siemens-Gymnasium Magdeburg, Abiturnote: 1,3

Grundschule

08/2001 – 07/2005 Grundschule am Heiderand, Samswegen

Magdeburg, den

Unterschrift