

Aus dem Institut für Transfusionsmedizin und Immunologie  
der Medizinischen Fakultät Mannheim  
Direktor: Prof. Dr. med. Harald Klüter

Vergleichende Analyse von retinalen Perizyten und Fett-abgeleiteten  
mesenchymal stromalen Zellen vor dem Hintergrund hyperglykämischer  
Modifikationen der extrazellulären Matrix im Rahmen der diabetischen  
Retinopathie

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des medizinischen Doktorengrades  
der  
Medizinischen Fakultät Mannheim  
der Ruprecht-Karls-Universität  
zu  
Heidelberg

vorgelegt von  
Julian Eduard Gebauer  
aus Bad Oeynhausen

2021

Dekan: Prof. Dr. med. Sergji Goerd  
Referent: Prof. Dr. rer. nat. Karen Bieback

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>6</b>
1.1	Diabetes mellitus und Diabetische Retinopathie . . . . .	6
1.2	Pathomechanismus der diabetischen Retinopathie . . . . .	7
1.3	Diabetische Retinopathie und extrazelluläre Matrix . . . . .	8
1.4	Mesenchymal stromale Zellen und zellbasierte Therapiekonzepte . . .	9
1.5	Diabetische Retinopathie und mesenchymal stromale Zellen . . . . .	10
1.6	Vorarbeiten und Ziel der Studie . . . . .	11
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>14</b>
2.1	Material . . . . .	14
2.2	Methoden . . . . .	22
2.2.1	Allgemeine Zellkulturmethoden . . . . .	22
2.2.2	Adhäsions und Proliferationsexperimente auf extrazellulärer Matrix . . . . .	23
2.2.3	Einfluss hoher Glukose auf die extrazelluläre Matrix von Endothelzellen . . . . .	24
2.2.4	Vergleichende Analyse von ASC und Perizyten . . . . .	26
2.2.5	Statistik . . . . .	29
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>31</b>
3.1	Adhäsion und Proliferation von ASC und Perizyten auf HRMVEC- ECM . . . . .	31
3.2	Einfluss hoher Glukose auf Endothelzellen und ihre extrazelluläre Ma- trix . . . . .	34
3.2.1	Glykosaminoglykane . . . . .	34
3.2.2	Zymographie . . . . .	35
3.2.3	Advanced Glycation Endproducts . . . . .	37
3.2.4	Carbonylierung . . . . .	38

3.2.5	Veränderungen der mechanischen Eigenschaften der ECM . . .	39
3.2.6	HUVEC RT-qPCR . . . . .	39
3.3	Vergleichende Analyse von ASC und Perizyten . . . . .	42
3.3.1	Morphologie und Kulturverhalten . . . . .	42
3.3.2	Genexpressionsanalyse auf Basis der Arraydaten . . . . .	43
3.3.3	Expression von Oberflächenantigenen . . . . .	45
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>52</b>
4.1	Zusammenfassung der Ergebnisse . . . . .	52
4.2	Einfluss hoher Glukose auf die extrazelluläre Matrix von retinalen Endothelzellen . . . . .	53
4.2.1	Glykosaminoglykane . . . . .	53
4.2.2	Matrix-Metalloproteinasen . . . . .	54
4.2.3	Advanced Glycation Endproducts . . . . .	55
4.2.4	Carbonylierung . . . . .	56
4.2.5	Einfluss hoher Glukose auf die mechanischen Eigenschaften der ECM . . . . .	57
4.3	Vergleichende Analyse von ASC und Perizyten . . . . .	58
4.3.1	Perizyten- und MSC-Marker . . . . .	60
4.3.2	Funktioneller Vergleich von ASC und Perizyten . . . . .	61
4.4	ASC und zellbasierte Therapieansätze der diabetischen Retinopathie .	64
4.5	Schlussfolgerung . . . . .	65
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>66</b>
<b>6</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>68</b>
<b>7</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>69</b>
<b>8</b>	<b>Quellenverzeichnis</b>	<b>70</b>
8.1	Eigene Publikationen . . . . .	70
8.2	Literaturverzeichnis . . . . .	71
8.3	R-Softwarepakete . . . . .	79
<b>9</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>80</b>
<b>10</b>	<b>Danksagung</b>	<b>81</b>

# Anmerkung

Teilergebnisse dieser Dissertation sind vorab bereits veröffentlicht worden:

H. Kremer et al. (2020). Pro-angiogenic Activity Discriminates Human Adipose-Derived Stromal Cells From Retinal Pericytes: Considerations for Cell-Based Therapy of Diabetic Retinopathy. doi: [10.3389/fcell.2020.00387](https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00387)

J. Hafner et al. (2020). Monitoring matrix remodeling in the cellular microenvironment using microrheology for complex cellular systems. *Acta Biomater.* 111, 254–266. doi: [10.1016/j.actbio.2020.04.053](https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.04.053)

# Abkürzungen

AGE	Advanced Glycation Endproducts
ASC	Fettgewebe-abgeleitete stromale Zellen
CSPC	humane retinale Perizyten
DR	diabetische Retinopathie
ECM	extrazelluläre Matrix
GAG	Glykosaminoglykane
HG	hohe Glukose
HRMVEC	humane retinale mikrovaskuläre Endothelzellen
HRMVPC	humane retinale mikrovaskuläre Perizyten
HUVEC	human umbilical vein endothelial cells
MGO	Methylglyoxal
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MPT	multiple particle tracking
MSC	mesenchymal stromale Zellen
NG	normale Glukose
ROS	reaktive Sauerstoffspezies

# 1 Einleitung

## 1.1 Diabetes mellitus und Diabetische Retinopathie

Diabetes mellitus bezeichnet eine Gruppe von Stoffwechselerkrankungen, welche durch eine chronisch gestörte Regulation der Blutglukose gekennzeichnet sind. 2017 wurde die weltweite Prävalenz von Diabetes unter den 18 - 79-jährigen auf 425 Millionen Fälle geschätzt (Cho et al. 2018). In Deutschland lag die Lebenszeitprävalenz 2011 bei 7,2%, das entsprach ca. 4,6 Millionen der deutschen 18 - 79-jährigen (Kurth et al. 2012).

Die diabetische Retinopathie (DR) ist eine der schwerwiegendsten diabetischen Komplikationen. Sie gilt als häufigste Ursache für Erblindung im arbeitsfähigen Alter, wobei die Prävalenz der DR unter deutschen Diabetikern 2015 21,7% betrug. Bei 5% der Diabetiker bestand die Gefahr der Erblindung (Raum et al. 2015).

Obwohl eine enge Kontrolle des Blutzuckerspiegels die Prävalenz der DR deutlich verringert, kann ein gut eingestellter Blutzuckerspiegel die DR nicht komplett verhindern (Colagiuri et al. 2011). Auch mit aktuellen Therapieansätzen, wie intravitrealen Glukokortikoid-Injektionen, Laser-Photokoagulation, PKC-Inhibitoren oder Anti-VEGF-Antikörpern, ist die Progression der DR derzeit nicht komplett aufzuhalten (Whitehead et al. 2018). Daher besteht großer Bedarf an neuartigen Therapieansätzen.

Im Rahmen des Internationalen Graduiertenkollegs DIAMICOM untersucht unsere Arbeitsgruppe die Hypothese, dass mesenchymal stromale Zellen (MSC), vor allem Fettgewebe-abgeleitete stromale Zellen (ASC), sich zur Etablierung einer zellbasierten Therapie für die DR eignen. Dieser Hypothese liegen komplexe pathomechanische Veränderungen der Interaktion zwischen Endothelzellen und Perizyten

und extrazellulären Matrix (ECM) zugrunde, welche in dieser Arbeit untersucht werden.

## **1.2 Pathomechanismus der diabetischen Retinopathie**

Als Hauptkomponenten des Pathomechanismus der DR werden Hyperglykämie, entzündliche Prozesse und neuronale Dysfunktion angenommen. Eine Vielzahl von Veränderungen in biochemischen Stoffwechsel- und Signalwegen sind beschrieben (Hammes et al. 2002; Hammes et al. 2011; Stitt et al. 2016). Chronische Hyperglykämie scheint dabei vor allem durch eine mitochondriale Überproduktion reaktiver Sauerstoffspezies (Brownlee 2005) und damit einhergehenden oxidativem Stresses sämtliche retinalen Zellen zu schädigen.

Als erstes Anzeichen der diabetischen Retinopathie wird der Verlust von Perizyten angesehen. Diese kommen in der Retina in besonders hoher Dichte vor. Ihre Aufgabe besteht vor allem in der Unterstützung der Angiogenese und der Endothelzellendifferenzierung (Hellström et al. 2001). Dabei stehen die Perizyten mit den Endothelzellen über Tight Junctions, Gap Junctions und Fokale Adhäsionen in engem Kontakt, wobei einerseits eine direkte zelluläre Kommunikation stattfindet und andererseits die Blut-Retina-Schranke ausgebildet wird. Diese Interaktionen regulieren zum einen das Überleben und Wachstum der Perizyten, zum anderen aber auch die Funktion der Endothelzellen, sowie die Gefäßstabilisierung oder die Aussprossung neuer Kapillare (Beltramo et al. 2013). In der Entstehung der DR führt der sogenannte „pericyte dropout“, und die damit wegfallende gefäßunterstützende Funktion der Perizyten, zu einem Untergang der Endothelzellen. Es kommt zu einer Bildung von nicht mehr durchbluteten, azellulären Kapillaren. Die Retina reagiert auf den so entstandenen ischämischen Reiz mit der Ausschüttung von angiogenen Faktoren, welche letztlich zur fatalen proliferativen Phase der diabetischen Retinopathie führen (Hammes et al. 2011).



## 1.3 Diabetische Retinopathie und extrazelluläre Matrix

Das Ziel dieser Arbeit bestand zum einen darin, eine molekulare Ursache für die von meinem Vorgänger Heiner Kremer beobachtete unterschiedliche Adhäsion von ASC und Perizyten auf Glukose-modifizierte extrazelluläre Matrix zu finden. Daher galt es zunächst, sich einen Literatur-Überblick zu verschaffen.

Bei der extrazellulären Matrix handelt es sich um eine im hohen Maß organisierte Ansammlung verschiedener Makromoleküle im Interzellularraum. Im Kontext der DR ist die funktionelle Integrität der ECM nicht nur für das Überleben von Perizyten und Endothelzellen essenziell, sondern besitzt zudem höchste Relevanz zur Funktionalität der gesamten Retina. Während der „pericyte drop-out“ als Schlüsselmechanismus postuliert wird, gilt aus histologischer Sicht eine Verdickung der Basalmembran als frühes und sicheres Zeichen der diabetischen Retinopathie mit einhergehender überschießender vaskulärer Permeabilität und Angiogenese (Roy et al. 2015). Die retinale Basalmembran setzt sich hauptsächlich aus Kollagen Typ IV, Fibronectin, Laminin und Proteoglykanen zusammen. Kollagen Typ IV kann direkt an Integrine binden und somit die Zelladhäsion und bestimmte intrazelluläre Signalwege initiieren. Fibronectin wirkt als molekularer Kleber und ist ein kritischer Baustein für die organisierte Struktur der Basalmembran. Laminin beeinflusst die zelluläre Adhäsion, Motilität, Proliferation und Differenzierung. Proteoglykane bilden mit ihren langen, stark negativ geladenen Glykosaminoglykan-Seitenketten (GAG) eine Speicherfunktion. Sie können neben extrazellulärer Flüssigkeit eine Vielzahl an Wachstumsfaktoren, Enzymen und Zytokinen zurückhalten. Zudem können sie mit Integrinen interagieren. In der Zellkultur von Endothelzellen ist eine Verminderung der GAG durch hohe Glukose beschrieben (Gharagozian et al. 2006b). Somit könnte eine Veränderung der gebundenen Wachstumsfaktoren oder eine veränderte Wirkung auf zelluläre Adhäsionsmoleküle die von uns beschriebene Einschränkung der Perizytenproliferation erklären. Neben einer vermehrten Synthese der einzelnen Komponenten der Basalmembran, ist eine gestörte Degradation und Remodelierung durch Matrix-Metalloproteinasen (MMP) im Rahmen der DR beschrieben (Roy et al. 2010).

Abweichend von diesen zellulären Anpassungsreaktionen auf einen hyperglykämischen Stimulus, postulierte Brownlee eine direkte Schädigung von Zellen und ex-

trazellulärer Matrix durch hohe Glukosespiegel (Brownlee 2001). Seine „Unifying Hypothesis“ postuliert zum einen, dass der Hauptmechanismus der hyperglykämischen Schädigungen auf einer gesteigerten Bildung von Reactive Oxygen Species (ROS) beruht. Zum anderen postuliert er direkte chemische Modifikationen von extrazellulärer Matrix und zellulären Signalwegen durch nicht-enzymatische Reaktionen von reaktiven Stoffwechselprodukten des Glukosemetabolismus. Advanced Glycation Endproducts (AGE) entstehen zum einen durch die nicht-enzymatische Adduktion von Glukose an Proteine. Ein weiterer Entstehungsmechanismus von AGE ist die Reaktion von Proteinen mit reaktiven Glukosemetaboliten wie Glyoxal oder Methylglyoxal (MGO). Da diese Substanzen sich chemisch durch ihre Carbonylgruppen auszeichnen, werden sie in der Literatur analog zu den ROS als Reactive Carbonyl Species oder Carbonyl-Stress bezeichnet. Im Zusammenhang mit Diabetes mellitus wurden bereits negative Effekte von MGO und Glukose-modifiziertem Kollagen Typ IV auf die Adhäsion und Proliferation von renalen Mesangiumzellen beschrieben, wobei unter anderem eine Veränderung der Integrinabhängigen Zell-ECM Interaktionen postuliert wurde (Pozzi et al. 2009).

## **1.4 Mesenchymal stromale Zellen und zellbasierte Therapiekonzepte**

Mesenchymal stromale Zellen (MSC) sind multipotente Vorläuferzellen verschiedenster mesenchymaler Zelltypen. Sie sind definiert als plastikadhärente Zellen, welche die Oberflächenantigene CD 73, CD 90 und CD 105 exprimieren, während CD 14, CD 19, CD 34, CD 45 und HLA-DR nicht exprimiert werden. Außerdem müssen sich die Zellen in-vitro adipogen, chondrogen und osteogen differenzieren können (Dominici et al. 2006).

Mit ihrer Fähigkeit zur Selbsterneuerung sowie zur Differenzierung in diverse spezialisierte Zelltypen versprechen sie ein großes Potenzial für neue regenerative zellbasierte Therapieansätze. Nach ihrer ersten Beschreibung durch Friedenstein im Jahre 1970 (Friedenstein et al. 1970) fanden sie durch eine erste Studie zur Sicherheit ihrer Anwendung für zellbasierte Therapiekonzepte im Jahr 1995 sehr schnell ihren Weg in die klinische Erprobung zu unterschiedlichsten Indikationen. Die entwickelten Therapieansätze basieren dabei auf den besonderen Eigenschaften dieser Zellen. Neben

ihrer fehlenden Immunogenität scheinen sie von pro-inflammatorischen Botenstoffen gelockt an den Ort einer Gewebeschädigung oder eines Entzündungsprozesses zu migrieren (Sharma et al. 2014). Obwohl eine therapeutische Wirksamkeit besteht, ist nach wie vor unklar, welche Mechanismen genau involviert sind. Während einige Studien auf die Differenzierungskapazität der MSC und die Sekretion von lokal wirkenden trophischen Faktoren setzten, um Wundheilungsprozesse zu begünstigen, versuchten andere Studien ihre immunoregulatorischen Fähigkeiten für die Therapie Immunzell-vermittelter zytotoxischer Reaktionen zu nutzen (Sharma et al. 2014). Obwohl sich MSC-basierte Therapieansätze in den letzten Jahren als verhältnismäßig sicher herausstellten, und in präklinischen Modellen eine gute Wirksamkeit beobachtet wurde, wurden die Erwartungen an ihren klinischen Nutzen bisher nicht erfüllt. Ausgehend von dieser Diskrepanz zwischen vielversprechenden Resultaten in der Grundlagenforschung, welche sich in der klinischen Erprobung nicht wie erhofft abbildeten, bleibt das genauere Verständnis der Wirkmechanismen der MSC der Schlüssel zu erfolgreichen Therapieansätzen (Hoogduijn et al. 2019).

## **1.5 Diabetische Retinopathie und mesenchymal stromale Zellen**

Im Hinblick auf die DR bieten MSC drei vielversprechende Ansatzpunkte für zellbasierte Therapiekonzepte. Zum einen können sie konstruktiv wirken, indem sie in das geschädigte Gewebe migrieren und dort einwachsen. Zum anderen können sie instruktiv wirken und mittels Sekretion trophischer Faktoren die lokale Umgebung in ein progeneratives Stadium versetzen. Letztlich können sie regenerativ wirken, da sie durch Remodelierung der extrazellulären Matrix nicht nur das größte Reservoir extrazellulärer Wachstumsfaktoren beeinflussen, sondern gleichzeitig mögliche diabetische Schädigungen der zellulären Mikroumgebung ausbessern können (Fiori et al. 2018).

Ein erstes vielversprechendes Resultat eines Therapieversuches mit MSC lieferten Yang, Li et al. Sie zeigten im Streptozotocin-induzierten Rattenmodell der DR eine Verbesserung der Integrität der Blut-Retina-Schranke nach intravenöser Applikation von MSC (Z. Yang et al. 2010). Während vorerst unklar blieb, ob der Effekt direkt mit einer lokalen Wirkung der MSC zusammenhing oder sekundär durch

eine Verminderung der Blutglukosespiegel bedingt war, zeigten neuere Studien sowohl einen zytoprotektiven und regenerativen Effekt durch Sekretion trophischer Faktoren (Ezquer et al. 2016) als auch eine perizytenähnliche Integration in die Retina (Mendel et al. 2013). Neben positiven Forschungsergebnissen wuchsen jedoch auch Bedenken, dass die MSC vermittelte proangiogene Wirkung zu vaskulärer Hyperproliferation führen könnte (Beltramo et al. 2014). Weitere Arbeiten deuteten darauf hin, dass MSC eine verschlimmernde Entzündungsreaktion mit weiterem Perizytenverlust und vaskulärer Dysfunktion induzieren könnten (Huang et al. 2019). Im Gegensatz dazu konnten MSC nach intravitrealer Injektion in einem retinopathy-of-prematurity-Mausmodell eine Perizyten-spezifische Position einnehmen und die retinale Angiogenese verbessern und stabilisieren (Hajmoussa et al. 2018). Dies deutet eine kontext-abhängige Wirksamkeit an. Das Ziel unserer Arbeitsgruppe war es daher, ein genaues Verständnis der Abhängigkeiten und Wechselwirkungen von MSC, Perizyten und Endothelzellen zu bekommen.

## 1.6 Vorarbeiten und Ziel der Studie

Diese Arbeit knüpft an die Ergebnisse der medizinischen Dissertation von Heiner Kremer an. Herr Kremer etablierte in unserem Labor eine Methode der ECM-Präparation für Adhäsions- und Proliferationsexperimente. Dabei konnte er einen negativen Einfluss Glukose-modifizierter HUVEC-ECM auf die Proliferation von HRMVPC beobachten, während die Proliferation von ASC nicht beeinträchtigt wurde. Darauf aufbauend untersuchte Herr Kremer, ob die Kultur von HUVEC in hoher Glukose die Zusammensetzung ihrer ECM beeinflusst. Er konnte dabei keine quantitativen Unterschiede in der Exkretion von Fibronectin, Laminin oder Kollagen Typ IV feststellen (Kremer 2017, Kremer, Gebauer et al. 2020).

Ebenfalls im Rahmen des DFG-geförderten Internationalen Graduiertenkollegs IRTG1874 „Diabetic Microvascular Complications (DIAMICOM)“ etablierte Agnese Fiori in unserem Labor zwei unterschiedliche Angiogenese-Assays zur Untersuchung des Zusammenspiels von Endothelzellen und ASC bzw. HRMVPC. Während ASC durch die Kultur unter hyperglykämischen Bedingungen keine Beeinträchtigung zeigten, konnte sie eine Glukose-induzierte Verminderung des angiogenen Potentials humaner retinaler mikrovaskulärer Endothelzellen (HRMVEC) feststellen. Diesen Effekt konnte sie mit einem erhöhten Level an oxidativem Stress der HRM-

VEC in Verbindung bringen, welches sich durch die Behandlung mit dem Antioxidanz N-Acetylcystein oder durch ASC-konditioniertes Medium wieder abschwächen ließ (Fiori et al. 2020). Zudem konnte sie überraschender Weise beobachten, dass HRMVPC im Gegensatz zu ASC keine proangiogene Aktivität aufzeigten, sondern die Formation vaskulärer Netzwerke aktiv unterdrückten. (Kremer, Gebauer et al. 2020).

*Ausgehend von den Vorarbeiten wurden für diese Dissertation folgende Kernfragen formuliert:*

1. Welchen Einfluss hat die Kultur unter hoher Glukose auf die extrazelluläre Matrix von Endothelzellen?
2. Wie verhalten sich ASC bzw. retinale Perizyten bei der Adhäsion und Proliferation auf Glukose-modifizierter extrazellulärer Matrix von retinalen Endothelzellen?
3. Welche Ähnlichkeiten und Unterschiede zeigen sich zwischen Zellkultur-expandierten ASC und retinalen Perizyten?
4. Welche Rolle spielen insbesondere die Integrine in der differentiellen Sensitivität von mesenchymal stromalen Zellen und retinalen Perizyten gegenüber Glukose-modifizierter extrazellulärer Matrix? Diese Frage wurde im Rahmen eines eigenständig eingeworbenen Drittmittelprojektes der Deutschen Diabetes-Gesellschaft (DDG) adressiert.



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

**Tabelle 2.1:** Verwendete Zellen und Kulturbedingungen

Zelltyp	Abkürzung	Herkunft	Medium	Aussaatdichte
Lipoaspirate-derived mesenchymal stromal cells	ASC	AG Bieback, Mannheim, DE	DMEM AB	200/cm <sup>2</sup> , T175
Human retinal microvascular Pericytes	HRMVPC	Pelo Biotech, Planegg, DE	PCM	Split 1:2, T25, Speed Coat Solution (Pelo Biotech)
Human retinal Pericytes cells ACBRI 183	CSPC	Cell Systems, Kirkland, USA	CSM	10 <sup>6</sup> , T75
Human umbilical vein endothelial cells	HUVEC	AG Bieback, Mannheim, DE	EGM2	8000/cm <sup>2</sup> , T25
Human retinal microvascular endothelial cells	HRMVEC	Pelo Biotech, Planegg, DE	EGM2	8000/cm <sup>2</sup> , T25

**Tabelle 2.2:** Zellkulturmedien und Zusammensetzung

Medium	Zusammensetzung
DMEM AB	Dulbecco's modified Eagles's medium low glucose (Lonza, Vervies, B) 10 % human AB-serum (DRK Mannheim, DE) 4 mM L-Glutamin (PAA Laboratories, Cambridge, UK) 1 % Penicillin/Streptomycin (Sigma, St. Louis, USA)
PCM	Pericytes Growth Medium (Pelo Biotech, Planegg, DE)
CSM	Complete Medium formulated at normal blood glucose level with serum and CultureBoost (Cell Systems, Kirkland, USA)
EGM2	Endothelial Cell Growth Medium (Promocell, Heidelberg, DE)
1/4 EGM	25 % EGM2 75 % Endothelial Cell Basal Medium (Promocell, Heidelberg, DE)

**Tabelle 2.3:** Chemikalien

Bezeichnung	Abkürzung	Hersteller
Ammoniakwasser 25 %		Merck, Darmstadt, DE
Aqua destillata		Merck Millipore, Darmstadt, DE
Casy-Ton		Omni Life Science, Bremen, DE
2,4-Dinitrophenylhydrazin		Sigma, St. Louis, USA
FACS Cell Wash Buffer		BD, Franklin Lakes, USA
4,6-Diamidino-2-phenylindole	DAPI	Sigma, St. Louis, USA
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	PBS	Sigma St. Louis, USA
FcR Blocking Reagent		Milteny, Bergisch Gladbach, DE
Fetal Bovine Serum	FBS	Gibco, Paisley, UK
D-Glukose		Sigma, St. Louis, USA
Gelantine		Sigma, St. Louis, USA
Heparin-Natrium-5000		Ratiopharm, Ulm, DE
Methylglyoxal	MGO	Sigma, St. Louis, USA
Paraformaldehyd 35 %		Roth, Karlsruhe, DE
Phosphorsäure > 85 %		Roth, Karlsruhe, DE
Trypsin EDTA		PAA Laboratories, Cambridge, UK
Triton-X-100		Sigma, St. Louis, USA



**Tabelle 2.4:** Hergestellte Puffer

<b>Bezeichnung</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Papain-Lösung	20 mM Natriumphosphat pH 6,8 (Merck, Darmstadt, DE) 1 mM EDTA (Roth, Karlsruhe, DE) 2 mM Dithiothreitol (Serva, Heidelberg, DE) 300 µg/ml Papain (Sigma, St. Louis, USA)
Zymographie Proben-Puffer	4 % SDS (Serva, Heidelberg, DE) 20 % Glycerin (Serva, Heidelberg, DE) 0,01 % Bromphenolblau (Roth, Karlsruhe, DE) 125 mM Tris-HCl pH 6,8 (Serva, Heidelberg, DE)
Zymographie Waschpuffer	2,5 % Triton-X-100 (Sigma, St.Louis, USA) 50 mM Tris-HCl pH 7,5 (Serva, Heidelberg, DE) 5 mM Calciumchlorid (Roth, Karlsruhe, DE) 1 µM Zinkchlorid (Roth, Karlsruhe, DE)
Zymographie Inkubationspuffer	1 % Triton-X-100 (Sigma, St. Louis, USA) 50 mM Tris-HCl pH 7,5 (Serva, Heidelberg, DE) 5 mM Calciumchlorid (Roth, Karlsruhe, DE) 1 µM Zinkchlorid (Roth, Karlsruhe, DE)
Zymographie Färbelösung	40 % Methanol (Merck, Darmstadt, DE) 10 % Essigsäure (Merck, Darmstadt, DE) 0,5 % Coomassie-Brilliant-Blau (Sigma, St. Louis, USA) Ad 100 % Wasser (Merck Millipore, Darmstadt, DE)
Zymographie Entfärbelösung	40 % Methanol (Merck, Darmstadt, DE) 10 % Essigsäure (Merck, Darmstadt, DE) Ad 100 100 % Wasser (Merck Millipore, Darmstadt, DE)

Tabelle 2.5: Antikörperpanel Durchflusszytometrie

Bezeichnung	Klon	Hersteller
CD13-APC-Cy7	WM15	BioLegend, San Diego, USA
CD29-AF488	TS2/16	BioLegend, San Diego, USA
CD31-FITC	WM59	BD Biosciences, Heidelberg, DE
CD34-APC	581	BD Biosciences, Heidelberg, DE
CD44-APC-eFluor780	IM7	eBioscience, San Diego, USA
CD45-PE-Cy7	HI30	BD Biosciences, Heidelberg, DE
CD49a-AF647	TS2/7	AbD Serotec, Oxford, UK
CD49b-FITC	P1E6-C5	BioLegend, San Diego, USA
CD49d-PE-Cy7	9F10	BioLegend, San Diego, USA
CD49e-PE	NKI-SAM-1	BioLegend, San Diego, USA
CD49f-PE	GoH3	BD Biosciences, Heidelberg, DE
CD73-PE	AD2	BD Biosciences, Heidelberg, DE
CD90-APC	5E10	BD Biosciences, Heidelberg, DE
CD105-PE-Cy7	SN6	eBioscience, San Diego, USA
CD106-FITC	51-10C9	BD Biosciences, Heidelberg, DE
CD140a-PE	16A1	BioLegend, San Diego, USA
CD140b-APC	18A2	BioLegend, San Diego, USA
CD146-PE	TEA1/34	Beckman Coulter, Brea, USA
CD248-AF647	B1/35	BD Biosciences, Heidelberg, DE
HLA-ABC-PE-Vio770	REA230	Milteny, Bergisch Gladbach, DE
HLA-DR-APC-Cy7	L243	BioLegend, San Diego, USA
Integrin $\beta$ 7	FIB504	BioLegend, San Diego, USA
NG2-AF488	9.2.27	eBioscience, San Diego, USA

**Tabelle 2.6:** Sonstige Antikörper

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Anti-MGH-1	Zur Verfügung gestellt von Thomas Fleming, Klinik für Endokrinologie, Stoffwechsel und klinische Chemie, Uniklinik Heidelberg, DE
Streptavidin-AF480	Thermo Fischer Scientific, Braunschweig, DE
Dinitrophenyl-KLH Polyclonal Antibody	Thermo Fischer Scientific, Braunschweig, DE

**Tabelle 2.7:** Kits

<b>Kit</b>	<b>Hersteller</b>
TGX FastCast Acrylamide Kit 10 %	Bio-Rad, Hercules, USA
Sulfated Glycosaminoglycan Quantification Kit	amsbio, Frankfurt am Main, DE
Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Fischer Scientific, Braunschweig, DE
RNeasy Micro Kit	Qiagen, Hilden, DE
RT2 First Strand Kit	Qiagen, Hilden, DE
RT2 Custom PCR Arrays	Qiagen, Hilden, DE

**Tabelle 2.8:** Geräte

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
Casy Cell Counter	OLS OMNI Life Science, Bremen, DE
NucleoCounter NC-100	ChemoMetec, Allerød, DK
Tecan Infinite M200	Tecan, Männedorf, CH
Bio-Rad Thermal Cycler	Bio-Rad, Hercules, USA
Roche LightCycler 480	Roche, Basel, CH
Mini-PROTEAN Tetra Cell	Bio-Rad, Hercules, USA
Mini-PROTEAN Tetra Handcast System	Bio-Rad, Hercules, USA
IncuCyte Zoom	Essen Bioscience, Hertfordshire, UK
Axiovert 100	Carl Zeiss Microscopy, Jena, DE
Durchflusszytometer FACS Canto II	BD Biosciences, Heidelberg, DE

**Tabelle 2.9:** Gene des Custom PCR-Arrays

<b>Abkürzung</b>	<b>Englische Bezeichnung</b>
ACTA2	Actin, alpha 2, smooth muscle, aorta
AGTR1	Angiotensin II receptor, type 1
AMOT	Angiomotin
ANGPT1	Angiopoietin 1
ANPEP	Alanyl (membrane) aminopeptidase
ATPIF1	ATPase inhibitory factor 1
BAX	BCL2-associated X protein
BCL2	B-cell CLL/lymphoma 2
MMP14	Matrix metalloproteinase 14 (membrane-inserted)
BCL2L1	BCL2-like 1
HAS1	Hyaluronan synthase 1
CAT	Catalase
CAV1	Caveolin 1, caveolae protein, 22kDa
CD151	CD151 molecule (Raph blood group)
CD248	CD248 molecule, endosialin
CD81	CD81 molecule
CFLAR	CASP8 and FADD-like apoptosis regulator
COL11A1	Collagen, type XI, alpha 1
COL12A1	Collagen, type XII, alpha 1
COL1A1	Collagen, type I, alpha 1
COL4A3	Collagen, type IV, alpha 3 (Goodpasture antigen)
COL5A1	Collagen, type V, alpha 1
COL6A1	Collagen, type VI, alpha 1
COL6A2	Collagen, type VI, alpha 2
COL7A1	Collagen, type VII, alpha 1
COL8A1	Collagen, type VIII, alpha 1
CSPG4	Chondroitin sulfate proteoglycan 4
CTNNA1	Catenin (cadherin-associated protein), alpha 1, 102kDa
CTNND1	Catenin (cadherin-associated protein), delta 1
CX3CL1	Chemokine (C-X3-C motif) ligand 1

Fortsetzung von Tabelle 2.9

<b>Abkürzung</b>	<b>Englische Bezeichnung</b>
DES	Desmin
EDN1	Endothelin 1
EDNRA	Endothelin receptor type A
EFNB2	Ephrin-B2
ERBB2	V-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2, neuro/glioblastoma derived oncogene homolog (avian)
FLT1	Fms-related tyrosine kinase 1 (vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor receptor)
ICAM1	Intercellular adhesion molecule 1
IFNGR2	Interferon gamma receptor 2 (interferon gamma transducer 1)
IL6	Interleukin 6 (interferon, beta 2)
ITGA1	Integrin, alpha 1
ITGA2	Integrin, alpha 2 (CD49B, alpha 2 subunit of VLA-2 receptor)
ITGA4	Integrin, alpha 4 (antigen CD49D, alpha 4 subunit of VLA-4 receptor)
ITGA5	Integrin, alpha 5 (fibronectin receptor, alpha polypeptide)
ITGA6	Integrin, alpha 6
ITGB1	Integrin, beta 1 (fibronectin receptor, beta polypeptide, antigen CD29 includes MDF2, MSK12)
ITGB3	Integrin, beta 3 (platelet glycoprotein IIIa, antigen CD61)
JAG1	Jagged 1
KIT	V-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog
LAMA1	Laminin, alpha 1
LAMA2	Laminin, alpha 2
LAMA3	Laminin, alpha 3
LAMC1	Laminin, gamma 1 (formerly LAMB2)
LEPR	Leptin receptor
MCAM	Melanoma cell adhesion molecule
MMP1	Matrix metalloproteinase 1 (interstitial collagenase)
MMP15	Matrix metalloproteinase 15 (membrane-inserted)
MMP16	Matrix metalloproteinase 16 (membrane-inserted)
NOTCH1	Notch 1

Fortsetzung von Tabelle 2.9

<b>Abkürzung</b>	<b>Englische Bezeichnung</b>
NOTCH2	Notch 2
NOTCH3	Notch 3
NRP1	Neuropilin 1
NRP2	Neuropilin 2
PDGFRA	Platelet-derived growth factor receptor, alpha polypeptide
PDGFRB	Platelet-derived growth factor receptor, beta polypeptide
PECAM1	Platelet/endothelial cell adhesion molecule
PF4	Platelet factor 4
PLAT	Plasminogen activator, tissue
PLAU	Plasminogen activator, urokinase
PROCR	Protein C receptor, endothelial
PTGS1	Prostaglandin-endoperoxide synthase 1 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)
PTK2	PTK2 protein tyrosine kinase 2
RGS5	Regulator of G-protein signaling 5
SPG7	Spastic paraplegia 7 (pure and complicated autosomal recessive)
SPHK1	Sphingosine kinase 1
TEK	TEK tyrosine kinase, endothelial
TGFB1	Transforming growth factor, beta 1
TGFB2	Transforming growth factor, beta 2
TGFB3	Transforming growth factor, beta 3
TGFBI	Transforming growth factor, beta-induced, 68kDa
TIMP1	TIMP metalloproteinase inhibitor 1
TIMP2	TIMP metalloproteinase inhibitor 2
TIMP3	TIMP metalloproteinase inhibitor 3
TNC	Tenascin C
TSPAN4	Tetraspanin 4
VCAN	Versican
VEGFA	Vascular endothelial growth factor A

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Allgemeine Zellkulturmethoden

Alle Zellen wurden bei 37 °C und 5 % Kohlenstoffdioxid mit den in Tabelle 2.1 angegebenen Medien und Aussaatdichten kultiviert. Abweichende Kulturbedingungen als Anpassung auf die unterschiedlichen Untersuchungen sind in den entsprechenden Methodenabschnitten beschrieben. Die Zusammensetzung der Zellkulturmedien ist Tabelle 2.2 zu entnehmen. Das Medium wurde alle 2-3 Tage gewechselt. Für einige Experimente wurden die Zellen in Medien mit normalem oder hohem Glukosegehalt kultiviert. Normale Glukose (NG) entspricht dem regulärem Glukosegehalt des jeweiligen Mediums. Zur Herstellung des Mediums mit hoher Glukose (HG) wurden 3,5 g/l Glukose zu dem jeweiligen Medium hinzugefügt. Bei den Medien für HUVEC, HRMVEC, ASC und CSPC lag die Konzentration der NG-Medien bei 1 g/l bzw. 5,6 mmol/l und die Konzentration der HG-Medien bei 4,5 g/l bzw. 25 mmol/l. Das HRMVPC-Medium PCM war seitens der Hersteller nur mit 4,5 g/l bzw. 25 mmol/l erhältlich. Damit ergab sich für den HG-Ansatz eine Konzentration von 8 g/l bzw. 44,4 mmol/l.

Die in Kryowells unter flüssigem Stickstoff eingelagerten Zellen wurden zur Verwendung im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut und in eine Zellkulturflasche mit vorgelegtem und vortemperiertem Zellkulturmedium ausgesät. Am Folgetag wurde das Medium gewechselt, um zellulären Debris zu entfernen. Bei 70 % Konfluenz der ASC oder 100 % Konfluenz der übrigen Zelltypen wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA in PBS für 3 Minuten bei 37 °C geerntet. Zur Inaktivierung des Trypsins wurde anschließend PBS mit 10 % FBS hinzugefügt. Die Zellsuspension wurden bei 420 g für 5 min zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstandes wurde das Zellpellet im entsprechenden Zellkulturmedium resuspendiert. Die Zellzahl wurde mittels Casy-Counter ermittelt. Die Zählung der HRMVPC war aufgrund ihrer Aggregationsneigung nur mit einem NucleoCounter möglich. Dabei werden die Zellen lysiert und die übrig bleibenden Zellkerne werden gezählt.

## 2.2.2 Adhäsions und Proliferationsexperimente auf extrazellulärer Matrix

**Herstellung der ECM** HRMVEC wurden mit einer Zelldichte von  $7500/\text{cm}^2$  auf 24-wellplates mit NG oder HG ausgesät. Für die HG-Stimulation wurde dem Endothelzellmedium 4,5 g/l Glukose hinzugefügt. Das Zellkulturmedium wurde alle 2 Tage erneuert. Bei vollständiger Konfluenz wurden die Endothelzellen einmal mit PBS gewaschen und mit 0,25 mM Ammoniakwasser für 3 min unter mikroskopischer Kontrolle lysiert. Die so gewonnene ECM wurde vorsichtig dreimal mit PBS gewaschen und anschließend mit PBS bedeckt im Brutschrank gelagert, während die ASC und Perizyten geerntet wurden.

**Aussaat** ASC oder Perizyten wurden auf die frisch hergestellte ECM mit einer Dichte von  $5000/\text{cm}^2$  in ihrem jeweiligen Standardmedium (NG) ausgesät. Nach der Aussaat auf die ECM erfolgte keine Stimulation der ASC oder Perizyten mit HG. Der Fokus der Fragestellung lag auf der Untersuchung des Effekts hyperglykämischer Kulturbedingungen auf Endothelzellen und deren extrazellulärer Matrix.

**Live-Cell-Imaging** Durch das Live-Cell-Imaging-System IncuCyte Zoom war es uns möglich eine genaue Analyse der zellulären Adhäsion und Proliferation durchzuführen. Bei dem Gerät handelt es sich um einen im Brutschrank installierten Mikroskopieroboter, welcher automatische mikroskopische Aufnahme definierter Regionen von Zellkulturgefäßen in programmierbaren Zeitabständen ermöglicht. Das so erhobene Bildmaterial kann mittels zugehöriger Software auf Basis verschiedener Parameter, wie beispielsweise Zellgröße und Exzentrizität, ausgewertet werden. Somit kann die Kinetik der zellulären Adhäsion und Proliferation quantifiziert werden. In unseren Experimenten haben wir 10 min und 20 min nach Aussaat (Adhäsion), sowie darauffolgend im Abstand von 2 h (Proliferation) Bilder von den Zellen aufgenommen und analysiert.

**Bildanalyse** Für die beiden Zeitpunkte während der Adhäsion wurden die Parameter für die Bildanalyse so gewählt, dass nur einzeln liegende Zellen gewertet und die mittlere Zellfläche sowie die mittlere Zellzahl pro Bild berechnet wurden. Die Proliferationsphase wurde durch Bestimmung der Konfluenz, also der prozentual von



Zellen bedeckten Gesamtfläche, abgebildet. Für die verschiedenen Zelltypen wurden die Parameter zur Erkennung von Zellen jeweils individuell angepasst. Einzelne Bilder mit groben Fehlern der Bildanalyse oder starker Verschmutzung wurden für die Auswertung ausgeschlossen. Die Mitte jedes wells wurde auf Grund von Debris generell ausgeschlossen. Ein genauer Einblick in den Arbeitsablauf der Bildanalyse wurde von uns bereits publiziert (Kremer et al. 2020). Die Daten wurden zur verständlicheren Darstellung gegen die Bedingung NG normalisiert. Die Anzahl der Replikate betrug für ASC und HRMVPC  $N = 3$  biologische Replikate und  $n = 48$  technische Replikate. Die Experimente mit CSPC wurden mit zwei verschiedenen Spendern je zweimal wiederholt. Biologische Replikate bezeichnen Messungen derselben methodischen Durchführung unter Verwendung von Zellen desselben Zelltyps mit biologisch unabhängiger Herkunft. Technische Replikate bezeichnen mehrfache, identische Ansätze innerhalb eines Experiments.

### 2.2.3 Einfluss hoher Glukose auf die extrazelluläre Matrix von Endothelzellen

**Glukosaminoglykan-Nachweis** HUVEC wurden mit einer Zelldichte von  $7500/\text{cm}^2$  auf 24-wellplates mit NG oder HG ausgesät. Bei Konfluenz wurden die Zellen der einzelnen Wells mit gepufferter Papain-Lösung geerntet und mittels Casy Cell Counter gezählt. Der Gehalt an GAG wurde mit dem GAG Assay Kit vom amsbio in einem Tecan Infinite 200 photometrisch bestimmt und zur Zellzahl normalisiert. Als Kontrolle wurde das Zellkulturmedium zusätzlich mit  $50 \mu\text{mol/l}$  Heparin versetzt. Die Anzahl der Replikate betrug  $N = 1$  biologisches Replikat und  $n = 3$  technische Replikate.

**Zymographie zum Nachweis von Matrixmetalloproteasen** Zur Probegewinnung wurden HUVEC und HRMVEC mit  $8000 \text{ Zellen}/\text{cm}^2$  in T25-Flaschen mit NG oder HG kultiviert. Bei 80 % Konfluenz wurden die Zellen für 24 h in serumfreiem BasalmEDIUM (EBM2) gehalten. Anschließend wurde das konditionierte serumfreie Medium steril aliquotiert und bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert. Die Proteinkonzentration der Aliquots wurde mittels Pierce <sup>TM</sup> BCA Protein Assay Kit bestimmt.

Die Gelatine-Zymographie erfolgte nach einem Protokoll der Firma Abcam. Das Prinzip basiert auf einer SDS-PAGE Gelelektrophorese, wobei in das Gel Gelatine ein-

gegossen wird. Anschließend wird das Gel mit konditioniertem Medium in standardisierten Proteinkonzentrationen bestückt. Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proben wird das SDS mit dem Waschpuffer ausgewaschen. Die dadurch renaturierten Metalloproteasen entfalten ihre enzymatische Aktivität anschließend im Inkubationspuffer bei 37°C für 24 Stunden. Die im Gel vorhandene Gelatine wird hierbei durch MMP2 und MMP9 abgebaut. Das Gel wird danach für 1 h in einer wässrigen Färbelösung mit 40 % Methanol, 10 % Essigsäure und 0,5 % Coomassie Blau inkubiert. Abweichend vom Protokoll der Firma Abcam erfolgte die Entfärbung der Gele über Nacht in Wasser auf einem Schüttler. Zur besseren Entfärbung wurde dem Wasser ein Stück Zellstoff zur Absorption des Farbstoffes beigelegt. Zur Analyse der Gele wurden diese zunächst über Nacht in 30 %-iger wässriger Glycerinlösung getränkt. Anschließend wurden die Gele zwischen Cellophan in Trocknungsrahmen eingespannt und dort bis zur Aushärtung belassen. Die getrockneten Gele wurden mit einem Flachbettscanner digitalisiert. Das so gewonnene Bildmaterial wurde mit ImageJ ausgewertet. Die Farbaufnahme wurde mit der „RGB to luminance“ Funktion in analysierbare Graustufen konvertiert. Zur besseren Abgrenzbarkeit der Banden wurden die Helligkeits- und Kontrastwerte nachjustiert. Die Quantifizierung erfolgte mittels der Gel-Analyse-Funktion. Dazu wurden auf Grund der höheren Bandenintensität nur die mit 15 µg/ml Protein beladenen Banden analysiert. Die so erhobenen Bandenintensitäten wurden statistisch ausgewertet. Die Anzahl der Replikate betrug  $N = 1$  biologisches Replikat und  $n = 3$  technische Replikate.

**Nachweis von Advanced Glycation Endproducts** In Kooperation mit Thomas Fleming, Klinik für Endokrinologie, Stoffwechsel und klinische Chemie, Uniklinik Heidelberg, wurden Endothelzellen auf die Bildung von advanced glycation endproducts (AGE) untersucht. Hierzu wurden HUVEC mit einer Zelldichte von 5000 cm<sup>2</sup> in einer 96-well Platte in NG oder HG ausgesät. Nach 24 h wurden zur Positivkontrolle unterschiedliche Konzentrationen MGO hinzugegeben. Nach weiteren 24 h wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 4 % Paraformaldehyd in PBS für 15 min fixiert. Die Zellen wurden danach für 10 min mit PBS, 3 % Ziegenserum und 0,1 % Triton-X100 permeabilisiert und anschließend dreimal mit 3 % Ziegenserum in PBS gewaschen. Die Färbung mit einem Biotin-gekoppelt anti-MGH1-Primärantikörper, welcher uns freundlicher Weise von Thomas Fleming zur Verfügung gestellt wurde, erfolgte über Nacht bei 4 °C. Die Sekundärfärbung mit Alexa-Fluor488-Straptavidin erfolgte bei Raumtemperatur im Dunkeln für eine Stunde. Abschließend erfolgte

eine DAPI-Färbung für eine Minute mit 1 ng/ml DAPI in Wasser. Nach den Färbeschritten wurde jeweils dreimal mit 3% Ziegen Serum in PBS gewaschen. Diese qualitative Untersuchung wurde mit drei technischen Replikaten durchgeführt.

**Nachweis zellulärer Carbonylgruppen** HUVEC und HRMVEC wurden in T25-Flaschen mit NG oder HG kultiviert. Bei 80% Konfluenz wurden die Zellen trypsinisiert, mit PBS gewaschen und anschließend mit Methanol fixiert und permeabilisiert. Nach erneutem Waschen mit PBS wurden die Carbonylgruppen der Zellen mit 10 mM 2,4-Dinitrophenylhydrazin-Phosphorsäure-Lösung für 45 min im Dunkeln derivatisiert. Nach dreimaligem Waschen mit FACS-Puffer wurden die derivatisierten Carbonylgruppen mit einem Anti-DNP-Antikörper in 1:1000 Verdünnung für 45 min bei 4°C gefärbt. Nach zweimaligem Waschen mit FACS-Puffer erfolgte die Sekundärfärbung mit einem anti-rabbit-FITC-Antikörper für 30 min bei 4°C. Anschließend wurde erneut zweimal mit FACS-Puffer gewaschen, bevor die mediane Fluoreszenzintensität (MFI) an einem BD FACS Canto II mit BD FACS Diva Software gemessen wurde. Als Positivkontrollen wurden Wasserstoffperoxid und Glyoxal in unterschiedlichen Konzentrationen erprobt. Die durchflusszytometrische Messung zellulärer Carbonylgruppen wurde für HRMVEC in fünf unabhängigen Experimenten durchgeführt. Bei den HUVEC wurden zwei unabhängige Experimente unter Verwendung eines HUVEC-Pools durchgeführt.

**Veränderungen der mechanischen Eigenschaften der ECM** Die Untersuchung der mechanischen Eigenschaften der HUVEC-ECM wurde in Kooperation mit Johanna Hafner durchgeführt. Die HUVEC wurden dafür von mir in Anlehnung an unsere ECM-Experimente kultiviert. Auf Grund der Komplexität des Versuchsaufbau und insbesondere der Datenauswertung, welche von Johanna Hafner durchgeführt wurde, möchte ich an dieser Stelle auf die detaillierte Beschreibung aller Einzelheiten in unserer Publikation verweisen (Hafner et al. 2020).

## **2.2.4 Vergleichende Analyse von ASC und Perizyten**

### **Kultur von ASC und Perizyten für Durchflusszytometrie und RNA-Gewinnung**

Die Zellkultur zur Gewinnung von ASC und Perizyten für die durchflusszytometrischen Untersuchungen und die RNA-Isolation erfolgte analog zu den Standard-

kulturbedingungen der beiden Zelltypen. In Passage 1 eingefrorene ASC wurden in T175-Zellkulturflaschen mit DMEM AB in Kultur genommen. Bei 75 % Konfluenz wurden die ASC passagiert und mit einer Dichte von 200 Zellen/cm<sup>2</sup> in T175-Zellkulturflaschen mit 20 ml DMEM AB ausgesät. Zur Stimulation mit hoher Glukose wurde dem Zellkulturmedium ab Aussaat 4,5 g/l Glukose hinzugefügt. Nach 7 Tagen Kultur wurden die Zellen mit Trypsin geerntet. Die in Passage 3 eingefrorenen HRMVPC wurden in T25-Zellkulturflaschen mit 10 ml PCM in Kultur genommen. Um für die Untersuchungen ausreichende Zellzahlen zu erreichen wurden die HRMVPC bei Konfluenz zunächst 1:2 gesplittet. Bei erneuter Konfluenz wurden die HRMVPC erneut 1:2 gesplittet und anschließend in normaler oder hoher Glukose in Kultur genommen. Zur Stimulation mit hoher Glukose wurde dem Zellkulturmedium dabei analog zu den ASC ab Aussaat 4,5 g/l Glukose hinzugefügt. Die Zellernte mit Trypsin erfolgte ebenfalls nach 7 Tagen Kultur in normale oder hoher Glukose. Für die Durchflusszytometrie wurden zusätzlich CSPC analysiert. Diese waren in Passage 3 eingefroren und wurden in T75-Zellkulturflaschen mit 30 ml CSM in Kultur genommen. Nach Passagierung mit Trypsin wurde die Kultur mit  $1 \cdot 10^6$  Zellen je T75-Zellkulturflasche fortgesetzt. Nach 7 Tagen in Kultur wurden die Zellen mit Trypsin geerntet. Eine durchflusszytometrische Untersuchung von HG stimulierten Perizyten war auf Grund ihrer begrenzten Verfügbarkeit nicht möglich. Bei allen drei Zelltypen wurde nach Inkulturnahme der eingefrorenen Zellen das Zellkulturmedium am Folgetag gewechselt um Debris zu entfernen. Danach erfolgte die Erneuerung des Zellkulturmediums alle 2 Tage. Die geernteten Zellen wurden mittels Casy-Counter gezählt und mit den im weiteren beschriebenen Zellzahlen für Durchflusszytometrie oder RNA-Extraktion verwendet.

**Gewinnung der RNA-Proben** Die RNA-Proben wurde mit je  $5 \cdot 10^5$  der trypsinierten Zellen mittels RNeasy Micro Kit gemäß den Angaben des Herstellers extrahiert. Die RNA-Konzentration der gewonnenen Eluate wurde mittels Tecan NanoQuant Plate gemessen.

**RNA MicroArray** Die Genexpression von ASC und HRMVPC mit jeweils  $N = 3$  biologischen Replikaten wurde in Kooperation mit der Affymetrix Core Facility, unterstützt durch Dr. Carsten Sticht, vom Zentrum für Medizinische Forschung in Mannheim untersucht. Nach erfolgter RIN-Wert Bestimmung zur Ermittlung der RNA-Integrität, wurden Affymetrix Arrays vom Typ human HTA-2\_0-st verwendet.

Unter Verwendung des GeneChip WT Plus Reagent Kit, des GeneChip Hybridization, Wash and Stain Kit wurde zunächst biotinylierte antisense cRNA vorbereitet. Die Hybridisierung auf dem Chip erfolgte im GeneChip Hybridization oven 640, die Färbung an der GeneChip Fluidics Station 450 und die abschließende Datenerhebung mittels GeneChip Scanner 3000.

Für die bioinformatische Auswertung wurden die Arraydaten mittels einer Custom CDF Version 22 mit ENTREZ basierten Gen-Definitionen annotiert (Dai et al. 2005). Die Rohfluoreszenzintensitäten wurden mittels quantile normalization und RMA background correction normalisiert. Zur Identifikation der differenziell exprimierten Gene wurde eine ANOVA mit dem Softwarepaket SAS JMP11 Genomics Version 7 durchgeführt. Als Signifikanzniveau wurde eine FDR-Korrektur mit einer falsch positiv Rate von  $\alpha = 0,05$  verwendet.

Eine Gene Set Enrichment Analyse (GSEA) wurde durchgeführt, um zu überprüfen, ob zusammengehörige Gene bestimmter Signalwege oder zellulärer Prozesse zwischen den beiden verglichenen Zelltypen eindeutige Tendenzen in ihrer Expression aufweisen. Dazu wurde das R-Software-Paket EnrichmentBrowser (Geistlinger et al. 2016) mit den pathways der KEGG-Datenbank(<http://www.genome.jp/kegg>) verwendet.

Die Rohdaten sowie die normalisierten MicroArray-Daten sind in der Gene Expression Omnibus Datenbank hinterlegt. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>; accession No. GSE144605).

**PCR-Array** Eine Validierung der MicroArray Ergebnisse erfolgte mittels RT-qPCR. PCR Arrays und zugehörige Reagenzien wurden von Qiagen bezogen und gemäß den Vorgaben des Herstellers verwendet. Eine Liste der im PCR-Arrays untersuchten Gene zeigt Tabelle 2.9. Die 500 ng pro RNA-Probe wurden mit dem RT2 first strand kit in cDNA umgeschrieben. Anschließend wurde die Genexpression von 91 auf Basis der MicroArray Daten ausgewählter Gene mit custom RT2 profiler PCR arrays und RT2 SYBR Green qPCR MasterMix untersucht. Für die RT-qPCR wurde ein Roche LightCycler 480 verwendet. Die Daten wurden mit der zugehörigen LightCycler 480 Software vorverarbeitet und zur Analyse mittels Qiagen GeneGlobe exportiert.

Neben den bereits im MicroArray verwendeten Proben von ASC und HRMVPC in normaler Glukose wurden zusätzlich HUVEC mit 3 biologischen Replikaten, kultiviert in EGM mit reduziertem Supplement-Gehalt und normaler oder hoher Glukose, analysiert.

**Durchflusszytometrie** ASC und Perizyten wurden durchflusszytometrisch auf ausgesuchte Oberflächenmerkmale untersucht. Dazu wurden ASC und HRMVPC mit  $N = 3$  biologischen Replikaten und CSPC mit  $N = 2$  biologischen Replikaten verwendet. Nach Ernte der Zellen aus Standardkulturbedingungen wurden pro tube  $1 \times 10^5$  Zellen in FACS Puffer für 5 min mit FCR blocking reagent behandelt und anschließend mit den in Tabelle 2.5 aufgeführten Antikörpern für 20 min bei  $4^\circ\text{C}$  gefärbt. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit cell wash gewaschen und zur Analyse in FACS buffer mit dem Lebend-Tot-Farbstoff Sytox Blue resuspendiert. Die Messung erfolgte an einem BD FACS Canto II mit BD FACS Diva Software.

## 2.2.5 Statistik

Die Speicherung der Rohdaten erfolgte je nach Ursprung als Trennzeichen-getrennte Textdatei oder als Excel-Arbeitsmappe. Die gesamte Datenverarbeitung und Analyse erfolgte unter Verwendung der statistischen Programmiersprache R Version 3.6.1 (R Core Team 2020) mit der graphischen Benutzeroberfläche Rstudio Version 1.2.5033 (RStudio Team 2019). Die Rohdaten wurden unter Verwendung der R-Pakete openxlsx (Schauberger et al. 2020), dplyr (Wickham et al. 2020) und reshape (Wickham 2007) umstrukturiert, bereinigt und so in eine graphisch darstellbare und statistisch auswertbare Form gebracht. Da im Rahmen dieser Arbeit nur sehr kleine Stichprobengrößen möglich waren, wurde für jeden einzelnen Datensatz mittels Shapiro-Wilk-Test geprüft, ob eine Normalverteilung vorliegt. Da für keinen der Datensätze eine Stichprobe einer normalverteilten Grundgesamtheit angenommen werden konnte, wurde für alle Berechnungen der Signifikanz der Wilcoxon-Test mit Holm-Bonferroni-Methode zur Korrektur der Alphafehler-Kummulierung verwendet. Als Signifikanzniveau wurde  $\alpha = 0.05$  definiert. Die Erstellung der Abbildungen einschließlich statistischer Berechnungen wurde mit dem R-Paket ggpubr (Kassambara 2020) durchgeführt. In den Abbildungen sind, sofern nicht anders beschrieben, jeweils Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung dargestellt.

Eine Ausnahme bildet die MicroArray-Analyse. Diese wurde davon abweichend, wie in Abschnitt 2.2.4 beschrieben, ausgewertet. Die Erstellung der Volcano Plots erfolgte anschließend wieder in R mit Hilfe der R-Packete ggplot2 (Wickham 2016) und ggrepel (Slowikowski 2020).

---

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Adhäsion und Proliferation von ASC und Perizyten auf HRMVEC-ECM

**Adhäsion auf extrazellulärer Matrix** Die Ergebnisse von Heiner Kremer legten nahe, dass die HG-modifizierte ECM eher den Adhäsionsprozess beeinflusst als das Proliferationsverhalten. Daher haben wir uns auf diese frühe Phase der Interaktion fokussiert. HRMVEC wurden mit NG oder HG kultiviert, anschließend wurden die Endothelzellen lysiert um zellfreie ECM zu erhalten und ASC und Perizyten wurden darauf kultiviert. Mittels live cell imaging wurde der Prozess der Adhäsion analysiert. Wir betrachteten die Auswertung der Zellfläche als Indikator für die Adhäsion und Ausbreitung sowie die Zellzahl (Abbildung 3.1). Der Vergleich beider Parameter der einzelnen Zelltypen zeigte Ähnlichkeiten zur Morphologie der verschiedenen Zelltypen, jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen der Adhäsion auf NG/HG HRMVEC ECM. Die Reduktion der Zellzahl erklärt sich durch die Ausbildung von Zellkontakten zu Zellclustern, die eine Quantifizierung der Einzellzellen nicht mehr erlaubte.

**Proliferation auf extrazellulärer Matrix** In Abbildung 3.2 ist die Proliferation von ASC und Perizyten auf HRMVEC ECM HG normalisiert zu NG-ECM dargestellt. Während bei den ASC kein signifikanter Unterschied sichtbar war, zeigte sich bei den CSPC eine leicht verminderte und bei den HRMVPC eine deutlich verminderte Proliferation. Dies bestätigt Herrn Kremers Beobachtungen auf HUVEC-ECM. Daraus ergab sich die Frage, welche molekularen Veränderungen ursächlich sein könnten. Eine eingehende Charakterisierung der HG-modifizierten ECM von HUVEC und HRMVEC erfolgte wie nachfolgend beschrieben.



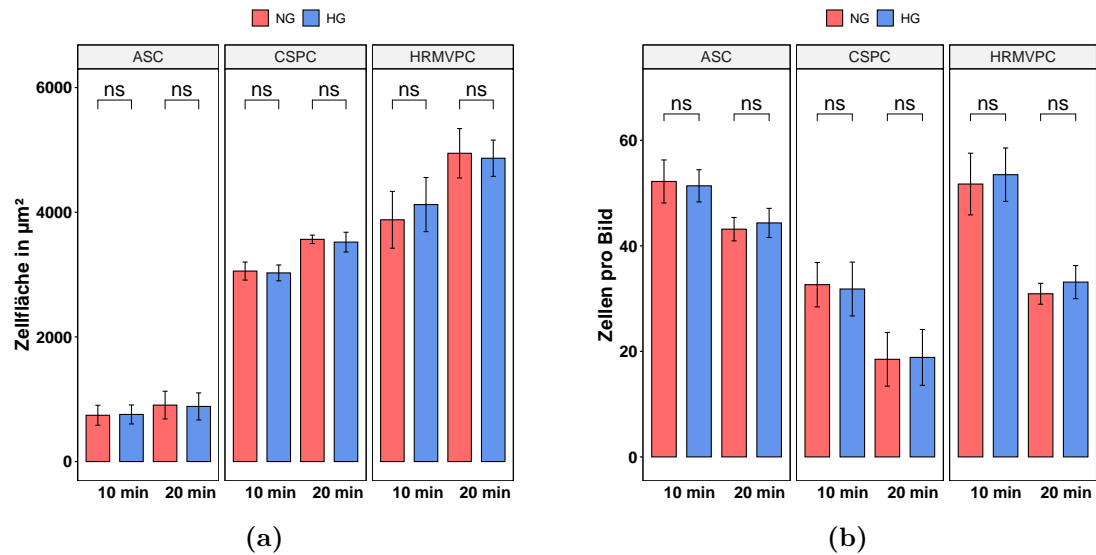


Abbildung 3.1

**Zellfläche und Zellzahl von ASC, CSPC und HRMVPC während der Adhäsion auf HRMVEC ECM.** Durch live cell imaging und Bildanalyse bestimmte Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung von Zellfläche (a) und Zellzahl pro Bild (b) 10 und 20 Minuten nach Aussaat auf HRMVEC ECM. Für ASC und HRMVPC mit 3 biologischen Replikaten, für CSPC mit 2 biologischen Replikaten und je einer Wiederholung. Der Vergleich von normaler und hoher Glukose zeigte unter Verwendung des Wilcoxon-Test mit Holm-Bonferroni-Methode keine signifikanten Unterschiede.

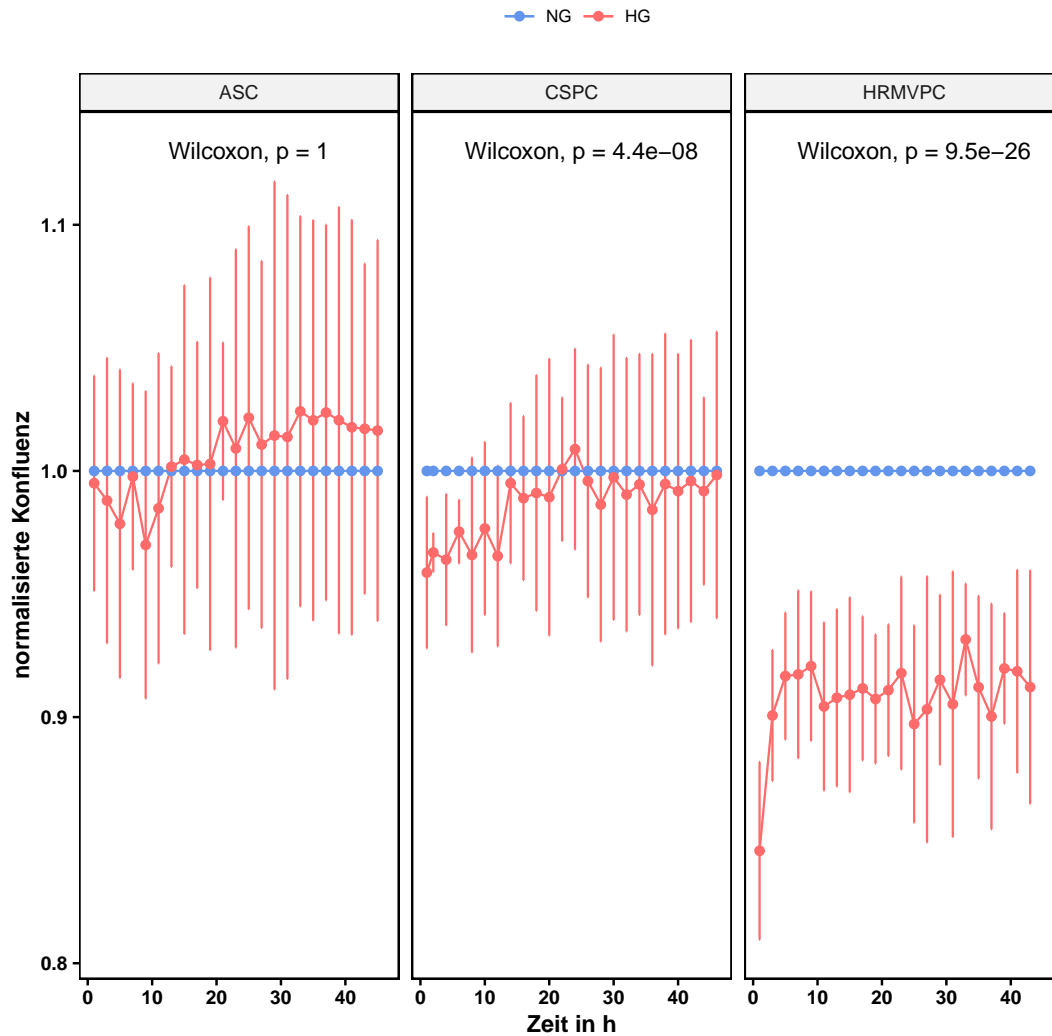


Abbildung 3.2

**Proliferation von ASC, CSPC und HRMVPC auf HRMVEC ECM.** Durch live cell imaging und Bildanalyse bestimmte Zellkonfluenz während der Proliferation auf HRMVEC ECM. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung. Zur besseren Vergleichbarkeit bei unterschiedlichem Proliferationspotential der Zelltypen wurden die Proliferationswerte der hohen Glukose zur normalen Glukose normalisiert. Für ASC und HRMVPC mit 3 biologischen Replikaten, für CSPC mit 2 biologischen Replikaten. Unter Verwendung des Wilcoxon-Tests mit Holm-Bonferroni-Methode zeigte sich eine signifikant niedrigere Proliferation von CSPC und HRMVPC in hoher Glukose.

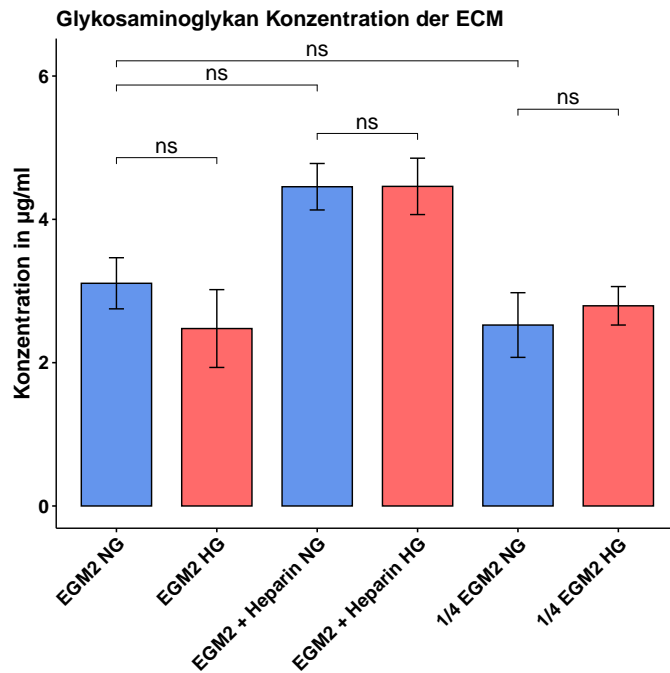


Abbildung 3.3

**Einfluss verschiedener Kulturbedingungen auf die Konzentration von Glykosaminoglykanen in der extrazellulären Matrix.** Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung der photometrischen Messungen mit einem biologischen Replikat und mindestens 3 technischen Replikaten. Der Vergleich der einzelnen Kulturbedingungen mittels Wilcoxon-Test mit Holm-Bonferroni-Methode zeigte keine signifikanten Unterschiede.

## 3.2 Einfluss hoher Glukose auf Endothelzellen und ihre extrazelluläre Matrix

### 3.2.1 Glykosaminoglykane

Um zu überprüfen, ob sich die Glykosaminoglykanzusammensetzung der ECM unter HG ändert, haben wir die GAG-Konzentration der ECM analysiert. Der Einfluss von hoher Glukose sowie unserem  $1/4$  Medium auf die GAG-Konzentration der ECM von HUVEC ist in Abbildung 3.3 dargestellt. Die Kultur in normaler oder hoher Glukose hatte keinen signifikanten Einfluss auf die GAG-Konzentration in der ECM. Ebenso zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen normalen und  $1/4$  Medium. In der Positivkontrolle zeigte sich durch Zugabe von Heparin zwar eine Erhöhung der GAG-Konzentration, allerdings war der Unterschied nicht signifikant.

### **3.2.2 Zymographie**

Eine HG-modifizierte Glykosaminoglykankonzusammensetzung konnten wir nicht nachweisen. Als nächsten fragten wir, ob es zu einer Änderung der Expression oder Aktivität von Matrixmetalloproteasen durch HG kommt. Dies haben wir mittels Zymographie untersucht. In Abbildung 3.4a ist zur Veranschaulichung ein fertiges Gelatine-Zymogramm mit konditioniertem serumfreiem Medium von HRMVEC dargestellt. Die Intensitätsunterschiede der benachbarten Banden beruhen auf zwei unterschiedlichen Proteinmengen für die Beladung der benachbarten Geltaschen. Die blaue Färbung entsteht durch die Anfärbung der in das Gel eingegossenen Gelatine. Nach elektrophoretischer Auftrennung und Renaturierung der Enzyme bilden sich die helleren Banden durch den enzymatischen Abbau der Gelatine. Der verwendete Komigrationsstandard hat vorgefärbte Banden mit hoher Intensität bei 25, 50 und 75 kDa. Zu sehen sind auf der Abbildung nur die 2 oberen Banden, da die Elektrophoresezeit ausreichend lang gewählt wurde, um den 25 kDa Komigrationsstandard an die Unterkante des Gels zu befördern. Die damit erreichte höhere Trennschärfe im Bereich der höheren Molekülmassen, führte leider gelegentlich zum Verlust der 25 kDa Bande während des Färbeprozesses. Die 2 sichtbaren Banden der Proben liegen in Relation zu dem Komigrationsstandard ungefähr bei 75 kDa und 62 kDa. Damit entsprechen sie sehr gut der MMP2 (72 kDa) und der aktiven Form der MMP2 (62kDa) (Toth et al. 2001). Von einer Expression des Enzyms MMP9 mit einem Molekulargewicht von 92 kDa, welches laut Abcam unter Verwendung dieses Protokolls ebenfalls nachweisbar sein sollte, ist in unseren Zymogrammen kein Anhalt zu finden.

Wie im Methodenteil beschrieben wurden bestimmte Bahnen zur densitometrischen Analyse ausgewählt, digitalisiert und digital aufbereitet. Abbildung 3.4b zeigt die ausgewerteten Banden. Das Ergebnis des statistischen Vergleichs der quantitativen Messungen der Farbdichten der Banden von den drei technischen Replikaten des HRMVEC konditionierten Mediums aus NG versus HG ist in Abbildung 3.5 dargestellt. Es zeigten sich hierbei keine signifikanten Unterschiede. Deshalb wurde auf die genaue Identifikation der sichtbaren Proteine verzichtet. Dazu wäre die Verwendung einer rekombinanten Metalloproteinase als Positivkontrolle in der Zymographie oder der Nachweis des spezifischen Proteins im Western-Blot mittels spezifischem Antikörper nötig.

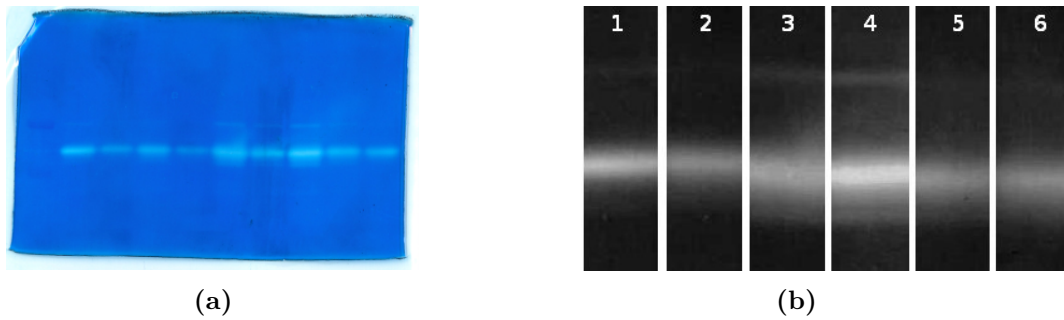


Abbildung 3.4

**Exemplarische Darstellung eines nativen Gelatine-Zymogrammes und dessen digitale Aufarbeitung.** (a) Im fertigen Zustand zeigt das gesamte Gel eine homogene Coomassie-blaue Färbung durch die in das Gel eingebetteten Gelatine. Die hellen Banden ergeben sich aus der enzymatischen Verdauung der Gelatine nach elektrophoretischer Auftrennung und Renaturierung der in den Proben enthaltenen Enzyme. (b) Anschließend werden die Banden digital aufbereitet und densitometrisch analysiert. Probe 1, 3 und 5 zeigen voneinander unabhängige Proben von konditioniertem serumfreiem HRMVEC-Medium eines biologischen Spenders mit normaler Glukose. Probe 2, 4, und 6 zeigen das jeweilige Korrelat in hoher Glukose.

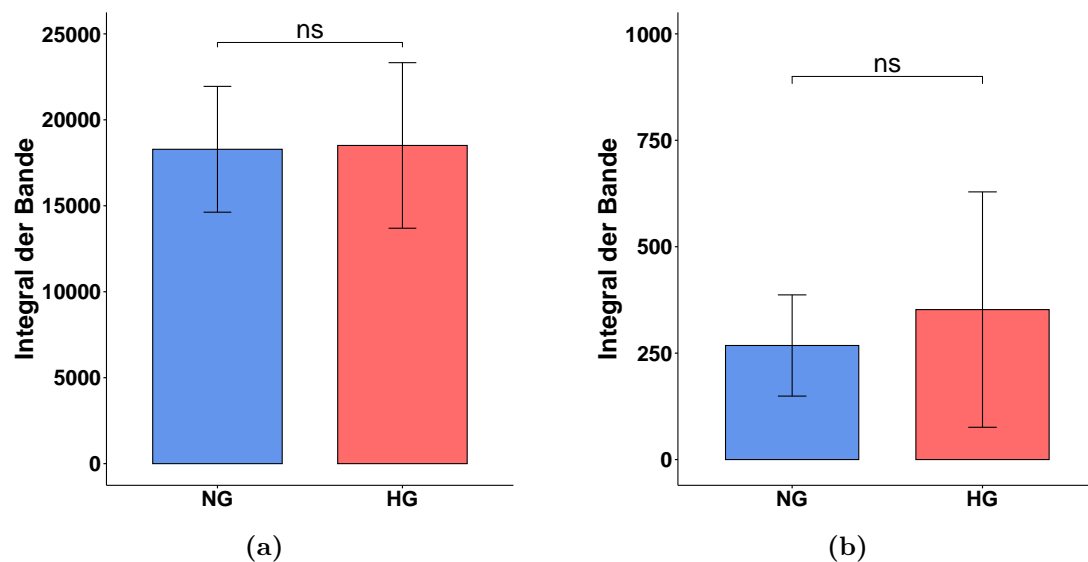
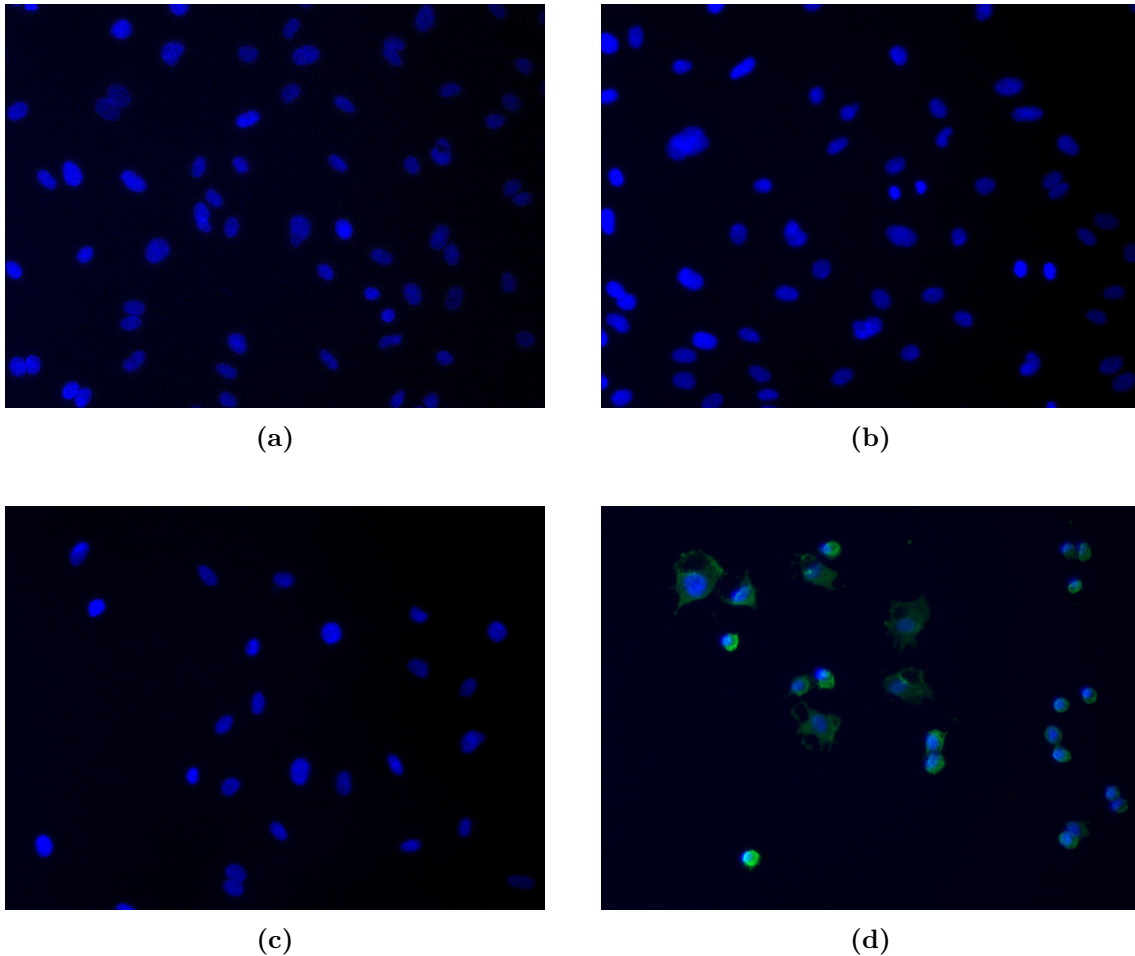


Abbildung 3.5

**Auswertung der densitometrischen Analyse der Gelatine-Zymographie.** Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung der densitometrischen Analyse der unteren (a) und oberen (b) Banden der Gelatine-Zymographie aus 3 unabhängigen Replikaten von serumfreiem konditioniertem Zellkulturmedium unserer HRMVEC von einem biologischen Spender. Der Vergleich zwischen normaler und hoher Glukose mittels Wilcoxon-Test mit Holm-Bonferroni-Methode zeigte keine signifikanten Unterschiede.



**Abbildung 3.6**

**Nachweis des Advanced Glycation Endproducts Methylglyoxal-derived Hydroimidazolone-1 (MGH-1) mittels Immunfluoreszenz auf HUVEC bei 40-facher Vergrößerung.** Je 5000 HUVEC pro well wurden nach Adhäsion für 48 Stunden mit normaler Glukose (a), hoher Glukose (b), 200  $\mu\text{M}$  MGO (c) oder 1600  $\mu\text{M}$  MGO (d) kultiviert. Die Färbung erfolgte nach PFA-Fixation mit DAPI (blau) und einem spezifischen anti-MGH-1-Antikörper (grün).

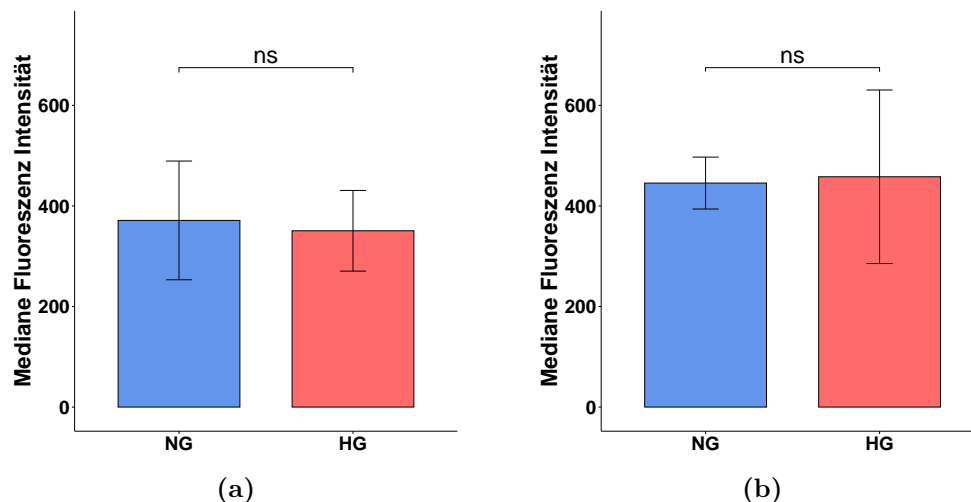
### **3.2.3 Advanced Glycation Endproducts**

Wir konnten weder eine Veränderung der GAG-Expression, noch eine veränderte MMP-Aktivität durch HG nachweisen. Es ist bekannt, dass Glukose zur Bildung von AGE führen kann, welche die Adhäsion von Perizyten beeinträchtigen könnten. Daher untersuchten wir diese als Nächstes. Abbildung 3.6 zeigt die Immunfluoreszenzfärbung von HUVEC auf das AGE MGH-1. Als Positivkontrolle wurde Methylglyoxal verwendet. Hierunter zeigte sich lediglich bei der sehr hohen und apoptotisch

wirkenden Konzentration von 1600  $\mu\text{M}$  die Bildung von AGE (d). Bei geringeren Konzentrationen Methylglyoxal wie 200  $\mu\text{M}$  war eine deutliche Einschränkung der Proliferation, jedoch keine Bildung von MGH-1 (c) nachweisbar. MGH-1 konnte in HUVECs unter Kultur mit NG oder HG nicht nachgewiesen werden.

### 3.2.4 Carbonylierung

Da weder GAG, noch MMP, noch AGE eine nachweisliche Veränderung durch HG zeigten, überprüften wir zuletzt Veränderung der zellulären Carbonylierung. Abbildung 3.7 zeigt die durchflusszytometrisch bestimmte mediane Fluoreszenzintensität nach Färbung der derivatisierten zellulären Carbonylgruppen. Weder bei HRMVEC, noch bei HUVEC zeigte sich ein signifikanter Effekt durch Kultur in Medium mit hoher Glukose. Als Positivkontrollen wurden in Einzelmessungen verschiedene Konzentrationen Wasserstoffperoxid oder Glyoxal erprobt. Aufgrund fehlender Eignung als Positivkontrolle werden diese jedoch hier nicht dargestellt. Die Aussagekraft dieses Experiments ist somit stark begrenzt und wird im Abschnitt 4.2.4 ausführlich diskutiert.



**Abbildung 3.7**

**Carbonylierung von Endothelzellen in Medium mit normaler oder hoher Glukose.** (a) Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung der medianen Fluoreszenzintensität der durchflusszytometrischen Messungen von 5 unabhängigen Experimenten mit HRMVEC eines Spenders. (b) Ergebnisse der durchflusszytometrischen Messungen von 2 unabhängigen Experimenten mit einem HUVEC Pool aus 4 verschiedenen Spendern. Der Vergleich zwischen normaler und hoher Glukose mittels Wilcoxon-Test mit Holm-Bonferroni-Methode zeigte keine signifikanten Unterschiede.

### **3.2.5 Veränderungen der mechanischen Eigenschaften der ECM**

Da unsere Suche nach HG-induzierten Veränderungen der ECM auf biochemischer Ebene bislang erfolglos blieb, entwickelten wir die Hypothese, dass veränderte mechanische Eigenschaften unsere Beobachtung der Adhäsions- und Proliferationsexperimente erklären könnten. In Zusammenarbeit mit Johanna Hafner von Institut für Mechanische Verfahrenstechnik und Mechanik des Karlsruher Instituts für Technologie konnten wir erstmals zeigen, dass die Methode Multiple Particle Tracking (MPT) zur Messung der mechanischen Eigenschaften der ECM in direkter Zellumgebung anwendbar ist. Zusätzlich konnten wir erste Hinweise auf eine Glukose-vermittelte Veränderung der mechanischen Eigenschaften der ECM finden. Die Ergebnisse der Zusammenarbeit sind in Abbildung 3.8 dargestellt.

### **3.2.6 HUVEC RT-qPCR**

Keines der verwendeten Nachweissystem ergab deutliche Unterschiede in der ECM-Zusammensetzung. Um Klarheit darüber zu bekommen, ob eine zelluläre Reaktion unserer HUVEC auf die Kultur in HG vorliegt, fokussierten wir uns nun darauf eine HG-induzierte Veränderung der Genexpression nachzuweisen. Hierzu verwendeten wir einen RT-qPCR-Array, den wir basierend auf Literaturdaten für unsere Fragestellung zusammengestellt haben. Wir verglichen damit die Genexpression von HUVEC, welche für 5 Tage in  $\frac{1}{4}$  Medium mit NG oder HG kultiviert wurden. Wie in Abbildung 3.9 dargestellt, zeigten sich unter der Betrachtung von 3 biologischen Replikaten jedoch auch hier keine signifikant differenziell exprimierten Gene im Vergleich HUVEC NG versus HUVEC HG. HRMVEC wurden nicht eingehender analysiert, da hier nur ein biologisches Replikat zur Verfügung stand.



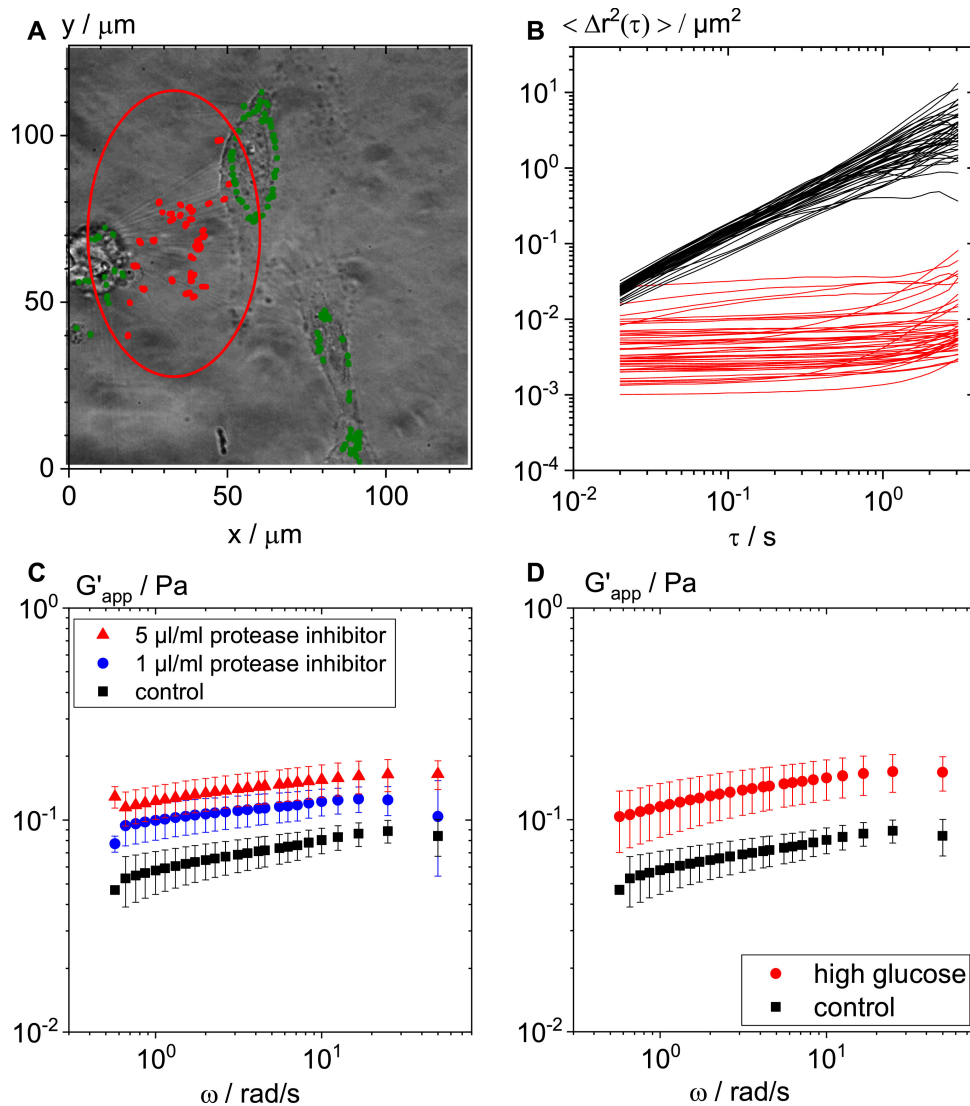
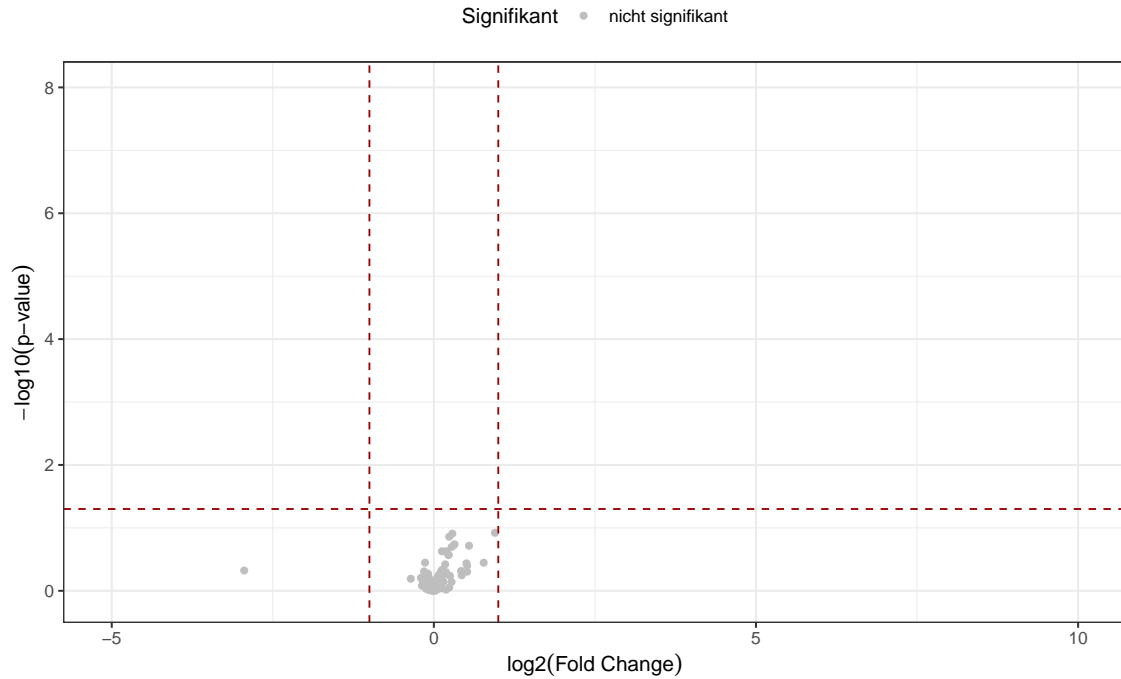


Abbildung 3.8

**Multiple Particle Tracking (MPT)-Untersuchung der HUVEC-ECM.** **A** Die Lichtmikroskopische Aufnahme einer Hochgeschwindigkeitskamera zeigt bei 100-facher Vergrößerung 3 Zellen und die ihre filigranen ECM-Strukturen. Die  $0,2\ \mu\text{m}$  großen MPT-Partikel in der ECM sind rot hinterlegt. Die grün hinterlegten Partikel wurden für die Analyse ausgeschlossen, da sie an den Zellwänden haften. **B** Exemplarische Darstellung der Auswertung einer MPT Messung in unterschiedlichen Konditionen mit einem Protease-Inhibitor oder hoher Glukose. Betrachtet wird das Verhältnis von mittlerer quadratischer Verschiebung zur Wartezeit. Aus diesen Trajektorien lässt sich der sogenannte apparant bulk modulus  $G'_{app}$  als Maß für die Elastizität der Partikelumgebung berechnen. **Abbildung C** zeigt die Erprobung der Methode an HUVEC-ECM welche mit einem Proteinase-Inhibitor behandelt wurde. **Abbildung D** zeigt den Effekt einer Behandlung mit 100 mM Glukose. Die Abbildung wurde entnommen und übersetzt aus: J. Hafner et al. (2020). Monitoring matrix remodeling in the cellular microenvironment using microrheology for complex cellular systems. *Acta Biomater.* 111, 254–266. doi: 10.1016/j.actbio.2020.04.053



**Abbildung 3.9**

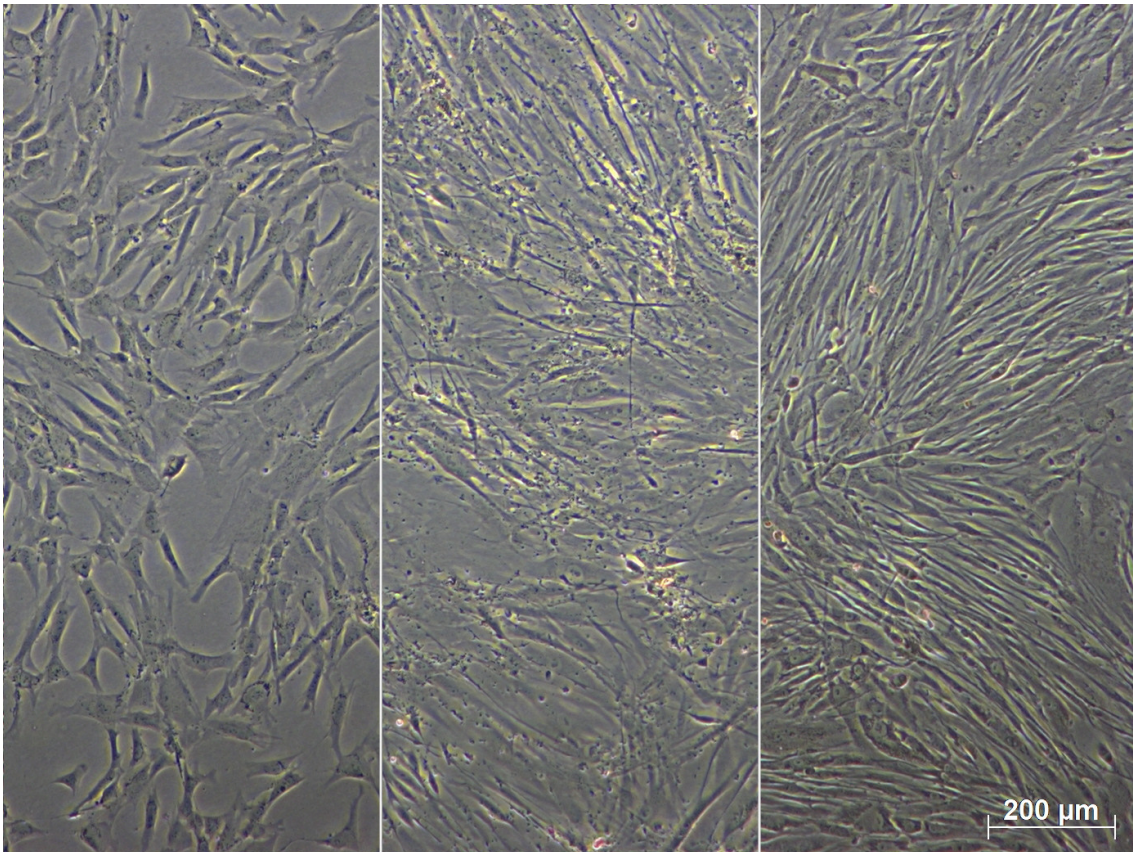
**Volcano plot des RT-qPCR Arrays von HUVEC.** RT-qPCR Array Analyse von HUVEC, welche für 5 Tage in 1/4 Medium mit normaler oder hoher Glukosekonzentration kultiviert wurden. Dargestellt ist das Verhältnis von statistischer Signifikanz (p-Wert) zu biologischem Ausmaß der Veränderung (fold change). In diesem Experiment wurden keine signifikant differenziell exprimierten Gene nachgewiesen.

### 3.3 Vergleichende Analyse von ASC und Perizyten

Heiner Kremer konnte in seiner Doktorarbeit zeigen, dass die Interaktion von Perizyten mit HG-modifizierter HUVEC ECM beeinträchtigt ist, die der ASC jedoch nicht. Unter Verwendung von NG/HG HRMVEC ECM konnten diese Daten reproduziert werden (Abbildung 3.2). Leider blieb unsere Suche nach molekularen Ursachen der HUVEC oder HRMVEC ECM-Modifikation erfolglos. Aus diesem Grund richteten wir unseren Fokus weg von HUVEC/HRMVEC hin zu den ASC und Perizyten. Wir verglichen diese beiden Zelltypen eingehend und insbesondere unter Betrachtung der für die Adhäsion verantwortlichen Faktoren.

#### 3.3.1 Morphologie und Kulturverhalten

Unter den jeweiligen Standardkulturbedingungen der 3 Zelltypen (Abbildung 3.10) zeigte sich phasenkontrastmikroskopisch bei den ASC die klassische fibroblastenartige, spindelförmige Morphologie. Die CSPC zeigten eine sehr ähnliche Morphologie bei vergleichbarem Wachstumsverhalten. HRMVPC zeigten hingegen eine unruhigere, größere und flachere Morphologie mit deutlich sichtbaren Vesikeln und Granulae bei eingeschränktem Proliferationspotential. Im Gegensatz zu ASC und CSPC, ließen sich die HRMVPC nur schwer durch Trypsin/EDTA vom Boden der Zellkulturflaschen lösen und neigten zur Aggregation. Aufgrund der Aggregation war eine Zählung mittels Casy-Counters oder Neubauer-Kammer nicht möglich. Eine zuverlässige Bestimmung der Zellzahl war nur mittels NucleoCounter möglich. Alles in allem imponierten die HRMVPC wie seneszente Zellen. Es zeigten sich also in der bloßen Zellkultur große Unterschiede zwischen den beiden humanen retinalen Perizyten der zwei verschiedenen Hersteller Pelo-Biotech (HRMVPC) und cell systems (CSPC).



**Abbildung 3.10**  
**Morphologie von ASC, CSPC und HRMVPC.** Repräsentative lichtmikroskopische Phasenkontrastaufnahme der drei Zelltypen unter ihren Standardkulturbedingungen vor dem Passagieren. Von links nach rechts: ASC, HRMVPC, CSPC.

### 3.3.2 Genexpressionsanalyse auf Basis der Arraydaten

Wir führten zunächst eine Microarray-Analyse durch, um Unterschiede im Genexpressionsprofil zwischen ASC und HRMVPC zu erfassen. Abbildung 3.11 zeigt zum groben Überblick die Microarray-Daten mit einer Selektion im Zusammenhang dieser Arbeit relevanter Gene als Volcano Plots. Volcano Plots sind eine Art der Daten-Visualisierung, bei der in einem Streudiagramm das Verhältnis von statistischer Signifikanz (p-Wert) zum biologischen Ausmaß der Veränderung (fold change) dargestellt wird. Zur leichteren Verständlichkeit werden die beiden Parameter logarithmisch skaliert. Somit lassen sich mit Hilfe der eingezeichneten Cutoffs für das Signifikanzniveau auf der y-Achse und den fold change auf der x-Achse sehr leicht die am meisten differenziell exprimierten Gene ablesen.

Im Vergleich ASC NG vs HRMVPC NG waren im MicroArray 2533 Gene signifikant höher in ASC und 2873 Gene signifikant höher in HRMVPC exprimiert. Die KEGG pathway Analyse zeigte bei den ASC eine signifikante Anreicherung in der Gruppe „genetic information processing“. Bei HRMVPC zeigte sich eine signifikante Anreicherung in der Gruppe „environmental information processing“. Der Vergleich ASC NG versus ASC HG beziehungsweise HRMVPC NG versus HRMVPC HG zeigte nur sehr geringe und unspezifische Differenzen, weshalb auf die Darstellung von Volcano Plots verzichtet wurde. So waren beim Vergleich ASC NG versus ASC HG 56 Gene signifikant differenziell exprimiert, während bei HRMVPC NG versus HRMVPC HG 117 Gene signifikant differenziell exprimiert waren. Ziel der MicroArray-Analyse war dabei vorrangig der Vergleich zwischen beiden Zelltypen in NG, da ASC und Perizyten in unseren ECM-Experimenten keinen Kontakt zu Medium mit HG hatten. Der Vergleich NG versus HG wurde lediglich durchgeführt um festzustellen, ob HG per se einen Einfluss auf ASC oder Perizyten hat.

Bei Betrachtung der Expression in der Literatur diskutierter Perizytenmarker, stachen FLT1, MMP1, ANGPT1, FBLN1 und RGS5 besonders hervor. Diese Gene waren in den HRMVPC im Vergleich zu ASC signifikant höher exprimiert und zudem im Gen-Datensatz “pericytes” der Harmonizome database als Gene mit relativ starker funktioneller Assoziation geführt (Rouillard et al. 2016). Die gängigen Perizytenmarker ANPEP, MCAM, DES, CSPG4, PDGFRA, PDGFRB, NG2 und ASMA zeigten sich im MicroArray nicht signifikant differentiell exprimiert.

Auf Basis meiner Literaturrecherche habe ich bereits zu Beginn meiner Experimente vermutet, dass Integrine eine wesentliche Rolle bei dem unterschiedlichen Adhäsions- und Proliferationsverhalten von ASC und Perizyten spielen könnten (Beltramo et al. 2013; Friedlander et al. 1996; Prišćáková et al. 2016; Tolentino et al. 2016; J.H. Han et al. 2010). Ich konnte hierzu über die Allgemeine Projektförderung der Deutschen Diabetes Gesellschaft ein Drittmittelprojekt mit dem Titel „Die Rolle der Integrine in der differentiellen Sensitivität von mesenchymal stromalen Zellen und retinalen Perizyten gegenüber Glukose-modifizierter extrazellulärer Matrix“ in Höhe von 10.000 € einwerben.

Zunächst betrachteten wir die Expression diesbezüglich relevanter Gene in unseren MicroArray-Daten genauer. Basierend auf Recherchen in der Datenbank Pubmed Genes wurde die Auswahl an potentiell relevanten Genen eingegrenzt. Unter dem Suchterminus „adhesion AND Homo sapiens“ zeigten sich 434 signifikant differentiell

exprimierte Gene. Die Integrin subunits alpha 1, alpha 2, alpha 4 und alpha 6 waren in HRMVPC hochreguliert, während ASC Integrin subunits alpha 5 und beta 1 höher exprimierten. Dabei standen nicht durch HG induzierte Veränderungen, sondern die mögliche differentielle Wahrnehmung der extrazellulären Umgebung von ASC und Perizyten im Fokus. In unseren ECM-Interaktions-Versuchen waren die ASC und Perizyten nur der NG-Bedingung ausgesetzt. Daher sind nur die Expressionsunterschiede in dieser Bedingung relevant, um eine Erklärung für die differentielle Wahrnehmung ihrer extrazellulären Umgebung zu verstehen.

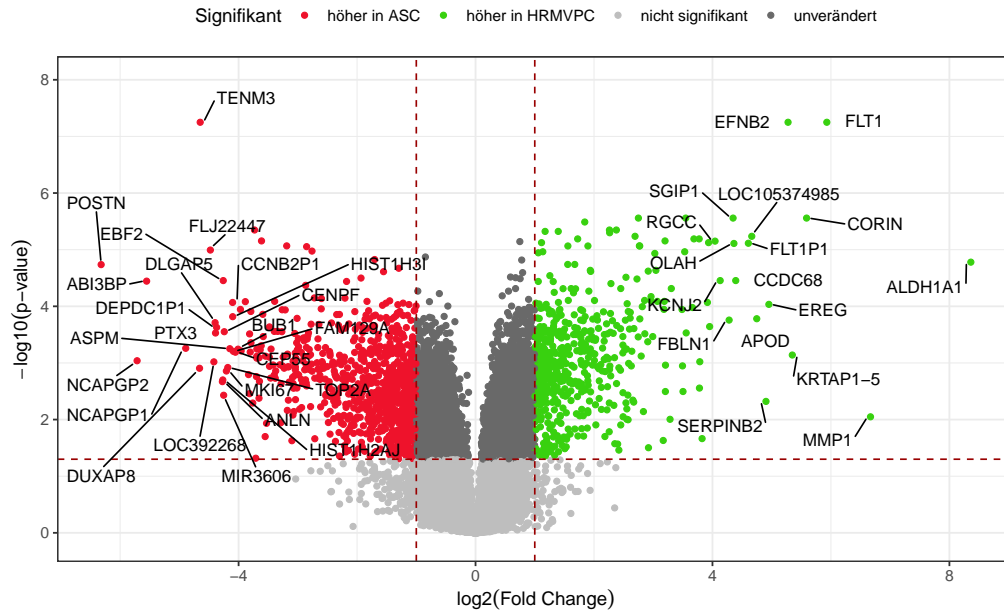
Mit Hinblick auf die ECM fanden sich unter den in HRMVPC hochregulierten Genen laminin subunit alpha3, collagen type XI alpha 1 chain, collagen type VIII alpha 1 chain und matrix metalloproteinase-1. In den ASC waren laminin subunit alpha 1, tenascin C, sowie collagen type IV alpha 1 und 2 höher exprimiert.

Die Daten unseres RT-qPCR-Arrays sind in 3.12 analog zu den Microarray-Daten als Volcanoplots dargestellt. Die PCR-Daten zeigten eine starke und statistisch signifikante Korrelation zu den Microarray-Daten (Rangkorrelation nach Spearman mit  $R = 0.95$  und  $p < 0.001$ ).

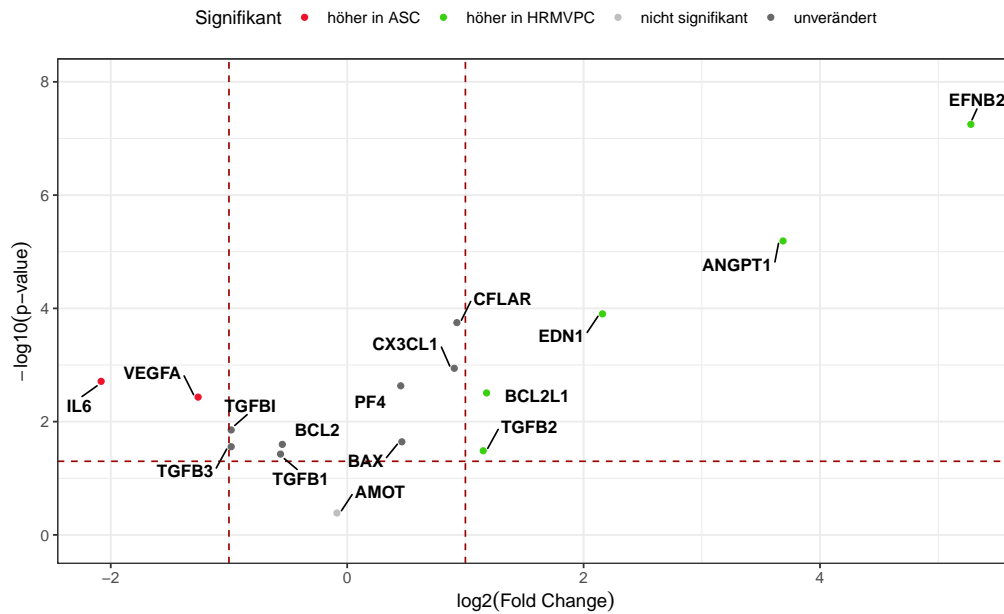
### 3.3.3 Expression von Oberflächenantigenen

Unter durchflusszytometrischer Betrachtung klassischer MSC-Marker ließen sich ASC, CSPC und HRMVPC nicht voneinander diskriminieren. Alle drei Zelltypen entsprachen den typischen MSC-Markern (Dominici et al. 2006) und waren demnach CD 105, CD 73 und CD 90 positiv, sowie CD 45, CD 34, CD 31 und HLA-DR negativ, wie in Abbildung 3.13a und 3.13b dargestellt.

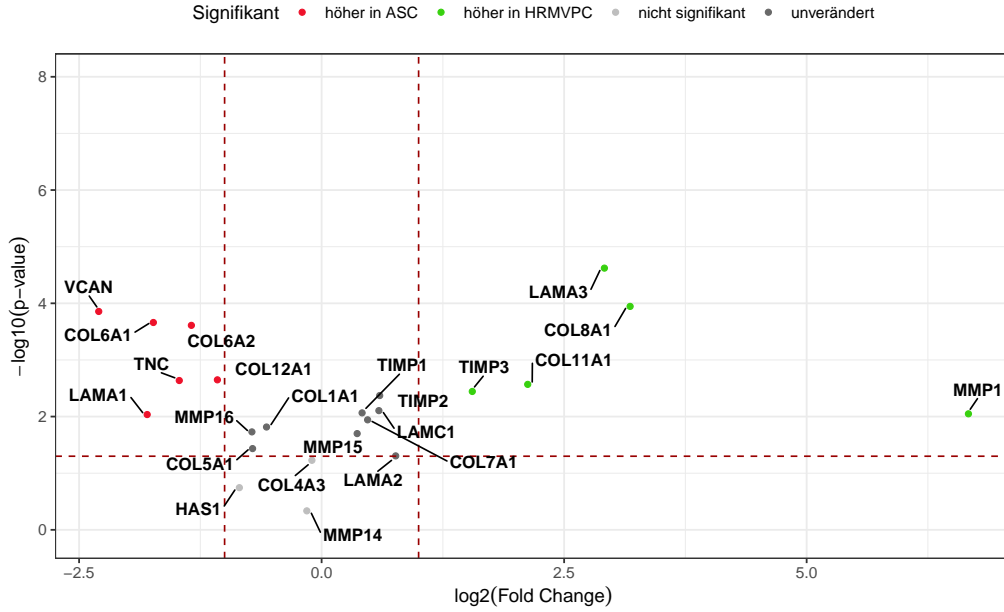
Bei der Betrachtung potentieller Perizytenmarker zeigten alle drei Zelltypen keine oder nur eine sehr geringe Expression von NG2, CD140a, CD140b und CD248. Auch in der Expression verschiedener in Abbildung 3.13d dargestellter Integrine präsentierten sich die drei Zelltypen sehr ähnlich. Zusammenfassend ließen sich bei unseren durchflusszytometrischen Untersuchungen keine signifikanten Unterschiede zwischen ASC, CSPC und HRMVPC feststellen.



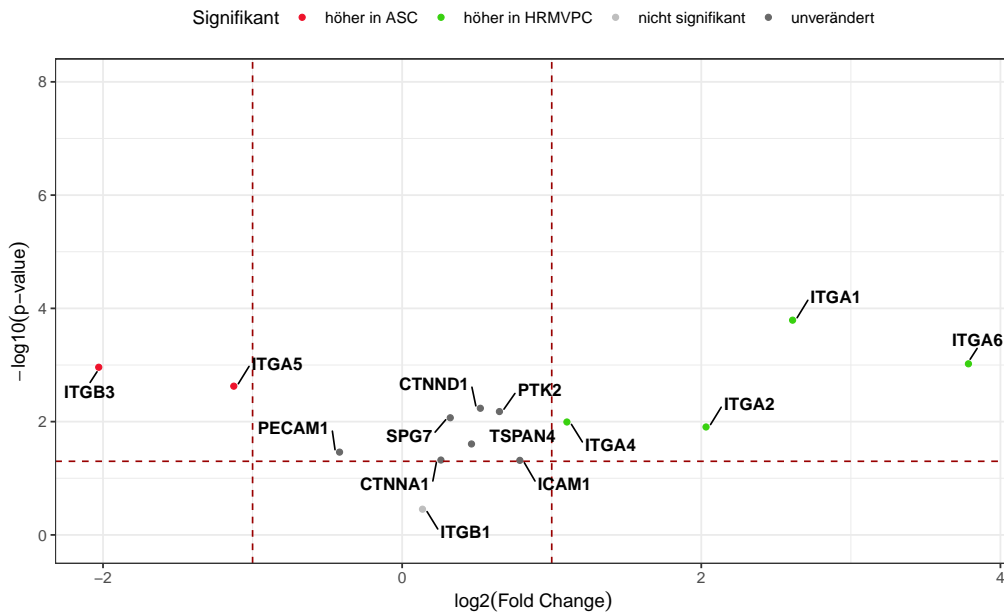
(a) Am stärksten differentiell exprimierte Gene



(b) Sekretierte Faktoren bezogene Gene



(c) ECM bezogene Gene



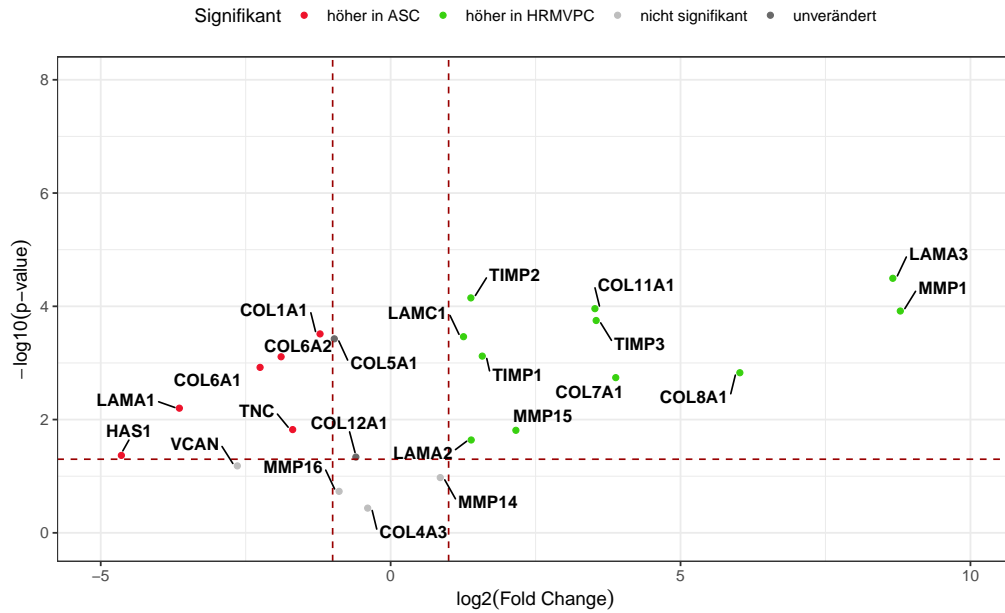
(d) Adhäsion bezogene Gene

Abbildung 3.11

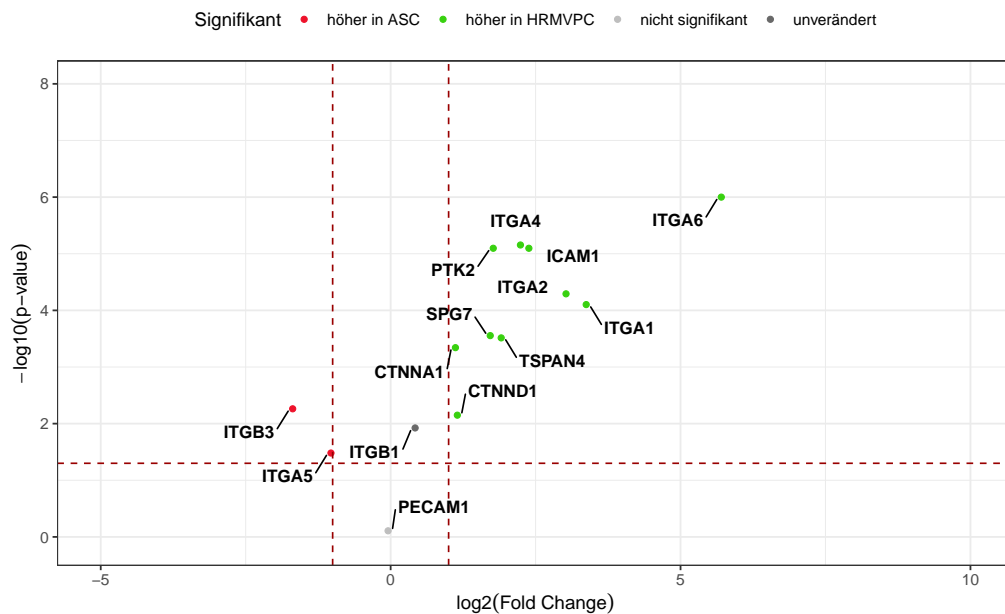
Volcano plots der Microarray-Daten des Vergleichs von ASC und HRMVPC in normaler Glukose. Verwendet wurden jeweils 3 biologische Replikate von ASC und HRMVPC. Hervorgehoben wurden die am stärksten differentiell exprimierte Gene (a) oder Gene mit Bezug zu unseren Fokussen (b) sekretierte Faktoren, (c) ECM oder (d) Adhäsion.







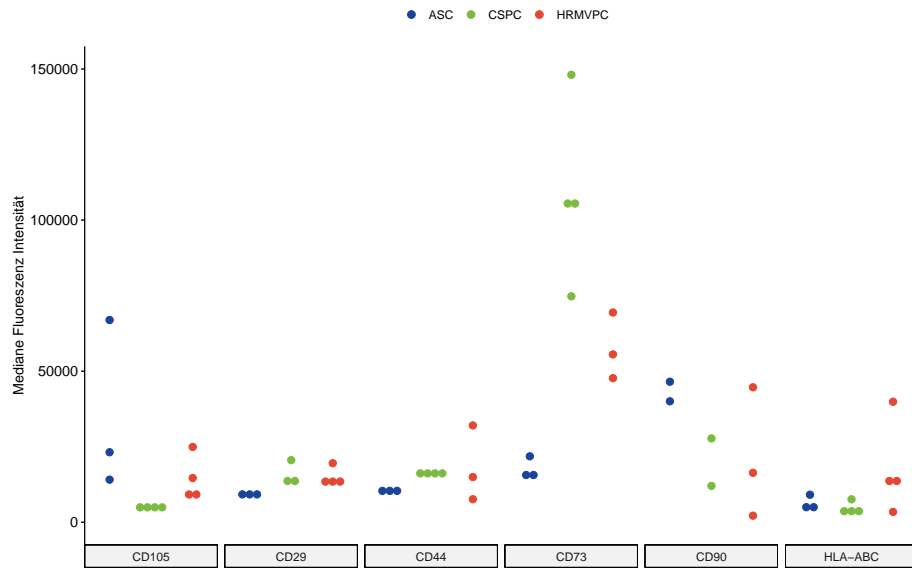
(c) ECM bezogene Gene



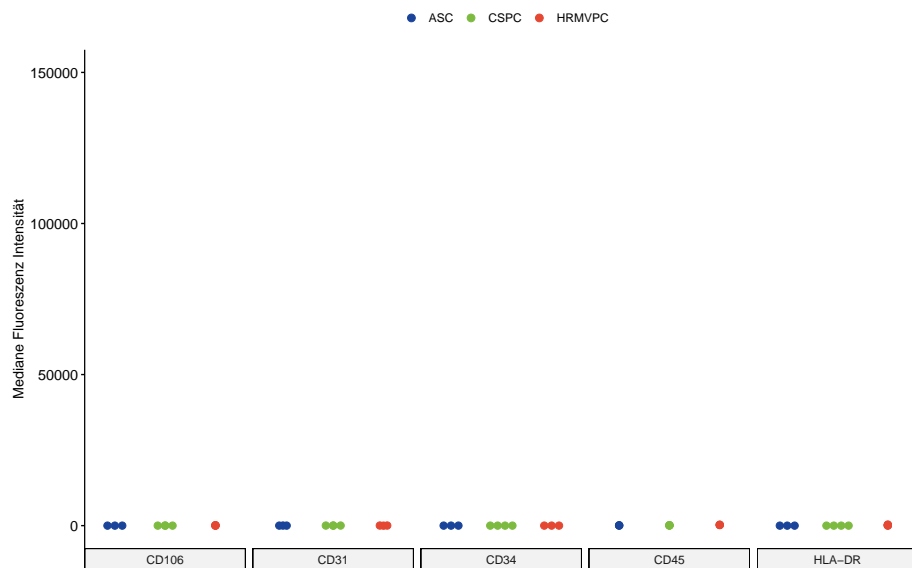
(d) Adhäsion bezogene Gene

**Abbildung 3.12**

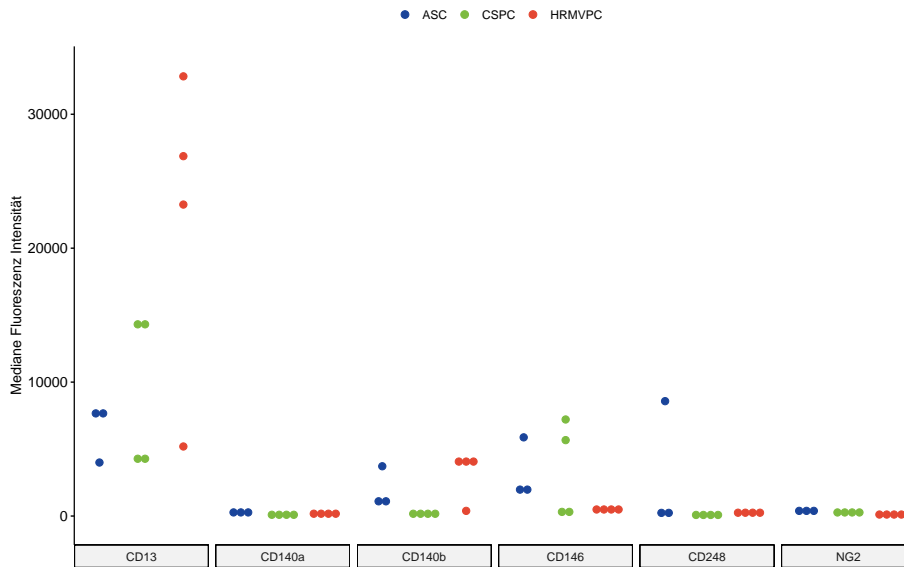
Volcano plots der RT-qPCR-Daten des Vergleichs von ASC und HRMVPC in normaler Glukose. Verwendet wurden jeweils 3 biologische Replikate von ASC und HRMVPC. Hervorgehoben wurden die am stärksten differentiell exprimierten Gene (a) oder Gene mit Bezug zu unseren Fokussen (b) sekretierte Faktoren, (c) ECM oder (d) Adhäsion. Eine Liste der verwendeten Gene findet sich in Tabelle 2.9.



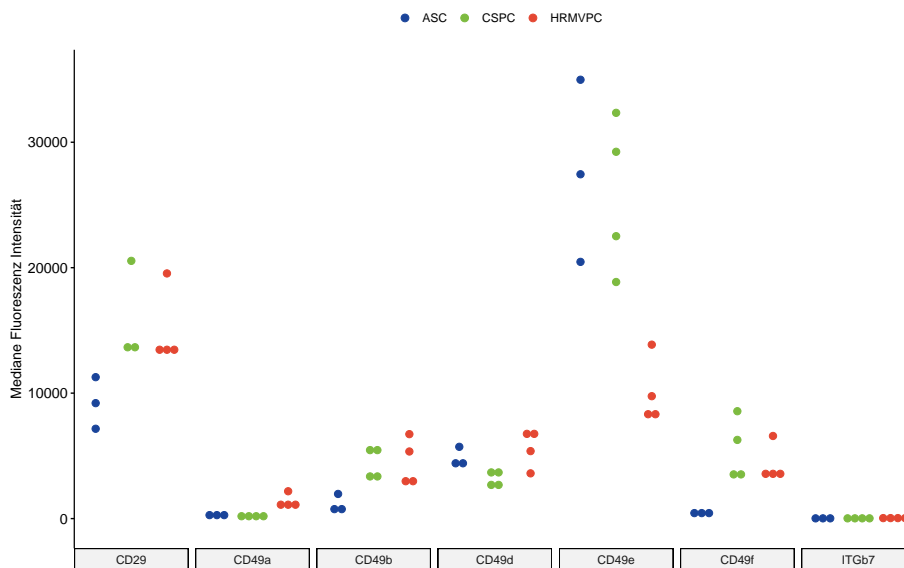
(a) Expression der etablierten positiven MSC-Marker



(b) Expression der etablierten negativen MSC-Marker



(c) Expression der diskutierten Perizytenmarker



(d) Expression ausgewählter Integrinuntereinheiten

### Abbildung 3.13

**Expression ausgewählter Oberflächen-Antigene von ASC und Perizyten.** Ergebnisse der durchflusszytometrischen Messungen mit 3 biologischen Replikaten von ASC und HRMVPC, sowie 2 biologischen Replikaten von CSPC. Abweichend von den 3 biologischen Replikaten für ASC und HRMVPC konnten aufgrund von Problemen während der Messung, wie Aggregation der Zellen oder zu geringer Zellzahl vereinzelt nur 2 biologische Replikate ausgewertet werden. Der statistische Vergleich der Messwerte jedes einzelnen Oberflächenantigen zwischen den drei Zelltypen mittels Wilcoxon-Test und Holm-Bonferroni-Methode zeigte keine signifikanten Unterschiede.

## 4 Diskussion

### 4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Wir konnten den von Herrn Kremer beschriebenen negativen Effekt der HG-Endothelzell-ECM auf retinale Perizyten bestätigen. Die zusammenfassende Betrachtung aller Ergebnisse deutet auf keine oder nur geringfügige zellphysiologische Reaktionen von Endothelzellen, ASC oder Perizyten auf die Stimulation mit hoher Glukose hin. Am deutlichen zeigt sich dies in den fehlenden Unterschieden in den Genexpressions-Analysen beim Vergleich der Zellen in Standardkulturbedingungen zu der Kultur in Medium mit hoher Glukose, konkret dem RT-qPCR-Array der HUVEC und dem MicroArray der ASC und Perizyten. Deshalb vermuten wir zellunabhängige chemische oder physikalische Modifikationen der ECM durch die Glukose im Endothelzell-Medium. Unsere MPT-Messungen zeigten erste Hinweise dafür, dass Glukose die mechanischen Eigenschaften respektive die Elastizität der ECM verändern kann. Dies stellt einen Ansatzpunkt weiterer Forschung dar.

Da keine deutlichen ECM-Veränderungen feststellbar waren, vermuteten wir Unterschiede zwischen ASC und Perizyten als grundlegende Ursache für die Beobachtungen unserer ECM-Interaktion-Experimente. Während sich die Pathway-Analysen im Vergleich von ASC versus Perizyten eher unspezifisch gestalteten, zeigten sich klare Unterschiede in der Expression von Integrinen. Diese ließen sich jedoch auf Oberflächenexpressions-Ebene nicht bestätigen. Zusätzlich versprachen die MicroArray-Daten wertvolle Hinweise auf die Beziehung zwischen ASC und Perizyten, welche in der Literatur kontrovers diskutiert wird. Eine klare Diskriminierung von ASC und Perizyten auf Basis der Genexpressions-Daten, vor allem an Hand diskutierter Perizyten-Marker, war zwar möglich, die Untersuchung auf Ebene der Oberflächenantigen-Expression bestätigte dies jedoch nicht. Somit bestand die ein-

zige eindeutige Möglichkeit zur Diskriminierung beider Zelltypen durch die funktionellen Angiogenese-Assay meiner Kollegin Frau Fiori.

Die einzelnen Teilergebnisse dieser Arbeit werden im folgenden detailliert diskutiert.

## **4.2 Einfluss hoher Glukose auf die extrazelluläre Matrix von retinalen Endothelzellen**

Direkt an die Vorarbeiten von Herrn Kremer anknüpfend, untersuchten wir den Einfluss einer erhöhten Glukosekonzentration in der Zellkultur von Endothelzellen. Ich verifizierte hierbei die an HUEVC gewonnen Befunde von Herrn Kremer mit humanen retinalen Endothelzellen (HRMVEC). Bei der Suche nach molekularen Targets nutzte ich sowohl HUVEC als auch HRMVEC. Während uns HUVEC von unterschiedlichen Spendern sowie Spender-Pools zur Verfügung stehen, war bei den kommerziell erhältlichen HRMVEC nur eine Zell-Linie eines einzelnen Spenders verfügbar. Daher haben die HUVEC Experimente in der Regel biologische und technische Replikate, während wir uns bei den HRMVEC auf technische Replikate beschränken mussten. Trotz Untersuchung unterschiedlichster molekularer Targets konnten wir überraschender Weise keine HG-induzierten zellphysiologischen Veränderungen bei den Endothelzellen und ihrer ECM nachweisen. Da wir auf Basis unserer Literaturrecherche jedoch stark von Glukose-induzierten zellphysiologischen Veränderungen ausgegangen sind, sollen unsere einzelnen Beobachtungen im Folgenden erörtert werden.

### **4.2.1 Glykosaminoglykane**

Wir konnten keine Glukose-induzierte Veränderung der GAG-Konzentration unserer extrazellulären Matrix feststellen. Gharagozlian et al. haben zuvor eine Verminderung des GAG Heparansulfatproteoglykan in der Kultur von HUVEC über 5 Tage beschrieben. Als Zellkulturmedium verwendeten sie DMEM mit Zusatz von 10 % FBS, 10 IU/ml Heparin und 10 µg/ml eines endothelial cell growth supplement (Gharagozlian et al. 2006b). Unser Standard-Medium EGM2 enthielt 2 % FBS und 22,5 µg/ml Heparin. Ergänzend dazu konnten wir bei der Verwendung unseres 1/4-

Mediums eine höhere Stressanfälligkeit unserer Endothelzellen, z.B durch zu geringe Aussattdichten, beobachten. Wir vermuteten, dass dies an dem verminderten Gehalt an Wachstumsfaktoren, unter anderem aus dem FBS, liegen kann. Somit hätten wir in unserem Experiment im Vergleich zu den Beobachtungen von Gharagozlian einen stärkeren Effekt der Glukose erwartet, welcher allerdings ausblieb.

Han et al. beschrieben ebenfalls einen Einfluss von Glukose auf die GAG-Konzentration von Endothelzellen. Sie beobachteten eine höhere GAG-Konzentration im Zellkulturmedium ihrer HG-Kondition im Vergleich zur Kontrolle. Dabei postulierten sie eine vermehrte Degradation der GAG durch eine Glukose-induzierte Hochregulierung von Heparanase (J. Han et al. 2009). Dies brachte uns auf die Idee für unser Experiment die Heparanase durch Zugabe ihres Substrates Heparin kompetitiv zu hemmen. Wir sahen dabei den erwarteten Effekt einer erhöhten GAG-Konzentration der ECM in unserer Heparin-Kondition. Obzwar dieser nicht signifikant war, ist vor dem Hintergrund des Mechanismus der kompetitiven Hemmung ein signifikanter Unterschied bei höherer Heparinkonzentration anzunehmen.

#### **4.2.2 Matrix-Metalloproteinasen**

Ähnlich der Heparanase bilden die Matrix-Metalloproteinasen eine große Gruppe weiterer ECM-degradierender Enzyme. Mittels Gelatine-Zymographie konnten wir im Zellkulturüberstand unserer Endothelzellen MMP-2 nachweisen, wobei wir auch hier keine Glukose-abhängigen Unterschiede feststellen konnten. Interessanter Weise beschrieben Gharagozlian et al. in einer früheren Arbeit ebenfalls einen vergleichbaren Versuchsaufbau einer Gelatine-Zymographie von konditioniertem serumfreiem HUVEC-Medium (Gharagozlian et al. 2006a). Sie sahen eine Verminderung der MMP-2 Sekretion der HUVEC durch die Kultur in hoher Glukose. Bei genauerer Betrachtung kann man meiner Meinung nach in deren Arbeit jedoch eine Donorvariabilität der drei HUVEC-Spender erkennen. Dies würde bedeuten, dass HUVEC von unterschiedlichen Spendern unterschiedlich auf die Kultur in HG reagieren könnten und bekräftigt wie wichtig eine ausreichende Anzahl biologischer Replikate für Zellkulturexperimente ist. Wir haben in unseren Experimenten keine deutliche Unterschiede zwischen einzelnen HUVEC-Spendern und auch keine signifikanten Unterschiede zwischen NG und HG beobachtet. Gleichzeitig konnte wir bei den selben

Zellisolaten jedoch eine Glukose-abhängige Veränderung ECM durch die verminderte Proliferation von HRMVPC beobachten. Somit ist meiner Meinung eine mögliche spenderabhängige Glukose-Sensitivität ein großes Problem der diabetischen Grundlagenforschung, während die Relevanz im Kontext unserer spezifischen Fragestellung der beobachteten ECM-Modifikation allerdings eher gering ist.

Eine weitere vergleichbare Arbeit beschreibt Glukose-induzierte Unterschiede in der MMP-2 Sekretion bei erhöhter Sekretion der MMP-Inhibitoren TIMP-1 und TIMP-2 (McGinn et al. 2004). Beide Arbeiten beschreiben dies in HUVEC, während wir in diesen Experimenten mit retinalen HRMVEC gearbeitet haben. Dabei konnten wir nur Zellen von einem einzigen Spender analysieren. Es ist also möglich, dass der andere Zelltyp und der einzelne verfügbare Spender das Fehlen einer vergleichbaren Veränderung begründen. Bekräftigt wird unser Ergebnis durch die Überprüfung der MMP und TIMP Expression mittels RT-qPCR. Hierbei konnten wir bei 3 biologischen Replikaten von HUVEC keine signifikanten Unterschiede in der Expression von MMP1, MMP15, MMP16, sowie TIMP1, TIMP2 und TIMP3 feststellen. Ergänzend dazu zeigten Grant et al. bei der Untersuchung von diabetischen und nicht diabetischen humanen retinalen Endothelzellen, kultiviert in normaler oder hoher Glukose, keine Unterschiede in der Expression von MMP2 und MMP9 (Grant et al. 1998).

### **4.2.3 Advanced Glycation Endproducts**

Neben enzymatisch bedingten Veränderungen der ECM, kommen auch postsekretorische Modifikationen als Erklärung für unsere Beobachtungen in Frage. Ein möglicher Mechanismus ist die nicht-enzymatische Adduktion von Glukose. In unseren Versuchen konnten wir keine Bildung des AGE MGH-1 in der Zellkultur von HUVEC mit 25 mM Glukose über 48 h nachweisen.

Möglicherweise sind 48 h als Inkubationszeit dieser Glukosekonzentration zu kurz, um zu einer mittels Immunfluoreszenz nachweisbaren Bildung von MGH-1 zu führen. Ebenso könnte MGH-1 als ein AGE von vielen, nicht oder nur kaum durch die Adduktion von Glukose gebildet werden. In unserer Positivkontrolle konnten wir mit MGO nur unter apoptotisch wirkenden Konzentrationen die Bildung von MGH-1 nachweisen. Zur genaueren Klärung wäre eine massenspektrometrische Untersuchung zum Nachweis kleinster Mengen nötig. Leider ließen sich keine ausrei-



chenden Mengen HUVEC-/HRMVEC ECM für massenspektrometrische Untersuchungen ernten, daher war uns eine isolierte Untersuchung der ECM-AGE nicht möglich.

Möchte man diese Glukose- oder MGO-induzierten Veränderungen in Form von AGE untersuchen so stellt sich die schwierige Frage der richtigen Methodik. Die Methode mit der höchsten Genauigkeit wäre die HPLC-MS/MS. Zwar kann man damit jede entsprechende chemische Proteinmodifikation genau detektieren und quantifizieren, allerdings muss die gesuchte Modifikation chemisch exakt bekannt sein und zur Quantifikation als Reinsubstanz zur Herstellung einer Standardreihe zur Verfügung stehen. Unter anderem dadurch ist diese Methode sehr aufwendig und kostenintensiv. Wesentlich einfacher, allerdings auch weniger spezifisch und sensitiv sind immunologische Methoden wie ELISA oder Immunfluoreszenzverfahren. Hierbei ist jedoch stets zu berücksichtigen, wie gut der jeweilige Antikörper funktioniert und an welchen Zielstrukturen er binden kann. Da sich diese Frage in erster Linie mit viel Erfahrung beantworten lässt haben wir uns an bekannte Arbeitsgruppen gewandt. Von der Arbeitsgruppe Thomas Fleming der Universität Heidelberg erhielten wir freundlicher Weise einen anti-MGH1-Primärantikörper, welchen wir mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie zur Untersuchung unserer Endothelzellen verwendeten. Einen Unterschied konnten wir jedoch nicht beobachten.

Einen weiteren vielversprechenden Hinweis erhielten wir von der Arbeitsgruppe Wagner, ebenfalls von der Universität Heidelberg. Basierend auf ihrer Methodik zur Detektion von zellulären Carbonylgruppen mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie und Western Blot versuchten wir eine Methode zur durchflusszytometrischen Quantifikation zellulärer Carbonylgruppen zu etablieren.

#### **4.2.4 Carbonylierung**

Die diabetische Dysregulation des Glukosemetabolismus kann über ein erhöhtes Level an reactive oxygen species zu der Bildung von sehr reaktiven Oxidationsprodukten von Glukose, wie Glyoxal und Methylglyoxal führen (Brownlee 2001). Diese führen neben der Bildung von AGE auch zu einer vermehrten Carbonylierung von Proteinen. Die Carbonylierung von Plasmaproteinen bei Patienten mit Adipositas oder Diabetes mellitus Typ 2 wurde von Bollineni et al. ausführlich untersucht. Dabei wurden unter anderem Modifikationen der Zelladhäsionsmoleküle Integrin al-

pha6 und versican core protein sowie der angiogeneserelevanten Proteine MMP2 und VEGFR-2 beschrieben (Bollineni et al. 2014).

In unseren Versuchen konnten wir keine Hinweise auf Veränderungen der zellulären Carbonylierung feststellen. Leider blieb eine vermehrte Induktion zellulärer Carbonylgruppen auch in unseren Positivkontrollen mit  $H_2O_2$  oder Glyoxal aus. Die Titration dieser beiden als Positivkontrolle erprobten Substanzen gestaltete sich schwierig. Bei niedrigen Konzentrationen zeigte sich kein Effekt. Höhere Konzentrationen führten hingegen zu zellulärer Apoptose und verhinderten somit die durchflusszytometrische Messung. Möglicherweise bedarf es zur messbaren Erhöhung des zellulären Carbonylgehalts komplexerer Stimuli.

Während viele Publikationen die direkte chemische Modifikation von extrahierten Proteinen betrachten (Fedorova 2013), befassen sich eher weniger Publikationen mit Messungen in Zellkulturmodellen. Jung et al. konnten an HT22-Zellen die Induktion von zellulärer Proteincarbonylierung durch nicht toxische Dosen  $H_2O_2$  sehr gut darstellen. Sie zeigten nach 30-minütiger Behandlung der Zellen mit  $H_2O_2$  in PBS eine deutliche Induktion zellulärer Proteincarbonylierung, welche jedoch bereits 6 Stunden nach der Behandlung nicht mehr nachweisbar war (Jung et al. 2006). In unseren Versuchen haben wir mit dem Hintergrund der chronischen Stoffwechselveränderung bei Diabetes mellitus längere Stimulationszeiträume erprobt. Die Behandlung mit hoher Glukose erfolgte über 5 Tage, während wir als Positivkontrolle Behandlungen mit  $H_2O_2$  oder Glyoxal über 24 Stunden in Kulturmedium evaluierten. Eine mögliche Erklärung für unsere Beobachtungen inklusive der nicht funktionierenden Positivkontrolle wäre, dass die von uns erprobten Stimuli entweder so stark waren, dass die Zellen in die Apoptose getrieben wurden, oder aber so schwach, dass die Zellen über einen ausreichenden Kompensationsmechanismus verfügen, sodass kurzfristig induzierte Proteincarbonylierung nach 24 Stunden bereits kompensiert waren und die Zellen ihrem Ausgangszustand wiederherstellen konnten.

#### **4.2.5 Einfluss hoher Glukose auf die mechanischen Eigenschaften der ECM**

Da wir keine Hinweise für zellphysiologisch bedingte Veränderungen der ECM finden konnten, stellte sich uns die Frage, ob unsere Beobachtungen aus den ECM-Adhäsions-Proliferation-Experimenten auf Endothelzell-unabhängigen Effekten be-

ruhen könnten. Möglich wäre eine chemische oder physikalische Modifikation der ECM durch Glukose, welche zu veränderten physikalischen Eigenschaften der ECM, beispielsweise durch osmotisches Quellen, führen könnte.

Wir kontaktierten Johanna Hafner aus der Arbeitsgruppe für Angewandte Mechanik des Karlsruher Instituts für Technologie, die sich mit der Methode des Multiple Particle Trackings (MPT) beschäftigt. Diese Methode basiert auf mikroskopischen Highspeed-Kamera-Aufnahmen von fluoreszenzmarkierten Partikeln, welche aufgrund ihrer Größe der brownischen Molekularbewegung unterliegen. Aus den Aufnahmen werden Trajektorien einzelner Partikel berechnet, von denen auf die mechanischen Eigenschaften der Partikelumgebung geschlossen werden kann. Erste Erprobungen der Methode bewiesen die Anwendbarkeit zur Messung der mechanischen Eigenschaften der direkten Zellumgebung. Dabei sahen wir eine deutliche Veränderung der ECM-Elastizität durch Kultur in Medium mit 100 mM Glukose (Hafner et al. 2020). Bei gemeinsamer Betrachtung aller Ergebnisse ist eine ursächliche zellphysiologische Reaktion unwahrscheinlich. Daher vermuten wir entweder eine osmotische Dehydrierung oder eine Glukose-vermittelte chemische Modifikation der ECM. Dies ist vor allem im Kontext diabetischer Zellkulturmodelle ein interessanter Ansatzpunkt weiterer Forschung.

### **4.3 Vergleichende Analyse von ASC und Perizyten**

Ausgangspunkt dieser Arbeit war die von Herr Kremer beschriebene Insensitivität der ASC gegenüber hyperglykämisch modifizierter ECM. Während Agnese Fiori eine generelle Unempfindlichkeit von ASC gegenüber der Kultur in hoher Glukose feststellen konnte (Fiori et al. 2020), bestätigten meine Untersuchungen ihre Unempfindlichkeit gegenüber Glukose-modifizierter HRMVEC-ECM. Einen negativen Effekt dieser ECM auf retinale Perizyten konnten wir ebenfalls, wie von Herrn Kremer (Kremer 2017) und Beltramo et al. 2009 beschrieben, bestätigen. Um dieses Verhalten von ASC und Perizyten genauer zu untersuchen, haben wir uns den Gemeinsamkeiten und Unterschieden der beiden Zelltypen zugewendet. Angefangen bei der basalen Charakterisierung beider Zelltypen, ist nach wie vor unklar in welcher „Verwandtschaft“ Perizyten zu MSC stehen (Crisan et al. 2008; De Souza et al. 2016). Daher soll zunächst die Definition beider Zelltypen erläutert werden.

Während MSC mit dem Ziel der Verwendung in regenerativen Therapieansätze ausführlich in-vitro untersucht wurden, blieb ihre eigentlich Identität in-vivo bisher unklar (Lv et al. 2014). Auch die aktuelle ISCT-Definition der MSC (Dominici et al. 2006) charakterisiert die Zellen ex-vivo. Dabei wurde bereits gezeigt, dass die Zellen durch die Kulturbedingungen in ihrer Expression von charakteristischen Oberflächenmarkern stark beeinflusst werden können. Dies führte zu der provokativen Behauptung, dass MSC ein bloßes Artefakt der Zellkultur ohne exaktes Äquivalent in-vivo seien (Murray et al. 2014). Um dem entgegenzukommen, differenzieren manche Autoren zwischen dem Begriff mesenchymale stromale Zellen für kultivierte Zellpopulationen und nativen mesenchymalen Stammzellen als deren Korrelat in-vivo (da Silva Meirelles et al. 2016).

Die Betrachtung der Perizyten begann hingegen aus der entgegengesetzten Richtung. Nach der Erstbeschreibung im Jahre 1873 durch Rouget, wurden die Zellen einige Zeit später nach ihrer anatomischen Position, abluminal die Endothelzellen umschließend und luminal von parenchymalen Zellen umgeben, als Perizyten benannt. Somit ist die definitive Identifikation der Zellen nur histologisch mittels Elektronenmikroskopie oder Semidünnschnitten, dafür allerdings eindeutig, möglich (Dore-Duffy et al. 2011). Die Perizyten lassen sich so zwar immunhistochemisch problemlos auf spezifische Zellmarker untersuchen, allerdings entstehen dadurch auch zwei grundlegende Probleme. Zum einen können die histologisch identifizierten Marker nicht ohne weiteres für Perizyten in Zellkultur verwendet werden, da sich deren Expression, wie auch bei MSC, durch die Kultivierung verändern kann (da Silva Meirelles et al. 2016). Zum anderen gibt es Unterschiede in Markerexpression in Abhängigkeit der anatomischen Lage der Perizyten. So werden beispielsweise die meisten Perizyten in kapillärer Lokalisation als alpha smooth muscle actin (aSMA) negativ beschrieben, während Perizyten im Gehirn in der Nähe von Arteriolen als aSMA positiv gelten. Im Gegensatz dazu kann aSMA bei Perizyten in Zellkultur als Zeichen der Dedifferenzierung gewertet werden (Dore-Duffy et al. 2011).

Es tauchen somit bei einem Vergleich von MSC und Perizyten bereits durch die formale Definition der beiden Zelltypen erste Probleme auf. Betrachtet man beide Zelltypen im engsten Rahmen der Definition, so sind vergleichende funktionelle Untersuchungen mit beiden Zelltypen prinzipiell nur sehr eingeschränkt möglich. Fasst man die Definitionen hingegen lockerer, so verschwimmen die Grenzen zwischen MSC und Perizyten zunehmend. Trotz dessen haben wir einen direkten Vergleich

beider Zelltypen gewagt. Dazu mussten wir allerdings zugrunde legen, dass es sich bei den verwendeten HRMVPC und CSPC tatsächlich um Perizyten handelt, obwohl wir sie anhand von Oberflächenmarkern nicht eindeutig von unseren ASC differenzieren konnten. Zudem erfolgt der Vergleich auf in-vitro Ebene. Die schwierige Frage der Abstammung beider Zelltypen, bzw. inwiefern es sich um in-vivo/in-vitro Korrelate handelt und ob Perizyten in Zellkultur noch Perizyten sind, bleibt also offen. Stattdessen fokussierten wir uns auf den Vergleich beider Zelltypen, um das Potential der ASC für neue zellbasierte Therapiekonzepte der DR zu evaluieren.

Während bei ASC dank ihrer guten Verfügbarkeit und hohem Proliferationspotential keine Probleme bestehen, ausführliche und auch zellintensive Untersuchungen mit vielen biologischen Replikaten durchzuführen, waren im Rahmen dieser Arbeit die Perizyten der limitierende Faktor. Unser Versuch des eins zu eins Vergleichs beider Zelltypen wurde durch die sehr schwache Proliferation unserer Perizyten erschwert. Zudem neigten die Perizyten beim Passagieren sehr stark zu Aggregation. Diese Kombination bereitete große Probleme bei Zellkultur, Zellzahlbestimmung und Durchflusszytometrie. Außerdem waren bei den Herstellern lediglich HRMVPC von drei biologisch unabhängigen Spendern und CPSC von zwei biologisch unabhängigen Spendern verfügbar. Daher konnte die Genexpressionsanalyse nur mit  $N = 3$  biologischen Replikaten durchgeführt werden. Die Einbeziehung der CSPC in die Genexpressionsanalyse war mit  $N = 2$  biologischen Replikaten nicht möglich.

Mein Vorgänger Heiner Kremer hat sich bereits bemüht, Perizyten aus anderen humanen Geweben (z.B. Plazenta) zu isolieren. Auch ich konnte auf Basis von Publikationen anderer Arbeitsgruppen (Primo et al. 2016; Sánchez-Palencia et al. 2016; Banumathi et al. 2009) bovine retinale Perizyten aus Rinderaugen isolieren. Diese xenogenen Kulturen erlauben allerdings wegen fehlender Verfügbarkeit entsprechender artspezifischer Antikörper keinen direkten Vergleich mit humanen ASC mittels Durchflusszytometrie. Daher haben wir von deren weiterer Verwendung abgesehen und uns auf humane retinale Perizyten fokussiert.

### 4.3.1 Perizyten- und MSC-Marker

Um trotz der stark begrenzten Verfügbarkeit humaner retinaler Perizyten eine aufschlussreiche Betrachtung spezifischer Oberflächenmarker durchführen zu können, haben wir zunächst in der Literatur diskutierte Perizytenmarker (da Silva Meirel-

les et al. 2016; Crisan et al. 2008; Fiori et al. 2018) auf Genexpressionsebene untersucht. Im MicroArray war nur ANGPT1, im PCR-Array zusätzlich noch ANPEP (CD13), ICAM1 und RGS5 in den Perizyten signifikant höher exprimiert. Die gängigsten Perizytenmarker haben wir zusätzlich noch durchflusszytometrisch analysiert. Dabei stellten sich die HRMVPC als negativ für NG2, CD106, CD140a, CD140b, CD146 und CD248 dar. Als einziger postulierter Perizytenmarker war bei unseren HRMVPC CD13 positiv. Allerdings waren ebenfalls unsere ASC CD13 positiv. Zusätzlich zeigten sie im Gegensatz zu den HRMVPC noch eine leichte Expression von CD140b, CD146 und CD248. Die Expression dieser Oberflächenmarker auf ASC bzw MSC wurde bereits beschrieben (Camilleri 2016, Van Pham 2016). Wir konnten somit durchflusszytometrisch keine signifikanten Unterschiede zwischen ASC und HRMVPC feststellen. Der Perizytenmarker RGS5, für den kein Durchflusszytometrie-geeigneter Antikörper verfügbar war, wurde auf immunhistochemischer Ebene weder von unseren ASC, noch von den HRMVPC exprimiert (Kremer, Gebauer et al. 2020).

### 4.3.2 Funktioneller Vergleich von ASC und Perizyten

Während bei der durchflusszytometrischen Charakterisierung keine klare Differenzierung zwischen ASC und HRMVPC möglich war, fielen die Unterschiede in der Zellkultur umso gravierender aus. Die ASC verfügten über ein gutes Proliferationspotential. Die HRMVPC schienen hingegen kaum zu proliferieren. Im Einklang zu dieser Beobachtung zeigte sich im MicroArray bei den ASC im Vergleich zu den HRMVPC eine signifikante Anreicherung von KEGG-pathways der Gruppe genetic information processing. Eine Untergruppe davon fasst Gene zusammen, welche für die DNA-Replikation und die DNA-Reparatur-Mechanismen zuständig sind. Es deutet also bereits die MicroArray-Analyse auf ein höheres Proliferationspotential der ASC hin. Dies ist jedoch eine sehr überraschende Beobachtung, wenn man in Betracht zieht, dass in der Literatur Perizyten als in-vivo Korrelat und somit Ursprung der MSC diskutiert werden (da Silva Meirelles et al. 2016). Eine Ursache könnte die Zeitspanne der Zellen in Kultur sein. Aufgrund der unterschiedlichen Passagen unserer Zellen könnte man argumentieren, ASC in Passage 2 sind noch wenig kulturadaptierte Zellen und weit vom sog. Hayflick-Limit entfernt, während die HRMVPC mit Passage 6 deutlich länger in Kultur gehalten wurden. Dies trifft jedoch nicht zu. ASC werden pro Passage mit nur 300 Zellen/cm<sup>2</sup> ausgesät. Sie unterlaufen so

circa 5 kumulative Populationsverdopplungen. Über die gesamte Kulturzeit von 5-6 Passagen ergeben sich insgesamt 30-40 kumulative Populationsverdopplungen (Bieback et al. 2012). Die HRMVPC wurden vom Hersteller in Passage 3 geliefert und konnten im Idealfall bis zu Passage 6 kultiviert werden, bevor sich keine Zunahme der Zellzahl mehr zeigte. Da diese Zellen jedoch jeweils nur im Verhältnis 1:1 gesplittet wurden, haben sie eine deutlich geringere Anzahl an kumulativen Populationsverdopplungen erfahren. Zudem zeigten sich bereits direkt nach dem Auftauen der kryokonservierten HRMVPC morphologische Zeichen der zellulären Seneszenz. Wir beobachteten morphologisch relativ große Zellen mit großen Zellkernen und zahlreichen Einschlusskörperchen, was als Zeichen der zellulären Seneszenz gewertet werden kann (Cristofalo et al. 2004). Die MicroArray-Daten zeigten unter Betrachtung von Biomarkern für zelluläre Seneszenz, wie IGF1, EGF (Cristofalo et al. 2004), p53, CDKN2A, NXT1, IL6 oder IL8 (Jesus et al. 2012) hingegen keine signifikant höhere Expression dieser Marker in HRMVPC. Eine genauere Untersuchung auf zelluläre Seneszenz, beispielsweise mittels senescence-associated-beta-galactosidase Assay oder Annexin V-Färbung, war leider aufgrund der geringen Verfügbarkeit von HRMVPC nicht durchführbar.

Im Kontext der differentiellen Sensitivität beider Zelltypen gegenüber der Glukose-modifizierten ECM untersuchten wir unsere Array-Daten auf mögliche adhäsionsrelevante Targets. Dabei fielen uns signifikant differenzielle Expressionen verschiedener Integrinuntereinheiten auf. Sowohl im MicroArray, als auch im PCR-Array waren ITGA5 und ITGB3 höher in ASC exprimiert, während ITGA1, ITGA2, ITGA4 und ITGA6 höher in HRMVPC exprimiert waren. Im Rahmen eines eigenständig eingeworbenen Drittmittelprojektes konnten wir, dank Förderung der Deutschen Diabetes Gesellschaft, die Expression verschiedener Integrine auch durchflusszytometrisch untersuchen. Dabei bestätigten sich die Ergebnisse unserer Array-Analyse überraschender Weise nicht. So zeigte sich keine signifikant differenzielle Oberflächenexpression der Marker CD49a (ITGA1), CD49b (ITGA2), CD49d (ITGA4), CD49e (ITGA5) und CD49f (ITGA6). Man könnte nun schlussfolgern, dass die Integrine wegen der ähnlichen Expression in ASC und Perizyten nicht mit dem Verhalten der Zellen auf der HG-modifizierten ECM zusammenhängen. Die Situation ist jedoch komplexer. Die Integrinrezeptoren, welche sich jeweils aus einer alpha- und einer beta-Untereinheit zusammensetzen, gehören nicht nur zu den Hauptrezeptoren für Zelladhäsion und Zell-Zell-Kontakte, sondern bilden auch Transmembranverbindungen und greifen in eine Vielzahl von intrazellulären Signalwegen ein

(Green et al. 2019). Die Untersuchung der Expression von Integrinen wird dadurch erschwert, dass sie zwar häufig auf der Zelloberfläche exprimiert sind, sich jedoch in einem inaktivem Zustand befinden können und erst durch einen bestimmten Stimulus aktiviert werden müssen (Hynes et al. 2002). Die ähnliche Oberflächenexpression von Integrinen auf ASC und HRMVPC spricht folglich nicht gegen eine Mitbeteiligung an dem unterschiedlichen Verhalten der Zellen auf Glukose-modifizierter ECM. Daher wären zur weiteren funktionellen Untersuchung Adhäsionsexperimente beider Zelltypen auf unterschiedlichen Matrices von hohem Interesse. Leider waren uns solche Untersuchungen aufgrund der bereits zuvor geschilderten Einschränkungen durch die HRMVPC nicht möglich.

Zu guter Letzt ist ein weiterer wichtiger Prozess, nicht nur im Kontext unserer ECM-Untersuchungen, sondern auch für das regenerative Potential der ASC, das sogenannte ECM-Remodelling (Roy et al. 2016). Hierbei spielen Matrixmetalloproteasen und deren Regulation über spezifische Inhibitorproteine eine wichtige Rolle (Kowluru et al. 2012). Beim Vergleich unserer MicroArray-Daten von ASC und HRMVPC stach in den HRMVPC eine höhere Expression von MMP1, MMP15, TIMP2 und TIMP3 besonders heraus. Davon waren MMP1 und TIMP3 ebenfalls im PCR-Array signifikant stärker von den HRMVPC exprimiert. Während in der Literatur vor allem MMP2 und MMP9 im Zusammenhang mit der DR diskutiert werden (Tarallo et al. 2010; Underly et al. 2017; R. Yang et al. 2007; Noda et al. 2003) findet man kaum Hinweise auf eine Mitbeteiligung von MMP1 (Abu El-Asrar et al. 2016; Abu El-Asrar et al. 2017), MMP14 (MT1-MMP) (R. Yang et al. 2007) oder MMP15 (keine einschlägigen Publikationen).

Trotz der höheren Expression unserer HRMVPC von angiogenese-relevanten MMP, konnte unsere Arbeitsgruppe das fehlende angiogene Potential der HRMVPC als einzigen und fundamentalen Unterschied zu unseren ASC ausmachen. Während die ASC in zwei unterschiedlichen Angiogenese-Assays die Ausbildung von Endothelzell-Netzwerken förderten, führten die HRMVPC zu keiner Ausbildung Gefäß-ähnlicher Strukturen. Bei den verwendeten Assays setzte eines den Fokus auf die Zell-Zell-Kontakte in direkter Kokultur mit Endothelzellen. Das zweite davon unabhängige Assay untersuchte den Einfluss von parakrinen Faktoren durch die Verwendung von Basal-lamina-Matrix. In gemeinsamer Betrachtung mit einer ELISA-Analyse von Wachstumsfaktoren und Inhibitoren im konditionierten Medium



der beiden Zelltypen konnten wir ASC von HRMVPC anhand ihre pro-angiogenen Kapazität klar diskriminieren (Kremer, Gebauer et al. 2020).

## 4.4 ASC und zellbasierte Therapieansätze der diabetischen Retinopathie

Zur Therapie der DR wurden MSC bereits in Tiermodellen bereits erfolgreich erporbt (Fiori et al. 2018, Ding et al. 2017; Davey et al. 2014; ). Es gab jedoch auch erste Berichte über negative Folgen von MSC-Applikationen. So kam es in einer Studie zur altersbedingten Makuladegeneration bei 3 Patienten nach einer ASC-Injektion zur Erblindung (Kuriyan et al. 2017). Präklinische Studien zeigten allerdings, dass MSC sich an das lokale Milieu anpassen und in Abhängigkeit davon sowohl pro-angiogen, als auch anti-angiogen wirken können (Ezquer et al. 2016). Eine weitere Studie beschrieb in einem murinen Modell der Sauerstoff-induzierten Retinopathie, dass eine ASC-Applikation vor der retinalen Gefäßschädigung die Kapillarschädigung vermindern kann, während eine intravitrale ASC-Injektion nach der Kapillarschädigung eine Migration und Integration der ASC in die retinale Vaskulatur mit einhergehendem Nachwachsen der retinalen Kapillaren zeigte (Mendel et al. 2013). Man kann also davon ausgehen, dass ASC sehr sensitiv mit ihrer Umgebung interagieren und dadurch trotz erster negativer Resultate ein hohes Potential für die Anwendung in zellbasierten Therapieansätzen besitzen.

Unsere und weitere im Kontext der internationalen Forschergruppe DIAMICOM gewonnenen Erkenntnisse deuten darauf hin, dass die therapeutische Wirkung vom Tier- beziehungsweise Erkrankungsmodell abhängig ist. Die Arbeitsgruppe von Prof. Harmsen in Groningen beschreibt im sogenannten ROP-Modell einen positiven Einfluss der ASC auf die Vaskularisierung (Hajmoussa et al. 2018). Im Gegensatz dazu deuten die Daten der AG Feng aus Mannheim darauf hin, dass ASC in einem Tiermodell der genetisch induzierten DR nachteilige Effekte erzielen könnten (Huang et al. 2019).

Wir postulieren, dass ASC im Rahmen der DR zugrunde gegangene Perizyten funktionell ersetzen können und dabei, im Gegensatz zu den Perizyten, nicht unter dem Milieu der hohen Glukose leiden. Meine Kollegin Agnese Fiori konnte bereits zeigen, dass HG das angiogene Potential von HRMVEC deutlich reduziert. ASC

hingegen waren von der Glukose nicht beeinflusst und konnten über sezernierte Faktoren dieses reduzierte angiogene Potential wiederherstellen (Fiori et al. 2020).

## **4.5 Schlussfolgerung**

Trotz der frustran verlaufener Suche nach einer molekularen Erklärung für das beobachtete unterschiedliche Interaktionsmuster von Perizyten und ASC mit Glukose-modifizierter endothelialer Matrix, konnten im Rahmen dieser Arbeit wertvolle Erkenntnisse gewonnen werden. So bietet die Methode des Multiple Particle Trackings einen hervorragenden Ausgangspunkt für detaillierte Analysen der ECM. Differenziertere MPT-Untersuchungen könnten dabei nicht nur zu einem besseren Verständnis der Zellphysiologie unter in-vitro-Bedingungen, sondern auch zu einem neuen Aspekt in der Beurteilung verschiedener Zellkulturmodelle beitragen.

Im Hinblick auf die Entwicklung ASC-basierter Therapieansätze der DR ist vor allem das von uns beobachtete angiogene Potential der ASC von Interesse, welches die ASC deutlich von den retinalen Perizyten diskriminieren konnte. Dies ist unserer Meinung nach ein zweischneidiges Schwert. Während die Förderung der Vaskularisation im frühen Stadium der DR nützlich wäre, kann sie im Stadium der proliferativen DR kontraproduktiv sein. Ein Ansatz diese Fragestellung weiter zu erforschen, wäre die Etablierung von komplexen Zellkulturmodellen, welche eine Untersuchung der Interaktionen von ASC und Endothelzellen, aber auch Zellen der neurovaskulären Unit sowie infiltrierenden Immunzellen ermöglicht. Ebenso erscheint es nötig, die Wirkung der ASC in geeigneten Tiermodellen genauer zu studieren, um eine Nutzen-Risiko-Abschätzung im Kontext der unterschiedlichen Erkrankungsstadien vornehmen zu können.

## 5 Zusammenfassung

Im Verlauf der diabetischen Retinopathie (DR) gilt der Verlust von retinalen Perizyten als erstes Anzeichen dieser diabetischen Komplikation. Es besteht ein großer Bedarf an neuartigen Therapiemöglichkeiten. In diesem Rahmen werden derzeit in einer Vielzahl von Studien mesenchymal stromale Zellen (MSC) zur Therapie der DR erprobt. Auf Grund der morphologischen und funktionellen Gemeinsamkeit von MSC und Perizyten sowie ihrer Differenzierungskapazität und ihrem immunmodulatorischen Potential untersucht unsere Arbeitsgruppe die zelltherapeutische Verwendung von MSC zur Wiederherstellung der retinalen Integrität im Rahmen des Perizytenverlustes der DR. Vorarbeiten zeigten, dass die Proliferation von humanen retinalen Perizyten durch Glukose-modifizierte extrazelluläre Endothelzellmatrix (ECM) deutlich eingeschränkt wird, was bei Fettgewebe-abgeleiteten mesenchymal stromalen Zellen (ASC) nicht der Fall war. Ich konnte dieses Verhalten unter Verwendung von humanen retinalen Endothelzellen reproduzieren.

Auf der Suche nach der molekularen Ursache dieser Beobachtung führten wir ein ausführliches Screening nach potentiellen Mechanismen der hyperglykämischen ECM-Modifikation durch. Wir konnten jedoch weder Glykosaminoglykane, noch Matrix-Metallo-Proteinasen, noch Advanced Glycation Endproduct, noch Carbonylierung als ursächlich hierfür identifizieren. Mittels Multiple Particle Tracking konnten wir jedoch erstmals die mechanischen Eigenschaften von ECM in direkter Zellumgebung messen und dabei Anzeichen für eine Glukose-vermittelte Änderung der ECM-Elastizität feststellen.

Wir schlossen daraus, dass möglicher Weise Unterschiede zwischen ASC und Perizyten für die unterschiedliche Interaktion mit HG-modifizierter ECM verantwortlich sind. Daher führten wir eine vergleichende Genexpressionanalyse beider Zelltypen durch. Dabei zeigten sich im Vergleich ASC versus Perizyten deutliche Unterschiede in der Expression von Integrinen sowie von Genen, welche mit funktionellen Eigenschaften von Perizyten korreliert wurden. Auf Ebene der Oberflächenantigene

---

zeigten sich hingegen keine Unterschiede in der Expression von Integrinen oder potentiellen Perizytenmarkern. Ergänzend konnten unsere Genexpressions-Daten keine nennenswerte zellphysiologische Reaktion von HUVEC, ASC oder HRMVPC auf Stimulation mit HG-Zellkulturmedium zeigen. Zusätzlich führte Agnese Fiori funktionelle Untersuchungen zur angiogenen Kapazität beider Zelltypen durch. Zusammenfassend konnte lediglich das angiogene Potential ASC klar von Perizyten diskriminieren.

Während die Verwendung von humanen Primärzellkulturen durch ihre große Relevanz für Fragestellung eine deutliche Stärke dieser Arbeit darstellt, bildet sie durch die geringe Verfügbarkeit an biologischen Replikaten der retinalen Primärzellen zugleich ihre größte Schwäche. Dennoch konnten wir eine gute Basis erarbeiten, um die knapp zur Verfügung stehenden retinalen Primärzellen in folgenden Projekten zielgerichtet und effizient weiter zu erforschen.

Im Rahmen des DIAMICOM-Verbundes verfolgen auch weitere Arbeitsgruppen die Hypothese, dass ASC die Rolle von Perizyten übernehmen können und sich somit für eine Zelltherapie der DR eignen. Betrachtet man zusätzlich die Daten meiner Kollegen Agnese Fiori, Heiner Kremer, Vincenzo Terlizzi und Hongpeng Huang, so müssen wir schlussfolgern, dass ASC sich hauptsächlich durch die Unterstützung der Angiogenese auszeichnen. Somit wäre ein zelltherapeutischer Ansatz der DR eher in einem sehr frühen Zeitpunkt anzusetzen, wohingegen eine ASC-Behandlung im Stadium der proliferativen DR kontraproduktiv erscheint. Wir erachtet es daher als notwendig, weitere detaillierte Analysen in geeigneten in-vitro und in-vivo Modellen durchzuführen, um eine sichere und erfolgreiche Therapie zu erzielen.

## 6 Tabellenverzeichnis

2.1	Verwendete Zellen und Kulturbedingungen . . . . .	14
2.2	Zellkulturmedien und Zusammensetzung . . . . .	15
2.3	Chemikalien . . . . .	15
2.4	Hergestellte Puffer . . . . .	16
2.5	Antikörperpanel Durchflusszytometrie . . . . .	17
2.6	Sonstige Antikörper . . . . .	18
2.7	Kits . . . . .	18
2.8	Geräte . . . . .	18
2.9	Gene des Custom PCR-Arrays . . . . .	19

---

## 7 Abbildungsverzeichnis

3.1	Zellfläche und Zellzahl von ASC, CSPC und HRMVPC während der Adhäsion auf HRMVEC ECM . . . . .	32
3.2	Proliferation von ASC, CSPC und HRMVPC auf HRMVEC ECM . . . . .	33
3.3	Einfluss verschiedener Kulturbedingungen auf die Konzentration von Glykosaminoglykanen in der extrazellulären Matrix . . . . .	34
3.4	Exemplarische Darstellung eines nativen Gelatine-Zymogrammes und dessen digitale Aufarbeitung . . . . .	36
3.5	Auswertung der densitometrischen Analyse der Gelatine-Zymographie . . . . .	36
3.6	AGE . . . . .	37
3.7	Carbonylierung von Endothelzellen nach Kultur in Medium mit normaler oder hoher Glukose . . . . .	38
3.8	Multiple Particle Tracking (MPT)-Untersuchung der HUvEC-ECM . . . . .	40
3.9	Volcano plot des RT-qPCR Arrays von HUVEC . . . . .	41
3.10	Morphologie von ASC, CSPC und HRMVPC . . . . .	43
3.11	Volcano plots vom Microarray . . . . .	47
3.12	Volcano plots der RT-qPCR-Daten . . . . .	49
3.13	Expression ausgewählter Oberflächen-Antigene von ASC und Perizyten . . . . .	51

## 8 Quellenverzeichnis

### 8.1 Eigene Publikationen

Fiori, A., Terlizzi, V., Kremer, H., Gebauer, J., Hammes, H.P., Harmsen, M.C. und Bieback, K. (2018). Mesenchymal stromal/stem cells as potential therapy in diabetic retinopathy. *Immunobiology* 223.12, 729–743. doi: 10.1016/j.imbio.2018.01.001.

Hafner, J., Grijalva, D., Ludwig-Husemann, A., Bertels, S., Bensinger, L., Raic, A., Gebauer, J., Oelschlaeger, C., Bastmeyer, M., Bieback, K., Lee-Thedieck, C. und Willenbacher, N. (2020). Monitoring matrix remodeling in the cellular microenvironment using microrheology for complex cellular systems. *Acta Biomater.* 111, 254–266. doi: 10.1016/j.actbio.2020.04.053.

Kremer, H., Gebauer, J., Elvers-Hornung, S., Uhlig, S., Hammes, H.P., Beltramo, E., Steeb, L., Harmsen, M.C., Sticht, C., Klueter, H., Bieback, K. und Fiori, A. (2020). Pro-angiogenic Activity Discriminates Human Adipose-Derived Stromal Cells From Retinal Pericytes: Considerations for Cell-Based Therapy of Diabetic Retinopathy. doi: 10.3389/fcell.2020.00387.

## 8.2 Literaturverzeichnis

- Abu El-Asrar, A., Ahmad, A., Alam, K., Siddiquei, M., Mohammad, G., Hertogh, G., Mousa, A. und Opdenakker, G. (2017). Extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) is a potential biomarker of angiogenesis in proliferative diabetic retinopathy. *Acta Ophthalmol.* 95.7, 697–704. doi: 10.1111/aos.13284.
- Abu El-Asrar, A., Alam, K., Nawaz, M., Mohammad, G., Van den Eynde, K., Siddiquei, M.M., Mousa, A., De Hertogh, G. und Opdenakker, G. (2016). Upregulation of Thrombin/Matrix Metalloproteinase-1/Protease-Activated Receptor-1 Chain in Proliferative Diabetic Retinopathy. *Curr. Eye Res.* 41.12, 1590–1600. doi: 10.3109/02713683.2016.1141964.
- Banumathi, E., Haribalaganesh, R., Sheik Pran Babu, S., Sirish Kumar, N. und Sangiliyandi, G. (2009). High-yielding enzymatic method for isolation and culture of microvascular endothelial cells from bovine retinal blood vessels. *Microvasc. Res.* 77.3, 377–81. doi: 10.1016/j.mvr.2008.12.005.
- Beltramo, E., Nizheradze, K., Berrone, E., Tarallo, S. und Porta, M. (2009). Thiamine and benfotiamine prevent apoptosis induced by high glucose-conditioned extracellular matrix in human retinal pericytes. *Diabetes Metab Res Rev* 25.7, 647–656. doi: 10.1002/dmrr.1008.
- Beltramo, E., Lopatina, T., Berrone, E., Mazzeo, A., Iavello, A., Camussi, G. und Porta, M. (2014). Extracellular vesicles derived from mesenchymal stem cells induce features of diabetic retinopathy in vitro. *Acta Diabetol.* 51.6, 1055–1064. doi: 10.1007/s00592-014-0672-1.
- Beltramo, E. und Porta, M. (2013). Pericyte Loss in Diabetic Retinopathy: Mechanisms and Consequences. *Curr. Med. Chem.* 20.26, 3218–3225. doi: 10.2174/092986731132-09990022.
- Bieback, K., Hecker, A., Schlechter, T., Hofmann, I., Brousos, N., Redmer, T., Besser, D., Klter, H., Mller, A. und Becker, M. (2012). Replicative aging and differentiation potential of human adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells expanded in pooled human or fetal bovine serum. *Cytotherapy* 14.5, 570–583. doi: 10.3109/14653249.2011.652809.



- Bollineni, R., Fedorova, M., Blüher, M. und Hoffmann, R. (2014). Carbonylated plasma proteins as potential biomarkers of obesity induced type 2 diabetes mellitus. *J. Proteome Res.* 13.11, 5081–5093. doi: 10.1021/pr500324y.
- Brownlee, M. (2001). Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 414.6865, 813–820. doi: 10.1038/414813a.
- (2005). The pathobiology of diabetic complications: A unifying mechanism. *Diabetes* 54.6, 1615–25. doi: 10.2337/diabetes.54.6.1615.
- Cho, N.H., Shaw, J.E., Karuranga, S., Huang, Y., da Rocha Fernandes, J.D., Ohlrogge, A.W. und Malanda, B. (2018). IDF Diabetes Atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 138, 271–281. doi: 10.1016/j.diabres.2018.02.023.
- Colagiuri, S., Lee, C.M., Wong, T.Y., Balkau, B., Shaw, J.E. und Borch-Johnsen, K. (2011). Glycemic thresholds for diabetes-specific retinopathy: Implications for diagnostic criteria for diabetes. *Diabetes Care* 34.1, 145–150. doi: 10.2337/dc10-1206.
- Crisan, M., Yap, S., Casteilla, L., Chen, C.W., Corselli, M., Park, T.S., Andriolo, G., Sun, B., Zheng, B., Zhang, L., Norotte, C., Teng, P.N., Traas, J., Schugar, R., Deasy, B.M., Badylak, S., Buhring, H.J., Giacobino, J.P., Lazzari, L., Huard, J., Péault, B. und Peault, B. (2008). A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell* 3.3, 301–313. doi: 10.1016/j.stem.2008.07.003.
- Cristofalo, V.J., Lorenzini, A., Allen, R.G., Torres, C. und Tresini, M. (2004). Replicative senescence: A critical review. *Mech. Ageing Dev.* 125.10-11, 827–848. doi: 10.1016/j.mad.2004.07.010.
- da Silva Meirelles, L., de Deus Wagatsuma, V.M., Malta, T.M., Bonini Palma, P.V., Araújo, A.G., Panepucci, R.A., Silva, W.A., Kashima, S. und Covas, D.T. (2016). The gene expression profile of non-cultured, highly purified human adipose tissue pericytes: Transcriptomic evidence that pericytes are stem cells in human adipose tissue. *Exp. Cell Res.* 349.2, 239–254. doi: 10.1016/j.yexcr.2016.10.017.
- Dai, M., Wang, P., Boyd, A.D., Kostov, G., Athey, B., Jones, E.G., Bunney, W.E., Myers, R.M., Speed, T.P., Akil, H., Watson, S.J. und Meng, F. (2005). Evolving

- gene/transcript definitions significantly alter the interpretation of GeneChip data. *Nucleic Acids Res.* 33.20, 1–9. doi: 10.1093/nar/gni179.
- Davey, G.C., Patil, S.B., O’Loughlin, A. und O’Brien, T. (2014). Mesenchymal stem cell-based treatment for microvascular and secondary complications of diabetes mellitus. doi: 10.3389/fendo.2014.00086.
- De Souza, L.E.B., Malta, T.M., Kashima Haddad, S. und Covas, D.T. (2016). Mesenchymal Stem Cells and Pericytes: To What Extent Are They Related? *Stem Cells Dev.* 25.24, 1843–1852. doi: 10.1089/scd.2016.0109.
- Ding, S.L.S., Kumar, S. und Mok, P.L. (2017). Cellular reparative mechanisms of mesenchymal stem cells for retinal diseases. doi: 10.3390/ijms18081406.
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D. und Horwitz, E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8.4, 315–7. doi: 10.1080/14653240600855905.
- Dore-Duffy, P. und Cleary, K. (2011). Morphology and properties of pericytes. *Methods Mol. Biol.* 686, 49–68. doi: 10.1007/978-1-60761-938-3\_2.
- Ezquer, M., Urzua, C.A., Montecino, S., Leal, K., Conget, P. und Ezquer, F. (2016). Intravitreal administration of multipotent mesenchymal stromal cells triggers a cytoprotective microenvironment in the retina of diabetic mice. doi: 10.1186/s13287-016-0299-y.
- Fiori, A., Hammes, H.P. und Bieback, K. (2020). Adipose-derived mesenchymal stromal cells reverse high glucose-induced reduction of angiogenesis in human retinal microvascular endothelial cells. *Cytotherapy* 22.5, 261–275. doi: 10.1016/j.jcyt.2020.02.005.
- Friedenstein, A.J., Chailakhjan, R.K. und Lalykina, K.S. (1970). The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone-marrow and spleen cells. *Cell Prolif.* 3.4, 393–403. doi: 10.1111/j.1365-2184.1970.tb00347.x.
- Friedlander, M., Theesfeld, C.L., Sugita, M., Fruttiger, M., Thomas, M.A., Chang, S. und Cheresch, D.A. (1996). Involvement of integrins  $\alpha v \beta 3$  and  $\alpha v \beta 5$  in ocu-

- lar neovascular diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93.18, 9764–9. doi: 10.1073/pnas.93.18.9764.
- Geistlinger, L., Csaba, G. und Zimmer, R. (2016). Bioconductor's EnrichmentBrowser: Seamless navigation through combined results of set- & network-based enrichment analysis. *BMC Bioinformatics* 17.1, 1–11. doi: 10.1186/s12859-016-0884-1.
- Gharagozlian, S., Henriksen, T. und Kolset, S.O. (2006a). High glucose and Nepsilon-(carboxymethyl) lysine bovine serum albumin modulate release of matrix metalloproteinases in cultured human endothelial cells. *Eur J Nutr* 45.5, 283–290. doi: 10.1007/s00394-006-0597-8.
- Gharagozlian, S., Borrebæk, J., Henriksen, T., Omsland, T.K., Shegarfi, H. und Kolset, S.O. (2006b). Effect of hyperglycemic condition on proteoglycan secretion in cultured human endothelial cells. *Eur. J. Nutr.* 45.7, 369–375. doi: 10.1007/s00394-006-0608-9.
- Grant, M.B., Caballero, S., Tarnuzzer, R.W., Bass, K.E., Ljubimov, A.V., Spoerri, P.E. und Galardy, R.E. (1998). Matrix metalloproteinase expression in human retinal microvascular cells. *Diabetes* 47.8, 1311–1317. doi: 10.2337/diab.47.8.1311.
- Green, H.J. und Brown, N.H. (2019). Integrin intracellular machinery in action. *Exp. Cell Res.* 37.2, 226–231. doi: 10.1016/j.yexcr.2019.03.011.
- Hajmoussa, G., Przybyt, E., Pfister, F., Paredes-Juarez, G.A., Moganti, K., Busch, S., Kuipers, J., Klaassen, I., Luyn, M.J. van, Krenning, G., Hammes, H.P. und Harmsen, M.C. (2018). Human adipose tissue-derived stromal cells act as functional pericytes in mice and suppress high-glucose-induced proinflammatory activation of bovine retinal endothelial cells. *Diabetologia* 61.11, 2371–2385. doi: 10.1007/s00125-018-4713-0.
- Hammes, H.P., Feng, Y., Pfister, F. und Brownlee, M. (2011). Diabetic retinopathy: Targeting vasoregression. *Diabetes* 60.1, 9–16. doi: 10.2337/db10-0454.
- Hammes, H.P., Lin, J., Renner, O., Shani, M., Lundqvist, A., Betsholtz, C., Brownlee, M. und Deutsch, U. (2002). Pericytes and the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Diabetes* 51.10, 3107–3112. doi: 10.2337/diabetes.51.10.3107.
- Han, J.H., Ha, S.W., Lee, I.K., Kim, B.W. und Kim, J.G. (2010). High glucose-induced apoptosis in bovine retinal pericytes is associated with transforming grow-

- th factor beta and betaIG-H3: betaIG-H3 induces apoptosis in retinal pericytes by releasing Arg-Gly-Asp peptides. *en. Clin. Experiment. Ophthalmol.* 38.6, 620–628.
- Han, J., Zhang, F., Xie, J., Linhardt, R.J. und Hiebert, L.M. (2009). Changes in cultured endothelial cell glycosaminoglycans under hyperglycemic conditions and the effect of insulin and heparin. *Cardiovasc. Diabetol.* 8.46. doi: 10.1186/1475-2840-8-46.
- Hellström, M., Gerhardt, H., Kalén, M., Li, X., Eriksson, U., Wolburg, H. und Betscholtz, C. (2001). Lack of pericytes leads to endothelial hyperplasia and abnormal vascular morphogenesis. *J. Cell Biol.* 152.3, 543–553. doi: 10.1083/jcb.153.3.543.
- Hoogduijn, M.J. und Lombardo, E. (2019). Concise Review: Mesenchymal Stromal Cells Anno 2019: Dawn of the Therapeutic Era? *Stem Cells Transl. Med.* 8.11, 1126–1134. doi: 10.1002/sctm.19-0073.
- Huang, H., Kolibabka, M., Eshwaran, R., Chatterjee, A., Schlotterer, A., Willer, H., Bieback, K., Hammes, H.P. und Feng, Y. (2019). Intravitreal injection of mesenchymal stem cells evokes retinal vascular damage in rats. *FASEB J.* 33.12, 14668–14679. doi: 10.1096/fj.201901500R.
- Hynes, R.O., Lively, J.C., McCarty, J.H., Taverna, D., Francis, S.E., Hodivala-Dilke, K. und Xiao, Q. (2002). The diverse roles of integrins and their ligands in angiogenesis. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 67, 143–53. doi: 10.1101/sqb.2002.67.143.
- Jesus, B.B.D. und Blasco, M.A. (2012). Assessing Cell and Organ Senescence Biomarkers. 111.1, 97–109. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.111.247866.Assessing.
- Jung, T., Engels, M., Kaiser, B., Poppek, D. und Grune, T. (2006). Intracellular distribution of oxidized proteins and proteasome in HT22 cells during oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* 40.8, 1303–12. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2005.11.023.
- Kowluru, R.A., Zhong, Q. und Santos, J.M. (2012). Matrix metalloproteinases in diabetic retinopathy: Potential role of MMP-9. *Expert Opin. Investig. Drugs* 21.6, 797–805. doi: 10.1517/13543784.2012.681043.

- Kremer, H. (2017). „Auswirkungen von hyperglykämisch modifizierter extrazellulärer Matrix von Endothelzellen auf die Charakteristika von Fett-Stroma Zellen“. Med. Dissertation. Universität Heidelberg. DOI: <https://doi.org/10.11588/heidok.00028138>.
- Kuriyan, A.E., Albini, T.A., Townsend, J.H., Rodriguez, M., Pandya, H.K., Leonard, R.E., Parrott, M.B., Rosenfeld, P.J., Flynn, H.W. und Goldberg, J.L. (2017). Vision Loss after Intravitreal Injection of Autologous “Stem Cells” for AMD. *N. Engl. J. Med.* 376.11, 1047–1053. doi: 10.1056/nejmoa1609583.
- Kurth, B.-M., Kamtsiuris, P., Lange, M., Hoffmann, R. und Kurth, B.-M. (2012). Erste Ergebnisse aus der SStudie zur Gesundheit Erwachsener in Deutschland (DEGS) Eckdaten von DEGS1: Worüber wissen wir jetzt mehr? *Bundesgesundheitsbl* 55, 980–990. doi: 10.1007/s00103-011-1504-5.
- Lv, F.J., Tuan, R.S., Cheung, K.M. und Leung, V.Y. (2014). Concise review: The surface markers and identity of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 32.6, 1408–19. doi: 10.1002/stem.1681.
- McGinn, S., Poronnik, P., Gallery, E.D. und Pollock, C.A. (2004). The effects of high glucose and atorvastatin on endothelial cell matrix production. *Diabet. Med.* 21.10, 1102–7. doi: 10.1111/j.1464-5491.2004.01293.x.
- Mendel, T.A., Clabough, E.B., Kao, D.S., Demidova-Rice, T.N., Durham, J.T., Zotter, B.C., Seaman, S.A., Cronk, S.M., Rakoczy, E.P., Katz, A.J., Herman, I.M., Peirce, S.M. und Yates, P.A. (2013). Pericytes derived from adipose-derived stem cells protect against retinal vasculopathy. *PLoS One* 8.5, e65691. doi: 10.1371/journal.pone.0065691.
- Murray, I.R., West, C.C., Hardy, W.R., James, A.W., Park, T.S., Nguyen, A., Tawonsawatruk, T., Lazzari, L., Soo, C. und Péault, B. (2014). Natural history of mesenchymal stem cells, from vessel walls to culture vessels. *Cell. Mol. Life Sci.* 71.8, 1353–1374. doi: 10.1007/s00018-013-1462-6.
- Noda, K., Ishida, S., Inoue, M., Obata, K.I., Oguchi, Y., Okada, Y. und Ikeda, E. (2003). Production and activation of matrix metalloproteinase-2 in proliferative diabetic retinopathy. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44.5, 2163–2170. doi: 10.1167/iovs.02-0662.

- Pozzi, A., Zent, R., Chetyrkin, S., Borza, C., Bulus, N., Chuang, P., Chen, D., Hudson, B. und Voziyan, P. (2009). Modification of collagen IV by glucose or methylglyoxal alters distinct mesangial cell functions. *J Am Soc Nephrol* 20.10, 2119–2125. doi: 10.1681/ASN.2008080900.
- Primo, V.A. und Arboleda-Velasquez, J.F. (2016). Isolation and transfection of primary culture bovine retinal pericytes. *Methods Mol. Biol.* 430, 107–17. doi: 10.1007/978-1-4939-3628-1\_7.
- Přiščáková, P., Minárik, G. und Repiská, V. (2016). Candidate gene studies of diabetic retinopathy in human. *Mol. Biol. Rep.* 43.12, 1327–1345. doi: 10.1007/s11033-016-4075-y.
- Raum, P., Lamparter, J., Ponto, K.A., Peto, T., Hoehn, R., Schulz, A., Schneider, A., Wild, P.S., Pfeiffer, N. und Mirshahi, A. (2015). Prevalence and cardiovascular associations of diabetic retinopathy and maculopathy: Results from the Gutenberg health study. *PLoS One* 10.6, 1–12. doi: 10.1371/journal.pone.0127188.
- Rouillard, A.D., Gundersen, G.W., Fernandez, N.F., Wang, Z., Monteiro, C.D., McDermott, M.G. und Ma'ayan, A. (2016). The harmonizome: a collection of processed datasets gathered to serve and mine knowledge about genes and proteins. doi: 10.1093/database/baw100.
- Roy, S., Bae, E., Amin, S. und Kim, D. (2015). Extracellular matrix, gap junctions, and retinal vascular homeostasis in diabetic retinopathy. *Exp Eye Res* 133, 58–68. doi: 10.1016/j.exer.2014.08.011.
- Roy, S., Trudeau, K., Roy, S., Behl, Y., Dhar, S. und Chronopoulos, A. (2010). New insights into hyperglycemia-induced molecular changes in microvascular cells. *J Dent Res* 89.2, 116–127. doi: 10.1177/0022034509355765.
- Roy, S., Amin, S. und Roy, S. (2016). Retinal fibrosis in diabetic retinopathy. *Exp. Eye Res.* 142, 71–75. doi: 10.1016/j.exer.2015.04.004.
- Sánchez-Palencia, D.M., Bigger-Allen, A., Saint-Geniez, M., Arboleda-Velásquez, J.F. und D'Amore, P.A. (2016). Coculture assays for endothelial cells-mural cells interactions. *Methods Mol. Biol.* 1464, 35–47. doi: 10.1007/978-1-4939-3999-2\_4.

- Sharma, R.R., Pollock, K., Hubel, A. und McKenna, D. (2014). Mesenchymal stem or stromal cells: A review of clinical applications and manufacturing practices. *Transfusion* 54.5, 1418–37. doi: 10.1111/trf.12421.
- Stitt, A.W., Curtis, T.M., Chen, M., Medina, R.J., McKay, G.J., Jenkins, A., Gardner, T.A., Lyons, T.J., Hammes, H.P., Simó, R. und Lois, N. (2016). The progress in understanding and treatment of diabetic retinopathy. *Prog. Retin. Eye Res.* 51, 156–186. doi: 10.1016/j.preteyeres.2015.08.001.
- Tarallo, S., Beltramo, E., Berrone, E., Dentelli, P. und Porta, M. (2010). Effects of high glucose and thiamine on the balance between matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in vascular cells. *Acta Diabetol.* 47.2, 105–111. doi: 10.1007/s00592-009-0124-5.
- Tolentino, M.S., Tolentino, A.J. und Tolentino, M.J. (2016). Current and investigational drugs for the treatment of diabetic retinopathy. *Expert Opin. Investig. Drugs* 25.9, 1011–22. doi: 10.1080/13543784.2016.1201062.
- Toth, M. und Fridman, R. (2001). Assessment of Gelatinases (MMP-2 and MMP-9) by Gelatin Zymography. *Metastasis Res. Protoc.* 57, 163–174. doi: 10.1385/1-59259-136-1:163.
- Underly, R.G., Levy, M., Hartmann, D.A., Grant, R.I., Watson, A.N. und Shih, A.Y. (2017). Pericytes as inducers of rapid, matrix metalloproteinase-9-dependent capillary damage during ischemia. *J. Neurosci.* 37.1, 129–140. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2891-16.2016.
- Whitehead, M., Wickremasinghe, S., Osborne, A., Van Wijngaarden, P. und Martin, K.R. (2018). Diabetic retinopathy: a complex pathophysiology requiring novel therapeutic strategies. *Expert Opin. Biol. Ther.* 18.12, 1257–1270. doi: 10.1080/14712598.2018.1545836.
- Yang, R., Liu, H., Williams, I. und Chaqour, B. (2007). Matrix metalloproteinase-2 expression and apoptogenic activity in retinal pericytes: Implications in diabetic retinopathy. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1103, 196–201. doi: 10.1196/annals.1394.000.
- Yang, Z., Li, K., Yan, X., Dong, F. und Zhao, C. (2010). Amelioration of diabetic retinopathy by engrafted human adipose-derived mesenchymal stem cells in streptozotocin diabetic rats. *Graefe's Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 248.10, 1415–1422. doi: 10.1007/s00417-010-1384-z.

## 8.3 R-Softwarepackete

Kassambara, A. (2020). *ggpubr: 'ggplot2' Based Publication Ready Plots*. R package version 0.4.0.

R Core Team (2020). *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria.

RStudio Team (2019). *RStudio: Integrated Development Environment for R*. RStudio, Inc. Boston, MA.

Schauberg, P. und Walker, A. (2020). *openxlsx: Read, Write and Edit xlsx Files*. R package version 4.2.3.

Slowikowski, K. (2020). *ggrepel: Automatically Position Non-Overlapping Text Labels with 'ggplot2'*. R package version 0.8.2.

Wickham, H. (2007). Reshaping Data with the reshape Package. *Journal of Statistical Software* 21.12, 1–20.

– (2016). *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag New York.

Wickham, H., François, R., Henry, L. und Müller, K. (2020). *dplyr: A Grammar of Data Manipulation*. R package version 1.0.2.



## 9 Lebenslauf

### PERSONALIEN

Name und Vorname: Julian Eduard Gebauer  
Geburtsdatum: 20.04.1994  
Geburtsort: Bad Oeynhausen

### SCHULISCHER WERDEGANG

2000 - 2004: Grundschule Bad Gandersheim  
2004 - 2012: Roswitha-Gymnasium Bad Gandersheim  
Abitur: 03.07.2012

### UNIVERSITÄRER WERDEGANG

WS2012/13 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der  
Universität Szeged, Ungarn  
12.06.2014 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
WS2015 Technische Universität Braunschweig  
Studienfach Chemie  
WS2015/16 Beginn Hauptstudium Humanmedizin an der  
Medizinischen Fakultät Mannheim der Universität Heidelberg  
WS2017/18 Freisemester für Promotion  
11.04.2019 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
2019 - 2020 Praktisches Jahr an der Universität Magdeburg  
28.05.2020 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

## 10 Danksagung

Mein Dank gilt zunächst Prof. Dr. rer. nat. Karen Bieback für die Überlassung des Themas dieser Arbeit und für die hervorragende Betreuung in allen Phasen der Promotion.

Ebenso danke ich Susanne Elvers-Hornung, Stefanie Uhlig, Agnese Fiori und Adriana Torres Crigna für die umfangreiche Einarbeitung in den Laboralltag. Die angenehme und abwechslungsreiche Zeit in der Arbeitsgruppe werde ich in positiver Erinnerung behalten.

Besonders stolz bin ich auf die hohe methodische Vielfalt dieser Arbeit, welche ohne die großartige Zusammenarbeit mit Arbeitsgruppen unterschiedlichster Fachrichtungen, die vielfältigen fachlichen Diskussionen sowie den methodischen Austausch nicht möglich gewesen wäre. Daher bedanke ich mich bei bei Johanna Hafner, Carsten Sticht, Torsten Gloe, Thomas Fleming und Christoph Hangel.

Zu guter Letzt bedanke ich mich für die finanzielle Unterstützung bei der Deutschen Diabetes Gesellschaft (Allgemeine Projektförderung), bei der International Graduate School GRK 1874 DIAMICOM (Promotionsstipendium) und bei der Deutschen Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunologie (Reisestipendium).