



Aus dem Institut für vegetative Physiologie

der Universität Würzburg

Vorstand: Professor Dr. med. Michaela Kuhn

**Die natriuretischen Peptide ANP, BNP und CNP stimulieren die Kommunikation  
zwischen Perizyten und Endothelzellen während der physiologischen  
Angiogenese.**

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der  
medizinischen Fakultät der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

**Franziska Koch**  
aus Kaufbeuren

Würzburg, Januar 2022

**Referentin:** Prof. Dr. med. Michaela Kuhn

**Koreferentin:** Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Barbara Braunger

**Dekan:** Prof. Dr. med. Matthias Frosch

**Tag der mündlichen Prüfung:** 25. Mai 2022

**Die Promovendin ist Ärztin**

# Inhaltsverzeichnis

---

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1	Bedeutung der Angiogenese in Physiologie und Pathologie .....	1
1.2	Die Rolle natriuretischer Peptide in der Angiogenese: Ein kurzer Ausblick ....	2
1.3	Die Rezeptoren und Signalwege der natriuretischen Peptide .....	3
1.3.1	ANP und BNP .....	3
1.3.2	CNP .....	5
1.3.3	Die Guanylylzyklase-Rezeptoren GC-A und GC-B .....	6
1.4	Die murine Retina als Modell zur Untersuchung der physiologischen Angiogenese.....	6
1.5	Die spezielle Bedeutung der Perizyten während der Angiogenese .....	10
1.6	Bedeutung des Angiopoietins .....	12
1.7	Die Wirkung natriuretischer Peptide und ihre Rezeptoren in der Retina.....	13
1.7.1	Natriuretische Peptide werden in der Retina gebildet.....	13
1.7.2	Die natriuretischen Peptide ANP, BNP und CNP modulieren die physiologische Angiogenese während der Entwicklung der Retina.....	13
1.8	Fragestellungen und Ziele der Dissertationsarbeit .....	15
<b>2</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>18</b>
2.1	Tierversuchsvotum .....	18
2.2	Beschreibung der Versuchstiere und der genetischen Mausmodelle .....	18
2.3	Bestimmung des Genotyps.....	20
2.3.1	DNA-Extraktion aus Schwanzbiopsien.....	20
2.3.2	Polymerasekettenreaktion zur DNA-Amplifizierung.....	20
2.3.3	DNA-Gelelektrophorese.....	22
2.4	Präparation und Immunfluoreszenzfärbung der Retinae .....	23
2.4.1	Präparation der Netzhäute.....	23
2.4.2	Immunfluoreszenzfärbung .....	23
2.4.3	Morphometrische Auswertung der Mikroskopiebilder.....	24
2.5	Nichtinvasive plethysmographische Messung des arteriellen Blutdrucks .....	26
2.6	In-vitro Versuche an kultivierten Perizyten .....	27
2.6.1	Perizyten in Zellkultur .....	27
2.6.2	Zellstimulation mittels natriuretischer Peptide .....	28
2.6.3	Westernblot-Analysen der Angiopoietin-1 Expression.....	29
2.7	Berechnungen und Statistik .....	31
2.8	Verwendete Programme .....	31

<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>32</b>
3.1	Versuche an Mäusen mit perizytenspezifischer GC-A Deletion, dem gemeinsamen Rezeptor von ANP und BNP.....	32
3.1.1	Körpergewicht.....	32
3.1.2	Vaskularisierung der Retina in Jungtieren.....	33
3.1.3	Charakteristik des Gefäßplexus adulter Versuchstiere.....	39
3.1.4	Plethysmographische Blutdruckmessung in adulten Mäusen.....	40
3.2	Versuche an Mäusen mit perizytenspezifischer GC-B Deletion, dem Rezeptor von CNP.....	42
3.2.1	Körpergewicht.....	42
3.2.2	Vaskularisierung der Retina in Jungtieren.....	43
3.2.3	Charakteristik des Gefäßplexus adulter Versuchstiere.....	48
3.2.4	Plethysmographische Blutdruckmessung in adulten Mäusen.....	49
3.3	Versuche an Mäusen mit perizytenspezifischer Deletion der cGMP-abhängigen Protein Kinase Typ I (cGKI).....	50
3.3.1	Körpergewicht.....	50
3.3.2	Vaskularisierung der Retina in Jungtieren.....	51
3.4	Effekte der NPe auf die Expression von Angiopoietin-1 in kultivierten Perizyten .....	57
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>60</b>
4.1	Ergebnisse im Überblick .....	60
4.2	Vor- und Nachteile der Cre-LoxP-Strategie.....	61
4.3	Physiologische Angiogenese in der Retina .....	63
4.3.1	Die Retina als Angiogenesemodell .....	63
4.3.2	Veränderungen nach perizytenspezifischer Deletion der Guanylylzyklase-Rezeptoren GC-A oder GC-B.....	64
4.3.3	Das Wachstum und die Vitalität von GC-A-, GC-B- oder cGKI-defizienten Perizyten erscheint unverändert .....	65
4.4	Signalvermittlung der natriuretischen Peptide in Perizyten.....	65
4.4.1	Signalwegtransduktion der Guanylylzyklase-Rezeptoren in Perizyten ...	65
4.4.2	Bedeutung des parakrinen Faktors Angiopoietin-1 .....	67
4.5	Systemische Effekte der perizytenspezifischen Guanylylzyklasedeletion.....	69
4.5.1	Unterschiede im Körpergewicht der verschiedenen Genotypen.....	69
4.5.2	Erhöhung des arteriellen Blutdrucks bei Deletion des GC-A- oder GC-B-Rezeptors .....	71
4.6	Klinische Bedeutung der Ergebnisse .....	73
4.6.1	Klinische Implikationen .....	74
4.6.2	Bedeutung bei der pathologischen Neoangiogenese.....	76

<b>5 Zusammenfassung .....</b>	<b>79</b>
--------------------------------	-----------

<b>6 Literaturverzeichnis .....</b>	<b>80</b>
-------------------------------------	-----------

## **Appendix**

I	Verwendete Chemikalien, Antikörper, Enzyme, Proteine und Medien
II	Technische Geräte
III	Verbrauchsmaterialien
IV	Lösungen und Puffer
V	Abkürzungsverzeichnis
VI	Abbildungsverzeichnis
VII	Tabellenverzeichnis
VIII	Danksagung
IX	Eigene Veröffentlichungen und Kongressteilnahme

# 1 Einleitung

---

## 1.1 Bedeutung der Angiogenese in Physiologie und Pathologie

Die Neubildung von Blutgefäßen, die Angiogenese, geschieht physiologisch vor allem während der Embryonalentwicklung und postnatal im Rahmen des Gewebewachstums. Im Erwachsenenalter findet Angiogenese nur noch in einem deutlich reduzierteren Umfang statt. Zum Beispiel im Rahmen der Wundheilung oder des zyklischen Wachstums der Uterusschleimhaut. Im Embryo geht die Gefäßneubildung von einem primitiven durch Vaskulogenese geformten Gefäßplexus aus, später entspringt sie dem venösen postkapillären Kompartiment des erwachsenen Gefäßsystems (Favier and Corvol, 2001, Gerhardt and Betsholtz, 2003). Ziel der Angiogenese ist die Konstruktion eines Gefäßnetzes, welches den funktionellen Ansprüchen und dem Nährstoffbedarf des entsprechenden Gewebes gerecht wird (Gerhardt and Betsholtz, 2003). Pathologische Angiogenese findet sich in einer Vielzahl an Krankheiten, wie zum Beispiel in Karzinomen, „proliferativen“ Retinopathien (wie der diabetischen Retinopathie), der altersassoziierten Makuladegeneration, der rheumatoiden Arthritis, der Psoriasis, der Endometriose oder auch bei entzündlichen Darmerkrankungen (Kushner and Bautch, 2013, Gerhardt and Betsholtz, 2003). Die Neovaskularisation wird dabei als ursächlich für die schädlichen Auswirkungen und Komplikationen einiger dieser Erkrankungen angesehen und trägt zum Fortschreiten Anderer bei. Gemeinsame Merkmale der pathologischen Neovaskularisation sind dabei eine abnorme Gefäßpermeabilität sowie eine fehlerhafte Gefäßumgestaltung und -reifung die Leckagen, Blutungen und Entzündungen fördern (Gerhardt and Betsholtz, 2003). Weiterhin findet sich im adulten Organismus eine Hypoxie-getriggerte reparative oder adaptative Angiogenese, beispielsweise in der Lunge als Adaptationsprozess während eines längeren Höhengaufenthaltes, im Skelettmuskel bei physiologischer Hypertrophie oder auch im Herzmuskel nach einem Myokardinfarkt (Eldridge and Wagner, 2019, Krock et al., 2011, McLoughlin and Keane, 2011).

In der Netzhaut tritt die Angiogenese sowohl physiologisch als Teil der normalen Entwicklung sowie pathologisch im Rahmen von proliferativen Retinopathien wie der diabetischen Retinopathie oder der Frühgeborenen-Retinopathie auf. Bei den soeben genannten Erkrankungen kann die pathologische Neovaskularisation in der Retina

(durch Einblutungen oder Ödem) bis zur Erblindung führen (Frank, 2004, Sapiieha et al., 2010). Epidemiologische Studien haben gezeigt, dass die proliferative diabetische Retinopathie sowie die choroidale Neovaskularisation im Rahmen der altersbedingten Makuladegeneration zu den häufigsten Ursachen einer Erblindung im Erwachsenenalter zählen (Flaxman et al., 2017). Ebenso stellt die Frühgeborenen-Retinopathie eine Ursache für eine erworbene kindliche Blindheit dar (Sapiieha et al., 2010). Sowohl die physiologische als auch die pathologische Gefäßneubildung in der Retina, wird dabei durch Hypoxie ausgelöst und durch mechanische und parakrine Interaktionen zwischen Astrozyten, Perizyten und Endothelzellen gesteuert (Bergers and Song, 2005).

## **1.2 Die Rolle natriuretischer Peptide in der Angiogenese: Ein kurzer Ausblick**

Dieser Abschnitt möchte nur einen kurzen Ausblick auf die klinische Bedeutung des Themas geben. Die genauen Zusammenhänge zwischen natriuretischen Peptiden (NPe) und der Angiogenese werden im Abschnitt 1.7 detailliert dargestellt, denn klinische und experimentelle Studien haben einen Zusammenhang zwischen *i)* protektiven reparativen Angiogeneseprozessen sowie *ii)* pathologischen Angiogeneseprozessen und den NPe hergestellt:

*i)* Exogen zugeführte synthetische NPe stimulieren die Proliferation und Regeneration von kultivierten Endothelzellen und die reparative Angiogenese nach experimentell induzierter Ischämie im Skelett- oder Herzmuskel (Kuhn et al., 2009, Yamahara et al., 2003). Weiterhin konnten die Peptide In klinischen Studien die Gehstrecke bei Patienten mit peripherer arterieller Verschlusskrankheit verlängern (Park et al., 2008).

*ii)* Hamano et al. konnte nachweisen, dass die Menge des zirkulierenden NT(N-Terminalen)-proBNPs mit sowohl mikro- als auch makrovaskulären Gefäßkomplikationen bei Diabetes mellitus korreliert (Hamano et al., 2014). NT-proBNP ist das biologisch inaktive N-terminale Segment des Pro-BNP, welches zusammen mit zu BNP, dem B-Typ natriuretischen Peptid, in den Kardiomyozyten der Herzvorhöfe erzeugt und freigesetzt wird. NT-proBNP hat jedoch eine längere Halbwertszeit als BNP und ist daher besser zur diagnostischen Messung geeignet. Beide Proteine werden durch proteolytische Spaltung eines Pro-BNP-Vorläufers in Herzmuskelzellen erzeugt und als Reaktion auf ein erhöhte Volumen- oder Druckbelastung in den Kreislauf sekretiert (Czernik et al., 2011). Erhöhte NT-proBNP-Plasmaspiegel fanden sich in der untersuchten Kohorte auch bei Patienten mit diabetischer Retinopathie. Die Erhöhung

des NT-proBNP-Spiegels war dabei unabhängig von der Erkrankungsdauer, der Nierenfunktion und dem Alter mit der diabetischen Retinopathie assoziiert (Hamano et al., 2014). Ähnliche Ergebnisse fanden sich in einer großen Patientenkohorte bestehend aus Diabetikern mit Typ 1 Diabetes (Gruden et al., 2012). Des Weiteren wurde eine Assoziation zwischen einem erhöhten NT-proBNP-Spiegel im Urin Neugeborener und einer schweren Frühgeborenen-Retinopathie beobachtet (Czernik et al., 2011).

Auch die systemische Konzentration des atrialen natriuretischen Peptids (ANP) ist bei normotensiven jedoch diabetischen Patienten mit Retinopathie signifikant erhöht (Yano et al., 1998). Weiterhin weisen Diabetiker mit aktiver Neovaskularisation der Retina signifikant höhere ANP-Spiegel in der Glaskörperflüssigkeit des Auges auf als Patienten ohne aktive proliferative Retinopathie. Die Konzentrationen des ANPs im Plasma und im Glaskörper zeigen dabei keine Korrelation. Eine intraokuläre ANP-Produktion erscheint daher naheliegend, zumal in fibrovaskulärem, auf der Netzhaut gelegenen Gewebe dieser Patienten ANP in vaskulären, glialen, fibroblastenähnlichen und retinalen Pigmentepithelzellen nachgewiesen wurde (Rollin et al., 2004a).

Das C-Typ natriuretische Peptid (CNP) als drittes NP ist ein lokales, endotheliales natriuretisches Peptid, während die Herz hormone ANP und BNP endokrine Regulatoren des arteriellen Blutdrucks und des Blutvolumens sind (Bubb et al., 2019, Kuhn, 2016). Aktuelle Studien weisen darauf hin, das CNP über den Gefäßtonus auch den systemischen Blutdruck moduliert und des Weiteren eine Bandbreite an kardiovaskulären Prozessen wie Angiogenese, Entzündung, Proliferation glatter Muskel- und Endothelzellen sowie Arteriosklerose und Gewebefibrose reguliert (Bubb et al., 2019, Moyes and Hobbs, 2019, Yamahara et al., 2003).

## **1.3 Die Rezeptoren und Signalwege der natriuretischen Peptide**

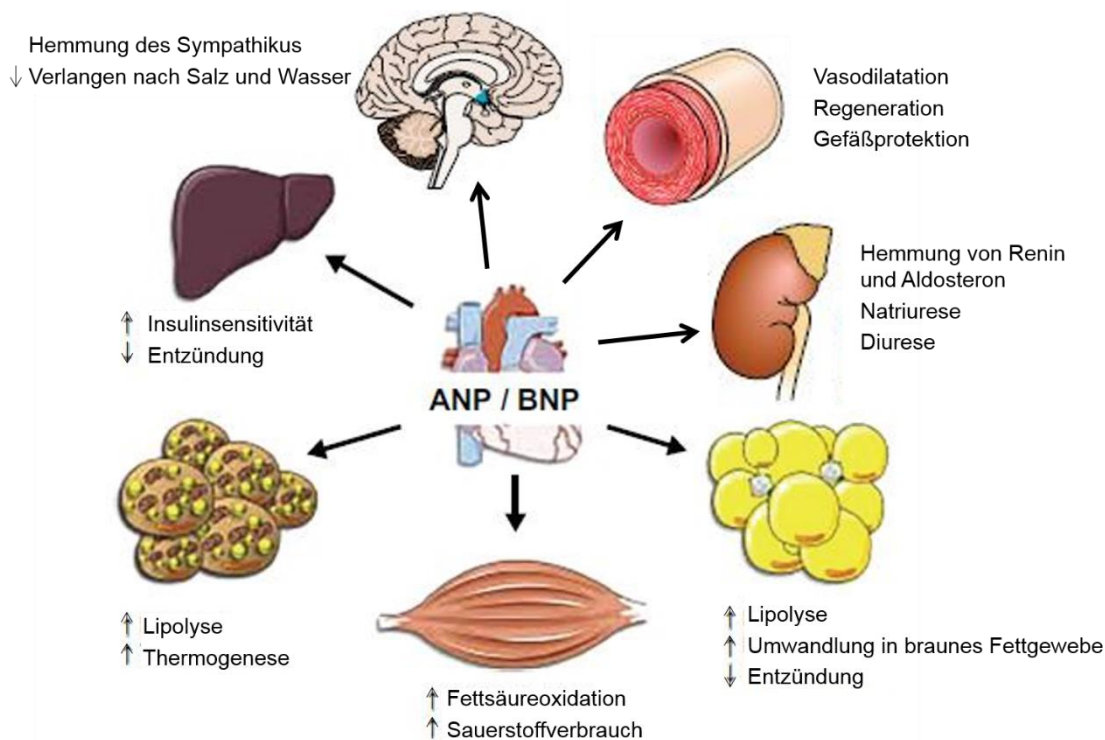
### **1.3.1 ANP und BNP**

Die beiden Herz hormone ANP und BNP stimulieren die Diurese und Natriurese sowie Vasodilatation, inhibieren das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System und den Sympathikus und sind somit wichtig für die Blutdruckregulation und die Flüssigkeitshomöostase (Kuhn, 2016, Forte et al., 2019). Zudem haben die NPe eine gefäßprotektive Wirkung und stimulieren die Gefäßregeneration im Skelettmuskel nach Ischämie (Kuhn et al., 2009). Mittels ANP und BNP fungiert das Herz als Vermittler zwischen Organen, die an der Regelung der Blutdrucks- und Stoffwechselhomöostase



beteiligt sind. Physiologisch sind beide NPe hauptsächlich in den sekretorischen Granula des Herzvorhofs gespeichert. Fast äquimolare Mengen an ANP und BNP werden kontinuierlich von Vorhofmyozyten freigesetzt. Die Bildung und Sekretion in den Kreislauf werden durch eine akute oder chronische Dehnung des Vorhofs reguliert. Weitere Stimuli für eine verstärkte Sekretion stellen körperliche Aktivität, Gewichtsverlust und Kälteexposition dar. Die Bindung des ANP und BNP an den gemeinsamen zyklisches Guanosin-Monophosphat (cGMP) produzierenden Guanylylzyklase-A Rezeptor (GC-A) löst dann koordinierte Effekte im Gefäßsystem, in der Niere, in den Nebennieren und im Zentralnervensystem, wie Sympathikolyse und vermindertes Durstgefühl aus, die insgesamt für die Senkung des arteriellen Blutdrucks sowie den Erhaltung der intravaskulären Volumenhomöostase entscheidend sind (Kuhn, 2016, Goetze et al., 2020). Darüber hinaus sind ANP und BNP Schlüsselregulatoren des Energieverbrauchs und des Stoffwechsels, da sie die Lipolyse der Adipozyten, die Lipidoxidation in Muskelzellen, die Wärmeproduktion in braunem Fettgewebe sowie die Insulinsensitivität erhöhen. (siehe Abb. 1) (Schlueter et al., 2014). Die pathophysiologische Relevanz dieser Hormone wurde in großen epidemiologischen Studien hervorgehoben, welche zeigen, dass Menschen mit Übergewicht, Insulinresistenz und Diabetes reduzierte Spiegel der natriuretischen Peptide aufweisen (Ramos et al., 2015).

Mittels in situ Hybridisierung und Immunhistochemie wurde in vielen extrakardialen Geweben wie Aorta, Lunge, Gehirn, Niere und Nebenniere, Darm, Thymus, Choroidea und Ziliarkörper niedrige ANP und BNP Expression festgestellt. Auch wenn es unwahrscheinlich ist, dass diese Quellen wesentlich zu den zirkulierenden ANP- und BNP-Spiegeln beitragen, ist es möglich, dass die NPe, zumal diese Gewebe auch den GC-A-Rezeptor exprimieren, in diesen Organen parakrine Effekte auslösen (Kuhn, 2016).



**Abb. 1 Blutdruckregulierende und metabolische Effekte der natriuretischen Peptide ANP und BNP**

*Die Freisetzung von ANP und BNP aus dem Herzen erfolgt bei einer erhöhten Dehnung der Wand des Herzvorhofs, aber auch bei körperlicher Aktivität, Gewichtsverlust und Kälteexposition. Eine Aktivierung des NP/GC-A Systems erhöht in weißem und braunem Fettgewebe, in Hepatozyten, im Skelettmuskel, in der Niere, in den Gefäßen und im Gehirn die intrazellulären cGMP Spiegel. Dies verbessert über eine Modulation der Zellfunktion den Energiehaushalt. Des Weiteren wird durch koordinierte Effekte in Gefäßsystem, Niere, Nebennieren und zentralem Nervensystem der arterielle Blutdruck gesenkt und die intravaskuläre Volumenhomöostase reguliert (Kuhn, 2016). [Abbildung entnommen und modifiziert aus (Kuhn, 2016)]*

### 1.3.2 CNP

CNP wird im kardiovaskulären System vor allem von Endothelzellen synthetisiert. CNP wird dabei nicht wie die anderen beiden NPe granulär gespeichert, sondern kontinuierlich produziert und freigesetzt (Suga et al., 1993). In geringeren Mengen findet auch eine Produktion in anderen Zellarten, wie etwa in den glatten Muskelzellen der Gefäße, in Kardiomyozyten und Fibroblasten des Herzens sowie in Makrophagen und Leukozyten statt (Potter et al., 2009). Die Effekte des CNP werden vornehmlich über den cGMP bildenden Guanylylzyklase-B-Rezeptor (GC-B) vermittelt. Es findet aber möglicherweise auch eine Signalübermittlung über den Natriuretischen Peptidrezeptor

C (NPR-C) statt, welcher keine Guanylylzyklaseaktivität hat aber an G-Proteine koppeln kann (Kuhn et al., 2009, Potter et al., 2009). Es wurde gezeigt, dass exogenes CNP den Gefäßtonus und pathologischen Gefäßumbau beeinflusst und zudem die regenerativen, antiinflammatorischen und antithrombotischen Eigenschaften des Endothels verbessert (Kuhn, 2016). Die kritische Aufgabe des CNP ist allerdings die autokrine CNP/GC-B-Signalübertragung in den Chondrozyten der Wachstumsfuge. CNP ist hier essenziell für das endochondrale Knochenwachstum. Die cGMP-abhängige Proteinkinase II (cGKII) ist in diesem Fall der intrazelluläre Hauptbotenstoff, welcher die Effekte des GC-B/cGMP-Signalwegs mediiert. Knockoutmäuse mit einer Deletion von CNP oder GC-B oder der cGKII sind kleinwüchsig, haben kurze Gliedmaßen und auch kraniale Anomalien (Kuhn, 2016). Im Menschen führen inhibierende Mutationen des GC-B-Rezeptors zur Achondrodysplasie Typ Maroteaux (Bartels et al., 2004). Des Weiteren werden in Nagetieren sowohl CNP als auch der GC-B-Rezeptor in der Gebärmutter und den Eierstöcken exprimiert. Weibliche Mäuse mit einer Deletion des GC-B-Rezeptors sind unfruchtbar. Die parakrine CNP/GC-B-Signalübertragung in den Eierstöcken der Nager spielt dabei bezüglich der Regulation der Meiose der Eizellen eine kritische Rolle (Kuhn, 2016).

### **1.3.3 Die Guanylylzyklase-Rezeptoren GC-A und GC-B**

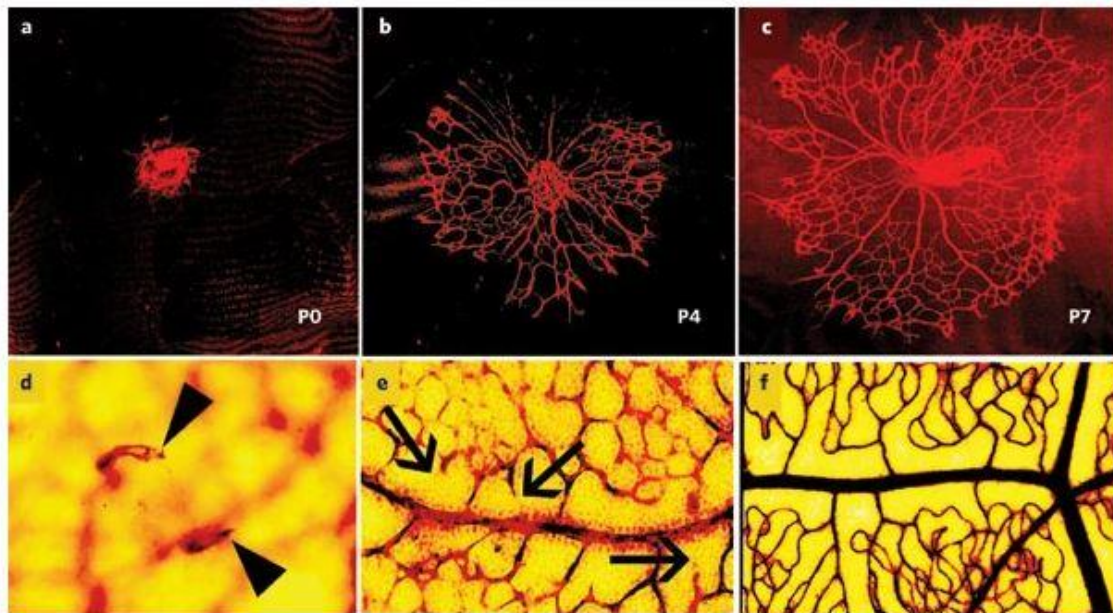
Wie bereits angesprochen aktivieren ANP und BNP die transmembranäre Guanylylzyklase vom Typ-A, welche auch natriuretischer Peptidrezeptor-A (NPR-A) genannt wird. CNP aktiviert eine verwandte Guanylylzyklase vom Typ B, auch natriuretischer Peptidrezeptor B (NPR-B) genannt. Beide Rezeptoren katalysieren die Synthese von cGMP, dass die meisten der bekannten Wirkungen der natriuretischen Peptide vermittelt. Ein dritter natriuretischer Peptidrezeptor, der natriuretische Peptidrezeptor-C (NPR-C), entfernt natriuretische Peptide mittels rezeptorvermittelter Internalisierung und darauffolgendem Abbau aus dem Blutkreislauf. Es wird jedoch auch eine Signalfunktion dieses Rezeptors diskutiert (Potter et al., 2009).

## **1.4 Die murine Retina als Modell zur Untersuchung der physiologischen Angiogenese**

Die Netzhaut der Maus wurde in den letzten Jahrzehnten als Modellsystem zur Untersuchung der physiologischen und pathologischen Angiogenese herangezogen

(Stahl et al., 2010). Die Entwicklung des Netzhautgefäßsystems basiert auf einer streng koordinierten Signalübertragung zwischen verschiedenen Zelltypen der Netzhaut. Hierbei spielen sowohl interne Stoffwechsellanforderungen als auch externe Einflüsse wie die Zufuhr von Sauerstoff und Nährstoffen eine entscheidende Rolle. Das Netzhautgefäßsystem der Maus ist ein nützliches Modell zur Untersuchung dieser Wechselwirkungen, da es experimentell für intraokulare Injektionen und genetische Manipulationen sowie leicht mikroskopisch zugänglich ist und sich das Gefäßsystem auf ähnliche Weise wie das des Menschen, allerdings erst postnatal entwickelt (Selvam et al., 2018). Die Vaskularisation der Retina beginnt in den oberflächlichen Netzhautschichten am Sehnervenkopf und breitet sich von diesem zentralen Punkt in die Peripherie aus. Weitere Kapillarnetze in tieferen Netzhautschichten entstehen im Anschluss durch Auskeimung aus der inneren Gefäßschicht (Gariano and Gardner, 2005). Beim Menschen läuft die Bildung von Hyaloidgefäßen, welche aus der zentralen hyaloidalen Arterie entstehen, durch den Glaskörper verlaufen und die initiale Versorgung sicherstellen, ihre Regression und die Entwicklung der Netzhautgefäße bereits intrauterin ab (Selvam et al., 2018). Auf diese Weise kommt ein zeitgerecht geborener Säugling mit voll entwickelten Netzhautgefäßen auf die Welt. Im Gegensatz hierzu weisen Mäuse bei der Geburt ein unreifes Netzhautgefäßsystem und persistierende Hyaloidgefäße auf. Parallel zur Regression dieser Hyaloidgefäße erfolgt die Entwicklung des intraretinalen Gefäßsystems bei Mäusen postnatal in einem streng zeitlichen und räumlich regulierten Muster. Daher können Störungen der postnatalen Gefäßentwicklung zum Beispiel in genmodifizierten Tieren zuverlässig beobachtet werden (Stahl et al., 2010, Gariano and Gardner, 2005). Zum Zeitpunkt der Geburt der Maus sprießen die ersten Netzhautgefäße von der Eintrittsstelle des Sehnervs radial aus. Sie bilden im Verlauf ein expandierendes Netzwerk, den primären Plexus, der um den siebten postnatalen Tag (P7) den Netzhautrand in der Peripherie erreicht. Er besteht aus abwechselnden arteriell-venösen Schleifen und ist radialsymmetrisch (siehe Abb. 2). Nach Abschluss des primären Plexus beginnt das Auswachsen eines tieferen Plexus aus den Venen des primären Plexus heraus. Die Gefäße dringen dabei in die Netzhaut ein und bauen wie beim Menschen ein laminares Gefäßnetz um die innere Körnerzellschicht herum auf (Selvam et al., 2018). Nach der Gestaltung dieses tiefen vaskulären Plexus bildet sich ein weiterer intermediärer Plexus zwischen dem oberflächlichen und dem tiefer liegenden Plexus. Gegen Ende der dritten Lebenswoche sind alle drei Gefäßschichten vollständig ausgebildet und weisen viele

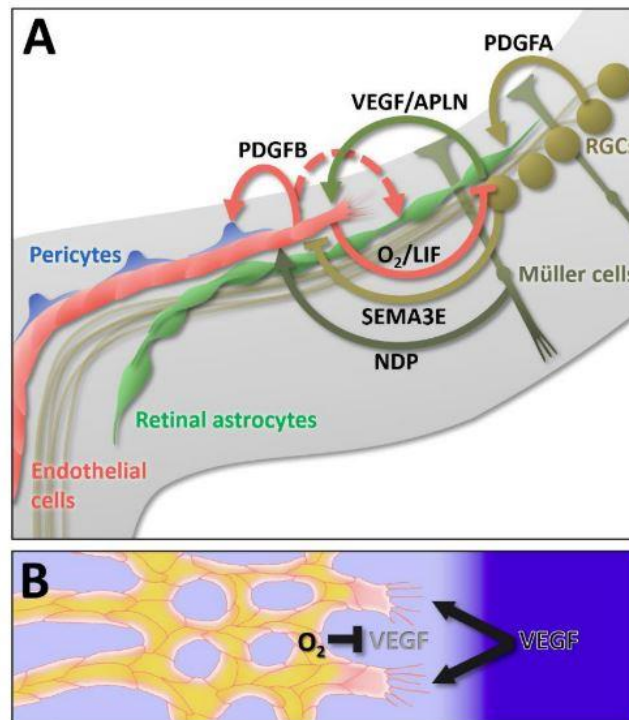
Verbindungsgefäße zwischen den unterschiedlichen Gefäßebenen auf (Stahl et al., 2010).



**Abb. 2 Zeitliche Koordination und Morphologie der Netzhautvaskularisation in der Maus**

*(a-c): Um die Geburt (P0) entstehen Netzhautgefäße (rot) aus dem Sehnerv und dehnen sich dann über circa sieben Tage radial in der oberflächlichen Netzhaut aus, bis sie die Peripherie erreichen. (d): Im Anschluss bildet sich ein tieferes Kapillarnetzwerk durch endotheliales Keimen (Pfeilspitzen) aus dem zuvor gebildeten oberflächlichen Gefäßnetzwerk (unscharf im Hintergrund) aus. (e): Kurz nach der Bildung von Netzhautgefäßen, ziehen sich Kapillarsegmente neben entstehenden Arterien (Pfeile) zurück und es bildet sich eine periarterielle kapillarfreie Zone. (Gariano and Gardner, 2005, Selvam et al., 2018) [Abbildung entnommen aus (Gariano and Gardner, 2005)]*

Einen grundlegenden Baustein der Bildung von Gefäßnetzen stellt in diesem Geschehen die Verlängerung von Gefäßknospen dar. Dieser Prozess erfordert ein unterschiedliches Verhalten der Endothelzellen abhängig von ihrer Lokalisation. Zellen an der Spitze des Gefäßsprosses sind daher im Vergleich zu Endothelzellen im Gefäßstiel beweglicher und weniger proliferativ. Diese sogenannten Tip-Zellen, welche die Spitze des Gefäßes bilden, steuern die Wachstumsrichtung und orientieren sich dabei an den Gradienten angiogener Faktoren wie dem vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF). Im Gegensatz hierzu vermehren sich die Zellen im Stiel und bilden das Gefäßlumen, wodurch die Verlängerung und Perfusion des Sprosses aufrechterhalten wird. Ein anderes Transkriptionsmuster der endothelialen *tip-cells* im Vergleich zu den nachfolgenden Zellen im Stiel bildet die Grundlage für das unterschiedliche Verhalten (Selvam et al., 2018, Kubota and Suda, 2009). Die Vaskularisation erfolgt dabei entlang eines bereits vorhandenen Astrozytennetzwerks (siehe Abb. 3).



**Abb. 3 Signalübertragung während der retinalen Angiogenese**

(A): Die Zell-Zell-Signalübertragung zwischen retinalen Ganglienzellen (RGCs, oliv), Netzhautastrozyten (grün), Perizyten (blau) und Endothelzellen (rot) steuert die Entwicklung der Netzhautgefäße. Von den RGCs freigesetztes PDGF-A (platelet derived growth factor type A) wirkt auf Astrozyten und fördert deren Proliferation und Migration. VEGF und Apelin, die von den retinalen Astrozyten produziert werden sowie das VEGF, welches von RGCs und anderen neuronalen Zellen produziert wird, aktivieren die Endothelzellen. Umgekehrt stabilisieren Endothelzellen die retinalen Astrozyten über LIF („leukaemia inhibitory factor“). In ähnlicher Weise hemmt der durch das wachsende Gefäßsystem bereitgestellte Sauerstoff die VEGF-Expression von Netzhautastrozyten und anderen Nervenzellen und wirkt somit als negativer Feedback Mechanismus. Semaphorin 3E (SEMA3E) beschränkt das Wachstum des sich entwickelnden Plexus auf die Nervenfaserschicht. Vom Endothel stammendes PDGF-B hat chemoattraktive und mitotische Wirkungen auf Perizyten, kann aber auch die Astrozyten der Netzhaut beeinflussen (punktiertes Pfeil).

(B): Eine erhöhte VEGF-Expression in der hypoxischen Peripherie und eine VEGF-Unterdrückung im vaskularisierten Zentrum erzeugen einen VEGF-Gradienten, der die Migration der Tip-Zellen steuert (die Gefäßperfusion ist gelb dargestellt)

[Abbildung entnommen aus (Selvam et al., 2018)]

Die Astrozytenvorläufer gelangen über den Sehnerv in die Netzhaut und migrieren von dort in Richtung Peripherie. Dies deutet auf eine Art Schablonenfunktion der Gliafasern hin, denn es erstrecken sich feine endotheliale Filopodien an den Spitzen wachsender Netzhautgefäße häufig entlang der darunter liegenden Astrozyten, die VEGF sezernieren (Gariano and Gardner, 2005). Eine weitere in diesen Vorgang involvierte Zellart sind die Perizyten. Diese werden in der Netzhaut über den Wachstumsfaktor „platelet derived growth factor B“ (PDGF-B) rekrutiert und fördern das Gefäßwachstum unter anderem durch eine VEGF-Sekretion. Zusätzlich stabilisiert der Kontakt zwischen Perizyten und Endothel die Gefäße (Gariano and Gardner, 2005).

Die Entwicklung unterschiedlicher genetischer Mausmodelle hat die Möglichkeiten eröffnet Signalwege zu untersuchen, die an der Entwicklung der postnatalen Netzhautgefäße beteiligt sind. Dies ist von großer klinischer und auch therapeutischer Bedeutung, da wie bereits ausgeführt zahlreiche Augenerkrankungen des Menschen durch eine pathologische Angiogenese verursacht oder verschlimmert werden (Selvam et al., 2018).

## **1.5 Die spezielle Bedeutung der Perizyten während der Angiogenese**

Die bei der Angiogenese mitwirkenden Perizyten sind verzweigte Zellen, die im gesamten Körper zusammen mit den Endothelzellen die Wand kapillärer Blutgefäße ausbilden und eine zentrale Rolle in der Aufrechterhaltung der vaskulären Homöostase spielen (Cathery et al., 2018). Sie wurden erstmals 1879 von Rouget beschrieben und deshalb initial als „Rouget-Zellen“ bezeichnet. Aufgrund ihrer Lage an der äußeren Oberfläche der Blutkapillaren und ihrer engen Wechselwirkung mit den darunter liegenden Endothelzellen, welche sie umhüllen, mit denen sie sich die Basalmembran teilen und somit einen starken physischen Kontakt halten, benannte Zimmermann sie 1923 in „Perizyten“ (peri-: rundherum; -zyte: Zelle) um (Gerhardt and Betsholtz, 2003). Perizyten regulieren dabei nicht nur die Angiogenese und Gefäßstabilisierung, sondern tragen auch zur Bildung sowohl der Blut-Hirn-, als auch der Blut-Retina-Schranke bei. Verschiedene parakrine Signalmoleküle, wie zum Beispiel Angiopoietin-1 (Ang-1) und dessen Tyrosinkinase-Rezeptor Tie-2, PDGF und den transformierenden Wachstumsfaktor (TGF) steuern die Kommunikation zwischen den Perizyten und den Endothelzellen (Ferland-McCollough et al., 2017). Weiterhin weisen Perizyten mesenchymale Stammzellmerkmale auf. Im Auge spielen Perizyten daher nicht nur eine Rolle bei der Stabilisierung der Augengefäße, sondern auch als Stammzellpool, der zu Regenerationsprozessen zum Beispiel bei der diabetischen Retinopathie beitragen kann (Trost et al., 2019). Ergänzend können Perizyten die Blutperfusion aufgrund eines hohen Gehalts an „ $\alpha$ -smooth muscle actin“ ( $\alpha$ -SMA) regulieren, denn dieses verleiht ihnen ähnlich den glatten Muskelzellen größerer Gefäße Kontraktionsfähigkeit. Diese kontraktile Funktion in Perizyten wird auch durch Identifizierung kontraktiler Proteine wie Tropomyosin und Myosin im Zellinneren untermauert (Caporarello et al., 2019). Perizyten enthalten ferner die cGMP-abhängige Proteinkinase (cGKI), von der berichtet

wurde, dass sie die Kontraktion reguliert (Díaz-Flores et al., 1991). Die Kontraktilität der Zellen lässt sich auch an kultivierten Perizyten nachweisen (Allt and Lawrenson, 2001). Die Dichte der Perizytenbedeckung der abluminalen Endotheloberfläche variiert insgesamt stark zwischen den Kapillarbetten verschiedener Gewebe. Der Grund, weshalb die Bedeckung in einigen Geweben nur zehn Prozent und in anderen Geweben bis zu fünfzig Prozent beträgt ist nicht bekannt, spiegelt wahrscheinlich, aber spezifische funktionelle Besonderheiten der Mikrogefäße in den unterschiedlichen Organen wider. Die höchste Perizyten-dichte wurde in Nervengewebe, insbesondere in der Netzhaut beschrieben. Dies mag mit der außergewöhnlich hohen Stoffwechselaktivität und der damit einhergehenden Notwendigkeit eines sorgfältig regulierten Blutflusses in den Netzhautkapillaren sowie deren ausgeprägter Barrierefunktion (Bluthirnschranke) zusammenhängen (Gerhardt and Betsholtz, 2003). Andere Orte an denen Perizyten Organ-spezifische Funktionen zu haben scheinen sind die Nierenglomeruli (als Mesangiumzellen) (Ferland-McCollough et al., 2017), die Leber (als sinusoidale Sternzellen) sowie die Plazenta (Gerhardt and Betsholtz, 2003).

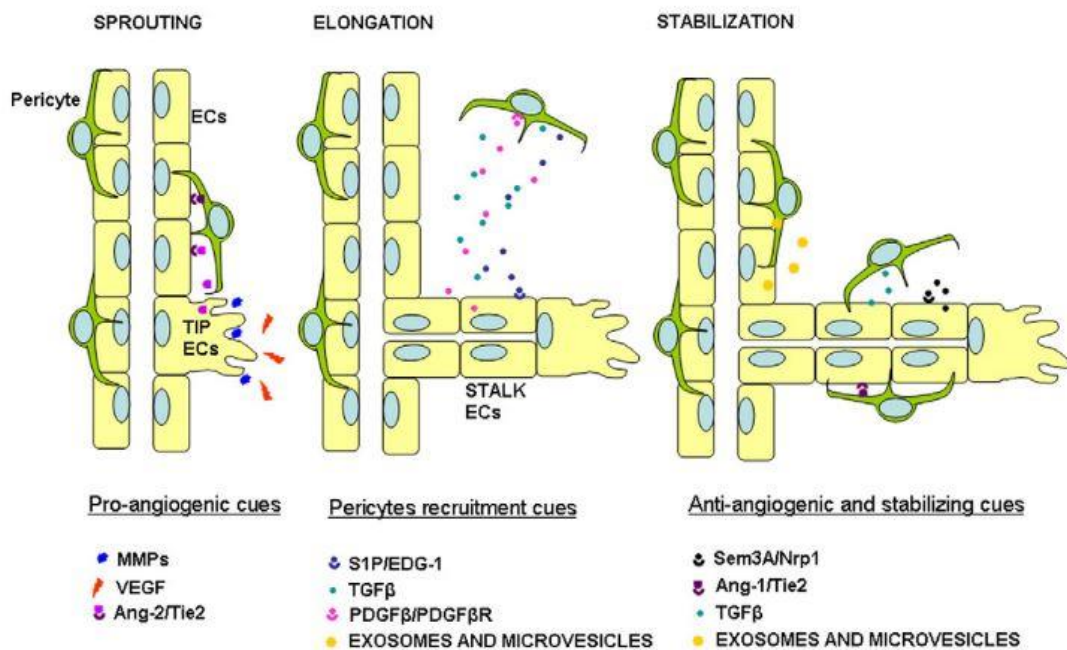
Die Notwendigkeit der Stabilisierung neu gebildete Gefäße nach erfolgreicher Induktion einer Neovaskularisation stellt Perizyten auch in den Fokus proangiogener Therapien (Caporarello et al., 2019). Das Wissen über die Aufgaben und Funktionen der Perizyten ist jedoch verglichen mit den Endothelzellen immer noch begrenzt. Für ein tieferes Verständnis der Angiogenese und therapeutisch Ansätze zu Modulation derselben ist es daher wichtig die Mechanismen weiter zu entschlüsseln, die die Rekrutierung und Funktionen der Perizyten sowie ihre Interaktionen mit Endothelzellen kontrollieren (Gerhardt and Betsholtz, 2003).

Phänotypisch exprimieren Perizyten eine Reihe von Markern, die bei ihrer Identifizierung helfen. Keines dieser Markerproteine kann allerdings als perizyten-spezifisch angesehen werden, weshalb ihre Identifizierung auf einer Kombination verschiedener Marker basieren muss. Üblicherweise umfasst dies das Proteoglykan des neuralen/glialen Antigens 2 (NG2), den PDGF-Rezeptor Typ B und CD146 zusammen mit mesenchymalen Markern wie CD90 und CD105. Zusätzlich sollte kein CD56, ein Oberflächenantigen der Neuronen, Gliazellen und Skelettmuskelzellen sowie keine hämatopoetischen und endothelialen Markern wie CD45 oder CD31 exprimiert sein (Cathery et al., 2018).



## 1.6 Bedeutung des Angiopoietins

Zahlreiche Faktoren regulieren die Interaktion zwischen Perizyten und Endothelzellen (ECs). Zum einen sind dies direkte mechanische Kontakte, denn die Perizyten stehen über ihre Zellfortsätze in engem Kontakt mit den ECs. Die physikalische Verbindung zwischen den Zellen wird durch sogenannte „Gap Junctions“ hergestellt, die den direkten Austausch kleiner Moleküle und Ionen ermöglichen (Caporarello et al., 2019). Die Kommunikation erfolgt des Weiteren über die parakrine Freisetzung von Proteinen und Nucleinsäuren (Caporali et al., 2017). Eine Übersicht dieser parakriner Faktoren ist in Abb. 4 dargestellt. Als Beispiele seien hier Angiopoietin-1 und sein Tie-2 Rezeptor, PDGF-B und der transformierende Wachstumsfaktor Beta (TGF- $\beta$ ) genannt (Caporarello et al., 2019), ebenso Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) (Armulik et al., 2005), VEGF-A sowie das von Perizyten sekretierte Sphingosin-1-Phosphat (S1P) (Caporali et al., 2017).



**Abb. 4 Parakrine Faktoren, die die Interaktion von Perizyten und ECs während der Angiogenese regulieren**

*Räumliche und zeitliche Verteilung parakriner Faktoren, die an der gegenseitigen Regulation der Perizyten- sowie der Endothelzell-Funktionen während der physiologischen Angiogenese beteiligt sind. (Ang: Angiopoietin; MMPs: Matrix-Metalloproteinasen; S1P: Sphingosin-1-Phosphat; TGF- $\beta$ : transformierender Wachstumsfaktor  $\beta$ ; VEGF-A: vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor A) [Abbildung entnommen aus (Caporali et al., 2017)]*

Für einen dieser Faktoren, das Angiotensin-1 (Ang-1) wurde bereits gezeigt, dass es von Perizyten in vitro und in vivo exprimiert wird und eine wichtige Rolle bei der Gefäßentwicklung und -reifung spielt (Sundberg et al., 2002). Deshalb wird diese Arbeit auch untersuchen, ob es einen Zusammenhang zwischen der Produktion dieses Proteins in den Perizyten und der Wirkung der natriuretischen Peptide gibt.

## **1.7 Die Wirkung natriuretischer Peptide und ihre Rezeptoren in der Retina**

### **1.7.1 *Natriuretische Peptide werden in der Retina gebildet***

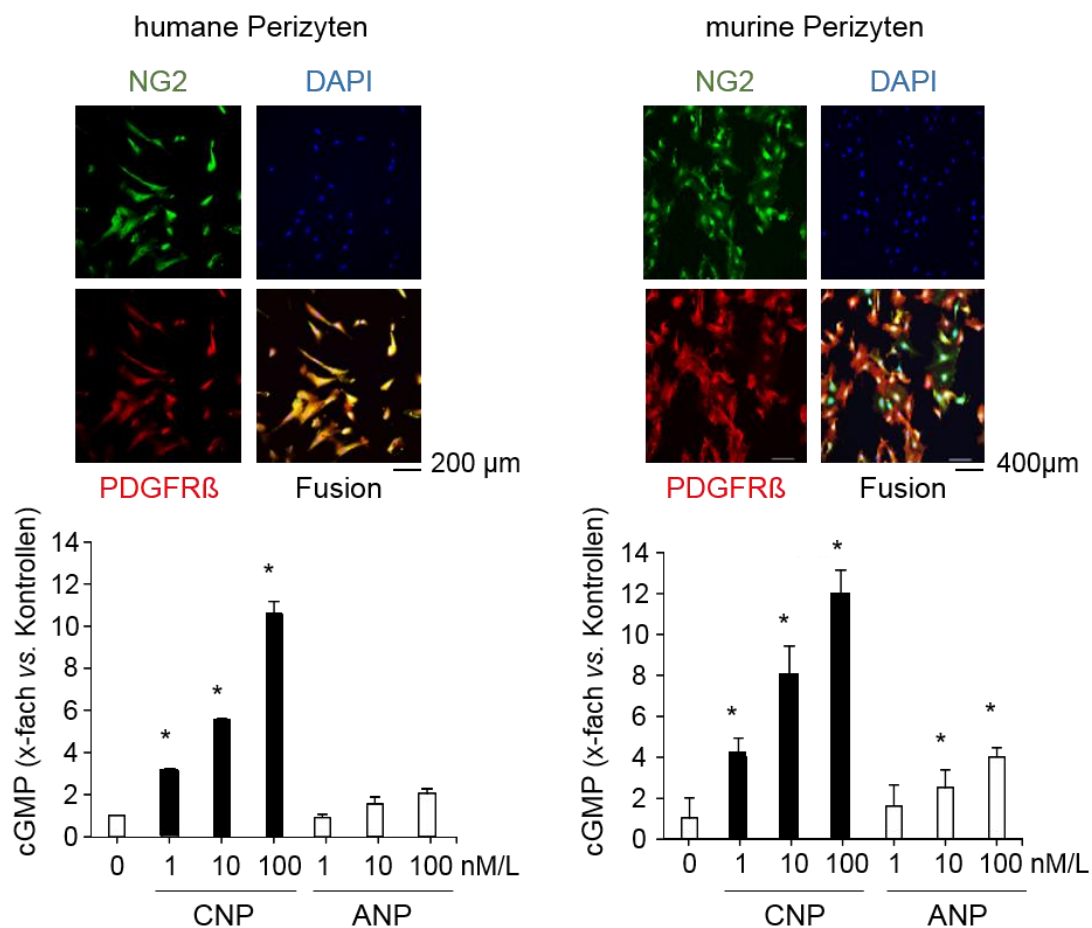
Bereits 1995 wurde die Expression der natriuretischen Peptide und ihrer Rezeptoren im Auge dargestellt. Es konnte das Vorhandensein von mRNA-Transkripten der drei natriuretischen Peptidrezeptoren GC-A, GC-B und NPR-C in der Netzhaut, der Aderhaut und dem Ziliarprozess des Ratten- und Kaninchenauges nachgewiesen werden. Zudem wurde die mRNA von ANP, BNP und CNP im Augengewebe detektiert, was darauf hindeutet, dass zumindest ein Teil der im Auge nachgewiesenen natriuretischen Peptide die Retina nicht über den Blutstrom erreichen, sondern lokal synthetisiert werden (Fernandez-Durango et al., 1995). Auch im menschlichen Auge wurde mittels Immunhistochemie die Bildung von NPe in der Retina sowie im retinalen Pigmentepithel nachgewiesen. Eine positive Immunfärbung für NPe wurde in Astrozyten und ihren Ausläufern, die die Gefäße umhüllen, beobachtet. Auch die Expression von NP-Rezeptor-Transkripten zusammen mit ANP-, BNP- und CNP-mRNA in der menschlichen Netzhaut wurde gezeigt (Rollin et al., 2004b).

### **1.7.2 *Die natriuretischen Peptide ANP, BNP und CNP modulieren die physiologische Angiogenese während der Entwicklung der Retina***

Wie bereits in den vorangegangenen Kapiteln erläutert, sind Endothelzellen die Hauptakteure der Gefäßentwicklung sowohl in der physiologischen Angiogenese als auch im Rahmen von Pathologien wie der proliferativen Retinopathie. Ihr Wachstum wird dabei durch ihre Interaktion mit benachbarten Zellen, nämlich den Astrozyten und Perizyten reguliert. Erstere bilden die Grundstruktur an welcher die Endothelzellen

entlang migrieren und letztere begleiten und stabilisieren die neugebildeten Gefäße (Eilken et al., 2017, Kubota and Suda, 2009).

In Zellkulturen konnte nun gezeigt werden, dass sowohl in Astrozyten als auch in Perizyten ANP die intrazelluläre cGMP-Konzentration erhöht. Dies weist eine Expression und Aktivität des GC-A-Rezeptors in beiden Zelltypen nach. In der Retina von Mäusen wird der GC-A Rezeptor in Endothelzellen, Astrozyten und Perizyten exprimiert (Špiranec Spes et al., 2020a). Des Weiteren wurde in Zellkulturen eine Expression des GC-B Rezeptors für CNP auf sowohl mikrozirkulatorischen Endothelzellen als auch Perizyten nachgewiesen (Špiranec et al., 2018). Die Erhöhung des cGMP-Spiegels in humanen und murinen Perizyten durch ANP und CNP ist in Abb. 5 gezeigt und für das Vorliegen sowohl des GC-A- als auch des GC-B-Rezeptors auf Perizyten beweisend.



**Abb. 5 Expression des GC-A- und GC-B-Rezeptors in Perizyten**

CNP und in geringerem Maße ANP erhöhen den cGMP-Spiegel in kultivierten humanen und murinen Perizyten. Dies belegt eine Expression der GC-A- und GC-B-Rezeptoren in diesen Zellen. Die Bilder oberhalb der Diagramme zeigen eine doppelte Immunfärbung mit Antikörpern gegen NG2 (grün) und PDGF-Rezeptor (R) Typ B (rot), welche die Reinheit der Perizytenkulturen demonstriert. Des Weiteren sind die Zellkerne mittels 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) angefärbt (blau). (\* $p < 0,05$  vs. Basal (0)) [Abbildung entnommen aus (Špiranec et al., 2018)]

Studien an Mäusen mit einer globalen Deletion des GC-A-Rezeptors haben kürzlich gezeigt, dass diese Mäuse am fünften Lebenstag eine deutlich verminderte Vaskularisierung der Netzhaut aufweisen. Eben solche Untersuchungen an Mäusen mit einer endothelspezifischen Deletion des GC-A-Rezeptors wiesen allerdings keine Unterschiede der Gefäßentwicklung auf. Dies lässt darauf schließen, dass die protektiven pro-angiogenen physiologischen Effekte des NPe/GC-A Signalwegs nicht über die Endothelzellen, sondern über andere, nicht-endotheliale Zellen vermittelt werden. Um die Ursache der beobachteten Verminderung der Netzhautvaskularisation in Mäusen mit einer globalen Deletion des GC-A-Rezeptors zu untersuchen, wurden in vivo Experimente an Mäusen mit astrozytenspezifischer Deletion des GC-A-Rezeptors durchgeführt. Auch in diesen Tieren war die physiologische Angiogenese der Netzhaut unverändert (Špiranec Spes et al., 2020a). Aus diesem Grund muss eine andere Zellart in der Retina für die in den globalen GC-A Knockouts beobachteten Effekte verantwortlich sein.

## **1.8 Fragestellungen und Ziele der Dissertationsarbeit**

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Angiogenese sowohl in ihrer physiologischen Funktion als auch im Hinblick auf diverse Erkrankungen von der Embryonalentwicklung an das ganze Leben lang eine wichtige Rolle spielt. Als Beispiel seien hier die proliferativen Retinopathien genannt (Gerhardt and Betsholtz, 2003). Wie bereits in vorangehenden Kapiteln erläutert, sind Endothelzellen dabei die Hauptprotagonisten der Gefäßentwicklung. Ihr Wachstum wird durch ihre Interaktion mit den ihnen benachbarten Astrozyten und Perizyten reguliert. Erstere bilden hierbei die Grundstruktur, an welcher die Endothelzellen entlang migrieren und letztere begleiten und stabilisieren die neugebildeten Gefäße (Eilken et al., 2017, Kubota and Suda, 2009). In zahlreichen Studien wurde ein Zusammenhang zwischen diesen Vorgängen und den natriuretischen Peptiden ANP, BNP und CNP gefunden (Czernik et al., 2011, Hamano et al., 2014, Rollin et al., 2004a, Yamahara et al., 2003, Yano et al., 1998). Wie zuvor geschildert, werden diese natriuretischen Peptide auch in der Retina gebildet und Voruntersuchungen unserer Arbeitsgruppe hatten gezeigt, dass die spezifischen cGMP-bildenden Guanylylzyklase-Rezeptoren für diese Hormone (GC-A, der gemeinsame Rezeptor von ANP und BNP; GC-B, der Rezeptor für CNP) in Endothelzellen, Astrozyten und Perizyten ko-exprimiert werden (siehe Kapitel 1.7.2). Diese Zellen und ihre

reziproken mechanischen und parakrinen Interaktionen sind für die physiologische Gefäßentwicklung, speziell auch für die Vaskularisierung der Retina, essenziell. In Mäusen führte die globale, systemische Deletion des GC-A-Rezeptors zu einer Retardierung der postnatalen Angiogenese in der Retina. In Mäusen mit Endothel- oder Astrozyten-spezifischer GC-A-Deletion dagegen, war dieser Prozess unverändert (Špiranec Spes et al., 2020a). Diese Beobachtungen führten zu der **Hypothese**, dass lokal gebildete natriuretische Peptide die physiologische Vaskularisierung der Retina stimulieren, ihre protektiven Effekte in diesem Szenario aber nicht direkt durch Endothelzellen oder Astrozyten vermittelt werden. Das **Ziel** dieser Arbeit war es daher zu untersuchen, ob die natriuretischen Peptide ANP, BNP und CNP über ihre Guanylylzyklase-Rezeptoren A und B in Perizyten deren Kommunikation mit den Endothelzellen und darüber die physiologische Angiogenese in der Retina stimulieren.

Durch Anwendung spezifischer genetischer Mausmodelle wurden die folgenden **Fragen** untersucht:

- 1.) Wird der stimulierende Effekt der natriuretischen Peptide ANP und BNP auf die physiologische Vaskularisierung der Retina durch den GC-A-Rezeptor auf Perizyten vermittelt? In diesem Zusammenhang wurden auch mögliche systemische Veränderungen, speziell des Körpergewichts oder des arteriellen Blutdrucks, in Mäusen mit Perizyten-spezifischer GC-A-Deletion betrachtet.
- 2.) Ist auch das endotheliale C-Typ natriuretische Peptid (CNP) und sein Guanylylzyklase-B-Rezeptor regulierend an der physiologischen Angiogenese in der Retina beteiligt?
- 3.) Ein gemeinsamer dritter intrazellulärer Signalträger der cGMP-bildenden GC-A und GC-B Rezeptoren ist die cGMP-abhängige Protein Kinase I (cGKI). Vorarbeiten der Arbeitsgruppe hatten gezeigt, dass diese Kinase in Perizyten exprimiert wird und anti-apoptotische Effekte der natriuretischen Peptide vermittelt. Im Rahmen dieser Dissertationsarbeit wurde die Rolle dieser Kinase bei der physiologischen Angiogenese in der Retina untersucht.
- 4.) Angiopoietin-1 ist ein parakrin wirkendes Peptid, welches aus Perizyten freigesetzt wird, um die Proliferation und Migration der benachbarten Endothelzellen und darüber die Angiogenese zu verbessern. Daher haben wir letztlich untersucht, ob natriuretische Peptide die Angiopoietin-1 Expression in kultivierten Perizyten verbessern.

Insgesamt möchte diese Dissertationsarbeit zu einem besseren Verständnis der Bedeutung der Hormone ANP, BNP und CNP für die physiologische Angiogenese beitragen. Dies könnte in Zukunft auch der Darstellung neuer Angriffspunkte für die Therapie von proliferativen, speziell diabetischen Retinopathien dienen, welche eine der häufigsten Ursache für eine Erblindungen im erwachsenen Alter darstellen (Stahl et al., 2010).

## 2 Material und Methoden

---

Eine vollständige Auflistung aller verwendeten Chemikalien, Geräte und Lösungen findet sich im Anhang (siehe Kapitel I, II, III und IV).

### 2.1 Tierversuchsvotum

Die Experimente dieser Dissertation fanden im Rahmen der Tierversuchsanträge mit den Genehmigungsnummern 55.2 2532-2-135 und 55.2 2532-2-472; siehe auch (Špiranec et al., 2018) und (Špiranec Spes et al., 2020b) statt.

### 2.2 Beschreibung der Versuchstiere und der genetischen Mausmodelle

Um die Bedeutung der Hormone ANP/BNP und CNP für die physiologische Angiogenese in der Retina darzustellen, wurden bereits vorhandene genetisch veränderte Mauslinien mit Perizyten-spezifischer Deletion des GC-A bzw. GC-B Rezeptors benutzt. Die Perizyten-spezifische Deletion der für den GC-A- bzw. den GC-B-Rezeptor kodierenden Gene (*Npr1* bzw. *Npr2*) wurde mit der *Cre-LoxP*-Strategie erreicht. Dazu wurden Mäuse mit einem „floxed-Gen“ mit Tieren gekreuzt, die in Perizyten die Cre-Rekombinase exprimieren. Konkret wurden für die GC-A-Deletion GC-A<sup>flox/flox</sup> Mäuse (Sabrane et al., 2005) mit PDGFR $\beta$ -Cre<sup>ERT2</sup> Mäusen (Sheikh et al., 2015) gekreuzt. Für die GC-B-Deletion wurden GC-B<sup>flox/flox</sup> Mäuse mit der gleichen PDGFR $\beta$ -Cre<sup>ERT2</sup> Mauslinie gekreuzt (Špiranec et al., 2018). Diese Kreuzungen und die Tamoxifen-Gaben zur Induktion der Cre<sup>ERT2</sup>-Rekombinase, wurden innerhalb der Arbeitsgruppe von Frau Dr. vet. med. Katarina Špiranec Spes durchgeführt (Tierversuchsanträge mit den Genehmigungsnummern 55.2 2532-2-135 und 55.2 2532-2-472; siehe auch (Špiranec et al., 2018, Špiranec Spes et al., 2020b). Im folgenden werden die daraus resultierenden homozygoten GC-A<sup>flox/flox</sup> bzw. GC-B<sup>flox/flox</sup> Mäuse die gleichzeitig Träger des Cre-Transgens waren und Tamoxifen erhalten hatten, als „**Perizyten GC-A KO**“ bzw. „**Perizyten GC-B KO** Mäuse“ bezeichnet. Die jeweiligen Tamoxifen-behandelten Geschwistertiere ohne das Cre-transgen wurden als Kontrollgruppe (Kontrolltiere) herangezogen.

Um den, dem Rezeptor nachgeschalteten Signalweg zu charakterisieren, wurden in einer dritten Versuchsreihe Mäuse untersucht, die eine Deletion der cGMP-abhängigen Proteinkinase I (cGKI) in den Perizyten aufweisen. Hierfür wurden homozygote cGKI<sup>flox/flox</sup> Mäuse mit PDGFR $\beta$ -Cre<sup>ERT2</sup> Mäusen gekreuzt um „**Perizyten cGKI KO** Tiere“ zu generieren. Auch hier wurden Mäuse des gleichen Wurfs ohne das Cre-Transgen als Kontrollpopulation (Kontrolltiere) genutzt (Špiranec Spes et al., 2020b).

Eine hohe Effizienz dieses Vorgehens zur Deletion des GC-A- oder GC-B-Rezeptors bzw. der nachgeschalteten cGKI in Perizyten der murinen Retina wurde bereits an anderer Stelle demonstriert (Špiranec et al., 2018), (Špiranec Spes et al., 2020b). Es findet sich diese Deletion nahezu ausschließlich in Perizyten, es sind jedoch auch glatten Muskelzellen der distalen Arteriolen am Übergang zu den kapillären Netzhautgefäßen von der Deletion betroffen (Eilken et al., 2017).

Es wurden für die vorliegenden Experimente fünf Tage alte (P5), sieben Tage alte (P7) sowie acht Monate alte (adulte) Tiere untersucht und mit respektiven Kontrollgeschwistertieren verglichen. Da der Fokus dieser Dissertation auf der Angiogenese in der Entwicklung lag, wurden die meisten Analysen an postnatalen Retinae (P5 und P7) durchgeführt. Die Anzahl der Versuchstiere (N) ist in den jeweiligen Abbildungslegenden der Ergebnisse aufgeführt.

Die Experimente zum Nachweis der Perizyten-spezifischen Deletionen und alle für diese Dissertationsarbeit notwendigen Mausezüchtungen, Tamoxifen-Behandlungen und Organentnahmen (Resektionen der Schwanzspitze und der Retina am zuvor euthanasierten Tier) wurden innerhalb der Arbeitsgruppe von Frau Dr. vet. med. Katarina Špiranec Spes vollzogen. Die Untersuchungen an den entnommenen Gewebeproben im Sinne einer Genotypisierung sowie anschließenden immunhistochemischen Verfahren der Retina wurden von mir im Rahmen der vorliegenden Dissertation durchgeführt.



## **2.3 Bestimmung des Genotyps**

### **2.3.1 DNA-Extraktion aus Schwanzbiopsien**

Zur Bestimmung des Genotyps des jeweiligen Versuchstieres wurde die Spitze des Schwanzes der zu untersuchenden Maus nach deren Tod herangezogen. Zwischen 50 und 100 mg Gewebe wurden in ein 2 ml Eppendorf Reaktionsgefäß (Eppi) gegeben und 500 µl Verdaupuffer (100 mM Tris; 5 mM EDTA; 200 mM NaCl; 0,2% SDS in sterilem DNase- und RNase-freiem Wasser) sowie 5 µl Proteinase K (Stammlösung 20 mg/ml, Sigma-Aldrich GmbH) hinzugefügt. Anschließend wurde das Gewebe bei 55 °C für vier Stunden unter leichtem Schütteln im Thermomix verdaut. Nach vollständiger Auflösung des Gewebes wurden jeweils 250 µl Chloroform und 250 µl Phenol hinzugefügt und die Eppis bei 13.000-facher Erdbeschleunigung (*g*) für fünf Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Hierbei bilden sich zwei Phasen. Die obere Phase, welche die DNA enthält, wurde unter dem Abzug in neue Eppis, welche bereits 500µl Isopropanol enthielten, mit Hilfe einer Pipette überführt. Beim manuellen Schwenken wurde präzipitierte DNA sichtbar. Im Anschluss wurden die Eppis erneut bei 13.000 *g* zehn Minuten lang zentrifugiert, wobei sich am Boden der Gefäße ein DNA-Pellet bildete. Die Flüssigkeit, welche das Pellet bedeckte, wurde abgegossen und Pellets im Eppi über Nacht bei Raumluft getrocknet. Am nächsten Tag wurde die DNA in 100 µl TE-Puffer (10 mM Tris; 200 mM EDTA in DNase- und RNase-freiem Wasser) gelöst und die Reinheit sowie die DNA-Konzentration der Proben photometrisch im Spektrophotometer gemessen. Das Gerät wurde hierfür zu Beginn zweimal mittels TE-Puffer als Standard geeicht und daraufhin jeweils 2 µl der Proben für die Messung verwendet. Der angestrebte Reinheitsgrad lag zwischen 0,8 und 1,4 und der DNA-Gehalt zwischen 100 und 200 ng.

### **2.3.2 Polymerasekettenreaktion zur DNA-Amplifizierung**

Zur Amplifizierung von spezifischen DNA-Fragmenten wurde eine Polymerasekettenreaktion (PCR) im Thermozykler durchgeführt. Die Zusammensetzungen, der jeweiligen 20µl umfassenden Reaktionsansätze, sind in Tabelle 1 aufgelistet. Tabelle 2 zeigt die je nach Genotyp verwendeten Primerpaare und stellt ihre Position am Gen dar. Das zusätzlich zum Cre-Primerpaar aufgeführte Primerpärchen diente als Kontrolle. Die entsprechenden Zyklusprogramme der PCR sind in Tabelle 3 und Tabelle 4 aufgelistet.

Tabelle 1 PCR-Ansatz der jeweiligen Genotypisierung

PCR Ansatz je Probe	GC-A-KO / GC-B-KO	cGKI-KO	Cre-Gen
DNAse-und RNAse-freies Wasser	14,46 µl	14,86 µl	13,12 µl
10x Reaktionspuffer	2,0 µl	2,0 µl	2,0 µl
10 mM dNTP	0,2 µl	0,2 µl	0,2 µl
50 mM MgCl <sub>2</sub>	0,8 µl	0,4 µl	0,8 µl
Primer Sense (30 µM)	0,67 µl	0,67 µl	0,67 µl
			0,67 µl
Primer Antisense (30 µM)	0,67 µl	0,67 µl	0,67 µl
			0,67 µl
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,2 µl	0,2 µl	0,2 µl
DNA	2 µl	2 µl	2 µl

Tabelle 2 Primersequenzen der Genotypisierung

Primer GC-A-Gen	Sequenz (5'-3')	Hersteller
MK 116	atcagagaataaccagccagag	Eurofins Genomics
MK 117	gcatgtagttgtagtctacac	Eurofins Genomics
Primer GC-B-Gen	Sequenz (5'-3')	Hersteller
D1	ggacgacccatcctgtgata	Eurofins Genomics
R3	gttacaacaaaagcaagataaatacc	Eurofins Genomics
Primer cGKI-Gen	Sequenz (5'-3')	Hersteller
RF 53	cctggctgtgattcactcca	Eurofins Genomics
RF 118	aaattataactgtcaaattcttg	Eurofins Genomics
Primer Cre-Gen	Sequenz (5'-3')	Hersteller
Cre 800	gctgccacgaccaagtacagcaatg	Eurofins Genomics
Cre 1200	gtagttattcggatcatcagctacac	Eurofins Genomics
TRPA_D	gaccaccaggaagtcccttttatg	Eurofins Genomics
TRPA_R	aataagctgccc aaaggtcaggac	Eurofins Genomics

Tabelle 3 PCR-Programme GC-A und GC-B

PCR-Phase	GC-A		GC-B	
	Temperatur (°C); Zeit (min/sec); Zyklen (x-mal)			
Initiale Denaturierung	94°C; 3min; 1-mal		94°C; 2min; 1-mal	
Denaturierung	94°C; 15sec	39-mal	94°C; 30sec	34-mal
Annealing	56°C; 15sec		58°C; 30sec	
Elongation	72°C; 45sec		72°C; 1min	
Finale Elongation	72°C; 7min; 1-mal		72°C; 3min; 1-mal	

Tabelle 4 PCR-Programme cGKI und Cre

Phase	cGKI		Cre	
	Temperatur (°C); Zeit (min/sec); Zyklen (x-mal)			
Initiale Denaturierung	94°C; 2min; 1-mal		94°C; 2min; 1-mal	
Denaturierung	94°C; 30sec	40-mal	94°C; 30sec	34-mal
Annealing	53°C; 30sec		63°C; 30sec	
Elongation	72°C; 1min		72°C; 1min	
Finale Elongation	72°C; 3min; 1-mal		72°C; 3min; 1-mal	

### 2.3.3 DNA-Gelelektrophorese

Um die in der PCR amplifizierten DNA-Fragmente mittels Gelelektrophorese sichtbar zu machen, wurde ein zweiprozentiges Agarosegel hergestellt. Dafür wurden 1,5 g Agarose mit 75 ml Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer 4,84 g (0,04 M) Tris; 1,142 ml Essigsäure (>99,9%); 2,92 g (0,01 M) EDTA bei pH 8,0 mit DNase- und RNase-freiem Wasser auf einen Liter auffüllen) gelöst. Die so entstandene Lösung wurde in der Mikrowelle bis zum vollständigen Auflösen des Agarosepulvers erhitzt. Anschließend wurden 5 µl des Farbstoffes Nancy-520 (Sigma-Aldrich GmbH) der Flüssigkeit hinzugefügt und diese nach kurzem Abkühlen auf circa 50 °C in einen dafür vorbereiteten Gelträger gegossen und Kämme als Platzhalter für die Geltaschen eingefügt. Nach einer Ruhezeit von 30 Minuten zur Erstarrung des Gels wurden die Kämme entfernt und das Gel in der entsprechenden Elektrophoresekammer mit TAE-Puffer vollständig bedeckt. Den DNA-Proben wurden je 3 µl DNA Loading Dye (Thermo Fischer Scientific) hinzugefügt und die Flüssigkeiten gut miteinander vermischt. Im Anschluss folgte die Füllung der einzelnen Kammern des Gels mit je 10 µl einer Probe. In die erste Kammer

eines jeden Gels wurden 3,5 µl eines „GeneRulers“ (100-1000 bp; Sigma-Aldrich GmbH) zur späteren Größenbestimmung der DNA-Fragmente eingefüllt. Des Weiteren wurden immer eine sicher positive sowie eine sicher negative Kontrollprobe einer Maus-DNA mit bekanntem Genotyp, in je eine Kammer für die spätere Auswertung pipettiert. Nach Einfüllen aller Proben wurde eine Spannung von 80 Volt bei 300 Milliampere und 300 Watt für 55 Minuten angelegt, um die DNA-Fragmente ihrer Größe nach in Richtung Anode aufzutrennen. Abschließend wurden die Banden im Gel Logic 100 Imaging System (Kodak) mittels UV-Strahlung sichtbar gemacht. Versuchstiere deren DNA sowohl das Amplikon für das Cre-Transgen, als auch das Amplikon für die entsprechende GC-A (*Npr1*)-, GC-B (*Npr2*)- oder cGKI (*Prkg1*) -Gendeletion lieferten wurden der entsprechenden Versuchsgruppe zugeordnet. Tiere ohne das Cre-Transgen wurden als Kontrolltiere untersucht. Die Genotypisierung wurden dabei immer erst nach der morphometrischen Auswertung der immunhistochemisch gefärbten Retinae durchgeführt, um eine verblindete beziehungsweise objektive Auswertung zu gewährleisten.

## **2.4 Präparation und Immunfluoreszenzfärbung der Retinae**

### **2.4.1 Präparation der Netzhäute**

Nach der Euthanasie, der Bestimmung des Gewichts und der Entfernung der Schwanzspitze eines jeden Versuchstiers, wurden die Augen beidseits entnommen und in Eppis überführt. Diese wurden für 15 Minuten bei Raumtemperatur in vierprozentigem Paraformaldehyd (PFA) zur leichteren Entfernung der Hyaloidgefäße fixiert. Anschließend wurden die Augen in Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS: 8,09 g NaCl; 0,2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 1,44 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,2 g KCl in einem Liter DNase- und RNase-freies Wasser; pH 7,4) gewaschen, die Netzhäute von der restlichen Augenstruktur getrennt und diese für weitere zwei Stunden bei 4 °C in vierprozentigem PFA fixiert.

### **2.4.2 Immunfluoreszenzfärbung**

Die isolierten Retinae wurden anschließend dreimal in Folge für je zehn Minuten mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Färbung der Endothelzellen mittels Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-gekoppeltem Isolektin B4 (Lektin von *Bandeiraea simplicifolia*; 0,04 mg/ml; Sigma-Aldrich GmbH) in Pblec-Lösung (1 mM MgCl<sub>2</sub>;

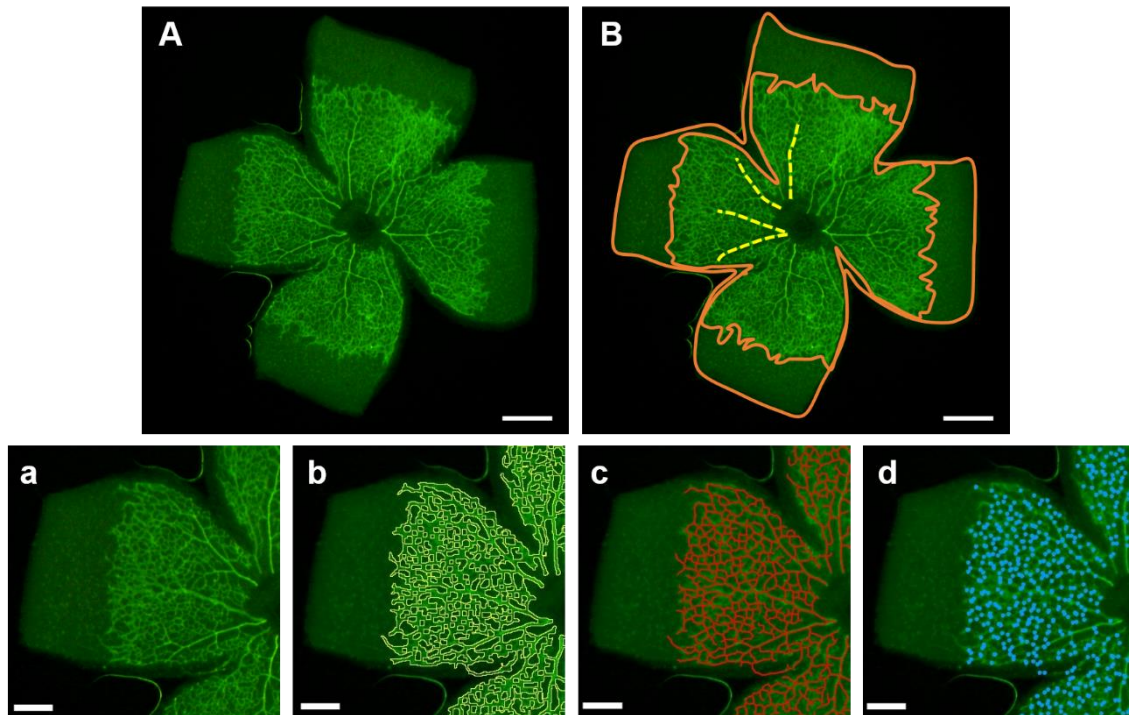
1 mM CaCl<sub>2</sub>; 0,1 mM MnCl<sub>2</sub>; 1 % Triton X-100 in PBS) über Nacht unter Lichtausschluss bei 4 °C. Am darauffolgenden Tag wurden die Netzhäute in PBS drei Mal für je zehn Minuten gewaschen und danach in 100 µl „Blocking“-Puffer (1 % BSA; 0,3 % Triton X-100 in PBS) für eine Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln belassen. Anschließend wurde der Blocking-Puffer erneuert und zum Färben der Perizyten ein Anti-NG2 (NG2: Chondroitin Sulfat Proteoglykan) Antikörper (AB5320; Merck Chemicals GmbH; Verdünnung der Stammlösung, 1:200) hinzugegeben. Die Netzhäute wurden darin über Nacht bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Netzhäute mit PBS für je zehn Minuten wurde ein Cy3-markierter sekundärer Antikörper (Cy3-AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG; 111-165-003; Jackson ImmunoResearch Europe Ltd.) in „Blocking“-Puffer; Verdünnung der Stammlösung, 1:200) für zwei Stunden bei Raumtemperatur hinzugefügt. Nach viermaligem Waschen mittels PBS für jeweils zehn Minuten erfolgte die Überführung auf einen Objektträger. Hierfür wurden die Netzhäute an der Seite eingeschnitten, wodurch sie in vier in der Mitte zusammenhängende Quadranten geteilt wurden, um ein flaches Aufliegen der Retina zu gewährleisten. Die Proben wurden mittels Mowiol-Lösung (Dianova GmbH) und Deckglas fixiert und über Nacht im Dunkeln bei 4 °C getrocknet.

### **2.4.3 *Morphometrische Auswertung der Mikroskopiebilder***

Die Betrachtung der immunhistochemisch gefärbten Präparate erfolgte am Fluoreszenzmikroskop (Keyence BZ-8100, Keyence Corporation). Um die Gefäßentwicklung in der Netzhaut zu untersuchen, wurde zuerst in 2-facher Vergrößerung ein Bild der gesamten Netzhaut aufgenommen. Zur Detektion, der mittels FITC-Isolectin gefärbten Gefäße wurde ein Dichroitischer FITC Filter mit einem Emissionsband zwischen 513 und 556 nm und einem Anregungsbereich zwischen 467 und 498 nm genutzt, so dass sich die Netzhaut mit ihren Gefäßen (grün) darstellt. Zur Aufnahme der Bilder diente das Programm „BZ-8100 Observation Application“ (Keyence Corporation).

Um die Gesamtfläche der Netzhaut sowie die Fläche des bereits vaskularisierten Bereichs zu vermessen wurde das mit dem Mikroskop verknüpfte Programm „BZ-II Analyser“ (Version 1.42, Keyence Corporation) verwendet und händisch die entsprechenden Flächen markiert (siehe Abb. 6). Die entsprechenden Areale wurden anschließen zueinander ins Verhältnis gesetzt, um den prozentualen Anteil der vaskularisierten Fläche an der Gesamtfläche zu ermitteln. Mit diesem Programm wurde auch die Arteriolenlänge durch händisches Markieren der vom Zentrum der Retina

aussproießenden großen Gefäße erfasst. Um im Anschluss genauere Parameter des Gefäßnetzes zu erfassen wurde des Programm AngioTool (Version 0.6a) verwendet. Mit Hilfe dieses, just diesen Zweck entwickelten Programms wurden die Gesamtlänge der Gefäße, die Anzahl der Gefäßverzweigungen und die Anzahl der Endpunkte des Gefäßnetzes ermittelt (Zudaire et al., 2011).



**Abb. 6 Auswertung der Vaskularisation**

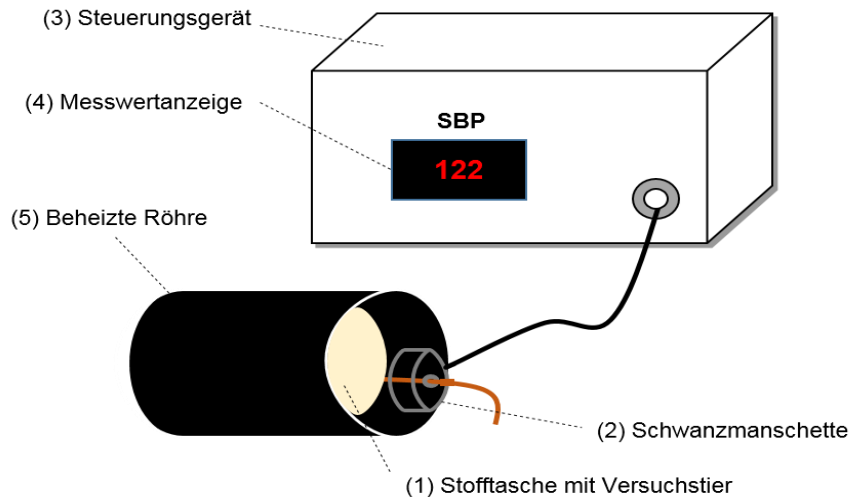
*Zu sehen ist die Retina einer fünf Tage alten Maus (A). In (B) ist beispielhaft die Umrandung der gesamten Netzhaut sowie der vaskularisierten Fläche (beides orange) sowie die Markierung einiger Arteriolen (gestrichelt gelb) gezeigt. Die Bilder (a-d) zeigen einen Ausschnitt dieser Isolektin-gefärbten Retina (a) und nach der Kennzeichnung für die Auswertung der unterschiedlichen Parameter durch das Programm AngioTool: Die Umrandung (gelb in b), der Verlauf (rot in c) und die Verzweigungspunkte (blau in d) der Gefäße werden sichtbar.  
[Scalebar: 500µm]*

Da bei adulten Tieren die Retina voll ausgereift und wesentlich vielschichtiger und dichter ist, war diese Art der Auswertung der gesamten Retina bei diesen Tieren nicht möglich. Die Dreischichtigkeit des Gefäßplexus und die hohen Dichte der Gefäße machte eine Auswertung der vollständigen Retina unmöglich. Daher wurden hier vier repräsentative Ausschnitte, die jeweils einen der vier Quadranten der Netzhaut umfassten, zur Auswertung herangezogen und die Gesamtlänge der abgebildeten Gefäße sowie die Anzahl der Verzweigungspunkte je Fläche mit Hilfe der AngioTool-Software ermittelt. Um die Perizytenbedeckung des mit Isolektin gefärbten Gefäßendothels zu messen, wurden mittels Fluoreszenzmikroskopie (Keyence BZ-8100) je Retina sechs Bilder an

unterschiedlichen Stellen des Gefäßplexus in 40-facher Vergrößerung aufgenommen. Hierbei wurde immer ein Bild der Isolektin-Färbung (grün, Dichroitischer FITC Filter mit Emissionsband zwischen 513 – 556 nm und Anregungsbereich von 467 – 498 nm) und ein Bild der mittels Cy3-markierten NG2 (rot, Dichroitischer TRITC Filter mit Emissionsband zwischen 570 – 613 nm und Anregungsbereich von 532 – 554 nm). Die optische Intensität der Färbungen wurde als Anzahl der gefärbten Pixel über einem Schwarz-Weiß-Schwellenwert quantifiziert. Als Software wurde hierfür ImageJ (Version 1.50i, Rasband Wayne) genutzt. Je Retina wurden somit sechs Felder ausgewertet und die jeweilige Pixelanzahl der Isolektin Färbung, welche den Endothelzellen entsprach mit der Pixelanzahl der NG2 Färbung, also der Färbung der Perizyten ins Verhältnis gesetzt um eine relative Aussage über die Perizytenbedeckung des Gefäßendothels treffen beziehungsweise diese Werte zwischen Knockout- und Kontrollgeschwistertieren vergleichen zu können.

## **2.5 Nichtinvasive plethysmographische Messung des arteriellen Blutdrucks**

Diese Untersuchungen wurden mit Hilfe bzw. unter Aufsicht von Frau Dr. vet. med. Katarina Špiranec Spes durchgeführt (Genehmigungsnummer 55.2 2532-2-472). Zur nicht-invasiven Messung des arteriellen Blutdrucks wurde ein Gerät der Firma Softron™ genutzt. Hierbei wurde die Maus in einen kleinen Käfig mit ummantelnder Stofftasche geschoben, der ihr wenig Bewegungsspielraum lies. Um einem Auskühlen des Tieres vorzubeugen wurde der Käfig anschließend in einer auf 33 °C temperierten Wärmeröhre platziert. Daraufhin wurde ein Ring, welcher eine aufblasbare Manschette enthält über den Schwanz des Tieres gestreift. Mittels Manschetten-Inflation und -Deflation wurde anschließend der systolische arterielle Blutdruck gemessen. Das Auslesen der Daten erfolgte mittels der mitgelieferten Schnittstelle und Software, welche die Messergebnisse auf einen PC übertrug.



**Abb. 7 Versuchsaufbau der plethysmographischen Blutdruckmessung:**

*Die Maus, deren Blutdruck gemessen wird, befindet sich in einer Stofftasche (1), welche in eine temperierte (33 °C) Röhre (5) geschoben wird. Die Blutdruckmessmanschette (2) wird über den Schwanz der Maus geschoben. Diese ist mit der Steuereinheit (3) verbunden, welche die Ergebnisse der Blutdruckmessungen anzeigt (4) und die Daten an einen angeschlossenen Computer überträgt.*

Diese Messungen wurden an drei Monate alten perizytenspezifischen GC-A KO und GC-B KO Mäusen beider Geschlechter sowie ihren jeweiligen GC-A<sup>flox/flox</sup> und GC-B<sup>flox/flox</sup> Kontrollgeschwistern durchgeführt. Die Versuchstiere wurden an drei zusammenhängenden Tagen morgens um die gleiche Uhrzeit acht aufeinander folgenden Messungen unterzogen (Dauer < 15 Minuten), um die Tiere an das Prozedere zu gewöhnen und somit die Stressreaktion zu minimieren. An darauffolgenden weiteren zwei Tagen wurden die erhobenen Blutdruckwerte zur Auswertung herangezogen. Abschließend erfolgte eine Auftrennung der gewonnenen Ergebnisse nach Genotyp und Geschlecht.

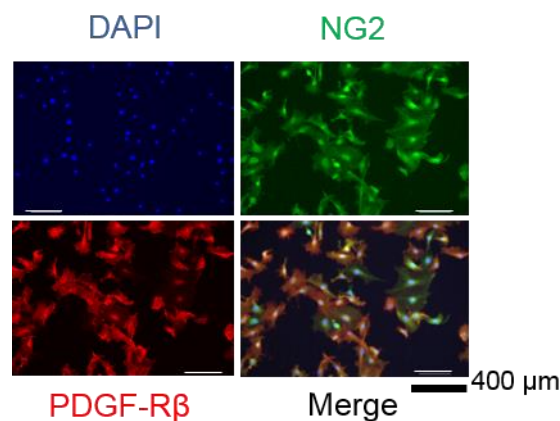
## 2.6 In-vitro Versuche an kultivierten Perizyten

### 2.6.1 Perizyten in Zellkultur

Weitere Experimente dieser Arbeit wurden an kultivierten Perizyten durchgeführt. Die Perizyten für diese Zellkulturen wurden dabei zusammen mit Frau Dr. vet. med. Katarina Špiranec Spes aus der Großhirnrinde von drei bis vier Monate alten Knockout- und Kontrollmäusen isoliert. Um Perizyten zu kultivieren, wurden die Tiere unter tiefer Ketamin-Xylazin-Narkose euthanasiert. Der Kortex des Gehirns wurde disseziert und in



einer enzymatischen Lösung bestehend aus 30 U/mL Papain und 40 µg/mL DNase I in Earle's Balanced Salt Solution (Papain Dissociation System; LK 003150, Worthington Biochemical Corporation) für 70 Minuten bei 37 °C inkubiert. Bovines Serumalbumin (22 % BSA w/v) wurde anschließend hinzugefügt, um die Enzymreaktion zu beenden. Die gewonnenen Zellen wurden durch Zentrifugation (300 g, fünf Minuten bei Raumtemperatur) pelletiert, in einem Medium für endotheliales Zellwachstum (EGM™; CC-3202; Lonza Group AG) suspendiert und auf Kollagen I-beschichtete Kulturschalen ausplattiert. Für die ersten beiden Zellpassagen verblieben die Zellen in EGM™, nach der dritten Passage wurden sie in einem Perizytenmedium (SC-1231; Provitro AG), welches zwei Prozent fetales Rinderserum enthält gehalten (Tigges et al., 2012). Eine immunhistochemische Färbung mit Antikörpern gegen die Perizyten-Markerproteine NG2 (Merk KGaA) und PDGF-Rezeptor B (platelet-derived growth factor receptor B; Bio-Tech Corporation) zeigte, dass nach der vierten Passage circa 95 % der kultivierten Zellen Perizyten waren (siehe Abb. 8) (Špiranec et al., 2018).



**Abb. 8** Kultivierte murine Hirn-Perizyten

*Färbung mit DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) zur Darstellung der Zellkerne, sowie mit Antikörpern gegen die Markerproteine NG2 und PDGFRβ zeigten, dass nach der vierten Passage circa 95 % aller kultivierten Zellen Perizyten waren. [Abbildung entnommen aus (Špiranec et al., 2018)]*

### 2.6.2 Zellstimulation mittels natriuretischer Peptide

Die kultivierten murinen Hirn-Perizyten von Kontrolltieren versus Knockoutgeschwistertieren wurden in mehreren Versuchsreihen mit unterschiedlichen Konzentrationen der synthetisch hergestellten Peptide ANP (ChinaPeptides Co. Ltd.), BNP (Bachem AG) und CNP (Bachem AG) inkubiert. Hierfür wurde das Perizytenmedium entfernt und Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; F0445; Merk

KGaA) auf die Zellen gegeben. Sie wurden anschließend für fünf Stunden darin belassen. Hierauf wurden jeweils 1 nM oder 10 nM des jeweiligen natriuretischen Peptids oder PBS (als Kontrollbedingung) in DMEM auf die Zellen gegeben. Nach Ablauf von zwei Stunden wurden die Zellen lysiert und die Angiotensin-1 Proteinexpression im Zelllysate mittels Westernblot untersucht (siehe Kapitel 2.6.3).

Die kultivierten Perizyten wurden im Anschluss an die zweistündige Inkubation mittels eines Zellfraktionierungskits für Zellkulturen (Thermo Fisher Scientific; Katalognummer 78840) lysiert, die Proteinlysate in flüssigem Stickstoff schockgefroren, aliquotiert und bei -80°C bis zur Durchführung des Westernblots gelagert. Die Proteinkonzentration des jeweiligen Lysats wurde mittels eines BCA-Tests bestimmt. Hierfür wurde der entstandene Farbstoff mittels Photometrie im Victor<sup>2</sup>™ 1420 Multilabel Counter (Perkin Elmer life sciences) bei einer Wellenlänge von 562 nm quantifiziert.

### **2.6.3 Westernblot-Analysen der Angiotensin-1 Expression**

Die Auftrennung der Proteine vor der Durchführung des Westernblots (WB) erfolgte mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE). Hierfür wurde ein zwölfprozentiges SDS-Gel (29,2 % Acrylamid; 0,8 % N,N'-Methylenbisacrylamid; 1,5 M Tris mit pH 8,8; 10 % SDS; 10 % Ammoniumperoxodisulfat; 0,04 % N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin in DNase- und RNase-freiem Wasser) gewählt. Damit ist eine Auftrennung von Proteinen mit Molekulargewichten (MG) zwischen 20 und 100 kDa möglich. Das MG von Angiotensin-1 (Ang1) liegt zwischen 50 und 70 kDa. Es wurden je 40 µg Protein pro Probe im Gel aufgetragen. Die Proteine wurden zuvor in Lämmli-Puffer (200 mM Tris-HCl (pH 6,8); 6 % SDS; 15 % Glycerin; 10 % β-Mercaptoethanol; 0,01 % Bromphenolblau in DNase- und RNase-freiem Wasser) denaturiert. Die Proben wurden für zehn Minuten auf 72 °C erwärmt und dann zentrifugiert (1000 g, fünf Minuten, 4 °C). Die Gelkammer wurde mit Laufpuffer (3,43 g Tris (25 mM); 14,0 g Glycin (192 mM); 1,0 g SDS (0,1 %) in 1 L DNase- und RNase-freiem Wasser) befüllt. Nach dem Auftragen in das SDS-Gel wurden die Proteine für 15 Minuten bei 80 Volt und danach für 60 Minuten bei 120 Volt aufgetrennt (Temperatur 4 °C). Für den anschließenden Transfer („Blot“) der separierten Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran wurden die Semi-Dry Transferkammer „Biometra Fastblot“ (Analytik Jena AG) und ein Transferpuffer (3,8 g Tris (25 mM); 18,0 g Glycin (192 mM); 200 ml Methanol (20 %) in 1 L DNase- und RNase-freiem Wasser) verwendet. Der Transfer erfolgte mit 256mA über 90 Minuten bei 4 °C. Danach wurde die Membran für

zehn Minuten in TBS-T (0,1 % Tween-20 in 100 ml 10x-TBS in 1 L DNase- und RNase-freiem Wasser; 10x-TBS: 61 g Tris (0,5 M); 90 g NaCl (1,55 M) in 1 L DNase- und RNase-freiem Wasser; pH 7,6) bei Raumtemperatur gewaschen und die Proteine auf der Membran mittels eines Fixierpuffers (5 % BSA in TBS-T) für eine Stunde fixiert. Im Anschluss wurde die Membran mit dem Antikörper Anti-Angiopoietin-1 (ab8451, Abcam) in Fixierpuffer über Nacht bei 4 °C inkubiert (die Stammlösung wurde im Verhältnis 1:500 verdünnt). Am darauffolgenden Tag wurde die Membran dreimal in Folge zehn Minuten lang bei Raumtemperatur in TBS-T gewaschen, im Anschluss in Fixierpuffer gegeben und der sekundäre Antikörper Anti-Rabbit-IgG (111-035-144; Jackson ImmunoResearch Europe Ltd.) hinzugefügt (die Stammlösung wurde im Verhältnis 1:10.000 verdünnt). Die Membran wurde für zwei Stunden in dieser Lösung bei Raumtemperatur belassen und danach dreimal für zehn Minuten in TBS-T gewaschen.

Schlussendlich erfolgte die Entwicklung im FluorChem SP Chemilumineszenz Detektionssystem (Alpha InnoTech) mittels des Pierce™ ECL Western Blotting-Substrats (Thermo Fisher Scientific) und die Quantifizierung mittels Densitometrie.

Danach wurde die Membran mit einem weiteren Antikörper gegen GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase), als Referenzprotein zur Ladungskontrolle gefärbt. Hierfür wurde die Membran viermal für jeweils fünf Minuten in TBS-T gewaschen und dann für 15 Minuten in „Stripping“-Puffer (62,5 mM Tris; 2 % SDS; 0,7 %  $\beta$ -Mercaptoethanol; pH 6,7) im Wasserbad auf 50 °C erwärmt. Dadurch wurden die Antikörper des ersten Inkubationsschritts entfernt. Anschließend erfolgte ein sechsmaliges Waschen in TBS-T für jeweils zehn Minuten sowie eine Fixierung für eine Stunde in Fixierpuffer. Nachfolgend wurde die Färbung auf die gleiche Art und Weise wie im ersten Durchgang durchgeführt. Als primärer Antikörper diente diesmal allerdings der Anti-GAPDH-Antikörper (#2118; Cell Signaling Technology, die Stammlösung wurde im Verhältnis 1:10.000 verdünnt). Abschließend wurde der gebundene zweite Antikörper erneut mit dem ECL-System sichtbar gemacht.

In der Auswertung wurden die semiquantitativ gemessene Proteinmengen des Angiopoietin-1 mit der jeweiligen Menge an GAPDH einer Probe ins Verhältnis gesetzt, um eine Verzerrung aufgrund einer unterschiedlichen Gesamtproteinmenge in den Proben zu vermeiden. Die mittels GAPDH „normierten“ Angiopoietin-1-Mengen je Probe wurden dann miteinander verglichen. Als Basalmenge wurde hierbei die normierte Angiopoietin-1-Menge der Zellen herangezogen, die PBS anstelle synthetischer Peptide erhalten hatten.

## **2.7 Berechnungen und Statistik**

Die Ergebnisse dieser Dissertation wurden mit Hilfe des Programms „Excel“ (Version 2013 der Microsoft Corporation) durch die Autorin der Dissertation ausgewertet. Alle dargestellten Werte entsprechen den Mittelwerten unter Angabe des Standardfehlers des Mittelwerts (SEM).

Bei Vergleichen zwischen zwei Gruppen wurde die Varianz innerhalb dieser Stichproben bestimmt und die Fehlerwahrscheinlichkeit mittels t-Tests bei bekannter Varianz ermittelt. Bei einem Fehlerwahrscheinlichkeitswert kleiner 5% ( $p < 0.05$ ) wurden Unterschiede zwischen den Vergleichsgruppen als statistisch gesichert (also „signifikant“) bewertet.

## **2.8 Verwendete Programme**

Das Bildmaterial wurde durch die mit dem Mikroskop gelieferte Software „BZ-8100 Observation Application“ der Keyence Corporation aufgenommen und gespeichert. Die weitere Verarbeitung und Auswertung des Bildmaterials wurden mit der Software „BZ-II Analyser“ (Version 1.42, Keyence Corporation), dem Programm ImageJ (Version 1.50i, Wayne Rasband), sowie der Software AngioTool (Version 0.6a, (Zudaire et al., 2011)) wie in Kapitel 2.4.3 beschrieben durchgeführt.

Für die Darstellung der Diagramme wurde das Programm „Excel“ (Version 2013, Microsoft Corporation) genutzt und zum Erstellen der Schaubilder die Software „PowerPoint“ (Version 2013, Microsoft Corporation). Die vorliegende Dissertation wurde mit Hilfe des Textprogramms „Word“ (Version 2013, Microsoft Corporation) erstellt. Die Literaturangaben wurden in „EndNote“ (Version X8.2, Alfasoft GmbH) verwaltet und über dieses Programm in den Fließtext integriert. Auch das Literaturverzeichnis wurde mit Hilfe von „EndNote“ erstellt.

### 3 Ergebnisse

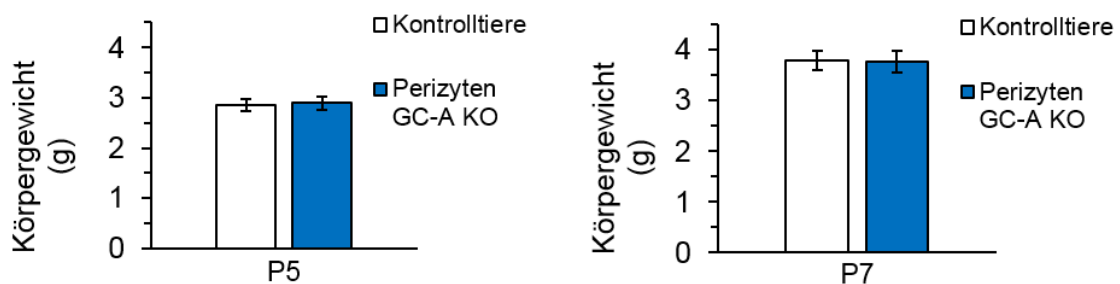
---

#### 3.1 Versuche an Mäusen mit perizytenpezifischer GC-A Deletion, dem gemeinsamen Rezeptor von ANP und BNP

Wie bereits in Kapitel 2.4 beschrieben, wurden in jeder Versuchsreihe eine Vielzahl an Parametern der postnatalen retinalen Angiogenese erhoben und zwischen Gen-Knockout Mäusen und Kontrollgeschwistertieren verglichen. Diese Ergebnisse werden nun, beginnend mit der Versuchsreihe an den PDGFR $\beta$ -Cre<sup>ERT2</sup> x GC-A<sup>fl<sup>ox</sup>/fl<sup>ox</sup></sup> Mäusen, welche eine spezifische Deletion (KO) des GC-A-Rezeptors in Perizyten aufweisen (siehe Kapitel 2.2), dargestellt.

##### 3.1.1 Körpergewicht

Im Rahmen der Netzhautpräparation wurde auch das Körpergewicht jedes Tieres bestimmt. Hierbei zeigt sich zu beiden Untersuchungszeitpunkten, sprich in fünf Tage alten (P5) sowie in sieben Tage alten Tieren (P7) kein signifikanter Unterschied des Körpergewichts zwischen Perizyten GC-A KO Mäusen und Kontrollgeschwistertieren. Ein Vergleich des Körpergewichts zwischen den Untersuchungszeitpunkten zeigt einen adäquaten Anstieg des Gewichts vom fünften auf den siebten Lebensstag in beiden Genotypen (siehe Abb. 9).



**Abb. 9 Körpergewicht von neonatalen Perizyten GC-A KO Mäusen und Kontrolltieren**

*Das Körpergewicht steigt von Tag fünf zu Tag sieben nach der Geburt an, ohne Unterschiede zwischen den beiden Genotypen (Perizyten GC-A KO Tiere: N(P5) = 10, N(P7) = 9; Kontrollmäuse: N(P5) = 13, N(P7) = 9)*

### **3.1.2 Vaskularisierung der Retina in Jungtieren**

Wie bereits einleitend ausführlich beschrieben, haben Mäuse im Gegensatz zum Menschen bei Geburt keine vollständig vaskularisierte Netzhaut, sondern persistierende Hyaloidgefäße. Postnatal verläuft die Gefäßeinsprossung in die Retina vom Zentrum, welches der Eintrittsstelle des Nervus opticus entspricht, in die Peripherie. Dieser Vorgang ist dabei streng zeitlich reguliert. Zwischen verschiedenen Mausstämmen finden sich aber Unterschiede im exakten zeitlichen Ablauf (Stahl et al., 2010). Aus diesem Grund wurden im Rahmen dieser Arbeit als Kontrollpopulation immer Wurfgeschwister der entsprechenden Knockout Populationen herangezogen.

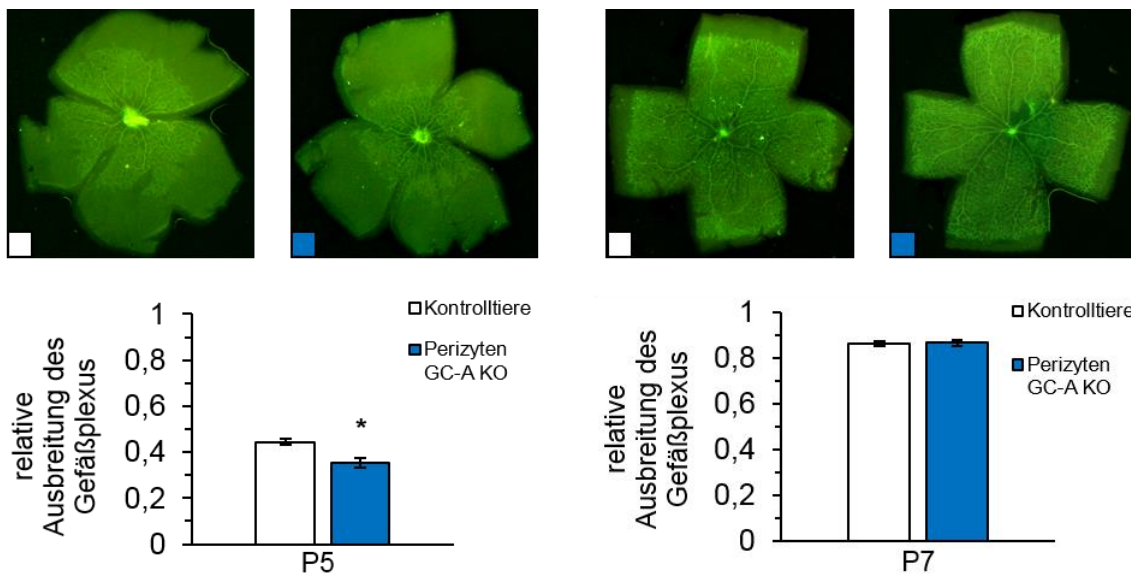
In Anlehnung an zahlreiche Publikationen zur physiologischen Angiogenese in der murinen Retina habe ich die Ausdehnung der retinalen Vaskularisierung am fünften (P5) und siebten (P7) Lebenstag der Tiere untersucht. An P5 zeigten die Perizyten GC-A KO Mäuse eine signifikant verminderte Ausdehnung des Gefäßplexus über die Gesamtfläche der Retina im Vergleich zu den Kontrolltieren (siehe Abb. 10). An P7, also zu einem Zeitpunkt, an dem die Vaskularisierung mit der ersten Gefäßschicht beinahe abgeschlossen ist, war die Ausdehnung der Gefäßplexi in beiden Genotypen ähnlich (siehe Abb. 10).

Eine genauere Charakterisierung des Gefäßplexus wurde mit dem Programm AngioTool vorgenommen. Damit wurde in jedem Versuchstier die Gesamtlänge der retinalen Gefäße (siehe Abb. 11), die Anzahl an Gefäßverzweigungen (siehe Abb. 12) und die Anzahl an Gefäßendpunkten (siehe Abb. 13) evaluiert. Des Weiteren wurde die Länge der Arteriolen gemessen (siehe Abb. 14), da die Deletion des floxed GC-A-Rezeptors mittels des PDGFR $\beta$ -Cre<sup>ERT2</sup>-Transgens neben Perizyten auch glatte Muskelzellen distaler Arteriolen am Übergang zu den Netzhautkapillaren betrifft (siehe Kapitel 2.2) (Eilken et al., 2017).

Insgesamt war die Gesamtlänge der retinalen Gefäße in den Knockout-Versuchstieren sowohl an P5 als auch an P7 signifikant vermindert (Abb. 11). An P5 war zudem die Länge der Arteriolen in den Knockout Tieren reduziert. Diese Veränderung war jedoch zum Untersuchungszeitpunkt P7 aufgehoben (Abb. 14). Des Weiteren wiesen die Knockouttiere sowohl an P5 als auch an P7 eine signifikant verminderte Anzahl an Verzweigungspunkten der Gefäße auf. Die Gefäßendpunkte waren in den KO Tieren an P5 leicht und an P7 signifikant reduziert (Abb. 12 und Abb. 13).

Ein Vergleich zwischen den beiden Untersuchungszeitpunkten zeigte erwartungsgemäß eine Zunahme der Gefäßgesamtlänge, der Arteriolenlänge sowie der Verzweigungspunkte von P5 auf P7, sowohl in den Knockout-Mäusen, als auch in den Kontrollgeschwistertieren. Die Anzahl der Gefäßendpunkte war in beiden Genotypen an P7 kleiner als an P5.

Es zeigt sich somit, dass alle Aspekte der Angiogenese, abgesehen von der Anzahl der Gefäßendpunkte, vom fünften bis zum siebten Tag nach der Geburt zunehmen, was der natürlichen Entwicklung entspricht. Die Deletion des GC-A-Rezeptors in Perizyten verursacht ein verlangsamtes Einwachsen der Gefäße in die Netzhaut am fünften Lebensstag. Dies scheinen die Tiere bis zum siebten Lebensstag teilweise zu kompensieren. Die genauere Betrachtung des Gefäßplexus zeigt jedoch zu beiden Zeitpunkten eine deutlich geringere Dichte des Gefäßnetzes in den Retinae der Perizyten GC-A KO Tiere.

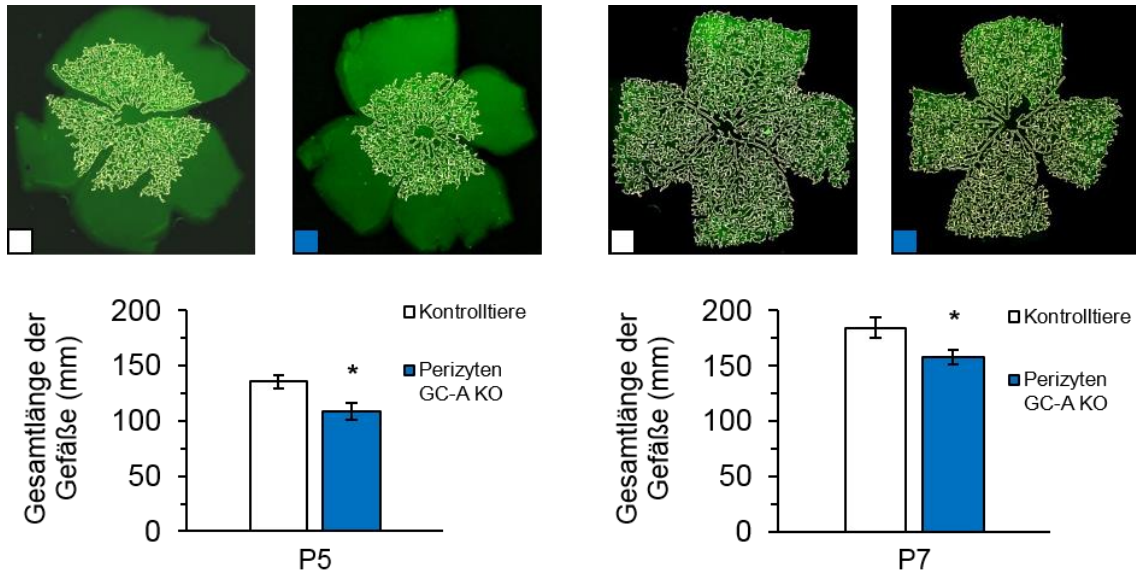


**Abb. 10 Ausdehnung des retinalen Gefäßplexus**

Zum Zeitpunkt P5 zeigten die Perizyten GC-A Knockout-Mäuse eine signifikant verminderte Ausdehnung des Gefäßplexus über die Gesamtfläche der Netzhaut im Vergleich zu ihren Kontrollgeschwistertieren. An Tag 7 lässt sich keine signifikante Veränderung in der Ausdehnung der vaskularisierten Fläche feststellen.

(Perizyten GC-A KO Tiere: N(P5) = 10, N(P7) = 14; Kontrollmäuse: N(P5) = 12, N(P7) = 18; \*p < 0,05 versus Kontrollen)

[grün: Isolectin-Färbung des Endothels]

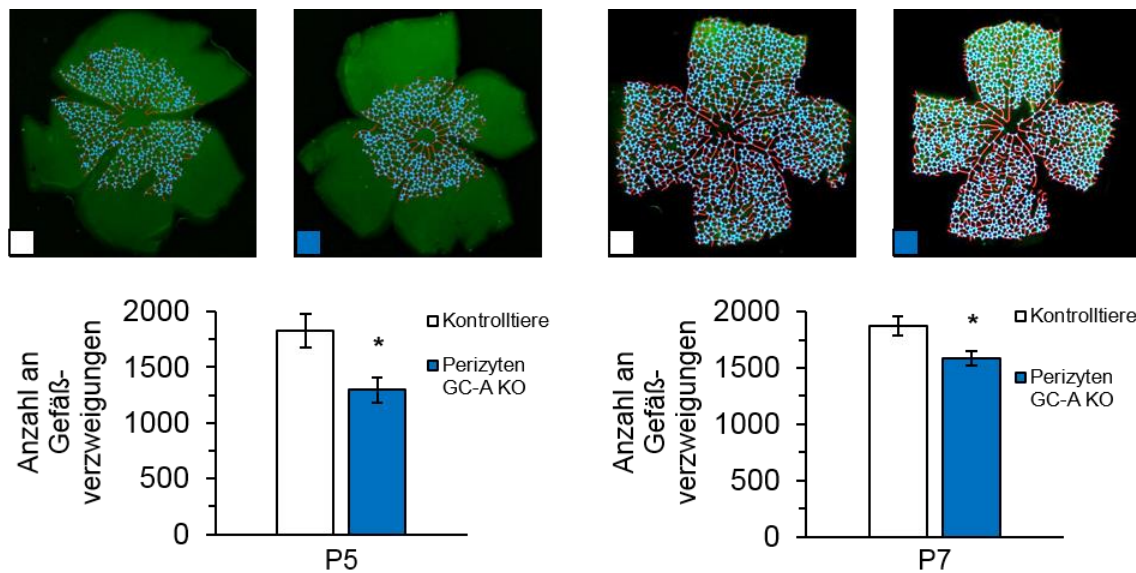


**Abb. 11 Charakteristik des Gefäßnetzes: Gefäßgesamtlänge**

Die fünf Tage alten GC-A KO Mäuse hatten eine signifikant verringerte Gesamtlänge der retinalen Gefäße im Vergleich zu der Kontrollpopulation. Diese Abnahme war auch in sieben Tage alten Knockout-Tieren signifikant. Die Gefäßlängen nahmen von P5 auf P7 in beiden Gruppen zu.

(Perizyten GC-A KO Tiere: N(P5) = 8, N(P7) = 6; Kontrollmäuse: N(P5) = 11, N(P7) = 8; \*p < 0,05 versus Kontrollen)

[grün: Isolectin-Färbung des Endothels; weiß: Umrandung der Gefäße]



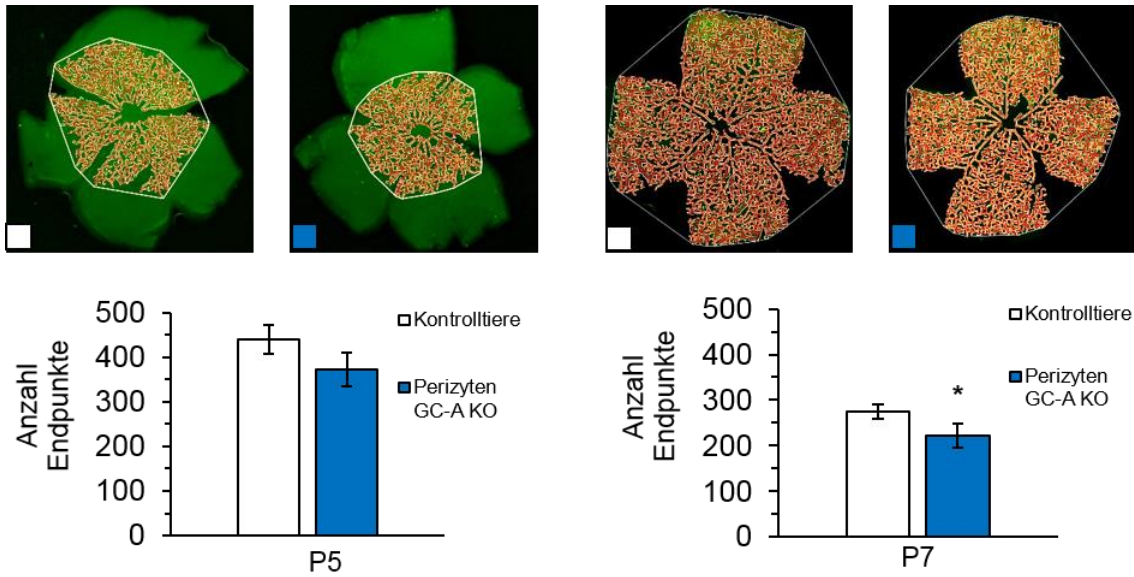
**Abb. 12 Charakteristik des Gefäßnetzes: Gefäßverzweigungen**

Die Anzahl der Gefäßverzweigungspunkte war an P5 und P7 in den GC-A Knockout-Mäusen vermindert. Von P5 auf P7 nahm die Anzahl der Gefäßverzweigungspunkte zu, wobei die Knockout-Mäuse einen stärkeren Zuwachs zeigten.

(Perizyten GC-A KO Tiere: N(P5) = 8, N(P7) = 6; Kontrollmäuse: N(P5) = 11, N(P7) = 8; \*p < 0,05 versus Kontrollen)

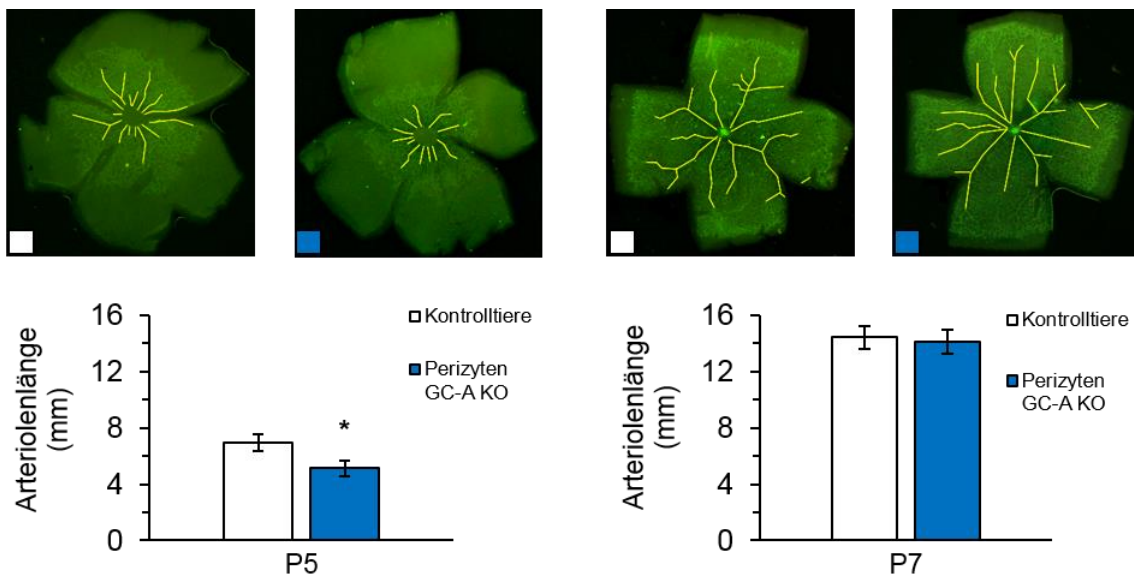
[grün: Isolectin-Färbung des Endothels; blau: Verzweigungspunkte; rot: Verbindungslinien]





**Abb. 13 Charakteristik des Gefäßnetzes: Gefäßendpunkte**

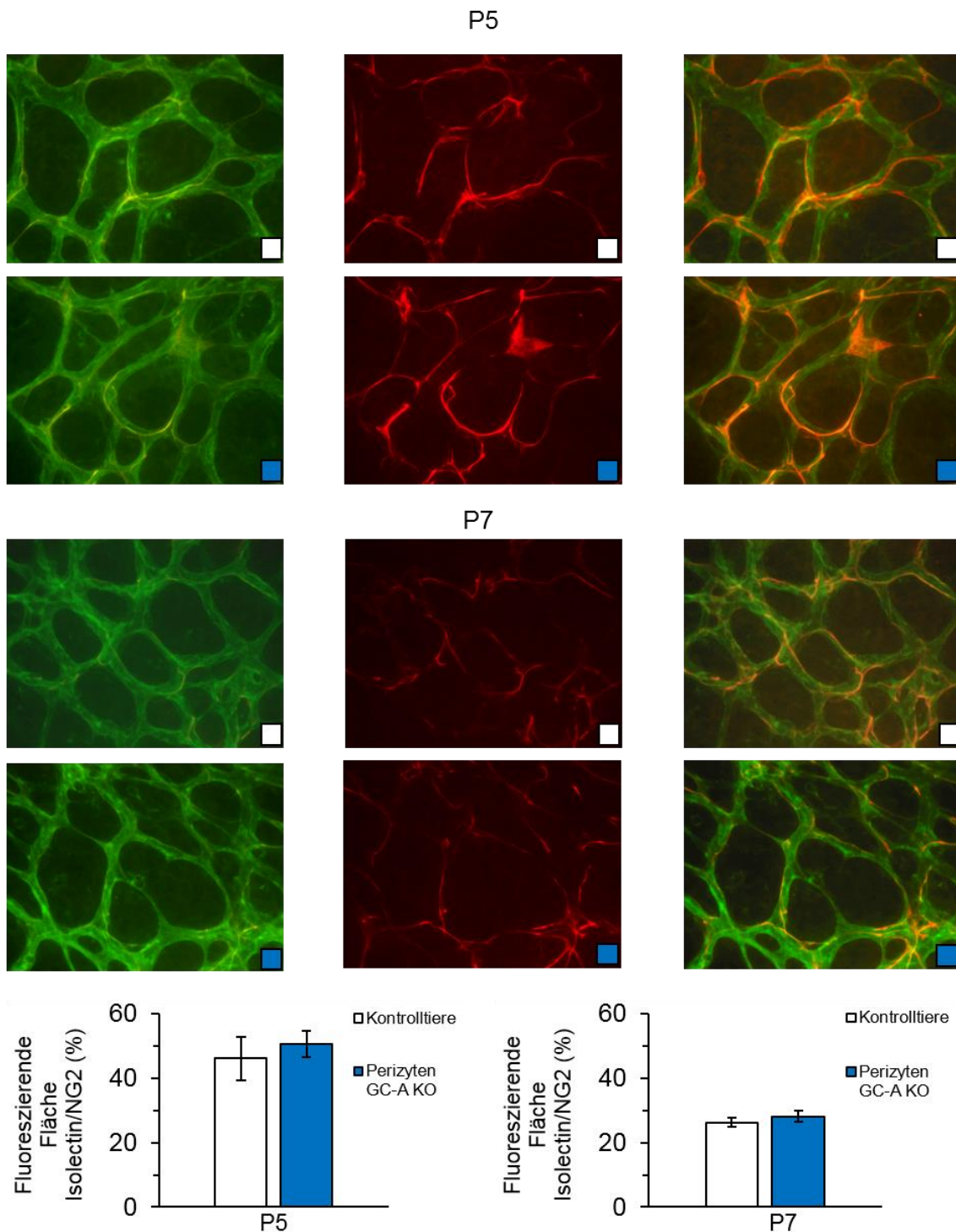
Die Gefäßendpunkte, also die Stellen, an denen der Gefäßplexus weiterwächst, waren in den Retinae der GC-A Knockout-Mäuse an P5 nicht signifikant ( $p=0,07$ ), an P7 signifikant vermindert im Vergleich zur Kontrollgruppe. Von Tag 5 auf Tag 7 nahm die Anzahl dieser Endpunkte in beiden Genotypen ab. (Perizyten GC-A KO Tiere:  $N(P5) = 8$ ,  $N(P7) = 6$ ; Kontrollmäuse:  $N(P5) = 11$ ,  $N(P7) = 8$ ; \* $p < 0,05$  versus Kontrollen) [grün: Isolectin-Färbung des Endothels; weiß: Umrandung der Gefäße und Umfang des Gefäßplexus; rot: Gefäßskelett]



**Abb. 14 Charakteristik des Gefäßnetzes: Arterienlänge**

Die Gesamtlänge der Arteriolen war in GC-A Knockout Tieren an P5 reduziert. An P7 dagegen war die Arterienlänge in den Retinae beider Genotypen ähnlich. (Perizyten GC-A KO Tiere:  $N(P5) = 8$ ,  $N(P7) = 6$ ; Kontrollmäuse:  $N(P5) = 11$ ,  $N(P7) = 8$ ; \* $p < 0,05$  versus Kontrollen) [grün: Isolectin-Färbung des Endothels; gelb: Markierung der Arteriolen]

Um zu Evaluieren, ob die verzögerte Vaskularisierung der Retinae von Perizyten GC-A KO Mäusen mit einer Abnahme der Perizyten-Anzahl beziehungsweise -Fläche einherging, respektive dadurch verursacht wurde, wurde die Bedeckung des Gefäßendothels durch diese Zellen gemessen und zwischen den beiden Genotypen verglichen. Hierfür wurde wie in Kapitel 2.4.3 beschrieben, die Fläche des Isolektin-gefärbten Endothels mit der Fläche der NG2-immunreaktiven Perizyten in den jeweils gleichen Ausschnitten der Retina miteinander verglichen, beziehungsweise wurde das Verhältnis zwischen diesen Flächen berechnet (siehe Abb. 15). Das Verhältnis zwischen der Isolektin-positiven Fläche und der NG2-immunoreaktiven Fläche, zum Zeitpunkt P5 oder P7 war in den Perizyten GC-A KO Tieren und den Kontrollgeschwistertieren ähnlich. Es zeigt sich jedoch in beiden Genotypen eine Abnahme der NG2-immunreaktiven Fläche im Verhältnis zur Isolektin-positiven Fläche vom fünften auf den siebten Tag nach Geburt. Möglicherweise nimmt also die Dichte der Perizyten im Vergleich zur Dichte der Endothelzellen in diesem Zeitraum ab. Natürlich ist nicht auszuschließen, dass auch die NG2-Expression einzelner Perizyten abnimmt.



**Abb. 15 Perizytenbedeckung des Gefäßendothels**

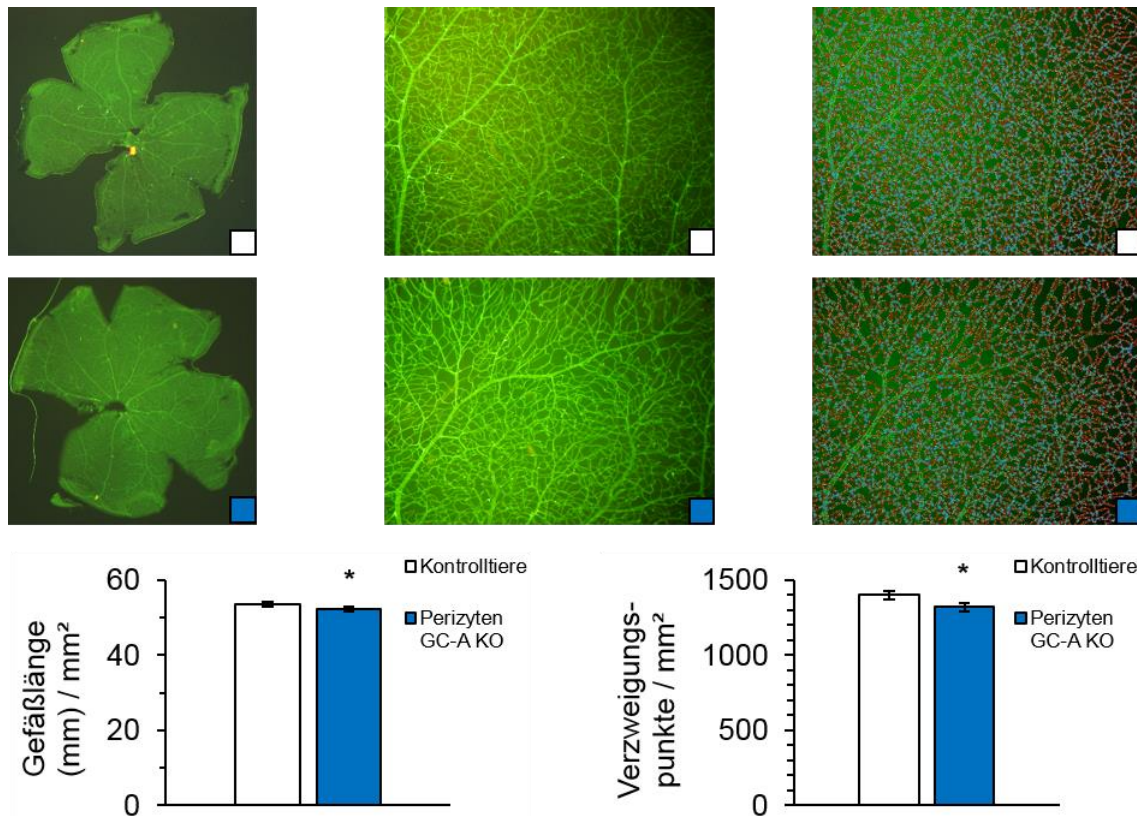
Dargestellt sind beispielhaft das mittels Isolectin-Färbung fluoreszierende Endothel (grün) sowie die mittels anti-NG2 Antikörpern immunreaktiven Perizyten. Die Analyse der fluoreszierenden Flächen des jeweils gleichen Ausschnitts der Retina zeigte weder an P5 noch an P7 Genotyp-abhängige Unterschiede in der Bedeckung des Endothels mit Perizyten. Es fällt jedoch eine Abnahme der NG2-Fluoreszenz im Verhältnis zur Isolectin-Fluoreszenz von Tag 5 zu Tag 7 in beiden Genotypen auf.

(Perizyten GC-A KO Tiere: N(P5) = 6, N(P7) = 7; Kontrollmäuse: N(P5) = 7, N(P7) = 6)

### **3.1.3 Charakteristik des Gefäßplexus adulter Versuchstiere**

Um darzustellen, ob die postnatalen Veränderungen der retinalen Angiogenese in den Perizyten GC-A KO Mäusen auch eine veränderte Vaskularisierung im adulten Tier zur Folge haben, wurden die Gefäße in der Netzhaut acht Monate alter Mäuse analysiert. Hier wurden zum Vergleich wieder Mäuse mit perizytenspezifischer Deletion des GC-A-Rezeptors und ihre Wurfgeschwister ohne entsprechende Deletion herangezogen. Wie bereits in Kapitel 2.4.3 ausführlich erläutert wurde repräsentative Ausschnitte eines jeden Quadranten der Netzhaut ausgewertet und die Gesamtlänge der abgebildeten Gefäße sowie die Anzahl der Verzweigungspunkte ermittelt (siehe Abb. 16).

Es zeigt sich dabei eine leichte, aber signifikant verminderte Länge der Gefäße pro Quadratmillimeter der Netzhaut, sowie eine signifikante Abnahme der Verzweigungspunkte in der Knockout-Gruppe. Dies spricht dafür, dass die in der frühen Entwicklung des Gefäßplexus auftretende Verminderung der Dichte der Gefäße in den perizytenspezifischen GC-A Knockout Mäusen bis in das Erwachsenenalter hinein erhalten bleibt.

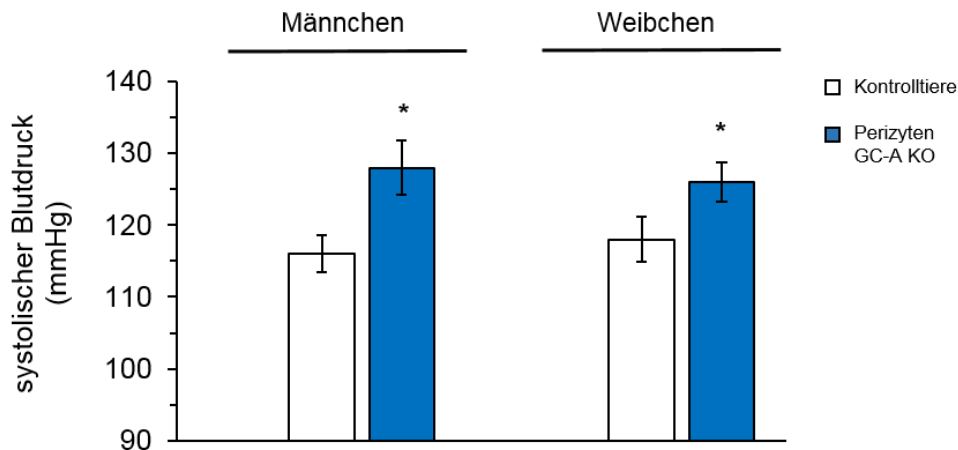


**Abb. 16 Charakteristik des retinalen Gefäßnetzes adulter Versuchstiere**

*Auch im Alter von acht Monaten hatten die Perizyten GC-A KO-Mäuse eine signifikante Abnahme der Gesamtlänge der retinalen Gefäße pro Quadratmillimeter der Retinafläche. Auch die Anzahl der Verzweigungspunkte pro Quadratmillimeter Netzhaut (also die Gefäßdichte) war in den KO Tieren reduziert. (Perizyten GC-A KO Tiere: N = 5; Kontrollmäuse: N = 5; \*p < 0,05 versus Kontrollen) [grün: Isolectin-Färbung des Endothels]*

### 3.1.4 Plethysmographische Blutdruckmessung in adulten Mäusen

Mittels der in Kapitel 2.5 geschilderten Methode wurde in adulten, circa drei Monate alten Perizyten GC-A KO Mäusen und ihren Kontrollgeschwistertieren nicht-invasiv der arterielle Blutdruck gemessen. Männliche und weibliche Versuchstiere wurden getrennt evaluiert (siehe Abb. 17). Perizyten GC-A KO Tiere beider Geschlechter hatten signifikant erhöhte systolische Blutdruckwerte im Vergleich zur Kontrollpopulation. Dieses Ergebnis kann als Hinweis auf eine in perizyten-spezifischen GC-A Knockout-Mäusen generell verminderte Kapillardichte und dadurch erhöhten peripheren Widerstand als Ursache für erhöhten Blutdruck gewertet werden.



**Abb. 17 Blutdruckmessungen an adulten Perizyten GC-A KO Mäusen**

Mittels Plethysmographie wurde über eine Schwanzmanschette nicht-invasiv der Blutdruck drei Monate alter Perizyten GC-A KO Mäuse sowie ihrer Kontrollgeschwistertiere gemessen. Männliche und weibliche KO Tiere hatten einen erhöhten arteriellen Blutdruck (♂: 116 mmHg (Kontrollen) vs. 128 mmHg (KO); ♀: 118 mmHg (Kontrollen) vs. 126 mmHg (KO)). (Perizyten GC-A KO Tiere:  $N(\♂)=8$ ,  $N(\♀)=8$ ; Kontrollmäuse:  $N(\♂)=8$ ,  $N(\♀)=8$ ; \* $p < 0,05$  versus Kontrollen)

#### Zusammenfassung 1:

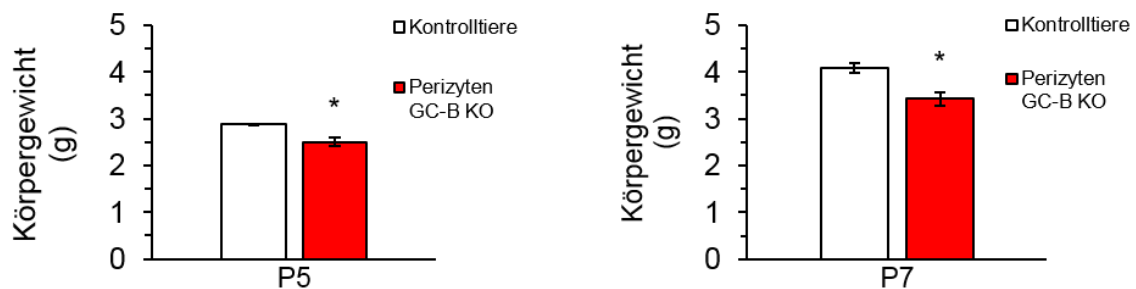
Die Perizyten GC-A KO Tiere zeigten keine Unterschiede in der Entwicklung des Körpergewichts, jedoch eine verminderte postnatale Angiogenese in der Retina. Die genaue Betrachtung des Gefäßplexus dieser Tiere im Vergleich zu ihren Kontrollgeschwistertieren zeigte zu allen Untersuchungszeitpunkten (P5, P6, 8 Monate) eine geringere Dichte des Gefäßnetzes, gemessen an der Gesamtlänge der retinalen Gefäße, der Anzahl der Gefäßverzweigungen und Gefäßendpunkten sowie der Arteriolenlängen. Eine Abnahme der NG2-Fluoreszenz im Verhältnis zur Isolectin-Fluoreszenz stellte sich nicht dar. Auch in den adulten Perizyten GC-A KO Tieren fand sich eine verringerte Gefäßdichte. Weiterhin hatten die Perizyten GC-A Knockout-Mäuse geschlechterunabhängig erhöhte systolische arterielle Blutdruckwerte.

### 3.2 Versuche an Mäusen mit perizytenspezifischer GC-B Deletion, dem Rezeptor von CNP

Die zweite im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Versuchsreihe konzentriert sich auf die retinale Angiogenese in PDGFR $\beta$ -Cre<sup>ERT2</sup> x GC-B<sup>flox/flox</sup> Mäusen, welche eine spezifische Deletion (KO) des GC-B-Rezeptors in Perizyten (siehe Kapitel 2.2) aufweisen. Auch hier wurden vergleichend die Kontrollgeschwistertiere untersucht. Damit wird der Frage nachgegangen, ob das endotheliale Hormon CNP in ähnlicher Weise wie ANP und BNP die physiologische Angiogenese stimuliert.

#### 3.2.1 Körpergewicht

Zu Beginn wurde wie auch in der ersten Versuchsreihe, das Körpergewicht jedes Tieres bestimmt. Überraschenderweise hatten sowohl die fünf Tage alten als auch die sieben Tage alten Perizyten GC-B KO-Tiere ein signifikant reduziertes Gewicht im Vergleich zu ihren Kontrollgeschwistertieren. Von Tag fünf auf Tag sieben zeigte sich in beiden Gruppen ein adäquater Gewichtsanstieg.



**Abb. 18 Körpergewicht von neonatalen Perizyten GC-B KO Mäusen und Kontrolltieren**

Das Körpergewicht nimmt von Tag fünf bis Tag sieben in beiden Genotypen zu. Die Perizyten GC-B KO Tiere haben dabei zu beiden Zeitpunkten ein vermindertes Körpergewicht im Vergleich zu ihren Kontrollgeschwistertieren.  
(Perizyten GC-B KO Tiere: N(P5) = 12; N(P7) = 16; Kontrollmäuse: N(P5) = 22; N(P7) = 16; \* $p < 0,05$  versus Kontrollen)

### **3.2.2 Vaskularisierung der Retina in Jungtieren**

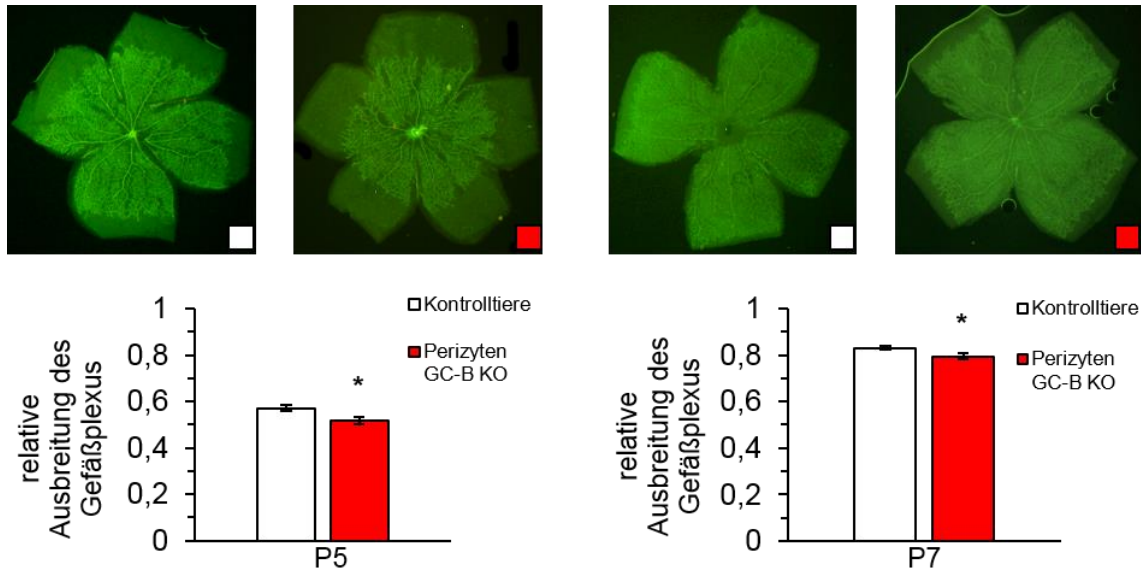
Die Perizyten GC-B KO Mäuse zeigten an beiden Untersuchungszeitpunkten (P5 und P7) eine signifikante Reduktion in der Ausdehnung des Gefäßplexus der Retina im Vergleich zu ihren Kontrollgeschwistertieren (siehe Abb. 19).

Auch die Gesamtlänge der Gefäße (siehe Abb. 20), die Anzahl an Gefäßverzweigungen (siehe Abb. 21) sowie die Anzahl der Gefäßendpunkte (siehe Abb. 22) war in der Perizyten GC-B KO Population an beiden Zeitpunkten signifikant geringer. Die gemessenen Gesamtlängen der Arteriolen an P5 und P7 waren in den Perizyten GC-B KO Tieren im Vergleich zur Kontrollpopulation ebenfalls vermindert (Abb. 23).

Ein Vergleich zwischen den beiden Untersuchungszeitpunkten zeigte eine Zunahme der Gefäßgesamtlänge, der Arteriolenlänge sowie der Verzweigungspunkte von P5 auf P7, sowohl in den Knockout Mäusen, als auch in den Kontrollgeschwistertieren. Die Anzahl der Gefäßendpunkte nahm in beiden Genotypen von P5 auf P7 ebenfalls etwas zu.

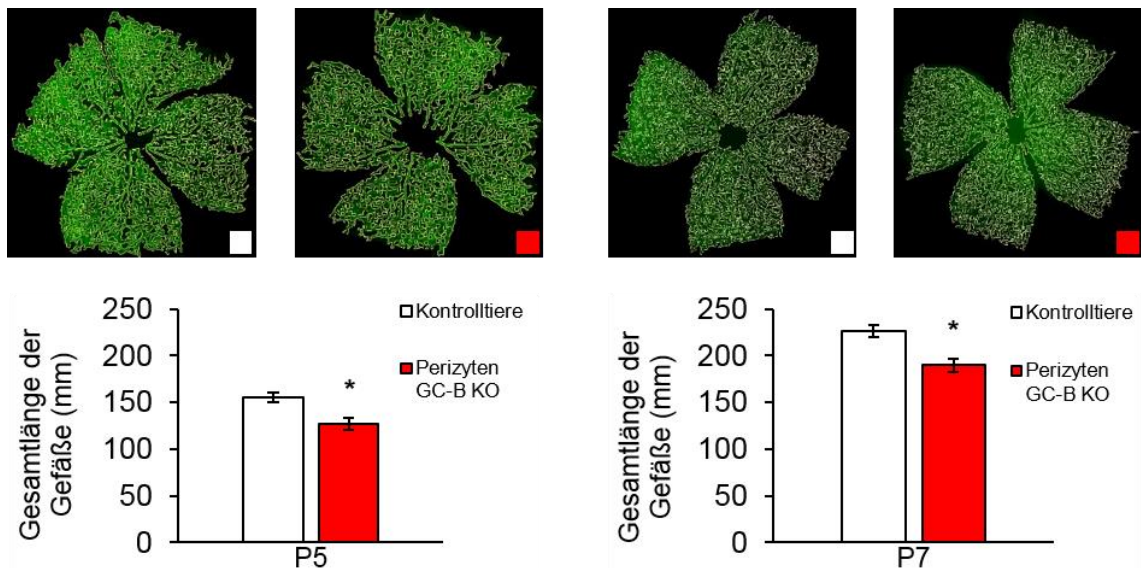
Es zeigt sich somit, dass auch die Deletion des GC-B-Rezeptors in Perizyten eine verlangsamte Gefäß-Aussprossung in die Netzhaut sowie eine deutlich geringere Dichte des Gefäßnetzes verursacht. Im Unterschied zu den GC-A KO Tieren, in welchen die Ausdehnung des Gefäßplexus an P7 bei einer verminderten Gefäßdichte, der Ausdehnung des Gefäßplexus auf der Retina der Kontrollgeschwistertieren entspricht, zeigte sich in den Perizyten GC-B KO Tiere auch an P7 keine altersentsprechende Ausdehnung des Gefäßplexus.





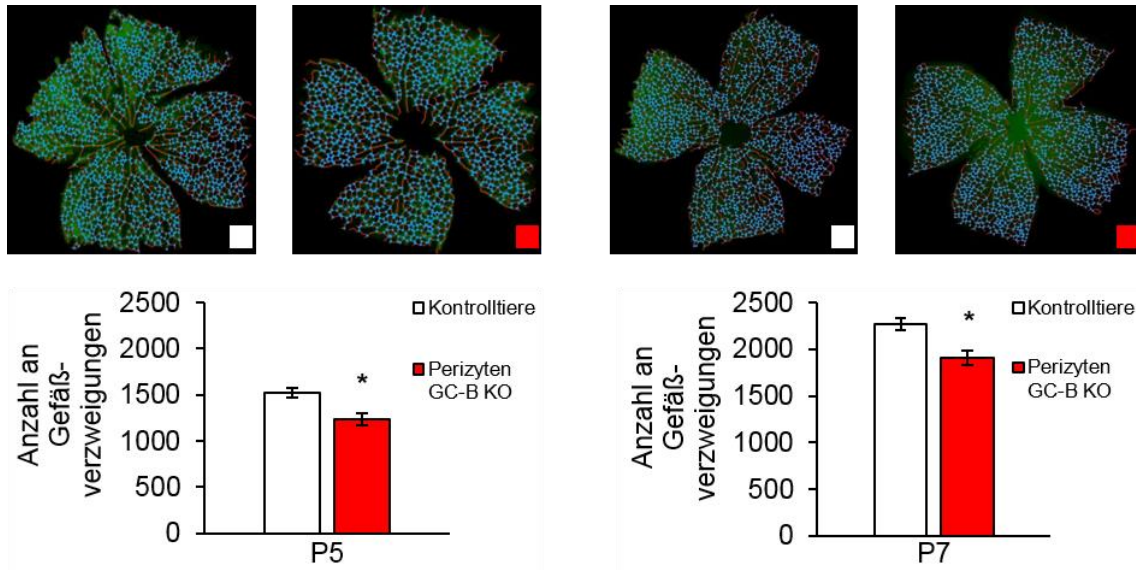
**Abb. 19 Ausdehnung des retinalen Gefäßplexus**

Zu beiden Untersuchungszeitpunkten P5 und P7 zeigten die Perizyten GC-B KO Mäuse eine signifikant verminderte Ausdehnung des Gefäßplexus über der Gesamtfläche der Netzhaut verglichen mit ihren Kontrollgeschwistertieren. Von P5 auf P7 fand sich in beiden Genotypen eine Zunahme des Gefäßplexus (Perizyten GC-B KO Tiere: N(P5) = 11, N(P7) = 16; Kontrollmäuse: N(P5) = 22, N(P7) = 16; \* $p < 0,05$  versus Kontrollen)  
[grün: Isolectin-Färbung des Endothels]



**Abb. 20 Charakteristik des Gefäßnetzes: Gefäßgesamtlänge**

Die Gesamtlänge der Gefäße war in der Perizyten GC-B KO Population im Vergleich zur Kontrollpopulation in den fünf und sieben Tage alten Tieren vermindert. Von P5 auf P7 nahm die Gefäßgesamtlänge in beiden Gruppen zu. (Perizyten GC-B KO Tiere: N(P5) = 11, N(P7) = 16; Kontrollmäuse: N(P5) = 22, N(P7) = 16; \* $p < 0,05$  versus Kontrollen)  
[grün: Isolectin-Färbung des Endothels, gelb: Umrandung der Gefäße]

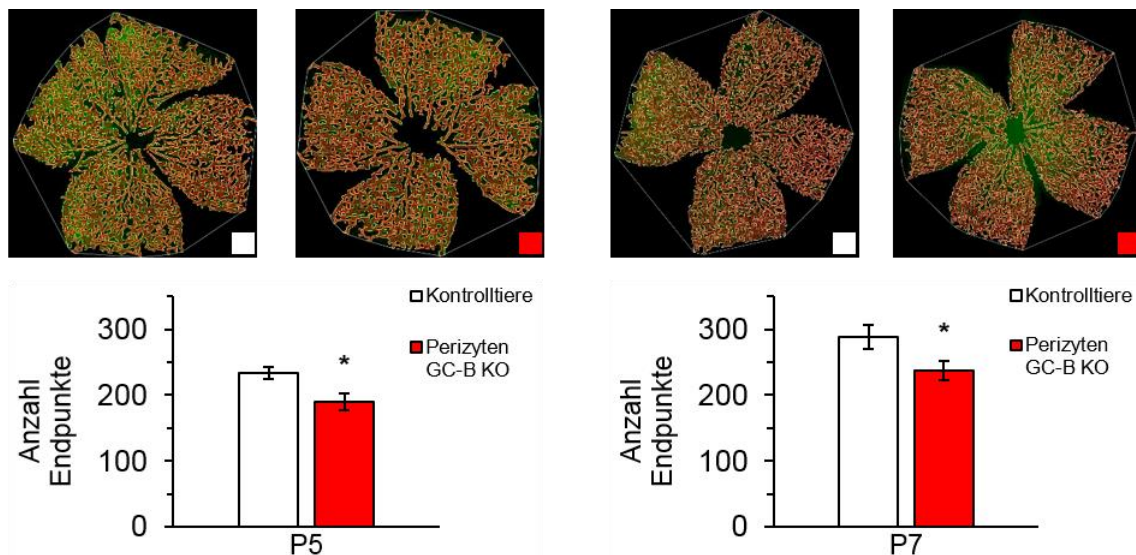


**Abb. 21 Charakteristik des Gefäßnetzes: Gefäßverzweigungen**

Die Anzahl der Gefäßverzweigungspunkte war zu beiden Untersuchungszeitpunkten (P5 und P7) in den Retinae der Perizyten GC-B KO Versuchstieren im Vergleich zu den Kontrollgeschwistertieren geringer. In beiden Gruppen war ein Zuwachs der Anzahl der Gefäßverzweigungen zu beobachten.

(Perizyten GC-B KO Tiere: N(P5) = 11, N(P7) = 16; Kontrollmäuse: N(P5) = 22, N(P7) = 16; \* $p < 0,05$  versus Kontrollen)

[grün: Isolectin-Färbung des Endothels, blau: Verzweigungspunkte, rot: Verbindungslinien]

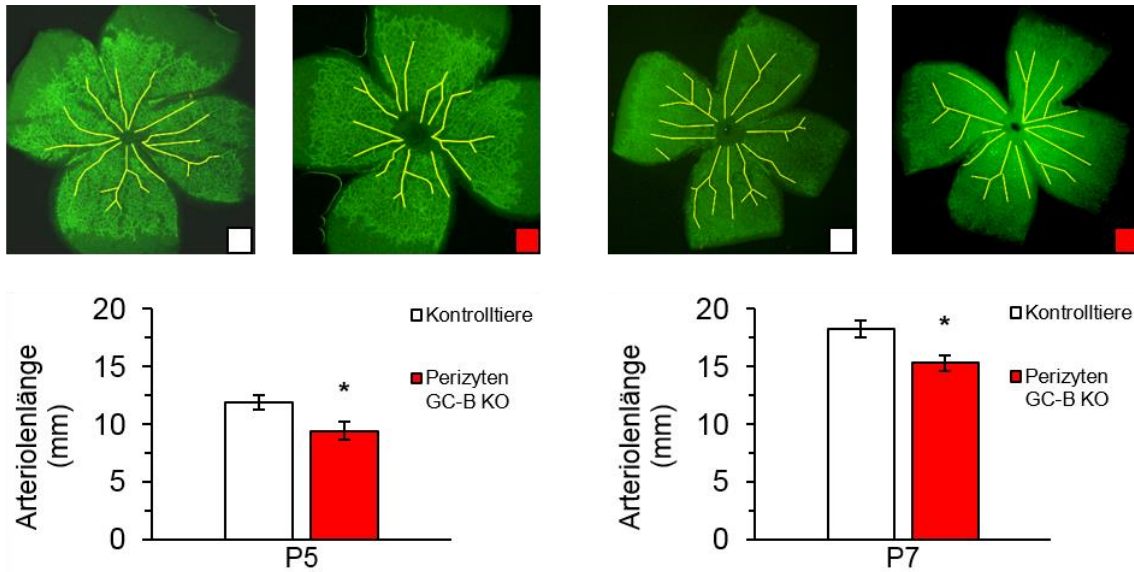


**Abb. 22 Charakteristik des Gefäßnetzes: Gefäßendpunkte**

Es zeigte sich eine signifikante Abnahme der Gefäßendpunktzahl in den Retinae der Perizyten GC-B KO Mäusen im Vergleich zu ihren Wurfgeschwistern der Kontrollgruppe sowohl an P5 als auch an P7. Weiterhin zeigte sich von P5 auf P7 in beiden Gruppen ein leichter Anstieg der Endpunktzahl.

(Perizyten GC-B KO Tiere: N(P5) = 11, N(P7) = 16; Kontrollmäuse: N(P5) = 22, N(P7) = 16; \* $p < 0,05$  versus Kontrollen)

[grün: Isolectin-Färbung des Endothels, gelb: Umrandung der Gefäße, weiß: Umfang des Gefäßplexus, rot: Gefäßskelett]



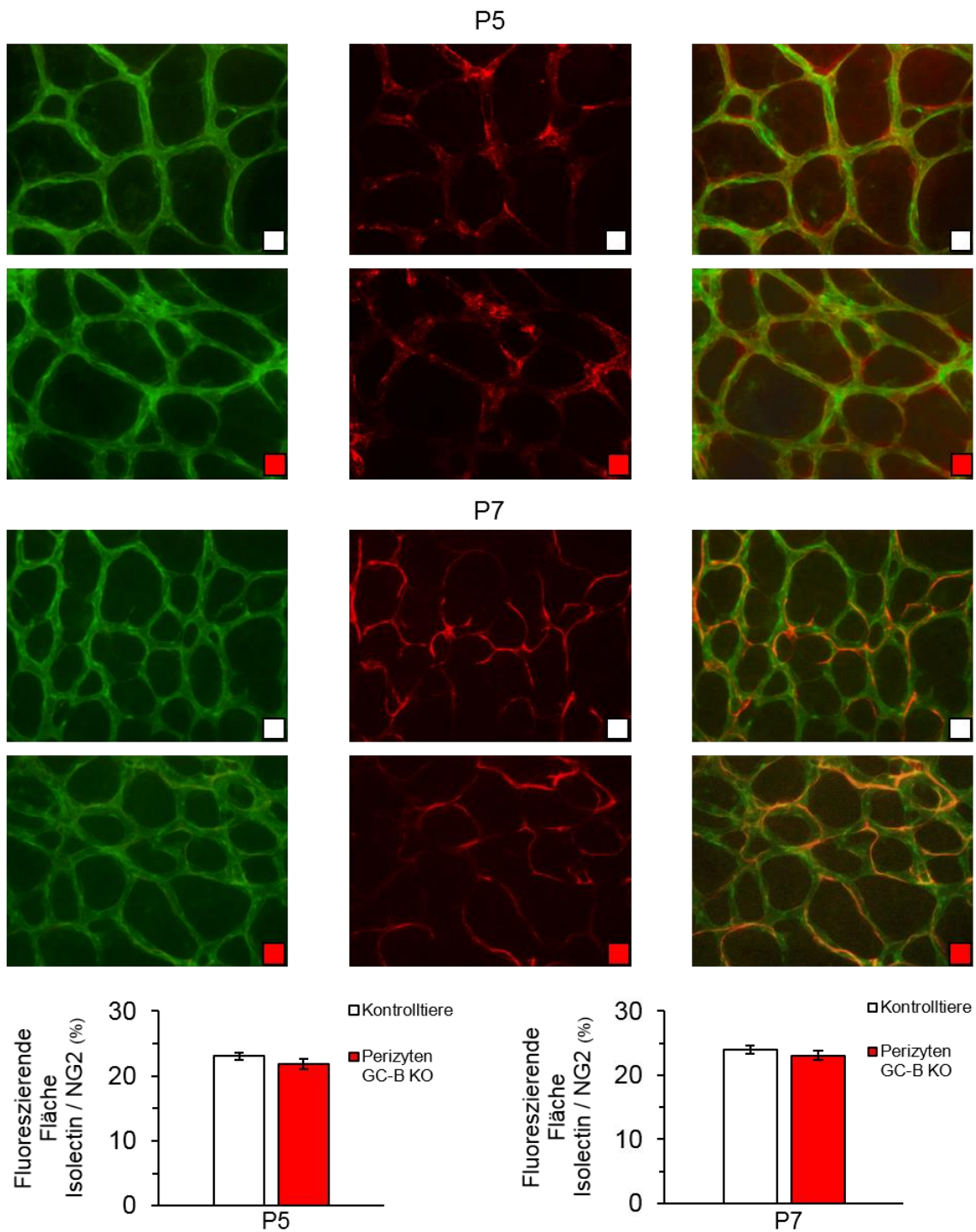
**Abb. 23 Charakteristik des Gefäßnetzes: Arteriolenlänge**

Die Vermessung der Arteriolen ergab an P5 und P7 eine signifikant verminderte Länge dieser Gefäße in den Perizyten GC-B KO Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe. Im Vergleich von P5 zu P7 zeigte sich in beiden Gruppen ein deutlicher Anstieg der Arteriolenlängen. (Perizyten GC-B KO Tiere: N(P5) = 11, N(P7) = 16; Kontrollmäuse: N(P5) = 22, N(P7) = 16; \* $p < 0,05$  versus Kontrollen)  
 [grün: Isolectin-Färbung des Endothels; gelb: Markierung der Arteriolen]

Die Evaluation der Perizytenbedeckung (mittels NG2) des Gefäßendothels (mittels Isolectin) erfolgte entsprechend des Vorgehens in der vorangegangenen Versuchsreihe mit perizyten-spezifischer GC-A Deletion. Es wurde die Fläche des mittels Isolectin gefärbten Endothels mit der Fläche der NG2-immunreaktiven Perizyten des jeweils gleichen Ausschnitts des Gefäßnetzes zu den Zeitpunkten P5 und P7 verglichen.

Weder in den fünf Tage alten, noch in den sieben Tage alten Versuchstieren zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der Bedeckung des Endothels mit Perizyten zwischen den perizyten-spezifischen GC-B Knockout Mäusen und ihren Kontrollgeschwistertieren (siehe Abb. 24).

Der Vergleich der beiden Untersuchungszeitpunkte zeigte in beiden Versuchsgruppen ein nahezu unverändertes Verhältnis der Fläche der NG2-Fluoreszenz zur Isolectin-Fläche.



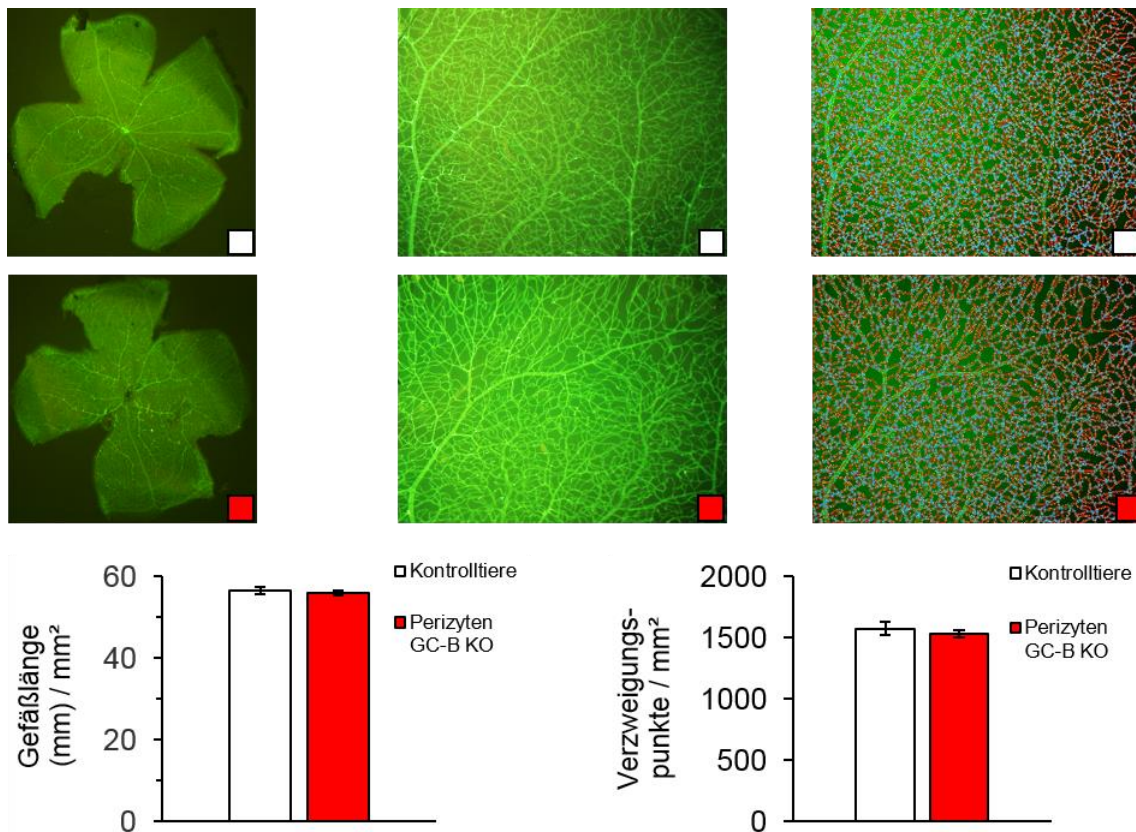
**Abb. 24 Perizytenbedeckung des Gefäßendothels**

Beispielhaft sind hier das mittels Isolektin immunfluoreszierenden Endothel (grün) sowie die mittels anti-NG2 Antikörpern immunreaktiven Perizyten dargestellt. Der Vergleich dieser Flächen des jeweils gleichen Ausschnitts des Gefäßnetzes zeigte sowohl an P5 als auch an P7 keine signifikanten Unterschiede in der Bedeckung des Endothels mit Perizyten. Ebenso zeigen sich in beiden Gruppen keine nennenswerten Unterschiede in der Perizytenbedeckung des Endothels zwischen den beiden Untersuchungszeitpunkten.

(Perizyten GC-B KO Tiere: N(P5) = 11, N(P7) = 16; Kontrollmäuse: N(P5) = 21, N(P7) = 16; \* $p < 0,05$  versus Kontrollen)

### 3.2.3 Charakteristik des Gefäßplexus adulter Versuchstiere

Die Untersuchung der Retinae von fünf Monate alten Tieren mit perizytenspezifischer Deletion des GC-B Rezeptors und entsprechender Wurfgeschwister zeigte keine Unterschiede der gesamten Gefäßlängen pro Quadratmillimeter der Netzhautfläche. Auch die Anzahl der Gefäßverzweigungspunkte pro Quadratmillimeter der Retina war in beiden Genotypen ähnlich (siehe Abb. 25). Dies spricht dafür, dass die in der frühen Entwicklung des Gefäßplexus auftretende Verringerung der Gefäßdichte in den Perizyten GC-B KO Mäusen bis zum Erwachsenenalter kompensiert werden.

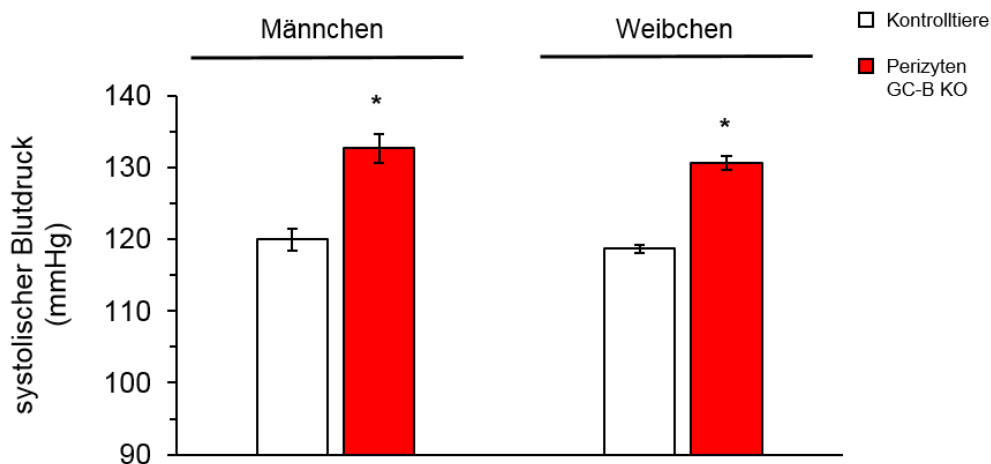


**Abb. 25** Charakteristik des retinalen Gefäßnetzes adulter Versuchstiere

In fünf Monat alten Perizyten GC-B Knockout- Mäusen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Gefäßlänge oder der Anzahl an Gefäßverzweigungspunkten jeweils gemessen pro mm<sup>2</sup> der Retinafläche im Vergleich zu den Kontrollgeschwistertieren. (Perizyten GC-B KO Tiere: N=5; Kontrollmäuse: N=5; \*p< 0,05 versus Kontrollen) [grün: Isolectin-Färbung des Endothels]

### 3.2.4 Plethysmographische Blutdruckmessung in adulten Mäusen

Ebenso wie in der ersten Versuchsreihe erfolgte eine nicht-invasive Messung des arteriellen Blutdrucks in den Perizyten GC-B KO Tieren und ihren Kontrollgeschwistern. Hierfür wurde der Blutdruck männlicher und weiblicher Tiere im Alter zwischen zwei und drei Monaten plethysmographisch über eine Schwanzmanschette gemessen. In beiden Geschlechtern zeigten die Perizyten GC-B KO Tiere dabei signifikant erhöhte systolische Blutdruckwerte im Vergleich zu den Kontrollgruppen (siehe Abb. 26).



**Abb. 26 Blutdruckmessungen - Perizyten-spezifische GC-B KO Mäuse**

Mittels Schwanzmanschette wurde plethysmographisch der Blutdruck männlicher und weiblicher Perizyten GC-B KO Mäuse und ihrer Kontrollgeschwistertiere gemessen. Die systolischen Blutdruckwerte zeigen sich in den Knockout-Versuchstieren beider Geschlechter signifikant erhöht (♂: 120 mmHg vs. 133 mmHg; ♀: 119 mmHg vs. 131 mmHg). (Perizyten GC-B KO Tiere:  $N(\♂) = 9$ ,  $N(\♀) = 8$ ; Kontrollmäuse:  $N(\♂) = 9$ ,  $N(\♀) = 8$ ; \* $p < 0,05$  versus Kontrollen)

#### Zusammenfassung 2:

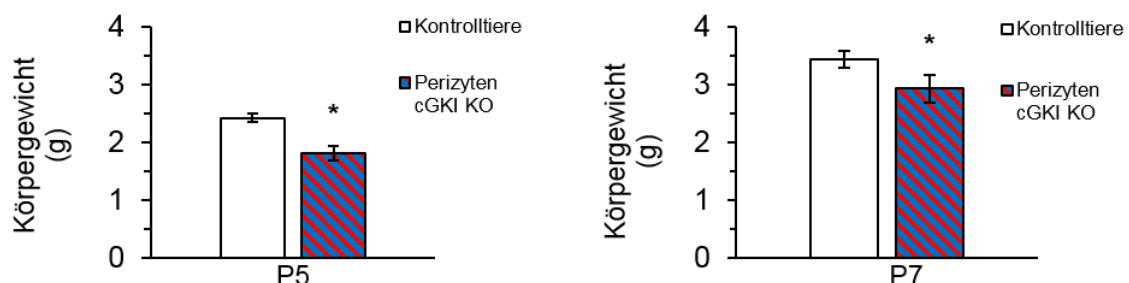
Die Perizyten GC-B KO Jungtiere zeigten ein vermindertes Körpergewicht im Vergleich zu ihren Kontrollgeschwistertieren. Ebenso war die Ausdehnung des Gefäßplexus sowie die Dichte des Gefäßnetzes in den Knockout-Tieren vermindert. Eine Abnahme der Bedeckung des Endothels durch Perizyten zeigte sich nicht. In den adulten Versuchstieren fanden sich keine signifikanten Unterschiede in der Dichte des Gefäßnetzes. Der systolische arterielle Blutdruck war in den Perizyten GC-B KO Tieren geschlechtsunabhängig erhöht.

### 3.3 Versuche an Mäusen mit perizytenspezifischer Deletion der cGMP-abhängigen Protein Kinase Typ I (cGKI)

Die zuvor geschilderten Ergebnisse zeigen, dass die NPe ANP/BNP und CNP, über Effekte an Perizyten die physiologische Angiogenese stimulieren. Somit stellte sich die Frage, über welchen weiteren Signalweg diese protektiven Effekte vermittelt werden. Das von den Guanylylzyklase-Rezeptoren nach Bindung der entsprechenden natriuretischen Peptide gebildete zyklische Guanosin-Monophosphat (cGMP) führt zur Aktivierung unterschiedlicher Enzyme in unterschiedlichen Zellen (siehe Kapitel 4.4.1). Ein ubiquitär vorkommendes Enzym dieser Signalkaskade stellt dabei die cGMP-abhängige Proteinkinase Typ I (cGKI) dar. Um der Bedeutung der cGKI für die proangiogene Effekte der NPe *in vivo* nachzugehen, wurde eine weitere Versuchsreihe zur Evaluation der postnatalen Angiogenese in einem genetischen Mausmodell durchgeführt. Diesmal wurde eine Mauslinie untersucht, die eine spezifische Deletion der cGKI in Perizyten aufweist. Vergleichend wurden Wurfgeschwister ohne cGKI-Deletion untersucht (siehe Kapitel 2.2). Ziel der Untersuchung war es zu evaluieren, ob sich bei genannter Deletion der cGKI ähnliche Effekte wie bei einer Deletion der Guanylylzyklase-Rezeptoren beobachten lassen.

#### 3.3.1 Körpergewicht

Die zu Beginn durchgeführte Messung des Körpergewichts der Versuchstiere zeigt zu beiden Versuchszeitpunkten Tag fünf und Tag sieben, ein signifikant vermindertes Körpergewicht in der Gruppe der cGKI Knockout-Mäuse im Vergleich zur Kontrollpopulation. In beiden Gruppen ist eine Zunahme des Gewichts von P5 auf P7 zu verzeichnen.



**Abb. 27 Körpergewicht neonataler Perizyten cGKI KO-Mäusen und Kontrolltiere**

Das Körpergewicht der Perizyten cGKI KO Tiere war zu beiden Erhebungszeitpunkten (P5 und P7) im Vergleich zu den Kontrollgeschwistertieren signifikant geringer. Von P5 auf P7 stieg das Körpergewicht in beiden Versuchsgruppen an. (Perizyten cGKI KO Tiere: N(P5) = 7; N(P7) = 5; Kontrollmäuse: N(P5) = 6; N(P7) = 14; \* $p < 0,05$  versus Kontrollen)

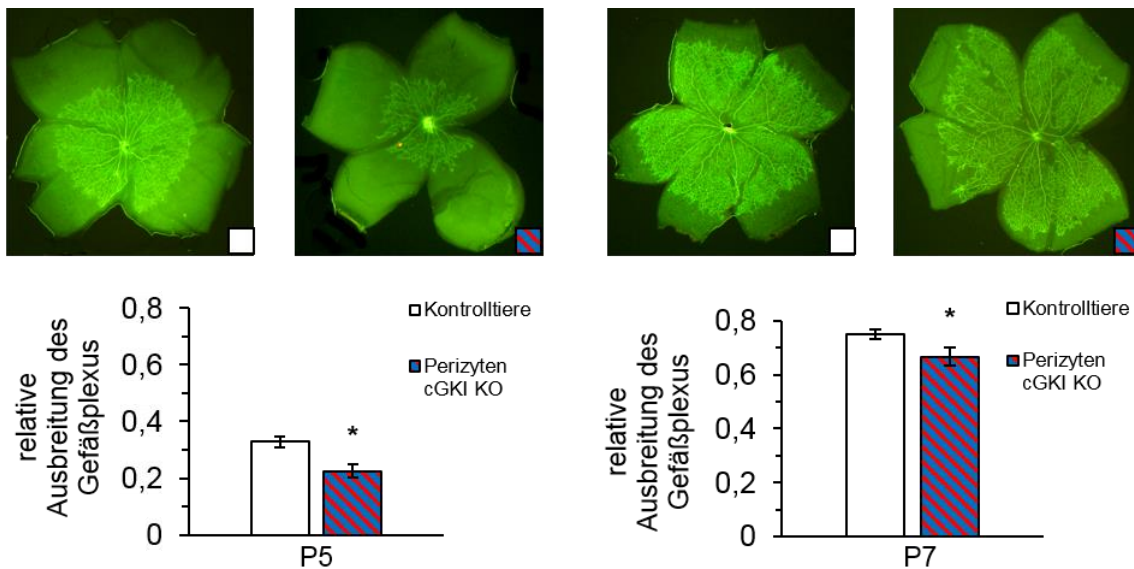
### 3.3.2 Vaskularisierung der Retina in Jungtieren

Im Rahmen der Untersuchung der Gefäßentwicklung in der Netzhaut der Perizyten cGKI KO Tiere, wurden die gleichen Parameter erhoben wie in den Jungtieren der ersten beiden Versuchsreihen.

Die Ausdehnung des Gefäßnetzes über die Retina ist dabei in den cGKI Knockout Mäusen sowohl bei den fünf als auch bei den sieben Tage alten Tieren signifikant vermindert (siehe Abb. 28).

Bezüglich der Eigenschaften der Gefäßnetze zeigte sich in den Perizyten cGKI KO Tieren im Vergleich zu ihren Kontrollgeschwistertieren eine signifikante Abnahme der Gefäßgesamtlänge (siehe Abb. 29), der Länge der Arteriolen (siehe Abb. 32) sowie der Anzahl an Gefäßverzweigungspunkte (siehe Abb. 30). Die Anzahl der Gefäßendpunkte war in den Perizyten cGKI KO Tieren ebenfalls vermindert, der Unterschied erweist sich aber statistisch als nicht signifikant (siehe Abb. 31).

Weiterhin war ein Größenwachstum, der die Netzhaut bedeckenden Gefäßplexi sowie eine Weiterentwicklung der Gefäßnetze mit einer Zunahme der Gefäßgesamtlänge, der Arteriolenlänge und der Anzahl an Verzweigungen von P5 auf P7 in beiden Gruppen zu erkennen.



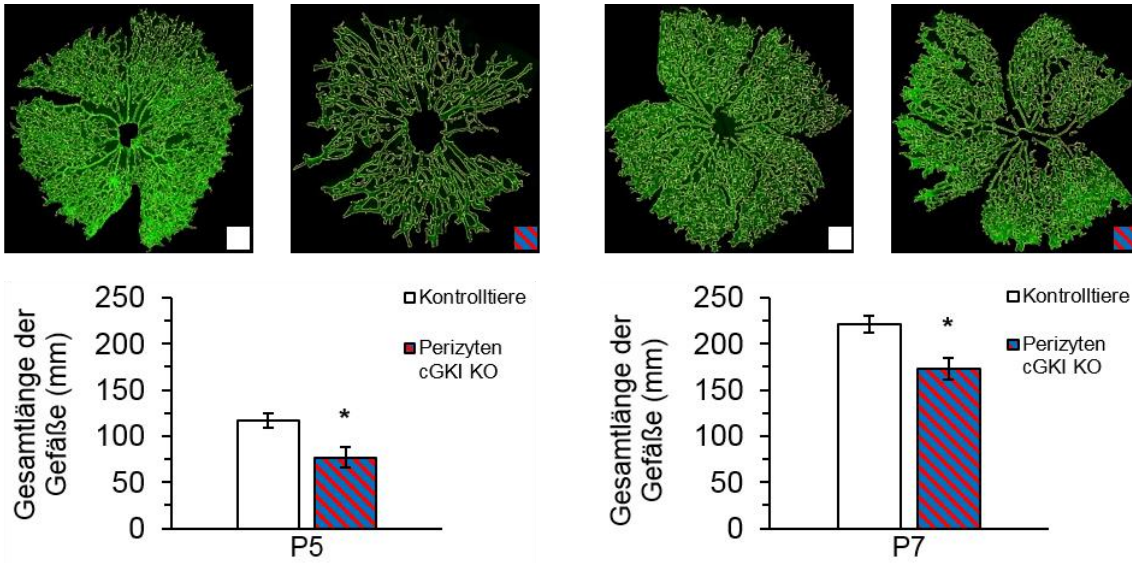
**Abb. 28** Ausdehnung des retinalen Gefäßplexus

Sowohl zum Zeitpunkt P5 als auch P7 war die Ausdehnung des Gefäßnetzes auf der Netzhaut in den Perizyten cGKI KO Tieren verglichen mit den Kontrollgeschwistertieren deutlich geringer. In beiden Gruppen wuchs der Gefäßplexus im Vergleich zur Gesamtfläche der Retina von P5 auf P7.

(Perizyten cGKI KO Tiere: N(P5) = 7, N(P7) = 5; Kontrollmäuse: N(P5) = 6, N(P7) = 14; \* $p < 0,05$  versus Kontrollen)

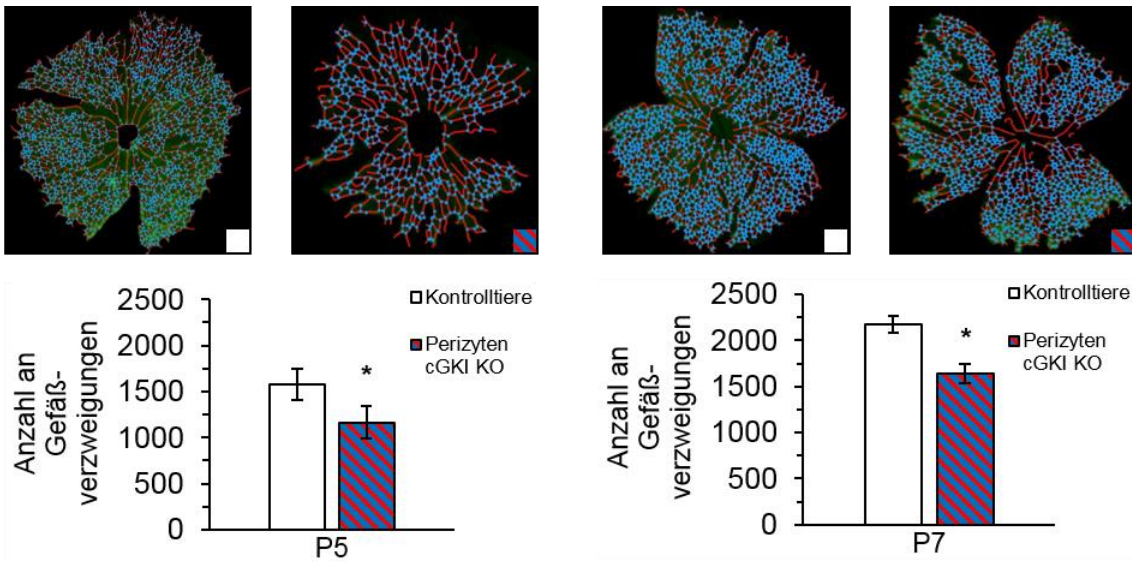
[grün: Isolectin-Färbung des Endothels]





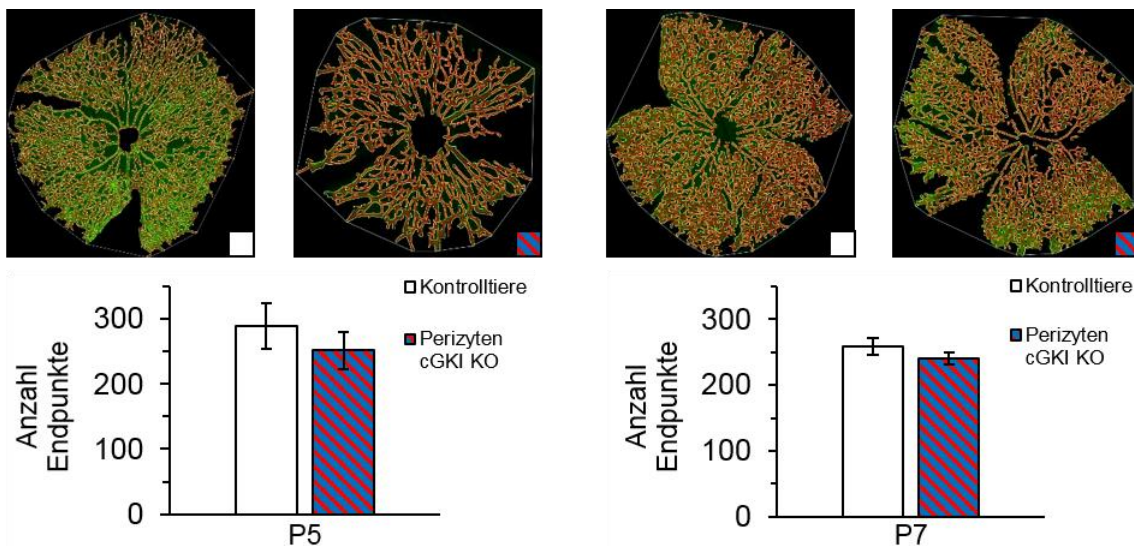
**Abb. 29 Charakteristik des Gefäßnetzes: Gefäßgesamtlänge**

Sowohl die fünf Tage, als auch die sieben Tage alten Perizyten cGKI KO Tieren zeigten eine signifikant verringerte Gesamtlänge der Gefäße im Vergleich zur Kontrollgruppe. Von P5 auf P7 nahmen die Gefäßlängen in beiden Populationen zu. (Perizyten cGKI KO Tiere: N(P5) = 7, N(P7) = 5; Kontrollmäuse: N(P5) = 6, N(P7) = 14; \* $p < 0,05$  versus Kontrollen) [grün: Isolectin-Färbung des Endothels, gelb: Umrandung der Gefäße]



**Abb. 30 Charakteristik des Gefäßnetzes: Gefäßverzweigungen**

Die Anzahl der Gefäßverzweigungspunkte im Gefäßplexus der Netzhaut war an beiden Untersuchungszeitpunkten P5 und P7 in den Perizyten CGKI KO Tieren verringert verglichen mit der Kontrollpopulation. In beiden Versuchsgruppen nahm die Anzahl der Gefäßverzweigungen von Tag 5 auf Tag 7 zu. (Perizyten cGKI KO Tiere: N(P5) = 7, N(P7) = 5; Kontrollmäuse: N(P5) = 6, N(P7) = 14; \* $p < 0,05$  versus Kontrollen) [grün: Isolectin-Färbung des Endothels, blau: Verzweigungspunkte, rot: Verbindungslinien]

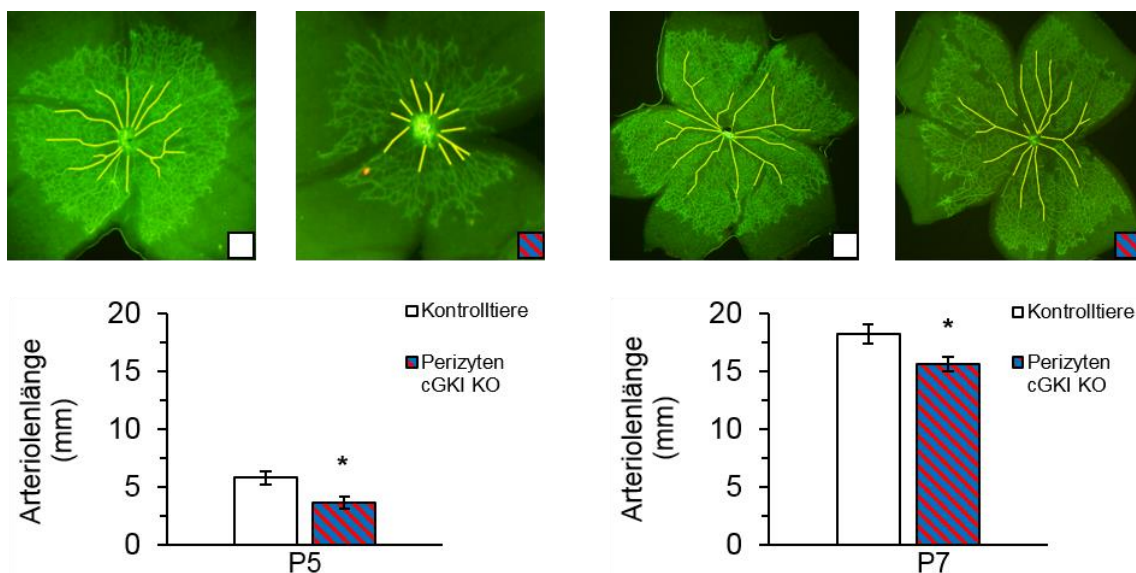


**Abb. 31** Charakteristik des Gefäßnetzes: Gefäßendpunkte

Die Betrachtung der Anzahl der Gefäßendpunkte zeigte eine verminderte Anzahl an Gefäßendpunkten in den Perizyten cGKI KO Tieren zu beiden Untersuchungszeitpunkten. Statistisch war dieser Unterschied allerdings nicht signifikant. Von P5 zu P7 zeigte sich in beiden Gruppen eine leichte Abnahme der Anzahl an Gefäßendpunkten.

(Perizyten cGKI KO Tiere: N(P5) = 7, N(P7) = 5; Kontrollmäuse: N(P5) = 6, N(P7) = 14; \* $p < 0,05$  versus Kontrollen)

[grün: Isolectin-Färbung des Endothels, gelb: Umrandung der Gefäße, weiß: Umfang des Gefäßplexus, rot: Gefäßskelett]



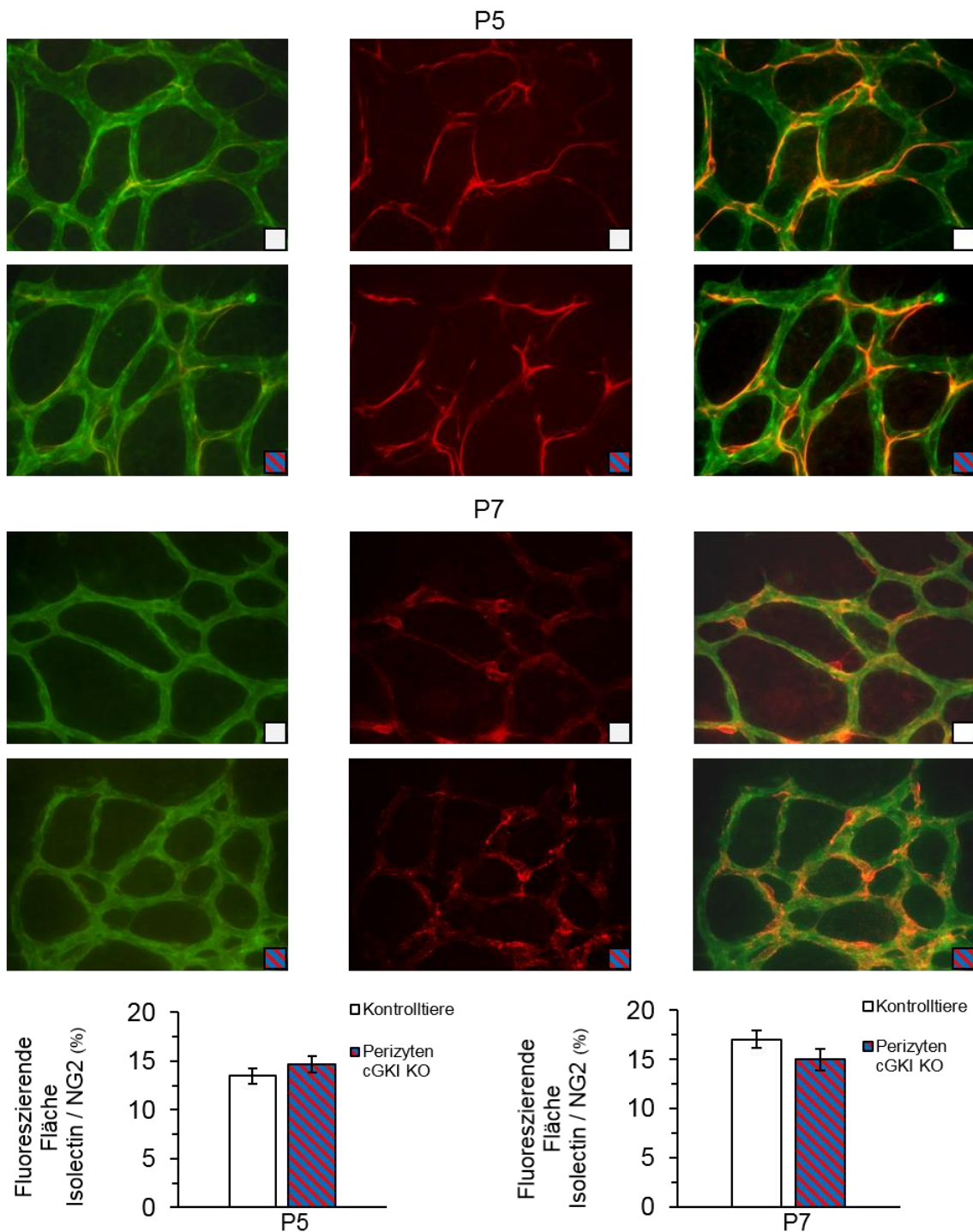
**Abb. 32** Charakteristik des Gefäßnetzes: Arteriolenlänge

Die Arteriolenlänge in den Retinae der Perizyten cGKI KO Tieren war zu beiden Zeitpunkten signifikant kürzer im Vergleich zur Kontrollpopulation. Von P5 auf P7 nahm sie in beiden Versuchsgruppen zu.

(Perizyten cGKI KO Tiere: N(P5) = 7, N(P7) = 5; Kontrollmäuse: N(P5) = 6, N(P7) = 14; \* $p < 0,05$  versus Kontrollen)

[grün: Isolectin-Färbung des Endothels; gelb: Markierung der Arteriolen]

Im Anschluss wurde auch in dieser Versuchsgruppe untersucht ob mit den beobachteten Veränderungen des Gefäßnetzes in den Perizyten cGKI KO Tieren auch eine Veränderung in der Bedeckung des Gefäßendothels durch Perizyten einhergeht. Daher wurde erneut in gleichen Ausschnitten der Retina die Fläche des mittels Isolectin gefärbten Endothels mit der Fläche der mit anti-NG2 Antikörpern immunreaktiven Perizyten verglichen. Auch in dieser Versuchsreihe fanden sich weder an P5 noch an P7 signifikante Unterschiede zwischen den Perizyten cGKI KO Mäusen und ihren Kontrollgeschwistertieren. Insgesamt lies sich von P5 auf P7 eine leichte Zunahme dieses Verhältnisses in beiden Versuchsgruppen beobachten (siehe Abb. 33).



**Abb. 33 Perizytenbedeckung des Gefäßendothels**

Der beispielhaft dargestellte Vergleich der gleichen Ausschnitte der Netzhaut mit der mittels Isolectin fluoreszierenden Endothelfläche (grün) und der Fläche der NG2-immunreaktiven Perizyten (rot) zeigte weder an Tag 5, noch an Tag 7 einen signifikanten Unterschied in der Perizytenbedeckung des Endothels zwischen den Perizyten cGKI KO Tieren und ihren Kontrollgeschwistertieren.

(Perizyten cGKI KO Tiere: N(P5) = 7, N(P7) = 5; Kontrollmäuse: N(P5) = 6, N(P7) = 9; \* $p < 0,05$  versus Kontrollen)

Zusammenfassung 3:

Die Perizyten cGKI KO Jungtiere zeigten ein vermindertes Körpergewicht im Vergleich zu ihren Kontrollgeschwistertieren. Ebenso war die Ausdehnung des Gefäßplexus sowie die Dichte des Gefäßnetzes in den Retinae der neonatalen Knockout-Tieren vermindert. Eine Abnahme der Bedeckung des Endothels durch Perizyten zeigte sich nicht.

### **3.4 Effekte der NPe auf die Expression von Angiotensinogen-1 in kultivierten Perizyten**

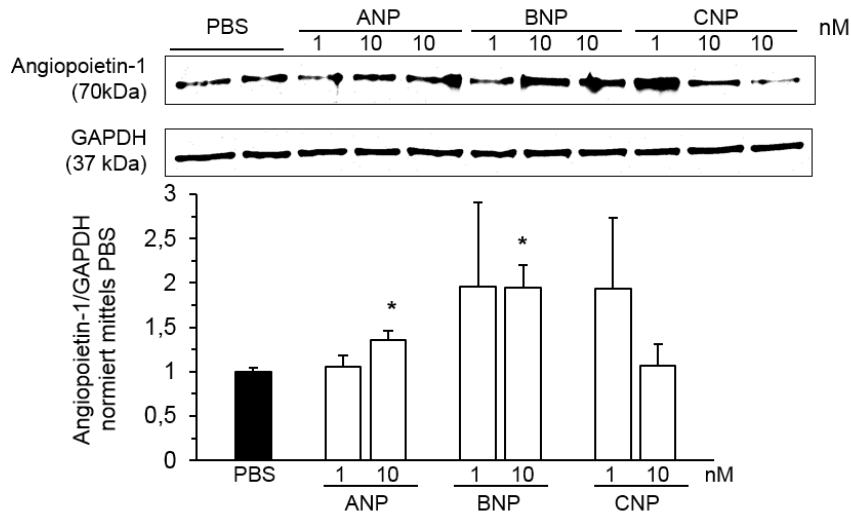
Die letzte Versuchsreihe dieser Dissertationsarbeit ging der Frage nach, ob die natriuretischen Peptide die Expression des proangiogenen Peptids Angiotensinogen-1 in kultivierten Perizyten induzieren. Aufgrund des Zeitmangels konnten nur wenige Experimente durchgeführt werden so dass die Ergebnisse keine finalen Schlussfolgerungen zulassen.

Die Inkubation von Perizytenzellkulturen mit unterschiedlichen Konzentrationen der natriuretischen Peptide ANP, BNP sowie CNP über einen Zeitraum von zwei Stunden, führte zu einem signifikanten Anstieg der Angiotensinogen-1 Expression nach Applikation von 10 nM ANP sowie 10 nM BNP (siehe Westernblot Analysen in Abb. 34).

Darauf folgend wurden kultivierte Perizyten, die aus Perizyten GC-A KO Mäusen sowie aus entsprechenden Kontrollgeschwistertieren isoliert wurden (siehe Kapitel 2.6.1) mit 1 oder 10 nM ANP oder BNP behandelt. In Kontroll-Perizyten führte 10 nM ANP sowie 1 nM BNP zu einem signifikanten Anstieg der Angiotensinogen-1 Expression. In GC-A-defizienten Perizyten war dieser Effekt aufgehoben (siehe Westernblot Analysen in Abb. 35).

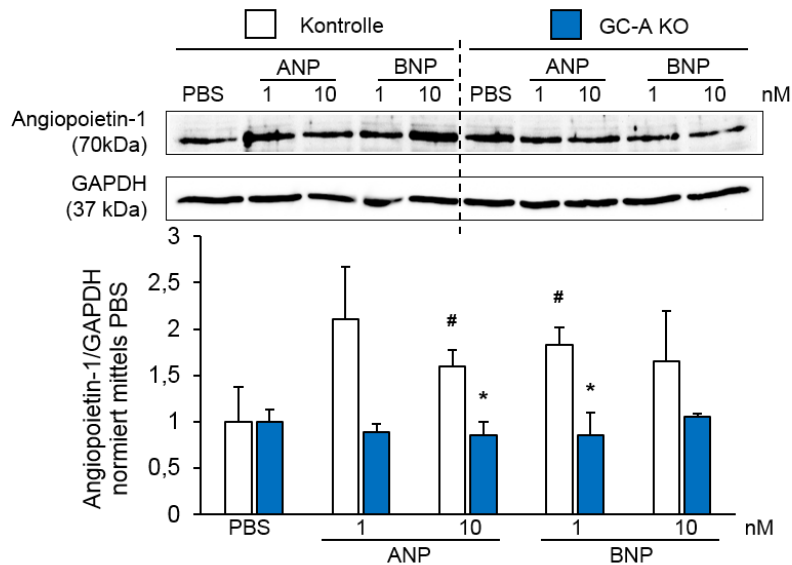
Analoge Versuche wurden mit 1 oder 10 nM CNP an kultivierten Perizyten von Perizyten GC-B KO Mäusen und entsprechenden Kontrollgeschwistertieren durchgeführt. In den Kontroll-Perizyten führte die Zugabe von 1 nM CNP zu einem leichten Anstieg des Angiotensinogen-1; dagegen hatte 10 nM CNP keinen deutlichen Effekt (siehe Abb. 36). Erstaunlicherweise führte die Behandlung von GC-B-defizienten Perizyten mit 1 nM oder 10 nM CNP zu einer Abnahme der Angiotensinogen-1 Expression.

Die Betrachtung dieser Ergebnisse legt einen Zusammenhang zwischen den natriuretischen Peptiden, welche an ihre entsprechenden Rezeptoren auf den Perizyten binden und dem Botenstoff Angiotensinogen-1, welcher über seinen Tie-2 Rezeptor eine wichtige Rolle während der Angiogenese spielt, nahe.



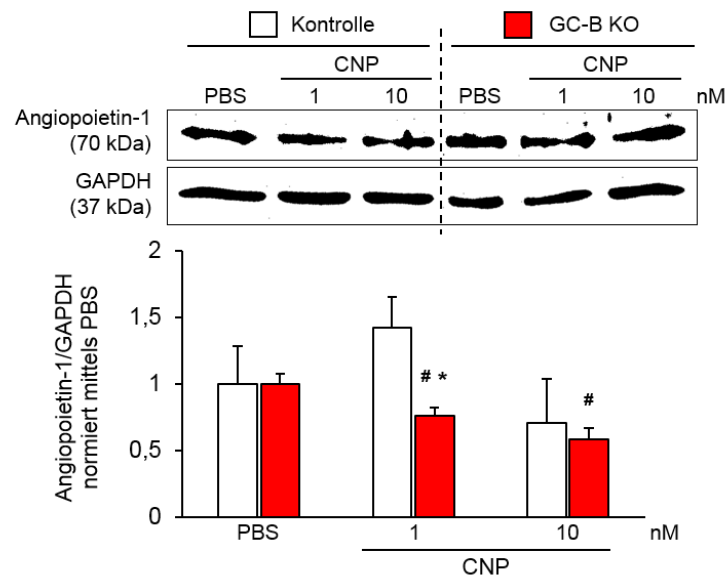
**Abb. 34** Westernblot-Analysen der Expression von Angiotensin-1 in kultivierten Perizyten: Einfluss der natriuretischen Peptide

Die Analysen des intrazellulären Angiotensin-1 nach zweistündiger Stimulation mit 1 nM oder 10 nM ANP, BNP oder CNP erfolgte mittels Westernblot. Es zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Ang-1 Expression nach der Stimulation mit 10 nM ANP sowie 10 nM BNP (\* $p < 0,05$  vs. PBS). Die Inkubation der Zellen mit 1 nM führte ebenfalls zu einem leichten Anstieg ( $p=0,07$ ). [ $n=3-5$ ]



**Abb. 35** Westernblot-Analysen der Expression von Angiotensin-1 in kultivierten Perizyten: Effekte von ANP und BNP auf Kontroll- und GC-A-defiziente Zellen

Perizytenzellkulturen aus Perizyten GC-A KO Mäusen sowie aus ihren Kontrollgeschwistertieren wurden für zwei Stunden mit 1 oder 10 nM ANP oder BNP stimuliert. Der Westernblot zeigt einen signifikanten Anstieg der Ang-1 Expression in Kontrollperizyten nach Stimulation mit 10 nM ANP sowie 1 nM BNP im Vergleich zu nicht stimulierten Perizyten (PBS). Diese Effekte von ANP und BNP waren in GC-A KO Perizyten aufgehoben. [ $n=2$ ] (\* $p < 0.05$  Perizyten GC-A KO vs. Kontrollen; # $p < 0.05$  vs. PBS)



**Abb. 36** Westernblot-Analysen der Expression von Angiopoietin-1 in kultivierten Perizyten: Effekt von CNP auf Kontroll- und GC-B-defiziente Zellen

*CNP (1 nM) führte zu einem leichten, nicht signifikanten Anstieg der Angiopoietin-1 Expression in Kontrollperizyten ( $P=0,06$ ). In GC-B-defizienten Perizyten war dieser Effekt aufgehoben; tendenziell führte CNP hier sogar zu einer Abnahme der Expression. [n = 2] ( $p < 0.05$  #vs. PBS und \*vs. Kontrollen)*



## 4 Diskussion

---

### 4.1 Ergebnisse im Überblick

Die Zusammenschau aller Ergebnisse lässt bezüglich der Frage, inwieweit die natriuretischen Peptide ANP, BNP und CNP und ihre entsprechenden Guanylylzyklase-Rezeptoren die Kommunikation zwischen Perizyten und Endothelzellen während der physiologischen Angiogenese stimulieren, folgende **Schlussfolgerungen** zu:

Sowohl der ANP und BNP bindende Guanylylzyklase-A-Rezeptor, als auch der CNP bindende Guanylylzyklase-B-Rezeptor auf Perizyten sind für eine normale postnatale Gefäßentwicklung in der Netzhaut der Maus von entscheidender Bedeutung. Eine perizytenspezifische Deletion des jeweiligen Rezeptors führt zu einer signifikanten Verminderung der Ausdehnung sowie der Dichte des Gefäßnetzes in der Knockout Maus. Eine damit einhergehende Verminderung der Bedeckung des Endothels durch die Perizyten zeigte sich nicht. Dies lässt vermuten, dass die NPe keinen direkten Einfluss auf das Wachstum der Perizyten haben, aber ihre proangiogene parakrine Kommunikation mit den Endothelzellen verbessern. Tatsächlich stellen meine Voruntersuchungen einen Zusammenhang zwischen den natriuretischen Peptiden, welche an ihre entsprechenden Rezeptoren auf den Perizyten binden und dem Botenstoff Angiopoietin-1, welcher über seinen Tie-2-Rezeptor an Endothelzellen eine wichtige Rolle während der Angiogenese spielen, her.

Auch Mäuse mit einer perizytenspezifischen Deletion der cGMP-abhängigen Proteinkinase vom Typ I (cGKI) zeigten eine retardierte und leicht verminderte Abnahme der postnatalen retinalen Angiogenese. Dies legt nahe, dass die cGKI als intrazellulärer Botenstoff die proangiogenen Effekte der natriuretischen Peptide vermittelt.

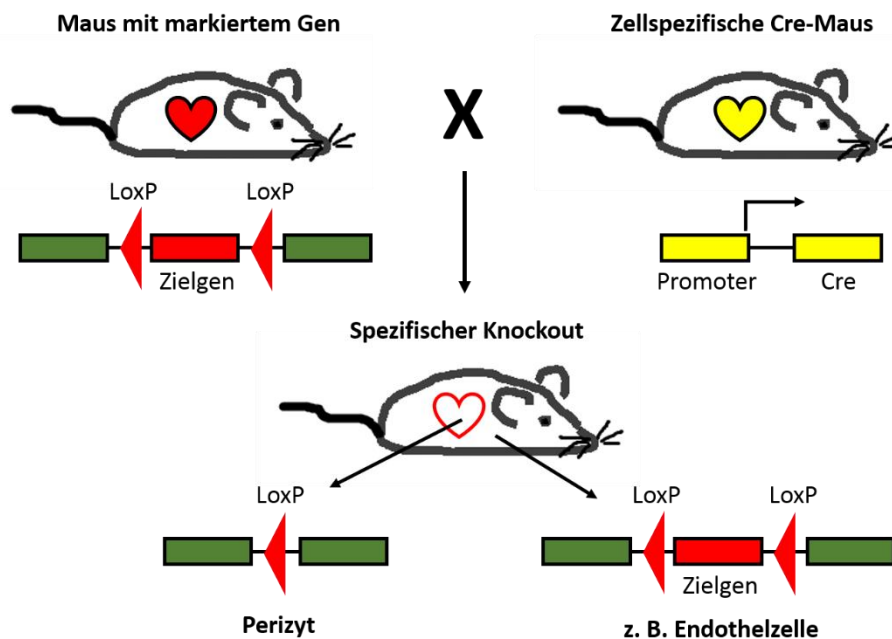
Die Deletion des GC-B Rezeptors oder der cGKI geht mit einer deutlichen Verminderung des Körpergewichts der neonatalen Tiere einher. Die Ursache wurde in der vorliegenden Dissertationsarbeit nicht untersucht. Dieser Phänotyp ist bei einer Deletion des GC-A Rezeptors nicht zu beobachten.

Eine Untersuchung des Gefäßstatus adulter Versuchstiere mit perizytenspezifischer Deletion des GC-A Rezeptors zeigte, dass diese auch im Erwachsenenalter noch eine signifikant verminderte Dichte des Gefäßnetzes aufweisen. Dies wurde in Tieren mit einer perizytenspezifischer Deletion des GC-B Rezeptors nicht beobachtet. Es finden sich in beiden Genotypen Geschlechts-unabhängig erhöhte systolische Blutdruckwerte. Zusammen mit anderen Befunden der Arbeitsgruppe belegen diese Ergebnisse, dass die NPe über Effekte an Perizyten nicht nur die physiologische Angiogenese stimulieren, sondern zudem den Widerstand der Mikrozirkulation und darüber den arteriellen Blutdruck mindern.

## **4.2 Vor- und Nachteile der Cre-LoxP-Strategie**

Genaue Tiermodelle menschlicher Krankheiten sind sowohl für das Verständnis der Krankheit als auch für die Bewertung therapeutischer Ansätze von unschätzbarem Wert (Sauer, 2006). Auch in dieser Arbeit stellt die zellspezifische Deletion der Guanylylzyklase-Rezeptoren auf Perizyten einen wichtigen Grundbaustein dar, um die Rolle natriuretischer Peptide während der Angiogenese genauer zu untersuchen. Hierfür wurde die Cre-LoxP-Strategie zur Ausschaltung der kodierenden Gene (Npr1, Npr2) in Perizyten genutzt, um die zellspezifischen Effekte der natriuretischen Peptide beobachten zu können. Cre ist dabei eine DNA-Rekombinase aus der Familie der Integrasen und ein nützliches molekulares Werkzeug, um präzise entworfene Mutationsänderungen im Genom zellspezifisch vorzunehmen (Sauer, 2006, Tsien et al., 1996). Die Cre-Rekombinase erkennt in die DNA gezielt eingebrachte LoxP-Stellen und schneidet die LoxP-flankierte, sogenannte „gefloxt“ DNA aus dem Genom aus. Mit dieser Strategie kann das zu untersuchende Gen inaktiviert oder mutiert werden (Kim et al., 2018). Da die LoxP-Sequenz im Genom höherer eukaryotischer Zellen nicht auf natürliche Weise vorkommt, ist eine effiziente Cre-medierte-Rekombination die ausschließlich an den gewünschten Stellen im Genom stattfindet möglich (Sauer, 2006). Um solch eine gefloxt Zielmaus zu generieren, wird in der Regel ein wichtiges Exon des Zielgens mittels homologer Rekombination in embryonalen Stammzellen durch zwei LoxP-Sequenzen flankiert und in die Keimbahn eingebracht. Da die LoxP-Sequenzen, in die das Exon flankierenden Introns eingebaut werden, bleibt die gefloxt Version des Gens funktionsfähig und die gefloxt Zielmaus unterscheidet sich phänotypisch nicht vom Wildtyp (Lukowski et al., 2005). Diese zwei Komponenten also eine Maus mit

entsprechenden LoxP-Sequenzen sowie eine zweite Maus, die Cre mit Hilfe eines Zelltyp-spezifischen Promoters exprimiert, werden dann zum Erzielen der Gendeletion kombiniert (Sauer, 2006). Um genauere genetische Funktionsstudien mit dem Cre-LoxP-System durchführen zu können, ist eine ausgefeiltere Technik erforderlich, die die Cre-Aktivierung in einer bestimmten Zelle steuert. Hierfür wendet man zellspezifische regulatorische Elemente sogenannte „Promotoren“ an (Kim et al., 2018).



**Abb. 37 Cre-LoxP-Strategie**

Die links dargestellte-Maus trägt ein Zielgen, in welchem eine kodierende Sequenz (in der Regel 1-2 Exone) von LoxP-Sequenzen (rote Pfeilspitzen) flankiert wird. Bei Kreuzung mit einer Maus, welche mit Hilfe eines zellspezifischen Promoters das Enzym Cre-Rekombinase nur just in diesen Zellen exprimiert, werden Nachkommen generiert, in welchen die Cre-vermittelte Rekombination das Zielgen zellspezifisch auslöscht. In anderen Zellen bleibt das Gen aktiv (Sauer, 2006). In der vorliegenden Dissertationsarbeit wurden Tiere genutzt, welche Cre mit Hilfe des Promoters von PDGFR $\beta$  in Perizyten exprimieren

Allerdings weist das Cre-LoxP-System trotz seiner weit verbreiteten Anwendung eine Reihe von Einschränkungen auf (McLellan et al., 2017). In diesem Zusammenhang sind zum Beispiel sogenannte „Off-Target“-Effekte des Cre zu nennen. Während bestimmte Promotoren und Enhancer nützlich sind, um die Auswahl der Zellen, die das Cre exprimieren, einzugrenzen, kann eine potenzielle Cre-Expression in anderen Zielzellen die Interpretation der Daten verfälschen (Soriano, 1999). In diesem Zusammenhang ist auch die Tatsache zu nennen, dass der PDGF-Rezeptor- $\beta$  und somit die Cre-Rekombinase die durch den Promoter dieses Gens angeschaltet wird, nicht

ausschließlich in Perizyten sondern auch in glatten Muskelzellen distaler Arteriolen (Špiranec et al., 2018), sowie in bestimmten Fibroblastenpopulationen (Henderson et al., 2013) und Darmzellen (Wang et al., 2019) exprimiert wird.

Eine weitere Einschränkung des Cre-LoxP-Systems ist die Unmöglichkeit die Zielzellen organspezifisch zu untersuchen (McLellan et al., 2017). So kann etwa in der vorliegenden Arbeit ein systemischer Effekt durch die Gendeletion in den Perizyten, der einen Einfluss auf die Gefäßentwicklung in der Retina nimmt neben den lokalen Effekten auf die Interaktion zwischen Perizyten und Endothel, nicht ausgeschlossen werden. Ein weiterer Störfaktor der Cre-LoxP-Strategie stellt zudem eine mögliche Toxizität der Cre-Rekombinase in den exprimierenden Zellen dar. In diesem Zusammenhang wurde bei hoher Cre-Aktivität in vitro gezeigt, dass die Cre-Expression zu aberranter DNA-Rekombination und Chromosomendefekten führen kann oder auch zu verändertem Zellwachstum (Loonstra et al., 2001).

Allerdings wurden solche Effekte für die hier verwendeten Tamoxifen-abhängige PDGFR $\beta$ -Cre<sup>ERT2</sup> durch behutsame Untersuchungen der generierenden Arbeitsgruppe ausgeschlossen (Eilken et al., 2017, Špiranec et al., 2018, Špiranec Spes et al., 2020b)

### **4.3 Physiologische Angiogenese in der Retina**

Das Hauptaugenmerk dieser Arbeit liegt auf dem Ablauf der physiologischen Angiogenese in der Retina. Aufgrund des komplexen Zusammenspiels der beteiligten Zellen ist eine Untersuchung dieses Vorgangs nur in vivo möglich. So diente die Netzhaut der Maus als ein Modell, welches bereits in den letzten Jahrzehnten ausgiebig zur Untersuchung der physiologischen und pathologischen Angiogenese herangezogen wurde (Stahl et al., 2010).

#### **4.3.1 Die Retina als Angiogenesemodell**

Die Entwicklung des Netzhautgefäßsystems basiert wie bereits in der Einleitung ausführlich dargelegt, auf einer streng koordinierten Signalübertragung zwischen den verschiedenen Zelltypen der Netzhaut. Hierbei spielen sowohl interne Stoffwechselanforderungen als auch externe Einflüsse wie die Zufuhr von Sauerstoff und Nährstoffen eine entscheidende Rolle. Das Netzhautgefäßsystem der Maus ist daher ein nützliches Modell zur Untersuchung dieser Wechselwirkungen, da es experimentell sowohl für intraokulare Injektionen und genetische Manipulationen

zugänglich ist, als auch gut mikroskopisch betrachtet werden kann und sich das Gefäßnetz auf ähnliche Weise wie das des Mensch entwickelt (Selvam et al., 2018). Somit haben sich im Laufe der Zeit verschiedene Maus-Retina-Modelle zu gut charakterisierten und robusten Werkzeugen in der Angiogeneseforschung entwickelt (Stahl et al., 2010). Insbesondere die Einführung induzierbarer genetischer Mausmodelle hat die Möglichkeiten verbessert, Signalwege zu untersuchen, die an der Entwicklung der Angiogenese beteiligt sind (Selvam et al., 2018).

#### **4.3.2 Veränderungen nach perizytenspezifischer Deletion der Guanylylzyklase-Rezeptoren GC-A oder GC-B**

Wie bereits einleitend erläutert führen die Beobachtungen, dass Mäusen mit einer globalen Deletion des ANP und BNP bindenden GC-A-Rezeptors eine deutlich verminderte Vaskularisierung der Netzhaut in der ersten Lebenswoche aufweisen und dass dieser Effekt nicht über den endothelialen GC-A-Rezeptor vermittelt wird (Špiranec Spes et al., 2020a) zu der Fragestellung dieser Dissertationsarbeit. Auch die wichtige Rolle der Perizyten, die die neu entstandenen Kapillaren umhüllen und stabilisieren, sowie ihre enge Wechselwirkung mit den ihnen anliegenden Endothelzellen während der Gefäßentwicklung (Caporarello et al., 2019) wurde einleitend ausführlich erläutert. Weiterhin wurde die Expression der Guanylylzyklase-Rezeptoren GC-A (für ANP/BNP) und GC-B (für CNP) auf Perizyten nachgewiesen (Špiranec et al., 2018, Špiranec Spes et al., 2020a). Daher war das Ziel dieser Arbeit zu untersuchen, inwieweit die natriuretischen Peptide ANP, BNP und CNP über ihre Guanylylzyklase-Rezeptoren auf Perizyten die Kommunikation zwischen Perizyten und Endothelzellen während der physiologischen Angiogenese beeinflussen.

Hierfür waren die genutzten genetischen Mausmodelle, die eine zellspezifische Deletion des GC-A- und GC-B-Rezeptors auf Perizyten ermöglichten unersetzlich. Die gewonnenen Ergebnisse zeigen ein verzögertes Gefäßwachstum mit einer Verringerung der Gefäßdichte sowohl in den Tieren mit perizytenspezifischer Deletion des GC-A-Rezeptors, als auch den Tieren mit einer perizytenspezifischen GC-B-Rezeptor-Deletion. Insgesamt konnten die durchgeführten Versuche somit zeigen, dass alle drei natriuretischen Peptide die Interaktion zwischen Perizyten und Endothelzellen verbessern und eine wichtige Rolle in der physiologisch ablaufenden Angiogenese spielen.

### **4.3.3 *Das Wachstum und die Vitalität von GC-A-, GC-B- oder cGKI-defizienten Perizyten erscheint unverändert***

Ein denkbarer Störfaktor dieses Resultats stellt eine Verminderung der Perizytenpopulation selbst, aufgrund der Gendeletion oder auch durch toxische Effekte der Cre-Rekombinase (Loonstra et al., 2001) dar. Ein Perizytenverlust kann zum Beispiel bei der diabetischen Retinopathie und anderen ischämischen Netzhauterkrankungen beobachtet werden (Beltramo and Porta, 2013). Ebenso wurde gezeigt, dass Mäuse mit verringerter PDGF-Aktivität und Perizytenbedeckung der Netzhautgefäße eine pathologische Angiogenese aufweisen und in diesem Zusammenhang eine diabetische Retinopathie entwickeln. Eine Perizytenfunktionsstörung führt somit zu einer Reihe von Gefäßveränderungen sowie dem Verlust bereits gebildete Gefäße (Gariano and Gardner, 2005). Die Evaluation der Perizytenbedeckung der Kapillargefäße in dieser Arbeit, zeigte jedoch keine Unterschiede zwischen den Knockout-Versuchstieren und ihren Wurfgeschwistern bezüglich der Umhüllung des Endothels mit Perizyten. Dies stützt die These, dass die beobachteten Veränderungen auf eine gestörte Interaktion zwischen Perizyten und Endothelzellen zurückzuführen sind.

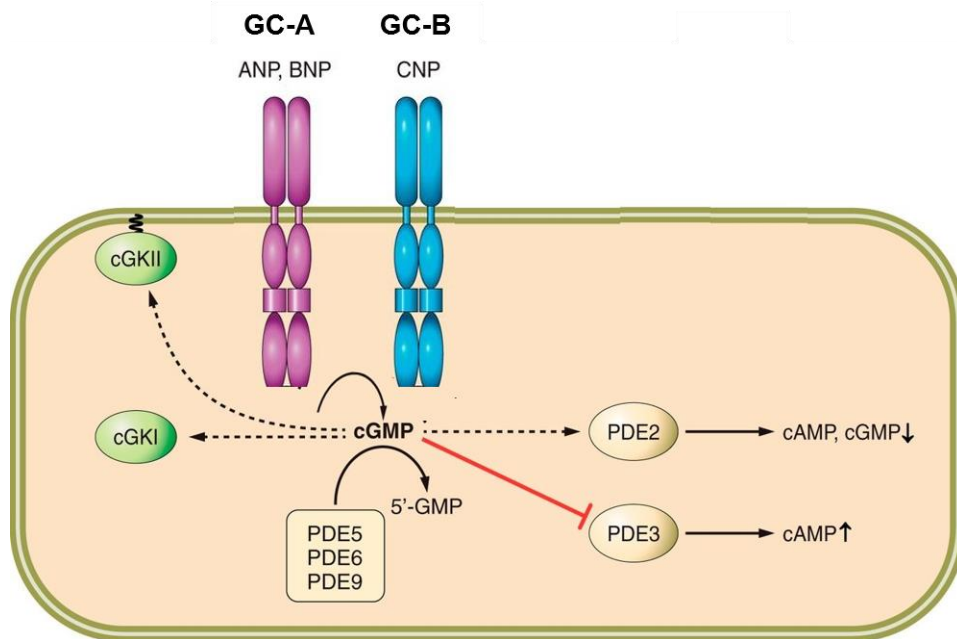
Dennoch ist die Aussagekraft dieser Untersuchung limitiert, da durch die Färbungen der Retina mittels anti-NG2-Antikörpern zur Darstellung der Perizyten sowie mittels Isolectin zur Darstellung der Endothelzellen nur „reaktive Flächen“, nicht jedoch eine genaue Zellzahl dargestellt wurde.

## **4.4 *Signalvermittlung der natriuretischen Peptide in Perizyten***

Die Dissertationsarbeit untersuchte auch die Frage über welchen intrazellulären „dritten“ Post-Rezeptor Signalträger die weitere Signalverarbeitung nach der Bindung eines natriuretischen Peptids an seinen jeweiligen Guanylylzyklase-Rezeptor vermittelt wird.

### **4.4.1 *Signalwegtransduktion der Guanylylzyklase-Rezeptoren in Perizyten***

GC-A und GC-B sind Hormonrezeptoren, die bei Aktivierung intrazellulär cGMP synthetisieren (Kuhn, 2016). Dieses kann nachfolgend prinzipiell unterschiedliche Signalwege in der Zelle regulieren (siehe Abb. 38):



**Abb. 38 Signalwege der Guanylylzyklase-Rezeptoren A und B**

Die unterschiedlichen Effekte der Guanylylzyklase-Rezeptoren nach Aktivierung durch ANP, BNP oder CNP werden über das von diesen synthetisierte cGMP vermittelt. Die führt zum Beispiel zur Aktivierung cGMP-abhängiger Proteinkinasen. Die cGMP-abhängige Proteinkinase Typ II (cGKII) ist dabei eine in der Membran verankerte Form, welche ausschließlich im juxtaglomerulären Apparat der Niere, in adrenalen Zellen der Zona glomerulosa, in Chondrozyten, verschiedenen Gruppen von Neuronen und im Darmepithel exprimiert wird. Auch die cGMP-abhängige Proteinkinase Typ I (cGKI), welche fast ubiquitär vorkommt, wird aktiviert sowie bestimmte Phosphodiesterasen (PDEs) mittels cGMP moduliert. Die PDE2 sowie die PDE3 beispielsweise hydrolysieren beide cAMP, die PDE2 wird dabei durch cGMP stimuliert, die PDE3 hingegen gehemmt und somit cGMP abhängig der cAMP-Spiegel in der jeweiligen Zelle eingestellt. Die intrazelluläre cGMP-Konzentration selbst wird vor allem über die PDE5 (ubiquitär) und die PDE9 (z.B. im zentralen Nervensystem und in Kardiomyozyten) reguliert.

[Abbildung entnommen und adaptiert aus (Kuhn, 2016)]

Zum einen ist eine Aktivierung der cGMP-abhängigen Proteinkinasen I und II möglich. Die cGMP-abhängige Proteinkinase Typ II (cGKII), eine in der Membran verankerte Form, wird dabei im juxtaglomerulären Apparat der Niere, in adrenalen Zona glomerulosa Zellen, in verschiedenen Gruppen von Neuronen sowie in hoher Dichte im Darmepithel exprimiert. Die cGMP-abhängige Proteinkinase Typ I (cGKI) kommt nahezu ubiquitär vor. Eine weitere Möglichkeit der Signaltransduktion stellt die Modulierung bestimmter Phosphodiesterasen (PDEs) mittels cGMP dar. Als Beispiel seien hier die Phosphodiesterasen 2 und 3 aufgeführt, die beide zyklisches Adenosin-Monophosphat (cAMP) hydrolysieren. Die PDE3 wird dabei von cGMP gehemmt, die PDE2 hingegen durch cGMP stimuliert (Kuhn, 2016). Somit wird je nach Expression der Phosphodiesterasen in der Zelle durch cGMP der cAMP-Spiegel erhöht oder erniedrigt. Der cGMP-Spiegel selbst wiederum wird vor allem über die Phosphodiesterasen 5 oder

im zentralen Nervensystem und in Kardiomyozyten auch über die PDE9 reguliert bzw. abgebaut (Kuhn, 2016).

Aufgrund des Vorkommens der cGKI in den meisten Zelltypen, habe ich mich in dieser Dissertationsarbeit auf die cGMP-abhängige Proteinkinase vom Typ I als möglicher Kandidat für die intrazelluläre Weiterleitung des durch NPe ausgelösten cGMP-Signals konzentriert. Tatsächlich wurde die Bedeutung dieser Proteinkinase für eine funktionierende Angiogenese bereits zuvor publiziert (Aicher et al., 2009). Die Untersuchung neonataler Mäuse mit perizyten-spezifischer cGKI-Deletion zeigte ähnlich den beobachteten Effekten in den GC-A- und GC-B-KO Tieren eine Verminderung der Gefäßbildung in der Retina. Dies stützt die These, dass cGKI die Effekte der NPe auf Perizyten vermittelt.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass in Perizyten CNP und ANP über die Aktivierung der cGKI eine Phosphorylierung des Zytoskelett-assoziierten Vasodilatator-stimulierten Phosphoproteins (VASP) hervorrufen (Špiranec et al., 2018). VASP, ein Mitglied der Ena/Mena/Vasp-Familie, ist ein Aktin-bindendes Protein, das an zwei Stellen mit unterschiedlicher Präferenz durch Proteinkinasen, wie die cGKI phosphoryliert wird und dementsprechend die Zellproliferation verstärkt oder vermindert (Hofmann, 2005). Mehrere Studien weisen auch darauf hin, dass das cGMP/cGKI-System die vaskuläre Zellproliferation durch die Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK) und den Phosphatidylinositol-3-Kinase/Akt-Kinase-Weg fördert (Hofmann et al., 2006). Über welche Zielproteine die cGKI die in dieser Arbeit gezeigten Effekte der NPe genau vermittelt, muss allerdings in weiteren Studien untersucht werden.

#### **4.4.2 Bedeutung des parakrinen Faktors Angiopoietin-1**

Wie bereits einleitend dargestellt gibt es neben den natriuretischen Peptiden eine Vielzahl weiterer Faktoren, die eine wichtige Rolle in der Interaktion zwischen Perizyten und Endothelzellen spielen. Im Rahmen dieser Dissertation habe ich die Expression von Angiopoietin-1, welches von Perizyten *in vitro* und *in vivo* exprimiert wird und eine wichtige Rolle bei der Gefäßentwicklung und -reifung spielt (Sundberg et al., 2002) untersucht. Untersuchungen der Sekretion von Angiopoietin-1 konnten leider nicht durchgeführt werden, da es keinen spezifischen Assay hierfür gibt.

Die Ergebnisse zeigten, dass eine Inkubation von Perizytenzellkulturen mit unterschiedlichen Konzentrationen von NPe zu einem Anstieg der Angiopoietin-1 Expression führt. Ein entsprechender Anstieg der Angiopoietin-1 Expression nach Stimulation mit ANP bzw. BNP blieb in GC-A-defizienten Perizyten aus. In analogen



Versuchen mit kultivierten Perizyten von Perizyten GC-B KO Mäusen und entsprechenden Kontrollgeschwistertieren führte die Zugabe von CNP in der Kontrollgruppe zu einem leichten Anstieg des Angiopoietin-1 Expression, in den GC-B-defizienten Perizyten sogar zu einer Abnahme der Angiopoietin-1 Expression.

Aufgrund der geringen Anzahl an Experimente lassen die Ergebnisse keine finalen Schlussfolgerungen zu, die Ergebnisse legen allerdings einen Zusammenhang zwischen den natriuretischen Peptiden und dem Botenstoff Angiopoietin-1 nahe.

Es ist bekannt, dass das parakrin wirksame Hormon Angiopoietin Ligand für die Rezeptor-Tyrosinkinase Tie-2 sowohl für die Instandhaltung des Gefäßsystems, als auch für das Anstoßen der Angiogenese von großer Bedeutung ist (Fukuhara et al., 2010). Die Rolle des Angiopoietin/Tie2-Systems wurde dabei vielfach untersucht, diese Studien beziehen sich zum Großteil jedoch auf die Endothelzellen (Park et al., 2003). Dort hat das Angiopoietin-1 eine gefäßprotektive Wirkung, es stärkt die endotheliale Barriere und verhindert Entzündungsprozesse sowie Zelltod. Die Bedeutung des Ang-1 für die Gefäßentwicklung wird in genveränderten Mäusen welche den Tie-2 Rezeptor nicht mehr exprimieren deutlich. Diese Tiere sterben alle um den zwölften Lebensstag und die sich geformten Gefäße zeigen eine verminderte Dichte mit Gefäßdilatationen, reduzierter Verzweigung und verminderter Anzahl an Kapillaren (Brindle et al., 2006). Park et al. untersuchte in einer Studie an Perizyten aus der Netzhaut von Rindern die Effekte von VEGF und Hypoxie, beides bekannte Stimuli der Angiogenese, auf das Angiopoietin/Tie2-System. Er zeigte, dass beide Stimuli zu einer signifikant verstärkten Expression der Angiopoietin-1 mRNA in Perizyten führen (Park et al., 2003). Medium, welches aus diesen hypoxischen Perizyten gewonnen wurde, konnte im Anschluss endotheliale Zellmigration und die Formung von Gefäßen induzieren. Der Einsatz eines Anti-Angiopoietin-1 Antikörpers wiederum verhinderte diese Effekte (Park et al., 2016). Ultrastrukturanalysen legen zudem nahe, dass Endothelzellen in Abwesenheit von Angiopoietin-1 schlecht mit der zugrunde liegenden Matrix assoziiert sind (Suri et al., 1996). Da diese Studien zeigen, dass die Kommunikation zwischen Perizyten und Endothelzellen neben anderen Faktoren auch durch den Ang-1/Tie-2-Signalweg reguliert wird, wird angenommen, dass die parakrine Ang-1/Tie-2-Signalschleife entgegengesetzte Tendenzen zum PDGF-B/PDGFR $\beta$ -Signalweg aufweist und Endothelreifung und -stabilität vermittelt. Obwohl das Ausschalten des Ang-1 im Tierversuch zeigte, dass dieses Gen für die Perizytenrekrutierung nicht erforderlich ist, ist die Sekretion von Ang-1 durch die Perizyten notwendig für die Bildung neuer Gefäße sowie für die Gefäßreifung (Caporarello et al., 2019). Mittlerweile haben Studien eine

Expression des Tie-Rezeptors nicht nur auf Endothelzellen, sondern auch auf Perizyten demonstriert. Die Expression von Angiopoietin-1 durch die Perizyten aktiviert somit in Abwesenheit von Angiopoietin-2 (Ang-2) Tie2-Rezeptoren sowohl auf Perizyten als auch auf ECs und löst nachgeschaltete Signalwege aus, die zur Gefäßreifung beitragen. In Gegenwart von Ang-2, das fast ausschließlich von Endothelzellen exprimiert wird, werden die Tie2-Rezeptoren jedoch gehemmt, was die Ablösung und Migration von Perizyten von der Endothelschicht und neue angiogene Aktivitäten fördert (Cathery et al., 2018). Des Weiteren steigerte Sildenafil, ein Phosphodiesterase-5-Inhibitor, welcher einem Anstieg des cGMPs in der Zelle hervorruft, nach Herzmuskelischämie die Angiogenese und verhinderte die Apoptose von Endothelzellen. Dies ging mit einem Anstieg der VEGF und Ang-1 mRNA im Myokard einher (Koneru et al., 2008). Dies stützt die These, dass ein Zusammenhang zwischen den NPe, die an ihre entsprechenden Rezeptoren auf den Perizyten binden und zur Bildung von cGMP führen und dem Botenstoff Angiopoietin-1, welcher über seinen Tie-2 Rezeptor eine wichtige Rolle während der Angiogenese spielt, gibt.

## **4.5 Systemische Effekte der perizytenspezifischen Guanylylzyklasedeletion**

### **4.5.1 Unterschiede im Körpergewicht der verschiedenen Genotypen**

Wie im Kapitel 3.1.1 beschrieben, hatten neonatale Mäuse mit perizytenspezifischer Deletion des GC-A-Rezeptors kein verändertes Körpergewicht. Es ist somit auszuschließen, dass ihre retardierte Gefäßentwicklung der Netzhaut durch ein generelles Entwicklungsproblem verursacht wurde.

Überraschenderweise zeigten die Perizyten GC-B KO und cGKI KO Tiere eine signifikante Verminderung des Körpergewichts verglichen mit ihren Kontrollgeschwistertieren, wobei dieser Phänotyp bei den cGKI KO Tieren sogar noch ausgeprägter war (siehe Kapitel 3.2.1 und 3.3.1).

Mögliche Erklärungen dieser Veränderungen sind zum einen eine verminderte Nahrungsresorption der Knockout-Tiere aufgrund einer gestörten Motilität des Gastrointestinaltrakts (GI-Trakt), zum anderen ein reduziertes Skelettwachstum der Tiere:

Wie bereits in Kapitel 4.2 ausführlich erläutert, ist nicht auszuschließen, dass die mittels des PDGF-Rezeptor- $\beta$  und der Cre-Rekombinase erzielte Deletion der Guanylylzyklase-Rezeptoren in Perizyten weitere Zellen betrifft. So wurde eine entsprechende Deletion bereits für die glatten Muskelzellen distaler Arteriolen gezeigt (Špiranec et al., 2018). Weiterhin ist bekannt, dass die Kontraktilität glatter Muskelzellen essentiell für viele wichtige biologische Prozesse wie die Gefäßdurchblutung, die kardiovaskuläre Homöostase und die gastrointestinale Motilität ist (Pfeifer et al., 1998). Bereits einleitend wurden auch die kontraktile Eigenschaften der Perizyten angesprochen. Perizyten können die Perfusion von Gefäßen aufgrund eines hohen Gehalts an  $\alpha$ -Aktin, Tropomyosin und Myosin regulieren (Allt and Lawrenson, 2001), denn dieses verleiht ihnen ähnlich der glatten Muskelzellen größerer Arterien und Arteriolen Kontraktionsfähigkeit. Perizyten exprimieren des Weiteren sowohl cholinerge Rezeptoren als auch die adrenergen Rezeptoren  $\alpha$ -2 und  $\beta$ -2. Insbesondere die Aktivierung des  $\alpha$ -2-Rezeptors führt zu einer Kontraktion, während die  $\beta$ -2-Stimulation eine Perizytenrelaxation bewirkt (Caporarello et al., 2019, Allt and Lawrenson, 2001, Díaz-Flores et al., 1991). Wenn man sich nun vor Augen führt, dass CNP eine wichtige Rolle im GI-Trakt spielt liegt ein Zusammenhang nahe (An et al., 2019). CNP kann zum Beispiel die spontane Kontraktion der zirkulären und longitudinalen glatten Muskulatur des Magens hemmen, wobei dieser Effekt über einen cGMP-abhängigen Signalweg vermittelt wird (Guo et al., 2003). Es wurde gezeigt, dass eine Applikation von CNP die vorübergehende cGMP-Produktion in Pylorus, Dickdarm und Rektum erhöht und die Magenentleerung bei Mäusen verstärkt (Sogawa et al., 2013). Dieser Anstieg der cGMP-Spiegel ist jedoch bei Mäusen, die einen Mangel an GC-B-Rezeptoren aufweisen nicht nachweisbar (Sogawa et al., 2010). Darüber hinaus wird der GC-B-Rezeptor im Pylorus, im Dickdarm und im Rektum in Nervenfasern sowie in den glatten Muskelzellen des GI-Trakts und der Blutgefäße exprimiert (Sogawa et al., 2013) und es konnte gezeigt werden, dass ein Verlust der cGKI die durch Stickstoff vermittelte cGMP abhängige Relaxation glatter Muskelzellen verhindert und daraus eine schwere vaskuläre und intestinale Dysfunktion resultiert (Pfeifer et al., 1998). Somit erscheint ein Zusammenhang zwischen dem beobachteten verminderten Körpergewicht nach einer Deletion der cGKI oder des GC-B-Rezeptors und einer intestinalen Dysfunktion naheliegend, zumal der PDGFR- $\beta$  auch in Darmzellen (Wang et al., 2019) exprimiert wird.

Auch eine verminderte Nahrungsresorption verursacht durch eine schlechtere Durchblutung des Magendarmtrakts erscheint hier plausibel, da gezeigt werden konnte,

dass CNP über seine Wirkung auf Perizyten, die Mikrozirkulation und den Blutdruck beeinflusst (Špiranec et al., 2018) und eine Existenz von Perizyten im GI-Trakt gezeigt wurde (Ramirez et al., 2019), wohingegen ANP keine vasokonstriktive Wirkung auf das gastrointestinale Gefäßsystem zugeschrieben wird (Špiranec Spes et al., 2020b, Woods and Smolich, 1991).

Eine weitere mögliche Ursache für das beobachtete verminderte Körpergewicht stellt ein vermindertes Skelettwachstum in den Perizyten GC-B beziehungsweise cGKI KO Tieren dar. Auch dort spielt das CNP während der enchondralen Ossifikation eine wichtige Rolle (Kuhn, 2016). Es ist bekannt, dass Mäuse, die eine Mutation in einem Allel des GC-B-kodierenden Genabschnitts aufweisen phänotypisch kleinwüchsig sind. In Mäusen, welche dieses Gen homozygot besitzen, führt diese Mutation zu Minderwuchs und frühem Tod zusammen mit einer Nahrungsmittelretention im Magen (Sogawa et al., 2010, Dickey et al., 2016). Ebenso führt eine gezielte Ausschaltung des CNPs in Mäusen zu schwerem Kleinwuchs infolge einer beeinträchtigten endochondralen Ossifikation (Komatsu et al., 2002). Für ANP und BNP konnte hingegen gezeigt werden, dass sie unter physiologischen Bedingungen nicht an der endochondralen Ossifikation beteiligt sind (Chusho et al., 2001). Wichtig in diesem Zusammenhang ist die Fähigkeit der Perizyten sich in Osteoblasten und Osteozyten zu differenzieren. Dies konnte an endogenen Perizyten in vivo gezeigt werden, die somit als zelluläre Quelle osteogener Zellen dienen (Supakul et al., 2019).

#### **4.5.2 Erhöhung des arteriellen Blutdrucks bei Deletion des GC-A- oder GC-B-Rezeptors**

Die mittels Schwanzmanschette gemessenen Blutdruckwerte in den adulten perizytenspezifischen GC-A und GC-B KO Mäusen und ihren Kontrollgeschwistertieren zeigten einen geschlechterunabhängigen Anstieg des systolischen Blutdrucks in den Knockout-Tieren. Dies wirft die Frage nach möglichen Ursachen dieses Blutdruckanstiegs auf. Mögliche Erklärungen liegen in einem insgesamt verminderten Kapillarlumen, etwa durch eine verminderte Dichte des Kapillarnetzes, einem erhöhten Flüssigkeitsvolumen oder einem erhöhten Gefäßtonus, welcher mit einem erhöhten peripheren mikrovaskulären Widerstand einhergeht:

Für ANP und BNP sowie den ihnen gemeinsamen GC-A-Rezeptor ist die Beteiligung an der Regulation des arteriellen Blutdrucks schon lange bekannt (Kuhn, 2016). Bei einer

Erhöhung des Drucks und der damit einhergehenden Dehnung des Herzvorhofs kommt es zu einer Ausschüttung dieser Hormone, einer Aktivierung ihres gemeinsamen GC-A Rezeptors in unterschiedlichen Zellarten und einer Erhöhung der intrazellulären cGMP-Konzentration. Hierrüber wird in der Folge unter anderem die Diurese gesteigert und eine Vasodilatation bewirkt woraus ein Absenken des Blutdrucks resultiert (Špiranec Spes et al., 2020b). In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass sowohl Mäuse mit einer globalen Mangel an ANP an einer deutlichen Hypertonie leiden (Kuhn, 2016), als auch, dass genetische Variationen im Menschen, die mit einer Verminderung der Konzentration an zirkulierenden natriuretischen Peptide einhergehen mit einem erhöhten arteriellen Blutdruck assoziiert sind (Newton-Cheh et al., 2009).

Da, wie bereits erwähnt die Nieren sind an der blutdrucksenkenden Wirkung des ANPs über eine verstärkte Diurese sowie eine Erhöhung der glomerulären Filtrationsrate und des renalen Blutflusses beteiligt sind (Kuhn et al., 2009, Theilig and Wu, 2015) und Perizyten eine wichtige Rolle in der neurohumoralen Regulation der Nierenrinde und der medullären Nierendurchblutung inne haben (Kennedy-Lydon et al., 2015), liegt die Hypothese nahe, dass die gezeigte Blutdruckerhöhung in den Perizyten GC-A KO Tieren aus einem erhöhten Blutvolumen aufgrund einer Störung der renalen Diurese resultiert. Allerdings zeigten Studien an Perizyten GC-A KO-Mäusen und ihren Kontrollgeschwistertieren in metabolischen Käfigen keine genotypabhängigen Unterschiede im intravaskulären Volumen und der täglichen Urin- und Natrium Produktion (Špiranec Spes et al., 2020b). Daher erscheint es unwahrscheinlich, dass eine veränderte Nierenfunktion die Hauptursache für die beobachtete Hypertonie in den Knockout-Tieren darstellt. Es konnte in diesem Zusammenhang gezeigt werden, dass ANP vasodilatierend in den präkapillären Arteriolen und Kapillaren wirkt und einer Endothelin-1 induzierten Kontraktion der Perizyten in vitro und in situ entgegenwirkt, wohingegen die dilatativen Effekte des ANP in Perizyten GC-A KO Tieren aufgehoben waren (Špiranec Spes et al., 2020b). Da der mikrozirkulatorische Tonus einen wichtigen Beitrag zum gesamten peripheren Widerstand leistet (Levy et al., 2001) ist dies eine plausible Erklärung für die beobachtet Hypertonie in den Perizyten GC-A KO Mäusen. Allerdings bleibt der globale Beitrag der direkten gefäßerweiternden Wirkungen von ANP umstritten, da in den unterschiedlichen Gefäßbetten des Körpers variable Spiegel des GC-A-Rezeptors in der glatten Gefäßmuskulatur exprimiert werden (Kuhn, 2016) und andere Studien gezeigt haben, dass zum Beispiel die selektive Deletion des GC-A Rezeptors auf glatten Muskelzellen nur die akuten aber nicht die chronischen blutdruckregulierenden Effekte des ANP inhibiert (Holtwick et al., 2002, Špiranec Spes

et al., 2020b). Somit erscheint auch eine Kombination aus einer verminderten Kapillardichte wie sie im Rahmen dieser Arbeit in den Netzhäuten der adulten Perizyten GC-A KO Tiere gezeigt werden konnte zusammen mit einem erhöhten peripheren mikrovaskulären Widerstand als Ursache der beobachteten Hypertonie in diesen Tieren denkbar.

Die Rolle des CNP und seines GC-B-Rezeptors im Zusammenhang mit der Blutdruckregulation war lange weniger untersucht. Es war allerdings bekannt, dass das endotheliale CNP an der lokalen Regulation des Gefäßtonus beteiligt ist (Kuhn, 2016). Špiranec et al konnte mittels telemetrischer Aufzeichnungen und invasiver hämodynamischer Messungen bestätigen, dass perizytenspezifische GC-B KO Mäuse sowohl nachts als auch tagsüber eine leichte, aber konsistente arterielle Hypertonie, zusammen mit einem erhöhten peripheren Gesamtwiderstand aufweisen (Špiranec et al., 2018). Weder die Herzfrequenz noch die spontane Bewegungsaktivität oder kardiale kontraktile Parameter wie Herzzeitvolumen und Ejektionsfraktion unterschied sich dabei zwischen den Knockout-Tieren und der Kontrollpopulation. Eine Veränderung der Nierenperfusion, der Ausscheidungsfunktion oder der Reninaktivität konnte als Ursache ebenso ausgeschlossen werden (Špiranec et al., 2018). Zusammen mit den Ergebnissen der vorliegenden Dissertationsarbeit führt dies zu dem Fazit, dass das endotheliale Hormon CNP über die Regulation der Perizyten den peripheren mikrovaskulären Tonus moduliert und darüber den systemischen arteriellen Blutdruck mindert (Špiranec et al., 2018).

Insgesamt lässt sich also feststellen, dass sowohl die perizytenspezifische GC-A als auch GC-B Deletion zu einer Erhöhung des systolischen arteriellen Blutdrucks führt und dies mit einem erhöhten peripheren Widerstand (Špiranec et al., 2018, Špiranec Spes et al., 2020b) sowie einer geringeren kapillären Dichte einhergeht.

#### **4.6 Klinische Bedeutung der Ergebnisse**

Da Perizyten für die Bildung, Reifung und den Tonus, also die Perfusion, von Kapillaren entscheiden sind, sind sie gleichzeitig ein potenzieller Angriffspunkt sowohl proangiogener als auch anti-angiogener Therapien, sowie für den Blutdruck regulierende Medikamente (Allt and Lawrenson, 2001). Ein umfassenderes Verständnis darüber, wie

sich Perizyten während der Gefäßbildung sowohl im physiologischen als auch pathologischen Kontext verhalten und mit den Endothelzellen interagieren, ist daher entscheidend, um diese Prozesse therapeutisch beeinflussen zu können. Ein detaillierteres molekulares Verständnis der Interaktionen zwischen Perizyten und ECs ist somit ein herausfordernder, aber vielversprechender Ansatz in der Behandlung von Krankheiten, die mit einer beeinträchtigten Angiogenese einhergehen, um die stabilisierende Wirkung dieser Zellen auf das Endothel steuern zu können (Caporali et al., 2017). Die Erforschung dieser Zellen kann dabei nicht nur zur Identifizierung neuer Angriffspunkte in der Therapie verschiedener Krankheiten die mit einer Perizytenfunktionsstörung verbunden sind beitragen, sondern auch die zukünftige Verwendung dieses Zelltyps im Rahmen einer zellbasierten regenerativen Medizin, auf Basis der Stammzellenfunktion der Perizyten fördern (van Dijk et al., 2015, Caporarello et al., 2019, Meyers et al., 2018).

#### **4.6.1 *Klinische Implikationen***

Die Angiogenese ist physiologisch nicht nur während der Entwicklung und dem Wachstum des Organismus von Bedeutung. Sie ist auch essentiell in der Wundheilung (Caporali et al., 2017, Jennewein et al., 2016) oder im Zuge einer Anpassung von Gewebe an Hypoxie, zum Beispiel im Rahmen einer Myokardischämie (Rautureau and Baxter, 2004) oder einer peripheren arteriellen Verschlusskrankheit (pAVK) (Bubb et al., 2019). In unterschiedlichen Studien wurde die Bedeutung der NPe in diesem Zusammenhang bereits hervorgehoben:

So wurde gezeigt, dass eine Behandlung mit BNP die Herzfunktion nach einem Myokardinfarkt verbessert sowie die Myokarddilatation verringert (Lyu et al., 2014). Die Wirkung ist dabei auch auf eine verbesserte Neovaskularisation in den infarzierten Teilen des Herzens zurückzuführen (Li et al., 2020).

Bezüglich der pAVK wurde gezeigt, dass eine Aktivierung des NPe/cGMP/cGKI-Signalwegs die Gefäßregeneration und die Wiederherstellung des Blutflusses nach einer Ligatur der Arteria femoralis in Mäusen beschleunigt (Park et al., 2008) und die durch die Ischämie induzierten Angiogenese fördert (Yamahara et al., 2003). Für Carperitid, ein synthetisches ANP konnten bereits therapeutische Effekte bei der Behandlung der pAVK nachgewiesen werden, welche nicht nur auf eine initiale gefäßerweiternde Wirkung des ANP zurückzuführen sind, sondern als Effekte, die aus einer Regeneration von Gefäßen resultieren angesehen werden (Park et al., 2008).

Um in diesem Gebiet der Neoangiogenese nach Ischämie weitere Therapien entwickeln zu können ist ein genaueres Verständnis der, der Angiogenese zugrundeliegenden Prozesse unerlässlich. Daher war es das Ziel dieser Dissertationsarbeit einen Beitrag zu einem besseren Verständnis der Angiogenese zu leisten und es wurde gezeigt, dass die natriuretischen Peptide über die Interaktion zwischen Endothelzellen und Perizyten für ein normales Gefäßwachstum unerlässlich sind.

Die synthetische Analoga von ANP (Anaritid und Carperitid) und BNP (Nesiritid) gelten allerdings nicht nur als mögliche Therapeutika in der Behandlung des Myokardinfarkts und der pAVK, sondern auch der dekompensierten Herzinsuffizienz und des Bluthochdrucks und vielversprechende Studien hierzu sind im Gange (Abuzaanona and Lanfear, 2017, Bubb et al., 2019, Kawase et al., 2018, Meems and Burnett, 2016, Potter et al., 2009, Tong and Rozner, 2009, Vinnakota and Chen, 2020).

Die Herzhypertrophie ist in diesem Spektrum an Erkrankungen eine häufige und oft tödliche Komplikation der arteriellen Hypertonie. Allerdings kann eine Erhöhung der cGMP-Spiegel in Myozyten, durch die lokale Wirkung endogenen ANPs und CNPs oder durch eine pharmakologische Hemmung der Phosphodiesterase-5, der pathologischen Hypertrophie entgegenwirken. Ein Verlust der cGKI in Herzmuskelzellen andererseits führt zu einer pathologischen Stimulation der Hypertrophie und macht das Herz anfälliger für Funktionsstörungen (Frantz et al., 2013). Hier gibt es bereits zugelassenes Medikament, den Neprilysin-Inhibitor Sacubitril, der in Kombination mit Valsartan (Handelsname: Entresto®) zur Behandlung einer symptomatischen, chronischen Herzinsuffizienz mit reduzierter Ejektionsfraktion zugelassen ist (Vinnakota and Chen, 2020) und den Abbau natriuretischer Peptide verringert (Pfau et al., 2019). Die lokalen Konzentrationen der NPe werden über den NPR-C-Rezeptor vermittelte Internalisierung gesenkt (Potter et al., 2006), sowie über den Abbau durch das Enzym Neprilysin (Vinnakota and Chen, 2020). Dies ist eine zinkabhängige Endopeptidase mit ubiquitärer Verbreitung und es wird angenommen, dass ein Großteil der Auswirkungen, welche die Hemmung des Neprilysin hervorruft, auf die Verbesserung der Bioaktivität natriuretischer Peptide zurückzuführen ist (Bayes-Genis et al., 2016). Es konnte in diesem Zusammenhang gezeigt werden, dass neben einer Förderung der Vasodilatation die natriuretische Peptide ANP und BNP einer Hypertrophie der Kardiomyozyten sowie einer Myokardfibrose entgegenwirken und Angiogenese induzieren. Insgesamt beruht die Wirkung von Entresto® somit nicht nur auf einer Senkung der Vor- und Nachlast des



Herzens, sondern auch auf einer verbesserten Myokardperfusion und Verminderung pathologischer Umbauprozesse (Pfau et al., 2019). Dies lässt in Zusammenschau mit den Ergebnissen dieser Dissertationsarbeit auch eine verbesserte Mikrozirkulation des Herzens vermuten.

#### **4.6.2 Bedeutung bei der pathologischen Neoangiogenese**

Es existiert allerdings auch eine Reihe an Erkrankungen, denen nicht mittels einer Verbesserung der Perfusion entgegengewirkt werden kann, sondern an deren Entwicklung eine pathologische Angiogenese maßgeblich beteiligt ist. Beispielsweise seien hier Retinopathien und die Tumorangio-genese genannt (Caporarello et al., 2019, O'Farrell and Atwell, 2014). Für diese Erkrankungen ist eine Beteiligung der Perizyten beschrieben. So sind etwa entzündungsfördernde Moleküle wie IL-10, TGF- $\beta$  und MHC-II, die in aktivierten Perizyten des Glioblastoms erhöht sind, für das Tumorstadium mitverantwortlich (Cheng et al., 2013).

Eine besondere Stellung nimmt die **diabetische Retinopathie** ein. Die Prävalenz des Diabetes mellitus nimmt weltweit zu und damit auch die Folgen dieser Erkrankung. Die diabetische Retinopathie (DR) ist dabei in Industrieländern eine der Hauptursachen für einen Sehverlust bei Erwachsenen und betrifft weltweit etwa 4,2 Millionen Menschen (Hendrick et al., 2015).

Die DR kann als mikrovaskuläre Erkrankung beschrieben werden, die schlussendlich alle Zelltypen in der Netzhaut betrifft. Die Krankheit entwickelt sich in zwei verschiedenen Stadien, als nicht-proliferative diabetische Retinopathie (NPDR) und **proliferative diabetische Retinopathie (PDR)**. Die NPDR ist das früheste Stadium der Krankheit. Die Netzhaut von NPDR-Patienten weist Mikroaneurysmen, Mikroblutungen, Netzhautödeme und intraretinale Gefäßanomalien auf (Frank, 2004). Auf zellulärer Ebene ist die NPDR durch einen Verlust von Perizyten und ECs gekennzeichnet, was zu einer Verringerung der Anzahl funktionsfähiger Blutgefäße sowie zu einer Störung der Blut-Netzhaut-Barriere führt (Beltramo and Porta, 2013). Die fortgeschrittene PDR ist durch dysreguliertes endotheliales Aussprosseln neuer Gefäße gekennzeichnet, welches zur Ablösung der Netzhaut oder einem diabetischen Makulaödem durch Austreten von Flüssigkeiten aus den aberranten Blutgefäßen führen kann (Ferland-McCollough et al., 2017).

Im Rahmen einer Publikation an der die Autorin dieser Arbeit mitwirken konnte, wurde gezeigt, dass natriuretische Peptide die pathologische Neovaskularisation im Rahmen

einer sauerstoffinduzierten Retinopathie in der Netzhaut abmildern können (Špiranec Spes et al., 2020a): Eine Inaktivierung des GC-A-Rezeptors auf Perizyten verzögerte hierbei die physiologische Netzhautvaskularisation und erhöhte deutlich die Zellapoptoserate, die Gefäßregression sowie die anschließende Neovaskularisation. In-vitro konnte mittels ANP über die Aktivierung der cGMP-abhängigen Proteinkinase Typ I die VEGF-Sekretion hypoxischer Astrozyten sowie die mittels TGF- $\beta$  induzierte Apoptose von Perizyten gehemmt werden. Insgesamt zeigten sich protektive Effekte der Perizyten, die über den ANP / GC-A / cGMP-Signalweg vermittelt werden und sowohl der Initiierung als auch dem Fortschreiten der proliferativen Retinopathie entgegenwirken (Špiranec Spes et al., 2020a). Dieser potenzielle Nutzen natriuretischer Peptide in der Behandlung der DR wird auch durch eine Studie von Dahrouj et al. gestützt. Dessen Untersuchung zeigte, dass die NPe, vor allem CNP über den GC-B-Rezeptor und die Bildung von cGMP, die negativen Effekte glykierten Albumins inhibieren. Das glykierte Albumin nimmt im fortgeschrittenen Stadium der DR zu und hat negative Auswirkungen auf die Barrierefunktion des retinalen Pigmentepithels (Dahrouj et al., 2013). Auch ein Nutzen des Angiopoietin-1 zur Verhinderung einer DR wurde publiziert (Joussen et al., 2002). Einen entscheidenden Faktor in der frühen Krankheitsentstehung der DR stellt die Adhäsion von Leukozyten an das Netzhautgefäßsystem dar. Sobald eine Leukozytenadhäsion auftritt, kommt es zu einer Endothelzellverletzung und damit einem Zusammenbruch der Blut-Netzhaut-Schranke. Angiopoietin-1 kann diese diabetische Netzhautgefäßveränderung verhindern und umkehren (Joussen et al., 2002).

Eine andere Form der **Retinopathie** tritt **bei Frühgeborenen** auf. Eine Frühgeburt ist dabei mit einer proliferativen Netzhautgefäßkrankung der sogenannten Frühgeborenenretinopathie assoziiert (Leung et al., 2018). Das pathologische Korrelat dieser Erkrankung stellt ein überschießendes, vorwiegend VEGF-induziertes Gefäßwachstum von der Netzhaut in den Glaskörper dar. Daher besteht ein neuer Ansatz der Therapie in der Gabe von **VEGF-Inhibitoren**, die die Produktion proangiogener Wachstumsfaktoren verringern (Stahl and Göpel, 2015).

Insgesamt sind an diesen pathologischen Prozessen jedoch viele verschiedene Faktoren beteiligt. Die **Wechselwirkungen zwischen Perizyten und Endothelzellen** sind in der Netzhaut ein wesentlicher Bestandteil des Blut-Retina-Schranke, die den Transport von Nährstoffen, Sauerstoff, Wachstums- und Regulationsfaktoren sowie Immunzellen von der Peripherie in die neuronale Umgebung der Netzhaut streng

reguliert. Eine Störung dieser Prozesse führt zu einem Verlust der Barrierefunktion des Gefäßsystems in verschiedene Regionen der Netzhaut und erleichtert den Eintritt von Immun- und Entzündungszellen in die Netzhautumgebung (Ferland-McCollough et al., 2017, Beltramo and Porta, 2013). Ein besseres Verständnis der Vorgänge, auf denen die Interaktion zwischen den Perizyten und den Endothelzellen beruht kann daher dazu beitragen, neue Therapiestrategien für Krankheiten mit einer pathologischen Angiogenese zu entwickeln (Caporali et al., 2017).

Ein weiterer therapeutischer Nutzen findet sich in der **Onkologie**: Neue Untersuchungen weisen bei der Tumorangio-genese auf eine Störung der Perizyten hin (Armulik et al., 2005, Raza et al., 2010). Aberrante TumorgefäÙe sind für ein schnelles Tumorstwachstum, die Metastasierung und die verminderte Wirksamkeit von Therapien mitverantwortlich. Perizyten spielen in diesen Prozessen eine zentrale Rolle. Insbesondere die, den Tumor umgebenden GefäÙe, weisen eine besonders starke Perizytenummantelung auf. Dies schafft eine Barriere, die den Zugang für Zellen des Immunsystems und Therapeutika behindert (Bergers and Hanahan, 2008). Im Gegensatz dazu weisen stark metastasierende Tumoren eine verringerte Perizytenbedeckung auf, was zu einer erhöhten Durchlässigkeit der Endothelwand und zur einfacheren Verbreitung von Krebszellen führt (Caporali et al., 2017). In diesem Zusammenhang wurde bereits für eine Kombination aus VEGF- und PDGF-Pathway-Inhibitoren in einem transgenen Modell von Pankreasinseltumoren eine synergistische antiangiogene und antitumoröse Wirkung nachgewiesen (Bergers et al., 2003). Ebenso wurde gezeigt, dass im Tiermodell eine Hemmung der PDGF-Signalübertragung die Wirkung von Chemotherapien verstärken kann (Armulik et al., 2005).

Insgesamt zeigen diese Studien somit, dass auch im Bereich der Onkologie ein besseres Verständnis der Wirkung der Perizyten auf das Endothel und die Kommunikation dieser beiden Zelltypen zum Beispiel mittels der natriuretischen Peptide wichtig ist, um hieraus potenzielle neue therapeutische Angriffspunkte bei der Behandlung von Tumoren zu finden.

## 5 Zusammenfassung

---

Die Entstehung neuer Gefäße, die Angiogenese, spielt das ganze Leben lang eine wichtige Rolle. Zum einen in ihrer physiologischen Funktion im Zuge der Embryonalentwicklung oder auch im Rahmen der Revaskularisierung geschädigten Gewebes, zum anderen aber auch im Hinblick auf diverse Pathologien, wie etwa der diabetischen Retinopathie (Gerhardt and Betsholtz, 2003). Hauptakteure dabei sind die Endothelzellen sowie ihre Interaktion mit den ihnen benachbarten Perizyten sowie in ZNS und Retina den Astrozyten. Astrozyten bilden in der Retina und im ZNS die Grundstruktur, an welcher die Endothelzellen entlangmigrieren, Perizyten begleiten überall im Körper die neugebildeten Gefäße und stabilisieren diese (Eilken et al., 2017, Kubota and Suda, 2009). In multiplen Studien wurde ein Zusammenhang zwischen diesen Vorgängen und den natriuretischen Peptiden ANP, BNP und CNP sowie ihren Guanylylzyklase-Rezeptoren vom Typ A und B gezeigt (Czernik et al., 2011, Hamano et al., 2014, Rollin et al., 2004a, Yamahara et al., 2003, Yano et al., 1998).

Das Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, inwieweit die genannten natriuretischen Peptide die Kommunikation zwischen Perizyten und Endothelzellen während der physiologischen Angiogenese beeinflussen. In Anbetracht der akquirierten Ergebnisse lassen sich folgende Schlussfolgerungen ziehen:

Sowohl der ANP und BNP bindende Guanylylzyklase-A-Rezeptor, als auch der CNP bindende Guanylylzyklase-B-Rezeptor auf den die Endothelzellen ummantelnden Perizyten sind für eine normale postnatale Gefäßentwicklung in der Netzhaut der Maus von entscheidender Bedeutung. Eine perizyten-spezifische Deletion der Guanylylzyklase-Rezeptoren führt in Mäusen zu einer signifikanten Verminderung der postnatalen Ausdehnung sowie der Dichte des Gefäßnetzes. Dies ist nicht auf eine Verminderung der Bedeckung des Endothels durch Perizyten zurückzuführen. Weiterhin geht diese Rezeptordeletion mit einer geschlechterunabhängigen Erhöhung des systolischen Blutdrucks einher. Die intrazelluläre Weiterleitung, des durch die natriuretischen Peptide ausgelösten cGMP-Signals erfolgt über die cGMP-abhängige Proteinkinase Typ I (cGKI). Weiterhin legen die Ergebnisse einen Zusammenhang zwischen den natriuretischen Peptiden und dem in der Angiogenese wichtigen parakrinen Botenstoff der Perizyten Angiopoietin-1 nahe.

## 6 Literaturverzeichnis

---

- ABUZAANONA, A. & LANFEAR, D. 2017. Pharmacogenomics of the Natriuretic Peptide System in Heart Failure. *Curr Heart Fail Rep*, 14, 536-542.
- AICHER, A., HEESCHEN, C., FEIL, S., HOFMANN, F., MENDELSON, M. E., FEIL, R. & DIMMELER, S. 2009. cGMP-dependent protein kinase I is crucial for angiogenesis and postnatal vasculogenesis. *PLoS One*, 4, e4879.
- ALLT, G. & LAWRENSEN, J. G. 2001. Pericytes: cell biology and pathology. *Cells Tissues Organs*, 169, 1-11.
- AN, J., LI, Y., SONG, S. & LIU, S. 2019. Electroacupuncture promotes the gastrointestinal motility of diabetic mice by CNP/NPR-B-cGMP and PDE3A-cGMP signaling. *Neurogastroenterol Motil*, 31, e13539.
- ARMULIK, A., ABRAMSSON, A. & BETSHOLTZ, C. 2005. Endothelial/pericyte interactions. *Circ Res*, 97, 512-23.
- BARTELS, C. F., BUKULMEZ, H., PADAYATTI, P., RHEE, D. K., VAN RAVENSWAALJ-ARTS, C., PAULI, R. M., MUNDLOS, S., CHITAYAT, D., SHIH, L. Y., AL-GAZALI, L. I., KANT, S., COLE, T., MORTON, J., CORMIER-DAIRE, V., FAIVRE, L., LEES, M., KIRK, J., MORTIER, G. R., LEROY, J., ZABEL, B., KIM, C. A., CROW, Y., BRAVERMAN, N. E., VAN DEN AKKER, F. & WARMAN, M. L. 2004. Mutations in the transmembrane natriuretic peptide receptor NPR-B impair skeletal growth and cause acromesomelic dysplasia, type Maroteaux. *Am J Hum Genet*, 75, 27-34.
- BAYES-GENIS, A., BARALLAT, J. & RICHARDS, A. M. 2016. A Test in Context: Neprilysin: Function, Inhibition, and Biomarker. *J Am Coll Cardiol*, 68, 639-653.
- BELTRAMO, E. & PORTA, M. 2013. Pericyte loss in diabetic retinopathy: mechanisms and consequences. *Curr Med Chem*, 20, 3218-25.
- BERGERS, G. & HANAHAAN, D. 2008. Modes of resistance to anti-angiogenic therapy. *Nat Rev Cancer*, 8, 592-603.
- BERGERS, G. & SONG, S. 2005. The role of pericytes in blood-vessel formation and maintenance. *Neuro Oncol*, 7, 452-64.
- BERGERS, G., SONG, S., MEYER-MORSE, N., BERGSLAND, E. & HANAHAAN, D. 2003. Benefits of targeting both pericytes and endothelial cells in the tumor vasculature with kinase inhibitors. *J Clin Invest*, 111, 1287-95.
- BRINDLE, N. P., SAHARINEN, P. & ALITALO, K. 2006. Signaling and functions of angiopoietin-1 in vascular protection. *Circ Res*, 98, 1014-23.
- BUBB, K. J., AUBDOOL, A. A., MOYES, A. J., LEWIS, S., DRAYTON, J. P., TANG, O., MEHTA, V., ZACHARY, I. C., ABRAHAM, D. J., TSUI, J. & HOBBS, A. J. 2019. Endothelial C-Type Natriuretic Peptide Is a Critical Regulator of Angiogenesis and Vascular Remodeling. *Circulation*, 139, 1612-1628.
- CAPORALI, A., MARTELLO, A., MISCIANINOV, V., MASELLI, D., VONO, R. & SPINETTI, G. 2017. Contribution of pericyte paracrine regulation of the endothelium to angiogenesis. *Pharmacol Ther*, 171, 56-64.
- CAPORARELLO, N., D'ANGELI, F., CAMBRIA, M. T., CANDIDO, S., GIALLONGO, C., SALMERI, M., LOMBARDO, C., LONGO, A., GIURDANELLA, G., ANFUSO, C. D. & LUPO, G. 2019. Pericytes in

- Microvessels: From "Mural" Function to Brain and Retina Regeneration. *Int J Mol Sci*, 20.
- CATHERY, W., FAULKNER, A., MASELLI, D. & MADEDDU, P. 2018. Concise Review: The Regenerative Journey of Pericytes Toward Clinical Translation. *Stem Cells*, 36, 1295-1310.
- CHENG, L., HUANG, Z., ZHOU, W., WU, Q., DONNOLA, S., LIU, J. K., FANG, X., SLOAN, A. E., MAO, Y., LATHIA, J. D., MIN, W., MCLENDON, R. E., RICH, J. N. & BAO, S. 2013. Glioblastoma stem cells generate vascular pericytes to support vessel function and tumor growth. *Cell*, 153, 139-52.
- CHUSHO, H., TAMURA, N., OGAWA, Y., YASODA, A., SUDA, M., MIYAZAWA, T., NAKAMURA, K., NAKAO, K., KURIHARA, T., KOMATSU, Y., ITOH, H., TANAKA, K., SAITO, Y., KATSUKI, M. & NAKAO, K. 2001. Dwarfism and early death in mice lacking C-type natriuretic peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 4016-21.
- CZERNIK, C., METZE, B., MULLER, C., MULLER, B. & BUHRER, C. 2011. Urinary N-terminal B-type natriuretic peptide predicts severe retinopathy of prematurity. *Pediatrics*, 128, e545-9.
- DAHROUJ, M., ALSARRAF, O., LIU, Y., CROSSON, C. E. & ABLONCZY, Z. 2013. C-type natriuretic peptide protects the retinal pigment epithelium against advanced glycation end product-induced barrier dysfunction. *J Pharmacol Exp Ther*, 344, 96-102.
- DÍAZ-FLORES, L., GUTIÉRREZ, R., VARELA, H., RANCEL, N. & VALLADARES, F. 1991. Microvascular pericytes: a review of their morphological and functional characteristics. *Histol Histopathol*, 6, 269-86.
- DICKEY, D. M., EDMUND, A. B., OTTO, N. M., CHAFFEE, T. S., ROBINSON, J. W. & POTTER, L. R. 2016. Catalytically Active Guanylyl Cyclase B Requires Endoplasmic Reticulum-mediated Glycosylation, and Mutations That Inhibit This Process Cause Dwarfism. *J Biol Chem*, 291, 11385-93.
- EILKEN, H. M., DIÉGUEZ-HURTADO, R., SCHMIDT, I., NAKAYAMA, M., JEONG, H. W., ARF, H., ADAMS, S., FERRARA, N. & ADAMS, R. H. 2017. Pericytes regulate VEGF-induced endothelial sprouting through VEGFR1. *Nat Commun*, 8, 1574.
- ELDRIDGE, L. & WAGNER, E. M. 2019. Angiogenesis in the lung. *J Physiol*, 597, 1023-1032.
- FAVIER, J. & CORVOL, P. 2001. [Physiological angiogenesis]. *Thérapie*, 56, 455-63.
- FERLAND-MCCOLLOUGH, D., SLATER, S., RICHARD, J., RENI, C. & MANGIALARDI, G. 2017. Pericytes, an overlooked player in vascular pathobiology. *Pharmacol Ther*, 171, 30-42.
- FERNANDEZ-DURANGO, R., NUNEZ, D. J. & BROWN, M. J. 1995. Messenger RNAs encoding the natriuretic peptides and their receptors are expressed in the eye. *Exp Eye Res*, 61, 723-9.
- FLAXMAN, S. R., BOURNE, R. R. A., RESNIKOFF, S., ACKLAND, P., BRAITHWAITE, T., CICINELLI, M. V., DAS, A., JONAS, J. B., KEEFFE, J., KEMPEN, J. H., LEASHER, J., LIMBURG, H., NAIDOO, K., PESUDOVS, K., SILVESTER, A., STEVENS, G. A., TAHHAN, N., WONG, T. Y. & TAYLOR, H. R. 2017. Global causes of blindness and distance

- vision impairment 1990-2020: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Glob Health*, 5, e1221-e1234.
- FORTE, M., MADONNA, M., SCHIAVON, S., VALENTI, V., VERSACI, F., ZOCCAI, G. B., FRATI, G. & SCIARRETTA, S. 2019. Cardiovascular Pleiotropic Effects of Natriuretic Peptides. *Int J Mol Sci*, 20.
- FRANK, R. N. 2004. Diabetic retinopathy. *N Engl J Med*, 350, 48-58.
- FRANTZ, S., KLAIBER, M., BABA, H. A., OBERWINKLER, H., VOLKER, K., GABETANER, B., BAYER, B., ABEBETAER, M., SCHUH, K., FEIL, R., HOFMANN, F. & KUHN, M. 2013. Stress-dependent dilated cardiomyopathy in mice with cardiomyocyte-restricted inactivation of cyclic GMP-dependent protein kinase I. *Eur Heart J*, 34, 1233-44.
- FUKUHARA, S., SAKO, K., NODA, K., ZHANG, J., MINAMI, M. & MOCHIZUKI, N. 2010. Angiopoietin-1/Tie2 receptor signaling in vascular quiescence and angiogenesis. *Histol Histopathol*, 25, 387-96.
- GARIANO, R. F. & GARDNER, T. W. 2005. Retinal angiogenesis in development and disease. *Nature*, 438, 960-6.
- GERHARDT, H. & BETSHOLTZ, C. 2003. Endothelial-pericyte interactions in angiogenesis. *Cell Tissue Res*, 314, 15-23.
- GOETZE, J. P., BRUNEAU, B. G., RAMOS, H. R., OGAWA, T., DE BOLD, M. K. & DE BOLD, A. J. 2020. Cardiac natriuretic peptides. *Nat Rev Cardiol*, 17, 698-717.
- GRUDEN, G., BARUTTA, F., CHATURVEDI, N., SCHALKWIJK, C., STEHOUWER, C. D., PINACH, S., MANZO, M., LOIACONO, M., TRICARICO, M., MENGOZZI, G., WITTE, D. R., FULLER, J. H., PERIN, P. C. & BRUNO, G. 2012. NH2-terminal probrain natriuretic peptide is associated with diabetes complications in the EURODIAB Prospective Complications Study: the role of tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Diabetes Care*, 35, 1931-6.
- GUO, H. S., JIN, Z., JIN, Z. Y., LI, Z. H., CUI, Y. F., WANG, Z. Y. & XU, W. X. 2003. Comparative study in the effect of C-type natriuretic peptide on gastric motility in various animals. *World J Gastroenterol*, 9, 547-52.
- HAMANO, K., NAKADAIRA, I., SUZUKI, J. & GONAI, M. 2014. N-terminal fragment of probrain natriuretic peptide is associated with diabetes microvascular complications in type 2 diabetes. *Vasc Health Risk Manag*, 10, 585-9.
- HENDERSON, N. C., ARNOLD, T. D., KATAMURA, Y., GIACOMINI, M. M., RODRIGUEZ, J. D., MCCARTY, J. H., PELLICORO, A., RASCHPERGER, E., BETSHOLTZ, C., RUMINSKI, P. G., GRIGGS, D. W., PRINSEN, M. J., MAHER, J. J., IREDALE, J. P., LACY-HULBERT, A., ADAMS, R. H. & SHEPPARD, D. 2013. Targeting of  $\alpha$ v integrin identifies a core molecular pathway that regulates fibrosis in several organs. *Nat Med*, 19, 1617-24.
- HENDRICK, A. M., GIBSON, M. V. & KULSHRESHTHA, A. 2015. Diabetic Retinopathy. *Prim Care*, 42, 451-64.
- HOFMANN, F. 2005. The biology of cyclic GMP-dependent protein kinases. *J Biol Chem*, 280, 1-4.

- HOFMANN, F., FEIL, R., KLEPPISCH, T. & SCHLOSSMANN, J. 2006. Function of cGMP-dependent protein kinases as revealed by gene deletion. *Physiol Rev*, 86, 1-23.
- HOLTWICK, R., GOTTHARDT, M., SKRYABIN, B., STEINMETZ, M., POTTHAST, R., ZETSCHKE, B., HAMMER, R. E., HERZ, J. & KUHN, M. 2002. Smooth muscle-selective deletion of guanylyl cyclase-A prevents the acute but not chronic effects of ANP on blood pressure. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 7142-7.
- JENNEWEIN, M., BUBEL, M., GUTHÖRL, S., METZGER, W., WEIGERT, M., POHLEMANN, T. & OBERRINGER, M. 2016. Two- and three-dimensional co-culture models of soft tissue healing: pericyte-endothelial cell interaction. *Cell Tissue Res*, 365, 279-93.
- JOUSSEN, A. M., POULAKI, V., TSUJIKAWA, A., QIN, W., QAUM, T., XU, Q., MOROMIZATO, Y., BURSELL, S. E., WIEGAND, S. J., RUDGE, J., IOFFE, E., YANCOPOULOS, G. D. & ADAMIS, A. P. 2002. Suppression of diabetic retinopathy with angiopoietin-1. *Am J Pathol*, 160, 1683-93.
- KAWASE, Y., HATA, R., TADA, T., KATOH, H. & KADOTA, K. 2018. Effects of Carperitide on Degree of Pulmonary Congestion in Treatment of Acute Heart Failure. *Circ J*, 82, 2079-2088.
- KENNEDY-LYDON, T., CRAWFORD, C., WILDMAN, S. S. & PEPPIATT-WILDMAN, C. M. 2015. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs alter vasa recta diameter via pericytes. *Am J Physiol Renal Physiol*, 309, F648-57.
- KIM, H., KIM, M., IM, S. K. & FANG, S. 2018. Mouse Cre-LoxP system: general principles to determine tissue-specific roles of target genes. *Lab Anim Res*, 34, 147-159.
- KOMATSU, Y., CHUSHO, H., TAMURA, N., YASODA, A., MIYAZAWA, T., SUDA, M., MIURA, M., OGAWA, Y. & NAKAO, K. 2002. Significance of C-type natriuretic peptide (CNP) in endochondral ossification: analysis of CNP knockout mice. *J Bone Miner Metab*, 20, 331-6.
- KONERU, S., VARMA PENUMATHSA, S., THIRUNAVUKKARASU, M., VIDAVALUR, R., ZHAN, L., SINGAL, P. K., ENGELMAN, R. M., DAS, D. K. & MAULIK, N. 2008. Sildenafil-mediated neovascularization and protection against myocardial ischaemia reperfusion injury in rats: role of VEGF/angiopoietin-1. *J Cell Mol Med*, 12, 2651-64.
- KROCK, B. L., SKULI, N. & SIMON, M. C. 2011. Hypoxia-induced angiogenesis: good and evil. *Genes Cancer*, 2, 1117-33.
- KUBOTA, Y. & SUDA, T. 2009. Feedback mechanism between blood vessels and astrocytes in retinal vascular development. *Trends Cardiovasc Med*, 19, 38-43.
- KUHN, M. 2016. Molecular Physiology of Membrane Guanylyl Cyclase Receptors. *Physiol Rev*, 96, 751-804.
- KUHN, M., VOLKER, K., SCHWARZ, K., CARBAJO-LOZOYA, J., FLOGEL, U., JACOBY, C., STYPMANN, J., VAN EICKELS, M., GAMBARYAN, S., HARTMANN, M., WERNER, M., WIELAND, T., SCHRADER, J. & BABA, H. A. 2009. The natriuretic peptide/guanylyl cyclase--a system functions as a stress-responsive regulator of angiogenesis in mice. *J Clin Invest*, 119, 2019-30.



- KUSHNER, E. J. & BAUTCH, V. L. 2013. Building blood vessels in development and disease. *Curr Opin Hematol*, 20, 231-6.
- LEUNG, M. P., THOMPSON, B., BLACK, J., DAI, S. & ALSWEILER, J. M. 2018. The effects of preterm birth on visual development. *Clin Exp Optom*, 101, 4-12.
- LEVY, B. I., AMBROSIO, G., PRIES, A. R. & STRUIJKER-BOUDIER, H. A. 2001. Microcirculation in hypertension: a new target for treatment? *Circulation*, 104, 735-40.
- LI, N., RIGNAULT-CLERC, S., BIELMANN, C., BON-MATHIER, A. C., DÉGLISE, T., CARBONI, A., DUCREST, M. & ROSENBLATT-VELIN, N. 2020. Increasing heart vascularisation after myocardial infarction using brain natriuretic peptide stimulation of endothelial and WT1(+) epicardial cells. *Elife*, 9.
- LOONSTRA, A., VOOIJS, M., BEVERLOO, H. B., ALLAK, B. A., VAN DRUNEN, E., KANAAR, R., BERNIS, A. & JONKERS, J. 2001. Growth inhibition and DNA damage induced by Cre recombinase in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 9209-14.
- LUKOWSKI, R., WEBER, S., WEINMEISTER, P., FEIL, S. & FEIL, R. 2005. Cre/loxP-vermittelte konditionale Mutagenese des cGMP-Signalwegs in der Maus. *BIOspektrum*, 3/2005, 287-290.
- LYU, T., ZHAO, Y., ZHANG, T., ZHOU, W., YANG, F., GE, H., DING, S., PU, J. & HE, B. 2014. Natriuretic peptides as an adjunctive treatment for acute myocardial infarction: insights from the meta-analysis of 1,389 patients from 20 trials. *Int Heart J*, 55, 8-16.
- MCLELLAN, M. A., ROSENTHAL, N. A. & PINTO, A. R. 2017. Cre-loxP-Mediated Recombination: General Principles and Experimental Considerations. *Curr Protoc Mouse Biol*, 7, 1-12.
- MCLOUGHLIN, P. & KEANE, M. P. 2011. Physiological and pathological angiogenesis in the adult pulmonary circulation. *Compr Physiol*, 1, 1473-508.
- MEEMS, L. M. G. & BURNETT, J. C., JR. 2016. Innovative Therapeutics: Designer Natriuretic Peptides. *JACC Basic Transl Sci*, 1, 557-567.
- MEYERS, C. A., CASAMITJANA, J., CHANG, L., ZHANG, L., JAMES, A. W. & PÉAULT, B. 2018. Pericytes for Therapeutic Bone Repair. *Adv Exp Med Biol*, 1109, 21-32.
- MOYES, A. J. & HOBBS, A. J. 2019. C-type Natriuretic Peptide: A Multifaceted Paracrine Regulator in the Heart and Vasculature. *Int J Mol Sci*, 20.
- NEWTON-CHEH, C., LARSON, M. G., VASAN, R. S., LEVY, D., BLOCH, K. D., SURTI, A., GUIDUCCI, C., KATHIRESAN, S., BENJAMIN, E. J., STRUCK, J., MORGENTHALER, N. G., BERGMANN, A., BLANKENBERG, S., KEE, F., NILSSON, P., YIN, X., PELTONEN, L., VARTIAINEN, E., SALOMAA, V., HIRSCHHORN, J. N., MELANDER, O. & WANG, T. J. 2009. Association of common variants in NPPA and NPPB with circulating natriuretic peptides and blood pressure. *Nat Genet*, 41, 348-53.
- O'FARRELL, F. M. & ATTWELL, D. 2014. A role for pericytes in coronary no-reflow. *Nat Rev Cardiol*, 11, 427-32.

- PARK, K., ITOH, H., YAMAHARA, K., SONE, M., MIYASHITA, K., OYAMADA, N., SAWADA, N., TAURA, D., INUZUKA, M., SONOYAMA, T., TSUJIMOTO, H., FUKUNAGA, Y., TAMURA, N. & NAKAO, K. 2008. Therapeutic potential of atrial natriuretic peptide administration on peripheral arterial diseases. *Endocrinology*, 149, 483-91.
- PARK, Y. S., KIM, G., JIN, Y. M., LEE, J. Y., SHIN, J. W. & JO, I. 2016. Expression of angiopoietin-1 in hypoxic pericytes: Regulation by hypoxia-inducible factor-2alpha and participation in endothelial cell migration and tube formation. *Biochem Biophys Res Commun*, 469, 263-9.
- PARK, Y. S., KIM, N. H. & JO, I. 2003. Hypoxia and vascular endothelial growth factor acutely up-regulate angiopoietin-1 and Tie2 mRNA in bovine retinal pericytes. *Microvasc Res*, 65, 125-31.
- PFAU, D., THORN, S. L., ZHANG, J., MIKUSH, N., RENAUD, J. M., KLEIN, R., DEKEMP, R. A., WU, X., HU, X., SINUSAS, A. J., YOUNG, L. H. & TIRZIU, D. 2019. Angiotensin Receptor Neprilysin Inhibitor Attenuates Myocardial Remodeling and Improves Infarct Perfusion in Experimental Heart Failure. *Sci Rep*, 9, 5791.
- PFEIFER, A., KLATT, P., MASSBERG, S., NY, L., SAUSBIER, M., HIRNEISS, C., WANG, G. X., KORTH, M., ASZODI, A., ANDERSSON, K. E., KROMBACH, F., MAYERHOFER, A., RUTH, P., FASSLER, R. & HOFMANN, F. 1998. Defective smooth muscle regulation in cGMP kinase I-deficient mice. *EMBO J*, 17, 3045-51.
- POTTER, L. R., ABBEY-HOSCH, S. & DICKEY, D. M. 2006. Natriuretic peptides, their receptors, and cyclic guanosine monophosphate-dependent signaling functions. *Endocr Rev*, 27, 47-72.
- POTTER, L. R., YODER, A. R., FLORA, D. R., ANTOS, L. K. & DICKEY, D. M. 2009. Natriuretic peptides: their structures, receptors, physiologic functions and therapeutic applications. *Handb Exp Pharmacol*, 341-66.
- RAMIREZ, M., PELL, N., MEJIAS, M. & FERNANDEZ, M. 2019. Pericytes in the Gut. *Adv Exp Med Biol*, 1122, 73-100.
- RAMOS, H. R., BIRKENFELD, A. L. & DE BOLD, A. J. 2015. INTERACTING DISCIPLINES: Cardiac natriuretic peptides and obesity: perspectives from an endocrinologist and a cardiologist. *Endocr Connect*, 4, R25-36.
- RAUTUREAU, Y. & BAXTER, G. F. 2004. Acute actions of natriuretic peptides in coronary vasculature and ischaemic myocardium. *Curr Pharm Des*, 10, 2477-82.
- RAZA, A., FRANKLIN, M. J. & DUDEK, A. Z. 2010. Pericytes and vessel maturation during tumor angiogenesis and metastasis. *Am J Hematol*, 85, 593-8.
- ROLLIN, R., MEDIERO, A., MARTINEZ-MONTERO, J. C., ROLDAN-PALLARES, M., SUAREZ-LEOZ, M., VIDAL-FERNANDEZ, P., CORTES-VALDES, C., FERNANDEZ-CRUZ, A. & FERNANDEZ-DURANGO, R. 2004a. Atrial natriuretic peptide in the vitreous humor and epiretinal membranes of patients with proliferative diabetic retinopathy. *Mol Vis*, 10, 450-7.
- ROLLIN, R., MEDIERO, A., ROLDAN-PALLARES, M., FERNANDEZ-CRUZ, A. & FERNANDEZ-DURANGO, R. 2004b. Natriuretic peptide system in the human retina. *Mol Vis*, 10, 15-22.

- SABRANE, K., KRUSE, M. N., FABRITZ, L., ZETSCHKE, B., MITKO, D., SKRYABIN, B. V., ZWIENER, M., BABA, H. A., YANAGISAWA, M. & KUHN, M. 2005. Vascular endothelium is critically involved in the hypotensive and hypovolemic actions of atrial natriuretic peptide. *J Clin Invest*, 115, 1666-74.
- SAPIEHA, P., JOYAL, J. S., RIVERA, J. C., KERMORVANT-DUCHEMIN, E., SENNLAUB, F., HARDY, P., LACHAPPELLE, P. & CHEMTOB, S. 2010. Retinopathy of prematurity: understanding ischemic retinal vasculopathies at an extreme of life. *J Clin Invest*, 120, 3022-32.
- SAUER, B. 2006. Cre/loxP Strategies. *Encyclopedic Reference of Genomics and Proteomics in Molecular Medicine*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- SCHLUETER, N., DE STERKE, A., WILLMES, D. M., SPRANGER, J., JORDAN, J. & BIRKENFELD, A. L. 2014. Metabolic actions of natriuretic peptides and therapeutic potential in the metabolic syndrome. *Pharmacol Ther*, 144, 12-27.
- SELVAM, S., KUMAR, T. & FRUTTIGER, M. 2018. Retinal vasculature development in health and disease. *Prog Retin Eye Res*, 63, 1-19.
- SHEIKH, A. Q., MISRA, A., ROSAS, I. O., ADAMS, R. H. & GREIF, D. M. 2015. Smooth muscle cell progenitors are primed to muscularize in pulmonary hypertension. *Sci Transl Med*, 7, 308ra159.
- SOGAWA, C., ABE, A., TSUJI, T., KOIZUMI, M., SAGA, T. & KUNIEDA, T. 2010. Gastrointestinal tract disorder in natriuretic peptide receptor B gene mutant mice. *Am J Pathol*, 177, 822-8.
- SOGAWA, C., WAKIZAKA, H., AUNG, W., JIN, Z. H., TSUJI, A. B., FURUKAWA, T., KUNIEDA, T. & SAGA, T. 2013. C-type natriuretic peptide specifically acts on the pylorus and large intestine in mouse gastrointestinal tract. *Am J Pathol*, 182, 172-9.
- SORIANO, P. 1999. Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain. *Nat Genet*, 21, 70-1.
- ŠPIRANEC, K., CHEN, W., WERNER, F., NIKOLAEV, V. O., NARUKE, T., KOCH, F., WERNER, A., EDER-NEGRIN, P., DIEGUEZ-HURTADO, R., ADAMS, R. H., BABA, H. A., SCHMIDT, H., SCHUH, K., SKRYABIN, B. V., MOVAHEDI, K., SCHWEDA, F. & KUHN, M. 2018. Endothelial C-Type Natriuretic Peptide Acts on Pericytes to Regulate Microcirculatory Flow and Blood Pressure. *Circulation*.
- ŠPIRANEC SPES, K., HUPP, S., WERNER, F., KOCH, F., VÖLKER, K., KREBES, L., KÄMMERER, U., HEINZE, K. G., BRAUNGER, B. M. & KUHN, M. 2020a. Natriuretic Peptides Attenuate Retinal Pathological Neovascularization Via Cyclic Guanosine Monophosphate Signaling in Pericytes and Astrocytes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 40, 159-174.
- ŠPIRANEC SPES, K., W., C., L., K., K., V., M., A., P., E. N., A., C., A., N., VO., N., F., H., K., S., F., S. & M., K. 2020b. Heart-Microcirculation Connection: Effects of ANP (Atrial Natriuretic Peptide) on Pericytes Participate in the Acute and Chronic Regulation of Arterial Blood Pressure. *Hypertension*, 76, 1637-1648.
- STAHL, A., CONNOR, K. M., SAPIEHA, P., CHEN, J., DENNISON, R. J., KRAH, N. M., SEAWARD, M. R., WILLETT, K. L., ADERMAN, C. M., GUERIN, K.

- I., HUA, J., LOFQVIST, C., HELLSTROM, A. & SMITH, L. E. 2010. The mouse retina as an angiogenesis model. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 51, 2813-26.
- STAHL, A. & GÖPEL, W. 2015. Screening und Behandlung der Frühgeborenenretinopathie. *Dtsch Arztebl International*, 112, 730-5.
- SUGA, S., ITOH, H., KOMATSU, Y., OGAWA, Y., HAMA, N., YOSHIMASA, T. & NAKAO, K. 1993. Cytokine-induced C-type natriuretic peptide (CNP) secretion from vascular endothelial cells--evidence for CNP as a novel autocrine/paracrine regulator from endothelial cells. *Endocrinology*, 133, 3038-41.
- SUNDBERG, C., KOWANETZ, M., BROWN, L. F., DETMAR, M. & DVORAK, H. F. 2002. Stable expression of angiopoietin-1 and other markers by cultured pericytes: phenotypic similarities to a subpopulation of cells in maturing vessels during later stages of angiogenesis in vivo. *Lab Invest*, 82, 387-401.
- SUPAKUL, S., YAO, K., OCHI, H., SHIMADA, T., HASHIMOTO, K., SUNAMURA, S., MABUCHI, Y., TANAKA, M., AKAZAWA, C., NAKAMURA, T., OKAWA, A., TAKEDA, S. & SATO, S. 2019. Pericytes as a Source of Osteogenic Cells in Bone Fracture Healing. *Int J Mol Sci*, 20.
- SURI, C., JONES, P. F., PATAN, S., BARTUNKOVA, S., MAISONPIERRE, P. C., DAVIS, S., SATO, T. N. & YANCOPOULOS, G. D. 1996. Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell*, 87, 1171-80.
- THEILIG, F. & WU, Q. 2015. ANP-induced signaling cascade and its implications in renal pathophysiology. *Am J Physiol Renal Physiol*, 308, F1047-55.
- TIGGES, U., WELSER-ALVES, J. V., BOROUJERDI, A. & MILNER, R. 2012. A novel and simple method for culturing pericytes from mouse brain. *Microvasc Res*, 84, 74-80.
- TONG, A. T. & ROZNER, M. A. 2009. The role of nesiritide in heart failure. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 5, 823-34.
- TROST, A., BRUCKNER, D., RIVERA, F. J. & REITSAMER, H. A. 2019. Pericytes in the Retina. *Adv Exp Med Biol*, 1122, 1-26.
- TSIEN, J. Z., CHEN, D. F., GERBER, D., TOM, C., MERCER, E. H., ANDERSON, D. J., MAYFORD, M., KANDEL, E. R. & TONEGAWA, S. 1996. Subregion- and cell type-restricted gene knockout in mouse brain. *Cell*, 87, 1317-26.
- VAN DIJK, C. G., NIEUWEBOER, F. E., PEI, J. Y., XU, Y. J., BURGISSER, P., VAN MULLIGEN, E., EL AZZOUZI, H., DUNCKER, D. J., VERHAAR, M. C. & CHENG, C. 2015. The complex mural cell: pericyte function in health and disease. *Int J Cardiol*, 190, 75-89.
- VINNAKOTA, S. & CHEN, H. H. 2020. The Importance of Natriuretic Peptides in Cardiometabolic Diseases. *Journal of the Endocrine Society*, 4.
- WANG, H., JING, R., TREXLER, C., LI, Y., TANG, H., PAN, Z., ZHU, S., ZHAO, B., FANG, X., LIU, J., CHEN, J. & OUYANG, K. 2019. Deletion of IP(3)R1 by Pdgfrb-Cre in mice results in intestinal pseudo-obstruction and lethality. *J Gastroenterol*, 54, 407-418.

- WOODS, R. L. & SMOLICH, J. J. 1991. Regional blood flow effects of ANP in conscious dogs: preferential gastrointestinal vasoconstriction. *Am J Physiol*, 261, H1961-9.
- YAMAHARA, K., ITOH, H., CHUN, T. H., OGAWA, Y., YAMASHITA, J., SAWADA, N., FUKUNAGA, Y., SONE, M., YURUGI-KOBAYASHI, T., MIYASHITA, K., TSUJIMOTO, H., KOOK, H., FEIL, R., GARBERS, D. L., HOFMANN, F. & NAKAO, K. 2003. Significance and therapeutic potential of the natriuretic peptides/cGMP/cGMP-dependent protein kinase pathway in vascular regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 3404-9.
- YANO, Y., URA, H., GABAZZA, E. C., SEGUCHI, C., SUMIDA, Y., MISAKI, M. & SHIMA, T. 1998. Circulating levels of 7 S domain of type IV collagen and atrial natriuretic peptide in normotensive type 2 diabetic patients with or without retinopathy. *Horm Metab Res*, 30, 103-7.
- ZUDAIRE, E., GAMBARDELLA, L., KURCZ, C. & VERMEREN, S. 2011. A computational tool for quantitative analysis of vascular networks. *PLoS One*, 6, e27385.

## Appendix

---

### I Verwendete Chemikalien, Antikörper, Enzyme, Proteine und Medien

Produktbezeichnung	Firma / Hersteller
Acrylamid	Carl Roth GmbH
Agarose	Bio&Sell GmbH
Amoniumperoxodisulfat	Sigma-Aldrich GmbH
Anti-Angiopoietin 1 Antikörper (ab8451)	Abcam
Anti-GAPDH-Antikörper (#2118)	Cell Signaling Technology
Anti-NG2-Antikörper (AB5320)	Merk KGaA
Anti-Rabbit IgG (111-035-144)	Jackson ImmunoResearch Europe Ltd.
Anti-PDGFR $\beta$ -Antikörper	Bio-Techne Corporation
Atriales natriuretisches Peptid	ChinaPeptides Co. Ltd.
$\beta$ -Mercaptoethanol	Merk KGaA
Bromphenolblau	Merk KGaA
BSA (bovines Serumalbumin)	GERBU Biotechnik GmbH
B-Typ natriuretisches Peptid	Bachem AG
CaCl <sub>2</sub> (Kalziumchlorid)	Merk KGaA
Chloroform	Merk KGaA
C-Typ natriuretisches Peptid	Bachem AG

<b>Produktbezeichnung</b>	<b>Firma / Hersteller</b>
Cy3-AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (111-165-003)	Jackson ImmunoResearch Europe Ltd.
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium; F0445)	Merk KGaA
DNA Loading Dye	Thermo Fisher Scientific
DNase- und RNase-freies Wasser	Carl Roth GmbH
dNTP (Nukleosidtriphosphat)	Thermo Fisher Scientific
EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure)	Merk KGaA
EGM <sup>TM</sup> -Microvascular Endothelial Cell Growth Medium (CC-3202)	Lonza Group AG
Essigsäureanhydrid	Merk KGaA
FITC-gekoppeltes Isolektin B4	Sigma-Aldrich GmbH
Fraktionierungs-Kit für Zellkulturen (78840)	Thermo Fisher Scientific
GeneRuler DNA Ladders	Life Technologies
Glycerin	Merk KGaA
Glycin	Merk KGaA
HCl (Salzsäure)	Merk KGaA
Isopropanol	Carl Roth GmbH
KCl (Kaliumchlorid)	Merk KGaA
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Kaliumdihydrogenphosphat)	Merk KGaA
Methanol	Merk KGaA
Methylenbisacrylamid	Carl Roth GmbH
MnCl <sub>2</sub> (Manganchlorid)	Merk KGaA
MgCl <sub>2</sub> (Magnesiumchlorid) für Pblec-Lösung	Carl Roth GmbH

<b>Produktbezeichnung</b>	<b>Firma / Hersteller</b>
MgCl <sub>2</sub> (Magnesiumchlorid) für PCR	Invitrogen
Mowiol-Lösung	Dianova GmbH
NaCl (Natriumchlorid)	Merk KGaA
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Dinatriumhydrogenphosphat)	Merk KGaA
Nancy-520	Sigma-Aldrich GmbH
Papain Dissociation System (LK 003150)	Worthington Biochemical Corporation
Perizytenmedium (SC-1231)	Provitro AG
PFA (Paraformaldehyd) 4%	Santa Cruz Biotechnology
Phenol	Carl Roth GmbH
Pierce™ ECL Western Blotting-Substrat	Thermo Fisher Scientific
Proteinase K	Sigma-Aldrich GmbH
Reaktionspuffer PCR	Invitrogen
SDS	SERVA Electrophoresis GmbH
Taq-Polymerase	Invitrogen
Tetramethylethylenediamin	Sigma-Aldrich GmbH
Tris	Sigma-Aldrich GmbH
Triton X-100	Sigma-Aldrich GmbH
Tween-20	Sigma-Aldrich GmbH



## II Technische Geräte

<b>Produktbezeichnung</b>	<b>Firma / Hersteller</b>
BIOFUGE fresco	Heraeus Instruments
Biometra Fastblot	Analytik Jena AG
Blutdruckmanschetten	Softron Co. Ltd.
Blutdruckmessgerät	Softron Co. Ltd.
Elektrophoresekammer (PCR)	Werkstatt der Physiologie
Feinwaage (TE214S)	Sartorius
FluorChem SP Chemilumineszens Detektionssystem	Alpha InnoTech
Gel Logic 100 Imaging System	Kodak
Gelkammer für die Elektrophorese (WB)	Peqlab Biotechnologie GmbH
Keyence BZ-8100	Keyence Corporation
Mikrowelle Privileg	Quelle GmbH
SimpliNano™ Spektrophotometer	Biochrom
Spannungsquelle E802	Consort EV202
Thermocycler T <sub>Gradient</sub>	Biometra
Thermomixer compact	Eppendorf AG
Tischwaage	Sartorius
Victor <sup>2</sup> ™ 1420 Multilabel Counter	Perkin Elmer life sciences

### III Verbrauchsmaterialien

#### Produktbezeichnung

#### Firma / Hersteller

Eppendorf Reaktionsgefäß 1,5 / 2 ml

Eppendorf AG

Flüssigstickstoff

Linde AG

Filterpapier für WB

Whatman GmbH

Kollagen I-beschichtete Multwell Platten

Thermo Fisher Scientific

Nitrozellulose-Membran für WB

GE Healthcare Life Sciences

## IV Lösungen und Puffer

### Genotypisierung

Verdaupuffer: 100 mM Tris  
5 mM EDTA  
200 mM NaCl  
0,2% SDS  
in sterilem DNase- und RNase-freiem Wasser

TE-Puffer: 10 mM Tris  
200 mM EDTA  
in DNase- und RNase-freiem Wasser

TAE (Tris-Acetat-EDTA)-Puffer:  
4,84 g (0,04 M) Tris  
1,142 ml Essigsäure (>99,9%)  
2,92 g (0,01 M) EDTA  
bei pH=8,0, mit DNase- und RNase-freiem Wasser auf 1 L  
auffüllen

### Immunfluoreszenzfärbung

Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS):  
8,09 g NaCl  
0,2 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   
1,44 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$   
0,2 g KCl  
bei pH=7,4 in 1 L DNase- und RNase-freies Wasser; autoklaviert

Pblec-Lösung: 1 mM  $\text{MgCl}_2$   
1 mM  $\text{CaCl}_2$   
0,1 mM  $\text{MnCl}_2$   
1 % Triton X-100  
in PBS

„Blocking“-Puffer: 1 % BSA  
0,3 % Triton X-100  
in PBS

### Westernblot

12%-iges SDS-Gel: 29,2 % Acrylamid  
0,8 % N,N'-Methylenbisacrylamid  
1,5 M Tris (pH 8,8)  
10 % SDS  
10 % Amoniumperoxodisulfat;  
0,04 % N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin  
in DNase- und RNase-freiem Wasser

Lämmli-Puffer: 200 mM Tris-HCl (pH 6,8)  
6 % SDS  
15 % Glycerin  
10 %  $\beta$ -Mercaptoethanol  
0,01 % Bromphenolblau  
in DNase- und RNase-freiem Wasser)

Laufpuffer: 3,43 g Tris (25 mM)  
14,0 g Glycin (192 mM)  
1,0 g SDS (0,1 %)  
in 1 L DNase- und RNase-freiem Wasser

Transferpuffer: 3,8 g Tris (25 mM)  
18,0 g Glycin (192 mM)  
200 ml Methanol (20 %)  
in 1 L DNase- und RNase-freiem Wasser

10x-TBS: 61 g Tris (0,5 M)  
90 g NaCl (1,55 M)  
in 1 L DNase- und RNase-freiem Wasser; pH 7,6)

TBS-T: 0,1 % Tween-20  
in 100 ml 10x-TBS  
in 1 L DNase- und RNase-freiem Wasser

Fixierpuffer: 5% BSA  
in TBS-T

„Stripping“-Puffer 62,5 mM Tris  
2 % SDS  
0,7 %  $\beta$ -Mercaptoethanol  
pH 6,7

## V Abkürzungsverzeichnis

### A

Ang-1	Angiopoietin-1
Ang-2	Angiopoietin-2
ANP	atrales natriuretisches Peptid

### B

BNP	B-Typ natriuretisches Peptid
bp	Basenpaare

### C

C	Celsius
cAMP	cyclisches Adenosin-Monophosphat
cGKI	cGMP-abhängige Proteinkinase I
cGKI KO	cGKI <sup>flox/flox</sup> x PDGFR $\beta$ -Cre <sup>ERT2</sup>
cGMP	cyclisches Guanosin-Monophosphat
CNP	C-Typ natriuretisches Peptid

### D

DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DR	diabetische Retinopathie

### E

EC	Endothelzelle
ECs	Endothelzellen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Eppi	Eppendorf Reaktionsgefäß

### G

g	Gramm
g	Vielfaches der mittleren Erdbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase

GC-A	Guanylylzyklase-A Rezeptor
GC-A KO	GC-A <sup>flox/flox</sup> x PDGFR $\beta$ -Cre <sup>ERT2</sup>
GC-B	Guanylylzyklase-B Rezeptor
GC-B KO	GC-B <sup>flox/flox</sup> x PDGFR $\beta$ -Cre <sup>ERT2</sup>
GI-Trakt	Gastrointestinaltrakt
<b>K</b>	
kDa	Kilodalton
<b>L</b>	
L	Liter
<b>M</b>	
M	Mol
mg	Milligramm
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Millimol
$\mu$ l	Mikroliter
$\mu$ M	Mikromol
<b>N</b>	
n	Anzahl der Versuche
N	Anzahl der Versuchstiere
ng	Nanogramm
NG2	Proteoglykan des neuronalen/glialen Antigens 2
NO	Stickstoff
NP	Natriuretisches Peptid
NPDR	nicht-proliferative diabetische Retinopathie
NPR-C	Natriuretischen Peptidrezeptor C
NPe	Natriuretische Peptide (ANP, BNP, CNP)
<b>P</b>	
p	Signifikanzwert
pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit

PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDE(s)	Phosphodiesterase(n)
PDGF-B	„platelet derived growth factor B“
PDGFR $\beta$	Rezeptor des „platelet derived growth factor $\beta$ “
PDR	proliferative diabetische Retinopathie
PFA	Paraformaldehyd
P5	Maus im Alter von fünf Tagen
P7	Maus im Alter von sieben Tagen

## R

R	Anzahl der Retinae
RNA	Ribonukleinsäure

## S

SBD	systolischer Blutdruck
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde(n)
SEM	Standardfehler des Mittelwerts

## T

TGF- $\beta$	transformierender Wachstumsfaktor Beta
--------------	--

## U

U	Unit(s)
---	---------

## V

VEGF	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
------	--

## W

WB	Westernblot
----	-------------



## VI Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Blutdruckregulierende und metabolische Effekte der natriuretischen Peptide ANP und BNP .....	5
Abb. 2	Zeitliche Koordination und Morphologie der Netzhautvaskularisation in der Maus .....	8
Abb. 3	Signalübertragung während der retinalen Angiogenese .....	9
Abb. 4	Parakrine Faktoren, die die Interaktion von Perizyten und ECs während der Angiogenese regulieren .....	12
Abb. 5	Expression des GC-A- und GC-B-Rezeptors in Perizyten .....	14
Abb. 6	Auswertung der Vaskularisation .....	25
Abb. 7	Versuchsaufbau der plethysmographischen Blutdruckmessung: ....	27
Abb. 8	Kultivierte murine Hirn-Perizyten .....	28
Abb. 9	Körpergewicht von neonatalen Perizyten GC-A KO Mäusen und Kontrolltieren .....	32
Abb. 10	Ausdehnung des retinalen Gefäßplexus .....	34
Abb. 11	Charakteristik des Gefäßnetzes: Gefäßgesamtlänge .....	35
Abb. 12	Charakteristik des Gefäßnetzes: Gefäßverzweigungen .....	35
Abb. 13	Charakteristik des Gefäßnetzes: Gefäßendpunkte .....	36
Abb. 14	Charakteristik des Gefäßnetzes: Arteriolenlänge .....	36
Abb. 15	Perizytenbedeckung des Gefäßendothels .....	38
Abb. 16	Charakteristik des retinalen Gefäßnetzes adulter Versuchstiere .....	40
Abb. 17	Blutdruckmessungen an adulten Perizyten GC-A KO Mäusen .....	41
Abb. 18	Körpergewicht von neonatalen Perizyten GC-B KO Mäusen und Kontrolltieren .....	42
Abb. 19	Ausdehnung des retinalen Gefäßplexus .....	44
Abb. 20	Charakteristik des Gefäßnetzes: Gefäßgesamtlänge .....	44
Abb. 21	Charakteristik des Gefäßnetzes: Gefäßverzweigungen .....	45
Abb. 22	Charakteristik des Gefäßnetzes: Gefäßendpunkte .....	45

Abb. 23	Charakteristik des Gefäßnetzes: Arteriolenlänge .....	46
Abb. 24	Perizytenbedeckung des Gefäßendothels.....	47
Abb. 25	Charakteristik des retinalen Gefäßnetzes adulter Versuchstiere .....	48
Abb. 26	Blutdruckmessungen - Perizyten-spezifische GC-B KO Mäuse .....	49
Abb. 27	Körpergewicht neonataler Perizyten cGKI KO-Mäusen und Kontrolltiere .....	50
Abb. 28	Ausdehnung des retinalen Gefäßplexus.....	51
Abb. 29	Charakteristik des Gefäßnetzes: Gefäßgesamtlänge .....	52
Abb. 30	Charakteristik des Gefäßnetzes: Gefäßverzweigungen .....	52
Abb. 31	Charakteristik des Gefäßnetzes: Gefäßendpunkte.....	53
Abb. 32	Charakteristik des Gefäßnetzes: Arteriolenlänge .....	53
Abb. 33	Perizytenbedeckung des Gefäßendothels.....	55
Abb. 34	Westernblot-Analysen der Expression von Angiotensinogenase-1 in kultivierten Perizyten: Einfluss der natriuretischen Peptide .....	58
Abb. 35	Westernblot-Analysen der Expression von Angiotensinogenase-1 in kultivierten Perizyten: Effekte von ANP und BNP auf Kontroll- und GC-A-defiziente Zellen .....	58
Abb. 36	Westernblot-Analysen der Expression von Angiotensinogenase-1 in kultivierten Perizyten: Effekt von CNP auf Kontroll- und GC-B- defiziente Zellen .....	59
Abb. 37	Cre-LoxP-Strategie.....	62
Abb. 38	Signalwege der Guanylylzyklase-Rezeptoren A und B.....	66

## VII Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	PCR-Ansatz der jeweiligen Genotypisierung.....	21
Tabelle 2	Primersequenzen der Genotypisierung .....	21
Tabelle 3	PCR-Programme GC-A und GC-B .....	22
Tabelle 4	PCR-Programme cGKI und Cre .....	22

## VIII Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mir die Vollendung dieser Dissertationsarbeit ermöglicht haben!

Allen voran gilt hierbei mein Dank Frau Prof. Dr. med. Michaela Kuhn für die Überlassung des Themas und die fachliche Betreuung, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Aber nicht nur hierfür, auch für die Vermittlung des nötigen Fachwissens sowie ein allseits offenes Ohr für Fragen gilt ihr mein besonderer Dank.

Weiterhin möchte ich mich herzlich bei Frau Dr. Katarina Špiranec Spes für die Einführung in die verwendeten Experimentiertechniken, die stete Unterstützung im Labor sowie die freundschaftliche Betreuung im Allgemeinen bedanken.

Ein großes Dankeschön geht an dieser Stelle auch an alle anderen Mitarbeiter des Physiologischen Instituts für die freundliche Aufnahme und stete Unterstützung während meiner „Laborzeit“.

Zu guter Letzt möchte ich natürlich auch meiner Familie und meinen Freunden, die mich während meines Studiums und der vorliegenden Dissertation stets unterstützt und motiviert haben, danken.

## **IX Eigene Veröffentlichungen und Kongressteilnahme**

- 2017/07      **„The natriuretic peptide/guanylyl cyclase–A system stimulates the cross-talk from pericytes to endothelial cells during physiological retinal vascular development“**  
Koch et al.  
*Abstract und Poster auf der 8. internationalen cGMP- Konferenz in Bamberg*
- 2018/07      **„Endothelial C-Type Natriuretic Peptide Acts on Pericytes to Regulate Microcirculatory Flow and Blood Pressure“**  
Špiranec, K., Chen, W., Werner, F., Nikolaev, V. O., Naruke, T., Koch, F., Werner, A., Eder-Negrin, P., Dieguez-Hurtado, R., Adams, R. H., Baba, H. A., Schmidt, H., Schuh, K., Skryabin, B. V., Movahedi, K., Schweda, F. & Kuhn, M  
*Circulation Volume 138, Issue 5, Seite 494-508*
- 2020/01      **„Natriuretic Peptides Attenuate Retinal Pathological Neovascularization Via Cyclic Guanosine Monophosphate Signaling in Pericytes and Astrocytes“**  
Špiranec Spes, K., Hupp, S., Werner, F., Koch, F., Völker, K., Krebes, L., Kämmerer, U., Heinze, K. G., Braunger, B. M. & Kuhn, M.  
*Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology Volume 40, Issue 1, Seite 159–174*