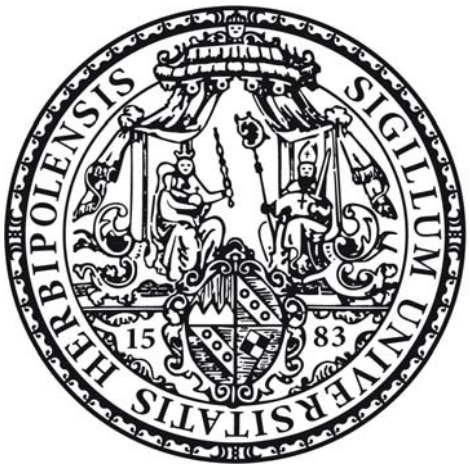
Bedeutung der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase bei der Angiogenese und der Arteriogenese in der Maus

Dissertation zur Erlangung des

Naturwissenschaftlichen Doktorgrades

der Julius-Maximilians-Universität Würzburg



Vorgelegt von

Noomen Bettaga

aus Ludwigsburg

Würzburg 2014

Eingereicht am:

.....

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

.....

Gutachter :

.....

Gutachter:

.....

Tag des Promotionskolloquiums:

.....

Doktorurkunde ausgehändigt am:

.....

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich meine Dissertation mit dem Titel „Bedeutung der NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase bei der Angiogenese und der Arteriogenese in der Maus“ eigenständig, d.h. insbesondere selbstständig und ohne Hilfe einer kommerziellen Promotionsberatung angefertigt habe und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen oder Hilfsmittel benutzt habe.

Des Weiteren versichere ich, dass ich die Gelegenheit zum Promotionsvorhaben nicht kommerziell vermittelt bekommen habe und dass ich insbesondere nicht eine Person oder Organisation eingeschaltet habe, die gegen Entgelt Betreuer bzw. Betreuerinnen für die Anfertigung von Dissertationen sucht.

Ich erkläre außerdem, dass die Regeln der Universität Würzburg über gute wissenschaftliche Praxis eingehalten wurden, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat und dass ich akademische Grade weder bereits früher erworben noch zu erwerben versucht habe.

Würzburg, 2014

Noomen Bettaga

Meinen geliebten Eltern, Frau und Sohn für alles, was sie für mich getan haben.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis **1**

Abbildungsverzeichnis **4**

Abkürzungsverzeichnis **5**

1. Einleitung **6**

1.1. Der NO/cGMP-vermittelte Signalweg 6

1.1.1. NO-Synthasen (NOS) 6

1.1.2. Stickstoffmonoxid und seine physiologischen Wirkungen 8

1.1.3. Guanylyl-Cyclasen 9

1.1.4. Die NO-sensitive Guanylyl-Cyclase (NO-GC) 9

1.1.5. Der sekundäre Botenstoff cGMP 10

1.1.6. cGMP-abhängige Proteinkinasen 11

1.1.7. cGMP-abhängige Phosphodiesterasen 12

1.1.8. cGMP-abhängige Ionenkanäle 13

1.2. Physiologie und Pathophysiologie der Blutgefäße 13

1.2.1. Bildung von Blutgefäßen 13

1.2.1.1. Vaskulogenese 13

1.2.1.2. Angiogenese 14

1.2.1.3. Arteriogenese 14

1.2.2. Physiologie der Blutgefäße in der Retina 16

1.2.3. Pathophysiologische Entwicklung der Netzhaut am Beispiel der proliferativen Retinopathie 17

1.3. Rolle des NO/cGMP-Signalweges bei der Angiogenese 18

1.3.1. VEGF: Struktur, Rezeptoren und Rolle bei der Angiogenese 18

1.3.2. Der NO/cGMP-Signalweg in der Angiogenese 19

1.4. Transgene Mausmodelle 21

1.4.1. KO-Mausmodelle für die NOS 23

1.4.2. KO-Mausmodelle für die NO-GC 24

1.4.3. KO-Mausmodelle für die PKG 25

2. Zielsetzung **26**

3. Material und Methoden **28**

3.1. Material 28

3.2. Methoden 32

3.2.1. Haltung und Zucht 32
3.2.2. Induktion von Knockout-Tieren durch Tamoxifen-Injektion 32
3.2.3. Genotypisierung 32
3.2.4. Aortenring-Assay 33
3.2.5. Sauerstoff-induzierte Retinopathie 34
3.2.6. Hinterlauf-Ischämie-Modell 37
3.2.7. Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR) 37
3.2.8. Proteinbiochemische Methoden 39
3.2.8.1. SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) 39
3.2.8.2. Western Blot und Immundetektion 41
3.2.8.3. Immunhistochemie 41
4. Ergebnisse 43
4.1. Generierung der zellspezifischen KO-Mäuse 43
4.2. Nachweis der NO-GC in Endothelzellen 44
4.2.1. Nachweis des DNA-Ausschnitts der NO-GC in Endothelzellen 44
4.2.2. Nachweis der NO-GC in Endothelzellen mittels Western Blot 44
4.2.3. Nachweis der mRNA der NO-GC in Endothelzellen 44
4.3. Aortenring-Assay 47
4.3.1. Auswirkung von Serum auf die wachsenden Aussprossungen 47
4.3.2. Auswirkung von VEGF auf die wachsenden Aussprossungen 49
4.3.3. Einfluss der NO-GC auf die Aussprossung der Aortenringe 49
4.3.4. Immunhistochemische Analyse der Aortenringe 52
4.4. Angiogenese in der Retina 52
4.4.1. Physiologische Gefäßentwicklung in der Retina 52
4.4.2. Die Gefäß-Obliteration in der Retina 55
4.4.2.1. Die Gefäß-Obliteration bei GCKO-Tieren 55
4.4.2.2. Die Gefäß-Obliteration bei zellspezifischen Knockout-Tieren 55
4.4.3. Die Gefäß-Neubildung während der Hypoxie-Phase 57
4.4.4. Die Tuft-Formation 57
4.4.5. Immunhistochemische Analysen der Tufts 59
4.4.6. NO-GC in den Perizyten 59
4.4.7. NO-GC in glatten Muskelzellen nach Tamoxifen-Injektion 62
4.5. Der Hinterlauf-Ischämie-Versuch 62
4.5.1. Basale Blutperfusion in den GCKO-Mäusen 64
4.5.2. Auswirkung der NO-GC auf die Blutreperfusion 64

4.5.2.1. Hinterlauf-Ischämie bei GCKO-Mäusen 66
4.5.2.2. Hinterlauf-Ischämie bei zellspezifischen Knockout-Mäusen 66
4.5.3. Proliferation im *Gastrocnemius*-Muskel nach Ischämie 70
5. Diskussion 72
5.1. NO-vermittelte Angiogenese 72
5.2. NO-GC im Hinterlauf-Ischämie-Versuch 73
5.3. Nekrose 74
5.4. NO-GC in der Retina 75
5.5. NO-GC in Perizyten 78
6. Zusammenfassung 79
7. Summary 80
8. Literaturverzeichnis 82
9. Eigene Publikationen 97
9.1. Originalarbeiten 97
9.2. Kongressbeiträge 97
10. Danksagung 98

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Der NO/cGMP-Signalweg	7
Abb. 2:	Angiogenese und Arteriogenese	15
Abb. 3:	Bei der NO/cGMP-vermittelte Angiogenese beteiligte Faktoren	22
Abb. 4:	Sauerstoff-Kammer	35
Abb. 5:	Hinterlauf-Ischämie	38
Abb. 6:	Einzelne Schritte der RT-PCR	40
Abb. 7:	Generierung der Knockout-Mausmodelle	45
Abb. 8:	Nachweis des Ausschnitts mittels PCR und Western Blot	46
Abb. 9:	Nachweis des Ausschnitts mittels RT-PCR	48
Abb. 10:	Effekt von Seren und VEGF auf die sprossenden Aortenringe	50
Abb. 11:	Effekt von NO-GC auf die sprossenden Aortenringe	51
Abb. 12:	Immunhistochemische Analyse der Aorten-Aussprossungen	53
Abb. 13:	Flachpräparat von Retinae aus 7 Tage alten WT- und GCKO-Tieren	54
Abb. 14:	Immunhistochemische Analyse der Retinae während des OIRs	56
Abb. 15:	Analyse der Tuft-Bildung	58
Abb. 16:	Immunhistochemische Analyse der Tufts	60
Abb. 17:	Nachweis der Expression der NO-GC in Perizyten	61
Abb. 18:	Nachweis des NO-GC Ausschnitts in jungen SMC-GCKO-Tieren	63
Abb. 19:	Blutperfusion im Hinterlauf von WT- und GCKO-Tieren	65
Abb. 20:	Einfluss der NO-GC auf die Blutreperfusion in GCKO-Tieren	67
Abb. 21:	Einfluss der NO-GC auf die Blutreperfusion in SMC-GCKO-Tieren	68
Abb. 22:	Einfluss der NO-GC auf die Blutreperfusion in EC-GCKO-Tieren	69
Abb. 23:	Analyse der Zellproliferation in den *Gastrocnemius*-Muskel	71

Abkürzungsverzeichnis

α-SMA	=	α-Glattmuskel-Aktin
BS-1 Lektin	=	Lektin aus *Bandeiraea simplicifolia*
cAMP	=	cyclisches Adenosinmonophosphat
CFTR-Kanal	=	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
cGMP	=	cyclisches Guanosinmonophosphat
CNG-Kanäle	=	cGMP-abhängige Ionenkanäle
$CreER^{T2}$	=	Cre-Recombinase mit modifizierter Estrogen-Rezeptor-Bindedomäne
EC-GCKO	=	Endothelzellen-GCKO
EDRF	=	endothelium-derived relaxing factor
eNOS	=	endotheliale NOS
FGF	=	Fibroblasten-Wachstumsfaktor
FITC-AK	=	Fluoresceinisothiocyanat-markierter Antikörper
GC	=	Guanylyl-Cyclase
GCKO	=	Guanylyl-Cyclase Knockout
GTP	=	Guanosintriphosphat
HIF	=	Hypoxie-induzierter Faktor
iNOS	=	induzierbare NOS
IRAG	=	IP_3-receptor-associated cGMP-dependent kinase-substrate
IP_3	=	Inositol-1,4,5-triphosphat
L-NAME	=	N^G-Nitro-L-Arginin-Methylester
LDI	=	Laser-Doppler-Imager
LDM	=	Laser-Doppler-Messung
MLCP	=	Myosin-leichte-Ketten Phosphatase
NO	=	Stickstoffmonoxid
NO-GC	=	NO-sensitive Guanylyl-Cyclase
NOS	=	NO-Synthase
nNOS	=	neuronale NOS
PAGE	=	Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
PCR	=	Polymerase-Kettenreaktion
PDE	=	Phosphodiesterase
pGC	=	partikuläre Guanylyl-Cyclase
PKA	=	cAMP-abhängige Proteinkinase
PKG	=	cGMP-abhängige Proteinkinase
PlGF	=	plazentaler Wachstumsfaktor
ODQ	=	1H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one
RT-PCR	=	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SMC-GCKO	=	Glattmuskel-spezifischer Guanylyl-Cyclase-Knockout
SMMHC	=	smooth muscle myosin heavy chain
TSP	=	Thrombospondin
VASP	=	Vasodilatator-stimuliertes Phosphoprotein
VEGF	=	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor

1. Einleitung

1.1. Der NO/cGMP-vermittelte Signalweg

Im Jahr 1980 konnten Furchgott und Zawadzki zeigen, dass ein vom Endothel freigesetzter Faktor, der sogenannte „Endothelium-Derived Relaxing Factor“ (EDRF), eine erweiternde Wirkung auf die Blutgefäße hat. Erst später stellte sich heraus, dass es sich beim EDRF um Stickstoffmonoxid (NO) handelt (Palmer et al., 1987; Ignarro et al., 1987).

NO wird in den Endothelzellen produziert und diffundiert anschließend in die benachbarten Zellen. In glatten Muskelzellen ist die NO-sensitiven Guanylyl-Cyclase (NO-GC) der Hauptrezeptor für NO im kardiovaskulären System (Groneberg et al., 2010). Die NO-GC wird durch NO stimuliert, was zu einer erhöhten Produktion von cGMP und weitergehend zur Gefäßrelaxation führt (Diamond, 1978; Axelson et al., 1979). cGMP wirkt je nach Zelltyp auf unterschiedliche Effektoren: cGMP-abhängige Proteinkinasen (PKG), cGMP-regulierte Phosphodiesterasen (PDE) oder auch cGMP-abhängige Ionenkanäle (Abbildung 1). Für die Identifizierung von EDRF als NO und für die Entdeckung, dass NO die Bildung des sekundären Botenstoffes cyclisches Guanosinmonophosphat (cGMP) durch die Stimulation der NO-GC vermittelt, erhielten Robert F. Furchgott, Louis J. Ignarro und Ferid Murad 1998 den Nobelpreis für Medizin. Im Folgenden sollen die angesprochenen Mitglieder des NO/cGMP Signalweges näher beschrieben werden.

1.1.1. NO-Synthasen (NOS)

Das Enzym NOS katalysiert in verschiedenen Geweben die enzymatische Bildung von Stickstoffmonoxid (Knowles et al., 1989; Schmidt und Murad, 1991; Wei et al., 1995). Die Familie der NOS unterteilt sich in drei verschiedenen Isoformen (Förstermann et al., 1994): die endotheliale NOS (eNOS), die neuronale NOS (nNOS) und die induzierbare NOS (iNOS). Die eNOS ist hauptsächlich in Endothelzellen des Blutgefäßsystems exprimiert und spielt dort eine wichtige Rolle bei der Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur (Gyurko et al., 2000). Die nNOS ist vorwiegend im Gehirn und neuronalen Geweben exprimiert (Mayer et al., 1990; Bredt und Snyder, 1990). Allerdings wurde die nNOS auch in epithelialen und glatten Muskelzellen nachgewiesen (Schmidt und Walter, 1994; Loesch und Burnstock, 1995). Dort übernimmt NO die Rolle eines Neurotransmitters. eNOS und nNOS sind im Körper konstitutiv exprimiert. Eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration führt zur Bildung des Calcium/Calmodulin (Ca/CaM) Komplexes die sowohl eNOS als auch nNOS aktivieren (Bredt und Snyder, 1990).

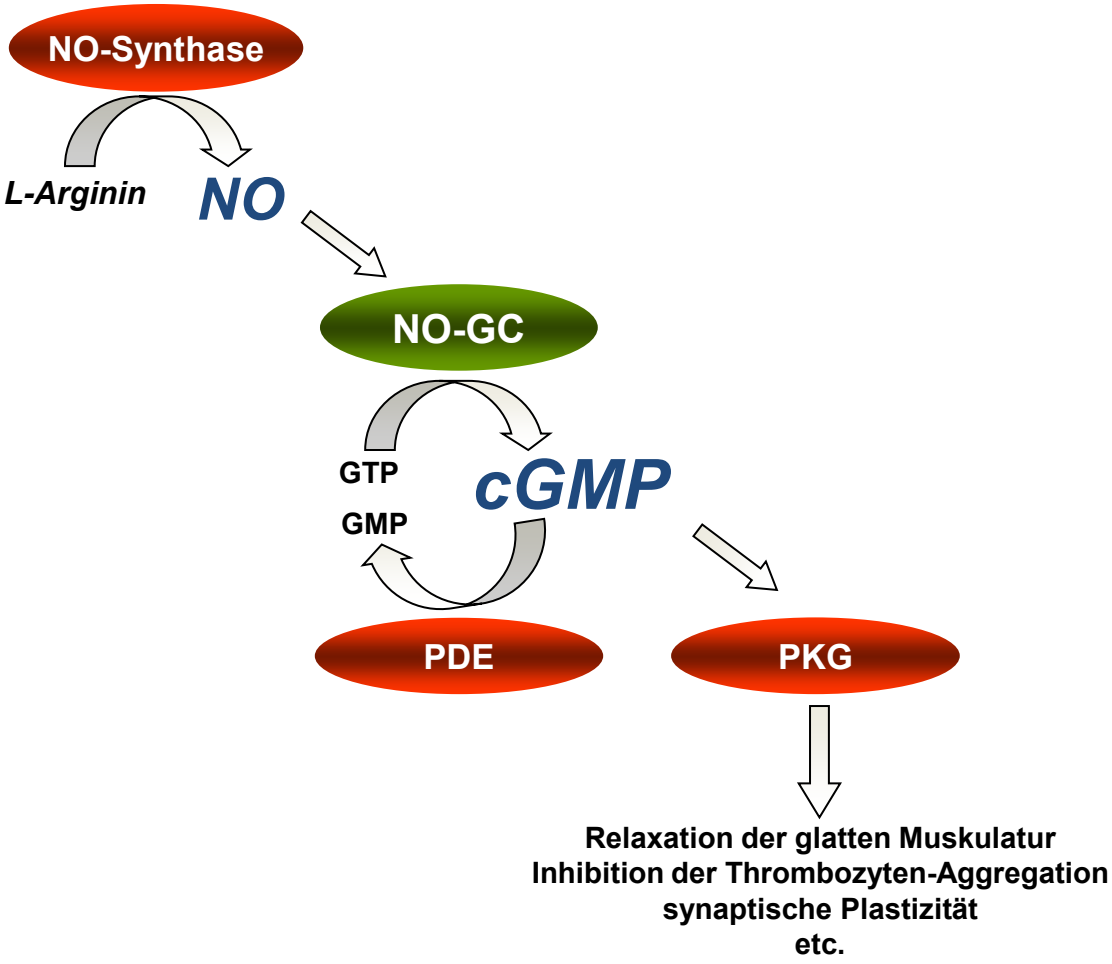


Abb. 1: Der NO/cGMP-Signalweg
NO-Synthasen produzieren Stickstoffmonoxid, welches die NO-sensitive Guanylyl-Cyclase (NO-GC) aktiviert. Guanosintriphosphat (GTP) wird durch die NO-GC in den sekundären Botenstoff cyclisches Guanosinmonophosphat (cGMP) umgewandelt. Anschließend aktiviert cGMP die Proteinkinase G (PKG), die eine Reihe von Effektor-Proteinen phosphoryliert, was zu verschiedenen physiologischen Effekte führt. Zeitgleich mit der Bildung katalysieren die Phosphodiesterasen (PDEs) den Abbau des cGMPs.

Zusätzlich kann die eNOS durch die Proteinkinase B (Akt) phosphoryliert und dadurch aktiviert werden (Dimmeler et al., 1999). Auch der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (vascular endothelial growth factor; VEGF) wirkt durch die Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration über Akt aktivierend auf die eNOS. Es konnte gezeigt werden, dass VEGF zu einer erhöhten Expression von eNOS-mRNA führen kann (Bouloumié et al., 1999). Im Gegensatz zu eNOS und nNOS ist die iNOS daueraktiv, da sie unter physiologischen Bedingungen CaM gebunden hat (Gross et al., 1990). Die iNOS wird hauptsächlich in Makrophagen und Mikrogliazellen infolge einer pro-inflammatorischen Cytokin-Induktion exprimiert (Hevel et al., 1991; Yui et al., 1991). So spielt sie eine Rolle bei der unspezifischen Immunabwehr durch eine erhöhte Produktion von NO, die direkt zytotoxisch auf Bakterien wirken kann (Liew et al., 1990, Xie und Nathan, 1994; Kiemer und Vollmar, 1998).
Die Aminosäure Arginin dient als Ausgangsstoff für die Bildung von NO. Während der Reaktion entstehen aus L-Arginin, Sauerstoff und Nikotinamid-Adenindinukleotid-Phosphat (NADPH), die Stoffe NADP, Wasser, Citrullin und NO. Die Reaktion verläuft in zwei Schritten mit dem Zwischenprodukt NOHLA (N^{ω}-hydroxy-L-arginine). Als Ko-Faktoren werden Tetrahydrobiopterin (BH4), Flavinadenindinukleotid (FAD), Flavinadeninmononukleotid (FMN) und Häm benötigt (Mayer et al., 1990; Klatt et al., 1992).

1.1.2. Stickstoffmonoxid und seine physiologischen Wirkungen

NO ist ein freies Radikal, das im menschlichen Organismus die Rolle eines Signalmoleküls einnimmt. NO ist lipophil, elektrisch neutral und relativ klein, sodass es leicht durch Zellmembranen diffundieren kann. Es hat eine kurze Halbwertszeit, wodurch direkte Effekte nur in der unmittelbaren Umgebung möglich sind.
NO ist an vielen physiologischen Prozessen beteiligt. Im Gefäßsystem wird NO von Endothelzellen produziert und diffundiert in die benachbarten glatten Muskelzellen, wo es eine Relaxation der Blutgefäße vermittelt. Dadurch spielt NO u.a. eine Rolle bei der Regulation des Blutdrucks, bei der Durchblutung von Skelettmuskulatur sowie bei der Erektion des Penis (Hedlund et al., 2000; Groneberg et al., 2013). Das in den Endothelzellen produzierte NO kann auch in das Lumen der Blutgefäße gelangen und in Thrombozyten diffundieren, wodurch eine Hemmung der Thrombozytenaggregation und -adhäsion verursacht wird (Moncada und Higgs, 1995). Im zentralen und peripheren Nervensystem spielt NO die Rolle eines synaptischen Neurotransmitters, der als Gas vorkommt (Böhme et al., 1991; Schuman und Madison, 1991). Die NO-GC ist mittlerweile als wichtigster Rezeptor für NO anerkannt; sehr viele physiologische

Funktionen gehen auf die Aktivierung der NO-GC zurück. Daher soll im Folgenden auf dieses Enzym näher eingegangen werden.

1.1.3. Guanylyl-Cyclasen

Die Proteinfamilie der Guanylyl-Cyclasen kann in zwei Gruppen eingeteilt werden: Zum einen die Peptid-aktivierten Guanylyl-Cyclasen (pGC), die auch als membrangebundene Guanylyl-Cyclasen bezeichnet werden. Diese werden durch Peptide wie z.B. die natriuretischen Peptide oder Guanylin stimuliert (Winquist et al., 1984). Bekannt sind sieben verschiedene pGC, die mit GC-A bis GC-G bezeichnet werden (Lucas et al., 2000; Kuhn, 2009). Da die Peptid-aktivierten Guanylyl-Cyclasen nicht an der NO-vermittelten Signaltransduktion beteiligt sind, soll auf sie nicht weiter eingegangen werden. Die zweite Gruppe besteht aus den NO-sensitiven Guanylyl-Cyclasen (NO-GC), die durch NO stimuliert werden (Böhme et al., 1978; Murad et al., 1978). Die NO-GC wird auch als lösliche Guanylyl-Cyclase bezeichnet (sGC: soluble guanylyl cyclase), mittlerweile weiß man aber, dass sie auch an Plasmamembranen assoziiert vorliegt (Russwurm et al., 2001). Die NO-GC ist in der Zelle der wichtigste Rezeptor für das Signalmolekül NO.

1.1.4. Die NO-sensitive Guanylyl-Cyclase (NO-GC)

Die NO-GC vermitteln die NO-induzierten Effekte über eine Erhöhung der intrazellulären cGMP-Konzentration. Durch Bindung des Botenstoffs NO wird die NO-GC aktiviert und katalysiert die Umsetzung von Guanosintriphosphat (GTP) in cGMP. Die NO-GC ist ein Heterodimer bestehend aus den zwei Untereinheiten α und β, welches in den meisten Zelltypen exprimiert wird (Mergia et al., 2003). Bereits im Jahr 1981 konnte die NO-GC aus Rinderlunge isoliert und später sequenziert werden (Gerzer et al., 1981). Dabei wurde gezeigt, dass die häufigste Isoform aus den Untereinheiten α_1 und β_1 besteht. Neben diesen beiden Untereinheiten wurden noch eine α_2- und eine β_2-Untereinheit identifiziert (Harteneck et al., 1991; Yuen et al., 1990). Allerdings existieren nur Heterodimere der $ß_1$-Untereinheit (α_1/β_1 und α_2/β_1). Die β_2-Untereinheit kann mit keiner der Untereinheiten ein katalytisch aktives Enzym generieren. Es wurde aber berichtet, dass im Gegensatz zu den anderen Untereinheiten die β_2-Untereinheit *in vitro* ein aktives Homodimer bilden kann (Koglin et al., 2001). Eine physiologische Funktion dieses Homodimers konnte jedoch bislang nicht gezeigt werden. Damit kommt der $ß_2$-Untereinheit wohl keine physiologische Rolle zu.

Der wichtigste Unterschied zwischen den α_1/β_1- und α_2/β_1-Isoformen liegt in ihrer subzellulären Lokalisation: Die α_2-Untereinheit ermöglicht die Membranassoziation der

α_2/β_1-Isoform, während die α_1/β_1-Isoform cytosolisch vorliegt (Russwurm et al., 2001). Ein weiterer Unterschied liegt in ihrer Expression. Die α_1/β_1-Isoform kommt besonders in Lunge und Aorta in hohen Konzentrationen vor (Mergia et al., 2003). Eine wichtige Funktion dieser Isoform besteht in der Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur. Diese Isoform ist auch in Thrombozyten zu finden und ist dort für die Hemmung der Aggregation verantwortlich (Dangel et al., 2010). Die α_2/β_1-Isoform ist insbesondere in Hippocampus und Cerebellum zu finden und scheint eine wichtige Rolle im ZNS zu spielen (Gibb und Garthwaite, 2001; Mergia et al., 2003). Diese Annahme wird durch die Interaktion der α_2-Untereinheit mit einer Domäne des PSD95 (Post Synaptic Density Protein) unterstützt, welches eine Lokalisation des α_2/β_1-Dimers an die synaptische Membran ermöglicht (Russwurm et al., 2001; Burette et al., 2002). Kürzlich konnte auch gezeigt werden, dass die α_2/β_1-Isoform der NO-GC zur synaptischen Plastizität beiträgt (Haghikia et al., 2007; Taqatqeh et al., 2009).

Die Primärstruktur der α_1- und β_1-Untereinheiten kann in drei Bereiche unterteilt werden: Zunächst einen N-terminalen Bereich, der die Häm Gruppe bindet, die für die Aktivierbarkeit des Enzyms zwingend notwendig ist (Friebe und Koesling, 2003). Dabei bindet NO direkt an die prosthetische Häm-Gruppe und bildet einen Eisen-Nitrosyl-Komplex. Der zweite Bereich ist eine zentrale Region, durch die die beiden Untereinheiten dimerisieren können (Lucas et al., 2000). Der C-terminale Bereich enthält die katalytische Domäne und weist die größten Homologien zwischen den zwei Untereinheiten auf (Wedel et al., 1995).

Als Häm-Protein bindet die NO-GC NO mit hoher Affinität, besitzt aber im Gegensatz zu anderen Häm-Proteinen, wie zum Beispiel Hämoglobin, eine sehr geringe Affinität zu Sauerstoff. Die Bindung von NO bewirkt eine bis zu 200-fach gesteigerte Aktivierung der NO-GC. Auch Kohlenmonoxid (CO) ist in der Lage, an das Häm der NO-GC zu binden, führt aber nur zu einer 3 bis 4-fach erhöhten Aktivierung des Enzyms (Gerzer et al., 1981).

1.1.5. Der sekundäre Botenstoff cGMP

Im Jahr 1963 ist es Ashman et al. erstmalig gelungen, den sekundären Botenstoff cGMP in Rattenurin nachzuweisen. Sechs Jahre später wurde die enzymatische Bildung des cGMPs nachgewiesen (Hardman und Sutherland, 1969; Schultz et al., 1969). cGMP ist u.a. beim Sehvorgang in den Stäbchen und Zapfen der Retina, der Relaxation der glatten Muskulatur der Blutgefäße und der Regulation des Insulinspiegels beteiligt. Die enzymatische Umsetzung von GTP zu cGMP wird von der NO-GC wie auch von membrangebundenen Guanylyl-Cyclasen katalysiert. Als

sekundärer Botenstoff wirkt cGMP auf Effektorproteine, die im Folgenden näher besprochen werden sollen.

1.1.6. cGMP-abhängige Proteinkinasen

Die cGMP-abhängige Proteinkinase, auch als Proteinkinase G (PKG) bekannt, ist eine Serin/Threonin-spezifische Proteinkinase, die durch cGMP aktiviert wird. Die PKG ist für die Phosphorylierung einer Reihe von biologisch wichtigen Proteinen verantwortlich und ist dadurch an vielen physiologischen Prozessen, wie zum Beispiel der Relaxation der glatten Muskelzellen und der Hemmung der Thrombozytenaggregation beteiligt (Birschmann und Walter, 2004; Hofmann et al. 2006). In Säugetieren konnten zwei Gene identifiziert werden, die für PKG-I und PKG-II kodieren (Wernet et al., 1989; Jarchau et al., 1994). Für die PKG-I existieren zwei Spleißvarianten: die PKG-Iα und die PKG-Iβ (Pryzwansky et al., 1995; Pfeifer et al., 1999). Die PKG-I kommt in der Zelle als lösliches Protein vor und wird hauptsächlich in Thrombozyten und glatter Gefäßmuskulatur exprimiert (Keilbach et al., 1992). Die PKG-II hingegen ist über eine N-Myristoylierung in der Plasmamembran verankert und kommt hauptsächlich im Gehirn, im gastrointestinalen Gewebe, in der Niere und in der Lunge vor (Vaandrager et al., 1997; Jarchau et al., 1994). Beide Isoformen liegen in der Zelle als Homodimere vor, wobei diese Dimerisierung keine Voraussetzung für eine katalytische Aktivität ist (Pfeifer et al., 1999). Die PKG-Untereinheiten lassen sich in drei Domänen unterteilen: Die N-terminale Domäne ermöglicht die Dimerisierung, vermittelt die Interaktion mit Substratproteinen und inhibiert die Kinaseaktivität in Abwesenheit von cGMP (Lincoln et al., 1995; Lohmann et al., 1997; Pfeifer et al., 1999). Die regulatorische Domäne enthält zwei nicht-identische cGMP-Bindungsstellen. In der katalytischen Domäne sind eine Substratbindungsstelle und eine Mg-ATP-Bindungsstelle lokalisiert. Diese Domäne ermöglicht den Phosphattransfer von ATP an die Hydroxylgruppe der Serin/Threonin-Seitenkette des Ziel-Proteins (Atkinson et al., 1991; Casteel et al., 2010).

Für die PKG-I konnte eine Reihe von biologischen Substraten identifiziert werden. Das VASP (Vasodilatator-stimuliertes Phosphoprotein) ist eines der am besten untersuchten Substrate der PKG-I. Es ist an der Aktivierung der Blutplättchen sowie an der Hemmung der Zelladhäsion beteiligt (Pryzwansky et al., 1995; Krause et al., 2002). VASP kann an drei Stellen phosphoryliert werden, die eine unterschiedliche Affinität zur PKG-I und der cAMP-abhängigen Proteinkinase (PKA) aufweisen (Walter et al., 1993). Ein zweites Substrat ist der IP_3-Rezeptor (Inositoltriphosphat-Rezeptor), der die Kontraktion der glatten Gefäßmuskulatur vermittelt (Raeymaekers et al., 1990; Komalavilas and Lincoln, 1996). Auch die Ca^{2+}-abhängigen Kaliumkanäle und das

Protein IRAG (IP_3-Rezeptor assoziiertes cGMP-Kinase-Substrat), welches zu einer Hemmung der IP_3-stimulierten Ca^{2+}-Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum führt (Alioua et al., 1998; Ammendola et al., 2001), werden von der PKG-I phosphoryliert. Zielproteine der PKG-Iβ sind beispielsweise Zytoskelett- und kontraktile Proteine wie die Myosin-Leichte-Ketten-Phosphatase (MLCP), Calponin, Desmin oder Connexin. Diese Zielmoleküle sind an der Regulation des vaskulären „Remodelling“ und der Angiogenese beteiligt (Nakamura et al., 1999; Eigenthaler et al., 1999).
Der CFTR-Kanal (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator) ist das wichtigste Effektorprotein für die PKG-II. Der CFTR spielt eine Rolle beim Salz- und Flüssigkeitstransport in Darm und Lunge. So kommt es nach der Phosphorylierung des Kanals zu einer verstärkten Sekretion von Chlorid-Ionen und Wasser (Vaandrager et al., 1998). Es konnte gezeigt werden, dass STa (ein Hitzestabiles Toxin aus E. Coli) die GC-C stimulieren kann, was zur Erhöhung der cGMP-Konzentration und dadurch zur Aktivierung der PKG-II führt; dabei kommt es zur Phosphorylierung des CFTR und Auslösung einer Diarrhoe. In PKG-II-Knockout-Mäusen trat die STa-induzierte Diarrhoe nicht auf (Golin-Bisello et al., 2005).

1.1.7. cGMP-abhängige Phosphodiesterasen

Phosphodiesterasen (PDEs) katalysieren den Abbau der cyclischen Nukleotide cAMP und cGMP zu den biologisch inaktiven 5´-Monophosphaten AMP (Adenosinmonophosphat) bzw. GMP (Guanosinmonophosphat). Durch den Abbau des sekundären Botenstoffs cGMP spielen die PDEs eine wichtige Rolle in der Regulation der Intensität und Dauer des NO/cGMP-Signalweges (Müllerhausen et al., 2004). Die PDEs katalysieren die Spaltung der Phosphodiesterbindung zwischen der 3'-OH-Gruppe der Ribose und der Phosphatgruppe. Alle PDEs besitzen eine hochkonservierte C-terminale katalytische Domäne, die aus 270 Aminosäuren besteht, sowie eine variable N-terminale regulatorische Domäne. Mit Ausnahme der PDE6 liegen alle PDEs als Homodimer in der Zelle vor (Hurley und Stryer, 1982; Artemyev et al., 1998).
Die PDEs lassen sich in 11 Isoenzyme unterteilen (PDE1-PDE11), wobei in jeder Familie noch unterschiedliche Isoformen und Spleißvarianten vorkommen. Sie lassen sich durch ihre Substrat- und Inhibitoren-Spezifität in drei Gruppen unterscheiden (Bender und Beavo, 2006): Die PDE-Familien mit cAMP-Spezifität umfassen die PDE4, PDE7 und PDE8. Die PDE-Familien mit gemischter Spezifität enthalten PDE1, PDE2, PDE3, PDE10 und PDE11. Die PDE-Familien mit cGMP-Spezifität sind die PDE5, PDE6 und PDE9. Die PDE5 ist eine der am besten erforschten PDEs. Es gibt 3 verschieden Spleißvarianten der PDE5, die PDE5A1, PDE5A2 und PDE5A3 (Lin et al.,

2000). PDE5 wird vorwiegend in der Lunge, der glatten Gefäßmuskulatur, den Thrombozyten und dem *Corpus cavernosum* exprimiert (Corbin und Francis, 1999). Sie wird spezifisch durch den Wirkstoff Sildenafil und seine Analoga Vardenafil und Tadalafil gehemmt, was zu einer Steigerung des cGMP-Spiegels in der Zelle führt (Corbin et al., 2000; Turko et al., 1999). Sildenafil wird unter dem Namen Viagra® zur medikamentösen Behandlung der erektilen Dysfunktion eingesetzt (Boolell et al., 1996; Burnett, 2005). Durch die Hemmung der PDE5 akkumuliert cGMP in der Zelle und führt zur einen Relaxation der glatten Muskulatur im *Corpus cavernosum*. Diese Relaxation ermöglicht einen vermehrten Bluteinstrom, was zu einer Erektion des Penis führt. Mittlerweile ist Sildenafil (Revatio®) auch zur Behandlung der pulmonalen Hypertonie zugelassen (Ghofrani et al., 2002).

1.1.8. cGMP-abhängige Ionenkanäle

Bei den cGMP-abhängige Ionenkanälen (CNG-Kanäle; cyclic nucleotide-gated channels) handelt es sich um nicht-selektive Kationenkanäle, die nach ihrer Aktivierung durch intrazelluläres cGMP den Einstrom von Calcium- und Natriumionen ermöglichen und dadurch weitere physiologische Prozesse vermitteln (Biel et al. 1999). Die cGMP-abhängigen Ionenkanäle wurden erstmals in Photorezeptorzellen in der Retina und in olfaktorischen Neuronen nachgewiesen (Fesenko et al., 1985). Die CNGs sind auch in Darmepithel, Hoden, Niere, Gehirn und Herz exprimiert (Biel et al., 1994; Distler et al., 1994). In wieweit die NO/cGMP-Signalkaskade die CNG-Kanäle mit einschließt, ist bislang unbekannt.

1.2. Physiologie und Pathophysiologie der Blutgefäße

1.2.1. Bildung von Blutgefäßen

1.2.1.1. Vaskulogenese

Die Bildung von Blutgefäßen verläuft in zwei nacheinander folgenden Abschnitten: die Vaskulogenese und die Angiogenese. Als Vaskulogenese wird die Entwicklung eines primären kapillaren Plexus bezeichnet. Das Herzkreislaufsystem ist das erste Organsystem, das während der Embryonalentwicklung angelegt wird (Hamilton et al., 1962). Während der Embryogenese erfolgt die Neubildung (*de novo*-Formation) von Gefäßen unter Einfluss der Wachstumsfaktoren Fibroblasten-Wachstumsfaktor (fibroblast growth factor, FGF) und VEGF (Carmeliet et al., 1996). Dadurch wird die Differenzierung von pluripotenten Vorläuferzellen (Hämangioblasten) zu Endothelzellen eingeleitet. Endothelzellen, die noch kein Lumen bilden, werden als Angioblasten bezeichnet. Angioblasten differenzieren sich weiter und verschmelzen zu einem primitiven Blutgefäßnetz (Risau, 1997). Der Prozess der Vaskulogenese beschränkt

sich nicht auf die Embryogenese, sondern ist auch in der adulten Phase aktiv. Es wurde gezeigt, dass auch im adulten Organismus noch endotheliale Vorläuferzellen im peripheren Blut zirkulieren (Peichev et al., 2000).

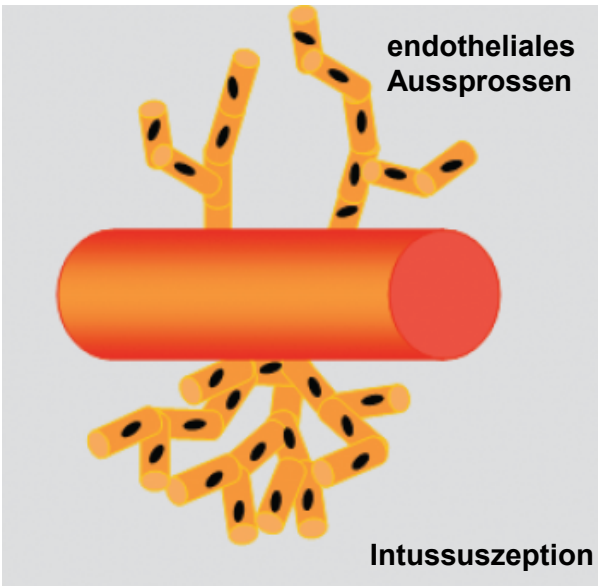
1.2.1.2. Angiogenese

Während der Angiogenese entstehen neue Blutgefäße aus bereits existierenden Kapillarnetzen (Abbildung 2A). Dies geschieht durch sprossende (sprouting) und nicht sprossende Angiogenese (Risau, 1997; Djonov und Makanya, 2005). Bei der sprossenden Angiogenese proliferieren die Endothelzellen und migrieren aus bereits existierenden Gefäßen in die umliegenden ischämischen Bereiche, wo sie sich zu durchgängigen Gefäßen formieren. Die nicht sprossende Angiogenese führt durch die transkapillare Teilung (Intussuszeption) der bereits existierenden Blutgefäße zur Erhöhung der Gefäßdichte. Trigger der Angiogenese ist eine lokale ischämische Hypoxie. Eine ischämische Hypoxie bezeichnet die Einschränkung der Organdurchblutung und somit der Sauerstoffversorgung. Dabei kann die Organdurchblutung aufgrund einer Verengung oder eines Verschlusses größerer Arterien, kleinen Arteriolen und insbesondere der Kapillaren vermindert sein. Während einer Hypoxie wird der Transkriptionsfaktor Hypoxie-induzierbarer Faktor-1 (HIF-1) stabilisiert, was zu einer Erhöhung der Expression von VEGF führt. Auch NO ist in der Lage, HIF-1 zu stabilisieren, was ebenfalls zu einer Expression von VEGF führen kann (Kimura und Esumi, 2003). VEGF wiederum induziert eine gesteigerte Gefäßpermeabilität und (über VEGF-Rezeptoren auf Endothelzellen) eine vermehrte endotheliale Proliferation (Carmeliet et al., 1998; Carmeliet et al., 2001). Diese Mechanismen werden durch weitere pro- und anti-angiogenetische Faktoren wie z.B. Scherkräfte moduliert. Eine Änderung des Verhältnisses dieser Faktoren kann zu erheblichen Störungen wie Fehlbildungen oder zum Tod führen (Dumont et al., 1995). Schließlich lagern sich unterstützende Zellen wie glatte Muskelzellen, Perizyten und Fibroblasten an, die der Stabilisierung der Gefäße dienen und ein reifes Gefäßsystem entstehen lassen (Risau et al., 1997).

1.2.1.3. Arteriogenese

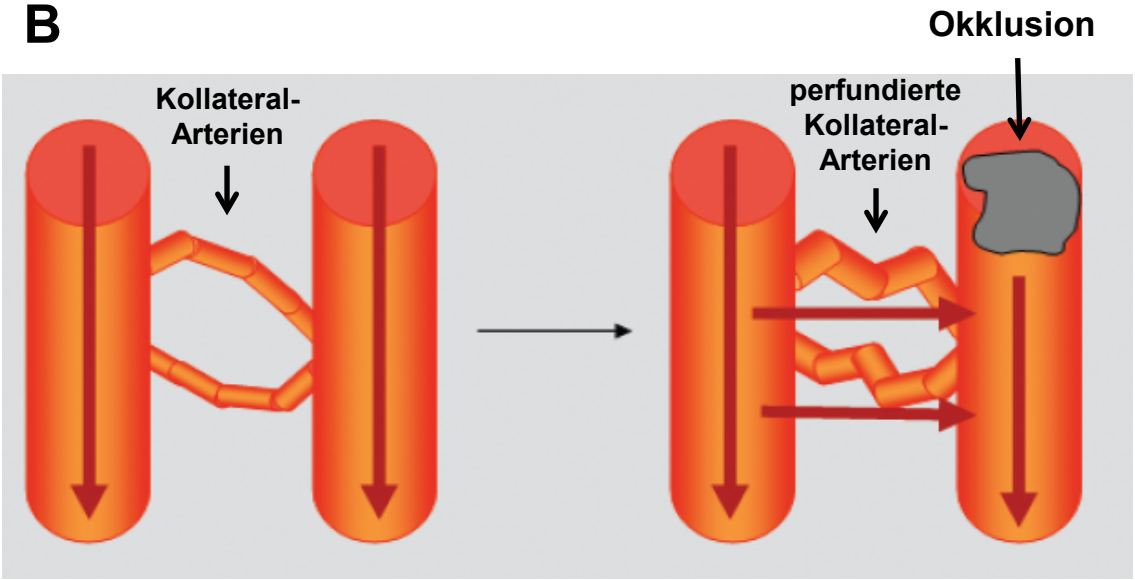
Die Arteriogenese beschreibt den Umbauvorgang von bereits existierenden kleinen Arteriolen zu vollständig entwickelten und funktionellen größeren Arterien (Abbildung 2B). Die Arteriogenese kann zu einer Steigerung bis zum 25-fachen des ursprünglichen Gefäßdurchmessers führen (Schaper, 2009). Die Arteriogenese wird primär durch die physikalischen Kräfte des fließenden Blutes ausgelöst. Im Falle einer Okklusion einer großen Arterie nimmt der Blutdruck distal der Stenose stark ab. In den

A



Hypoxie → sprossende Angiogenese

B



physikalische Kräfte → Arteriogenese

Modifiziert nach Heil et al., 2006

Abb. 2: Angiogenese und Arteriogenese
Schema zeigt Mechanismen der Angiogenese und der Arteriogenese. (A) Die Angiogenese bezeichnet die Entstehung neuer Blutgefäße aus bereits existierenden Kapillaren durch sprossende Angiogenese und Intussuszeption. (B) Infolge einer Stenose oder einer Okklusion verstärken sich die Scherkräfte, was zur Umwandlung von prä-existierenden Arteriolen in funktionale Kollateralarterien führt.

präexistierenden proximalen Kollateralgefäßen erhöht sich der Blutfluss, was zu einer erhöhten Schubspannung entlang der Endothelzellschicht führt. Es kommt dabei zu einer Querschnittsvergrößerung der Arteriolen und einer Vermehrung der Gefäß-umgebenden glatten Muskelzellen. Dabei induziert die Schubspannung die Phosphorylierung der eNOS in Endothelzellen, was zu einer Erhöhung der NO-Produktion führt (Dimmeler et al., 1999; Troidl et al., 2010). Diese erhöhte NO-Produktion führt letztendlich zur Endothelproliferation und zur Differenzierung der glatten Muskelzellen (Cai et al., 2004). Eine direkte Beteiligung der NO-GC bzw. des von der NO-GC synthetisierten cGMPs konnte noch nicht nachgewiesen werden, allerdings gibt es indirekt Hinweise darauf. So konnte in Hinterlauf-Ischämie-Experimenten gezeigt werden, dass die Inhibition der PDE5 eine Steigerung der Durchblutung bewirkt (Senthilkumar et al., 2007). In vergleichbaren Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Deletion der eNOS zu einer verringerten Reperfusion führen kann (Sahara et al., 2010). Auch die Gabe von L-NAME (L-Nitro-Arginin-Methylester; eNOS-Inhibitor) führte zur Inhibierung der Arteriogenese, was auf eine wichtige Rolle des NO-Signalwegs bei der Arteriogenese hinweist (Eitenmuller et al., 2006). Da L-NAME alle drei NOS-Isoformen inhibiert, konnte allerdings nicht gezeigt werden, ob die eNOS allein für diesen Effekt verantwortlich ist.

Auch Monozyten spielen bei der Arteriogenese eine wichtige Rolle. Durch die erhöhten Schubkräfte werden Adhäsionsmoleküle, wie ICAM (Intercellular Adhesion Molecule) vermehrt auf der Endotheloberfläche exprimiert, was zu einer Chemoattraktion der Monozyten führt (Hoefer et al., 2004). Die angelockten Monozyten differenzieren sich dann zu Makrophagen und produzieren verschiedene Zytokine wie Tumor-Nekrosefaktor alpha (TNF-α), Fibroblasten-Wachstumsfaktor-2 (FGF-2) und Matrix-Metalloproteinasen (MMPs; Fung und Helisch, 2012). Diese Faktoren bereiten den Extrazellularraum für die Proliferation und Migration von Endothelzellen und glatten Muskelzellen vor und ermöglichen die Bildung neuer Gefäße (Cai et al., 2000; Scholz et al., 2002; Fung und Helisch, 2012).

1.2.2. Physiologie der Blutgefäße in der Retina

Die Retina ist ein komplexes Organ, in dem die verschiedenen Zellen in einer Schichtenstruktur organisiert sind. Das Gefäßnetz in der Mausretina, welches diese Schichten mit Blut versorgt unterteilt sich in ein tiefes, ein intermediäres und ein oberflächliches Netz, wobei das oberflächliche Netz zuerst entsteht (Connolly et al., 1988). Angiogenese und Vaskulogenese sind hier schwer voneinander abzugrenzen. Das oberflächliche Netz entsteht durch eine Mischung aus Vaskulogenese und Angiogenese, wobei die tieferen Netze nur durch sprossende Kapillaren aus der

Oberfläche gebildet werden. Bei Mäusen ist das Gefäßnetz der Retina bei Geburt noch nicht angelegt. Die Bildung der Blutgefäße in der Retina geht von der Zentralarterie (*Arteria centralis retinae*) aus, die an der Position des Sehnervs (*Nervus opticus*) in das Auge mündet und sich in radial angeordnete Arteriolen aufspaltet. In Bereichen hoher Stoffwechselaktivität entsteht eine physiologische Hypoxie in der Netzhaut, die zu einer vermehrten Expression von VEGF durch Neuroglia (Astrozyten und Müllerzellen) führt und somit die Angiogenese induziert (Stone et al., 1995). Der Gefäßbildung geht die Ausbildung eines Astrozyten-Netzes voraus, welches den Endothelzellen als Leitgerüst dient. Bei Mäusen bilden endotheliale Tip-Zellen (endotheliale Zellen an der Spitze eines Blutgefäßes) lange Fortsätze (Filopodien), die entlang der „Astrozyten-Schienen“ bis zum Erreichen der Netzhautperipherie am siebten bis achten Tag nach der Geburt wandern (Gerhardt et al., 2003). Diese Wanderung der Endothelzellen folgt dem von den Astrozyten produzierten VEGF-Gradienten und führt zur Bildung des oberflächlichen Gefäßnetzes. In den tieferen Bereichen der Retina wird VEGF von Müllerzellen produziert, die vermutlich wie die Astrozyten als Leitgerüst für die Endothelzellen dienen (Stone und Maslim, 1997). Zur Stabilisierung der Gefäße lagern sich unterstützende Zellen wie glatte Muskelzellen, Perizyten und Fibroblasten an, wodurch schließlich ein reifes Gefäßsystem entsteht (Risau et al., 1997). Beim Aufbau des Blutgefäßnetzes bilden sich unterschiedlich dichte Bereiche. Das vaskuläre „Remodelling“ beginnt dann zentral und geht in Richtung Peripherie. Während dieses Prozesses wird die Dichte der Blutgefäße durch den Abbau überschüssiger Kapillaren angepasst. Dabei spielen wiederum Leukozyten eine wichtige Rolle (Ishida et al., 2003).

1.2.3. Pathophysiologische Entwicklung der Netzhaut am Beispiel der proliferativen Retinopathie

Ein Verlust des Gleichgewichts zwischen pro- und anti-angiogenetischen Faktoren kann zu pathologischer Angiogenese und damit zu Fehlbildung der Blutgefäße führen. Pathologische Angiogenese findet man z.B. in Tumorgewebe, welches zur eigenen Versorgung eine vermehrte Gefäßbildung induziert oder auch bei der diabetischen Retinopathie, die infolge einer Ischämie der Netzhaut zu vermehrter Gefäßbildung führen kann. Beide Beispiele sind die Folge eine Dominanz angiogener Faktoren wie FGF, VEGF und Angiopoietin (Carmeliet et al., 1996). Eine Hypoxie infolge eines Gefäßverschlusses ist der initiale Stimulus bei der Entwicklung der angioproliferativen Retinopathie. Sie kann durch verschiedene Pathologien, wie Hyperglykämie bei diabetisch erkrankten Personen, Thrombose im Fall von Venenverschlüssen oder auch Entwicklungsverzögerungen bei Frühgeborenen-Retinopathie (Retinopathy Of

Prematurity: ROP) verursacht werden. Wie bereits beschrieben führt eine Hypoxie zur Angiogenese, die eine Vaskularisation der ischämischen Bereiche durch neue Kapillaren ermöglicht. Die Revaskularisation in der Retina nach einer provozierten Ischämie führt hingegen zu einer abnormalen Gefäßbildung, zu so genannten „Tufts“ (auch Neovaskularisation genannt). Diese pathologische Gefäßneubildung wird in der Literatur häufig als Neovaskularisation anstatt als Angiogenese bezeichnet. Grund für die Bildung dieser Tufts ist die erhöhte Expression von VEGF, die zeitlich vor der Entwicklung erster Neovaskularisationen auftritt (Pe´er et al., 1995; Pierce et al., 1995). So wurden erhöhte VEGF-Spiegel sowohl im Glaskörper von Patienten mit proliferierender diabetischer Retinopathie als auch in entsprechenden Tiermodellen, in denen retinale Neovaskularisationen induziert wurden, nachgewiesen (Adamis et al., 1994).

1.3. Rolle des NO/cGMP-Signalweges bei der Angiogenese

1.3.1. VEGF: Struktur, Rezeptoren und Rolle bei der Angiogenese

VEGF spielt eine Schlüsselrolle in der Regulation der Vaskulogenese und der Angiogenese (Neufeld et al., 1999). Die VEGF-Familie unterteilt sich in sieben Gruppen, die mit A bis F bezeichnet sind. Zu der VEGF-Familie gehört auch der Plazenta-Wachstumsfaktor (PlGF). Abhängig von der Peptidlänge wird VEGF-A in acht verschiedenen Spleißvarianten unterteilt, die sich innerhalb einer kurzen Domäne im C-terminalen Bereich unterscheiden (Woolard et al., 2004; Cébe Suarez et al., 2006). Von VEGF-B entstehen durch alternatives Spleißen zwei Isoformen. VEGF-C und VEGF-D weisen ähnliche Strukturmerkmale und Funktionen auf. VEGF-E wird nur von einem ORF-Virus produziert (Open reading frame) (Ogawa et al., 1998). VEGF ist ein homodimeres Glykoprotein mit einem Molekulargewicht zwischen 34 und 46 Kilodalton (kDa). Er ist der spezifischste aller bekannten angiogenen Faktoren, da seine Rezeptoren fast ausschließlich auf Endothelzellen zu finden sind (Thomas, 1996). Die Expression von VEGF ist vom Sauerstoff-Partialdruck abhängig, wobei VEGF-A im Gegensatz zu den anderen VEGF-Formen nicht nur während einer kurzen Zeit der Gefäßentwicklung notwendig, sondern auch als Basalsekretion für den Erhalt der Gefäße essentiell ist (Carmeliet et al., 1996; Goldberg und Schneider, 1994). Viele Stimulatoren wie Wachstumsfaktoren, Hormone und Zytokine oder zellulärer Stress beeinflussen die Expression von VEGF, insbesondere auf der Transkriptionsebene. Dabei spielen Sp1 und HIF-1 als Transkriptionsfaktoren eine essentielle Rolle (Mukhopadhyay et al., 1997). Die Aktivierung von Sp1 trägt zur Angiogenese und Metastasierung bei Magenkrebs durch die erhöhte Expression von VEGF bei (Wei et al., 2009). HIF-1 kann die Expression von VEGF steigern indem sie an das HRE

(Hypoxia Response Element) im Promoter des VEGF-Gens bindet und zu einer vermehrten Transkription führt (Levy et al., 1995; Shibuya, 2001). Die biologischen Wirkungen von VEGF werden von drei Rezeptoren vermittelt, VEGFR-1 (FMS-like tyrosine kinase-1, Flt-1), VEGFR-2 (Fetal liver kinase-1, KDR/Flk-1) und VEGFR-3 (Flt-4), die der Gruppe der Tyrosin-Kinase-Rezeptoren (RTK) zuzuordnen sind (Neufeld et al., 1999). So bindet VEGF-A an VEGFR-1 und 2, PlGF und VEGF-B nur an VEGFR-1, VEGF-C und VEGF-D an VEGFR-2 und 3 und schließlich binden die beiden VEGF-E und F nur an VEGFR-2. VEGFR-1 und VEGFR-2 sind hauptsächlich auf Endothelzellen zu finden. Es wurde gezeigt, dass diese beiden Rezeptoren in der Retina auch auf den Müllerzellen exprimiert sind (Robinson et al., 2001). Zusätzlich ist VEGFR-1 auf Trophoblasten und Monozyten zu finden, während VEGFR-2 auf hämatopoeitischen Stammzellen, Vorläuferzellen und kortikalen Neuronen exprimiert ist (Ogunshola et al., 2002). Die Expression von VEGFR-3 findet hingegen hauptsächlich in lymphatischen Endothelzellen statt (Kukk et al., 1996). VEGFR-1 vermittelt die Rekrutierung von hämatopoetischen Vorläuferzellen und die Migration von Monozyten und Makrophagen (Kanno et al., 2000), während VEGFR-2 für die Funktionen der vaskulären Endothelzellen und VEGFR-3 für lymphatische Endothelzellen wichtig sind (Olsson et al., 2006). Bindet ein VEGF-Molekül an einen Rezeptor, kommt es zur Autophosphorylierung der intrazellulären Tyrosinkinasen dieses Rezeptors, was als erster Schritt der Signalübertragung angesehen wird (Takahashi et al., 2001).

1.3.2. Der NO/cGMP-Signalweg in der Angiogenese

Die Angiogenese, also die Bildung von Blutgefäßen aus bestehenden Gefäßen, wird durch viele Faktoren, darunter Scherkräfte und Zytokine wie z.B. VEGF, induziert. Dabei kommt es zur Aktivierung der Phosphoinositid-3-Kinase/Protein Kinase B-Signalweg (PI3K/Akt, Dimmeler et al., 1998). Akt ist eine Serin/Threonin Proteinkinase, die für mehrere physiologische Prozesse verantwortlich ist. So werden durch Akt eine Reihe von Effektorproteinen phosphoryliert, die die Apoptose inhibieren, Zellproliferation und Migration induzieren und das vaskuläre Remodelling und Angiogenese regulieren (Yao und Cooper, 1995; Gerber et al., 1998; Lee et al., 2014). Ein Zielprotein der Akt ist die eNOS. Akt führt durch Phosphorylierung des Serin-1179 zu Aktivierung der eNOS, was zu einer gesteigerten NO-Produktion führt (Fulton et al., 1999; Dimmeler et al., 1999; Fleming und Busse, 2003). Diese Phosphorylierung erhöht ebenfalls die Sensitivität der eNOS gegenüber der intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration (Dimmeler et al., 1999; Fulton et al., 1999). eNOS wird in der Zelle konstitutiv exprimiert und führt zu einer niedrigen, aber dauerhaften Produktion von

NO. Diese dauerhaft niedrige Produktion ist wichtig, um die Integrität der Blutgefäße aufrecht zu halten (Dimmeler et al., 1999). Der wichtigste physiologische Stimulus für die kontinuierliche Bildung von NO ist die Scherkraft, die vom fließenden Blut auf der Endothelzell-Schicht erzeugt wird (Kuchan und Frangos, 1994; Sessa et al., 1994; Busse und Flemming, 1998). Dadurch wird die cGMP-Synthese durch die NO-GC gefördert, um den Durchmesser der Blutgefäße an die Intensität der Scherkräfte anzupassen.

Die eNOS ist eines der ersten nachgewiesenen Effektorproteine von VEGF (Ku et al., 1993; Roberts und Palade, 1995). HIF-1α wird, infolge eine Hypoxie, exprimiert und stimuliert die Expression von VEGF und die Stabilisierung seine mRNA (Levy et al., 1995). Die Bindung von VEGF an VEGFR-2 (KDR) und nicht an VEGFR-1 (Kroll und Waltenberger, 1999) an der Endothelzelloberfläche führt zu Aktivierung des Phospholipase-C/Inositol-1,4,5-triphosphat-Signalweges (PLC/IP_3-Signalweg). Dadurch erhöht sich die intrazelluläre Ca^{2+}-Konzentration, die die Bildung der Ca/CaM-Komplexe ermöglicht, was ebenfalls zu Aktivierung der eNOS durch die Phosphorylierung von Threonin-495 führt (Mülsch et al., 1989; Fleming et al., 2001; Banumathi et al., 2011). Damit zeigt sich dass die eNOS dauerhaft eine geringe NO-Konzentration produziert, die durch VEGF-abhängigen Ca^{2+}-Einstrom erhöht werden kann. VEGF kann zu einer vermehrten Expression und Aktivität der eNOS führen und dadurch zu erhöhten NO-Konzentrationen (van der Zee et al., 1997; Hood et al., 1998; Fleming et al., 2001). Das freigesetzte NO bindet an die prosthetische Häm-Gruppe der NO-GC (Gerzer et al., 1981) und führt so zu ihrer Aktivierung. Dadurch wird GTP in cGMP umgesetzt, das wiederum die PKG-I aktiviert. PKG-I führt zur Phosphorylierung von verschiedenen Effektor-Proteinen wie z.B. VASP an Serin-239, das eine wichtige Rolle bei der Zelladhäsion und Zellmigration spielt (Krause et al., 2002; Chen et al., 2004).

Anderseits zeigen andere Studien, dass NO wiederum in der Lage ist, die Expression von VEGF zu regulieren. Es wurde zunächst berichtet, dass NO die Produktion von VEGF in Tumorzellen induziert (Chin et al., 1997). Nach einem angiogenen Stimulus ist die Vasodilatation der erste Schritt der Angiogenese. Sie erfolgt hauptsächlich als Antwort auf die erhöhte NO-Produktion, die die VEGF-Expression (Kimura et al., 2000), und somit die Gefäßpermeabilität steigert (Dvorak et al., 1995). Andere widersprüchliche Berichte zeigten, dass Natriumnitroprussid (SNP), ein NO-Donor, die VEGF-Promotoraktivität und damit die Synthese in glatten Gefäßmuskelzellen durch Störung der Bindung des Transkriptionsfaktors AP-1 (Aktivator Protein 1) inhibiert (Tsurumi et al., 1997). Zusätzlich führt NO zur Inhibition der HIF-1-Bindungsaktivität in glatten Muskelzellen und dadurch zur Hemmung der hypoxischen Stimulation der

VEGF-Produktion in Tumorzelllinien (Huang et al., 1999; Sogawa et al. 1998). Damit ergibt sich eine mögliche Feedback-Regulation der Expression von eNOS und VEGF.
Insgesamt ist allerdings nicht bekannt, ob diese NO-Effekte über die NO-GC vermittelt werden und damit cGMP-abhängig sind. In *in vitro*-Untersuchungen von Endothelzellen aus Rattenaorta konnten cGMP-abhängige pro-angiogenetische Effekte beobachtet werden (Pyriochou et al., 2007). Eine Verknüpfung zwischen dem NO/cGMP-Signalweg und der Angiogenese stellt sich nicht nur über die pro-angiogenetischen Faktoren wie VEGF und FGF-2 dar, sondern auch über anti-angiogenetische Faktoren (Abbildung 3). Thrombospondin-1 (TSP-1) ist ein potentieller Inhibitor der Angiogenese. TSP-1 wird in die extrazelluläre Matrix sezerniert und ist in der Lage, Migration, Adhäsion, Proliferation und Apoptose von Endothelzellen zu regulieren (Lawler und Lawler, 2012). TSP-1-defiziente Mäuse zeigen eine geringere Obliteration der Blutgefäße in der Retina nach einer Hyperoxie, begleitet mit einer höheren Blutgefäßdichte und einer steigenden Zahl an proliferierenden Endothelzellen (Wang et al., 2003). Eine Überexpression von TSP-1 führt zu einer abnehmenden Blutgefäßdichte in der Retina und einer Erhöhung der Obliteration der Blutgefäße infolge einer Erhöhung der Apoptoserate der Endothelzellen. Bei einem Sauerstoff-induzierten Retinopathie-Versuch zeigten diese Mäuse eine verminderte Tuft-Entstehung (Wu et al., 2006).
Die Effekte von TSP-1 werden über die Rezeptoren CD36 und CD47 vermittelt. TSP-1 bindet einerseits an CD36 und antagonisiert dadurch die VEGF-vermittelte Akt-Aktivierung über VEGFR-2 (Sun et al., 2009). Anderseits führt die Aktivierung von CD47 durch TSP-1 zur Inhibition der NO-GC und der PKG-I, was die Hemmung der NO/cGMP-abhängigen Angiogenese bewirkt (Isenberg et al., 2005; Ramanathan et al., 2011). Es wurde zusätzlich berichtet, dass TSP-1 in der Anwesenheit von NO eine 100-fache Inhibition der Angiogenese bewirken kann (Isenberg et al., 2005; Isenberg et al., 2009). Damit konnte eine Verbindung zwischen dem TSP-1-abhängigen Signalweg und der NO/cGMP-Kaskade aufgezeigt werden (Ridnour et al., 2005).

1.4. Transgene Mausmodelle

Aufgrund der relativ geringen Kosten der Tierhaltung, des geringen räumlichen Anspruchs, der hohen Reproduktionsrate und der schnellen Generationenfolge wird die Maus (Mus Musculus) als Tiermodell für die meisten Laborexperimente gewählt. Die Maus ist ein hervorragendes Modell für Humankrankheiten, da die Organisation ihrer DNA und ihre Genexpression dem Menschen sehr ähnlich sind. Ungefähr 99% der Gene der Maus haben ein homologes Gen im menschlichen Genom, wovon 96% in vergleichbarer Syntenie vorliegen (Chinwalla et al., 2002). Dabei wird erwartet dass die

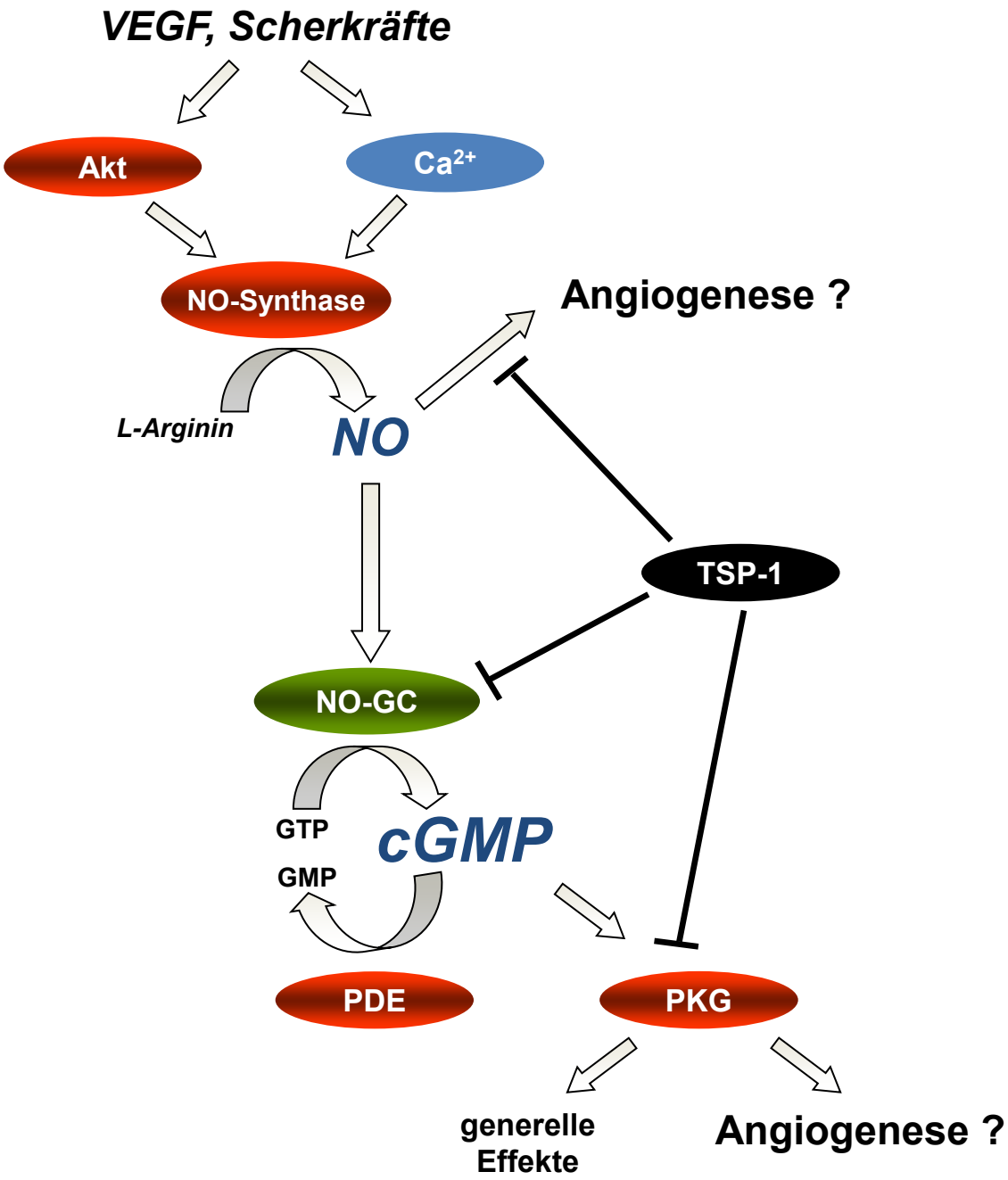


Abb. 3: Bei der NO/cGMP-vermittelte Angiogenese beteiligte Faktoren
VEGF und Scherkräfte aktivieren über Akt und Erhöhung der Ca^{2+}-Konzentration die NO-Synthase. Das gebildete NO stimuliert die NO-sensitive Guanylyl-Cyclase (NO-GC). Dies führt zu einer vermehrten cGMP-Synthese. Die NO-GC sowie die NO-vermittelte Angiogenese kann durch Thrombospondinen (TSP-1) deaktiviert bzw. inhibiert werden. Der sekundäre Botenstoff cGMP aktiviert im Anschluss cGMP-Effektorproteine (z.B. die cGMP-abhängige Proteinkinase, PKG), die verschiedene physiologische Effekte, darunter die Angiogenese hervorrufen. Phosphodiesterasen (PDE) katalysieren den Abbau des cGMPs im Gewebe.

am Mausmodell erhobenen Daten auf den Menschen übertragbar sind (Houdebine, 2007). Zusätzlich wird die Arbeit mit transgenen Mäusen dadurch vereinfacht, dass murine embryonale Stammzellen in Kultur gehalten werden können (Capecchi, 1989). Die Deletion bzw. die Mutation eines Gens verursacht das Fehlen oder eine Änderung des entsprechenden Proteins. Alternativ können Gene in das Genom eingefügt werden. Auf diese Weise ist es möglich, ein Enzym auf seine Funktion detailliert zu untersuchen.
Zurzeit existieren mehrere transgene Mausmodelle, bei denen Proteine des NO/cGMP-Signalweges ausgeschaltet wurden. Die dadurch hervorgerufenen Phänotypen lassen Rückschlüsse auf die physiologische Bedeutung des jeweiligen Proteins zu.

1.4.1. KO-Mausmodelle für die NOS

Wie im Abschnitt 1.1.1. beschrieben, existieren drei Isoformen der NOS, die durch separate Gene kodiert werden: eNOS, iNOS und nNOS. Für jede der drei Isoformen konnten KO-Maus-Modelle generiert werden.
In dem nNOS-Knockout-Mausmodell wurde das Exon 1, das das Start-Codon ATG der nNOS kodiert, deletiert. Diese Tiere weisen ein aggressives Verhalten auf (Nelson et al., 1995) und besitzen einen vergrößerten Magen mit einer Hypertrophie des Pylorus-Sphinkters und einer Pylorus-Stenose (Huang et al., 1993). Dieser Phänotyp bestätigt die Rolle von NO als Neurotransmitter in der Regulation der gastrointestinalen Motilität. An einem anderen nNOS-Knockout-Modell, bei dem das Exon 6 deletiert wurde, konnte gezeigt werden, dass eine katalytisch aktive ß-Spleißvariante der nNOS für eine Reproduktionsunfähigkeit verantwortlich ist (Gyurko et al., 2002).
Bei einem iNOS-KO-Modell konnten keine größeren Auffälligkeiten gezeigt werden, wobei diese Mäuse eine erhöhte Infektionsanfälligkeit aufwiesen (Laubach et al., 1995). Das bestätigt, dass die iNOS keine physiologische Rolle in der NO/cGMP-Signalkaskade spielt, sondern nur zelluläre Antworten auf Infektionen induziert.
1995 generierten Huang et al. lebensfähige eNOS-KO-Mäuse. Diese Mäuse weisen einen erhöhten Blutdruck auf und zeigen keine Gefäßrelaxation infolge einer Stimulation durch Acetylcholin (Huang et al., 1995). Darüber hinaus zeigen die eNOS-KO-Mäuse eine erhöhte glatte Muskelzellproliferation im Vergleich zu WT-Mäusen nach einer Okklusion der Femoralarterie (Moroi et al., 1998). Diese Ergebnisse weisen auf eine anti-proliferative Rolle des endothelialen NO auf die glatten Muskelzellen hin (Dai und Faber, 2010; Huang, 2000).
Im Jahr 2005 ist durch Kreuzung gelungen, eine lebensfähige nNOS/iNOS/eNOS-defiziente-Mauslinie zu generieren (Morishita et al., 2005). Diese Triple-Knockout-Mäuse sind hyperton, reproduktionsfähig, zeigen einen nephrologischen Diabetes

insipidus und haben eine Lebenserwartung von 4-5 Monaten. Hierzu ist allerdings anzumerken, dass dieser Tripel-Knockout kein vollständiger KO aller drei NOS darstellt, da in diesen Mäusen die ß-Spleißvariante der nNOS noch gebildet wird.

1.4.2. KO-Mausmodelle für die NO-GC

Die NO-GC ist ein Heterodimer, das aus zwei Untereinheiten besteht: die α- und die ß-Untereinheit. Die aktiven Formen der NO-GC sind die $\alpha_1/ß_1$ und die $\alpha_2/ß_1$ Isoformen. Für alle drei Untereinheiten wurden Knockout Mäuse generiert. Das in unserem Labor benutzte NO-GC-Knockout-Mausmodell wurde generiert, indem das Exon 10 in der Gen-Sequenz der $ß_1$-Untereinheit deletiert wurde, was zum ubiquitären Ausschalten der NO-GC führt (Friebe et al., 2007). 80% der NO-GC-Knockout-Tiere (GCKO) sterben bis zum zweiten Tag nach Geburt, die restlichen 20% mit einem Alter von 3 bis 5 Wochen, was mit dem Zeitpunkt des Absetzens der Tiere und der Umstellung auf feste Nahrung korreliert. Diese Tiere weisen eine gastrointestinale Dysmotilität auf, bei der eine verlängerte Darmpassagezeit zu beobachten ist. Eine ballaststoffarme Diät konnte die Überlebensrate der Tiere steigern.
Anatomisch zeigten die GCKO-Mäuse vergrößertes Caecum und Gallenblase, was auf eine wichtige Funktion der NO-GC in der gastrointestinalen Muskulatur hinweist. Zusätzlich weisen die GCKO-Mäuse eine Blutdruckerhöhung von 26 mmHg im Vergleich mit WT-Geschwistertieren auf, die auf einem Ausbleiben der NO-induzierten Relaxation der Aorta beruht (Friebe et al., 2007). In Thrombozyten hemmt NO bei den GCKO-Tieren im Gegensatz zu WT-Tieren die Thrombin-induzierte Aggregation nicht, was zu einer reduzierten Blutungszeit führt (Dangel et al., 2010). Phänotypisch haben die GCKO-Mäuse eine verminderte Lebenserwartung (auch nach Zufuhr der ballaststoffarmen Diät), eine starke Wachstumsretardierung und sind im Vergleich zu WT-Mäusen um ca. 30% kleiner.
Außer den Knockout-Tieren für die $ß_1$-Untereinheit wurden auch KO-Mäuse für die α_1- und die α_2-Untereinheit der NO-GC generiert (Mergia et al., 2006). Untersuchungen dieser Mauslinien ließen erkennen, dass die jeweils noch vorhandene NO-GC-Isoform die Funktion der deletierten Isoform übernehmen kann, obwohl die Deletion einer der beiden Untereinheiten nicht zu einer verstärkten Expression der jeweils anderen Untereinheit führte. In der Aorta von α_1-KO-Mäusen ist die Expression der NO-GC auf 6% vermindert, die auf die $\alpha_2ß_1$-Isoform zurückzuführen ist. Dennoch war nur eine leichte Blutdruckerhöhung von 7 mmHg im Vergleich zu den $ß_1$-KO-Mäusen (26 mmHg) zu beobachten. Die α_2-KO-Mäuse zeigen eine 94%-ige NO-GC-Expression und sind normoton. Diese Daten zeigen, dass eine kleine Menge an NO-GC für einen cGMP-vermittelten Effekt ausreichend ist (Mergia et al., 2006).

1.4.3. KO-Mausmodelle für die PKG

Es sind zwei Formen der PKG bekannt, die mit PKG-I und PKG-II bezeichnet werden. Die PKG-I ist in Thrombozyten sowie in glatten Muskelzellen stark exprimiert und damit wahrscheinlich der wichtigste Effektor für cGMP im kardiovaskulären System. Die PKG-I-KO-Mäuse haben eine stark reduzierte Lebenserwartung, wahrscheinlich aufgrund der gastrointestinalen Dysmotilität (Pfeifer et al., 1998). Zusätzlich weisen diese Mäuse eine stark reduzierte Reproduktionsfähigkeit auf, die auf eine erektile Dysfunktion zurückzuführen ist (Hedlund et al., 2000). Die PKG-I-KO Mäuse zeigen eine gestörte Thrombozytenaggregation, sind hypertensiv und weisen eine pathologische Veränderung der Tonusregulation der glatten Muskulatur auf. Insgesamt bestätigen diese Ergebnisse die Annahme, dass die PKG-I der Haupteffektor für die NO-induzierten-Effekte in Thrombozyten und in glatten Muskelzellen sind.

Im Gegensatz zu PKG-I-KO-Mäusen haben die PKG-II-KO-Mäuse eine normale Lebenserwartung und Reproduktionsfähigkeit. Aufgrund eines Defektes bei der endochondrialen Ossifikation sind die PKG-II-KO-Mäuse 30% kleiner als die WT-Mäuse, was auf eine funktionelle Bedeutung der PKG-II beim linearen Skelettwachstum zurückzuführen ist (Pfeifer et al., 1996).

2. Zielsetzung

Der NO/cGMP-Signalweg ist bei vielen physiologischen Prozessen beteiligt. Das durch die eNOS gebildete NO führt zur Aktivierung der NO-GC, welches GTP in cGMP umwandelt. Erhöhte intrazelluläre cGMP-Konzentrationen aktivieren die PKG, was zur Phosphorylierung von verschiedenen Effektorproteinen führt. In der Literatur ist die wichtige Rolle von NO bei der Angiogenese und Arteriogenese bekannt. Allerdings ist es noch unklar, ob diese Effekte über die NO-GC vermittelt werden. In dieser Arbeit soll die Bedeutung des NO/cGMP-Signalwegs bei der Angiogenese und der Arteriogenese untersucht werden. Hierfür wurden die im Labor vorhandenen Knockout-Mäuse für die NO-GC genutzt und in *in vitro*- sowie *in vivo*-Versuchen eingesetzt. Zur Verfügung standen globale Knockout-Mäuse (GCKO-Mäuse) sowie Glattmuskelzell-Knockout- (SMC-GCKO-Mäuse) und Endothelzell-Knockout-Mäuse (EC-GCKO).
Folgende Fragestellungen sollten im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden:

Expression der NO-GC in Endothelzellen

Bei der Angiogenese spielen die Endothelzellen eine Schlüsselrolle. Aus diesem Grund sollte die Expression der NO-GC in diesen Zellen untersucht werden. Um die Transkription des NO-GC-Gens in Endothelzellen nachzuweisen, sollte die reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) benutzt werden. Dabei sollte die mRNA der NO-GC aus EC-GCKO-, SMC-GCKO- und WT-Mauslungen isoliert werden, um die trunkierte cDNA zu identifizieren.

NO-GC und Angiogenese

Um eine eventuelle Rolle der NO-GC bei der Angiogenese zu untersuchen, wurde der Aortenring-Assay als *ex vivo*-Methode benutzt. Dabei sollte die VEGF-induzierte Angiogenese in Anwesenheit sowie in Abwesenheit der NO-GC überprüft werden. Dieser Versuch sollte mit Aorten aus den GCKO- und EC-GCKO-Mäusen durchgeführt werden, um die eventuelle Funktion der endothelialen NO-GC zu charakterisieren.
Die *in vivo*-Untersuchung der Angiogenese sollte anhand der Sauerstoff-induzierten-Retinopathie (OIR) durchgeführt werden. Dabei sollten die Vaskularisation in der Retina von 7 Tage alten Mäusen, der avaskuläre Bereich nach dem OIR-Versuch sowie die Tuft-Bildung in den Retinae bestimmt werden. Hierzu standen WT-Tiere und globale GCKO-, SMC-GCKO sowie EC-GCKO-Tiere zur Verfügung.

NO-GC und Arteriogenese

Die Rolle der NO-GC bei der Arteriogenese sollte mithilfe des Hinterlauf-Ischämie-Versuchs untersucht werden. Anhand der verschiedenen Knockout-Tiere sollte die Durchblutungsentwicklung nach der Ligation der Femoralarterie mithilfe von Laser-Doppler-Messungen (LDM) bestimmt werden.

3. Material und Methoden

3.1. Material

Tabelle 1 Verzeichnis der verwendeten Geräte

Gerät	Model	Hersteller, Ort
Agarosegelkammer	Werkstatt	Institut für Physiologie
Begasungsbrutschrank	B 5060 EK	Heraeus, Hanau
Binokular	Stemi 2000-c	Zeiss, Jena
Blottingkammer	Mini-PROTEAN®Tetra Cell	Bio-Rad, USA
Elektro-Spannungsgeber	EV231	Consort, Belgien
Heizblock	TMix	Analytikjena AG, Jena
Gelelektrophorese-Kammer	Mini-PROTEAN®Tetra Cell	Bio-Rad, USA
Laser Doppler Imager	LDI2-IR-HR	Moor Instruments, USA
PCR-Maschine	Block assembly 96G	Analytikjena AG, Jena
pH-Meter	SevenEasy™	Mettler Toledo, Schweiz
Magnetrührer	Combimag Ret	IKA, Staufen
Mikroskope	TCS SP5	Leica, Wetzlar
	BZ-9000	Keyence, Japan
	ID03	Zeiss
Kryotom	CM3050	Leica Microsystems, Wetzlar
Sauerstoff-Controller	P110	Biospherix, USA
Sauerstoff-Kammer	Werkstatt	Institut für Physiologie
Sauerstoff-Sensor	E702	Biospherix, USA
Sterilbank	BSB 6A	Gelaire, Australien
UV-Transilluminator	Gel Logic 100	Kodak, USA
Vortexer	Vortex-Genie 2	Scientific industries, USA
Western Blot Imaging	FluorChem SP	Alphainnotech, USA
Zentrifugen	Kendro Biofuge fresco	Heraeus, Hanau

Tabelle 2 Verzeichnis der verwendeten Kits

Produkt	Hersteller, Ort
NucleoSpin® RNA XS	Macherey-Nagel, Düren
SuperScript™III First-Strand Synthesis System	Invitrogen, Karlsruhe
Super Signal® ELISA Femto	Thermo scientific, USA

Tabelle 3 Verzeichnis der verwendeten Chemikalien

Produkt	Hersteller, Ort
Agarose	peqlab, Erlangen
Atemkalk Intersorb plus	intersurgical, Sankt Augustin
Bepanthen Augensalbe	Bayer AG, Leverkusen
Bromphenolblau	Applichem, Darmstadt
Buprenorphin	Apotheke des Uniklinikums
Dulbecco Phosphate Buffered Saline (DPBS) (x1)	Life Technologies, USA
Glycerin 85%	Merck, Darmstadt
Ketamin/Xylazin	Apotheke des Uniklinikums
Kollagen Type I	BD Biosciences, USA
MCDB 131 Medium (x1)	Life Technologies, USA
Miglyol 812	Apotheke des Uniklinikums
β-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Penicillin/Streptomycin	Life Technologies, USA
Ponceau S	Roth, Karlsruhe
Roti-Block	Roth, Karlsruhe
SDS	Applichem, Darmstadt
Tamoxifen	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tris-Base	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
VEGF	Peprotech, USA

Tabelle 4 Verzeichnis der verwendeten Lösungen und Puffer

Lösung	Zusammensetzung
SDS-haltiger Probenpuffer für Gelelektrophorese	10% (v/v) Glycerin 5% β-Mercaptoethanol 1% (w/v) SDS 0,005% (w/v) Bromphenolblau 62,5 mM Tris-Base pH 6,6
Ponceau-Reagenz:	0,2% (w/v) Ponceau S 10% (v/v) Trichloressigsäure
PBS (10x Stammlösung)	80,0 g NaCl 2,0 g KCl 14,4 g Na_2HPO_4 2,4 g KH_2PO_4 pH 7,4 mit HCl ad 1000 ml mit Aqua dest.
Laufpuffer (10x Stammlösung)	30,3 g Tris-Base 144,1 g Glycin 0,1% (w/v) SDS Ad 1000 ml mit Aqua dest.

Transferpuffer (10x Stammlösung)	30,3 g Tris-Base 144,1 g Glycin 0,02% (w/v) SDS Ad 1000 ml mit Aqua dest.
TBE-Puffer (10x Stammlösung)	108 g Tris-Base 55 g Borsäure ad 1000 ml mit Aqua dest.

Tabelle 5 Verzeichnis der verwendeten Antikörpern

Antikörper	Verdünnung	Hersteller, Ort
β_1-NO-GC, Kaninchen	1:800	in unserem Labor hergestellt
α-SMA, Maus (Klon 1A4)	1:500	Sigma-Aldrich, München
Alexa 488 anti-Kaninchen IgG	1:800	Invitrogen, Karlsruhe
Alexa 555 anti-Kaninchen IgG	1:800	Invitrogen, Karlsruhe
Alexa 488 anti-Ratte IgG	1:800	Invitrogen, Karlsruhe
Alexa 594 anti-Ziege IgG	1:800	Invitrogen, Karlsruhe
FITC-BS1-Lektin	1:200	Sigma-Aldrich, München
DAPI	1:1000	Applichem, Heidelberg
Ki-67, Ratte	1:100	eBioscience, Frankfurt
Desmin, Ziege	1:100	www.antikörper-online.de

Tabelle 6 Verzeichnis der verwendeten Primer

Primer	Sequenz
mRNA Analyse	
856-5´	AGCCTTCTGTCTGTCTTCT
1593-3´	GGCAAATGGACCGTGCAT
1544-3´	TTGTCACCAACTGTTTCCACGTGTC
Genotypisierung	
loxP-$ß_1$-U1	AAGATGCTGAAGGGAAGGATGC
loxP-$ß_1$-L1	CAGCCCAAAGAAACAAGAAGAAAG
del-$ß_1$-L1	GATGTGGGATTGTTTCTGAGGA
SMWT1	TGACCCCATCTCTTCACTCC
SMWT2	AACTCCACGACCACCTCATC
phCREAS1	AGTCCCTCACATCCTCAGGTT
Tie2-Cre-3´	CCCTGTGCTCAGACAGAAATGAGA
Tie2-Cre-5´	CGCATAACCAGTGAAACAGCATTGC

Alle Primer wurden von Sigma-Aldrich, Taufkirchen, bezogen.

Tabelle 7 Verzeichnis der verwendeten Programme

Software	Quelle
ImageJ	www.imagej.nih.gov/ij/
Swift_NV Plugin für ImageJ	Prof. Dr. Andreas Stahl, Universität Freiburg
GIMP2	www.gimp.org

3.2. Methoden

3.2.1. Haltung und Zucht

Die verwendeten Mauslinien (GCKO: globale NO-GC-Knockout; SMC-GCKO: Glattmuskelzellen-NO-GC-Knockout; EC-GCKO: Endothelzellen-NO-GC-Knockout) waren im Labor vorhanden. Die Mäuse wurden in Makrolon-Typ-III-Käfigen oder Makrolon-Typ-II-Käfigen den Anforderungen entsprechend gehalten. Als Einstreu für die Käfige wurden Holzspäne benutzt. Alle WT- und zellspezifischen Knockout-Tiere erhielten eine Nager-Standarddiät (Altromin 1320). GCKO-Tiere wurden mit einer ballaststoffarmen Diät (Altromin 1013) gefüttert und mit Wasser versorgt. Das Kreuzungsschema der Mauslinien zum Erhalt der verschiedenen NO-GC-Knockout-Linien ist in Abbildung 7 dargestellt. Zur Zucht wurden je zwei heterozygote Weibchen im gebärfähigen Alter (8 bis 45 Wochen) und ein heterozygotes Männchen (7 Wochen bis 1 Jahr) zusammengesetzt. 21 Tage nach Geburt wurden die Nachkommen genotypisiert, von der Mutter abgesetzt und nach Geschlechtern getrennt.
Die Versuche wurden mit 7 bis 17 Tage alten Jungtieren (Hyperoxie-Versuch) und 8 bis 24 Wochen alten Mäusen (alle anderen Versuche) beider Geschlechter durchgeführt. Eine Ausnahme stellen die SMC-GCKO-Tiere dar: Das SMMHC-Cre-Transgen ist auf dem Y-Chromosom lokalisiert, so dass nur männliche Nachkommen das Gen tragen. Versuche mit SMC-GCKO-Tieren wurden daher nur mit männlichen Tieren durchgeführt. Als Kontrollen wurden WT-Geschwistertiere für GCKO-Mäuse sowie heterozygote Cre-exprimierende Geschwistertiere für die zellspezifischen induzierbaren GCKO-Tiere verwendet.

3.2.2. Induktion von Knockout-Tieren durch Tamoxifen-Injektion

Mäuse (heterozygote Kontrolltiere und SMC-GCKO-Tiere) im Alter von 3 bis 4 Wochen (Aortenring-Assay) bzw. 6 bis 8 Wochen (alle anderen Versuche) wurden mit Tamoxifen (1 mg i.p; gelöst in Miglyol 812) an fünf aufeinander folgenden Tagen injiziert. Die Tiere wurden 50 Tage nach der letzten Injektion in Experimenten verwendet, da nach diesem Zeitraum keine NO-GC mehr in glatten Muskelzellen nachweisbar war (Groneberg et al., 2010). Für den Hyperoxie-Versuch wurde Tamoxifen an die neugeborenen Mäuse über die Muttermilch verabreicht. Die Mütter wurden an fünf aufeinander folgenden Tagen unmittelbar nach der Geburt mit Tamoxifen injiziert.

3.2.3. Genotypisierung

Die Genotypisierung der Nachkommen erfolgte im Alter von 18 bis 21 Tagen (für den Hyperoxie-Versuch im Alter von 3 bis 4 Tagen) durch Analyse von Schwanz- oder

Ohrgewebe. Dazu wurde zunächst das Gewebe nach der HotSHOT Methode lysiert (Truett et al., 2000). Daraufhin wurden die erhaltenen Proben mittels Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) aufgearbeitet (Mullis und Faloona, 1987; Saiki et al., 1988). Definierte DNA-Sequenzen können so aus einem Gemisch von Nukleinsäuremolekülen amplifiziert werden. Zur Genotypisierung der verschiedenen Mauslinien wurden verschiedenen Primer angesetzt. Die Genotypisierung der GCKO-Mauslinie erfolgte mittels einer Multiplex-PCR, indem drei verschiedene Primer (loxP-ß$_1$-U1, loxP-ß$_1$-L1 und del-ß$_1$-L1) benutzt wurden. Zum Genotypisieren der zellspezifischen KO-Linien wurden zwei verschiedene PCRs angesetzt. Neben der Multiplex-PCR, die zum Nachweis des mutierten Gens bzw. der gefloxte Sequenz dient, wurde zusätzlich eine zellspezifische PCR durchgeführt, um die Cre-Rekombinase nachzuweisen. Bei den SMC-GCKO-Tieren wurden die Primer SMWT1, SMWT2 und phCREAS1 benutzt, während für die EC-GCKO-Tiere die Tie2-Cre-5´ und Tie2-Cre-3´ zum Einsatz kamen. Anschließend wurden die DNA-Fragmente entsprechend ihrer Größe mittels Agarose-Gelelektrophorese horizontal aufgetrennt (Aaij und Borst, 1972). Zur Sichtbarmachung wurde eine Ethidiumbromidfärbung der DNA durchgeführt. Die Agarosegele wurden auf einem UV-Transilluminator mit UV-Licht bestrahlt und zur Dokumentation wurde ein Bild mit einer CCD-Kamera erstellt.

3.2.4. Aortenring-Assay

Zur Analyse der Effekte der NO-GC auf die Angiogenese wurde der Aortenring-Assay durchgeführt. Der Aortenring-Assay ist ein *ex vivo*-Versuch, bei dem die wachsenden Mikrogefäße mehrere Aspekte der Angiogenese in einem Zeitrahmen durchlaufen, der mit der *in vivo*-Situation vergleichbar ist. Er ermöglicht die Beurteilung der auffälligen Schritte in der Angiogenese und die Quantifizierung der Entwicklung von Mikrogefäßen (Baker et al., 2012).

Zunächst wurde von den Tieren Serum gewonnen. Hierzu wurden 8 bis 12 Wochen alte Mäuse mit Ether narkotisiert. Mittels einer Glaskapillare wurde Blut aus dem retrobulbären Plexus abgenommen. Das Blut wurde nach 30 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur mit 250 g zentrifugiert und der Überstand (Serum) wurde abgenommen. Im Abschluss wurde das Tier getötet und die thorakale Aorta isoliert. Die Aorta wurde unter einem Binokular freipräpariert, in eine Petrischale mit MCDB 131 Medium transferiert und von Blutresten und Bindegewebe gesäubert. Es wurde darauf geachtet, die Aortenwände nicht zu beschädigen. Anschließend wurde die Aorta mit einem Skalpell in 1 mm breite Ringe geschnitten. Die Ringe wurden in einer 96-well Platte kultiviert. Pro Well wurde ein Aortenring mittig platziert und in 1% Kollagen eingebettet. Nach 15 Minuten bei Raumtemperatur wurden die Aortenringe für 1

Stunde bei 37°C und 5% CO_2 in einem Brutschrank inkubiert, damit das Kollagen polymerisieren konnte. Anschließend wurden pro Well 50 µl Medium mit 2,5% Mausserum und 50 ng/ml VEGF zugegeben. Das Medium wurde an Tag 3 gewechselt und die Quantifizierung erfolgte an Tag 6. Um die Zahl der Mikrogefäße quantifizieren zu können, wurden die Aortenringe gefärbt. Dazu wurde das Medium abgenommen und die Aortenringe drei Mal mit PBS gewaschen und für 30 Minuten mit 4% PFA bei Raumtemperatur fixiert. Nach drei Waschschritten mit PBS wurden die Ringe mit BS1-FITC-Lektin (1:100) über Nacht gefärbt und anschließend nochmal mit PBS gewaschen. Zur Quantifizierung der gewachsenen Mikrogefäße wurden die Aortenringe mit einem Konfokalmikroskop untersucht. Die Aufnahme erfolgte im „Stack Modus“, da die Mikrogefäße in verschiedenen Ebenen wachsen. Anschließend wurde die Zahl der gewachsenen Endothelvorläufe mittels ImageJ ermittelt.

3.2.5. Sauerstoff-induzierte Retinopathie

Um *in vivo*-Effekte der NO-GC auf die Angiogenese untersuchen zu können, wurde das Sauerstoff-induzierte Retinopathie-Modell (Oxygen-Induced Retinopathy, OIR) benutzt (Smith et al. 1994). Das Modell betrachtet zwei Phasen:
In der ersten Phase wurden 7 Tage alte Mäuse 5 Tage lang einer 75%-igen Sauerstoffatmosphäre ausgesetzt. In dieser Phase ist das Gefäßsystem in der Retina bei Mäusen noch nicht vollständig ausgereift und daher sensibel gegenüber Schwankungen im Sauerstoff-Partialdruck. Im Falle einer Hyperoxie werden die Kapillaren in der Mitte der Netzhaut abgebaut. Der Untergang der Kapillaren wird wahrscheinlich durch die direkte toxische Wirkung des erhöhten Sauerstoffgehalts auf die Endothelzellen verursacht (Lange et al., 2009; Scott und Fruttiger, 2010). Die kapillarfreien Zonen wurden quantifiziert.
In der zweiten Phase des OIR-Modells wurden die 12 Tage alten Mäuse aus der Hyperoxie für 5 weitere Tage in die Normoxie gesetzt. Die Netzhaut wird daraufhin hypoxisch, weil in den Kapillar-verarmten Bereichen der Retina nicht genügend Sauerstoff vorhanden ist. Dies wird als relative Hypoxie bezeichnet. Die auf diesen Stimulus exprimierten angiogenen Faktoren (z.B. VEGF und Angiopoietin; Sone et al., 1999; Ozaki et al., 2000) führen zur Aussprossung neuer Gefäße auf der Netzhaut und so zu einer proliferativen Retinopathie. Anschließend wurde die Neubildung von Gefäßen quantifiziert.
Konkret wurde der Versuch folgendermaßen durchgeführt: Neugeborene Mäuse wurden zusammen mit ihren Müttern bei Raumtemperatur für 7 Tage gehalten. Am Tag 7 wurden sie in eine gasdichte Kammer aus Plexiglas gesetzt (Abbildung 4). Die O_2-Konzentration wurde langsam auf 75% gesteigert und bei 75% ± 2% gehalten.

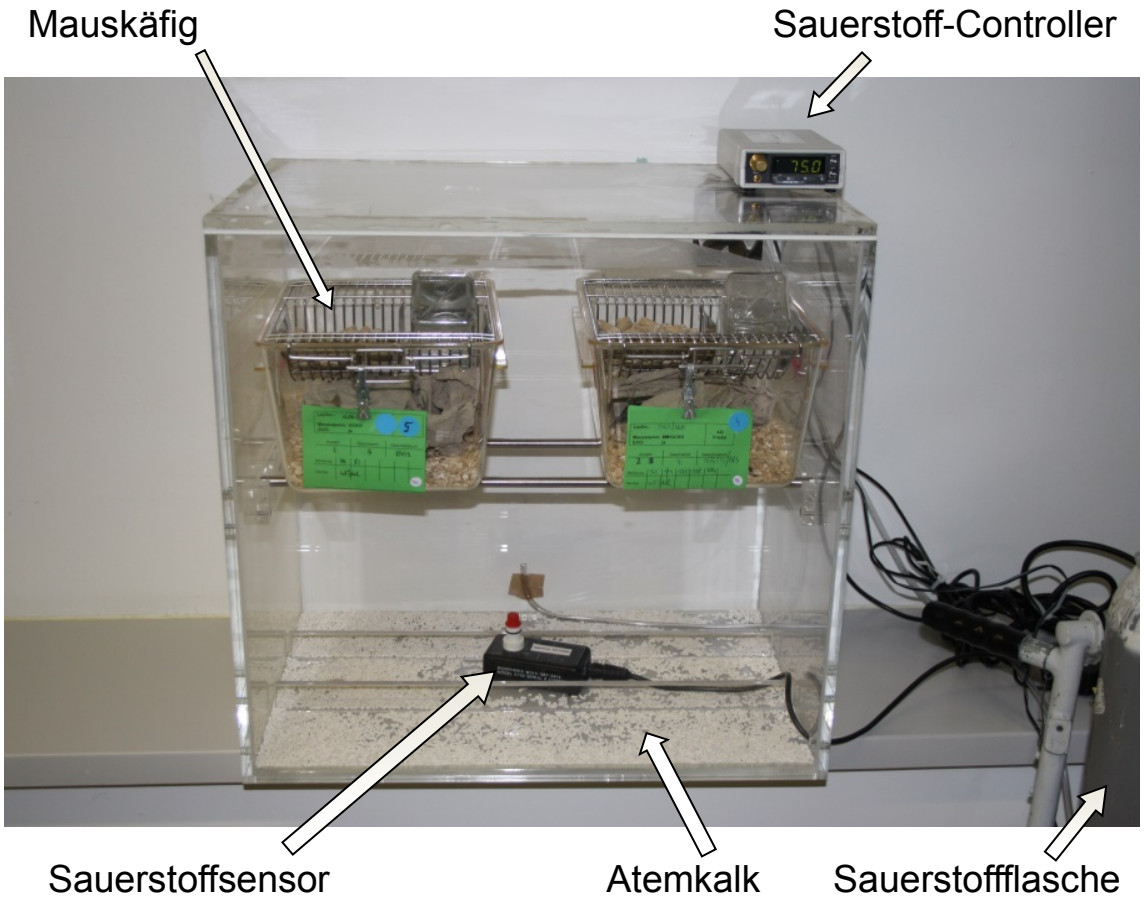


Abb. 4: Sauerstoff-Kammer
Die Sauerstoff-Kammer aus Plexiglas ermöglicht die Durchführung von OIR-Versuchen mit bis zu 4 Käfigen. Der Sauerstoffdruck wird mittels eines Sensors ermittelt und durch den Sauerstoff-Controller bei 75% gehalten. Auf den Kammerboden wurde Atemkalk gestreut, um das entstehende Kohlenstoffdioxid zu binden.

Auf dem Boden der Kammer wurde Atemkalk gestreut, um das entstehende Kohlenstoffdioxid zu binden. Zusätzlich besaß die Kammer zwei Bohrungen am Boden, um einen Abfluss von CO_2 zu ermöglichen. Auch die Makrolonkäfige besaßen Löcher im Boden. Nach einem fünftägigen Aufenthalt bei 75%iger Sauerstoff-Atmosphäre, wurden die Tiere mit ihren Müttern aus der Kammer genommen. Zur Vermeidung einer Atemdepression wurde die O_2-Konzentration langsam bis zum atmosphärischen Wert (21%) gesenkt. Die Hälfte der Tiere eines Wurfs wurde an Tag 12 untersucht. Die restlichen Tiere verblieben fünf Tage bei Raumluft und wurden an Tag 17 durch eine Überdosis Isofluran getötet.

Für die Untersuchung der Retina wurden zunächst die Augäpfel entnommen. Nach Enukleation der Augäpfel wurden diese zwei Stunden in 4% PFA fixiert. Die Retina wurde wie folgt präpariert: Die für 2 Stunden in 4% PFA fixierten Augen wurden in einer Petrischale mit PBS unter einem Binokular freipräpariert. In die Kornea des Auges wurde mittels einer Schere ein Loch gestochen, mittels zweier Pinzetten wurde die Öffnung verbreitert und vorsichtig die Verbindung zwischen Sklera und Netzhaut gelockert. Danach wurden die Sklera sowie der Sehnerv von der Netzhaut getrennt und schließlich wurden der Glaskörper und die Linse entfernt.

Der daraus resultierende Netzhautbecher wurde zwei Stunden mit 4% PFA fixiert, drei Mal mit PBS gewaschen und über Nacht in 1:200 FITC-konjugiertem BS1-Lektin bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Nach drei 10-minütigen Waschschritten mit PBS bei Raumtemperatur wurde die Retina wieder unter das Binokular gebracht. Um die Retina eindecken zu können, wurden vier Entlastungsschnitte durchgeführt. Als Eindeckmittel wurde Mowiol mit Dabco benutzt. Mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops wurde das Flachpräparat fotografiert und ausgewertet. Hier wurde die Fläche der kapillarfreien Zone an Tag 12 und Tag 17 ermittelt. Zusätzlich wurde die Fläche der Neovaskularisation (Tufts) in Relation zur Gesamtfläche der Retina an Tag 17 mit Hilfe der SWIFT_NV Software (Stahl et al., 2009) bestimmt.

Um die NO-GC in der Retina nachzuweisen, wurde ein abweichendes Protokoll benutzt. Dabei wurde der Augapfel isoliert und eine Stunde in 4% PFA fixiert. Darauf folgend wurde die Retina präpariert und über Nacht in 20% Sucrose fixiert. Die Inkubation der Retina mit dem ersten Antikörper erfolgte in 1x PBS mit 10% NDS (Normal Donkey Serum) und 0,3% Triton-X über zwei Nächte bei 4°C. Die Inkubation mit dem zweiten Antikörper wurde über Nacht bei 4°C oder 4 Stunden bei Raumtemperatur durchgeführt. Anschließend wurde die Retina mit 2x PBS und 0,3% Triton-X gewaschen. Zur Auswertung der Retinafärbung wurden die Retina-Quadranten als Wholemount-Präparat auf dem Objektträger ausgebreitet und dann in Mowiol eingebettet.

3.2.6. Hinterlauf-Ischämie-Modell

In diesem Versuch sollte die Bedeutung der NO-GC für die Arteriogenese und die Angiogenese untersucht werden. Dazu wurde das Tiermodell der Hinterlauf-Ischämie benutzt (Limbourg et al, 2009).

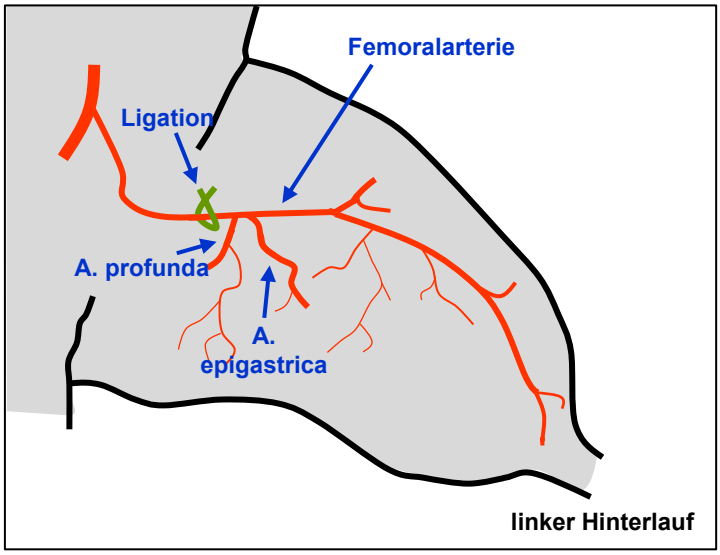
Dieses Modell basiert darauf, dass chirurgisches Abbinden der Femoralarterie oberhalb des Abgangs der *Arteria profunda femoris* eine Ischämie im Hinterlauf verursacht (Abbildung 5A). Die Ligation führt zu einem erhöhten Druck im proximalen Gefäßabschnitt. Dadurch kommt es zu einem vermehrten Blutfluss durch die Kollateralgefäße, was u.a. über die Entstehung von Scherkräften zu einer Aktivierung vom verschiedenen inter- und intrazellulären Signalwegen führt.

Die Narkose der Versuchstiere erfolgte durch eine intraperitoneale Injektion eines Gemisches aus Ketamin / Xylazin (100 bzw. 6 mg/kg Körpergewicht). Die Tiere wurden auf einer Wärmeplatte fixiert, um die Körpertemperatur bei 37°C konstant zu halten. Die Körpertemperatur der Tiere wurde über ein Analthermometer kontrolliert. Die Augen wurden mit Bepanthen-Augensalbe vor dem Austrocknen geschützt. Die Innenseite des linken Hinterlaufs wurde mit einer Enthaarungscreme enthaart und mit Cutasept F desinfiziert. Mit einer Schere wurde eine 1 cm lange Hautinzision longitudinal am Oberschenkel durchgeführt. Unter einem Binokular wurde die Femoralarterie von dem umliegenden Fett befreit und mit einer Pinzette vorsichtig proximal und distal der Verzweigung der *Arteria profunda femoris* und der *Arteria epigastrica*, von der Vene getrennt. Proximal des Kollateralgefäßes wurde die Femoralarterie mit einem Faden abgebunden, ohne dabei den femoralen Nerv oder die Vene zu verletzen. Die Wunde wurde mit Nadel und Faden verschlossen. Unmittelbar nach dem Aufwachen wurde den Tieren Buprenorphin (0,1 mg/kg Körpergewicht) i.p verabreicht, um den Operationsschmerz zu lindern. Direkt nach der Operation wurde die Verminderung der Durchblutung im operierten Hinterlauf mittels einer nicht-invasiven Laser-Doppler-Messung (LDM; moor LDI Software Version 5.3) überprüft (Abbildung 5B). In den fünf folgenden Tagen nach der Operation sowie an den Tagen 7, 14, 21 und 28 wurden nicht-invasive LDM durchgeführt, um den Verlauf der Reperfusion zu messen. Die Tiere wurden dabei mittels Isofluran-Inhalation narkotisiert.

3.2.7. Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR)

Um die mRNA der NO-GC in Endothelzellen nachzuweisen, wurde die Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) eingesetzt. Als Ausgangsmaterial wurde Lungengewebe der jeweiligen Tiere benutzt und mit der in dem Nukleospin RNA XS Kit (Machery-Nagel, Düren) enthaltenen Lösung homogenisiert. Die Isolation der

A



B

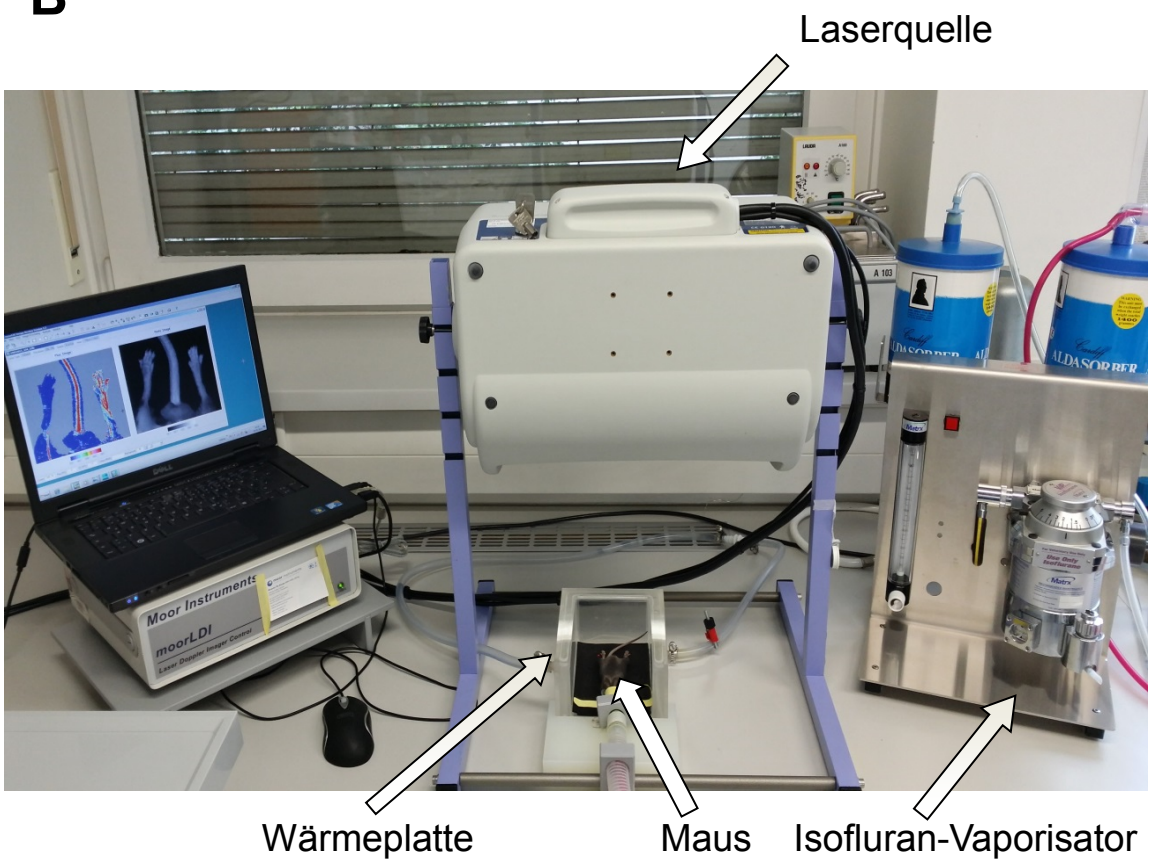


Abb. 5: Hinterlauf-Ischämie
(A) Schematische Darstellung der abgebundenen Femoralarterie. Die Femoralarterie wurde proximal der Verzweigung mit der A. *profunda* und der A. *epigastrica* abgebunden. (B) Aufbau des Laser-Doppler-Imaging (LDI)-Systems.

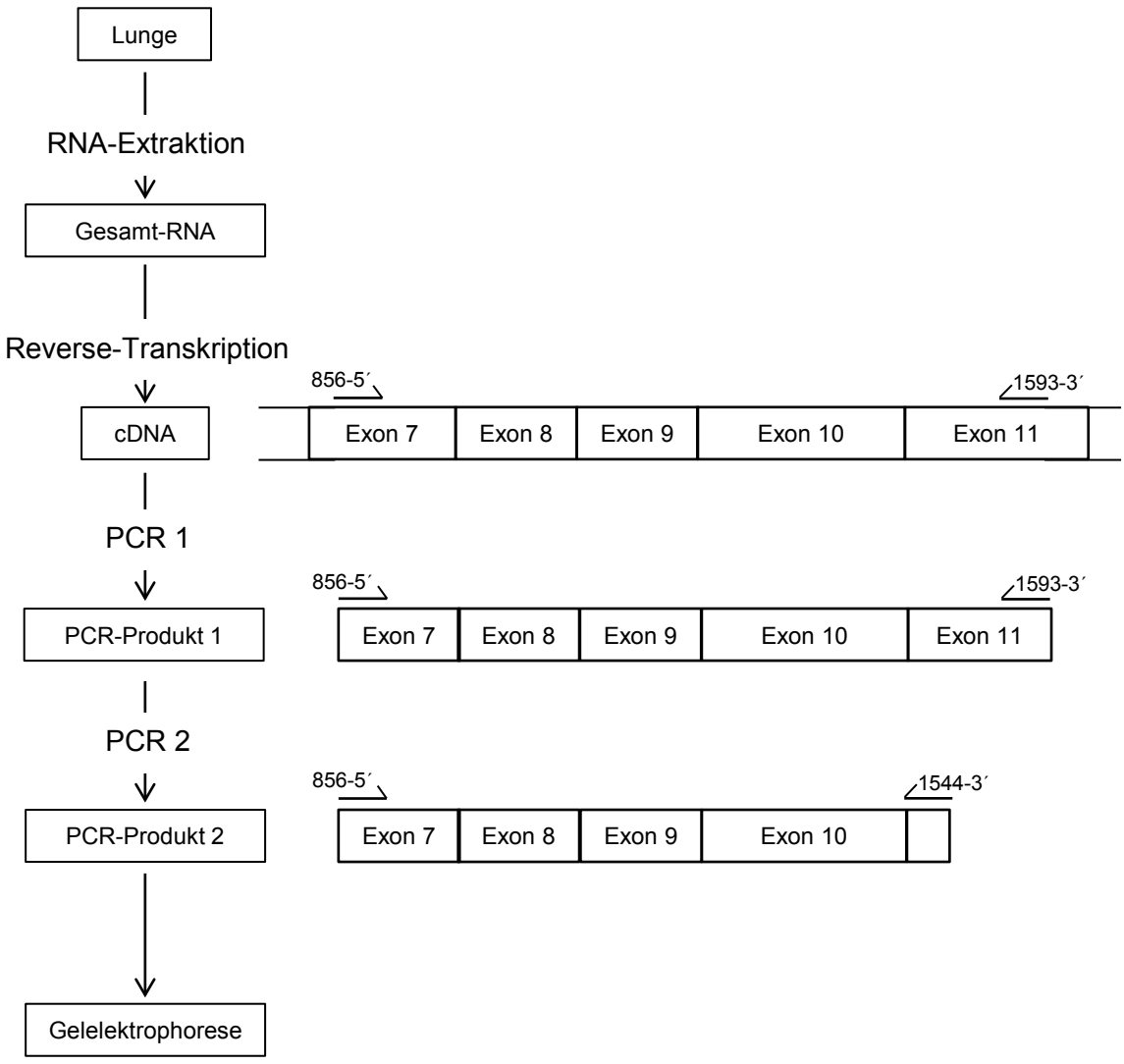
gesamten RNA aus der Lunge erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Die gewonnene RNA wurde in 10 µl RNase-freiem Wasser aufgenommen.
Für die cDNA-Synthese wurde das „SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR“ Kit (Invitrogen, Karlsruhe) benutzt. Dabei wurden bis zu 5 µg der Gesamt-RNA eingesetzt. Als Primer wurden die random Hexamer-Oligonukleotide (bestehend aus sechs zufällig zusammengesetzten Nukleotiden) benutzt. Mit Hilfe der reversen Transkriptase wurde die Gesamt-RNA in cDNA umgeschrieben.
Die erhaltene cDNA wurde anschließend mit einer „nested“-PCR amplifiziert. Es handelt sich um zwei aufeinanderfolgende PCR-Durchgänge mit zwei verschiedenen Primerpaaren. Die „nested“-PCR eignet sich, wenn die gesuchte cDNA in sehr geringer Menge vorhanden ist. Als Ausgangsmaterial für die zweite PCR dient das Produkt, das in der ersten PCR entstanden ist. Durch diese zweite Vervielfältigung wird die Spezifität erheblich gesteigert. Als Primer wurden 856-5´ und 1593-3´ für die äußere PCR und die Primer 856-5´ und 1544-3´ für die innere PCR konstruiert. Das PCR-Produkt wurde anschließend auf einem 1,5%igen Agarosegel aufgetragen, um die verschiedenen DNA-Banden zu trennen. Der Verlauf der RT-PCR sowie der PCR-Ansatz und das PCR-Programm sind in Abbildung 6 dargestellt.

3.2.8. Proteinbiochemische Methoden

3.2.8.1. SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese)

Die SDS-Polyacrylamid-Gelektrophorese dient der linearen Auftrennung von verschiedenen Proteinen nach ihren Molekulargewichten. SDS (Natriumdodecylsulfat) überdeckt die Eigenladung der Proteine, so dass alle Proteine eine konstante negative Ladungsverteilung aufweisen. Dabei werden zwei Gele eingesetzt, die sich bezüglich des pH-Wertes und der Porengröße unterscheiden. Dieses diskontinuierliche System besteht aus einem 3%igen Sammelgel und einem 7,5 bis 9%igen Trenngel.
Die Gel-Polymerisation wurde durch Zugabe von APS (Ammoniumperoxodisulfat) gestartet. TEMED (Tetramethylethylendiamin) dient als Reaktionskatalysator. Je konzentrierter das Gel ist, desto kleiner sind die Poren im Gel und Proteine mit kleinem Molekulargewicht lassen sich besser trennen. Vor der Elektrophorese wurden 30 µg Protein mit 1x Laufpuffer und 6x Laemmli-Puffer versetzt (36 µl Endvolumen) und bei 96°C für 5 Minuten denaturiert. Laemmli-Puffer enthält ß-Mercaptoethanol, das Disulfidbrücken durch Reduktion spaltet.
Die Elektrophorese erfolgt in 1x Laufpuffer mit einer Spannung von 25 mA. Durch den pH-Wert des Sammelgels ist die Mobilität von Glycin sehr gering im Vergleich zu der von Chlorid-Ionen. Die Mobilität von Proteinen liegt zwischen beiden Ionen. Alle Ionen

A



B

PCR-Ansatz		**PCR-Programm**	
H_2O:	8,8 µl	95°C: 3 min	
PCR-Puffer:	4,0 µl	95°C: 30 s	x35
dNTP:	2,0 µl	69°C: 45 s	
Primer F:	2,0 µl	72°C: 1 min	
Primer R:	2,0 µl	72°C: 7 min	
Taq-Polymerase:	0,2 µl		
Template:	1,0 µl		

Abb. 6: Einzelne Schritte der RT-PCR
(A) Links sind die einzelnen Schritte für die RT-PCR gezeigt. Rechts sind die Bindungsstellen der Primer der „Nested"-PCR sowie die entstehenden PCR-Fragmente dargestellt. (B) PCR-Ansatz und PCR-Programm.

wandern allerdings mit der gleichen Geschwindigkeit; es stellt sich lediglich im Bereich der Leitionen eine niedrige Feldstärke und im Bereich der Folgeionen eine hohe Feldstärke ein. Dadurch werden die Proteine zwischen beiden Ionenfronten akkumuliert. Durch die Veränderung des pH-Wertes vom Sammel- zum Trenngel liegt Glycin durch den Anstieg des pH-Wertes auf 8,8 negativ geladen vor und überholt die Proteine. Die Proteinakkumulation löst sich dann auf und die Proteinauftrennung ist nur vom Molekulargewicht abhängig.

3.2.8.2. Western Blot und Immunodetektion

Die aufgetrennten Proteine wurden auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Hierzu wurde ein Sandwich aus 4 Filterpapieren (Whatman) und zwei Schwämmchen hergestellt, in dem sich mittig das Gel sowie die Membran befanden. Der Transfer fand in einem Tank-Blot-System statt. Als Blotkammer wurde eine Transferkammer von Biorad verwendet und der Transfer wurde in Transferpuffer bei 250 mA für 1 Stunde unter Kühlung durchgeführt.
Die Behandlung der geblotteten Proteine mit spezifischen Antikörpern erlaubt deren Identifizierung. Zunächst wurde die Membran für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit 10% Rotiblock in TBST geblockt, um eine unspezifische Bindung der Antikörper zu verhindern. Die Membran wurde dann mit einem Primärantikörper (verdünnt in Wasser mit 10% Rotiblock nach Hersteller-Angaben), über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Membran wurde anschließend mit TBST dreimal 15 Minuten gewaschen. Es folgte eine einstündige Inkubation mit einem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper (verdünnt in Wasser mit 10% Rotiblock nach Hersteller-Angaben). Nach Waschen mit TBST (3x15 Minuten) erfolgte die Detektion mittels ECL-Lösungen (Lösung 1 und Lösung 2 im Verhältnis 1:1 gemischt). Dabei wurde die Membran 1 Minute in ECL-Lösung inkubiert. Das Chemolumineszenz-Substrat im ECL (Luminol) wird von der Peroxidase (HRP) des sekundären Antikörpers unter Lichtemission umgesetzt. Die freigesetzte Chemolumineszenz wurde mit einer CCD-Kamera (FluorChem SP, Alphainnotech USA) nachgewiesen.

3.2.8.3. Immunhistochemie

Frisch entnommene Gewebe wurden in Flüssigstickstoff schockgefroren. Kryoschnitte (10-20 µm) wurden angefertigt, luftgetrocknet und 7 Minuten lang mit 4% PFA fixiert. Darauf folgend wurden die Schnitte mittels 0,1% Triton-X für 20 Minuten permeabilisiert. Die Schnitte wurden dann mit 10% NDS für 1 Stunde geblockt und mit dem ersten Antikörper über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach drei 15-minütigen Waschschritten mit PBS wurde die Inkubation mit dem entsprechenden zweiten

Antikörper für eine Stunde im Dunkeln bei Raumtemperatur durchgeführt. Hinterher wurden die Schnitte dreimal 15 Minuten mit PBS gewaschen. Anschließend wurden sie mit Mowiol und Dabko eingedeckelt und mit einem Fluoreszenz-Mikroskop ausgewertet.

Wholemounts der Retina wurden wie in 3.2.5. beschrieben hergestellt.

4. Ergebnisse

Seit über 30 Jahren ist bekannt, dass der NO/cGMP-Signalweg für die Regulation der Kontraktion und Relaxation der glatten Muskulatur im Gefäßsystem entscheidend ist. Eine Rolle dieses Signalwegs bei Angiogenese und Arteriogenese ist allerdings bisher nicht ausreichend untersucht. In dieser Arbeit sollte die Funktion der NO-GC bei diesen beiden Prozessen untersucht werden. Hierzu wurden Knockoutlinien generiert, bei denen die NO-GC spezifisch entweder in den glatten Muskelzellen, in Endothelzellen oder in allen Zellen des Organismus ausgeschaltet ist.

4.1. Generierung der zellspezifischen KO-Mäuse

Die zellspezifischen Knockout-Mäuse (SMC-GCKO und EC-GCKO) wurden unter Zuhilfenahme des Cre/loxP-Systems hergestellt. Es handelt sich hier um ein Rekombinationssystem, das die gezielte Deletion einer definierten DNA-Sequenz in bestimmten Zellen ermöglicht. In unseren Mäusen wurde das Exon 10 der $ß_1$-Untereinheit der NO-GC mit zwei loxP-DNA-Sequenzen flankiert (Friebe et al., 2007). Die loxP Sequenzen dienen als Erkennungsstellen für die Cre-Rekombinase. In welchen Zellen das gezielte Gen inaktiviert wird, hängt von dem Promoter ab, der die Expression des Cre-Rekombinase-Gens reguliert. Bei den SMC-GCKO Mäusen ist das Gen der Cre-Rekombinase an den glattmuskel-spezifischen SMMHC-Promoter (smooth muscle myosin heavy chain-Promoter) gekoppelt. Dies ermöglicht die selektive Expression und Aktivierung der Cre-Rekombinase in glatten Muskelzellen. Die SMC-GCKO Mäuse exprimieren eine Fusionsprotein der Cre-Rekombinase mit einer modifizierten Estrogen-Rezeptor-Bindedomäne ($CreER^{T2}$), welche zur Induktion durch die Substanz Tamoxifen dient (Wirth et al., 2008). Dieses Fusionsprotein wird nur in den glatten Muskelzellen bei männlichen Nachkommen exprimiert, da die DNA-Sequenz auf dem Y-Chromosom lokalisiert ist. Die Verpaarung einer Maus mit gefloxtem $ß_1$-Exon 10 mit einer Maus, die die Cre-Rekombinase exprimiert, führt unter anderem zu Nachkommen, die über beide Komponenten verfügen. Bindung von Tamoxifen an die $CreER^{T2}$-Domäne, ermöglicht die Translokation der Cre-Rekombinase in den Zellkern. Dort erkennt sie die loxP-Stellen und schneidet das gefloxte Exon aus. Somit entsteht eine Deletion in der genomischen Sequenz, sodass die $ß_1$-Untereinheit nicht mehr zu einem funktionellen Protein translatiert werden kann.
In der EC-GCKO-Mauslinie ist die DNA-Sequenz der Cre-Rekombinase an den endothelspezifischen Tie2-Promoter gekoppelt. Der Tie2-Promoter wird konstitutiv abgelesen und die Cre-Rekombinase daher dauerhaft exprimiert (Kisanuki et al., 2001). Aufgrund des Fehlens der Estrogen-Rezeptor-Bindedomäne, kann die Cre-

Rekombinase in den Zellkern eindringen, ohne dass eine Tamoxifen-Zugabe notwendig ist. Eine Zusammenfassung der verschiedenen Mauslinien ist in Abbildung 7 dargestellt.

4.2. Nachweis der NO-GC in Endothelzellen

4.2.1. Nachweis des DNA-Ausschnitts der NO-GC in Endothelzellen

Die Genotypisierung der verschiedenen KO-Mäuse erfolgte mittels PCR. Die DNA stammte von Ohrlochstanzen, die nach der Markierung der Tiere auffielen. Eine Multiplex-PCR mit 3 Primern ermöglicht den Nachweis des Ausschnitts des gefloxten Exons in der genomischen DNA. Hierzu wurden die Primer loxP-$ß_1$-L1, loxP-$ß_1$-U1 und del-$ß_1$-L1 benutzt. Die Ergebnisse der verschiedenen KO-Linien sind in Abbildung 8A dargestellt. Der Nachweis des deletierten Exons (del) bei den zellspezifischen KO-Mäusen zeigt den erfolgreichen Ausschnitt in den Endothelzellen sowie in den glatten Muskelzellen. Das PCR-Fragment nach Deletion des Exons ist größer als die Bande der WT-Tiere, da bei der Deletion die Bindungsstelle eines Primers wegfällt und somit ein entfernt bindender Primer benutzt werden muss. Bei den zellspezifischen KO-Proben ist neben der WT-Bande, eine zusätzliche Bande zu sehen, die der gefloxten DNA-Sequenz entspricht. Homozygot gefloxte Tiere entsprechen dann KO-Tieren, als Kontrollen wurden jeweils heterozygot gefloxte Mäuse (WT/flox) genutzt.

4.2.2. Nachweis der NO-GC in Endothelzellen mittels Western Blot

Die Endothelzellen spielen eine Schlüsselrolle bei der Angiogenese. Aus der Literatur und eigenen Vorarbeiten war bekannt, dass die NO-GC in glatten Muskelzellen exprimiert wird. Um die Expression der NO-GC in Endothelzellen zu untersuchen, wurde ein Western Blot durchgeführt. Aus WT-, EC-GCKO- und SMC-GCKO-Tieren wurde Lungengewebe entnommen. Der Western Blot erlaubt, eine eventuelle Verminderung der Expression von NO-GC in den jeweiligen zellspezifischen Knockout-Mäusen zu quantifizieren. Die Ergebnisse zeigen eine deutliche Verminderung der Expression der $ß_1$-Untereinheit der NO-GC in der SMC-GCKO-Linie im Vergleich mit den WT-Mäusen. Ein solcher Unterschied konnte nicht bei den EC-GCKO-Mäusen festgestellt werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass die NO-GC vorwiegend in den glatten Muskelzellen und nicht in Endothelzellen vorliegt (Abbildung 8B).

4.2.3. Nachweis der mRNA der NO-GC in Endothelzellen

Da der Nachweis der NO-GC in Endothelzellen mittels Western Blot oder Immunhistochemie nicht möglich ist, ist auch der Nachweis eines erfolgreichen Ausschaltens des Enzyms erschwert. Um zumindest die Transkription der $ß_1$-

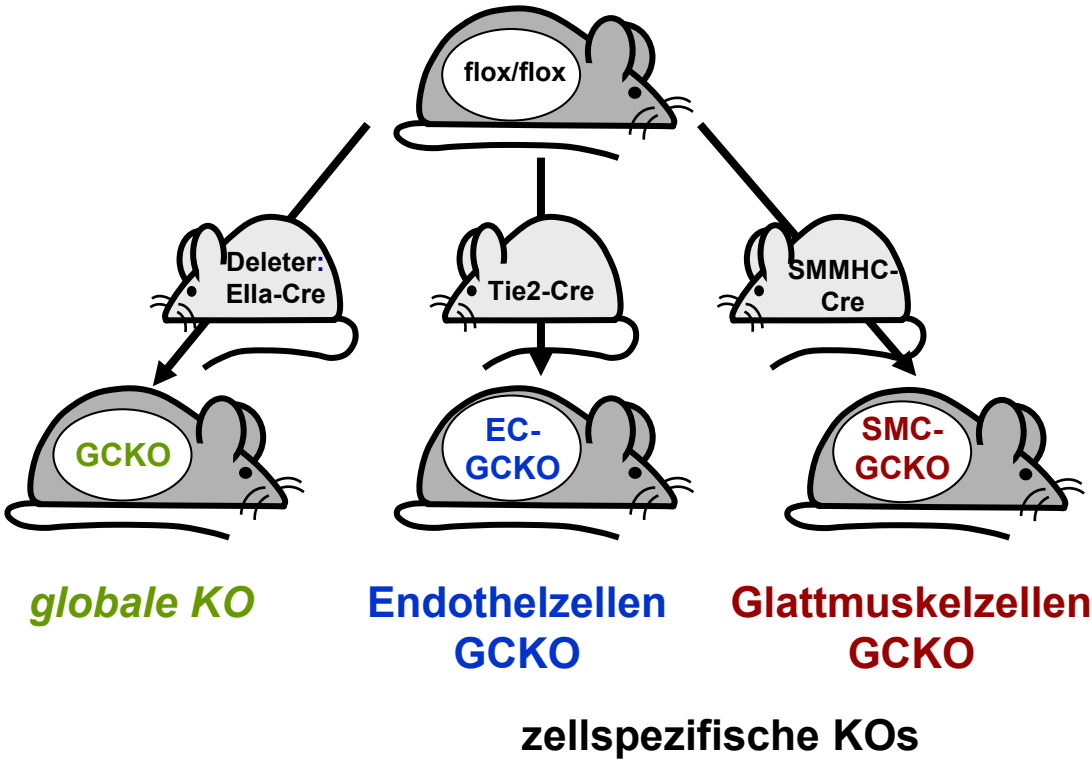


Abb. 7: Generierung der Knockout-Mausmodelle
Mäuse mit gefloxtem Exon 10 der NO-GC (ß$_1$-flox/flox) wurden mit Mäusen verpaart, die ubiquitär Cre exprimieren (Ella-Cre), wodurch globale KOs der NO-GC (GCKO) entstanden. Die ß$_1$-flox/flox-Mäuse wurden ebenfalls mit Mäusen verpaart, bei denen die Cre in den glatten Muskelzellen oder in den Endothelzellen exprimiert wird (SMMHC-Cre bzw. Tie2-Cre), wodurch zellspezifische KOs entstanden.

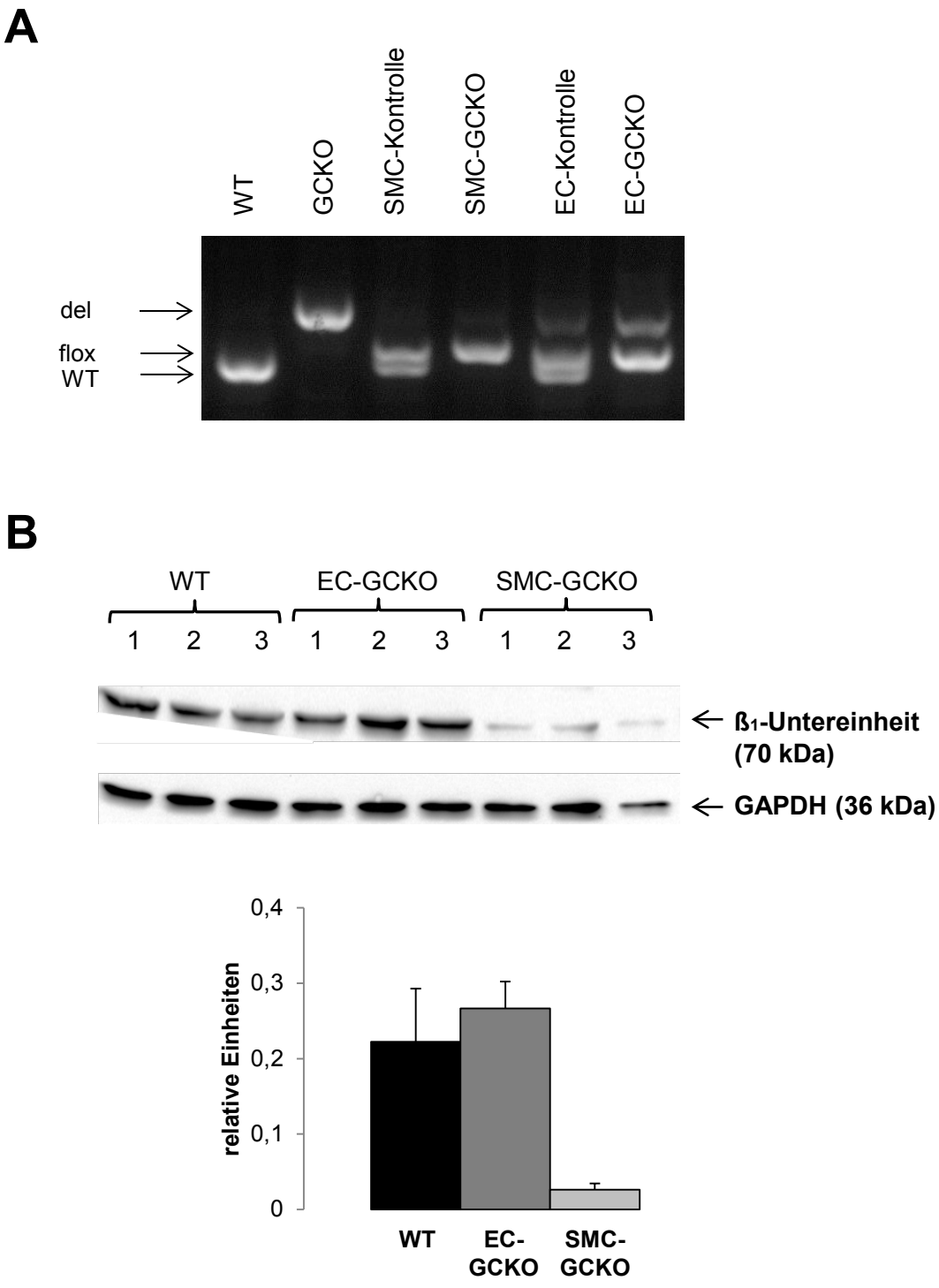


Abb. 8: Nachweis des Ausschnitts mittels PCR und Western Blot
(A) Nachweis des Ausschnitts mittels Genotypisierungs-PCR. Als Template für die PCR wurde Gewebe aus den Ohrloch-Stanzen der Mäuse benutzt. Das deletierte DNA-Fragment (del) ist bei den SMC-GCKO und den EC-GCKO nachweisbar. (B) Nachweis des Ausschnitts mittels Western Blot. Der Nachweis der murinen ß$_1$-Untereinheit der NO-GC erfolgte in Lungengewebe. Das Balkendiagramm (densitometrische Quantifizierung, zur Ladekontrolle GAPDH normalisiert) zeigt eine Verminderung der Expression der ß$_1$-Untereinheit in den SMC-GCKO-Mäuse, aber nicht in den EC-GCKO-Tieren.

Untereinheit der NO-GC auf mRNA-Ebene nachzuweisen, wurde eine RT-PCR durchgeführt. Bei einer Deletion des Exons sollte sich die Größe der mRNA bzw. der cDNA verringern.

Hierzu wurde zunächst die mRNA der $ß_1$-Untereinheit der NO-GC aus Lungengewebe isoliert. Mithilfe der Primer 856-3´ und 1593-5´ wurde eine Reverse Transkriptase-PCR durchgeführt. Nach der ersten PCR konnte die verkürzte cDNA nur in Lungengewebe von SMC-GCKO-Tieren (als Positivkontrolle) nachgewiesen werden, wobei die Größe der WT-Bande 737 bp und die der deletierten Bande 500 bp betrug. Das Produkt dieser PCR wurde dann in einer zweiten PCR („nested"-PCR) eingesetzt. Daraufhin zeigte sich auch in Lungengewebe der EC-GCKO-Tiere eine kürzere Bande, die dem Transkript der deletierten DNA entspricht (Abbildung 9A und 9B). Insgesamt zeigt sich also, dass in Endothelzellen eine mRNA für die $ß_1$-Untereinheit der NO-GC gebildet wird. Damit ist die Translation eines funktionellen Enzyms wahrscheinlich. Die Expression der NO-GC in Endothelzellen ist wesentlich geringer als in glatten Muskelzellen, da in diesen die mRNA der $ß_1$-Untereinheit schon nach einer RT-PCR nachgewiesen werden konnte, in den Endothelzellen allerdings eine „nested"-PCR notwendig war.

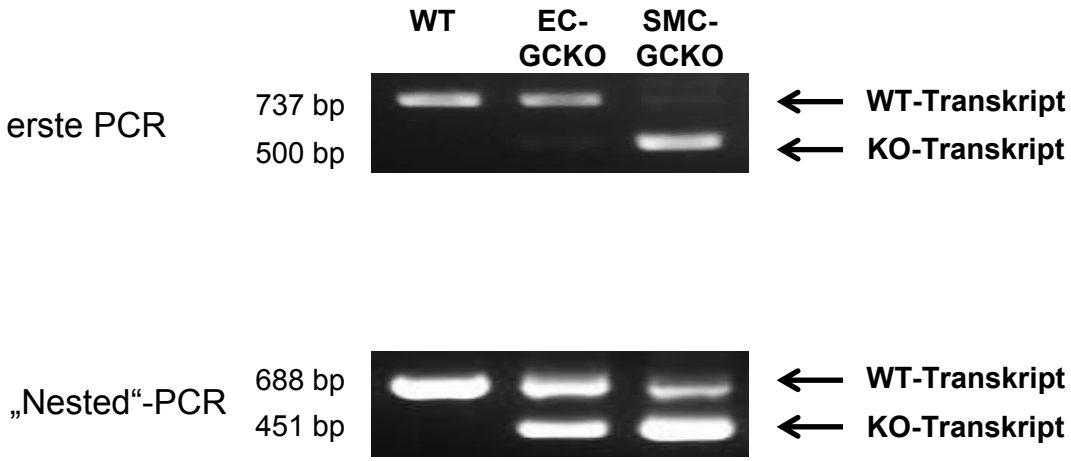
4.3. Aortenring-Assay

Die Angiogenese ist ein komplexer Prozess, der Aktivierung von Endothelzellen, Degradierung von Basalmembran, Proliferation und Elongation von Gefäßen, Neubildung von Basalmembran, Rekrutierung von Perizyten und Remodelling beinhaltet. Die meisten *in vitro*-Angiogenese-Assays sind zweidimensional und ermöglichen die Auswertung von nur wenigen Parametern. In dieser Arbeit wurde zunächst der Aortenring-Assay benutzt, um den Einfluss der NO-GC auf die Angiogenese *in vitro* zu analysieren. Generell wurden bei diesem Assay Aortenringe in eine Kollagenmatrix eingebettet und mit Serum / Wachstumsfaktor behandelt. Nach 6 Tagen der Inkubation wurden die neu gesprossenen Endothelstränge quantifiziert.

4.3.1. Auswirkung von Serum auf die wachsenden Aussprossungen

Da es in der Literatur unterschiedliche Angaben zum einzusetzenden Serum gibt, wurde zunächst ein Vergleich zwischen kommerziell erhältlichem fetalem Kälberserum (FCS) und selbst im Labor isoliertem Mausserum durchgeführt. Das Mausserum wurde direkt vor dem Versuch isoliert. Im Anschluss wurden Aortenringe aus WT-Mäusen mit 50 ng/ml VEGF in Kombination mit 2,5% FCS bzw. Mausserum für 6 Tage inkubiert.

A



B

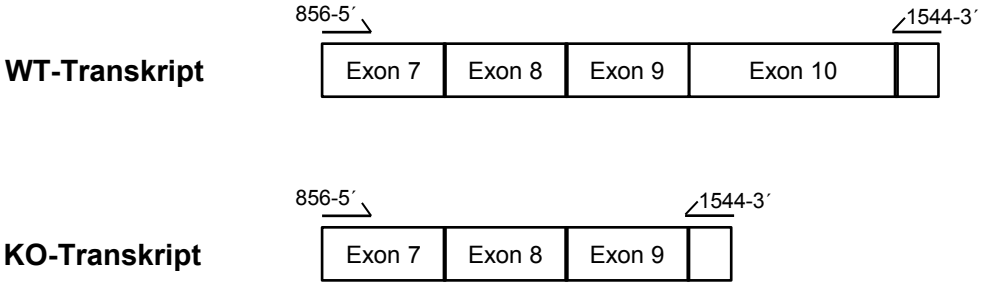


Abb. 9: Nachweis des Ausschnitts mittels RT-PCR
Für die Durchführung der RT-PCR wurde die Gesamt-RNA aus Lungengewebe isoliert. (A) Nach der erste PCR konnte die verkürzte mRNA der ß$_1$-Untereinheit der NO-GC in den SMC-GCKO-Tieren nachgewiesen werden. In den EC-GCKO-Tieren konnte dies erst nach der „nested-PCR" nachgewiesen werden. Bei den WT-Mäusen wurde auch nach der nested-PCR keine verkürzte mRNA festgestellt. (B) Darstellung der Primer-Bindungsstellen in WT- und KO-Fragmenten.

Eine deutlich höhere Anzahl an Aussprossungen wurde in den mit Mausserum inkubierten Aortenringen festgestellt (Abbildung 10A). Aus diesem Grund wurde in allen folgenden Experimenten 2,5% Mausserum benutzt, welches im Vorfeld des Versuchs von der jeweiligen Versuchsmaus gewonnen wurde.

4.3.2. Auswirkung von VEGF auf die wachsenden Aussprossungen

Wie in der Einleitung beschrieben spielt VEGF eine wichtige Rolle bei der Angiogenese, indem es die Proliferation und die Migration sowohl von Endothel- als auch glatten Muskelzellen induziert. Daher sollte als nächstes die Auswirkung von VEGF auf das Aussprossen der Aortenringe untersucht werden. Aortenringe von zwei WT-Tieren wurden präpariert und jeweils die Hälfte der Ringe mit 50 ng/ml VEGF und die andere Hälfte ohne VEGF inkubiert. Abbildung 10A zeigt deutlich, dass VEGF absolut notwendig für die Bildung von endothelialen Aussprossungen ist. Daher wurden alle weiteren Versuche mit 50 ng/ml VEGF durchgeführt.

4.3.3. Einfluss der NO-GC auf die Aussprossung der Aortenringe

Als nächstes wurden Aortenringe aus WT- und GCKO-Mäusen miteinander verglichen. Die Inkubation der Ringe mit VEGF / Mausserum ergab eine erhöhte Anzahl an Aussprossungen in den Aortenringen der GCKO-Mäuse im Vergleich mit den WT-Mäusen (Abbildung 11). Im Durchschnitt zeigten die GCKO-Aortenringe 143 ± 31, die WT-Ringe nur 91 ± 22 Aussprossungen, was einer Erhöhung von ca. 50% entspricht. Um auszuschließen, dass dieser Effekt auf mögliche Faktoren in den Seren der verschiedenen Tiere zurückzuführen ist, wurde ein „Cross over“-Versuch durchgeführt: Hierzu wurden die Aorten aus den WT-Tieren mit Serum der GCKO-Mäusen inkubiert und umgekehrt. In diesem Versuch zeigte sich allerdings kein signifikanter Unterschied in der Anzahl der Aussprossungen zwischen WT- und GCKO-Tieren (Abbildung 10B). Damit scheint nicht das Serum der Mäuse, sondern das Fehlen der NO-GC für die unterschiedliche Aussprossung der Endothelzellen verantwortlich zu sein.
Um zu untersuchen, ob die NO-GC in Endothelzellen die VEGF-induzierte Endothelsprossung beeinflusst, wurden diese Experimente mit Aorten aus EC-GCKO-Tieren durchgeführt. Abbildung 11 zeigt, dass bei endothelspezifischer Deletion der NO-GC die VEGF-vermittelte Aussprossung gegenüber den EC-Kontroll-Aorten unverändert war. Diese Daten legen nahe, dass die NO-GC in Endothelzellen tatsächlich keine Rolle bei der VEGF-induzierten Angiogenese spielt.

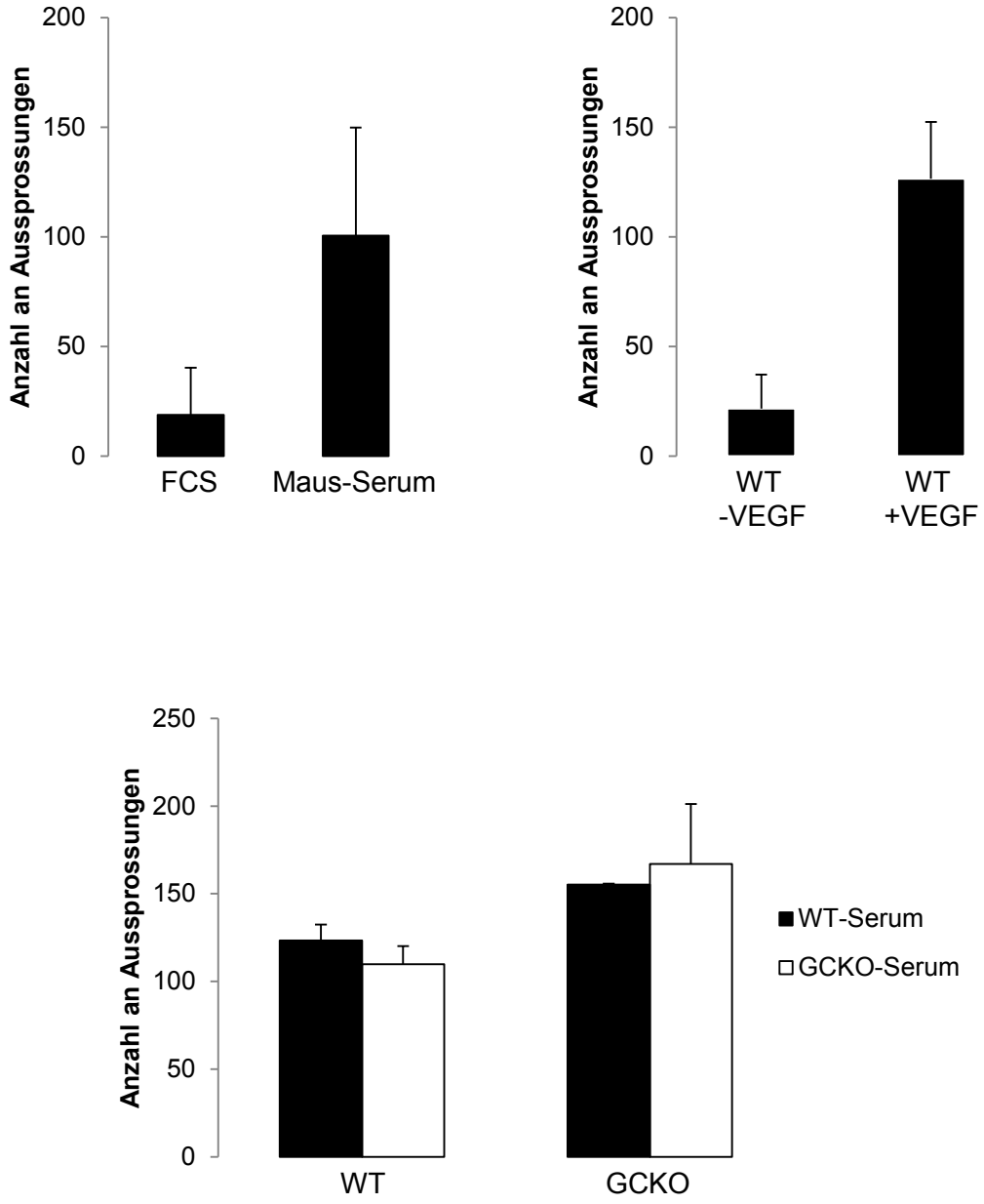


Abb. 10: Effekt von Seren und VEGF auf die sprossenden Aortenringe
(A) Die Inkubation von Aortenringen aus WT-Tieren mit dem Maus-eigenen Serum führt zu einer deutlich erhöhte Anzahl an Aussprossungen. Die Gabe von VEGF ist ebenfalls notwendig für eine erhöhte Aussprossungen-Anzahl. Daten entsprechen dem Mittelwert ± SD von n=2 WT-Tieren und N=14 Aortenringe pro Versuch. (B) Die Inkubation von Aortenringen aus WT-Tieren mit Maus-eigenem-Serum und Serum aus den GCKO-Tieren (und umgekehrt) führt zu keinem Unterschied in der Anzahl an Aussprossungen. Daten entsprechen dem Mittelwert ± SD für n=2 Tieren und N=14 Aortenringe pro Tier pro Genotyp.

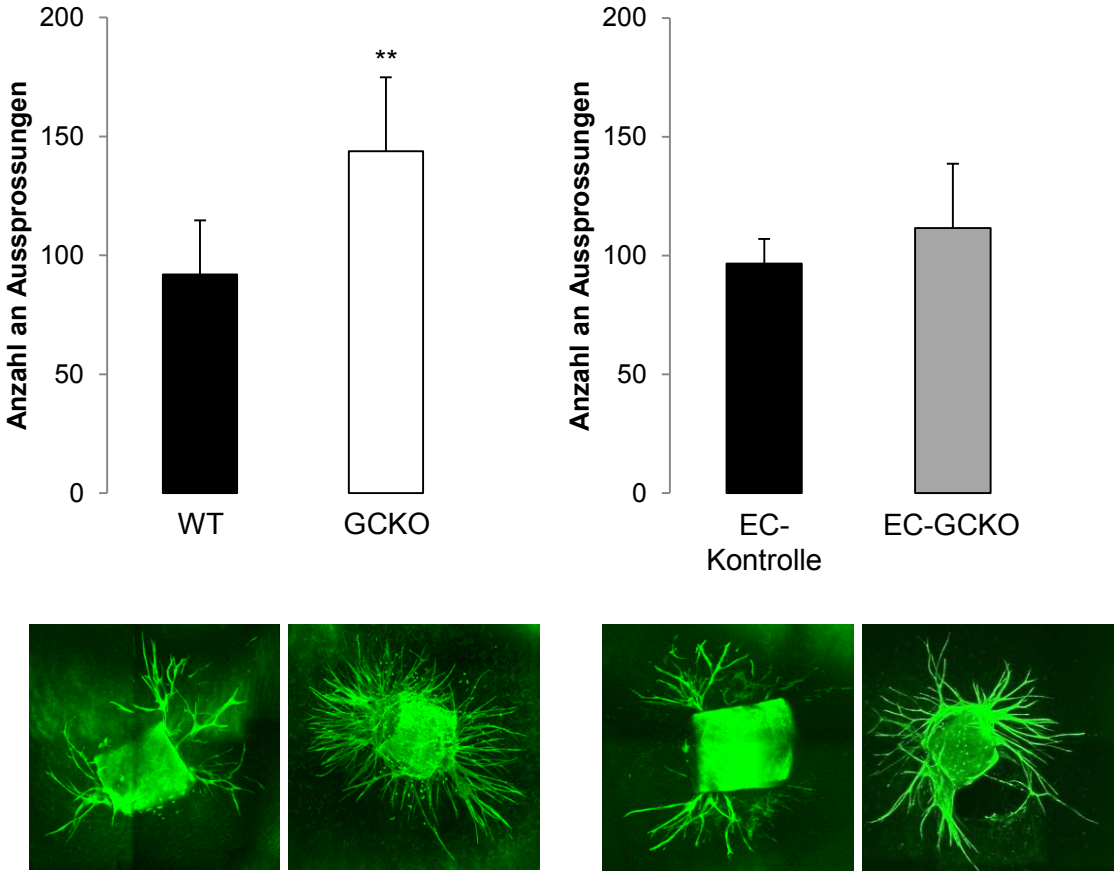


Abb. 11: Effekt von NO-GC auf die sprossenden Aortenringe
Aortenringe aus WT- und GCKO-Tieren sowie aus EC-Kontroll- und EC-GCKO-Tieren wurden mit 50 ng/ml VEGF und jeweils 2,5% Maus-eigeneM Serum für 6 Tage inkubiert. Daten entsprechen dem Mittelwert ± SEM von n=8 (WT und GCKO) bzw. n=5 (EC-Kontrolle und EC-GCKO) Tieren; (**p=0,0029). Unten sind repräsentative Aufnahmen des jeweiligen Genotyps gezeigt (Aufnahmen wurden am TSC SP5 Konfokal-Mikroskop durchgeführt, 20x Vergrößerung).

4.3.4. Immunhistochemische Analyse der Aortenringe

Um die an der Aussprossung beteiligten Zellen zu untersuchen, wurden immunhistochemische Aufnahmen der Aortenringe durchgeführt. Hierbei wurden Aortenringe mit Antikörpern gegen α-SMA (glatte Muskelzellen), NG2 (Perizyten Marker) und $ß_1$-Untereinheit (NO-GC) inkubiert. Abbildung 12 zeigt spezifische Signale in den Aussprossungen für α-SMA und NG2 (grün). Diese Färbung zeigt die Beteiligung von Perizyten und glatten Muskelzellen an der Bildung der Aussprossungen. Die Färbung von Aortenringen mit α-SMA zeigt eine höhere Anzahl an proliferierenden glatten Muskelzellen. Eine NO-GC-spezifische Anfärbung (rot) konnte ebenfalls beobachtet werden. Die Überlagerungsbilder zeigen eine Gelbfärbung, was auf eine Expression von NO-GC in Perizyten sowie in glatten Muskelzellen hindeutet (Abbildung 12A und 12B). Die Beteiligung von glatten Muskelzellen sowie von Perizyten an der Bildung von Mikrokapillaren wurde auch schon in der Literatur bestätigt (Baker et al., 2012).

4.4. Angiogenese in der Retina

4.4.1. Physiologische Gefäßentwicklung in der Retina

Aufgrund des hohen Grades der Vaskularisation und der relativ einfachen Präparation eignet sich die Retina gut als Organ zur *in vivo*-Untersuchung der Angiogenese. Im Gegenteil zur humanen Retina beginnt die Vaskularisation der Mausnetzhaut erst nach der Geburt und das Gefäßnetz ist nach ca. 3 Wochen vollständig ausgereift. Dabei bilden sich neue Blutgefäße zentral um den *Nervus opticus* und entwickeln sich radial bis zum Erreichen der Retinaperipherie. Um Effekte der NO-GC auf die physiologische Entwicklung der Blutgefäße zu untersuchen, wurde der Anteil der Vaskularisation in Retinae aus 7 Tage alten WT- und GCKO-Mäusen bestimmt.

Wie in der Einleitung beschrieben, zeigen die GCKO-Mäuse erhebliche phänotypische Abweichungen im Vergleich zu den WT-Mäusen. In der Retina der GCKO-Mäuse ist die Entwicklung von Blutgefäßen verzögert. Es zeigt sich eine signifikante Reduzierung der Vaskularisation bei 7 Tage alten GCKO-Mäusen im Vergleich zu WT-Tieren. Die Vaskularisation erreichte bei diesen Mäusen nur 76% der gesamten Fläche der Retina, während sie bei WT-Mäusen 89% erreichte (Abbildung 13). Diese verlangsamte Vaskularisation der Retina könnte auf eine Rolle von NO hindeuten. Allerdings könnte dies auch auf ein generelles Entwicklungsdefizit der GCKO-Mäuse zurückzuführen sein, da diese immer kleiner als WT-Tiere sind. Die vollständige Ausbildung eines Retinaplexus an P12 (Postnatal 12) spricht allerdings gegen eine spezifische Rolle von NO, sondern eher für einen Wachstumseffekt.

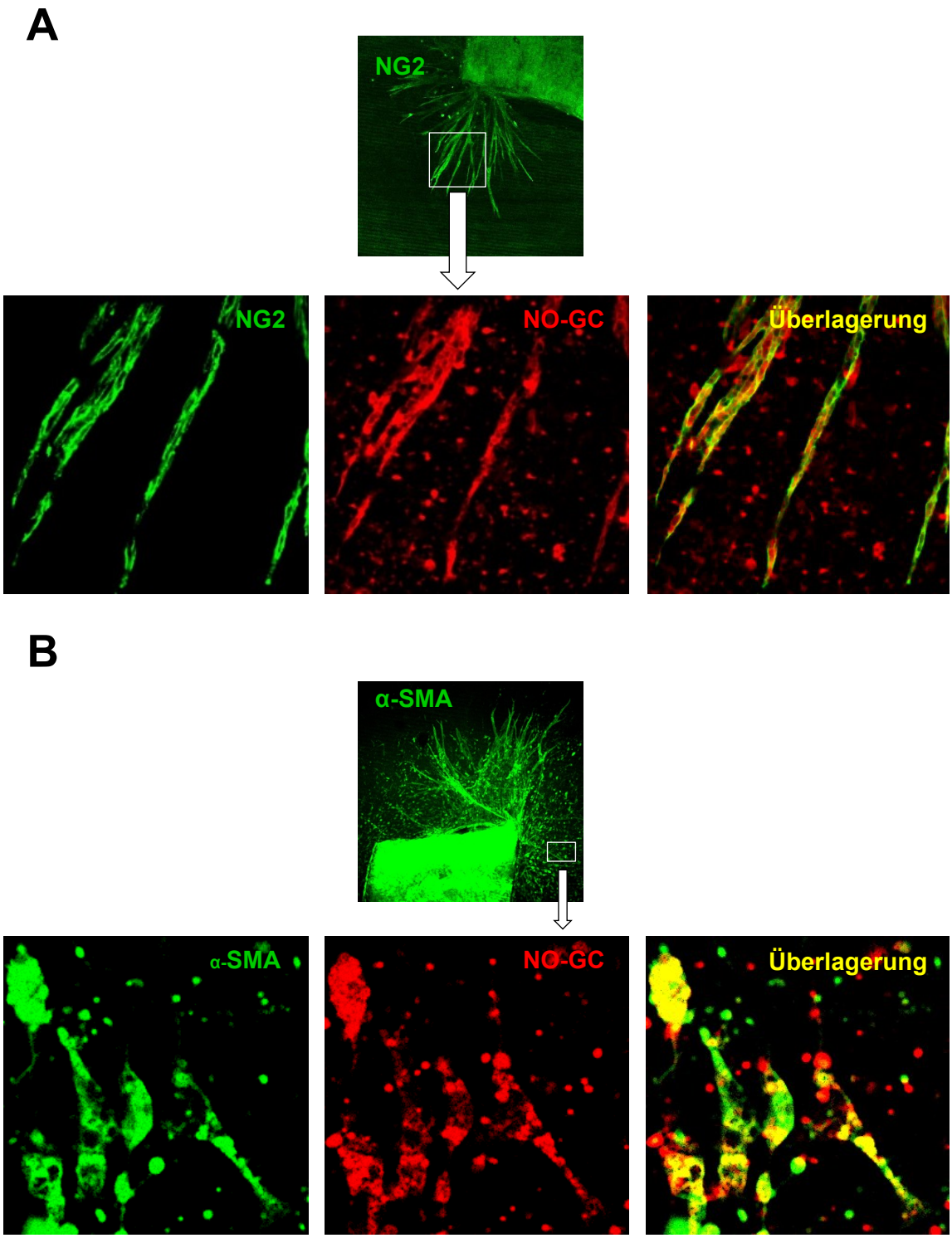


Abb. 12: Immunhistochemische Analyse der Aorten-Aussprossungen
(A) Aortenringe aus WT-Tieren wurden mit Antikörpern gegen NG2 und die ß$_1$-Untereinheit der NO-GC gefärbt. Eine Kolokalisation im Überlagerungsbild wurde festgestellt (Aufnahmen wurden am TSC SP5 Konfokal-Mikroskop durchgeführt; 200x Vergrößerung). (B) Aortenringe wurden mit Antikörpern gegen α-SMA und die ß$_1$-Untereinheit der NO-GC gefärbt. Eine Überlagerung von NO-GC und α-SMA in den glatten Muskelzellen kann festgestellt werden (Aufnahmen wurden am TSC SP5 Konfokal Mikroskop-durchgeführt; 400x Vergrößerung).

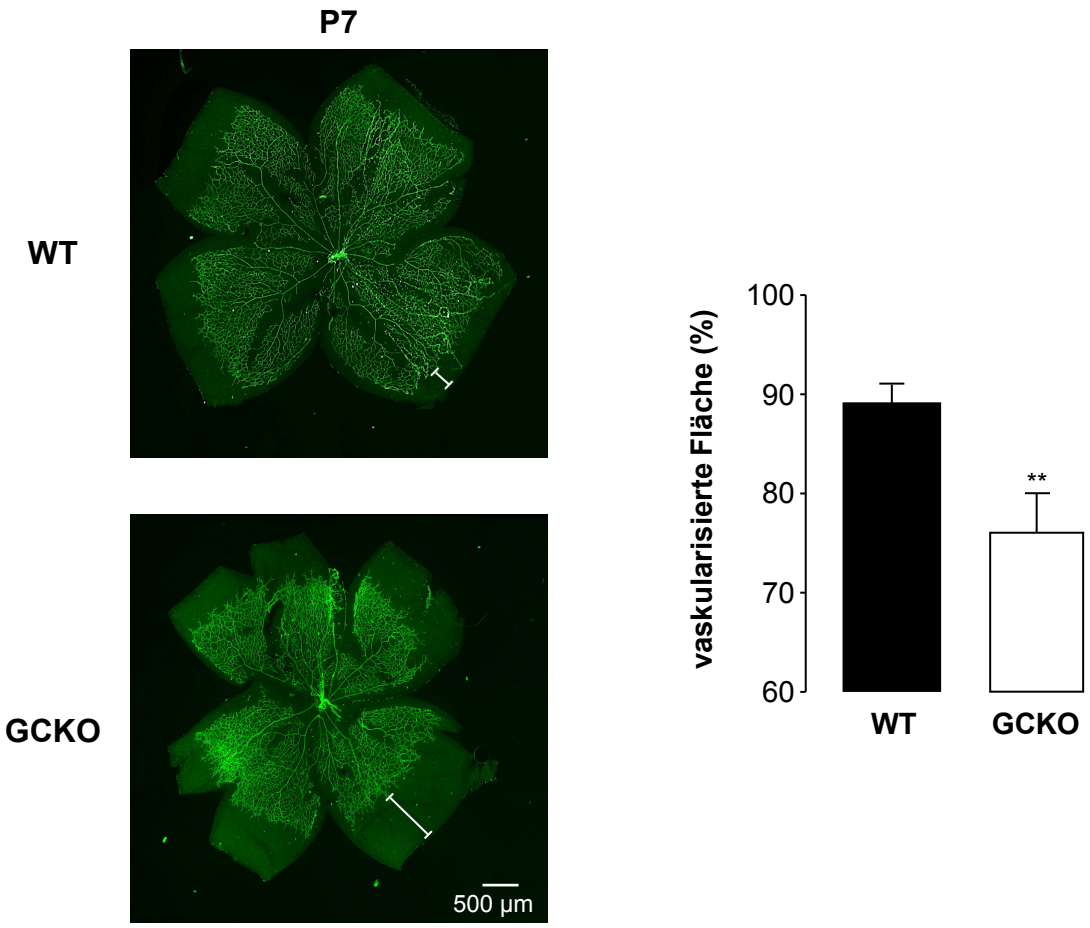


Abb. 13: Flachpräparat von Retinae aus 7 Tage alten WT- und GCKO-Tieren
Retinae aus WT- und GCKO-Tieren wurden präpariert und mit BS-1-Lektin (grün) gefärbt. Anschließend wurde die vaskularisierte Fläche mithilfe von GIMP2-Software ausgewertet. Die Klammer zeigt jeweils die avaskuläre Fläche an. Daten entsprechen dem Mittelwert ± SEM von n=6 Tiere pro Genotyp; (**p=0,0087).

4.4.2. Die Gefäß-Obliteration in der Retina

Einer der beliebtesten Methoden, um pathophysiologische Angiogenese zu untersuchen, ist das Modell der Sauerstoff-induzierten Retinopathie (oxygen-induced retinopathy, OIR). Dieses Modell wurde 1994 von Smith et al. entwickelt und besteht aus zwei Phasen: P7 Mäuse werden zunächst für 5 Tage unter hypoxischen Bedingungen gehalten (75% Sauerstoffatmosphäre), gefolgt von 5 Tagen in normaler Atmosphäre (21% Sauerstoff). Diese Phase wird als relative Hypoxie bezeichnet. Während der Hyperoxie-Phase des OIR-Versuchs bilden sich die Blutgefäße um den *Nervus opticus* in der Retina zurück. Dieser Gefäß-Obliterationsprozess findet nur zentral statt und ist unabhängig von der Gefäßbildung in der Peripherie der Retina (Lange et al., 2009). Wie in der Einleitung beschrieben, findet der Abbau der Blutgefäße nicht nur während des OIR-Versuchs, sondern auch während der normalen physiologischen Entwicklung statt (Remodelling). Somit scheint dieser Prozess beim OIR-Versuch eine Verstärkung des physiologischen Remodellings zu sein, um sich an die hohe Sauerstoffkonzentration anzupassen. Der maximale Abbau der Blutgefäße wird an P9, zwei Tage nach Beginn der Hyperoxie erreicht (Lange et al., 2009).

4.4.2.1. Die Gefäß-Obliteration bei GCKO-Tieren

Nach fünf Tagen unter Hyperoxie-Bedingungen wurden die Tiere an P12 getötet, die Retinae präpariert und die Blutgefäße mit BS1-Lektin gefärbt (Abbildung 14). Der avaskuläre Bereich wurde anschließend quantifiziert. Der zentrale Abbau der oberflächlichen sowie der tieferen Blutgefäßnetze um den *Nervus opticus* ist signifikant unterschiedlich zwischen GCKO- und WT-Mäusen. 82% der gesamten Retina-Oberfläche bei GCKO-Mäusen und nur 71% bei WT-Mäusen waren am Tag P12 vaskularisiert (Abbildung 14A und 14B). Dies deutet auf einen pro-apoptotischen Effekt der NO-GC hin. Gleichzeitig ist die Vaskularisation der Retina an Tag P12 vollständig, was die Unabhängigkeit der beiden Prozesse bestätigt.

4.4.2.2. Die Gefäß-Obliteration bei zellspezifischen Knockout-Tieren

Um die Zelltypen, die an diesem Effekt beteiligt sind, zu identifizieren, wurde der gleiche Versuch mit den zellspezifischen Knockout-Mäusen (SMC-GCKO und EC-GCKO) durchgeführt. Eine signifikante Reduzierung der avaskulären Bereiche wurde auch in der SMC-GCKO-Mauslinie beobachtet (Abbildung 14C). Der Unterschied in der Vaskularisation an P12 zwischen den SMC-GCKO-Mäusen und den SMC-Kontrollen ist nicht so groß wie bei den GCKO-Mäusen. Eine Erklärung dafür könnte die Beteiligung anderer Zellen sein. Da aber in den EC-GCKO-Mäusen kein signifikanter

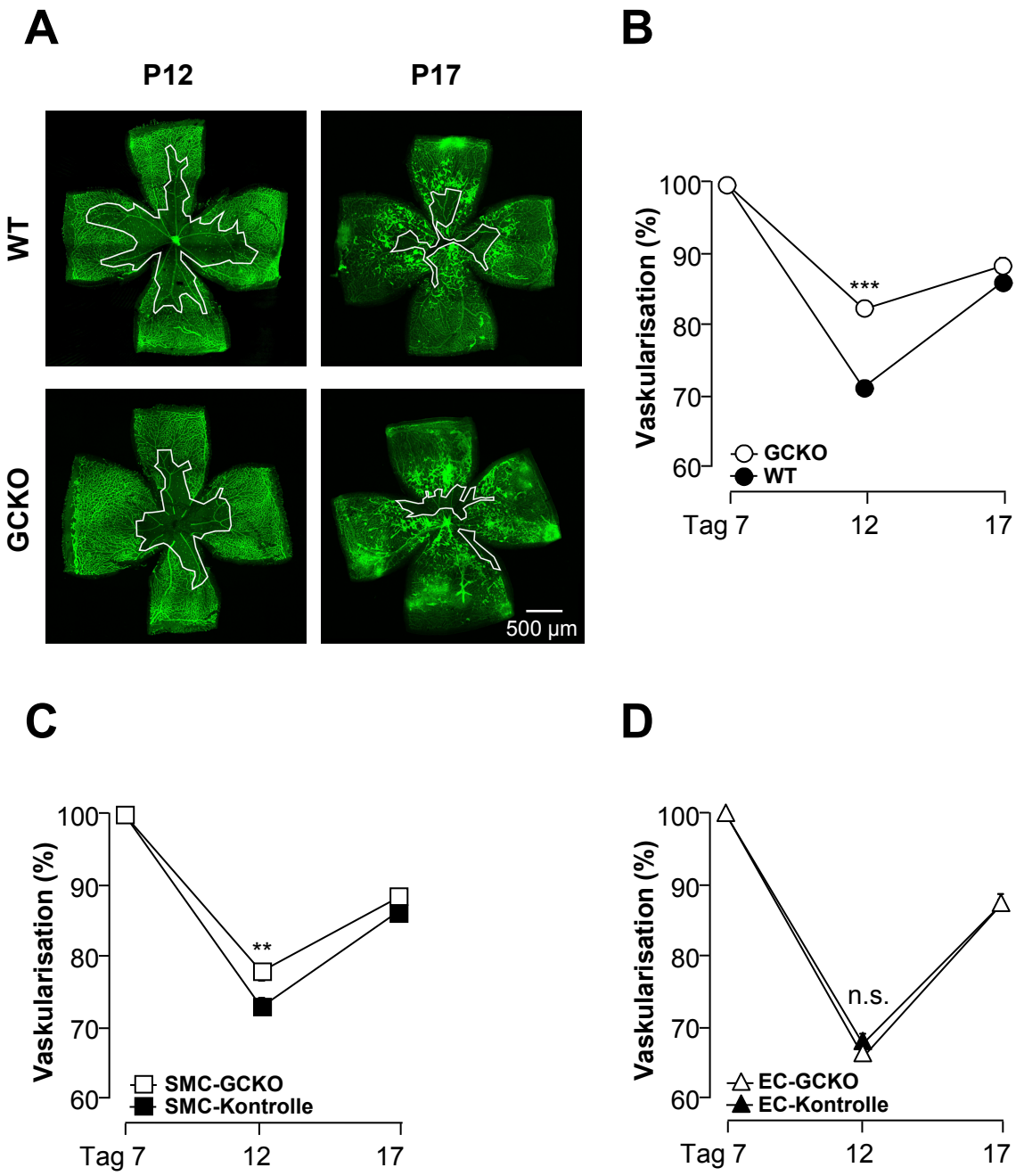


Abb. 14: Immunhistochemische Analyse der Retinae während des OIRs
Die Mäuse wurden nach 5-tägigem Aufenthalt unter Hyperoxie-Bedingung (P12) bzw. weiterem 5-tägigen Aufenthalt unter Normoxie (=rel. Hypoxie; P17) getötet und der avaskuläre Bereich in den Retinae wurde anschließend quantifiziert. (A) Repräsentative Aufnahmen der BS1-Lektin-gefärbten Retinae aus WT- und GCKO-Tieren an P12 und P17. Die weiß umrandeten Bereiche entsprechen den avaskulären Gebieten. (B) Quantitative Auswertung der Vaskularisation bei WT- und GCKO-Tieren; (***p<0,0001), (C) SMC-Kontroll- und SMC-GCKO-Tieren; (**p=0,0018) sowie (D) EC-Kontroll- und EC-GCKO-Tieren; (p=0,062). Daten entsprechen dem Mittelwert ± SEM von n=6-19 pro Genotyp. n.s.: nicht signifikant.

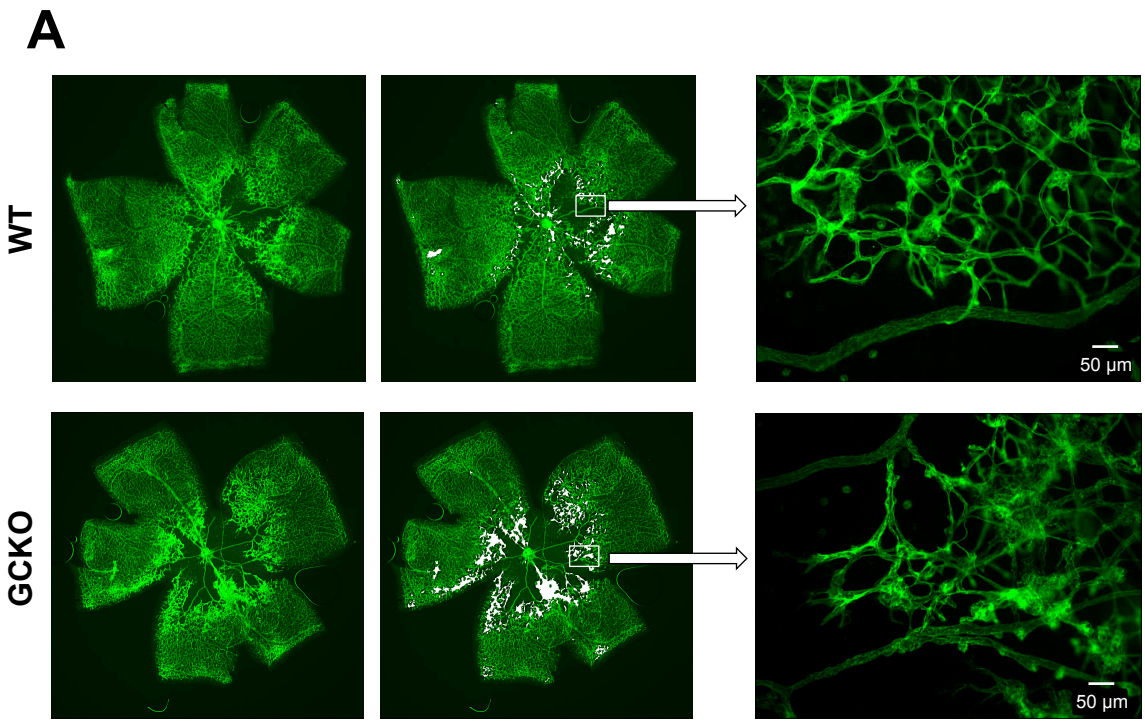
Effekt beobachtet werden konnte (Abbildung 14D), zeigt dies, dass die NO-GC in Endothelzellen am Abbau der Gefäße nicht beteiligt ist.

4.4.3. Die Gefäß-Neubildung während der Hypoxie-Phase

In einem zweiten Ansatz wurden die Mäuse an Tag P12 aus der Sauerstoff-Kammer herausgenommen und für 5 Tage wieder in normalen atmosphärischen Bedingungen gehalten. Damit entsteht eine relative Hypoxie in der Retina. Die Hypoxie ist der direkte Auslöser für die Angiogenese, wodurch eine Gefäßneubildung an der Grenze zu avaskulären Zone beginnt. In dieser Phase proliferieren Endothelzellen in den ischämischen Bereich (avaskuläre Bereiche), um sie wieder mit Blut zu versorgen. Die Auswertung der avaskulären Bereiche am Tag P17 zeigt keinen Unterschied zwischen den verschiedenen Mauslinien und ihren jeweiligen Kontrollen (ca. 88%; Abbildung 14B-D). Allerdings zeigen sich Unterschiede beim Angiogenese-Prozess, also der Phase des Gefäßneuwachstums, der zwischen Tag 12 und Tag 17 abläuft. So zeigt sich die größte Differenz in der Gefäßneubildung nach Hypoxie zwischen WT- und GCKO-Tieren. Bei den GCKO-Tieren werden nur ca. 6% der Retina revaskularisiert, während in WT-Tieren 15% mit neugewachsenen Kapillaren bedeckt waren (Abbildung 14B). Ein geringerer Unterschied zeigt sich bei SMC-GCKO-Tieren und den dazugehörigen Kontrollen (10% und 13%). Bei den Endothelspezifischen Knockout-Tieren und den Kontrollen ergab sich hingegen keine Differenz. Insgesamt zeigt sich also eine höhere Angiogeneserate bei Expression der NO-GC, und dieser Effekt ist wahrscheinlich auf die NO-GC in den glatten Muskelzellen zurückzuführen.

4.4.4. Die Tuft-Formation

Während der Hypoxie-Phase bilden sich, wie im vorigen Absatz beschrieben, neue Blutgefäße in den avaskulären Bereichen. Dabei kommt es gleichzeitig zur Ausbildung sogenannter Tufts (Neovaskularisation), die einer Fehlbildung der Blutgefäße entsprechen. Die Tufts bestehen aus einer unkontrollierten Proliferation von Endothelzellen und Perizyten (Abbildung 15A). Diese Neovaskularisation in der Mausretina entspricht phänotypisch derjenigen, die bei Patienten, mit diabetischer Retinopathie auftritt. In den OIR-Experimenten zeigt sich, dass die Anzahl an Tufts bei den GCKO- und den SMC-GCKO-Mäusen im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen erhöht ist. Bei den EC-GCKO- und den EC-Kontroll-Mäusen lässt sich hingegen kein Unterschied feststellen (Abbildung 15B). Es zeigt sich bei diesem Versuch allerdings erneut, dass der Effekt bei der SMC-GCKO-Mauslinie gegenüber den GCKO-Mäusen geringer ist.



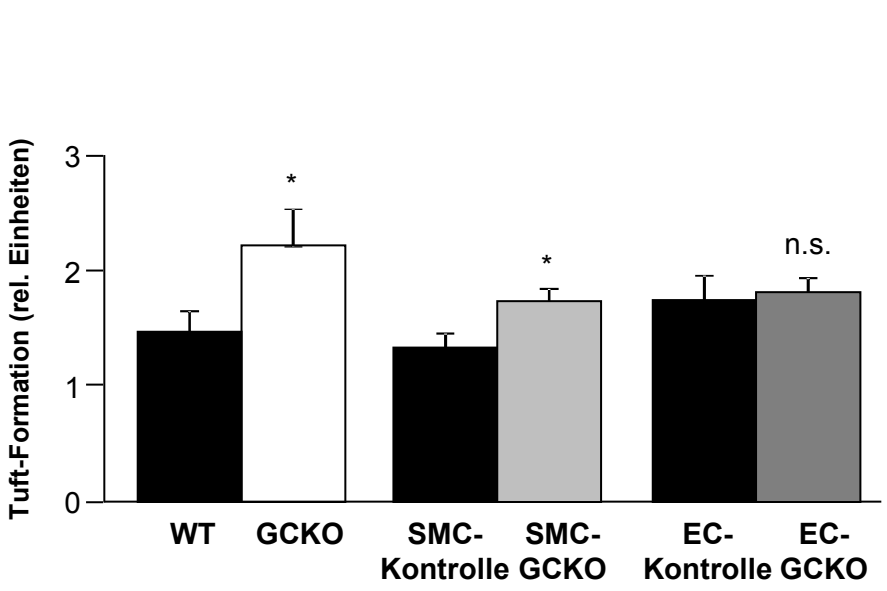


Abb. 15: Analyse der Tuft-Bildung
(A) Auswertung der Tuft-Formation in Retinae aus 17 Tage alten WT- und GCKO-Tieren. Mittels das SWIFT_NV Erweiterung der ImageJ Software wurden die Tufts weiß markiert und konnten so ausgezählt werden. (B) Das Balkendiagramm zeigt eine signifikante Erhöhung der Tuft-Formation in den GCKO- und SMC-GCKO-Tieren gegenüber den jeweiligen Kontrollen. Daten entsprechen dem Mittelwert ± SEM von n=6 bis n=19 Tiere pro Genotyp; (*p=0,036 für GCKO-Tieren; *p=0,016 für SMC-GCKO-Tieren; p=0,439 für EC-GCKO-Tieren). n.s.: nicht signifikant.

4.4.5. Immunhistochemische Analysen der Tufts

Um den Effekt der NO-GC näher zu untersuchen, wurden immunhistochemische Analysen durchgeführt. Ziel dabei war festzustellen, welche Zellen bei der Neovaskularisation tatsächlich beteiligt sind. Dabei wurden die Retinae mit BS1-Lektin und Antikörper gegen Desmin inkubiert, um Endothelzellen bzw. Perizyten zu identifizieren. Es zeigte sich, dass die Perizyten in den Tufts zu finden sind und damit sehr wahrscheinlich zu deren Bildung oder Stabilisierung beitragen (Abbildung 16A). Ein Unterschied der rekrutierten Perizyten zwischen den verschiedenen Mauslinien konnte ebenfalls festgestellt werden. Die immunhistochemischen Analysen zeigten einen höheren Anteil der Perizyten bei den GCKO-Mäusen im Vergleich zu den WT-Mäusen (Abbildung 16A). Um die Proliferation der beteiligten Zellen in den Tufts zu überprüfen, wurden die Retinae mit BS1-Lektin und Antikörper gegen Ki-67 gefärbt. Ki-67 ist ein Protein, das nur während der Zellteilung im Kern der Zelle vorliegt. Aus diesem Grund eignet es sich gut als Proliferationsmarker. In der Tat zeigte die Retina von WT- und GCKO-Mäusen eine höhere Proliferation in den Tufts. Die hohe Zellteilungsrate der Endothelzellen und der Perizyten während der Hypoxie-Phase scheint daher ein Grund für die Bildung von Neovaskularisation zu sein (Abbildung 16B).

4.4.6. NO-GC in den Perizyten

Die Unterschiede bei der Gefäß-Obliteration, der Angiogenese und der Neovaskularisation zwischen WT- und Knockout-Mäusen sind eindeutig auf das Fehlen der NO-GC zurückzuführen. Dabei ist es wichtig, die NO-GC zu lokalisieren, um die verantwortlichen Zelltypen für diesen Effekt zu identifizieren. Hierzu wurden immunhistochemische Versuche mit verschiedenen Antikörpern durchgeführt. Eine Färbung der Retina mit Desmin und α-SMA zeigt keine Überlagerung (Abbildung 17A). Dann wurde die Retina aus WT-Mäusen mit BS1-Lectin und einem Antikörper gegen die $ß_1$-Untereinheit der NO-GC inkubiert, um Endothelzellen bzw. NO-GC zu Färben. Abbildung 17B zeigt, dass das Fluoreszenzsignal für NO-GC am Rande der Endothelfärbung liegt. Der gleiche Versuch wurde anschließend mit Antikörpern gegen Desmin und die $ß_1$-Untereinheit durchgeführt. Dabei lässt sich anhand der gelben Signale eine Kolokalisation der NO-GC mit dem Perizyten-Marker Desmin in der Retina von WT-Mäusen feststellen (Abbildung 17C). Zusätzlich konnte eine Kolokalisation von NO-GC und Desmin in den Tufts festgestellt werden (Abbildung 17D). Diese Daten zeigen, dass die NO-GC in den Perizyten exprimiert wird. Eine Rolle der NO-GC in Perizyten bei der Hemmung der Apoptose, bei der Stabilisierung neu aussprossender

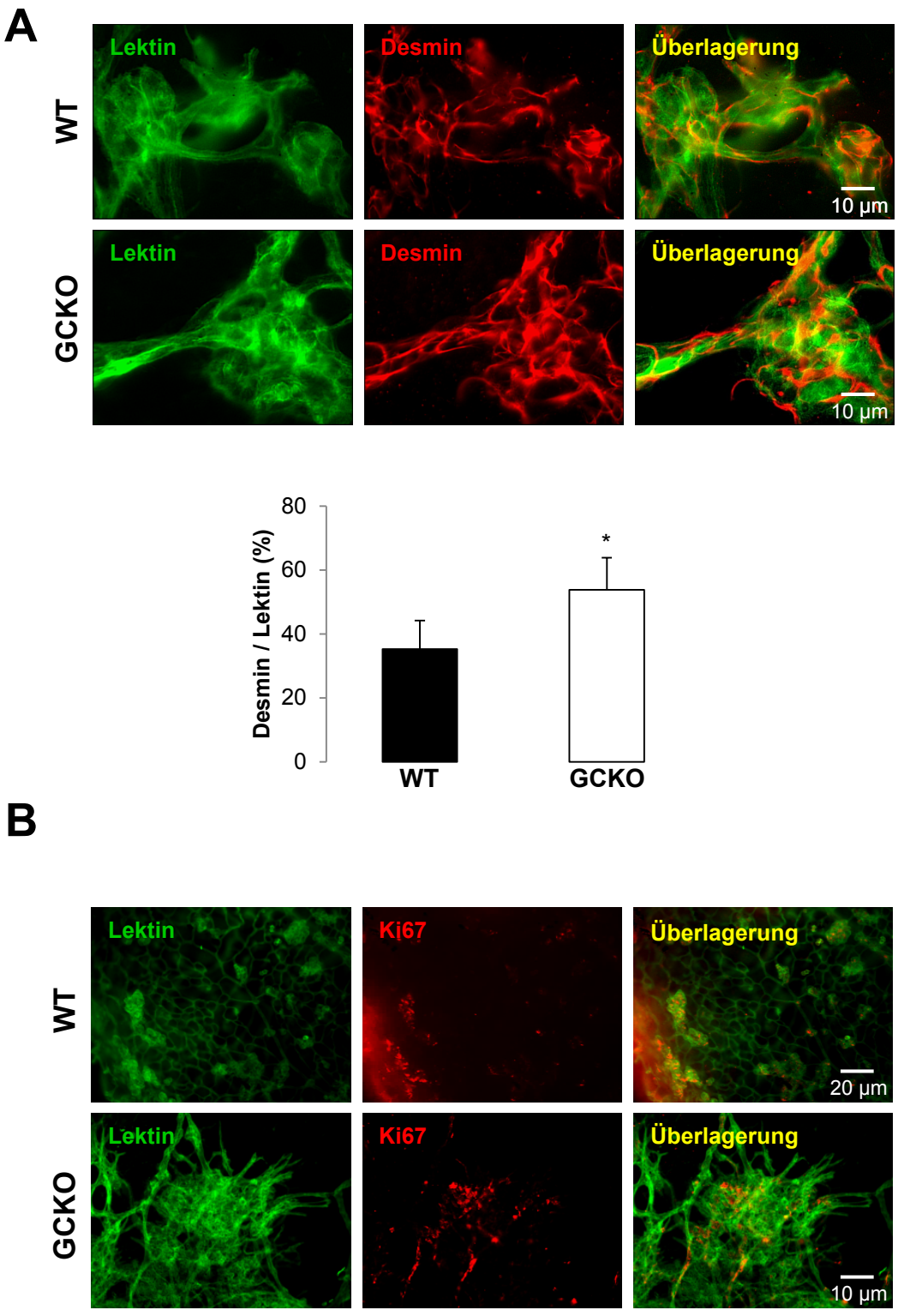


Abb. 16: Immunhistochemische Analyse der Tufts
Repräsentative immunhistochemischen Aufnahmen der Retina aus WT- und GCKO-Tieren nach dem OIR-Versuch (P17). (A) Tufts von GCKO-Tieren zeigen eine höhere Perizyten-Zahl als die von WT-Tieren. Die Auswertung entspricht dem Verhältnis von Desmin- zu Lektin-Färbung in 3-4 Tufts pro Retina bei n=3 Tieren pro Genotyp. Daten entsprechen dem Mittelwert ± SEM von n=3 pro Genotyp; (*p=0,02). (B) Retinae wurden mit Ki67 / Lektin gefärbt. Die Ki67-Färbung ist hauptsächlich in den Tufts lokalisiert.

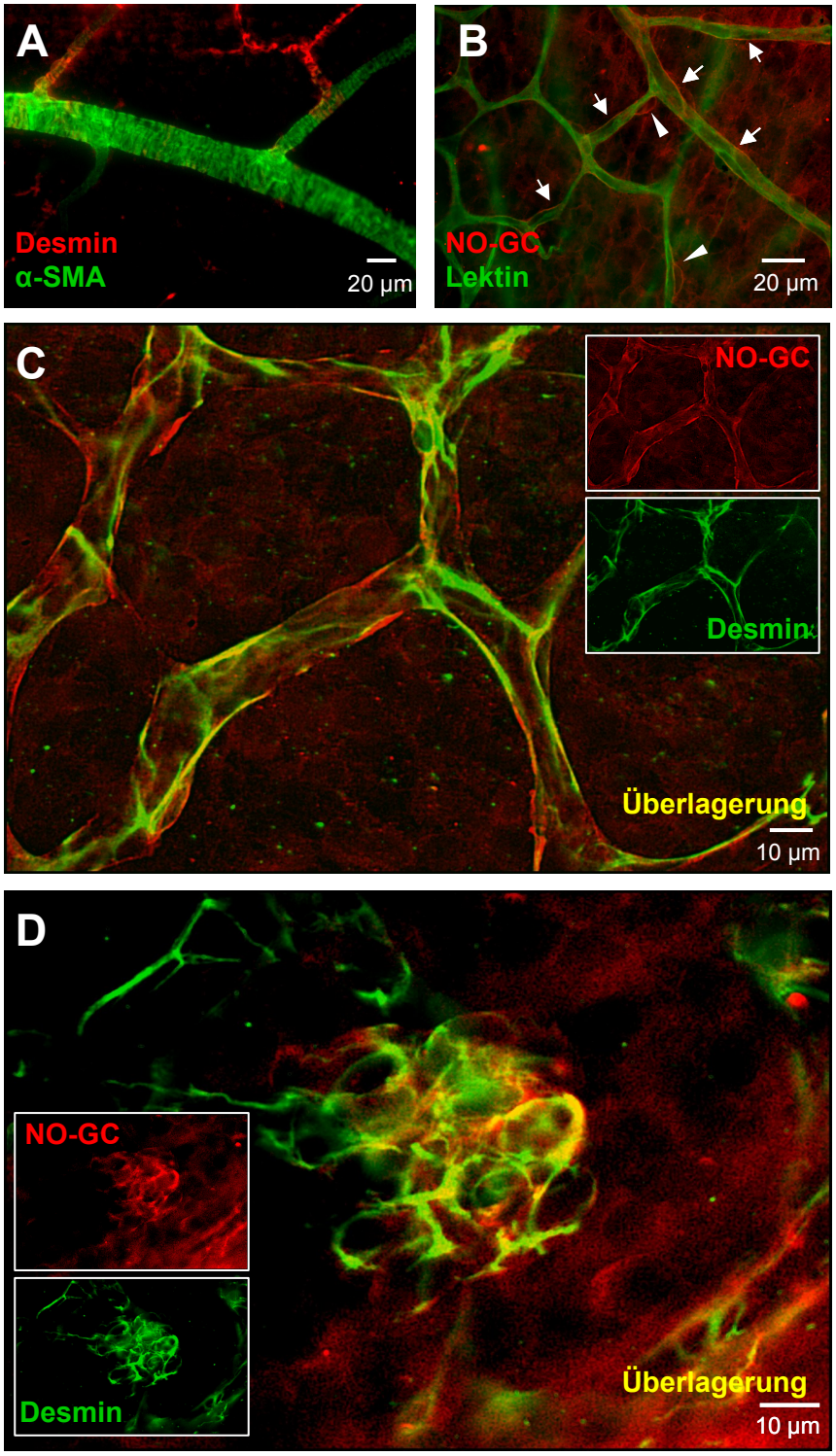


Abb. 17: Nachweis der Expression der NO-GC in Perizyten
Repräsentative immunhistochemische Aufnahmen der Retina aus WT-Tieren (P17). WT-Retinae wurden mit Antikörpern gegen Desmin / α-SMA (A) und die ß$_1$-Untereinheit der NO-GC / Lektin (B) gefärbt. Pfeile zeigen eine NO-GC-Färbung in dünnen Zellausläufern, die sich um das Lektin-gefärbte Endothel befinden. Pfeilköpfe zeigen Zellkörper der Perizyten. (C) NO-GC- und der Perizyten-Marker Desmin sind in retinalen Kapillaren kolokalisiert. (D) Retina von WT-Tieren nach Sauerstoff-induzierter Retinopathie (P17). Nachweis von NO-GC und Perizyten in den Tufts.

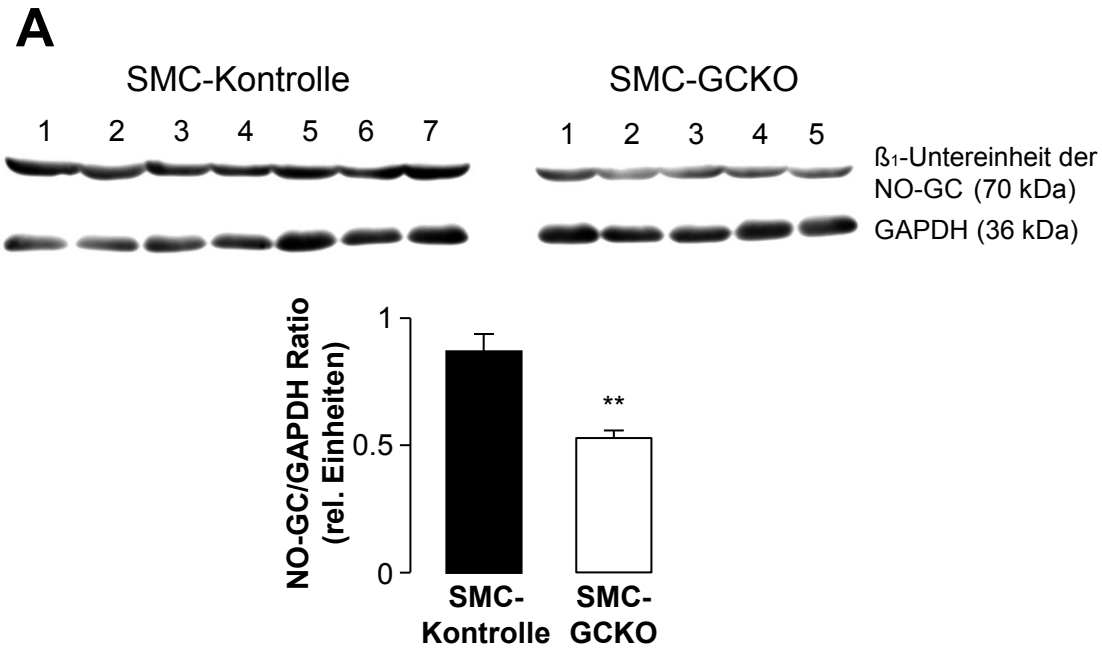
Gefäße und bei der Stimulation der Angiogenese ist damit sehr wahrscheinlich, muss aber noch endgültig gezeigt werden.

4.4.7. NO-GC in glatten Muskelzellen nach Tamoxifen-Injektion

Die in Abbildung 14B und 14C gezeigten Daten weisen auf eine wichtige Rolle der NO-GC in glatten Muskelzellen hinsichtlich des vaskulären Remodellings im OIR-Versuch hin. Es stellte sich allerdings die Frage, warum die Effekte in SMC-GCKO-Tieren nicht so stark ausgeprägt waren wie in GCKO-Mäusen. Eine mögliche Erklärung ist eine nicht vollständige Deletion der NO-GC in den glatten Muskelzellen. Im Gegensatz zu den SMC-GCKO-Tieren, die bei den Hinterlauf-Ischämie-Versuchen erst im Alter von 8 Wochen Tamoxifen erhalten, erfolgte die Gabe von Tamoxifen bei den Tieren im OIR-Versuch über die Muttermilch. Hierzu wurde den säugenden Müttern Tamoxifen gespritzt. In unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass eine komplette Deletion der NO-GC in den glatten Muskelzellen erst 50 Tage nach Tamoxifen-Gabe erfolgte (Groneberg et al., 2010). Da die Tiere im vorliegenden Versuchsansatz schon 12 Tage nach der ersten Tamoxifen-Gabe untersucht wurden, sollte überprüft werden, ob Tamoxifen nach dieser kurzen Zeit zumindest ein partielles Ausschalten der NO-GC verursacht. Dazu wurde mittels Western Blot Lungengewebe aus P12 SMC-GCKO- und SMC-Kontroll-Tieren analysiert. Hierzu wurden junge SMC-GCKO- und SMC-Kontroll-Tiere an P12 getötet, die Lungen entnommen und analysiert. Die Daten zeigen eine ca. 50%ige Verminderung der NO-GC (Abbildung 18A). Zusätzlich wurde in einem Myographie-Versuch die Relaxationsfähigkeit der Aortenringe von P17-Tieren untersucht. Die Daten aus diesem Versuch weisen ebenfalls auf eine verminderte Expression der NO-GC hin, da die DEA-NO-induzierte Relaxation der Aorten bei den SMC-GCKO Tieren im Vergleich zu den SMC-Kontroll-Tieren verringert war (Abbildung 18B).
Eine komplette Deletion der NO-GC in den glatten Muskelzellen der P12- und P17-SMC-GCKO-Tiere hat somit nicht stattgefunden. Allerdings zeigen die Daten aus dem OIR-Versuch, dass eine Verminderung der NO-GC um 50% ausreichend ist, um einen Effekt in der Vaso-Obliteration und der Angiogenese auszulösen.

4.5. Der Hinterlauf-Ischämie-Versuch

Weltweit sind kardiovaskuläre Erkrankungen die häufigsten letalen Krankheiten (WHO Bericht, Sep 2011). In Deutschland waren im Jahr 2013 über 40% aller Todesfälle einer kardiovaskulären Erkrankung zuzuordnen (Statistisches Bundesamt, Dez 2013). Hierbei sind insbesondere periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK), arterielle Hypertonie, Herzinfarkt und Apoplexie zu nennen.



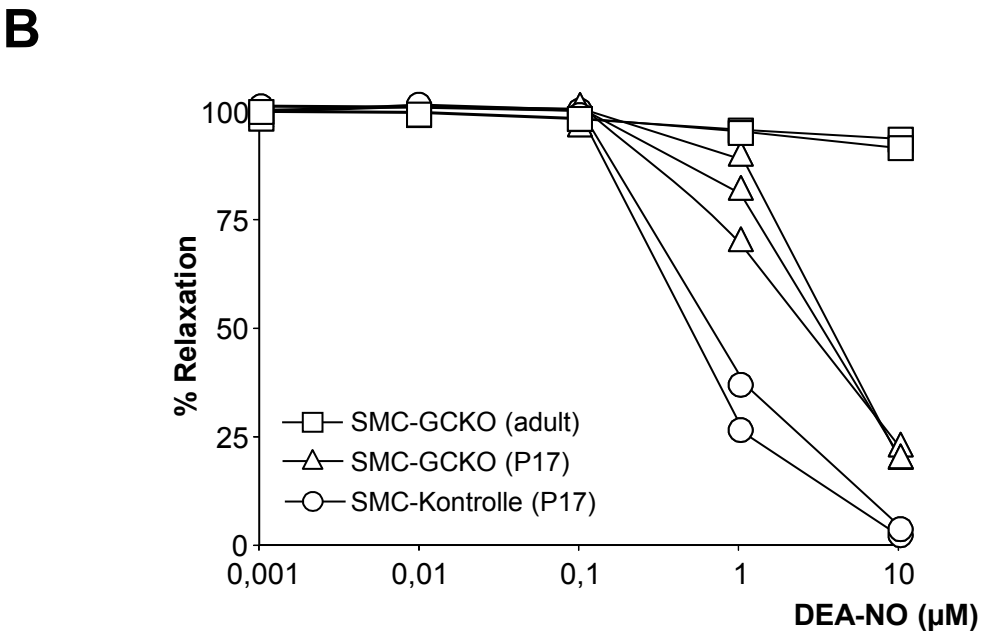


Abb. 18: Nachweis des NO-GC Ausschnitts in jungen SMC-GCKO-Tieren
Weiblichen Mäusen wurde je 1 mg Tamoxifen an 5 aufeinanderfolgenden Tagen i.p. injiziert. Die erste Injektion wurde am Tag der Geburt verabreicht, so dass die Jungtiere Tamoxifen über die Milch aufnehmen konnten. (A) Western Blot-Analyse der NO-GC-Expression im Lungengewebe von Jungtieren. Der Western Blot zeigt die Expression von NO-GC und GAPDH in den Lungen von 7 SMC-Kontroll- und 5 SMC-GCKO-Tieren (jeweils P12). Das Balkendiagramm (densitometrische Quantifizierung zur Ladekontrolle GAPDH normalisiert) zeigt eine ca. 50%ige Reduktion der NO-GC-Expression in Lungen von SMC-GCKO-Jungtieren. Daten entsprechen dem Mittelwert ± SEM von n=7 SMC-Kontroll- und n=5 SMC-GCKO-Tieren; (**p=0,0014). (B) Funktionsnachweis mittels Myographie. DEA-NO-induzierte Relaxation von Aortenringen von 2 SMC-Kontroll-, 3 SMC-GCKO- (jeweils P17) und 2 SMC-GCKO-Tieren (P55). Eine Verringerung der NO-induzierten Relaxation ist bereits bei den P17 SMC-GCKO-Tieren zu sehen, was die Wirkung von Tamoxifen auch zu diesem frühen Stadium beweist..

Bereits im Jahr 1845 konnte Luigi Porta beweisen, dass die Blutversorgung nach Abbinden der Femoralarterie eines Schweins durch die ausgebildeten Kollateralen kompensiert werden kann. Die Kompensation der Blutversorgung verhinderte in diesem Fall das Absterben der distalen Extremität. Das medizinische Pendant zu diesem Versuch ist die pAVK. Die periphere arterielle Verschlusskrankheit ist definiert als Einschränkung der Durchblutung der Extremitäten-versorgenden Arterien durch Stenosen oder Verschlüsse (Huppert et al., 2010). Das Resultat dieser Verschlüsse ist die Entstehung von größeren hypoxischen Gewebeabschnitten, die nicht durch die Angiogenese alleine versorgt werden können. Dies ist nur möglich über die Arteriogenese, die eine zeitnahe Reperfusion und damit das Überleben von ischämischen Organen ermöglicht.
Im Labor lässt sich die pAVK durch den sogenannten Hinterlauf-Ischämie-Versuch darstellen. Dabei wird die Perfusion des Hinterbeins vor und an verschiedenen Zeitpunkten nach dem Abbinden der Femoralarterie mittels Laser-Doppler-Imaging untersucht. Durch den Einsatz genetisch veränderter Mausmodelle können Rückschlüsse auf die Rolle bestimmter Proteine gezogen werden. Im Folgenden sollte die Rolle der NO-GC bei der Arteriogenese im Hinterlauf-Ischämie-Modell anhand der verschiedenen NO-GC-defizienten Mäuse untersucht werden.

4.5.1. Basale Blutperfusion in den GCKO-Mäusen

Vor der Durchführung der Ligation der Femoralarterie wurde die Durchblutung im Hinterlauf der jeweiligen Tiere mittels eine nicht-invasiven Laser-Doppler-Messung (LDM) bestimmt. Schon unbehandelt zeigen die GCKO-Mäuse eine um ca. 30% verminderte Blutperfusion im Vergleich zu den WT-Tieren (Abbildung 19A). Diese Reduzierung wird auf den verminderten Gefäßdurchmesser zurückgeführt, der bei den NO-GC-defizienten Tieren in unserem Labor nachgewiesen werden konnte. Ein ähnlicher Effekt konnte bei den zellspezifischen Knockout-Mäusen nicht festgestellt werden.

4.5.2. Auswirkung der NO-GC auf die Blutreperfusion

Die Arteriogenese bezeichnet den Umbau von kleinen Arteriolen zu größeren, funktionsfähigen Arterien. Ob die NO-GC eine Rolle bei der Arteriogenese spielt, ist bislang unklar. Um dies zu untersuchen, wurde der Hinterlauf-Ischämie-Versuch durchgeführt. Hierbei wurden 12 bis 14 Wochen alte Tiere der GCKO-, SMC-GCKO- und EC-GCKO-Linien benutzt. Wie bei dem OIR Versuch wurden als Kontrollen Geschwistertiere eingesetzt.

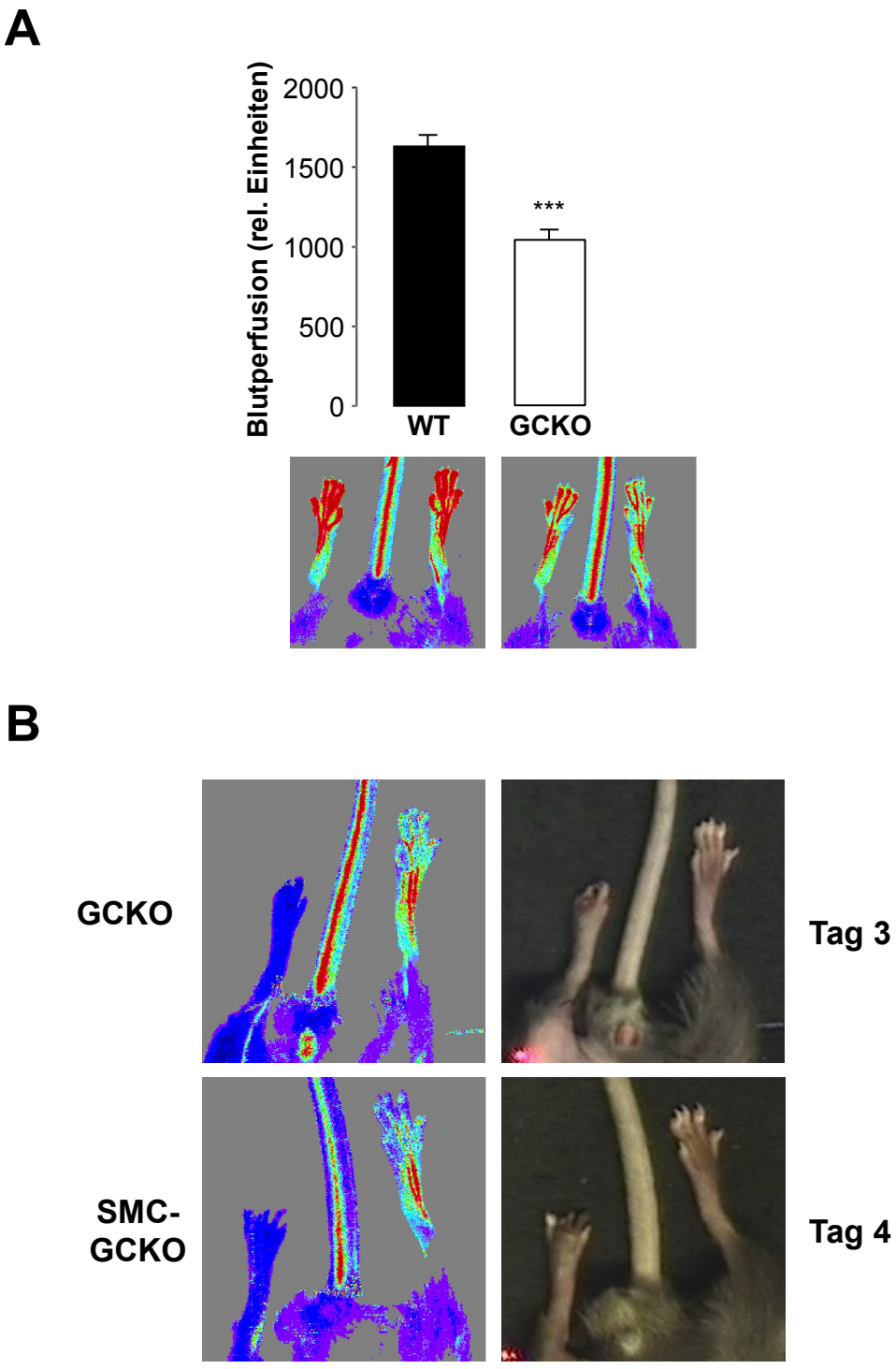


Abb. 19: Blutperfusion im Hinterlauf von WT- und GCKO-Tieren
Die Blutperfusion wurde mittels LDI ermittelt. (A) Die basale Blutperfusion im Hinterlauf von GCKO-Tieren ist im Vergleich mit den WT-Tieren reduziert. Repräsentative Aufnahmen der Durchblutung beider Genotypen sind unter dem Balkendiagramm dargestellt. Daten entsprechen dem Mittelwert ± SEM von n=5 GCKO- und n=8 WT-Tieren; (***p<0,0001). (B) Nekrotische Pfoten bei den GCKO- und SMC-GCKO-Tieren 3 bzw. 4 Tage nach der Operation. Bei Auftreten solcher nekrotischen Prozesse wurden die Versuchstiere aus tierethischen Gründen euthanasiert.

4.5.2.1. Hinterlauf-Ischämie bei GCKO-Mäusen

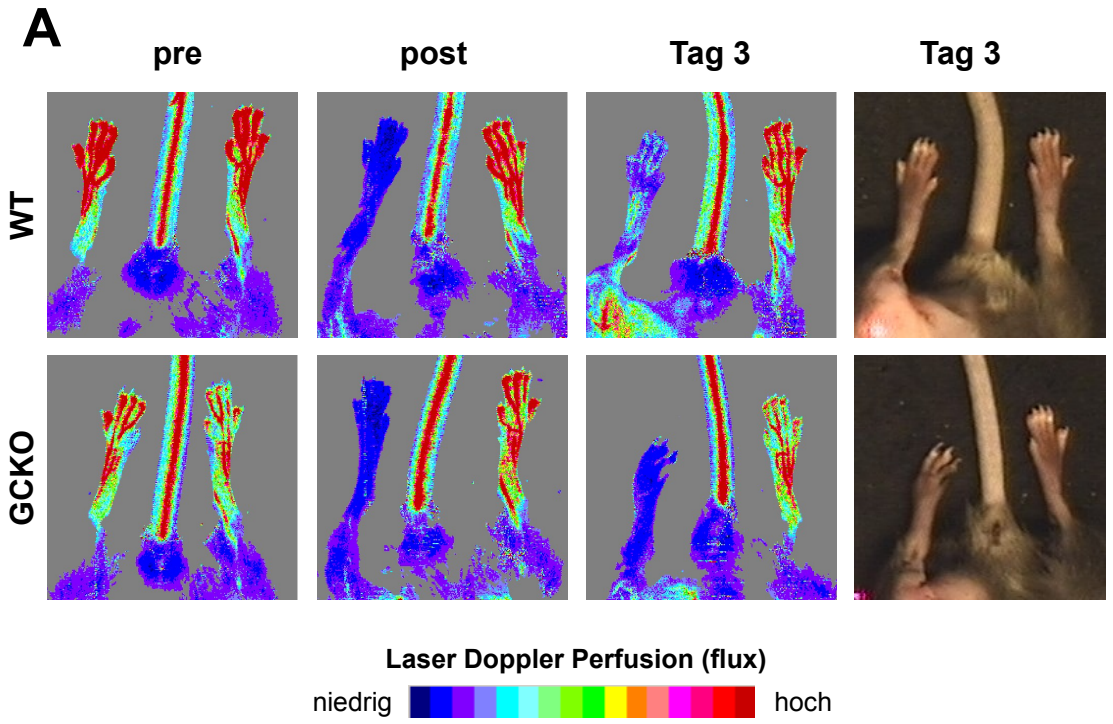
Nach einer initialen Perfusionsmessung mittels LDI wurde die Femoralarterie abgebunden. An den Tagen 1, 2, 3, 4, 7, 14, 21 und 28 nach der Operation wurde die Durchblutung in dem operierten sowie dem nicht operiertem Hinterlauf gemessen. Bei alle Tieren wurde direkt nach der Operation eine Verminderung der Durchblutung im operierten Hinterlauf von ca. 80% beobachtet. Die GCKO-Mäuse zeigten keine Benutzung des operierten Beines. Ab dem zweiten Tag nach der OP fingen die Pfoten bei den GCKO-Mäusen an zu degenerieren (Abbildung 19B). Aus tierethischen Gründen wurde die Messung der Durchblutung nur bis zum dritten Tag nach der OP durchgeführt (Abbildung 20B) und die Tiere direkt nach Auftreten der Nekrose getötet. Dieser Effekt wurde bei den WT-Tieren nicht beobachtet. Die Regeneration in den Kontrolltieren verlief wie in der Literatur beschrieben (Limbourg et al., 2009) und die Durchblutung erreichte 28 Tage nach der Operation ca. 70% des normalen Wertes (Abbildung 20A und 20B). Diese Daten zeigen, dass das komplette Ausschalten der NO-GC die vaskuläre Regeneration inhibiert und zur Nekrose des Hinterlaufs nach einer Okklusion der Femoralarterie führt.

4.5.2.2. Hinterlauf-Ischämie bei zellspezifischen Knockout-Mäusen

Bei den SMC-GCKO-Tieren wurde ein vergleichbarer Effekt wie bei den GCKO-Mäusen beobachtet. Allerdings entwickelten nur 2 von 10 SMC-GCKO-Tieren eine Nekrose des Hinterlaufs und mussten vorzeitig aus dem Versuch genommen werden (Abbildung 19B). Deshalb wurden die Messungen mit den restlichen 8 Tieren bis Tag 28 durchgeführt. Die Daten zeigen einen signifikanten Unterschied der Blut-Reperfusion im Hinterlauf der SMC-GCKO-Mäuse im Vergleich mit den SMC-Kontroll-Mäusen. Nach 28 Tagen erreichten die SMC-GCKO Tiere nur 40%, die SMC-Kontroll-Tiere hingegen ca. 70% des normalen Durchblutungswertes im operierten Hinterlauf (Abbildung 21A und 21B).

Alle Tiere der EC-GCKO-Linie zeigten nach dem Abbinden der Femoralarterie eine normale Regeneration. Die Durchblutung erreichte bei den EC-GCKO- sowie bei den EC-Kontroll-Tieren nach 28 Tagen ca. 70% des normalen Durchblutungswertes (Abbildung 22A und 22B).

Diese Versuche weisen auf eine essentielle Funktion der NO-GC bei der Arteriogenese *in vivo* hin. Dabei kann wie bei den OIR-Versuchen eine Rolle des Enzyms in Endothelzellen ausgeschlossen werden. Hingegen scheint die NO-GC in glatten Muskelzellen hauptsächlich für den physiologischen Ablauf der Arteriogenese verantwortlich zu sein.



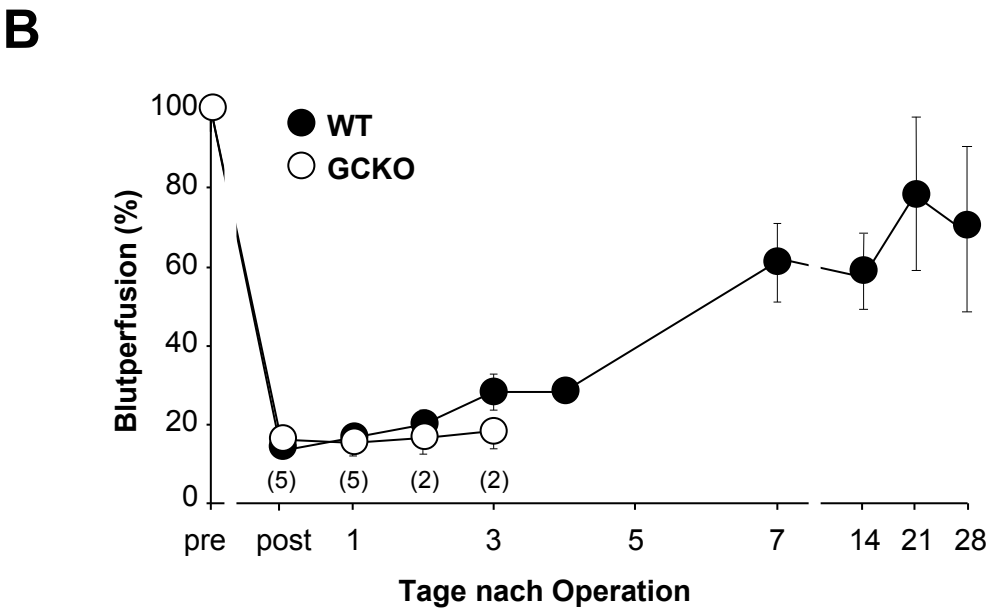
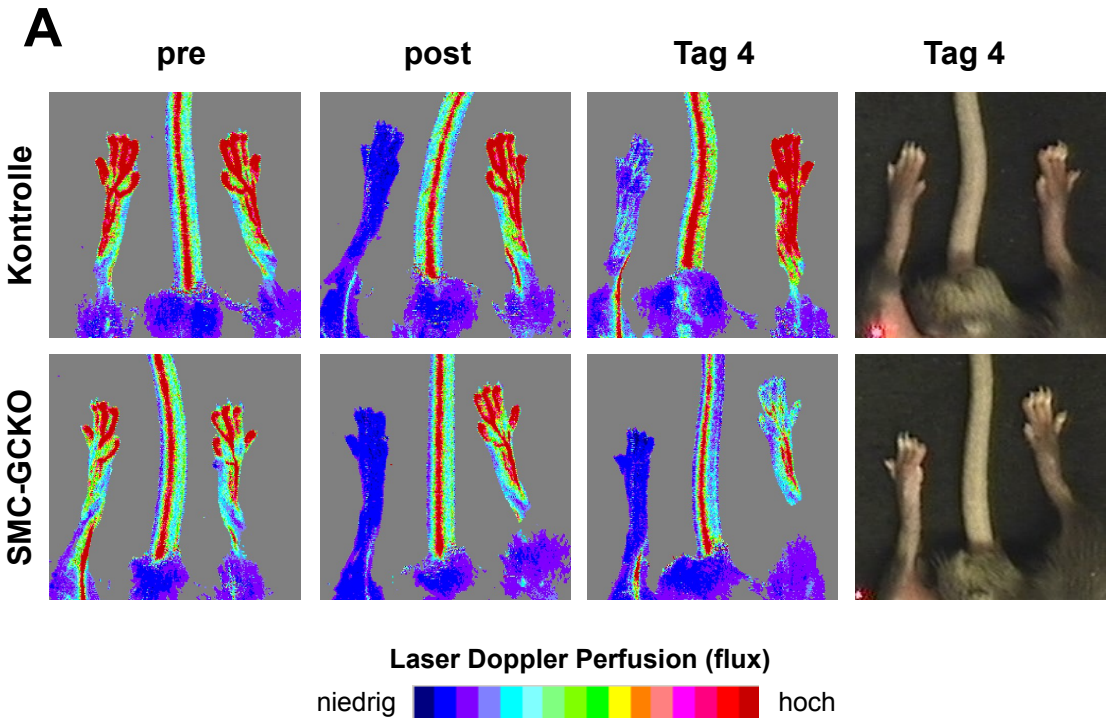


Abb. 20: Einfluss der NO-GC auf die Blutreperfusion in GCKO-Tieren
Die Blutperfusion von WT- und GCKO-Mäusen wurde vor und direkt nach der Ligation der Femoralaretrie des linken Hinterlaufs sowie an postoperativen Tagen 1, 2, 3, 4, 7, 14, 21 und 28 mittels LDI ermittelt. (A) Typische LD-Aufnahmen vor (pre) und unmittelbar nach (post) sowie am Tag 3 nach der Operation. (B) Statistische Analyse des Hinterlauf-Ischämie-Versuchs für WT- und GCKO- Tiere. Bei den WT-Tieren ergab sich eine Verbesserung der Hinterlaufperfusion über 28 Tage entsprechend der Literatur (Limbourg et al., 2009) während bei den GCKO-Tieren keine Verbesserung der Perfusion auftrat. Die Zahlen in Klammern geben die Anzahl der GCKO-Tiere ohne Nekrose an. Aufgrund der Nekrose mussten 3 GCKO-Tiere an Tag 2 und 2 Tiere an Tag 4 euthanisiert werden. Daten entsprechen den Mittelwerten ± SEM von n=8 WT- und n=5 GCKO-Tieren.



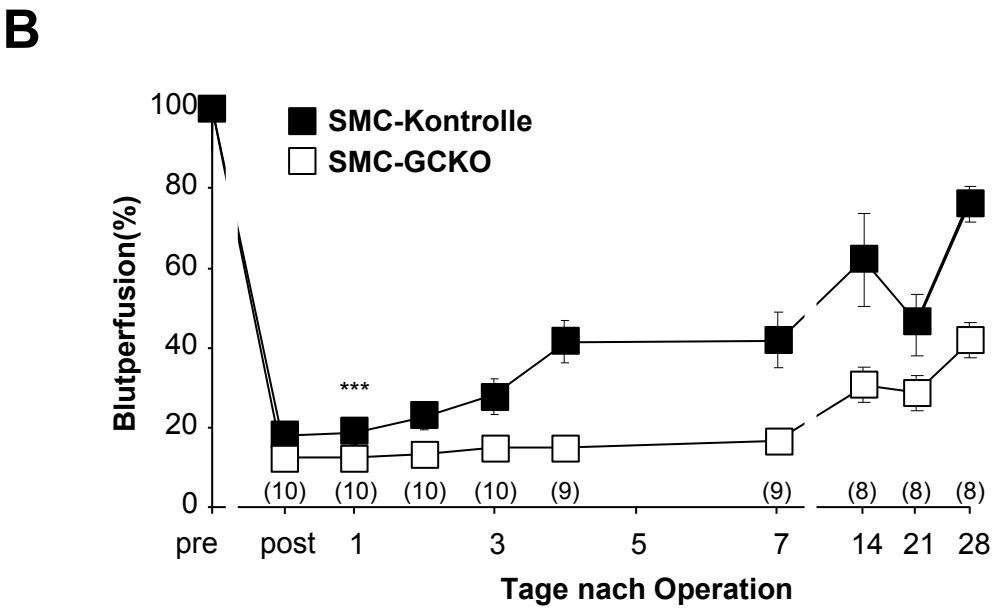
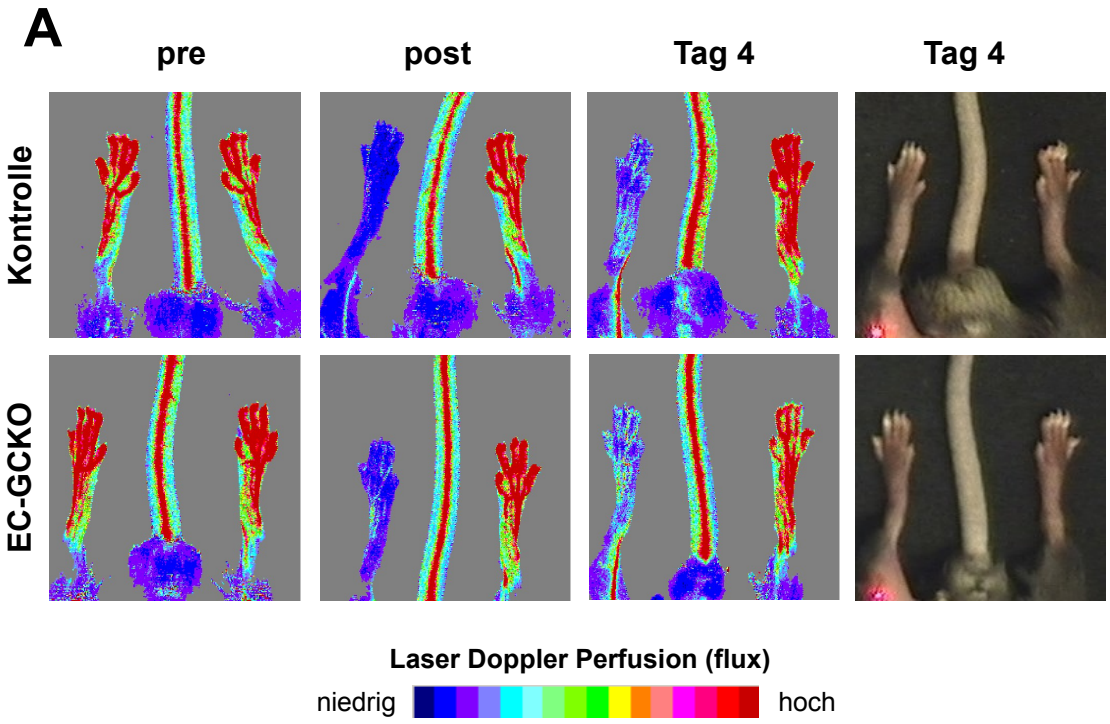


Abb. 21: Einfluss der NO-GC auf die Blutreperfusion in SMC-GCKO-Tieren
Die Blutperfusion von SMC-Kontroll- und SMC-GCKO-Mäusen wurde vor und direkt nach der Ligation der Femoralaretrie des linken Hinterlaufs sowie an postoperativen Tagen 1, 2, 3, 4, 7, 14, 21 und 28 mittels LDI ermittelt. (A) Typische LD-Aufnahmen vor (pre) und unmittelbar nach (post) sowie am Tag 4 nach der Operation sind dargestellt. (B) Statistische Analyse des Hinterlauf-Ischämie-Versuchs für SMC-Kontroll- und SMC-GCKO-Tiere. Bei den SMC-Kontroll-Tieren ergab sich eine Verbesserung der Hinterlaufperfusion über 28 Tage entsprechend der Literatur (Limbourg et al., 2009) während bei den SMC-GCKO-Tieren nur eine geringe Verbesserung der Perfusion auftrat. Die Zahlen in Klammern geben die Anzahl der SMC-GCKO-Tiere ohne Nekrose. Aufgrund der Nekrose musste ein SMC-GCKO-Tier an Tag 4 und ein Tier an Tag 14 euthanasiert werden. Daten entsprechen den Mittelwerten ± SEM von n=9 SMC-Kontroll- und n=10 SMC-GCKO-Tieren; (***p<0,0001).



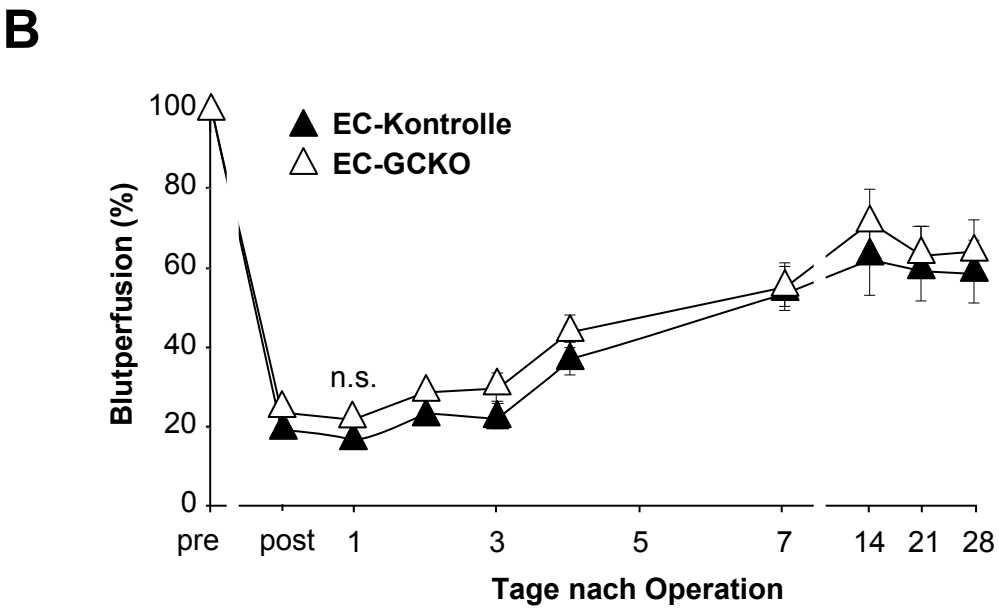


Abb. 22: Einfluss der NO-GC auf die Blutreperfusion in EC-GCKO-Tieren
Die Blutperfusion von EC-Kontroll- und EC-GCKO-Mäusen wurde vor und direkt nach der Ligation der Femoralaretrie des linken Hinterlaufs sowie an postoperativen Tagen 1, 2, 3, 4, 7, 14, 21 und 28 mittels LDI ermittelt. (A) Typische LD-Aufnahmen vor (pre) und unmittelbar nach (post) sowie am Tag 4 nach der Operation sind dargestellt. (B) Statistische Analyse des Hinterlauf-Ischämie-Versuchs für EC-Kontroll- und EC-GCKO-Tiere. Sowohl bei EC-Kontroll- als auch EC-GCKO-Tieren ergab sich eine Verbesserung der Hinterlaufperfusion über 28 Tage entsprechend der Literatur (Limbourg et al., 2009). Daten entsprechen den Mittelwerten ± SEM von n=12 EC-Kontroll- und n=12 EC-GCKO-Tieren. n.s.: nicht signifikant

4.5.3. Proliferation im *Gastrocnemius*-Muskel nach Ischämie

Um wie bei den OIR-Versuchen eine mögliche Veränderung der Zellproliferation nachzuweisen, wurden immunhistochemische Färbungen durchgeführt. Dabei wurden Kryoschnitte (10 µm) der *Gastrocnemius*-Muskel aus der WT- und der GCKO-Linie mit DAPI, BS1-Lektin und dem Proliferationsmarker Ki67 gefärbt. Abbildung 23 zeigt eine höhere Proliferation der Endothelzellen in den Muskeln aus den GCKO-Tieren im Vergleich zu den WT-Tieren.

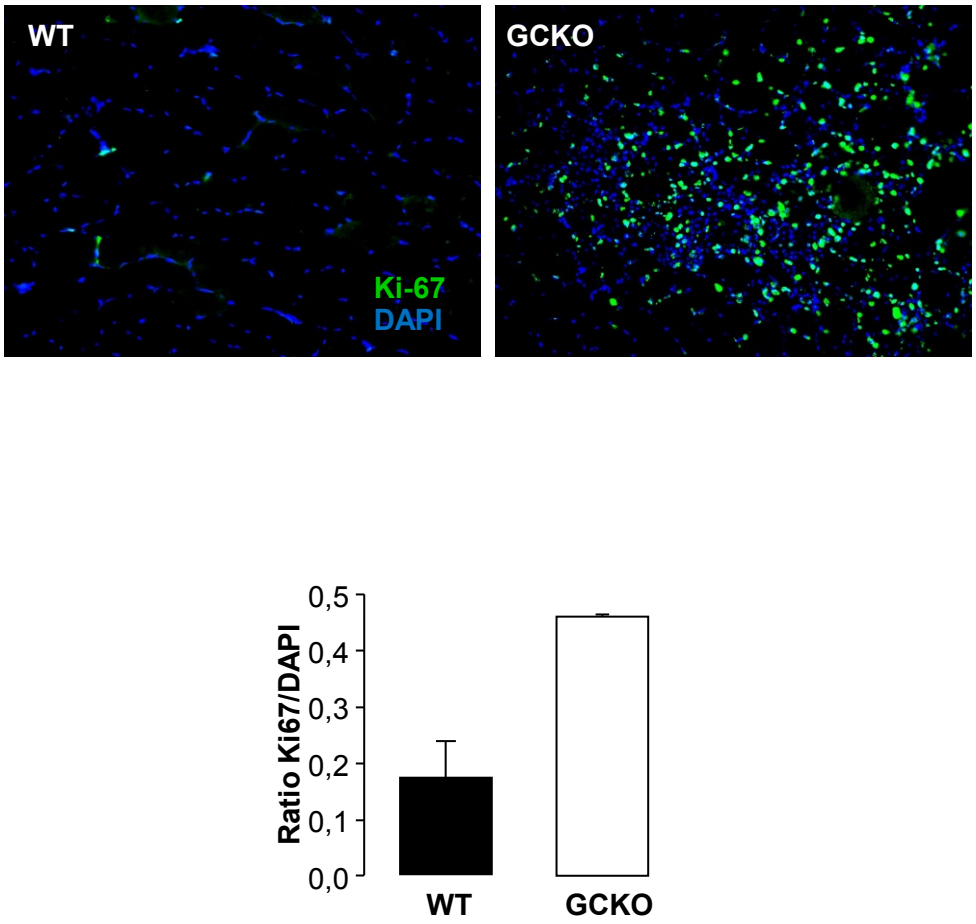


Abb. 23: Analyse der Zellproliferation im *Gastrocnemius*-Muskel
Die Zellproliferation wurde am Tag 2 nach der Operation im M. *Gastrocnemius* von WT- und GCKO-Tieren durch Färbung mit Anti-Ki-67 (grün) und DAPI (blau) untersucht. Die quantitative Analyse zeigt eine mehr als 2,5-fach erhöhte Proliferation im Muskel von GCKO-Tieren. Die gezeigten Daten entsprechen dem Mittelwert ± SEM von n = 3 pro Genotyp.

5. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Ausschalten der NO-GC, der Hauptrezeptor für NO, die VEGF-induzierte Angiogenese beeinflusst. GCKO-Tiere zeigten eine verlangsamte physiologische Gefäßbildung und eine verringerte Angiogenese in der Retina nach Hypoxie. Zusätzlich entwickelten diese Tiere eine massive Nekrose nach der Ligation der Femoralarterie, was auf eine Beteiligung der NO-GC an der Arteriogenese hindeutet. Diese Ergebnisse zeigen eindeutig, dass NO seine Wirkung auf die Angiogenese über die NO-GC vermittelt. Um den Zelltyp, der die NO-Effekte der Angiogenese und der Arteriogenese vermittelt, zu identifizieren, wurden zellspezifische Knockout-Mäuse für die NO-GC eingesetzt. Mit diesen Tieren wurden drei gut etablierte Versuche durchgeführt: der Aortenring-Assay, die Sauerstoff-induzierte Retinopathie und das Hinterlauf-Ischämie-Modell.

5.1. NO-vermittelte Angiogenese

Stickstoffmonoxid (NO) wird durch die konstitutiv exprimierten eNOS und nNOS sowie durch die induzierbare iNOS gebildet. NO induziert die Relaxation der vaskulären glatten Muskelzellen (Axelsson et al., 1979; Groneberg et al., 2010), inhibiert die Adhäsion und Aggregation von Thrombozyten (Walter et al., 1993; Moncada und Higgs, 1995), fungiert als Neurotransmitter und ist bei der synaptischen Plastizität beteiligt (Böhme et al., 1991; Schuman und Madison, 1991). Zusätzlich bewirkt NO die Relaxation der glatten Muskulatur des Gastrointestinal-Traktes und des penilen *Corpus cavernosum* (Hedlund et al., 2000; Groneberg et al., 2013). All diese Effekte sind NO-GC-abhängig und daher über cGMP und, sehr wahrscheinlich, die PKG vermittelt.
Es ist auch seit langem bekannt, dass NO bei vaskulären Remodellingprozessen, wie z.B. bei Angiogenese und Arteriogenese beteiligt ist (Ziche et al., 1994; Cooke, 2003). Zahlreiche Studien haben die Rolle von NO in diesen beiden Prozessen mittels *in vivo*- und *in vitro*-Versuchen beschrieben. Eine signifikante Verminderung der VEGF-induzierten Angiogenese und der vaskulären Permeabilität wurde bei eNOS-Knockout-Mäusen beobachtet (Fukumura et al. 2001). Im Kaninchenhornhaut-Modell der Angiogenese konnte gezeigt werden, dass L-NAME die VEGF-induzierte Angiogenese antagonisiert (Ziche et al., 1997). Auch die Anwendung von NO-Donoren wie z.B. Sodiumnitroprussid (SNP) oder Spermin-NONOate führte zu erhöhter Angiogeneseaktivität (Ziche et al., 1994; Majumder et al., 2014). Ob diese pro-angiogenetischen Effekte von NO über den NO/cGMP-Signalweg vermittelt werden, haben bislang nur wenige Studien untersucht. So konnte die Proliferation von Endothelzellen aus Rattenaorta, die keine NO-GC exprimieren, durch die Gabe von

NO stimuliert werden. Dies spricht für einen NO-GC/cGMP-unabhängigen Regulationsweg. Allerdings konnte nach Adenovirus-vermittelter Expression der NO-GC die Proliferation dieser Endothelzellen nach NO-Gabe stark erhöht werden, was wiederum für eine cGMP-Abhängigkeit spricht (Pyriochou et al., 2007). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass exogenes NO die NO/cGMP-vermittelte Angiogenese von cerebralen Endothelzellen der Maus erhöht, was wiederum durch ODQ (NO-GC-Inhibitor) vollständig inhibiert werden kann (Zhang et al., 2003). Die meisten dieser Studien basieren allerdings auf *in vitro*-Versuchen wie z.B der Kultur von Endothelzellen. *In vivo*-Studien sind bislang nur wenige durchgeführt worden. In PKG-I-Knockout-Mäusen ist die Angiogenese verlangsamt, in Tieren mit PKG-I-Überexpression hingegen verstärkt, was auf die wichtige Rolle der PKG hinweist (Yamahara et al., 2003). Eine weitere Studie zeigt, dass VEGF die Gefäßbildung in der avaskulären Hornhaut des Kaninchenauges induziert, und dass dieser Prozess durch den NO-GC-Inhibitor NS-2028 inhibiert wird (Morbidelli et al., 2010).

Versuche zu Beginn dieser Doktorarbeit mit isolierten Endothelzellen aus der Mauslunge führten jedoch zu keinem verwertbaren Ergebnis, da weder eine Protein-Expression der NO-GC noch eine NO-induzierte cGMP-Synthese in diesen Zellen nachgewiesen werden konnte. Generell ist bekannt, dass die NO-GC (wie auch die PKG-I) in kultivierten Zellen herunterreguliert wird, was aufgrund der antiproliferativen Rolle von cGMP verständlich ist (wie z.B in den in dieser Arbeit beschriebenen Aortenring-Assays). Damit waren also die oben beschriebenen Ergebnisse in cerebralen Endothelzellen aus Ratte bzw. Maus zunächst nicht mit Lungenendothelzellen der Maus reproduzierbar. Wahrscheinlich ist die Expression der NO-GC und damit eine NO-Wirkung über cGMP stark davon abhängig, aus welchem Organ und welcher Spezies die Endothelzellen stammen. Die in den oben zitierten Arbeiten beschriebenen Erkenntnisse über die Wirkung von NO auf die Angiogenese sollten daher nicht generell auf alle Organe und Spezies übertragen werden. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit die NO-GC global bzw. zellspezifisch ausgeschaltet, was eine zuverlässige Untersuchung der Rolle dieses Enzyms *in vitro* und, viel aussagekräftiger, *in vivo* ermöglicht.

5.2. NO-GC im Hinterlauf-Ischämie-Versuch

Der Hinterlauf-Ischämie-Versuch kann als Modell der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit (pAVK) benutzt werden. Die Ligation der Femoralarterie induziert sowohl Arteriogenese als auch Angiogenese, um eine ausreichende Reperfusion des Hinterlaufs zu gewährleisten. Abhängig vom Ort der Ligation der Femoralarterie bilden sich bereits angelegte Kollateralgefäße zu Arterien um. Um das vaskuläre Remodelling

zu untersuchen, wurde in der ursprünglichen Publikation die Femoralarterie distal der Verzweigung zu der *A. epigastrica* und der *A. profunda femoralis* ligiert, um den Blutfluss zu den Kollateralarterien umzuleiten. Jedoch kann in einigen Mäusestämmen (wie z.B. in unserem Fall der C57BL/6 Mausstamm) das Ausmaß der Ischämie, das durch dieses Verfahren induziert wird, unzureichend sein (Limbourg et al., 2009). Aus diesem Grund wurde die Ligation proximal der Bifurkation durchgeführt, um eine ausreichende Ischämie zu erzeugen. In einem vergleichbaren Versuch mit eNOS-Knockout-Mäusen wurde die Ligation ebenfalls proximal der Femoralarterie durchgeführt. Dabei kam es zu einer Reduzierung der Blutperfusion um 80% direkt nach der Operation, einem Wert, der mit unseren Daten vergleichbar ist (Yu et al., 2005).

Die in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse zeigen deutlich die Beteiligung der NO-GC an der Regulation der Blutreperfusion im Hinterlauf. Der gleiche Effekt wurde ebenfalls bei Ausschalten der eNOS beobachtet (Yu et al., 2005; MacLauchlan et al., 2011), was eine eNOS/NO-GC/cGMP-vermittelte Signaltransduktion suggeriert. In weiteren Experimenten konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die Inhibition der PDE 5 durch Sildenafil eine Steigerung der Hinterlauf-Durchblutung bewirkte (Senthilkumar et al., 2007). Damit kann diese Kaskade um die PDE 5 erweitert werden.

5.3. Nekrose

eNOS-Knockout-Tiere zeigten im Hinterlauf-Ischämie-Versuch eine starke Neigung zur Nekrose (Yu et al., 2005). Ein ähnliches Bild zeigte sich in dieser Arbeit mit den GCKO-Tieren. Dabei führte die Abwesenheit der NO-GC nach Ischämie zur Nekrose des Hinterlaufs. Auch bei den SMC-GCKO-Mäusen zeigte sich eine Nekrose des Hinterlaufs (allerdings nur bei zwei Tieren, an Tag 3 bzw. 14. nach der Operation). Das weist darauf hin, dass die NO-GC in den glatten Muskelzellen sehr wahrscheinlich einen Hauptteil der Reperfusion vermittelt, die ggf. eine Nekrose verhindert. Die restlichen SMC-GCKO-Mäuse zeigten eine verminderte Regeneration im Vergleich mit den Kontroll-Mäusen. Diese verminderte Regeneration könnte auf dem nachgewiesenen Defekt bei der Vasodilatation der SMC-GCKO-Tiere beruhen (Groneberg et al., 2010). Alternativ könnte eine erhöhte Angiogeneserate der Grund für diese Regeneration sein. Da aber die Nekrose des Hinterlaufs bei den GCKO-Tieren und zumindest bei einem SMC-GCKO-Tier innerhalb der ersten 4 Tage nach Operation auftrat, ist eine angiogenetische Wirkung unwahrscheinlich, sondern vielmehr auf eine fehlende Scherkraft-induzierte Vasodilatation zurückzuführen.

Die Dilatation der Blutgefäße ist der erste Schritt innerhalb der Arteriogenese um Kollateralgefäße zu rekrutieren. Zusätzlich zur Arteriogenese versucht das Gewebe,

durch die Bildung neuer Blutgefäße, die ischämischen Bereiche zu versorgen, was die hohe Zellproliferation im Hinterlauf der GCKO-Mäuse erklären könnte. Die schnelle Entwicklung von Nekrose nach 1 bis 3 Tagen trotz der hohen Proliferationsrate bei den GCKO-Mäusen zeigt, dass die Zellproliferation allein nicht in der Lage ist, die Blutreperfusion zu etablieren. Bei dieser Zellproliferation scheint die NO-GC in Endothelzellen keine Rolle zu haben. Die EC-GCKO-Mäuse zeigten keine Änderung an der Regeneration im Vergleich mit den EC-Kontroll-Tieren. Allerdings wäre es auch denkbar, dass die endotheliale NO-GC doch eine Rolle spielt, da das Ausschalten der NO-GC in den glatten Muskelzellen nur teilweise zu einer Nekrose führt, das globale Ausschalten jedoch zu einer totalen Nekrose.

Aufgrund der erhöhten Proliferation im Gastrocnemius-Muskel und basierend auf den Daten des Hinterlauf-Ischämie-Modells könnte eine wichtige Rolle der NO-GC bei der Induzierung der Kapillarbildung denkbar sein. Zusätzlich konnte durch diesen Versuch gezeigt werden, dass die Rolle von NO bei der Arteriogenese durch die glatten Muskelzellen, nicht aber durch die Endothelzellen vermittelt wird.

5.4. NO-GC in der Retina

Der Gefäßplexus in der Retina stellt ein gutes Modell dar, um innerhalb des OIR-Versuchs die physiologische wie auch die pathologische Angiogenese zu untersuchen. So dient der OIR-Versuch als Modell für verschiedene Krankheitsbilder, die mit Defekten der retinalen Gefäßbildung einhergehen, wie z.B. der diabetischen Retinopathie und der Frühgeborenen-Retinopathie. In den drei in dieser Arbeit eingesetzten Knockout-Linien war die initiale Bildung dieses Plexus nicht beeinflusst, da alle Tiere spätestens nach 12 Tagen eine vollständig vaskularisierte Retina besaßen. Allerdings zeigen die Retinae aus der GCKO-Mauslinie eine verlangsamte Plexus-Entwicklung (Abbildung 13). Körpergröße und -gewicht der GCKO-Mäuse sind allerdings geringer als in den WT-Mäusen. Das deutet darauf hin, dass die NO-GC eine wichtige Rolle bei generellen Wachstumsprozessen spielt. Eine geringfügig langsamere initiale Entwicklung des Retinaplexus muss daher nicht auf einer veränderten Angiogenese beruhen, sondern wird eher auf eine generelle Wachstumsretardierung zurückzuführen sein.

Im OIR-Versuch zeigte sich in Kontroll-Mäusen nach 5 Tagen bei 75 % Sauerstoff (P12) eine Gefäßobliteration im zentralen Teil der Retina. Venolen und Arteriolen blieben hingegen intakt und nur die kleineren Kapillaren wurden abgebaut (Claxton und Fruttiger, 2003). Der Abbau von Kapillaren wurde um den Bereich des *Nervus opticus* beobachtet, wo die Sauerstoff-Konzentration am größten ist (Scott und Fruttiger, 2010). In den GCKO-Mäusen war die Vaso-Obliteration gegenüber WT-Mäusen signifikant vermindert. Ein ähnliches Ergebnis wurde bei WT-Mäusen beobachtet, die mit einem

eNOS-Inhibitor (L-N^G-Nitroarginine; L-NNA) behandelt wurden (Brooks et al., 2001). In derselben Studie konnte gezeigt werden, dass die Retinae von eNOS-Knockout-Mäusen einen geringeren avaskulären Bereich als die Kontroll-Mäuse besaßen. Bei den eNOS-Mäusen wurde eine Reduzierung des avaskulären Bereichs um 46% beobachtet. Ein vergleichbarer Wert wurde in unserem Versuch mit den GCKO-Mäusen festgestellt (40%). Dieses Ergebnis zeigt, dass die Vaso-Obliteration bzw. der Schutz der Kapillargefäße den NO/cGMP-Signalweg einschließt. Die pathologische Vaso-Obliteration ist mit einer Herunterregulierung von VEGF assoziiert (Alon et al., 1995). Gleichzeitig ist die Dichte an Astrozyten in den avaskulären Bereichen vermindert (Bucher et al., 2013). Zusätzlich zu dem durch die hohe Sauerstoff-Konzentration verursachten oxidativen Stress sind die Leukozyten am Abbau der Blutgefäße beteiligt. Es konnte gezeigt werden, dass die Zahl an Leukozyten innerhalb von 6 Stunden nach Beginn der Hyperoxie ansteigt. Bindung der Leukozyten an Endothelzellen führt zur Initiierung des Fas-L (Fas-Ligand) Apoptose-Signalwegs (Ishida et al., 2003). In diesem Zusammenhang ist festzuhalten, dass cGMP in der Lage ist, Fas und Fas-L hochzuregulieren (Hayden et al., 2001). Damit könnte die Vaso-Obliteration in den GCKO-Mäusen auf eine fehlende Stimulation des Fas-L Apoptosewegs zurückzuführen sein.

Zusätzlich kam es in der Retina von GCKO-Mäusen infolge der Hyperoxie zur vermehrten Tuft-Bildung. Diese Tufts entsprechen einer pathologischen Angiogenese, die zu einer Fehlbildung von Blutgefäßen führt. Sie entstehen bei sehr hohen VEGF-Konzentrationen, die unter pathophysiologischen Situationen auftreten können (Adamis et al., 1994). Allerdings konnte ebenfalls gezeigt werden, dass in den eNOS-Knockout-Mäusen die Tuft-Formation im Vergleich mit WT-Mäusen vermindert war (Brooks et al., 2001). Dieser Fund widerspricht unseren Daten mit den GCKO-Mäusen. Jedoch zeigt eine aktuelle Studie, dass die Behandlung von Tieren mit Sildenafil zu einer 50%igen Reduzierung der Tufts führte (Fawzi et al., 2014). Sildenafil führt durch Inhibierung der PDE5 zur Akkumulation von cGMP in der Zelle. Dies weist auf eine inhibierende Wirkung von cGMP auf die Tuft-Formation hin. Somit entsprechen diese Ergebnisse den in dieser Arbeit erhobenen Befunden, da in den GCKO-Mäusen die NO-GC ausgeschaltet ist, was die Menge an cGMP in der Zelle vermindert.

Immunhistochemische Analysen der Tufts zeigten neben Endothelzellen die Anwesenheit von Perizyten. Die Tufts in der Retina von GCKO-Mäusen zeigten eine höhere Rekrutierung von Perizyten als in den WT-Mäusen. Diese Daten widersprechen ebenfalls einer pro-angiogenetischen Wirkung des NO/cGMP-Signalwegs, denn ein Fehlen dieses Signalwegs sollte die Rekrutierung vermindern. Ob der NO/cGMP-Signalweg in Perizyten pro- oder anti-proliferativ wirkt, ist bislang nicht bekannt. In

glatten Muskelzellen hingegen gibt es widersprüchliche Ergebnisse zu dieser Frage. Für eine antiproliferative Wirkung sprechen eine ganze Reihe von Studien: So führte die Deletion der eNOS zu einer höheren Proliferation von glatten Muskelzellen im Vergleich mit Kontroll-Mäusen (Moroi et al., 1998). In einer ähnlichen Studie wurde berichtet, dass NO die Neointima-Hyperplasie (die auf einer übermäßigen Proliferation der glatten Muskelzellen in der *Tunica intima* basiert), in Geschlecht- und Hormon-abhängiger Weise hemmen kann (Hogg et al., 2011). *In vitro* wurde gezeigt, dass NO-Donoren zur Inhibierung der Proliferation von glatten Muskelzellen aus Rattenaorta führten. Auch die Migration von diesen Zellen wurde *in vitro* durch das cGMP-Analogon 8-Br-cGMP gehemmt (Mooradian et al., 1995; Sarkar et al., 1996). Diese anti-proliferative Wirkung wurde jedoch auch generell hinsichtlich einer eher proliferativen Wirkung der PKG in Frage gestellt (Feil et al., 2005).

Der Unterschied zwischen den WT- und den GCKO-Mäusen hinsichtlich der physiologischen Angiogenese in der Retina, der Vaso-Obliteration sowie der Tuft-Formation könnte durch das Fehlen der NO-GC in den Perizyten erklärt werden. In den SMC-GCKO-Mäusen wurden ähnliche Effekte wie in den GCKO-Tieren beobachtet. Die NO-GC wurde bei dieser Knockout-Linie mithilfe des SMMHC-Promoters spezifisch in glatten Muskelzellen deletiert. Somit sollte eigentlich eine Wirkung durch Perizyten unwahrscheinlich sein. Allerdings zeigte ein vor kurzem veröffentlichter Bericht eine SMMHC-Promoter-vermittelte Deletion eines Ca^{2+}-aktivierten Chlorid-Kanals (TMEM 16) nicht nur in glatten Muskelzellen, sondern auch in Perizyten von Arteriolen (Heinze et al., 2014). Damit könnten die Ergebnisse des OIR-Versuchs nicht nur aufgrund der verminderten NO-GC-Expression in den glatten Muskelzellen, sondern auch aufgrund einer Reduzierung in Perizyten erklärt werden. Jedoch muss natürlich noch abgeklärt werden, ob es in Perizyten der Retinae in den SMC-GCKO-Tieren tatsächlich zu einer Deletion der NO-GC basierend auf der Aktivität der SMMHC-Promoter-gesteuerten Cre kommt.

Interessanterweise waren die Daten in SMC-GCKO-Tieren nicht identisch mit denen aus GCKO-Tieren, denn hier war die Vaso-Obliteration gegenüber GCKO-Tieren reduziert. Dabei ist zu berücksichtigen, dass die NO-GC-Expression in den SMC-GCKO-Tieren nicht komplett, sondern nur partiell erfolgte. Da die Tiere im OIR-Versuch nach 12 bzw. 17 Tagen untersucht wurden, kann nicht von einem vollständigen Rückgang der NO-GC ausgegangen werden; dieser konnte von unserer Arbeitsgruppe erst 50 Tage nach Tamoxifengabe gezeigt werden. Eine Wirkung von Tamoxifen, welches in diesem Fall nach Injektion des Muttertieres über die Milch an die Jungtiere weitergegeben wurde, konnte aber mithilfe der Aortenringrelaxation und der Expression der NO-GC in der Lunge nachgewiesen werden.

5.5. NO-GC in Perizyten

Ein sehr inspirierendes Ergebnis dieser Studie ist die Expression der NO-GC in retinalen Perizyten der Maus. Die Rolle des Enzyms in diesem Zelltyp ist bisher unbekannt. Hierzu existieren bislang auch sehr wenige Studien. *In vitro*-Untersuchungen mit humanen mikrovaskulären Endothelzellen (HMEC) zeigten, dass Perizyten über die Regulation der eNOS-Expression die Proliferation von Endothelzellen inhibieren und die Vasokonstriktion fördern (Martin et al., 2000). Eine weitere Studie zeigte, dass Perizyten die Migration, Proliferation, Permeabilität und NO-Produktion von Endothelzellen hemmen können (Majumder et al., 2007). Perizyten sind mikrovaskuläre Zellen, die der Außenwand von Kapillaren, präkapillären Arteriolen und postkapillären Venolen aller Gewebe anliegen. Sie sind dafür bekannt, chemisch und physikalisch mit Endothelzellen zu interagieren und bei der Stabilisierung und der Reifung von Blutgefäßen beteiligt zu sein (Armulik et al., 2005). Darüber hinaus sind Perizyten als multipotente Zellen in der Lage, sich in verschiedene murale Zelltypen zu differenzieren, wie z.B. glatte Muskelzellen, Myofibroblasten oder Endothelzellen, allerdings auch in Adipozyten, Osteoblasten oder Makrophagen (Lin und Lue, 2013). Basierend auf ihrer Plastizität spielen Perizyten sehr wahrscheinlich eine fundamentale Rolle im Gefäßumbau. Daher könnte den Perizyten und Perizyten-regulierten Prozessen eine klinische Bedeutung zukommen. Veränderte Perizyten-Endothelzell-Interaktionen sind bei verschiedenen Krankheiten wie diabetischer Retinopathie, Fibrose oder Tumorwachstum nachgewiesen (Geevarghese und Herman, 2014). Es wurde gezeigt, dass ein Verlust von Perizyten zu einer Induktion von Retinopathien in Mensch und Tier führt (Hammes et al., 2002; Gariano und Gardner, 2005). Die intravitreale Injektion von Perizyten aus adipösen Stammzellen konnte gegen retinale Vaskulopathie schützen (Mendel et al., 2013). Erst kürzlich wurde vorgeschlagen, die Heilung nach einer akuten Ischämie mittels Transplantation von menschlichen Perizyten zu induzieren bzw. zu unterstützen (Katare und Madeddu, 2013). Somit sind Perizyten ein vielversprechendes Ziel für die kardiovaskuläre regenerative Medizin (Crisan et al., 2012). Die Tatsache, dass NO-GC in retinalen Perizyten exprimiert wird in Kombination mit der Entdeckung von neu entwickelten NO-GC-aktivierenden Substanzen (Stasch und Evgenov, 2013) machen diesen Zelltyp zu einem sehr attraktiven Ziel für die Modulation der Gefäßentwicklung bei Krankheiten, die mit einer gestörten Arteriogenese oder Angiogenese einhergehen.

6. Zusammenfassung

Stickstoffmonoxid (NO) spielt eine wichtige Rolle bei Gefäßremodelling-Prozessen wie Angiogenese und Arteriogenese. Die NO-Synthese im Gefäßsystem wird hauptsächlich durch die endotheliale NO-Synthase (eNOS) gewährleistet. Sie kann durch verschiedene Faktoren wie Scherkräfte und Zytokine wie der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF) reguliert werden. VEGF ist ein wichtiger Stimulator der Angiogenese und wird während dieses Prozesses hochreguliert. Die meisten physiologischen Effekte von NO werden durch die NO-sensitive Guanylyl-Cyclase (NO-GC) vermittelt. Als Hauptrezeptor für NO produziert die NO-GC den sekundären Botenstoff cyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) und führt dadurch zur Stimulation der verschiedenen Effektoren wie z.B. der PKG. Ob die Wirkung von NO in Angiogenese und Arteriogenese ebenfalls durch NO-GC vermittelt wird, war bis zum Beginn dieser Arbeit noch unklar.

Die NO-GC besteht aus zwei Untereinheiten (α und ß). Die Deletion der $ß_1$-Untereinheit in Mäusen resultiert in einer vollständigen Knockout Maus (GCKO). Mithilfe des Cre-LoxP-Systems wurden zusätzlich zellspezifische Knockout-Mäuse für glatte Muskelzellen (SMC-GCKO) und Endothelzellen (EC-GCKO) generiert. Um die Rolle der NO-GC in der Angiogenese und Arteriogenese zu untersuchen, wurden drei gut etablierte Methoden benutzt.

Im ersten Teil des Projekts sollte die Expression der NO-GC in Endothelzellen untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde die reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) benutzt. Die Ergebnisse zeigen, dass die NO-GC in Endothelzellen der Lunge nur äußerst gering wenig exprimiert ist. Durch den Aortenring-Assay wurde eine Rolle der NO-GC bei der VEGF-vermittelten Angiogenese festgestellt. Dabei zeigte sich eine stärkere Angiogeneserate bei globaler Abwesenheit der NO-GC. Bei Fehlen der NO-GC ausschließlich in Endothelzellen zeigte sich kein Unterschied in den aussprossenden Aorten im Vergleich zu den Kontroll-Tieren. Dies zeigt, dass die NO-GC in Endothelzellen sehr wahrscheinlich keine Rolle bei der VEGF-vermittelten Angiogenese spielt.

Im zweiten Teil wurde die Rolle der NO-GC bei der Angiogenese in einem *in vivo*-Modell untersucht. In dem Modell der Sauerstoff-induzierten-Retinopathie zeigten die GCKO-Mäuse eine verringerte Vaso-Obliteration, eine verlangsamte Angiogenese und eine erhöhte Tuft-Bildung. Ähnliche Ergebnisse wurden bei den SMC-GCKO-Tieren beobachtet. EC-GCKO-Mäuse zeigten eine gegenüber den Kontroll-Tieren

unveränderte Vaso-Obliteration, Angiogeneserate und Tuft-Bildung. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die NO-GC in Endothelzellen keine Rolle spielt. Immunfluoreszenz-Aufnahmen zeigten die Expression von NO-GC in Perizyten der Gefäßkapillaren der Mausretina. Daher könnte die NO-GC in diesem Zelltyp letztendlich für die Effekte bei den GCKO- und SMC-GCKO-Tieren verantwortlich sein.

Im letzten Teil dieser Arbeit wurde eine Versuchsreihe unter Anwendung des Hinterlauf-Ischämie-Modells durchgeführt. Hierbei entwickelten die Pfoten aller GCKO- und teilweise der SMC-GCKO-Tiere nach der Ligation der Femoralarterie eine Nekrose. Die Regeneration der Hinterläufe der EC-GCKO-Tiere nach der Operation verlief normal. Diese Ergebnisse schließen eine bedeutende Rolle der NO-GC in Endothelzellen aus, zeigen allerdings, dass die NO-GC in den glatten Muskelzellen essentiell für den Arteriogenese-Prozess ist.

Zusammengefasst führt die Deletion der NO-GC in glatten Muskelzellen und wahrscheinlich auch in Perizyten zur einer verlangsamten Angiogenese und Inhibierung der Arteriogenese.

7. Summary

Nitric oxide (NO) plays an important role in vascular remodelling processes such as angiogenesis and arteriogenesis. The synthesis of NO in the vascular system is ensured mainly by endothelial NO synthase (eNOS). It can be regulated by a number of factors, such as shear stress and cytokines like the vascular endothelial growth factor (VEGF). VEGF is an important stimulator of angiogenesis and is upregulated during this process. Most of the physiological effects of NO are mediated by the NO-sensitive guanylyl cyclase (NO-GC). As the main receptor for NO, NO-GC produces the second messenger cyclic guanosine monophosphate (cGMP) and thereby leads to a variety of physiological effects. However, whether the effects of NO in angiogenesis and arteriogenesis are also mediated by NO-GC is still unclear.

NO-GC consists of two subunits (α and ß). The deletion of the $ß_1$ subunit in mice results in a global knockout mouse (GCKO). Using the Cre-LoxP system we also generated smooth muscle cell-specific (SMC GCKO) and endothelial cell-specific knockout mice (EC GCKO). To investigate the role of NO-GC in angiogenesis and arteriogenesis, three well-established methods have been used.

In the first part of the project, the expression of the NO-GC in endothelial cells should be investigated. By using the reverse transcription polymerase chain reaction method

(RT-PCR), the results show a very weak expression of the NO-GC in endothelial cells of the lung. A role for NO-GC in the VEGF-mediated angiogenesis was ascertained by the aortic ring assay. The results show an increased angiogenesis in the global absence of NO-GC. However, the EC-GCKO shows no difference compared to control mice. This indicates that NO-GC in endothelial cells is unlikely to play a major role in VEGF-mediated angiogenesis.

In the second part of the project, the role of NO-GC in angiogenesis was investigated in an *in vivo* model. In the oxygen induced-retinopathy model (OIR), GCKO mice showed reduced vaso-obliteration, slowed angiogenesis and increased tuft formation. Similar results were observed in the SMC-GCKO animals. In contrast, EC-GCKO mice showed vaso-obliteration as well as angiogenesis rate and tuft formation similar to those seen in control animals. The results of this experiment suggest that NO-GC in endothelial cells is not involved in vaso-obliteration, physiological angiogenesis and tuft formation. Immunhistochemical analyses showed the expression of NO-GC in pericytes of the vascular capillaries of the mouse retina. Therefore, NO-GC in this cell type could be responsible for the effects in GCKO- and SMC-GCKO animals.

In the last part of this thesis, hindlimb-ischemia experiments were performed. For this purpose, the paws of all GCKO- and some SMC-GCKO animals showed necrosis after ligation of the femoral artery. The regeneration of legs from EC-GCKO animals after the operation was normal. These results exclude a major role of NO-GC in endothelial cells, but show that NO-GC in smooth muscle cells is essential in the arteriogenesis process.

In summary, the deletion of NO-GC in smooth muscle cells and probably also in pericytes leads to a slowed angiogenesis and inhibits arteriogenesis.

8. Literaturverzeichnis

Aaij, C., und Borst, P. (1972). The gel electrophoresis of DNA. *Biochimica Et Biophysica Acta*, *269*(2), 192–200.

Adamis, A. P., Miller, J. W., Bernal, M. T., D'Amico, D. J., Folkman, J., Yeo, T. K., und Yeo, K. T. (1994). Increased vascular endothelial growth factor levels in the vitreous of eyes with proliferative diabetic retinopathy. *American Journal of Ophthalmology*, *118*(4), 445–450.

Alioua, A., Tanaka, Y., Wallner, M., Hofmann, F., Ruth, P., Meera, P., und Toro, L. (1998). The large conductance, voltage-dependent, and calcium-sensitive K+ channel, Hslo, is a target of cGMP-dependent protein kinase phosphorylation in vivo. *The Journal of Biological Chemistry*, *273*(49), 32950–32956.

Alon, T., Hemo, I., Itin, A., Pe'er, J., Stone, J., und Keshet, E. (1995). Vascular endothelial growth factor acts as a survival factor for newly formed retinal vessels and has implications for retinopathy of prematurity. *Nature Medicine*, *1*(10), 1024–1028.

Ammendola, A., Geiselhöringer, A., Hofmann, F., und Schlossmann, J. (2001). Molecular determinants of the interaction between the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-associated cGMP kinase substrate (IRAG) and cGMP kinase Ibeta. *The Journal of Biological Chemistry*, *276*(26), 24153–24159.

Armulik, A., Abramsson, A., und Betsholtz, C. (2005). Endothelial/Pericyte Interactions. *Circulation Research*, *97*(6), 512–523.

Artemyev, N. O., Arshavsky, V. Y., und Cote, R. H. (1998). Photoreceptor phosphodiesterase: interaction of inhibitory gamma subunit and cyclic GMP with specific binding sites on catalytic subunits. *Methods (San Diego, Calif.)*, *14*(1), 93–104.

Ashman, D. F., Lipton, R., Melicow, M. M., und Price, T.D. (1963). Isolation of adenosine 3', 5'-monophosphate and guanosine 3', 5'-monophosphate from rat urine. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *11*, 330–334.

Atkinson, R. A., Saudek, V., Huggins, J. P., und Pelton, J. T. (1991). 1H NMR and circular dichroism studies of the N-terminal domain of cyclic GMP dependent protein kinase: a leucine/isoleucine zipper. *Biochemistry*, *30*(39), 9387–9395.

Axelsson, K. L., Wikberg, J. E., und Andersson, R. G. (1979). Relationship between nitroglycerin, cyclic GMP and relaxation of vascular smooth muscle. *Life Sciences*, *24*(19), 1779–1786.

Baker, M., Robinson, S. D., Lechertier, T., Barber, P. R., Tavora, B., D'Amico, G., … Hodivala-Dilke, K. (2012). Use of the mouse aortic ring assay to study angiogenesis. *Nature Protocols*, *7*(1), 89–104.

Banumathi, E., O'Connor, A., Gurunathan, S., Simpson, D. A., McGeown, J. G., und Curtis, T. M. (2011). VEGF-induced retinal angiogenic signaling is critically dependent on Ca^{2+} signaling by Ca^{2+}/calmodulin-dependent protein kinase II. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *52*(6), 3103–3111.

Bender, A. T., und Beavo, J. A. (2006). Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use. *Pharmacological Reviews*, *58*(3), 488–520.

Biel, M., Zong, X., Distler, M., Bosse, E., Klugbauer, N., Murakami, M., … Hofmann, F. (1994). Another member of the cyclic nucleotide-gated channel family, expressed in testis, kidney, and heart. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *91*(9), 3505–3509.

Biel, M., Zong, X., Ludwig, A., Sautter, A., und Hofmann, F. (1999). Structure and function of cyclic nucleotide-gated channels. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, *135*, 151–171.

Birschmann, I., und Walter, U. (2004). Physiology and pathophysiology of vascular signaling controlled by guanosine 3',5'-cyclic monophosphate-dependent protein kinase. *Acta Biochimica Polonica*, *51*(2), 397–404.

Böhme, E., Graf, H., und Schultz, G. (1978). Effects of sodium nitroprusside and other smooth muscle relaxants on cyclic GMP formation in smooth muscle and platelets. *Advances in Cyclic Nucleotide Research*, *9*, 131–143.

Böhme, G. A., Bon, C., Stutzmann, J. M., Doble, A., und Blanchard, J. C. (1991). Possible involvement of nitric oxide in long-term potentiation. *European Journal of Pharmacology*, *199*(3), 379–381.

Boolell, M., Allen, M. J., Ballard, S. A., Gepi-Attee, S., Muirhead, G. J., Naylor, A. M., … Gingell, C. (1996). Sildenafil: an orally active type 5 cyclic GMP-specific phosphodiesterase inhibitor for the treatment of penile erectile dysfunction. *International Journal of Impotence Research*, *8*(2), 47–52.

Bouloumié, A., Schini-Kerth, V. B., und Busse, R. (1999). Vascular endothelial growth factor up-regulates nitric oxide synthase expression in endothelial cells. *Cardiovascular Research*, *41*(3), 773–780.

Bredt, D. S., und Snyder, S. H. (1990). Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *87*(2), 682–685.

Brooks, S. E., Gu, X., Samuel, S., Marcus, D. M., Bartoli, M., Huang, P. L., und Caldwell, R. B. (2001). Reduced severity of oxygen-induced retinopathy in eNOS-deficient mice. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *42*(1), 222–228.

Bucher, F., Stahl, A., Agostini, H. T., und Martin, G. (2013). Hyperoxia causes reduced density of retinal astrocytes in the central avascular zone in the mouse model of oxygen-induced retinopathy. *Molecular and Cellular Neurosciences*, *56*, 225–233.

Burette, A., Zabel, U., Weinberg, R. J., Schmidt, H. H. H. W., und Valtschanoff, J. G. (2002). Synaptic localization of nitric oxide synthase and soluble guanylyl cyclase in the hippocampus. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *22*(20), 8961–8970.

Burnett, A. L. (2005). Phosphodiesterase 5 mechanisms and therapeutic applications. *The American Journal of Cardiology*, *96*(12B), 29M–31M.

Busse, R., und Fleming, I. (1998). Pulsatile stretch and shear stress: physical stimuli determining the production of endothelium-derived relaxing factors. *Journal of Vascular Research*, *35*(2), 73–84.

Cai, W.-J., Kocsis, E., Luo, X., Schaper, W., und Schaper, J. (2004). Expression of endothelial nitric oxide synthase in the vascular wall during arteriogenesis. *Molecular and Cellular Biochemistry*, *264*(1-2), 193–200.

Cai, W., Vosschulte, R., Afsah-Hedjri, A., Koltai, S., Kocsis, E., Scholz, D., … Schaper, J. (2000). Altered balance between extracellular proteolysis and antiproteolysis is associated with adaptive coronary arteriogenesis. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, *32*(6), 997–1011.

Capecchi, M. R. (1989). The new mouse genetics: altering the genome by gene targeting. *Trends in Genetics: TIG*, *5*(3), 70–76.

Carmeliet, P., Dor, Y., Herbert, J. M., Fukumura, D., Brusselmans, K., Dewerchin, M., … Keshet, E. (1998). Role of HIF-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature*, *394*(6692), 485–490.

Carmeliet, P., Ferreira, V., Breier, G., Pollefeyt, S., Kieckens, L., Gertsenstein, M., … Nagy, A. (1996). Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature*, *380*(6573), 435–439.

Carmeliet, P., Moons, L., Luttun, A., Vincenti, V., Compernolle, V., De Mol, M., … Persico, M. G. (2001). Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nature Medicine*, *7*(5), 575–583.

Casteel, D. E., Smith-Nguyen, E. V., Sankaran, B., Roh, S. H., Pilz, R. B., und Kim, C. (2010). A Crystal Structure of the Cyclic GMP-dependent Protein Kinase Iβ Dimerization/Docking Domain Reveals Molecular Details of Isoform-specific Anchoring. *Journal of Biological Chemistry*, *285*(43), 32684–32688.

Cébe Suarez, S., Pieren, M., Cariolato, L., Arn, S., Hoffmann, U., Bogucki, A., … Ballmer-Hofer, K. (2006). A VEGF-A splice variant defective for heparan sulfate and neuropilin-1 binding shows attenuated signaling through VEGFR-2. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, *63*(17), 2067–2077.

Chen, L., Daum, G., Chitaley, K., Coats, S. A., Bowen-Pope, D. F., Eigenthaler, M., … Clowes, A. W. (2004). Vasodilator-stimulated phosphoprotein regulates proliferation and growth inhibition by nitric oxide in vascular smooth muscle cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *24*(8), 1403–1408.

Chin, K., Kurashima, Y., Ogura, T., Tajiri, H., Yoshida, S., und Esumi, H. (1997). Induction of vascular endothelial growth factor by nitric oxide in human glioblastoma and hepatocellular carcinoma cells. *Oncogene*, *15*(4), 437–442.

Chinwalla, A., T., Waterston, R. H., Lindblad-Toh, K., Birney, E., Rogers, J., Abril, J. F., … Lander, E. S. (2002). Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature*, *420*(6915), 520–562.

Claxton, S., und Fruttiger, M. (2003). Role of arteries in oxygen induced vaso-obliteration. *Experimental Eye Research*, *77*(3), 305–311.

Connolly, S. E., Hores, T. A., Smith, L. E., und D'Amore, P. A. (1988). Characterization of vascular development in the mouse retina. *Microvascular Research*, *36*(3), 275–290.

Cooke, J. P. (2003). NO and angiogenesis. *Atherosclerosis. Supplements*, *4*(4), 53–60.

Corbin, J. D., und Francis, S. H. (1999). Cyclic GMP phosphodiesterase-5: target of sildenafil. *The Journal of Biological Chemistry*, *274*(20), 13729–13732.

Corbin, J. D., Turko, I. V., Beasley, A., und Francis, S. H. (2000). Phosphorylation of phosphodiesterase-5 by cyclic nucleotide-dependent protein kinase alters its catalytic and allosteric cGMP-binding activities. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, *267*(9), 2760–2767.

Crisan, M., Corselli, M., Chen, W. C. W., und Péault, B. (2012). Perivascular cells for regenerative medicine. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, *16*(12), 2851–2860.

Dai, X., und Faber, J. E. (2010). Endothelial nitric oxide synthase deficiency causes collateral vessel rarefaction and impairs activation of a cell cycle gene network during arteriogenesis. *Circulation Research*, *106*(12), 1870–1881.

Dangel, O., Mergia, E., Karlisch, K., Groneberg, D., Koesling, D., und Friebe, A. (2010). Nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase is the only nitric oxide receptor mediating platelet inhibition. *Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH*, *8*(6), 1343–1352.

Diamond, J. (1978). Role of cyclic nucleotides in control of smooth muscle contraction. *Advances in Cyclic Nucleotide Research*, *9*, 327–340.

Dimmeler, S., Assmus, B., Hermann, C., Haendeler, J., und Zeiher, A. M. (1998). Fluid shear stress stimulates phosphorylation of Akt in human endothelial cells: involvement in suppression of apoptosis. *Circulation Research*, *83*(3), 334–341.

Dimmeler, S., Fleming, I., Fisslthaler, B., Hermann, C., Busse, R., und Zeiher, A. M. (1999). Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature*, *399*(6736), 601–605.

Distler, M., Biel, M., Flockerzi, V., und Hofmann, F. (1994). Expression of cyclic nucleotide-gated cation channels in non-sensory tissues and cells. *Neuropharmacology*, *33*(11), 1275–1282.

Djonov, V., und Makanya, A. N. (2005). New insights into intussusceptive angiogenesis. *EXS*, (94), 17–33.

Dumont, D. J., Fong, G. H., Puri, M. C., Gradwohl, G., Alitalo, K., und Breitman, M. L. (1995). Vascularization of the mouse embryo: a study of flk-1, tek, tie, and vascular endothelial growth factor expression during development. *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists*, *203*(1), 80–92.

Dvorak, H. F., Brown, L. F., Detmar, M., und Dvorak, A. M. (1995). Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *The American Journal of Pathology*, *146*(5), 1029–1039.

Eigenthaler, M., Lohmann, S. M., Walter, U., und Pilz, R. B. (1999). Signal transduction by cGMP-dependent protein kinases and their emerging roles in the regulation of cell adhesion and gene expression. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, *135*, 173–209.

Eitenmüller, I., Volger, O., Kluge, A., Troidl, K., Barancik, M., Cai, W.-J., … Schaper, W. (2006). The range of adaptation by collateral vessels after femoral artery occlusion. *Circulation Research*, *99*(6), 656–662.

Fawzi, A. A., Chou, J. C., Kim, G. A., Rollins, S. D., Taylor, J. M., und Farrow, K. N. (2014). Sildenafil attenuates vaso-obliteration and neovascularization in a mouse model of retinopathy of prematurity. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *55*(3), 1493–1501.

Feil, R., Feil, S., und Hofmann, F. (2005). A heretical view on the role of NO and cGMP in vascular proliferative diseases. *Trends in Molecular Medicine*, *11*(2), 71–75.

Fesenko, E. E., Kolesnikov, S. S., und Lyubarsky, A. L. (1985). Induction by cyclic GMP of cationic conductance in plasma membrane of retinal rod outer segment. *Nature*, *313*(6000), 310–313.

Fleming, I., und Busse, R. (2003). Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, *284*(1), R1–12.

Fleming, I., Fisslthaler, B., Dimmeler, S., Kemp, B. E., und Busse, R. (2001). Phosphorylation of Thr(495) regulates Ca(2+)/calmodulin-dependent endothelial nitric oxide synthase activity. *Circulation Research*, *88*(11), E68–75.

Förstermann, U., Closs, E. I., Pollock, J. S., Nakane, M., Schwarz, P., Gath, I., und Kleinert, H. (1994). Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension*, *23*(6 Pt 2), 1121–1131.

Friebe, A., und Koesling, D. (2003). Regulation of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. *Circulation Research*, *93*(2), 96–105.

Friebe, A., Mergia, E., Dangel, O., Lange, A., und Koesling, D. (2007). Fatal gastrointestinal obstruction and hypertension in mice lacking nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(18), 7699–7704.

Fukumura, D., Gohongi, T., Kadambi, A., Izumi, Y., Ang, J., Yun, C. O., … Jain, R. K. (2001). Predominant role of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis and vascular permeability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *98*(5), 2604–2609.

Fulton, D., Gratton, J. P., McCabe, T. J., Fontana, J., Fujio, Y., Walsh, K., … Sessa, W. C. (1999). Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature*, *399*(6736), 597–601.

Fung, E., und Helisch, A. (2012). Macrophages in Collateral Arteriogenesis. *Frontiers in Physiology*, *3*.

Furchgott, R. F., und Zawadzki, J. V. (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, *288*(5789), 373–376.

Gariano, R. F., und Gardner, T. W. (2005). Retinal angiogenesis in development and disease. *Nature*, *438*(7070), 960–966.

Geevarghese, A., und Herman, I. M. (2014). Pericyte-endothelial crosstalk: implications and opportunities for advanced cellular therapies. *Translational Research: The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, *163*(4), 296–306.

Gerber, H. P., McMurtrey, A., Kowalski, J., Yan, M., Keyt, B. A., Dixit, V., und Ferrara, N. (1998). Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *The Journal of Biological Chemistry*, *273*(46), 30336–30343.

Gerhardt, H., Golding, M., Fruttiger, M., Ruhrberg, C., Lundkvist, A., Abramsson, A., … Betsholtz, C. (2003). VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *The Journal of Cell Biology*, *161*(6), 1163–1177.

Gerzer, R., Böhme, E., Hofmann, F., und Schultz, G. (1981). Soluble guanylate cyclase purified from bovine lung contains heme and copper. *FEBS Letters*, *132*(1), 71–74.

Ghofrani, H. A., Wiedemann, R., Rose, F., Schermuly, R. T., Olschewski, H., Weissmann, N., … Grimminger, F. (2002). Sildenafil for treatment of lung fibrosis and pulmonary hypertension: a randomised controlled trial. *Lancet*, *360*(9337), 895–900.

Gibb, B. J., und Garthwaite, J. (2001). Subunits of the nitric oxide receptor, soluble guanylyl cyclase, expressed in rat brain. *The European Journal of Neuroscience*, *13*(3), 539–544.

Goldberg, M. A., und Schneider, T. J. (1994). Similarities between the oxygen-sensing mechanisms regulating the expression of vascular endothelial growth factor and erythropoietin. *Journal of Biological Chemistry*, *269*(6), 4355–4359.

Golin-Bisello, F., Bradbury, N., und Ameen, N. (2005). STa and cGMP stimulate CFTR translocation to the surface of villus enterocytes in rat jejunum and is regulated by protein kinase G. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, *289*(3), C708–716.

Groneberg, D., König, P., Wirth, A., Offermanns, S., Koesling, D., und Friebe, A. (2010). Smooth muscle-specific deletion of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase is sufficient to induce hypertension in mice. *Circulation*, *121*(3), 401–409.

Groneberg, D., Lies, B., Konig, P., Jager, R., und Friebe, A. (2013). Preserved fertility despite erectile dysfunction in mice lacking the nitric oxide receptor. *The Journal of Physiology*, *591*(Pt 2), 491–502.

Gross, S. S., Stuehr, D. J., Aisaka, K., Jaffe, E. A., Levi, R., und Griffith, O. W. (1990). Macrophage and endothelial cell nitric oxide synthesis: cell-type selective inhibition by NG-aminoarginine, NG-nitroarginine and NG-methylarginine. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *170*(1), 96–103.

Gyurko, R., Kuhlencordt, P., Fishman, M. C., und Huang, P. L. (2000). Modulation of mouse cardiac function in vivo by eNOS and ANP. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, *278*(3), H971–981.

Gyurko, R., Leupen, S., und Huang, P. L. (2002). Deletion of exon 6 of the neuronal nitric oxide synthase gene in mice results in hypogonadism and infertility. *Endocrinology*, *143*(7), 2767–2774.

Haghikia, A., Mergia, E., Friebe, A., Eysel, U. T., Koesling, D., und Mittmann, T. (2007). Long-term potentiation in the visual cortex requires both nitric oxide receptor guanylyl cyclases. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *27*(4), 818–823.

Hamilton, W. J. (MD), Boyd, J. D. (MD), und Mossman, H. W. (1962). *Human Embryology (Prenatal Development of Form and Function)* (Third Edition.). The Williams & Wilkins Co.

Hammes, H.-P., Lin, J., Renner, O., Shani, M., Lundqvist, A., Betsholtz, C., … Deutsch, U. (2002). Pericytes and the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Diabetes*, *51*(10), 3107–3112.

Hardman, J. G., und Sutherland, E. W. (1969). Guanyl cyclase, an enzyme catalyzing the formation of guanosine 3',5'-monophosphate from guanosine trihosphate. *The Journal of Biological Chemistry*, *244*(23), 6363–6370.

Harteneck, C., Wedel, B., Koesling, D., Malkewitz, J., Böhme, E., und Schultz, G. (1991). Molecular cloning and expression of a new alpha-subunit of soluble guanylyl cyclase. Interchangeability of the alpha-subunits of the enzyme. *FEBS Letters*, *292*(1-2), 217–222.

Hayden, M. A., Lange, P. A., und Nakayama, D. K. (2001). Nitric oxide and cyclic guanosine monophosphate stimulate apoptosis via activation of the Fas-FasL pathway. *The Journal of Surgical Research*, *101*(2), 183–189.

Hedlund, P., Aszodi, A., Pfeifer, A., Alm, P., Hofmann, F., Ahmad, M., … Andersson, K.-E. (2000). Erectile dysfunction in cyclic GMP-dependent kinase I-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *97*(5), 2349–2354.

Heil, M., Eitenmüller, I., Schmitz-Rixen, T., und Schaper, W. (2006). Arteriogenesis versus angiogenesis: similarities and differences. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, *10*(1), 45–55.

Heinze, C., Seniuk, A., Sokolov, M. V., Huebner, A. K., Klementowicz, A. E., Szijártó, I. A., … Hübner, C. A. (2014). Disruption of vascular Ca^{2+}-activated chloride currents lowers blood pressure. *The Journal of Clinical Investigation*, *124*(2), 675–686.

Hevel, J. M., White, K. A., und Marletta, M. A. (1991). Purification of the inducible murine macrophage nitric oxide synthase. Identification as a flavoprotein. *The Journal of Biological Chemistry*, *266*(34), 22789–22791.

Hoefer, I. E., van Royen, N., Rectenwald, J. E., Deindl, E., Hua, J., Jost, M., … Buschmann, I. R. (2004). Arteriogenesis proceeds via ICAM-1/Mac-1- mediated mechanisms. *Circulation Research*, *94*(9), 1179–1185.

Hofmann, F., Feil, R., Kleppisch, T., und Schlossmann, J. (2006). Function of cGMP-dependent protein kinases as revealed by gene deletion. *Physiological Reviews*, *86*(1), 1–23.

Hogg, M. E., Varu, V. N., Vavra, A. K., Popowich, D. A., Banerjee, M. N., Martinez, J., … Kibbe, M. R. (2011). Effect of nitric oxide on neointimal hyperplasia based on sex and hormone status. *Free Radical Biology & Medicine*, *50*(9), 1065–1074.

Hood, J. D., Meininger, C. J., Ziche, M., und Granger, H. J. (1998). VEGF upregulates ecNOS message, protein, and NO production in human endothelial cells. *The American Journal of Physiology*, *274*(3 Pt 2), H1054–1058.

Houdebine, L.-M. (2007). Transgenic animal models in biomedical research. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *360*, 163–202.

Huang, L. E., Willmore, W. G., Gu, J., Goldberg, M. A., und Bunn, H. F. (1999). Inhibition of hypoxia-inducible factor 1 activation by carbon monoxide and nitric oxide. Implications for oxygen sensing and signaling. *The Journal of Biological Chemistry*, *274*(13), 9038–9044.

Huang, P. L. (2000). Mouse models of nitric oxide synthase deficiency. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, *11 Suppl 16*, S120–123.

Huang, P. L., Dawson, T. M., Bredt, D. S., Snyder, S. H., und Fishman, M. C. (1993). Targeted disruption of the neuronal nitric oxide synthase gene. *Cell*, *75*(7), 1273–1286.

Huang, P. L., Huang, Z., Mashimo, H., Bloch, K. D., Moskowitz, M. A., Bevan, J. A., und Fishman, M. C. (1995). Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Nature*, *377*(6546), 239–242.

Huppert, P., Tacke, J., Lawall, H., und Deutschen Gesellschaft für Angiologie/Gefässmedizin. (2010). [S3 guidelines for diagnostics and treatment of peripheral arterial occlusive disease]. *Der Radiologe*, *50*(1), 7–15.

Hurley, J. B., und Stryer, L. (1982). Purification and characterization of the gamma regulatory subunit of the cyclic GMP phosphodiesterase from retinal rod outer segments. *The Journal of Biological Chemistry*, *257*(18), 11094–11099.

Ignarro, L. J., Buga, G. M., Wood, K. S., Byrns, R. E., und Chaudhuri, G. (1987). Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *84*(24), 9265–9269.

Isenberg, J. S., Martin-Manso, G., Maxhimer, J. B., und Roberts, D. D. (2009). Regulation of nitric oxide signalling by thrombospondin 1: implications for anti-angiogenic therapies. *Nature Reviews Cancer*, *9*(3), 182–194.

Isenberg, J. S., Ridnour, L. A., Perruccio, E. M., Espey, M. G., Wink, D. A., und Roberts, D. D. (2005). Thrombospondin-1 inhibits endothelial cell responses to nitric oxide in a cGMP-dependent manner. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(37), 13141–13146.

Ishida, S., Yamashiro, K., Usui, T., Kaji, Y., Ogura, Y., Hida, T., … Adamis, A. P. (2003). Leukocytes mediate retinal vascular remodeling during development and vaso-obliteration in disease. *Nature Medicine*, *9*(6), 781–788.

Jarchau, T., Häusler, C., Markert, T., Pöhler, D., Vanderkerckhove, J., De Jonge, H. R., … Walter, U. (1994). Cloning, expression, and in situ localization of rat intestinal cGMP-dependent protein kinase II. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *91*(20), 9426–9430.

Kanno, S., Oda, N., Abe, M., Terai, Y., Ito, M., Shitara, K., … Sato, Y. (2000). Roles of two VEGF receptors, Flt-1 and KDR, in the signal transduction of VEGF effects in human vascular endothelial cells. *Oncogene*, *19*(17), 2138–2146.

Katare, R. G., und Madeddu, P. (2013). Pericytes from human veins for treatment of myocardial ischemia. *Trends in Cardiovascular Medicine*, *23*(3), 66–70.

Keilbach, A., Ruth, P., und Hofmann, F. (1992). Detection of cGMP dependent protein kinase isozymes by specific antibodies. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, *208*(2), 467–473.

Kiemer, A. K., und Vollmar, A. M. (1998). Autocrine regulation of inducible nitric-oxide synthase in macrophages by atrial natriuretic peptide. *The Journal of Biological Chemistry*, *273*(22), 13444–13451.

Kimura, H., und Esumi, H. (2003). Reciprocal regulation between nitric oxide and vascular endothelial growth factor in angiogenesis. *Acta Biochimica Polonica*, *50*(1), 49–59.

Kimura, H., Weisz, A., Kurashima, Y., Hashimoto, K., Ogura, T., D'Acquisto, F., … Esumi, H. (2000). Hypoxia response element of the human vascular endothelial growth factor gene mediates transcriptional regulation by nitric oxide: control of hypoxia-inducible factor-1 activity by nitric oxide. *Blood*, *95*(1), 189–197.

Kisanuki, Y. Y., Hammer, R. E., Miyazaki, J., Williams, S. C., Richardson, J. A., und Yanagisawa, M. (2001). Tie2-Cre transgenic mice: a new model for endothelial cell-lineage analysis in vivo. *Developmental Biology*, *230*(2), 230–242.

Klatt, P., Schmidt, K., und Mayer, B. (1992). Brain nitric oxide synthase is a haemoprotein. *Biochemical Journal*, *288*(Pt 1), 15–17.

Knowles, R. G., Palacios, M., Palmer, R. M., und Moncada, S. (1989). Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *86*(13), 5159–5162.

Koglin, M., Vehse, K., Budaeus, L., Scholz, H., und Behrends, S. (2001). Nitric oxide activates the beta 2 subunit of soluble guanylyl cyclase in the absence of a second subunit. *The Journal of Biological Chemistry*, *276*(33), 30737–30743.

Komalavilas, P., und Lincoln, T. M. (1996). Phosphorylation of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. Cyclic GMP-dependent protein kinase mediates cAMP and cGMP dependent phosphorylation in the intact rat aorta. *The Journal of Biological Chemistry*, *271*(36), 21933–21938.

Krause, M., Bear, J. E., Loureiro, J. J., und Gertler, F. B. (2002). The Ena/VASP enigma. *Journal of Cell Science*, *115*(Pt 24), 4721–4726.

Kroll, J., und Waltenberger, J. (1999). A novel function of VEGF receptor-2 (KDR): rapid release of nitric oxide in response to VEGF-A stimulation in endothelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *265*(3), 636–639.

Kuchan, M. J., und Frangos, J. A. (1994). Role of calcium and calmodulin in flow-induced nitric oxide production in endothelial cells. *The American Journal of Physiology*, *266*(3 Pt 1), C628–636.

Ku, D. D., Zaleski, J. K., Liu, S., und Brock, T. A. (1993). Vascular endothelial growth factor induces EDRF-dependent relaxation in coronary arteries. *The American Journal of Physiology*, *265*(2 Pt 2), H586–592.

Kuhn, M. (2009). Function and dysfunction of mammalian membrane guanylyl cyclase receptors: lessons from genetic mouse models and implications for human diseases. *Handbook of Experimental Pharmacology*, (191), 47–69.

Kukk, E., Lymboussaki, A., Taira, S., Kaipainen, A., Jeltsch, M., Joukov, V., und Alitalo, K. (1996). VEGF-C receptor binding and pattern of expression with VEGFR-3 suggests a role in lymphatic vascular development. *Development (Cambridge, England)*, *122*(12), 3829–3837.

Lange, C., Ehlken, C., Stahl, A., Martin, G., Hansen, L., und Agostini, H. T. (2009). Kinetics of retinal vaso-obliteration and neovascularisation in the oxygen-induced retinopathy (OIR) mouse model. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv Für Klinische Und Experimentelle Ophthalmologie*, *247*(9), 1205–1211.

Laubach, V. E., Shesely, E. G., Smithies, O., und Sherman, P. A. (1995). Mice lacking inducible nitric oxide synthase are not resistant to lipopolysaccharide-induced death. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *92*(23), 10688–10692.

Lawler, P. R., und Lawler, J. (2012). Molecular basis for the regulation of angiogenesis by thrombospondin-1 and -2. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *2*(5), a006627.

Lee, M. Y., Luciano, A. K., Ackah, E., Rodriguez-Vita, J., Bancroft, T. A., Eichmann, A., … Sessa, W. C. (2014). Endothelial Akt1 mediates angiogenesis by phosphorylating multiple angiogenic substrates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*(35), 12865–12870.

Levy, A. P., Levy, N. S., Wegner, S., und Goldberg, M. A. (1995). Transcriptional regulation of the rat vascular endothelial growth factor gene by hypoxia. *The Journal of Biological Chemistry*, *270*(22), 13333–13340.

Liew, F. Y., Millott, S., Parkinson, C., Palmer, R. M., und Moncada, S. (1990). Macrophage killing of Leishmania parasite in vivo is mediated by nitric oxide from L-arginine. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *144*(12), 4794–4797.

Limbourg, A., Korff, T., Napp, L. C., Schaper, W., Drexler, H., und Limbourg, F. P. (2009). Evaluation of postnatal arteriogenesis and angiogenesis in a mouse model of hind-limb ischemia. *Nature Protocols*, *4*(12), 1737–1746.

Lincoln, T. M., Komalavilas, P., Boerth, N. J., MacMillan-Crow, L. A., und Cornwell, T. L. (1995). cGMP signaling through cAMP- and cGMP-dependent protein kinases. *Advances in Pharmacology (San Diego, Calif.)*, *34*, 305–322.

Lin, C. S., Lau, A., Tu, R., und Lue, T. F. (2000). Expression of three isoforms of cGMP-binding cGMP-specific phosphodiesterase (PDE5) in human penile cavernosum. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *268*(2), 628–635.

Lin, C.-S., und Lue, T. F. (2013). Defining vascular stem cells. *Stem Cells and Development*, *22*(7), 1018–1026.

Loesch, A., und Burnstock, G. (1995). Ultrastructural localization of nitric oxide synthase and endothelin in coronary and pulmonary arteries of newborn rats. *Cell and Tissue Research*, *279*(3), 475–483.

Lohmann, S. M., Vaandrager, A. B., Smolenski, A., Walter, U., und De Jonge, H. R. (1997). Distinct and specific functions of cGMP-dependent protein kinases. *Trends in Biochemical Sciences*, *22*(8), 307–312.

Lucas, K. A., Pitari, G. M., Kazerounian, S., Ruiz-Stewart, I., Park, J., Schulz, S., … Waldman, S. A. (2000). Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. *Pharmacological Reviews*, *52*(3), 375–414.

MacLauchlan, S., Yu, J., Parrish, M., Asoulin, T. A., Schleicher, M., Krady, M. M., … Kyriakides, T. R. (2011). Endothelial nitric oxide synthase controls the expression of the angiogenesis inhibitor thrombospondin 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(46), E1137–1145.

Majumder, S., Sinha, S., Siamwala, J. H., Muley, A., Reddy Seerapu, H., Kolluru, G. K., … Chatterjee, S. (2014). A comparative study of NONOate based NO donors: spermine NONOate is the best suited NO donor for angiogenesis. *Nitric Oxide: Biology and Chemistry / Official Journal of the Nitric Oxide Society*, *36*, 76–86.

Majumder, S., Tamilarasan, K. P., Kolluru, G. K., Muley, A., Nair, C. M., Omanakuttan, A., … Chatterjee, S. (2007). Activated pericyte attenuates endothelial functions: nitric oxide-cGMP rescues activated pericyte-associated endothelial dysfunctions. *Biochemistry and Cell Biology*, *85*(6), 709–720.

Martin, A. R., Bailie, J. R., Robson, T., McKeown, S. R., Al-Assar, O., McFarland, A., und Hirst, D. G. (2000). Retinal pericytes control expression of nitric oxide synthase and endothelin-1 in microvascular endothelial cells. *Microvascular Research*, *59*(1), 131–139.

Mayer, B., John, M., und Böhme, E. (1990). Purification of a Ca^{2+}/calmodulin-dependent nitric oxide synthase from porcine cerebellum. Cofactor-role of tetrahydrobiopterin. *FEBS Letters*, *277*(1-2), 215–219.

Mendel, T. A., Clabough, E. B. D., Kao, D. S., Demidova-Rice, T. N., Durham, J. T., Zotter, B. C., … Yates, P. A. (2013). Pericytes Derived from Adipose-Derived Stem Cells Protect against Retinal Vasculopathy. *PLoS ONE*, *8*(5), e65691.

Mergia, E., Friebe, A., Dangel, O., Russwurm, M., und Koesling, D. (2006). Spare guanylyl cyclase NO receptors ensure high NO sensitivity in the vascular system. *The Journal of Clinical Investigation*, *116*(6), 1731–1737.

Mergia, E., Russwurm, M., Zoidl, G., und Koesling, D. (2003). Major occurrence of the new alpha2beta1 isoform of NO-sensitive guanylyl cyclase in brain. *Cellular Signalling*, *15*(2), 189–195.

Moncada, S., und Higgs, E. A. (1995). Molecular mechanisms and therapeutic strategies related to nitric oxide. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *9*(13), 1319–1330.

Mooradian, D. L., Hutsell, T. C., und Keefer, L. K. (1995). Nitric oxide (NO) donor molecules: effect of NO release rate on vascular smooth muscle cell proliferation in vitro. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, *25*(4), 674–678.

Morbidelli, L., Pyriochou, A., Filippi, S., Vasileiadis, I., Roussos, C., Zhou, Z., … Papapetropoulos, A. (2010). The soluble guanylyl cyclase inhibitor NS-2028 reduces vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis and permeability. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, *298*(3), R824–832.

Morishita, T., Tsutsui, M., Shimokawa, H., Sabanai, K., Tasaki, H., Suda, O., … Yanagihara, N. (2005). Nephrogenic diabetes insipidus in mice lacking all nitric oxide synthase isoforms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(30), 10616–10621.

Moroi, M., Zhang, L., Yasuda, T., Virmani, R., Gold, H. K., Fishman, M. C., und Huang, P. L. (1998). Interaction of genetic deficiency of endothelial nitric oxide, gender, and pregnancy in vascular response to injury in mice. *Journal of Clinical Investigation*, *101*(6), 1225–1232.

Mukhopadhyay, D., Knebelmann, B., Cohen, H. T., Ananth, S., und Sukhatme, V. P. (1997). The von Hippel-Lindau tumor suppressor gene product interacts with Sp1 to repress vascular endothelial growth factor promoter activity. *Molecular and Cellular Biology*, *17*(9), 5629–5639.

Mullershausen, F., Russwurm, M., Koesling, D., und Friebe, A. (2004). In vivo reconstitution of the negative feedback in nitric oxide/cGMP signaling: role of phosphodiesterase type 5 phosphorylation. *Molecular Biology of the Cell*, *15*(9), 4023–4030.

Mullis, K. B., und Faloona, F. A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology*, *155*, 335–350.

Mülsch, A., Bassenge, E., und Busse, R. (1989). Nitric oxide synthesis in endothelial cytosol: evidence for a calcium-dependent and a calcium-independent mechanism. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, *340*(6 Pt 2), 767–770.

Murad, F., Mittal, C. K., Arnold, W. P., Katsuki, S., und Kimura, H. (1978). Guanylate cyclase: activation by azide, nitro compounds, nitric oxide, and hydroxyl radical and inhibition by hemoglobin and myoglobin. *Advances in Cyclic Nucleotide Research*, *9*, 145–158.

Nakamura, M., Ichikawa, K., Ito, M., Yamamori, B., Okinaka, T., Isaka, N., … Nakano, T. (1999). Effects of the phosphorylation of myosin phosphatase by cyclic GMP-dependent protein kinase. *Cellular Signalling*, *11*(9), 671–676.

Nelson, R. J., Demas, G. E., Huang, P. L., Fishman, M. C., Dawson, V. L., Dawson, T. M., und Snyder, S. H. (1995). Behavioural abnormalities in male mice lacking neuronal nitric oxide synthase. *Nature*, *378*(6555), 383–386.

Neufeld, G., Cohen, T., Gengrinovitch, S., und Poltorak, Z. (1999). Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *13*(1), 9–22.

Ogawa, S., Oku, A., Sawano, A., Yamaguchi, S., Yazaki, Y., und Shibuya, M. (1998). A novel type of vascular endothelial growth factor, VEGF-E (NZ-7 VEGF), preferentially utilizes KDR/Flk-1 receptor and carries a potent mitotic activity without heparin-binding domain. *The Journal of Biological Chemistry*, *273*(47), 31273–31282.

Ogunshola, O. O., Antic, A., Donoghue, M. J., Fan, S.-Y., Kim, H., Stewart, W. B., … Ment, L. R. (2002). Paracrine and autocrine functions of neuronal vascular endothelial growth factor (VEGF) in the central nervous system. *The Journal of Biological Chemistry*, *277*(13), 11410–11415.

Olsson, A.-K., Dimberg, A., Kreuger, J., und Claesson-Welsh, L. (2006). VEGF receptor signalling - in control of vascular function. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *7*(5), 359–371.

Ozaki, H., Seo, M. S., Ozaki, K., Yamada, H., Yamada, E., Okamoto, N., … Campochiaro, P. A. (2000). Blockade of vascular endothelial cell growth factor receptor signaling is sufficient to completely prevent retinal neovascularization. *The American Journal of Pathology*, *156*(2), 697–707.

Palmer, R. M., Ferrige, A. G., und Moncada, S. (1987). Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, *327*(6122), 524–526.

Pe'er, J., Shweiki, D., Itin, A., Hemo, I., Gnessin, H., und Keshet, E. (1995). Hypoxia-induced expression of vascular endothelial growth factor by retinal cells is a common factor in neovascularizing ocular diseases. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, *72*(6), 638–645.

Peichev, M., Naiyer, A. J., Pereira, D., Zhu, Z., Lane, W. J., Williams, M., … Rafii, S. (2000). Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood*, *95*(3), 952–958.

Pfeifer, A., Aszódi, A., Seidler, U., Ruth, P., Hofmann, F., und Fässler, R. (1996). Intestinal Secretory Defects and Dwarfism in Mice Lacking cGMP-Dependent Protein Kinase II. *Science*, *274*(5295), 2082–2086.

Pfeifer, A., Klatt, P., Massberg, S., Ny, L., Sausbier, M., Hirneiss, C., … Hofmann, F. (1998). Defective smooth muscle regulation in cGMP kinase I-deficient mice. *The EMBO Journal*, *17*(11), 3045–3051.

Pfeifer, A., Ruth, P., Dostmann, W., Sausbier, M., Klatt, P., und Hofmann, F. (1999). Structure and function of cGMP-dependent protein kinases. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, *135*, 105–149.

Pierce, E. A., Avery, R. L., Foley, E. D., Aiello, L. P., und Smith, L. E. (1995). Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor expression in a mouse model of retinal neovascularization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *92*(3), 905–909.

Pryzwansky, K. B., Kidao, S., Wyatt, T. A., Reed, W., und Lincoln, T. M. (1995). Localization of cyclic GMP-dependent protein kinase in human mononuclear phagocytes. *Journal of Leukocyte Biology*, *57*(4), 670–678.

Pyriochou, A., Vassilakopoulos, T., Zhou, Z., und Papapetropoulos, A. (2007). cGMP-dependent and -independent angiogenesis-related properties of nitric oxide. *Life Sciences*, *81*(21-22), 1549–1554.

Raeymaekers, L., Eggermont, J. A., Wuytack, F., und Casteels, R. (1990). Effects of cyclic nucleotide dependent protein kinases on the endoplasmic reticulum Ca2+ pump of bovine pulmonary artery. *Cell Calcium*, *11*(4), 261–268.

Ramanathan, S., Mazzalupo, S., Boitano, S., und Montfort, W. R. (2011). Thrombospondin-1 and angiotensin II inhibit soluble guanylyl cyclase through an increase in intracellular calcium concentration. *Biochemistry*, *50*(36), 7787–7799.

Ridnour, L. A., Isenberg, J. S., Espey, M. G., Thomas, D. D., Roberts, D. D., und Wink, D. A. (2005). Nitric oxide regulates angiogenesis through a functional switch involving thrombospondin-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(37), 13147–13152.

Risau, W. (1997). Mechanisms of angiogenesis. *Nature*, *386*(6626), 671–674.

Roberts, W. G., und Palade, G. E. (1995). Increased microvascular permeability and endothelial fenestration induced by vascular endothelial growth factor. *Journal of Cell Science*, *108 (Pt 6)*, 2369–2379.

Robinson, G. S., Ju, M., Shih, S. C., Xu, X., McMahon, G., Caldwell, R. B., und Smith, L. E. (2001). Nonvascular role for VEGF: VEGFR-1, 2 activity is critical for neural retinal development. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *15*(7), 1215–1217.

Russwurm, M., Wittau, N., und Koesling, D. (2001). Guanylyl cyclase/PSD-95 interaction: targeting of the nitric oxide-sensitive alpha2beta1 guanylyl cyclase to synaptic membranes. *The Journal of Biological Chemistry*, *276*(48), 44647–44652.

Sahara, M., Sata, M., Morita, T., Nakajima, T., Hirata, Y., und Nagai, R. (2010). A phosphodiesterase-5 inhibitor vardenafil enhances angiogenesis through a protein kinase G-dependent hypoxia-inducible factor-1/vascular endothelial growth factor pathway. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *30*(7), 1315–1324.

Saiki, R. K., Chang, C. A., Levenson, C. H., Warren, T. C., Boehm, C. D., Kazazian, H. H., und Erlich, H. A. (1988). Diagnosis of sickle cell anemia and beta-thalassemia with enzymatically amplified DNA and nonradioactive allele-specific oligonucleotide probes. *The New England Journal of Medicine*, *319*(9), 537–541.

Sarkar, R., Meinberg, E. G., Stanley, J. C., Gordon, D., und Webb, R. C. (1996). Nitric oxide reversibly inhibits the migration of cultured vascular smooth muscle cells. *Circulation Research*, *78*(2), 225–230.

Schaper, W. (2009). Collateral circulation: past and present. *Basic Research in Cardiology*, *104*(1), 5–21.

Schmidt, H. H., und Murad, F. (1991). Purification and characterization of a human NO synthase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *181*(3), 1372–1377.

Schmidt, H. H., und Walter, U. (1994). NO at work. *Cell*, *78*(6), 919–925.

Scholz, D., Ziegelhoeffer, T., Helisch, A., Wagner, S., Friedrich, C., Podzuweit, T., und Schaper, W. (2002). Contribution of arteriogenesis and angiogenesis to postocclusive hindlimb perfusion in mice. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, *34*(7), 775–787.

Schultz, G., Böhme, E., und Munske, K. (1969). Guanyl cyclase. Determination of enzyme activity. *Life Sciences*, *8*(24), 1323–1332.

Schuman, E. M., und Madison, D. V. (1991). A requirement for the intercellular messenger nitric oxide in long-term potentiation. *Science (New York, N.Y.)*, *254*(5037), 1503–1506.

Scott, A., und Fruttiger, M. (2010). Oxygen-induced retinopathy: a model for vascular pathology in the retina. *Eye (London, England)*, *24*(3), 416–421.

Senthilkumar, A., Smith, R. D., Khitha, J., Arora, N., Veerareddy, S., Langston, W., … Kevil, C. G. (2007). Sildenafil promotes ischemia-induced angiogenesis through a PKG-dependent pathway. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, *27*(9), 1947–1954.

Sessa, W. C., Pritchard, K., Seyedi, N., Wang, J., und Hintze, T. H. (1994). Chronic exercise in dogs increases coronary vascular nitric oxide production and endothelial cell nitric oxide synthase gene expression. *Circulation Research*, *74*(2), 349–353.

Shibuya, M. (2001). Structure and function of VEGF/VEGF-receptor system involved in angiogenesis. *Cell Structure and Function*, *26*(1), 25–35.

Smith, L. E., Wesolowski, E., McLellan, A., Kostyk, S. K., D'Amato, R., Sullivan, R., und D'Amore, P. A. (1994). Oxygen-induced retinopathy in the mouse. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *35*(1), 101–111.

Sogawa, K., Numayama-Tsuruta, K., Ema, M., Abe, M., Abe, H., und Fujii-Kuriyama, Y. (1998). Inhibition of hypoxia-inducible factor 1 activity by nitric oxide donors in hypoxia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *95*(13), 7368–7373.

Sone, H., Kawakami, Y., Segawa, T., Okuda, Y., Sekine, Y., Honmura, S., … Yamada, N. (1999). Effects of intraocular or systemic administration of neutralizing antibody against vascular endothelial growth factor on the murine experimental model of retinopathy. *Life Sciences*, *65*(24), 2573–2580.

Stahl, A., Connor, K. M., Sapieha, P., Willett, K. L., Krah, N. M., Dennison, R. J., … Smith, L. E. H. (2009). Computer-aided quantification of retinal neovascularization. *Angiogenesis*, *12*(3), 297–301.

Stasch, J.-P., und Evgenov, O. V. (2013). Soluble guanylate cyclase stimulators in pulmonary hypertension. *Handbook of Experimental Pharmacology*, *218*, 279–313.

Stone, J., Itin, A., Alon, T., Pe'er, J., Gnessin, H., Chan-Ling, T., und Keshet, E. (1995). Development of retinal vasculature is mediated by hypoxia-induced vascular endothelial growth factor (VEGF) expression by neuroglia. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *15*(7 Pt 1), 4738–4747.

Stone, J., und Maslim, J. (1997). Mechanisms of retinal angiogenesis. *Progress in Retinal and Eye Research*, *16*(2), 157–181.

Sun, J., Hopkins, B. D., Tsujikawa, K., Perruzzi, C., Adini, I., Swerlick, R., … Benjamin, L. E. (2009). Thrombospondin-1 modulates VEGF-A-mediated Akt signaling and capillary survival in the developing retina. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, *296*(5), H1344–H1351.

Takahashi, T., Yamaguchi, S., Chida, K., und Shibuya, M. (2001). A single autophosphorylation site on KDR/Flk-1 is essential for VEGF-A-dependent activation of PLC-gamma and DNA synthesis in vascular endothelial cells. *The EMBO Journal*, *20*(11), 2768–2778.

Taqatqeh, F., Mergia, E., Neitz, A., Eysel, U. T., Koesling, D., und Mittmann, T. (2009). More than a retrograde messenger: nitric oxide needs two cGMP pathways to induce hippocampal long-term potentiation. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *29*(29), 9344–9350.

Thomas, K. A. (1996). Vascular endothelial growth factor, a potent and selective angiogenic agent. *The Journal of Biological Chemistry*, *271*(2), 603–606.

Troidl, K., Tribulova, S., Cai, W.-J., Rüding, I., Apfelbeck, H., Schierling, W., … Schaper, W. (2010). Effects of endogenous nitric oxide and of DETA NONOate in arteriogenesis. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, *55*(2), 153–160.

Truett, G. E., Heeger, P., Mynatt, R. L., Truett, A. A., Walker, J. A., und Warman, M. L. (2000). Preparation of PCR-quality mouse genomic DNA with hot sodium hydroxide and tris (HotSHOT). *BioTechniques*, *29*(1), 52, 54.

Tsurumi, Y., Murohara, T., Krasinski, K., Chen, D., Witzenbichler, B., Kearney, M., … Isner, J. M. (1997). Reciprocal relation between VEGF and NO in the regulation of endothelial integrity. *Nature Medicine*, *3*(8), 879–886.

Turko, I. V., Ballard, S. A., Francis, S. H., und Corbin, J. D. (1999). Inhibition of cyclic GMP-binding cyclic GMP-specific phosphodiesterase (Type 5) by sildenafil and related compounds. *Molecular Pharmacology*, *56*(1), 124–130.

Vaandrager, A. B., Edixhoven, M., Bot, A. G., Kroos, M. A., Jarchau, T., Lohmann, S., … de Jonge, H. R. (1997). Endogenous type II cGMP-dependent protein kinase exists as a dimer in membranes and can be functionally distinguished from the type I isoforms. *The Journal of Biological Chemistry*, *272*(18), 11816–11823.

Vaandrager, A. B., Smolenski, A., Tilly, B. C., Houtsmuller, A. B., Ehlert, E. M., Bot, A. G., … de Jonge, H. R. (1998). Membrane targeting of cGMP-dependent protein kinase is required for cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl- channel activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *95*(4), 1466–1471.

Van der Zee, R., Murohara, T., Luo, Z., Zollmann, F., Passeri, J., Lekutat, C., und Isner, J. M. (1997). Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor augments nitric oxide release from quiescent rabbit and human vascular endothelium. *Circulation*, *95*(4), 1030–1037.

Walter, U., Eigenthaler, M., Geiger, J., und Reinhard, M. (1993). Role of cyclic nucleotide-dependent protein kinases and their common substrate VASP in the regulation of human platelets. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, *344*, 237–249.

Wang, S., Wu, Z., Sorenson, C. M., Lawler, J., und Sheibani, N. (2003). Thrombospondin-1–deficient mice exhibit increased vascular density during retinal vascular development and are less sensitive to hyperoxia-mediated vessel obliteration. *Developmental Dynamics*, *228*(4), 630–642.

Wedel, B., Harteneck, C., Foerster, J., Friebe, A., Schultz, G., und Koesling, D. (1995). Functional domains of soluble guanylyl cyclase. *The Journal of Biological Chemistry*, *270*(42), 24871–24875.

Wei, X. Q., Charles, I. G., Smith, A., Ure, J., Feng, G. J., Huang, F. P., … Liew, F. Y. (1995). Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Nature*, *375*(6530), 408–411.

Wei, Y., Li, C., und Xue, Y. (2009). [Expression of transcription factor SP1, vascular endothelial growth factor and CD34 in serosa-infiltrating gastric cancer and their relationship with biological behavior and prognosis]. *Zhonghua wei chang wai ke za zhi = Chinese journal of gastrointestinal surgery*, *12*(2), 145–149.

Wernet, W., Flockerzi, V., und Hofmann, F. (1989). The cDNA of the two isoforms of bovine cGMP-dependent protein kinase. *FEBS Letters*, *251*(1-2), 191–196.

Winquist, R. J., Faison, E. P., Waldman, S. A., Schwartz, K., Murad, F., und Rapoport, R. M. (1984). Atrial natriuretic factor elicits an endothelium-independent relaxation and activates particulate guanylate cyclase in vascular smooth muscle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *81*(23), 7661–7664.

Wirth, A., Benyó, Z., Lukasova, M., Leutgeb, B., Wettschureck, N., Gorbey, S., … Offermanns, S. (2008). G12-G13-LARG-mediated signaling in vascular smooth muscle is required for salt-induced hypertension. *Nature Medicine*, *14*(1), 64–68.

Woolard, J., Wang, W.-Y., Bevan, H. S., Qiu, Y., Morbidelli, L., Pritchard-Jones, R. O., … Bates, D. O. (2004). VEGF165b, an inhibitory vascular endothelial growth factor splice variant: mechanism of action, in vivo effect on angiogenesis and endogenous protein expression. *Cancer Research*, *64*(21), 7822–7835.

Wu, Z., Wang, S., Sorenson, C. M., und Sheibani, N. (2006). Attenuation of retinal vascular development and neovascularization in transgenic mice over-expressing thrombospondin-1 in the lens. *Developmental Dynamics*, *235*(7), 1908–1920.

Xie, Q., und Nathan, C. (1994). The high-output nitric oxide pathway: role and regulation. *Journal of Leukocyte Biology*, *56*(5), 576–582.

Yamahara, K., Itoh, H., Chun, T.-H., Ogawa, Y., Yamashita, J., Sawada, N., … Nakao, K. (2003). Significance and therapeutic potential of the natriuretic peptides/cGMP/cGMP-dependent protein kinase pathway in vascular regeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(6), 3404–3409.

Yao, R., und Cooper, G. M. (1995). Requirement for phosphatidylinositol-3 kinase in the prevention of apoptosis by nerve growth factor. *Science (New York, N.Y.)*, *267*(5206), 2003–2006.

Yuen, P. S., Potter, L. R., und Garbers, D. L. (1990). A new form of guanylyl cyclase is preferentially expressed in rat kidney. *Biochemistry*, *29*(49), 10872–10878.

Yui, Y., Hattori, R., Kosuga, K., Eizawa, H., Hiki, K., und Kawai, C. (1991). Purification of nitric oxide synthase from rat macrophages. *The Journal of Biological Chemistry*, *266*(19), 12544–12547.

Yu, J., deMuinck, E. D., Zhuang, Z., Drinane, M., Kauser, K., Rubanyi, G. M., … Sessa, W. C. (2005). Endothelial nitric oxide synthase is critical for ischemic remodeling, mural cell recruitment, and blood flow reserve. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(31), 10999–11004.

Zhang, R., Wang, L., Zhang, L., Chen, J., Zhu, Z., Zhang, Z., und Chopp, M. (2003). Nitric oxide enhances angiogenesis via the synthesis of vascular endothelial growth factor and cGMP after stroke in the rat. *Circulation Research*, *92*(3), 308–313.

Ziche, M., Morbidelli, L., Choudhuri, R., Zhang, H. T., Donnini, S., Granger, H. J., und Bicknell, R. (1997). Nitric oxide synthase lies downstream from vascular endothelial growth factor-induced but not basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis. *The Journal of Clinical Investigation*, *99*(11), 2625–2634.

Ziche, M., Morbidelli, L., Masini, E., Amerini, S., Granger, H. J., Maggi, C. A., … Ledda, F. (1994). Nitric oxide mediates angiogenesis in vivo and endothelial cell growth and migration in vitro promoted by substance P. *The Journal of Clinical Investigation*, *94*(5), 2036–2044.

9. Eigene Publikationen

9.1. Originalarbeiten

Jäger R, Groneberg D, Lies B, Bettaga N, Kümmel M, Friebe A. Radioimmunoassay for the quantification of cGMP levels in cells and tissues. Methods Mol Biol. 1020, 63-72 (2013)

Bettaga N, Jäger R, Dünnes S, Groneberg D, Friebe A. Cell-specific impact of nitric oxide-dependent guanylyl cyclase on arteriogenesis and angiogenesis in mice. Eingereicht (2014).

9.2. Kongressbeiträge

Bettaga N, Jäger R, Friebe A. Role of NO-sensitive guanylyl cyclase in angiogenesis. Workshop on Smooth Muscle Function, 10.12.2012, Lübeck

Bettaga N, Jäger R, Friebe A. Role of NO-sensitive guanylyl cyclase in angiogenesis. Deutsche Physiologische Gesellschaft; DPG 2013, Heidelberg

Bettaga N, Groneberg D, Jäger R, Lies B, Friebe A. Cell type-specific knockout models to unravel NO/cGMP signaling in smooth muscle. 6th International Conference on cGMP, 28. - 30.06.2013, Erfurt

Bettaga N, Jäger R, Friebe A. Role of NO-sensitive guanylyl cyclase in angiogenesis and arteriogenesis. 6th International Conference on cGMP, 28. - 30.06.2013, Erfurt

10. Danksagung

Bei der Durchführung dieser Doktorarbeit durfte ich wertvolle Unterstützung erfahren. An dieser Stelle möchte ich mich bei allen, die an dieser Arbeit beteiligt waren, herzlich bedanken.

Mein besonderer Dank geht an Herrn Prof. Dr. Andreas Friebe für die Überlassung des Forschungsthemas sowie sein Vertrauen und seine dauerhafte und intensive Unterstützung. Sehr dankbar bin ich auch für seine wertvollen Ratschläge und die vielen hilfreichen und konstruktiven Ideen. Seine Präsenz und ständige Hilfsbereitschaft waren für das Fortkommen dieser Arbeit entscheidend.

Ich bedanke mich auch herzlich bei Herrn Prof. Dr. Markus Engstler für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.

Mein Dank gilt auch Herrn Dr. Ronald Jäger für seine fachliche Betreuung sowie seine hilfreichen Tipps und wertvollen Ideen. Für seine ständige Diskussionsbereitschaft und die fruchtbare Zusammenarbeit bin ich ihm überaus dankbar.

Mein Dank geht ebenfalls an alle Mitarbeiter der Arbeitsgruppe Friebe für das wunderbare Arbeitsklima und die effektive Zusammenarbeit. Hier nenne ich insbesondere Herrn Dr. Dieter Groneberg für seine wertvollen Vorschläge, Frau Dr. Barbara Lies für ihre Unterstützung, Michaela Kümmel und Linda Kehrer für die technische Hilfe sowie Sarah Dünnes und Katharina Beck für die herausragenden Diskussionen und Ablenkungen.

Ich danke auch allen Mitarbeitern der anderen Arbeitsgruppen des Instituts für Physiologie. Hier geht mein besonderer Dank an Prof. Dr. Kai Schuh, Frau Dr. Melanie Ullrich, Heike Oberwinkler, Birgit Gassner und Bärbel Zumkeller.

Zuletzt möchte ich meinen persönlichen Dank den Menschen widmen, die mir stetigen Rückhalt in meinem Leben gegeben haben: meiner Familie. Die grenzenlose Unterstützung und die immerwährende Ermutigung, insbesondere meiner Eltern, meiner wunderschönen Frau Safa Habibi, sowie ganz besonders meines Sohnes OMAR, die mich auf meinem Weg stets begleitet und motiviert haben. Ich danke euch allen von ganzem Herzen.