

Aus der Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Malte Kelm

Neue Methoden
zur Untersuchung von Expression und Aktivität
der NO-Synthase in menschlichen Erythrozyten

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Tristan Römer

2013

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf
Dekan

Referent: Prof. Dr. Kelm

Koreferent: Prof. Dr. rer. Nat. Suschek

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Cortese-Krott MM, Rodriguez-Mateos A, Kuhnle GG, Brown G, Feelisch M, Kelm M 2012.
A multilevel analytical approach for detection and visualization of intracellular NO production and nitrosation events using diaminofluoresceins.
Free Radic Biol Med. 53(11):2146-58.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	III
1. Einleitung	1
1.1 Funktion von NO im menschlichen Herz-Kreislauf-System	1
1.2 Enzymatische NO-Produktion durch die NO-Synthase und ihre Regulation	2
1.3 Die Rolle der Erythrozyten im NO-Metabolismus	8
1.4 Nachweis und Funktion einer erythrozytären NO-Synthase	11
1.5 NO-Messung mit dem Fluoreszenzmolekül 4-Amino-5-Methylamino-2',7'-Difluorofluorescein-Diacetat (DAF-FM-Diacetat)	13
1.6 Ziel der Arbeit	14
2. Materialien und Methoden	15
2.1 Verwendete Chemikalien und Lösungen	15
2.2 Erythrozytenpräparation	17
2.3 Isolierung der NO-Synthase aus humanen Erythrozyten	17
2.3.1 Herstellung von Erythrozytenlysaten	17
2.3.2 Proteinbestimmung des Erythrozytenlysats	18
2.3.3 Immunpräzipitation mit Kaninchen Anti-eNOS-Antikörpern und Dynabeads [®] ProteinG	19
2.3.3.1 Vorbereitung/Reinigung der Dynabeads [®] ProteinG	19
2.3.3.2 Immunpräzipitation des Zielantigens (NO-Synthase)	19
2.3.4 SDS-PAGE (Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese)	20
2.3.5 Western Blot	21
2.3.6 Coomassie-Blau-Färbung der SDS-Polyacrylamid-Gele	22
2.4 Vorbehandlung der Erythrozyten	23
2.4.1 L-N5-(1-Iminoethyl)-Ornithin (L-NIO)	23
2.4.2 Aminosäuren	23
2.4.3 Nitrit und Nitrat	24
2.5 Behandlung humaner Erythrozyten mit DAF-FM-Diacetat (4-Amino-5-Methylamino-2',7'-Difluorofluorescein-Diacetat)	24
2.5.1 Messung der DAF-FM-Fluoreszenz mittels Durchflusszytometrie	25
2.5.2 Messung der DAF-FM-Fluoreszenz mittels Fluorometrie	27
2.7 Statistische Analyse	27
3. Ergebnisse	28
3.1 Isolierung der erythrozytären NO-Synthase mittels Immunpräzipitation und Western-Blot-Analyse	28

3.2 Bestimmung der intrazellulären NO-Produktion in humanen Erythrozyten durch Behandlung mit DAF-FM-Diacetat	31
3.2.1 Messung des DAF-FM-vermittelten Fluoreszenzsignals	31
3.2.1.1 Durchflusszytometrische Messungen	31
3.2.1.2 Fluorometrische Messungen	33
3.2.2 Abhängigkeit des DAF-FM-Fluoreszenzsignals von der Aktivität der erythrozytären NO-Synthase	35
3.2.3 Abhängigkeit des DAF-FM-Fluoreszenzsignals von der Nitrit- und Nitratkonzentration bei unterschiedlichen pH-Werten	38
3.2.4 Reproduzierbarkeit der Behandlung humaner Erythrozyten mit DAF-FM-Diacetat	39
4. Diskussion	42
4.1 Isolierung der NO-Synthase aus humanen Erythrozyten	42
4.2 Messung der intrazellulären NO-Produktion in humanen Erythrozyten mittels DAF-FM-Diacetat	43
4.3 Herkunft des mittels DAF-FM-Diacetat detektierten NO innerhalb des Erythrozyten	48
4.4 Physiologische und klinische Bedeutung der eNOS in menschlichen Erythrozyten	53
5. Zusammenfassung	58
6. Literaturverzeichnis	59

Abkürzungsverzeichnis

ADMA	Assymetrisches Dimethylarginin (N ^G ,N ^G -Dimethylarginin)
AE1	<i>Anion exchanger 1</i> (Anionenaustauscher 1)
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPK	AMP-aktivierte Proteinkinase
ANOVA	<i>Analysis of variance</i> (Varianzanalyse)
BH ₄	Tetrahydrobiopterin
BSA	Bovines Serumalbumin
Ca ²⁺	Calcium
CAD	<i>Coronary artery disease</i>
CAT	Kationischer Aminosäuretransporter
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
DAF-2	4,5-Diaminofluorescein
DAF-FM-Diacetat	4-Amino-5-Methylamino-2',7'-Difluorofluorescein-Diacetat
DAF-FM-T	4-Amino-5-Methylamino-2',7'-Difluorofluorescein-Triazol
De(s)oxy-Hb	Desoxygeniertes Hämoglobin
De(s)oxy-Mb	Desoxygeniertes Myoglobin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eNOS	endotheliale NO-Synthase
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i> (Durchflusszytometrie)
FAD	Flavin-Adenosin-Dinukleotid
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FMD	<i>Flow mediated dilatation</i>
FMN	Flavin-Mononukleotid
FSC	<i>Forward scatter</i> (Vorwärtsstreuung in der Durchflusszytometrie)
GTP	Guanosintriphosphat
H ₂ O	Wassermolekül
HbNO	Nitrosyliertes Hämoglobin
HbSNO	S-Nitrosohämoglobin
HNO ₂	Hydrogennitrit
IE	Internationale Einheiten
iNOS	induzierbare NO-Synthase
KHK	Koronare Herzkrankheit
LAT	L-Aminosäuretransporter
LDS	Lithiumdodecylsulfat
L-NAME	N ^G -Nitro-L-Arginin-Methylester
L-NIO	L-N5-(1-Iminoethyl)-Ornithin
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
MOPS	Morpholinpropanylsulfonsäure
N ₂ O ₃	Distickstofftrioxid
NaCl	Natriumchlorid
NADPH/NADP ⁺	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat reduziert/oxidiert
NaNO ₂	Natriumnitrit
NF-κB	<i>Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NMMA	N ^G -Monomethylarginin

nNOS	neuronal NO-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
NO ₂ ⁻	Nitrit
NO ₃ ⁻	Nitrat
NOS	NO-Synthase
NOSIP	NOS-interagierendes Protein
NOSTRIN	NOS <i>trafficking inducer</i>
O ₂	Molekularer Sauerstoff
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PKB	Proteinkinase B
PKG	Proteinkinase G/cGMP-abhängige Proteinkinase
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
RNNO	N-Nitrosamine
rNOS	rekombinante NO-Synthase
RSNO	S-Nitrosothiole
RT-PCR	<i>Real time-polymerase chain reaction</i>
SDS	Sodiumsodecylsulfat
SSC	<i>Sideward scatter</i> (Seitwärtsstreuung in der Durchflusszytometrie)
STAT1α	<i>Signal transducer and activator of transcription 1α</i>
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
u. a.	unter anderem
v. a.	vor allem
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i> (Gefäßendothel-Wachstumsfaktor)
XOR	Xanthinoxidoreduktase

1. Einleitung

1.1 Funktion von NO im menschlichen Herz-Kreislauf-System

Stickstoffmonoxid (NO) ist ein Signalmolekül, das in einer Vielzahl von biologischen Prozessen eine entscheidende Rolle spielt. Seine Funktionen werden hauptsächlich über die Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase und den daraus resultierenden Konzentrationsanstieg des zyklischen Guanosinmonophosphates (cGMP) in der Zelle vermittelt (Bryan et al., 2009). Die durch die NO-cGMP-Signalkaskade vermittelte Vasodilatation stellt die am besten untersuchte biologische Funktion von NO im Säugetierorganismus dar: Durch Scherstress oder Aktivierung endothelialer Rezeptormoleküle durch Mediatoren wie Bradykinin oder Acetylcholin kommt es zur Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels in der Endothelzelle, die die konstitutiv exprimierte endotheliale NO-Synthase (eNOS) stimuliert. Das auf diese Weise synthetisierte NO diffundiert in die benachbarten glatten Muskelzellen, wo es an das Eisen in der prosthetischen Hämgruppe der löslichen Guanylatzyklase bindet. Dadurch wird diese aktiviert und die Biosynthese des *second messengers* cGMP aus Guanosintriphosphat (GTP) katalysiert. Der Anstieg des cGMP-Spiegels in der glatten Muskelzelle führt u.a. zur Aktivierung der cGMP-abhängigen Proteinkinase (PKG) und über die dadurch initiierten Phosphorylierungsreaktionen schließlich zur Relaxation der Muskelzelle (Moncada und Higgs, 1993; Murad, 1994; Francis et al., 2010).

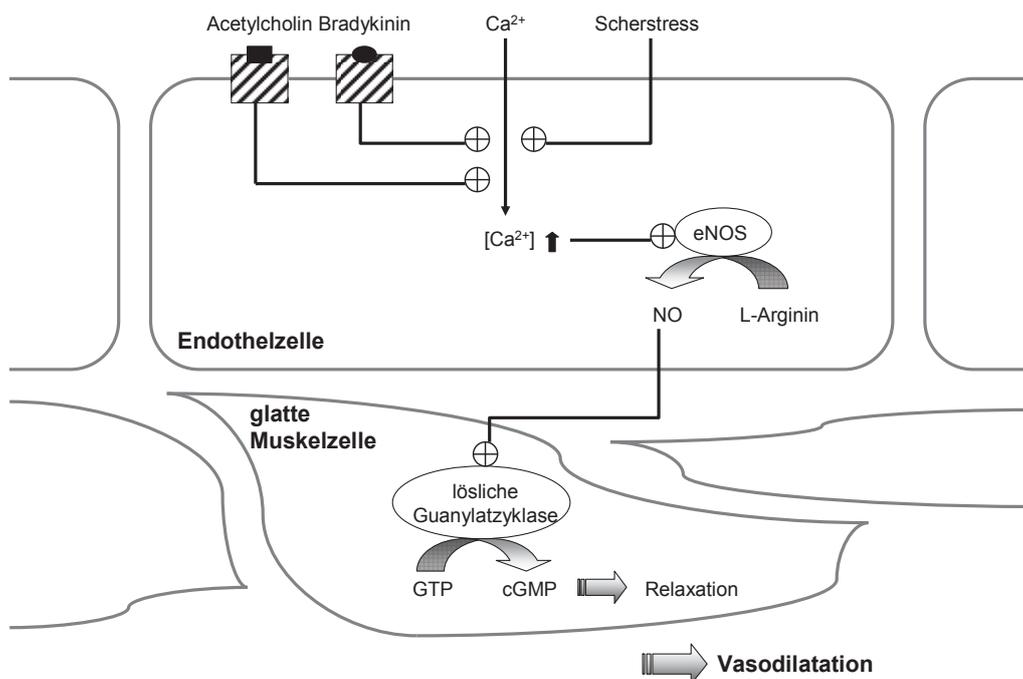


Abb.1

Stark vereinfachte Darstellung des klassischen Signalweges, der zur NO-vermittelten Vasodilatation führt (nach Moncada und Higgs, 1993).

NO nimmt jedoch nicht nur aufgrund seiner vasodilatatorischen Aktivität eine Schlüsselfunktion im Herz-Kreislauf-System ein. Das vom Gefäßendothel synthetisierte NO ist von entscheidender Bedeutung für die lokale Kontrolle der vaskulären Homöostase, indem es zum Einen über den oben beschriebenen Mechanismus den Gefäßtonus reguliert, zum Anderen aber auch die Proliferation der glatten Muskelzellen sowie die luminale Blutzelladhäsion inhibiert (Kubes et al., 1991; Scott-Burden und Vanhoutte, 1994). Die Kontrolle des Gefäßtonus in den Leitungsarterien und den Widerstandsgefäßen durch NO ist essenziell für die Aufrechterhaltung des basalen Blutflusses und die Regulation des Blutdruckes (Vallance et al., 1989; Stamler et al., 1994). Durch seine Wirkung auf die Koronararterien zeichnet sich NO als ein wesentlicher Determinant der Herzmuskeldurchblutung und somit der regionalen myokardialen Funktion aus. Bei Koronarstenose führt die NO-vermittelte Vasodilatation zur Erhaltung der myokardialen Perfusion distal der Stenose (Duncker und Bache, 1994). NO besitzt eine kardioprotektive Wirkung beim myokardialen Ischämie-Reperfusionsschaden, indem es diejenigen Mechanismen moduliert, die für die Zytotoxizität nach schwerer Ischämie verantwortlich sind (Schulz et al., 2004). Sowohl endothelial synthetisiertes als auch von den Thrombozyten selbst als negativer Feedback-Mechanismus produziertes NO inhibiert die Plättchenaggregation und wirkt somit antithrombotisch (Radomski et al., 1991; Loscalzo, 2001). Eine besondere pathophysiologische Bedeutung wird NO beim Phänomen des septischen Schocks zugeschrieben. Die Zytokin-vermittelte kontinuierliche NO-Produktion führt zu einer ungebremsten Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase und hat somit eine gegenüber Vasokonstriktoren resistente Relaxation der glatten Muskelzelle zur Folge, was zur massiven Vasodilatation mit Blutdruckabfall und konsekutivem Gewebeschaden führt (Parratt, 1998; Kuhl und Rosen, 1998).

Die vielfältigen Funktionen von NO im Gefäßsystem zeigen beispielhaft die enorme Potenz dieses Botenstoffes, der von vielen verschiedenen Zelltypen synthetisiert wird und sowohl unter physiologischen als auch unter pathologischen Bedingungen herausragende Bedeutung für den menschlichen Organismus hat.

1.2 Enzymatische NO-Produktion durch die NO-Synthase und ihre Regulation

Die enzymatische Produktion von NO wird durch eine Gruppe von NO-Synthasen (NOS) bewerkstelligt. Durch die Umwandlung von L-Arginin zu L-Citrullin durch Oxidation einer der basischen Guanidin-Stickstoff-Gruppen des Arginins unter Anwesenheit multipler Kofaktoren und Verwendung molekularen Sauerstoffs entsteht NO (Palmer et al., 1988;

Leone et al., 1991). Die an der NO-Synthese beteiligten Kofaktoren sind Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH), Tetrahydrobiopterin (BH₄), Flavin-Adenosin-Dinukleotid (FAD) und Flavin-Mononukleotid (FMN) (Knowles und Moncada, 1994; Marletta, 1994; Nathan und Xie, 1994). Die NO-Synthase ist ein dimeres Protein mit einer N-terminalen Oxygenase-Domäne, welche Bindungsstellen für Häm, BH₄ und L-Arginin besitzt, und einer C-terminalen Reduktase-Domäne mit Bindungsstellen für FAD, FMN und NADPH (Ghosh und Stuehr, 1995). Durch Umwandlung von NADPH zu NADP⁺ an der Reduktase-Domäne und Weitertransport des abgegebenen Elektrons mittels der Redox-Carrier FAD und FMN gelangt dieses zur Oxygenase-Domäne. Hier interagiert es mit dem Hämeisen und wird mittels BH₄ auf eine Guanidin-Stickstoff-Gruppe des L-Arginins transferiert. So entsteht an der aktiven Seite der Oxygenase-Domäne zunächst durch die Reaktion von L-Arginin mit molekularem Sauerstoff das Zwischenprodukt N^ω-Hydroxy-L-Arginin und dann in einer zweiten Reaktion schließlich L-Citrullin und NO (Stuehr et al., 1991; Alderton et al., 2001).

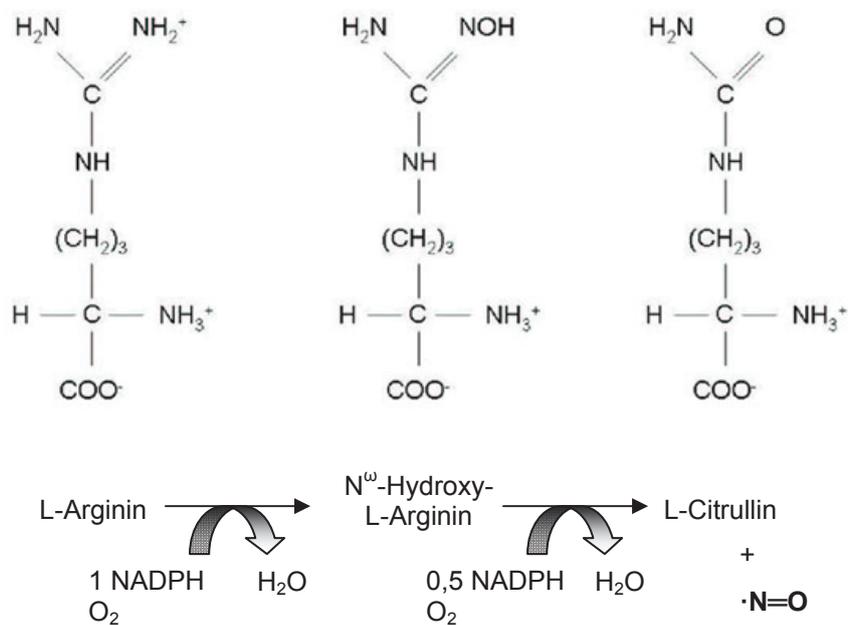


Abb.2

Reaktionsschema für die Entstehung von NO aus L-Arginin (Bryan et al., 2009).

Es gibt hauptsächlich drei Isoformen der NO-Synthase: Eine neuronale (nNOS), eine endotheliale (eNOS) und eine induzierbare NOS (iNOS). Die Klassifikation der NOS-Isoformen beruht auf der Tatsache, dass die endotheliale und die neuronale NOS konstitutiv exprimiert werden und ihre Aktivität „posttranslational“ – v.a. durch den intrazellulären Calciumspiegel – moduliert wird, während die Expression und Aktivierung der NOS-Isoform

in den Zellen der Immunabwehr erst auf immunologische und inflammatorische Stimuli hin erfolgt, d.h. sie wird auf Genebene nach Bedarf des Organismus „angeschaltet“ (Moncada und Higgs, 1993; Nathan, 1997). Einmal aktiviert, „arbeitet“ die iNOS dann jedoch – im Gegensatz zur eNOS bzw. nNOS – unabhängig vom intrazellulären Calciumspiegel und produziert NO in großen Mengen und von langer Dauer (Moncada, 1999). Die iNOS-Genexpression wird auf transkriptioneller Ebene durch verschiedene proinflammatorische Zytokine wie Interleukin-1 β , Interleukin-6 und Interferon- γ sowie durch bakterielles Lipopolysaccharid induziert (Förstermann et al., 1995). In der zur Aktivierung der iNOS-Genexpression führenden Signalkaskade ist die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF- κ B und STAT-1 α von entscheidender Bedeutung. Auch posttranskriptionell existieren diverse Mechanismen, die in der Regulation der iNOS-Expression involviert sind (Kleinert et al., 2004). Von klinischer Bedeutung ist hier insbesondere die Hemmung der iNOS-Aktivierung durch Glucocorticoide (Radomski et al., 1990). Das durch die iNOS synthetisierte NO ist aufgrund seiner zytotoxischen Eigenschaften ein effektives antimikrobielles Agens, das sowohl gegen intra- als auch extrazelluläre Erreger wirkt (Chakravorty und Hensel, 2003). Eine strenge Regulation des iNOS-vermittelten NO-Pools ist mit verantwortlich für die unterschiedlichen klinischen Ausprägungen verschiedener Infektionen (Das et al., 2010).

Nahezu alle Zellarten besitzen eine der NOS-Isoformen (Förstermann et al., 1994; Michel und Feron, 1997). Die NO-Synthese im vaskulären System wird unter physiologischen Bedingungen v.a. durch die eNOS bewerkstelligt. Die NO-Produktion durch die eNOS wird dabei durch verschiedene Faktoren moduliert, von denen im Folgenden die wichtigsten näher beschrieben werden, da sie auch für die in dieser Arbeit untersuchte erythrozytäre NO-Synthese von großer Relevanz sein könnten: 1) intrazelluläre Verfügbarkeit von L-Arginin, dem Substrat der eNOS, 2) intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration, 3) regulierte Protein-Protein-Interaktionen, 4) posttranslationale Phosphorylierung und 5) Konzentration an endogenen Inhibitoren.

1) Die intrazelluläre Verfügbarkeit von L-Arginin wird zum Einen durch den Import in die Zelle und zum Anderen durch die Umsetzung durch das mit der eNOS kompetitierende Enzym Arginase determiniert. Verantwortlich für den Ein- bzw. Ausstrom des eNOS-Substrates L-Arginin durch die Zellmembran sind zwei aktive, sättigbare Transportsysteme. Das y⁺-System, erstmals identifiziert in Ehrlich-Zellen, besitzt hohe Affinität zu den kationischen Aminosäuren L-Arginin, L-Lysin und L-Ornithin (Christensen, 1964). Das spezifische kinetische Verhalten dieses Transportsystems, das auf einer Asymmetrie im Sättigungsverhalten hinsichtlich Substrateinstrom und -ausstrom beruht, erlaubt eine

intrazelluläre Akkumulation von L-Arginin (White und Christensen, 1982). Aufgrund seiner Selektivität für kationische Aminosäuren beschreibt das y^+ -System die gesamte Aktivität der CAT-Transporter (CAT = *cationic amino acid transporters*) (Devés und Boyd, 1998). Es konnte gezeigt werden, dass der Arginintransport via CAT1 von wesentlicher Bedeutung für die Differenzierung von Erythrozyten ist (Shima et al., 2006). Die Kolokalisation der eNOS mit dem Arginin-Transporter CAT1 in den Caveolae der Endothelzelle schafft die Möglichkeit der direkten Verbindung zwischen Substrat und Enzym und ist somit Voraussetzung für eine optimale endotheliale NO-Produktion (McDonald et al., 1997). Es konnte gezeigt werden, dass NOS-Agonisten und NO-Donoren die Transportfunktion des y^+ -Systems beeinflussen, indem sie die y^+ -Aktivität und somit den Arginintransport in die Zelle erhöhen. Eine längere Abwesenheit dieser Substanzen hingegen wirkt sich suppressiv auf die Transportfunktion des y^+ -Systems aus (Ogonowski et al., 2000). Das zweite Transportsystem für L-Arginin ist das y^+L -System, welches in menschlichen Erythrozyten entdeckt wurde und neben den kationischen Aminosäuren L-Arginin und L-Lysin auch neutrale Aminosäuren wie L-Leucin und L-Valin transportiert (Devés et al., 1992). Zu diesem System gehören u.a. die Transporter y^+LAT1 und y^+LAT2 (Torrents et al., 1998; Bröer et al., 2000). Aber nicht nur der Transport von Arginin in die Zelle determiniert die intrazelluläre Verfügbarkeit von L-Arginin für die NO-Produktion via NOS, sondern auch die Aktivität des Enzyms Arginase. Dieses Hauptenzym des Harnstoffzyklus inhibiert die eNOS-medierte NO-Synthese durch Konkurrenz um das Substrat L-Arginin, das sie zu Harnstoff und die nicht proteinogene Aminosäure L-Ornithin hydrolysiert (Durante et al., 2007). Die im Lebergewebe exprimierte und im Zytosol lokalisierte Arginase I macht den Großteil der Arginase-Gesamtaktivität im Körper aus, während die Arginase II eine heterogenere Gewebeverteilung besitzt (Expression u.a. in Niere, Gehirn und Prostata) und subzellulär mitochondrial lokalisiert ist (Vockley et al., 1996; Morris et al., 1997). Beide Isoformen der Arginase konnten auch in der Gefäßwand gefunden werden. Während in den glatten Muskelzellen selektiv die Arginase I exprimiert wird, wurden in den Endothelzellen indes beide Isoformen der Arginase gefunden (Buga et al., 1996; Durante et al., 2000 und 2001; Bachetti et al., 2004). Das Arginase-Produkt L-Ornithin wird zu verschiedenen Polyaminen verstoffwechselt, die eine wesentliche Rolle in der Proliferation der glatten Muskelzellen der Gefäßwand spielen (Ignarro et al., 2001). Demzufolge wird der Expression der Arginase eine Bedeutung im vaskulären *remodeling* und in der Atherosuszeptibilität zugeschrieben (Teupser et al., 2006; Peyton et al., 2009). Eine Überexpression der Arginase in Endothelzellen und die damit einhergehende Reduktion der NO-Produktion konnten in zahlreichen pathologischen Zuständen, darunter arterielle

Hypertonie und Diabetes mellitus, nachgewiesen werden (Sahach et al., 2000; Bivalacqua et al., 2001). Auch in Erythrozyten wird die Arginase I exprimiert (Kim et al., 2002). Die in den Erythrozyten exprimierte Arginase spielt u.a. eine wichtige Rolle in der bluttransfusionsinduzierten Immunsuppression (Prins et al., 2001; Bernard et al., 2007).

2 und 3) Von entscheidender Bedeutung für die endotheliale NO-Bildung ist außerdem die Regulation der eNOS-Aktivität durch den intrazellulären Ca^{2+} -Spiegel (Busse und Fleming, 1995). Eine Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration in der Zelle wird einerseits durch Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern und andererseits durch Ca^{2+} -Einstrom von außen durch die Plasmamembran erreicht. Als Folge des intrazellulären Ca^{2+} -Konzentrationsanstiegs kommt es bei der neuronalen und endothelialen NO-Synthase zur reversiblen Bindung von Calmodulin an das Enzym. Dadurch wird die Interaktion zwischen der eNOS und dem in den Membrancaveolen lokalisierten Protein Caveolin-1 zerstört, was eine Disinhibition des Enzyms zur Folge hat (Feron et al., 1998). Calmodulin steuert den Elektronentransfer in Richtung Hämgruppe der NO-Synthase, es erlaubt die schnelle enzymatische Oxidation von NADPH unter Anwesenheit von O_2 und triggert so die enzymatische NO-Produktion (Abu-Soud und Stuehr, 1993). Bei erneuter Abnahme der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration kommt es zur Reassoziaton der eNOS an Caveolin-1, und die Enzymaktivität wird wieder inhibiert (Feron et al., 1998).

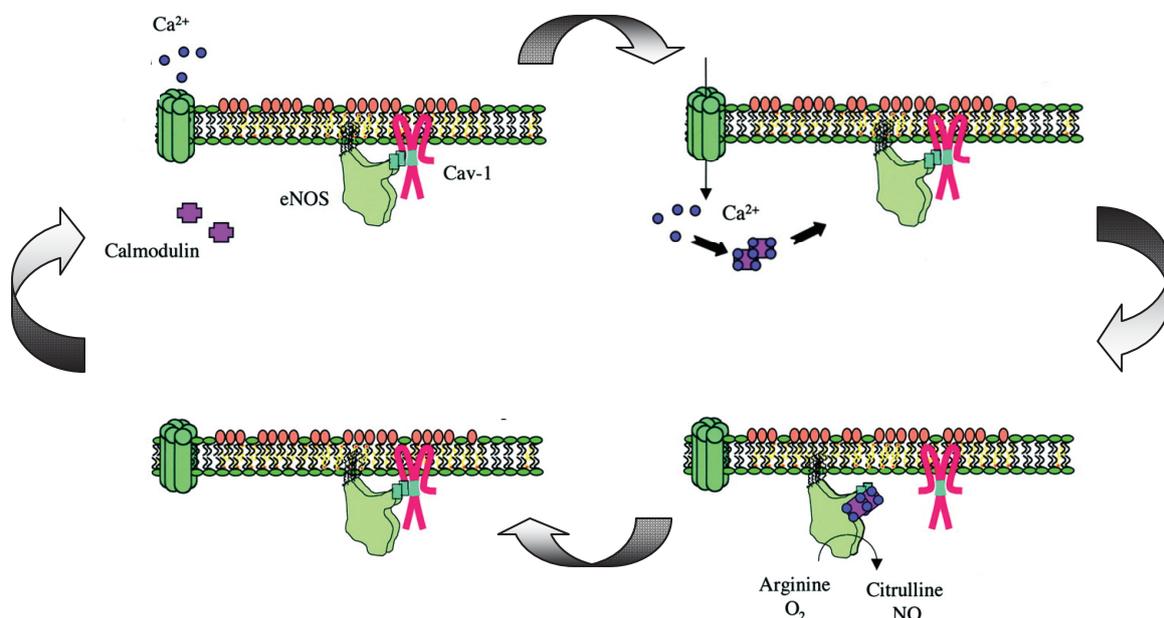


Abb.3

Schematische Darstellung des eNOS-Aktivierungszyklus in den Caveolae der Endothelzelle (nach Razani et al., 2002). Im inaktiven Zustand befindet sich die eNOS gebunden an dem in der Zellmembran verankerten Protein Caveolin-1 (Cav-1). Durch Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration (Ca^{2+}) kommt es zur Bindung von Calmodulin an die eNOS, wodurch die Assoziaton mit Caveolin-1 zerstört wird. Dies führt zur Aktivierung der eNOS. Bei erneuter Abnahme der intrazellulären Calciumkonzentration kommt es wieder zur Bindung an Caveolin-1 und die Enzymaktivität wird inhibiert.

Die Interaktion zwischen der eNOS und Caveolin-1 bzw. Calmodulin, die über die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration reguliert wird, ist zwar von entscheidender regulatorischer Bedeutung für die endotheliale NO-Produktion, darüber hinaus existieren jedoch auch noch weitere Interaktionen mit intrazellulären Proteinen, die eine wichtige Rolle in der eNOS-medierten NO-Bildung spielen. Hier sind v.a. die NOS-interagierenden Proteine NOSIP und NOSTRIN zu nennen, die die subzelluläre Lokalisation von eNOS regulieren und damit indirekt deren Aktivität (Dedio et al., 2001; Zimmermann et al., 2002; Schleicher et al., 2005).

4) Ein weiterer wichtiger Aktivierungsmechanismus der eNOS ist die Phosphorylierung von Serin 1177. Diese wird unter physiologischen Bedingungen, in denen der Scherstress den wesentlichen Stimulus für die kontinuierliche NO-Produktion durch die Endothelzelle darstellt, Ca^{2+} -unabhängig durch die Serin/Threonin-Proteinkinase Akt/PKB vermittelt (Dimmeler et al., 1999). Bei starker körperlicher Belastung und Ischämie hingegen wird Serin 1177 unter Anwesenheit von Ca^{2+} -Calmodulin durch die AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK) phosphoryliert. Die AMPK ist außerdem verantwortlich für die konstitutive, Ca^{2+} -unabhängige Phosphorylierung der eNOS an Threonin 495 in der Ca^{2+} -Calmodulin-Bindungsdomäne, die eine Inhibition der eNOS-Aktivität zur Folge hat (Chen et al., 1999). Die Ca^{2+} -abhängige Aktivierung der eNOS ist des Weiteren assoziiert mit einer Dephosphorylierung von Threonin 495 in der Ca^{2+} -Calmodulin-Bindungsdomäne. Dies verbessert die Bindung von Calmodulin (Fleming et al., 2001). Bei zahlreichen pathologischen Zuständen konnten Veränderungen der Phosphorylierung der eNOS nachgewiesen werden. So geht die erektile Dysfunktion im Alter mit einer signifikanten Erniedrigung der Phosphorylierung der eNOS an Serin 1177 und einer signifikanten Erhöhung der Phosphorylierung an Threonin 495 einher. Die erniedrigte Serin-1177-Phosphorylierung lässt sich durch Gabe des Wachstumsfaktors VEGF (*vascular endothelial growth factor*) rückgängig machen (Musicki et al., 2005). Hyperglykämie inhibiert die eNOS-Aktivität, indem es hierbei zur verstärkten posttranslationalen Modifikation von N-Acetylglucosamin und zu einer Abnahme der Phosphorylierung von Serin 1177 kommt. Dies könnte Hinweise auf die Pathogenese der beschleunigten Arteriosklerose bei Diabetes mellitus geben (Du et al., 2001). In Arterien von hypertensiven Ratten wurde eine verminderte Phosphorylierung der eNOS an Serin 1179 und 635 nachgewiesen und als wesentlicher pathogenetischer Faktor für die endotheliale Dysfunktion bei Hypertension bestimmt, eher noch als eine gesteigerte Superoxid-Produktion (Sasser et al., 2004).

5) Als effektive endogene Inhibitoren der NO-Synthase gelten die methylierten Arginin-Analoga N^{G} -Monomethylarginin (NMMA) und $\text{N}^{\text{G}},\text{N}^{\text{G}}$ -Dimethylarginin (ADMA), indem sie

untereinander und mit Arginin um den Transport in die Zelle mittels γ^+ -System kompetieren (Leiper und Vallance, 1999). Da ADMA in ca. 10-fach höherer Plasmakonzentration als NMMA vorliegt, stellt dieses Arginin-Analogon den wichtigsten endogenen NOS-Inhibitor dar (Cooke, 2000). Sowohl Produktion als auch Metabolismus der als endogene NOS-Inhibitoren fungierenden methylierten Arginin-Analoga werden aktiv reguliert, und eine Dysregulation in diesem Stoffwechsel kann in einer Erhöhung des freien Methylarginins resultieren (Leiper und Vallance, 1999). Eine Erhöhung der Plasmakonzentration von ADMA konnte bereits bei den kardiovaskulären Risikofaktoren Hypercholesterinämie, arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus und hohes Lebensalter nachgewiesen werden (Böger et al., 1998; Miyazaki et al., 1999). Die positive Korrelation des Plasmaspiegels von ADMA mit der Intima-Media-Dicke der A. carotis lässt vermuten, dass ADMA möglicherweise einen frühen Marker der Arteriosklerose darstellt (Miyazaki et al., 1999).

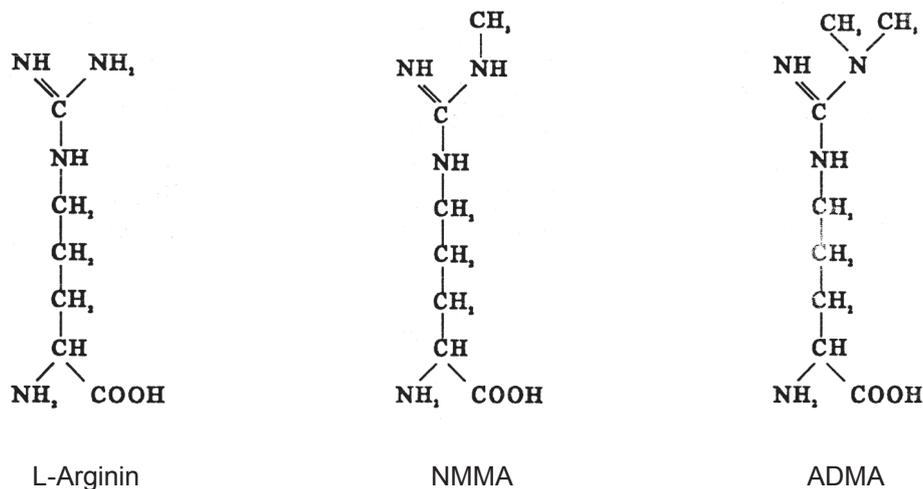


Abb.4
Strukturformeln von L-Arginin, N^G-Monomethylarginin (NMMA) und N^G,N^G-Dimethylarginin (ADMA). Man beachte die strukturelle Ähnlichkeit von L-Arginin, dem Substrat der NOS, mit den endogenen NOS-Inhibitoren NMMA und ADMA.

Insgesamt sind die komplexen Interaktionen der verschiedenen zellulären Signalwege, die die eNOS-Lokalisation und -Aktivität regulieren, noch keinesfalls vollständig verstanden und nach wie vor Gegenstand intensiver Forschung. Die Entschlüsselung dieser Mechanismen dient v.a. der Identifizierung neuer therapeutischer Ansatzpunkte bei kardiovaskulären Erkrankungen (Michel und Vanhoutte, 2010).

1.3 Die Rolle der Erythrozyten im NO-Metabolismus

Ein Großteil der biochemischen Reaktionen von NO im Blut besteht aus der Oxidation zu Nitrit und weiter zu Nitrat, der Nitrosylierung von Proteinen mit Thiol- (RSNO) und Aminogruppen (RNNO) sowie der Bildung von Eisennitrosyl-Verbindungen (Rassaf et al.,

2002). Aufgrund der schnellen Inaktivierungsreaktionen von NO mit Hämoglobin hat man stets angenommen, dass Erythrozyten große Mengen an NO „auffangen“ und somit imstande sind, die Bioverfügbarkeit des vasodilatatorisch aktiven NO stark zu verringern. Die Sichtweise über die Rolle der Erythrozyten als „Transportmittel“ für bioaktives NO ist in den letzten Jahren jedoch erweitert worden. So ist zunehmend auch die Funktion des Hämoglobins als Nitritreduktase und deren physiologische Bedeutung in den Vordergrund des forschenden Interesses getreten; die Erythrozyten wurden mehr und mehr als bedeutende eigenständige NO-Quelle angesehen. Eine wichtige Reaktion in diesem Zusammenhang ist die Oxidation von Desoxyhämoglobin zu Methämoglobin durch Nitrit, wodurch NO entsteht. Diese Hämoglobin-vermittelte Konversion von Nitrit zu NO unterliegt den klassischen allosterischen Kontrollmechanismen des Hämoglobins, so wie sie bei der Sauerstoffbindung von Bedeutung sind. Die enge Kopplung der Hämoglobin-vermittelten NO-Bildung mit der erythrozytären Sauerstoffaufnahme und -freisetzung zeigt die enorme physiologische Bedeutung der Nitritreduktaseaktivität des Hämoglobins für das Phänomen der hypoxischen Vasodilatation bzw. hyperoxischen Vasokonstriktion (McMahon et al., 2002; Cosby et al., 2003; Gladwin und Kim-Shapiro, 2008). Inhalierendes Nitrit führt zu einer Verbesserung hypoxisch bedingter pulmonaler Hypertension, was auch die klinische Relevanz der Desoxyhämoglobin-medierten Nitritreduktion unterstreicht (Hunter et al., 2004). Als schwierig erweist sich allerdings die Erklärung, wie das durch die Hämoglobin-vermittelte Nitritreduktion gebildete NO den Erythrozyten verlassen kann, ohne direkt wieder durch Bindung an das Eisen der Häm-Gruppe des desoxygenierten Hämoglobins bzw. durch Reaktion mit Oxyhämoglobin unter Bildung von Methämoglobin und Nitrat „inaktiviert“ zu werden (Doyle und Hoekstra, 1981; Gow und Stamler, 1998; Kelm, 1999). Hierbei könnte die erneute Oxidation von gebildetem Eisen(II)-Nitrosylhämoglobin durch Oxidanzien wie Peroxynitrit und die damit einhergehende NO-Freisetzung eine wichtige Rolle spielen (Herold, 2004). Es wird außerdem vermutet, dass das gebildete NO über ein Zwischenprodukt aus dem Erythrozyten transportiert wird, z.B. N_2O_3 . Dieses könnte direkt oder über Bildung von Nitrosothiolen aus der Zelle exportiert werden (Basu et al., 2007). Eine Erklärung für den Export der „NO-Bioaktivität“ aus dem Erythrozyten könnte in diesem Zusammenhang die Bindung von S-Nitrosothiol an den membranständigen Anionenaustauscher AE1 liefern (Pawloski et al., 2001). Zusammenfassend kann man sagen, dass die Mechanismen des NO-Exports aus dem Erythrozyten bei Weitem noch nicht zufriedenstellend geklärt sind.

Es konnte gezeigt werden, dass der NO-Verbrauch durch intraerythrozytäres Hämoglobin insgesamt ca. 650-mal langsamer verläuft als der NO-Verbrauch durch freies Hämoglobin,

bedingt durch die natürlichen Diffusionsbarrieren zwischen dem Endothel und dem intraerythrozytären Hämoglobin (Liu et al., 1998; Vaughn et al., 1998 und 2000). Azarov et al. (2011) konnten feststellen, dass hierbei v.a. die extrazelluläre Diffusion des NO zur Membran und die Membranpermeabilität die entscheidenden diffusionslimitierenden Faktoren für die erythrozytäre NO-Aufnahme darstellen. Die natürliche Kompartimentierung des Hämoglobins innerhalb der Erythrozyten ist somit wichtige Voraussetzung für eine stabile Halbwertszeit des biologisch aktiven NO im Gefäßlumen.

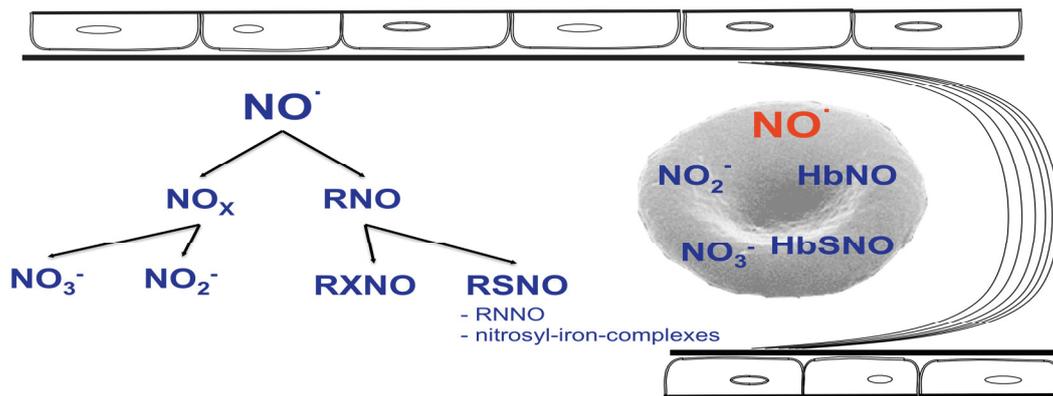


Abb.5

Schematische Darstellung des vaskulären NO-Pools, der sich aus intraplasmatischem und intraerythrozytärem NO zusammensetzt. Wichtige NO-Quellen im Blutplasma bzw. in den Erythrozyten sind die Oxidationsprodukte von NO, Nitrit (NO_2^-) und Nitrat (NO_3^-), nitrosylierte Proteine mit Thiol- (RSNO bzw. HbSNO) und Aminogruppen (RNNO) sowie Eisennitrosyl-Verbindungen (z.B. HbNO).

Webb et al. (2008) konnten zeigen, dass eine Erythrozyten-assoziierte Reduktion von Nitrit zu NO auch enzymatisch durch die Xanthinoxidoreduktase (XOR) und die erythrozytäre NO-Synthase erfolgen kann. Die an der Außenfläche von Endothelzellen und Erythrozyten lokalisierte Xanthinoxidoreduktase trägt wesentlich zur Nitritreduktase-Gesamtaktivität des Gefäßsystems bei. Der Anteil der an der Erythrozytenmembran lokalisierten XOR scheint in Abhängigkeit vom pO_2 und pH zu variieren, so dass die Bedeutung dieses Erythrozyten-assoziierten Enzyms für die NO-Produktion unter normoxischen bzw. physiologischen Bedingungen noch evaluiert werden muss. Auch die erythrozytäre NO-Synthase, die im nächsten Abschnitt näher beschrieben wird, besitzt eine Nitritreduktaseaktivität, die ebenfalls unter hypoxischen Bedingungen bei Mangel des natürlichen NOS-Substrates Arginin wichtige Bedeutung zu haben scheint (Webb et al., 2008).

Die Reduktion von Nitrit zu NO durch den Erythrozyten stellt in jedem Fall eine wichtige NO-Quelle im Gefäßsystem dar, die v.a. unter hypoxischen bzw. azidotischen Bedingungen von großer Bedeutung für das Kreislaufsystem ist.

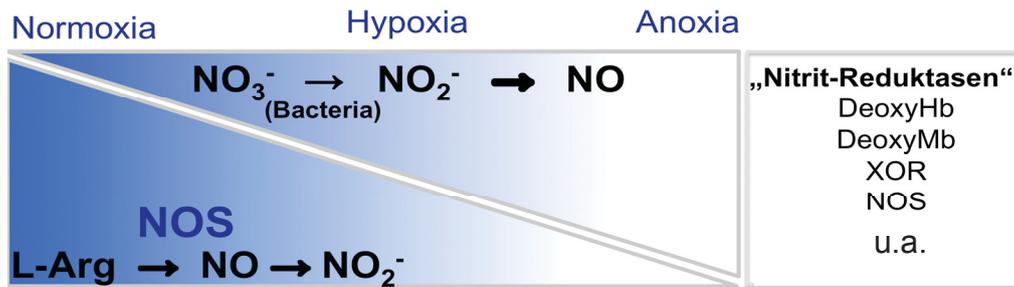


Abb.6

Enzymatische und nicht-enzymatische NO-Produktion in Abhängigkeit von der Sauerstoffversorgung des Gewebes. Während unter Normoxie die enzymatische NO-Produktion via NO-Synthase den Hauptanteil des biologisch aktiven NO liefert, nimmt unter zunehmender Hypoxie die Bedeutung der Nitritreduktion für die NO-Bildung immer mehr zu. Als physiologische „Nitritreduktasen“ fungieren dabei u.a. desoxygeniertes Häm- bzw. Myoglobin (DeoxyHb bzw. -Mb) sowie die Enzyme Xanthinoxidoreduktase (XOR) und NO-Synthase (NOS).

1.4 Nachweis und Funktion einer erythrozytären NO-Synthase

Die Erythrozyten spielen also eine zentrale Rolle im NO-Metabolismus, auch wenn zunächst nur die Transportfunktion des Erythrozyten für NO und seine Metabolite erkannt wurde. Zunehmend jedoch erschienen auch Ausführungen, die auf die Möglichkeit hinwiesen, dass die Erythrozyten ihrerseits ein NOS-Protein besitzen. Insgesamt finden sich in der Literatur jedoch keine einheitlichen Angaben zur Expression einer NO-Synthase in Erythrozyten und ihr proteinbiochemischer Nachweis stellt immer noch eine Herausforderung dar, v.a. auch bedingt durch den hohen Gehalt an Hämoglobin und den damit verbundenen hohen Aufwand bei der Proteinisolierung. Jubelin und Gierman (1996) konnten durch immunhistochemische Untersuchungen sowohl die eNOS als auch die iNOS in menschlichen Erythrozyten nachweisen. Chen und Mehta (1998) konnten durch Inkubation von lysierten Erythrozyten mit H³-markiertem L-Arginin eine Zunahme der Konversion von Arginin zu Citrullin messen, die sich durch Behandlung mit spezifischen NOS-Inhibitoren hemmen ließ. Außerdem konnten sie erstmals die endotheliale Isoform der NO-Synthase mit einem Molekulargewicht von ≈140 kDa im Zytosol der Erythrozyten mittels Western-Blot-Analyse identifizieren (Chen und Mehta, 1998). Durch Western-Blot-Analysen konnten Kang et al. (2000) die Existenz einer eNOS und iNOS im Erythrozyten bestätigen, allerdings keine katalytische Aktivität der Enzyme nachweisen. Ca. fünf Jahre später konnten Kleinbongard et al. (2006) u.a. durch Messung der NOS-abhängigen NO-Freisetzung aus Erythrozyten mittels Chemilumineszenz-Detektion und Oxyhämoglobin-Assay sowie der damit verbundenen Konzentrationsveränderung von NO-Metaboliten im Plasma die Aktivität einer in menschlichen Erythrozyten exprimierten NO-Synthase belegen. Dieselbe Arbeitsgruppe konnte des Weiteren durch immunhistochemische Untersuchungen von Erythrozyten-Gefrierschnitten die eNOS im Zytoplasma und in der dem Zytoplasma anliegenden Hälfte der Zellmembran lokalisieren. Diese Ergebnisse wurden durch Western-Blot- und RT-PCR-

Analysen sowie durch Untersuchungen an homozygoten eNOS-*knock-out*-Mäusen gestützt. Die erythrozytäre NO-Synthase gleicht auch in ihrem Muster an Regulationsmechanismen in vielfacher Hinsicht der endothelialen NO-Synthase. Beide werden stimuliert durch ihr Substrat L-Arginin, sprechen auf dieselben NOS-Inhibitoren an, und ihre Aktivität hängt vom intrazellulären Calciumspiegel und von der Phosphorylierung an Serin 1177, reguliert durch die Phosphoinositid-3-Kinase, ab (Kleinbongard et al., 2006). Es konnte also gezeigt werden, dass sich ein hinsichtlich seiner Aktivität und Regulation eNOS-ähnliches Protein in den Erythrozyten befindet. Welche NOS-Isoform bzw. -Isoformen sich jedoch tatsächlich in den Erythrozyten befindet bzw. befinden, steht nach wie vor zur Debatte. Dementsprechend ist auch die (patho-)physiologische Rolle des in den Erythrozyten enzymatisch produzierten NO und seine klinische Relevanz bislang noch nicht ausreichend geklärt worden. Allerdings zeigt die Perfusion von Herzen mit gereinigten Erythrozyten kardioprotektive Effekte beim myokardialen Ischämie-Reperfusionsschaden, die sich durch Zugabe von NOS-Inhibitoren aufheben lassen, so dass von einem Erythrozyten-vermittelten, NOS-abhängigen Protektionsmechanismus ausgegangen werden kann (Yang et al., 1996). Behandlung humaner Erythrozyten mit Wasserstoffperoxid führt zur verstärkten NO- und Peroxynitrit-Bildung, die durch den NOS-Inhibitor L-NMMA inhibiert werden kann, was für die Beteiligung einer erythrozytären NO-Synthase spricht. Die vermehrte Peroxynitrit-Bildung bei Brustkrebspatienten könnte über eine Verstärkung der Membranrigidität zur Verminderung der Erythrozytenüberlebenszeit beitragen, was auf eine potenzielle Rolle der erythrozytären NO-Synthase in der Pathogenese der toxischen Anämie bei Krebspatienten hinweist (Deliconstantinos et al., 1995). Des Weiteren konnte herausgefunden werden, dass Erythropoetin zur Aktivierung der NO-Synthase in Mauserythrozyten führt. Die Anzahl der erythrozytären Erythropoetin-Rezeptoren hängt dabei vom Alter der Erythrozyten ab: Je jünger die Zellen sind, umso mehr Rezeptoren besitzen sie. Durch die NOS-Aktivierung in Erythrozyten hat Erythropoetin somit wichtige Bedeutung für die zellulären Eigenschaften der Erythrozyten, insbesondere für die Aufrechterhaltung des zellulären Redox-Potenzials (Mihov et al., 2009).

Die Charakterisierung der NO-Synthase in Erythrozyten ist keineswegs vollständig, was v.a. am Mangel an zuverlässigen Methoden zur Isolierung des Enzyms aus den Erythrozyten liegt. Es ist von großer Bedeutung, zu untersuchen, ob eine erythrozytäre NO-Synthase überhaupt NO in physiologisch relevanten Mengen produziert, um welche Isoform es sich genau handelt und welchen erythrozytenspezifischen Regulationsmechanismen sie unterliegt.

Nur durch Beantwortung dieser grundlegenden Fragen kann die klinische Relevanz einer NO-Synthese in menschlichen Erythrozyten ausreichend herausgearbeitet werden.

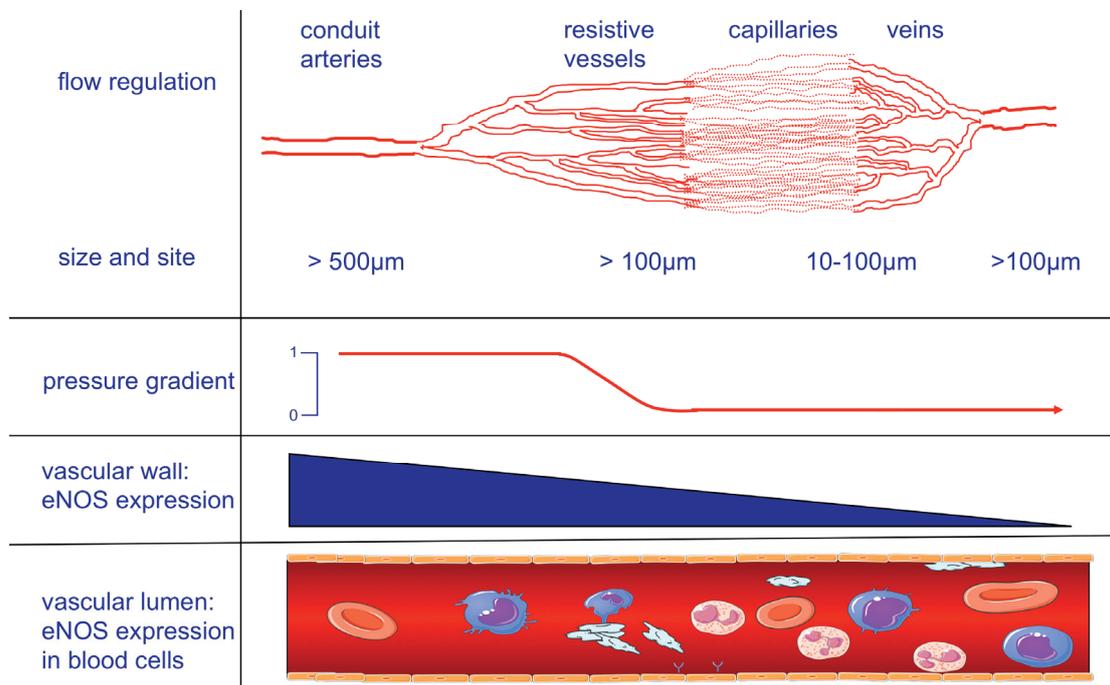


Abb.7

eNOS-Verteilungsmuster entlang des Gefäßbettes im Hinblick auf die potenzielle Bedeutung der erythrozytären NOS-Aktivität (nach Kleinbongard et al., 2007). Mit abnehmendem Gefäßdurchmesser nimmt auch die Expression der eNOS in der Gefäßwand ab. Beim Übergang von den Widerstandsgefäßen zum Kapillarnetz kommt es zum Druckabfall mit Reduktion der Flussgeschwindigkeit, wodurch die luminalen Zelldichten und damit auch die Zellaggregabilität ansteigt. Um die ungehinderte Passage des Blutes durch das Kapillarnetz zu gewährleisten, muss bei reduzierter eNOS-Expression in der Gefäßwand der Anteil der NO-Produktion durch die Blutzellen zunehmen, was die potenzielle Bedeutung der erythrozytären NO-Synthase für die Mikrozirkulation unterstreicht.

1.5 NO-Messung mit dem Fluoreszenzmolekül 4-Amino-5-Methylamino-2',7'-Difluorofluorescein-Diacetat (DAF-FM-Diacetat)

Bei der Untersuchung von NO in biologischen Systemen stellt u.a. das von Kojima und Mitarbeitern entwickelte DAF-2 ein wichtiges Reagenz zur Quantifizierung niedriger NO-Konzentrationen dar (NO-Detektionsgrenze = 5nM). Als Erstes wurde dieses neuartige Fluorochrom in glatten Muskelzellen aus Rattenaorta angewandt, wo man eine von der intrazellulären NO-Konzentration abhängige Fluoreszenzintensität detektieren konnte (Kojima et al., 1998). DAF-FM-Diacetat ist ein zellpermeables Derivat von DAF-2, welches, nachdem es in die Zelle eingedrungen ist, zunächst durch intrazelluläre Esterasen zu DAF-FM deacetyliert wird. Dieses wird dann unter Anwesenheit von NO/O₂ in das intensiv grün fluoreszierende Triazolofluorescein (DAF-FM-T) umgewandelt. Durch Reaktion mit NO kommt es zu einem 160-fachen Anstieg der Fluoreszenzintensität (Kojima et al., 1999). Mit einem Extinktionsmaximum von 495nm und einem Emissionsmaximum von 515nm kann

DAF-FM von jedem Instrument detektiert werden, das auch Fluorescein oder FITC (Fluoresceinisothiocyanat) detektieren kann, darunter Durchflusszytometer, Fluorometer und Fluoreszenzmikroskope. DAF-2 wurde schon erfolgreich zur Identifizierung NO produzierender Neurone angewandt (Brown et al., 1999; Lopez-Figueroa et al., 2000). Durch Behandlung von Endothelzellen mit den Fluorochromen Fura-2 und DAF-2 gelang Berkels und Mitarbeitern außerdem die gleichzeitige Messung von intrazellulärem Calcium und NO (Berkels et al., 2000). Umstritten ist dagegen der erbrachte Nachweis einer *in-vivo*-NO-Produktion in Mitochondrien mittels DAF-2 durch Lopez-Figueroa et al. (2000).

Insgesamt scheint das Fluoreszenzmolekül DAF-FM-Diacetat mit seiner hohen Sensitivität bei der Detektion von NO in biologischen Systemen ideal dazu geeignet zu sein, die NO-Produktion in Erythrozyten zu messen, was eine wichtige Grundlage für die Untersuchung der intraerythrozytären NO-Quellen darstellt.

1.7 Ziel der Arbeit

Ziel dieser Doktorarbeit ist es, neue Erythrozyten-spezifische Methoden zur Isolierung und Charakterisierung der erythrozytären NO-Synthase und ihrer Regulation zu etablieren:

1) Isolierung und Charakterisierung des erythrozytären NOS-Proteins:

In dieser Arbeit sollte eine Strategie entwickelt werden, mit der eine sichere, unzweideutige direkte Identifizierung der erythrozytären NO-Synthase gelingt. Das Prinzip dieser Methode ist, dass die Erythrozyten zunächst lysiert werden und das erythrozytäre NOS-Protein dann über eine spezielle Immunpräzipitationsmethode aus diesem Lysat isoliert und dann mittels Gelelektrophorese aufgetrennt wird. Durch anschließende Visualisierung mittels Coomassie-Blau-Färbung und Überprüfung der Spezifität mit dem Verfahren der Western-Blot-Analyse sollte der Beweis für die Existenz einer eNOS in menschlichen Erythrozyten erbracht werden.

2) Messung von intrazellulärem NO in Erythrozyten mittels DAF-FM-Diacetat:

Die Etablierung der NO-Messung mittels DAF-FM-Diacetat in dieser Arbeit könnte durch zukünftige Anwendung in *in-vivo*- und klinischen Studien auch dazu beitragen, dass die klinische Bedeutung des NOS-abhängigen NO in Erythrozyten schließlich entschlüsselt wird.

2. Materialien und Methoden

2.1 Verwendete Chemikalien und Lösungen

4-Amino-5-Methylamino-2',7'-Difluoro-fluorescein-Diacetat (DAF-FM-Diacetat)	Invitrogen, Karlsruhe
2-Bis(2-hydroxyethyl)glycin (Bicine)	Sigma-Aldrich, Steinheim
3(N-Morpholino)-propanylsulfonsäure (MOPS)	Carl Roth, Karlsruhe
Antikörper:	
- polyklonal Kaninchen anti eNOS/NOS Typ III	BD Transduction Laboratories, Heidelberg
- monoklonal Maus anti eNOS	Sigma-Aldrich, Steinheim
- monoklonal Maus anti iNOS	Sigma-Aldrich, Steinheim
- Peroxidase konjugiert Ziege anti-Maus IgG, F _{ab} -Fragment	Rockland, Gilbertsville, USA
Aqua dest. (H ₂ O)	Millipore, Schwalbach
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Citronensäure Monohydrat (C ₆ H ₈ O ₇ *H ₂ O)	Merck, Darmstadt
Complete Protease Inhibitor Cocktail Tabletten	Roche, Kulmbach
Coomassie Brilliant Blau R-250	BioRad, München
Dextrose (D-(+)-Glucose)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Carl Roth, Karlsruhe
Dynabeads [®] ProteinG	Invitrogen, Karlsruhe
Essigsäure (C ₂ H ₄ O ₂)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethanol (C ₂ H ₆ O)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Flüssigstickstoff	RWTH-Aachen / HHU Düsseldorf
Glycerol (HOCH ₂ CH(OH)CH ₂ OH)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Heparin	Ratiopharm, Ulm
Kaliumnitrat (KNO ₃)	Sigma-Aldrich, Steinheim
L-/D-Arginin Monohydrochlorid (C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂ *HCl)	Sigma-Aldrich, Steinheim
L-/D-Lysin Monohydrochlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim

(H ₂ N(CH ₂) ₄ CH(NH ₂)CO ₂ H*HCl)	
L-/D-Ornithin Monohydrochlorid (C ₅ H ₁₂ N ₂ O ₂ *HCl)	Sigma-Aldrich, Steinheim
L-N5-(1-Iminoethyl)-Ornithin (L-NIO)	Axxora, Lörrach
L-Valin Methylester Hydrochlorid ((CH ₃) ₂ CHCH(NH ₂)COOCH ₃ *HCl)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Magermilchpulver	Carl Roth, Karlsruhe
MagicMark™ XP Western Protein Standard	Invitrogen, Karlsruhe
Methanol (CH ₄ O)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumchlorid (NaCl), 0,9%	B.Braun, Melsungen
Natriumcitrat Dihydrat (C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ *2 H ₂ O)	Merck, Darmstadt
Natriumnitrit (NaNO ₂)	Sigma-Aldrich, Steinheim
NO-Synthase, endothelial, rekombinant (135µg)	Sigma-Aldrich, Steinheim
NuPAGE® Antioxidant	Invitrogen, Karlsruhe
NuPAGE® LDS-(Lithiumdodecylsulfat-) Probenpuffer (4x)	Invitrogen, Karlsruhe
NuPAGE® Proben-Reduktionsmittel (10x)	Invitrogen, Karlsruhe
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)	Serag-Wiessner, Naila
Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat (Tween®20)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ponceau-S-Lösung (0,1% (w/v) in 5% Essigsäure)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Restore™ Western Blot Stripping Puffer	Thermo Scientific, Karlsruhe
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Gibco / Invitrogen, Karlsruhe
SuperSignal® West Pico Chemilumineszenz-Substrat	Thermo Scientific, Karlsruhe
Toluen (C ₆ H ₅ CH ₃)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris Base)	BioRad, München
Tris-gepufferte Salzlösung, TBS (Tris Base 10mM, NaCl 100mM)	BioRad, München
T-TBS Puffer (TBS + 0,1% Tween®20)	BioRad, München

2.2 Erythrozytenpräparation

Für alle Experimente wurde Blut aus der V. mediana cubiti gesunder weiblicher und männlicher Erwachsener verwendet. Alle Donoren gaben ihr schriftliches Einverständnis. Die Genehmigung erfolgte durch die Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (Referenznummer 3857). Um Gerinnung zu vermeiden, wurde stets unmittelbar nach der Blutentnahme 1µl Heparin 5000IE zu 1ml Blut gegeben. Für die Identifizierung des erythrozytären NOS-Proteins mittels Immunpräzipitation und Western-Blot-Analyse wurde das Blut zur Antikoagulation in ein Sammelmedium (1,32g Natriumcitrat Dihydrat, 0,48g Citronensäure Monohydrat, 1,47g Dextrose auf 100ml Aqua dest.) abgenommen (250µl/ml Blut).

2.3 Isolierung der NO-Synthase aus humanen Erythrozyten

2.3.1 Herstellung von Erythrozytenlysaten

Um das erythrozytäre NOS-Protein mittels Immunpräzipitation isolieren und nachfolgend mittels Western Blot identifizieren zu können, mussten die Erythrozyten zunächst lysiert werden. In einem ersten Schritt wurden dazu die Erythrozyten durch zweifache Zentrifugation (800xg und 300xg, je 10min bei 4°C) inklusive Reinigungsschritt mit 10-fachem Volumen isotonischer Kochsalzlösung (NaCl 0,9%) von den übrigen Zellpopulationen separiert, um eine hohe Reinheit der Erythrozytenpopulation für die nachfolgende Zellyse zu erzielen. Die Zellen, die sich nach der zweiten Zentrifugation von der plasmatischen Phase abgesetzt hatten, wurden in ein neues Gefäß abgetropft und dann zunächst in einer volumenäquivalenten hypotonen Protease-Inhibitor(25IE)-Aqua-dest.-Lösung resuspendiert. Danach wurde der aromatische Kohlenwasserstoff Toluol in 1,5-facher Menge zugegeben. Während die hypotone Protease-Inhibitor-H₂O-Lösung ein osmotisch bedingtes Anschwellen der Zellen zur Folge hat, führt Toluol als unpolares Lösungsmittel durch Einlagerung im hydrophoben Mittelteil der Lipiddoppelschicht zu einer Destabilisierung der Zellmembran, wodurch insgesamt eine effektive Zellyse erzielt wird. Durch den Protease-Inhibitor wird gleichzeitig der enzymatische Verdau der freigesetzten intrazellulären Proteine verhindert. Nach Zentrifugation der hergestellten Suspension bei 13000xg und 4°C für 10min konnten stets mehrere Schichten identifiziert werden: Eine obere flüssige, aus organischem Material bestehende Phase, eine mittlere feste Phase, die aus Fett bzw. Membranbestandteilen gebildet wurde, und eine untere Phase, die das eigentliche Zellysat darstellte. Auf dem Boden des Gefäßes befand sich außerdem stets noch ein Überstand aus nicht lysierten Zellen. Das Zellysat wurde vorsichtig entnommen und in ein neues Gefäß überführt, die restlichen

Phasen wurden verworfen. Nach Wiederholung dieser Prozedur, d.h. nach erneuter Zentrifugation und Überführung des Zelllysats in ein neues Gefäß, wurde das erhaltene Lysat so aufgeteilt, dass mindestens immer ein Teil für die folgende Immunpräzipitation und ein Teil für die dafür notwendige Proteinbestimmung zur Verfügung stand.

Zur Weiterverarbeitung zu einem späteren Zeitpunkt konnten die nach Zentrifugation pelletierten Erythrozyten auch durch Zugabe von gleichem Volumen eines Einfriermediums (17,64g Natriumcitrat Dihydrat in 1l PBS-Glycerol(40%)-Lösung, pH 7,4) und anschließendes Schockfrieren in Flüssigstickstoff bei -80 °C eingefroren werden.

2.3.2 Proteinbestimmung des Erythrozytenlysats

Um herauszufinden, wie das Erythrozytenlysate verdünnt werden muss, um die für die Immunpräzipitation notwendige Proteinkonzentration von 100mg/ml zu erreichen, musste die Ausgangsproteinkonzentration des Lysats bekannt sein. Hierzu wurde stets eine Proteinbestimmung mittels DC-Protein-Assay von BioRad nach dem Prinzip von Lowry et al. (1951) durchgeführt. Die Messung basiert auf einer Reaktion zwischen Protein und Kupfer in alkalischem Milieu, die eine Reduktion von Folin zu einer Substanz mit charakteristischer blauer Farbe von messbarer Intensität zur Folge hat. Folgende Lösungen wurden für den Assay verwendet:

Reagenz A	alkalische Kupfer-Tartrat-Lösung (BioRad, <i>Catalog 500-0113</i>)
Reagenz B	verdünntes Folin-Reagenz (BioRad, <i>Catalog 500-0114</i>)
Reagenz S	? (BioRad, <i>Catalog 500-0115</i>)
Arbeitslösung A'	20µl Reagenz S auf 1ml Reagenz A
Standard	Bovines Serum Albumin (Sigma-Aldrich, Protein Standard)

Tab.1

Für den BioRad-Protein-Assay verwendete Substanzen.

Zur Erstellung der Konzentration-Extinktion-Eichgeraden wurden neun Standardverdünnungen aus einer 10%-igen BSA-Stammlösung mit Aqua bidest hergestellt: 0mg/ml, 0,2mg/ml, 0,4mg/ml, 0,8mg/ml, 1mg/ml, 1,2mg/ml, 1,4mg/ml, 1,5mg/ml und 2mg/ml. Von dem zu bestimmenden Lysat wurden immer mehrere Verdünnungsstufen verwendet (1:10, 1:25, 1:50, 1:100 und 1:200), da man eine Verdünnung finden wollte, deren Absorption ungefähr in der Mitte der Standardkurve liegt. Die zu bestimmenden Proben (Standard und Lysat) wurden dann zu je 5µl in eine unbeschichtete 96-Well-Mikrotiterplatte als Doppelwerte pipettiert. Anschließend wurde zu allen Proben 25µl Arbeitslösung A' und dann 200µl Reagenz B pipettiert. Nach 15min Inkubation bei Raumtemperatur und unter Lichtausschluss konnte die Absorption fluorometrisch bei einer Wellenlänge von 740nm gemessen werden und die Proteinkonzentration des Lysats anhand der Eichgeraden ermittelt werden. Dem Ergebnis der Proteinbestimmung entsprechend konnte nun das Lysat so

verdünnt werden, dass eine Proteinkonzentration von 100mg/ml für die Immunpräzipitation resultierte.

2.3.3 Immunpräzipitation mit Kaninchen Anti-eNOS-Antikörpern und Dynabeads[®]ProteinG

Das Prinzip der Immunpräzipitation mit Dynabeads[®]ProteinG beruht auf der Bindung des für die Immunpräzipitation verwendeten Antikörpers über seine F_c-Region an polymere magnetische Partikel, so dass das zu präzipitierende Protein (in diesem Falle eNOS), welches an die F_{ab}-Region des Antikörpers bindet, mit Hilfe eines Magneten einfach und mit hoher Spezifität isoliert werden kann. Diese spezielle Form der Proteinisolierung ermöglicht eine saubere Trennung des in geringer Konzentration vorhandenen Ziel-Antigens von dem im Erythrozytenlysat in großer Menge frei vorliegenden Hämoglobin. Durch maximale Minimierung der Hämoglobinkontamination kann so die Wahrscheinlichkeit falsch positiver Ergebnisse reduziert werden.

2.3.3.1 Vorbereitung/Reinigung der Dynabeads[®]ProteinG

Nach gründlicher Durchmischung für ca. 20sec (Vortex) wurden zunächst stets 200µl Dynabeads[®]ProteinG (=6mg) in ein Eppendorfgefäß überführt. Um die Dynabeads[®]ProteinG von dem Puffer, in dem sie gelöst sind, zu separieren, wurde das Gefäß dann für 1min auf einem DynaMag[™]-2-Magnet (Invitrogen, Karlsruhe) platziert, wodurch die magnetischen Partikel an die dem Magnet anliegende Seite des Gefäßes gezogen wurden. Nach Abnahme des Überstandes und Entfernung des Gefäßes vom Magnet wurden die separierten Dynabeads[®]ProteinG in 200µl Reinigungspuffer (0,1M Na₂HPO₄, 0,01% Tween[®]20, pH 8,2) resuspendiert. Diese, im Folgenden nur noch als Reinigungsschritt beschriebene Prozedur (Platzierung auf dem Magnet → Abnahme des Überstandes → Resuspension der Dynabeads[®]ProteinG) wurde stets noch zweimal wiederholt, um eine möglichst hohe Reinheit der Partikel für die Antikörperbindung zu erzielen.

2.3.3.2 Immunpräzipitation des Ziel-Antigens (NO-Synthase)

Zunächst wurde das Erythrozytenlysat stets dem jeweiligen Ergebnis der Proteinbestimmung entsprechend mit Reinigungspuffer verdünnt, so dass eine Proteinkonzentration von 100mg/ml für die Immunpräzipitation vorlag. Dann wurde die Probe mit 40µl 250µg/ml Kaninchen Anti-eNOS-Antikörper (=10µg) für 1h bei Raumtemperatur unter Rotation inkubiert, so dass hier unter idealen Bedingungen die Antikörper-Antigen-Bindung stattfinden konnte. Nach Inkubation der Probe mit den Antikörpern wurden die in Reinigungspuffer suspendierten Dynabeads[®]ProteinG (200µl) zugegeben. Während der folgenden Inkubation für 10min bei Raumtemperatur unter Rotation erfolgte nun die Bindung der mit dem Antigen beladenen Antikörper an die Dynabeads[®]ProteinG via F_c-Region. Danach wurde die Probe mit den Dynabeads[®]ProteinG-Antikörper-Antigen-Komplexen zweimal mit 200µl PBS-Puffer

„gereinigt“ (s. 2.3.3.1). Daraufhin wurde die Probe nochmal 1min auf den Magnet platziert, der Überstand wurde abgenommen und die Probe wieder vom Magnet entfernt. Nun wurden die Dynabeads[®]ProteinG-Antikörper-Antigen-Komplexe in 20µl 1x NuPAGE[®] LDS-Probenpuffer resuspendiert und bis zum nächsten Tag bei -20 °C gelagert. Kurz vor der Proteinauftrennung mittels Gelelektrophorese am nächsten Tag wurden je 2,5µl 10x NuPAGE[®] Proben-Reduktionsmittel und 1x LDS-Probenpuffer zu der Probe gegeben, so dass ein Probengesamtvolumen für die Gelelektrophorese von 25µl resultierte. Zur Elution des Ziel-Antigens (NOS-Protein) wurde nun die Probe für 10min bei 70°C inkubiert, so dass der Dynabeads[®]ProteinG-Antikörper-Antigen-Komplex denaturiert wurde. Danach wurde die Probe auf dem Magnet platziert, um die Dynabeads[®]ProteinG für die Gelelektrophorese zu entfernen. Der Überstand (Antigen + Antikörper) wurde direkt in die Geltasche pipettiert.

2.3.4 SDS-PAGE (Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese)

Zur analytischen Proteinauftrennung wurde die Sodiumdodecylsulfat-(SDS-)Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) nach Laemmli (1970) verwendet. Hierbei werden alle sich in der zu untersuchenden Probe befindenden Polypeptide durch Erhitzung und ein stark reduzierendes Milieu entfaltet und mit negativer Ladung versehen, so dass die Faktoren Proteinstruktur und -ladung bei der Elektrophorese im Polyacrylamidgel wegfallen und somit die Auftrennung der Polypeptide ausschließlich nach dem Molekulargewicht erfolgt. Die durch die unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeiten bedingte Lage der einzelnen Polypeptide im Trenngel kann im Anschluss durch verschiedene Färbemethoden sichtbar gemacht werden, z.B. durch Coomassie-Blau-Färbung. In dieser Arbeit wurde die Gelelektrophorese mit dem LDS-(Lithiumdodecylsulfat-)NuPAGE[®]-Elektrophorese-System der Firma Invitrogen (Karlsruhe) durchgeführt. Die zu bestimmenden Proben wurden stets wie folgt vorbereitet:

Substanz	Zusammensetzung	Menge
Probe	Dynabeads [®] ProteinG-Antikörper-Antigen-Komplexe in 1x NuPAGE [®] LDS-Probenpuffer	20µl
1x NuPAGE [®] LDS-Probenpuffer	106mM TrisHCl, 141mM Trishydroxymethylamino-methan (Tris), 2% LDS, 10% Glycerol, 0,51mM EDTA, 0,22mM SERVA [®] Blue G250, 0,175mM Phenol Red; pH 8,5	2,5µl
10x NuPAGE [®] Proben-Reduktionsmittel	500mM Dithiothreitol	2,5µl

Tab.2

Probenvorbereitung für die gelelektrophoretische Proteinauftrennung des Immunpräzipitats.

Anschließend wurde die so vorbereitete Probe zur Denaturierung für 10min bei 70°C erhitzt. Nach Entfernung der für die Immunpräzipitation des Zielantigens (eNOS) verwendeten Dynabeads[®]ProteinG durch Platzierung der Probe auf dem DynaMag[™]-2-Magnet erfolgte die

Elektrophorese bei einer konstanten Spannung von 200V innerhalb einer Laufzeit von 40 – 60min. Zur Größenreferenzierung wurde in zwei Gelspuren je 10µl Molekulargewichtsmarker (MagicMark™ XP Western Protein Standard) pipettiert. Als Positivkontrolle für die eNOS wurde stets rekombinantes NOS-Protein in einer Menge von 0,1µg oder 1µg verwendet, ebenfalls gelöst in 1x LDS-Probenpuffer und Proben-Reduktionsmittel 1:10 (Gesamtvolumen 15µl). Der verwendete Laufpuffer setzte sich aus 50mM MOPS (Morpholinpropanylsulfonsäure), 50mM Tris Base (Trishydroxymethylenaminomethan), 3,5mM SDS und 1mM EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure) in Aqua bidest (pH 7,7) zusammen. Da unter reduzierenden Bedingungen gearbeitet wurde, wurde als Kathodenlaufpuffer diese Lösung 1:400 mit NuPAGE® Antioxidant versetzt. Die verwendeten Gele waren NuPAGE® Novex® 10% Bis-Tris Mini-Gele.

2.3.5 Western Blot

Die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden auf eine Polyvinylidene-Difluorid-(PVDF-)Membran (Amersham Hybond-P; GE Healthcare Life Sciences) elektrophoretisch transferiert. Hierzu wurde ein in 4°C gekühltem Transferpuffer (25mM Bicine, 25mM Bis-Tris, 1mM EDTA, 10% Methanol, gelöst in Aqua bidest) getränkter Schwamm auf die Kathode der Transferzelle gelegt, darauf das Gel mit der aufliegenden Membran (zwischen zwei mit Transferpuffer angefeuchteten Whatman®-Papieren) und dann noch drei weitere puffergetränkte Schwämme. Nach Verschluss des Blotmoduls mit der Anodenplatte wurde mit einer konstanten Spannung von 30V über einen Zeitraum von ca. 1h transferiert. Nach dem Transfer wurde die Membran für 5min in Ponceau-S-Lösung auf dem Schüttler zur Kontrolle des Transfers und Fixierung der transferierten Proteine inkubiert. Die freien Bindungsstellen auf der Membran wurden für 2h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C auf dem Schüttler mit einer „Blocking“-Lösung (5% Magermilchpulver in T-TBS) abgesättigt. Zur Zwischenlagerung der Membran, z.B. für die Antikörper-Behandlung am nächsten Tag, bzw. für die einzelnen Reinigungsschritte bei der Antikörper-Behandlung wurde T-TBS verwendet (10mM Tris Base, 100mM NaCl, 0,1% Tween®20, gelöst in Aqua bidest, pH 7,4). Zur Immundetektion wurde antigenspezifischer monoklonaler Maus Anti-eNOS-Primärantikörper sowie zur Kontrolle der Spezifität Maus Anti-iNOS-Antikörper, jeweils in einer Menge von 1µg/ml in 5%-BSA/T-TBS-Lösung (1:1000-Verdünnung), eingesetzt. Der Nachweis gebundener Primärantikörper erfolgte mit Peroxidase-gekoppelten Ziege Anti-Maus-IgG-Sekundärantikörpern 0,4µg/ml in 10ml 5%-BSA/T-TBS-Lösung (1:2500-Verdünnung). Zwischen den Behandlungen mit Primär- und Sekundärantikörper sowie nach der Behandlung mit dem Sekundärantikörper wurde die Membran stets mehrmals mit T-TBS gereinigt, um unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen. Die Inkubationszeit für Primär- und Sekundärantikörper betrug jeweils 1h bei Raumtemperatur. Zur Detektion des Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörpers wurde die Membran für 5min

in Peroxid-Luminol-Lösung (SuperSignal[®] West Pico Chemilumineszenz-Substrat) inkubiert und anschließend die Chemilumineszenz nach verschiedenen Belichtungszeiten mit dem LAS-3000 (Fujifilm, Düsseldorf) dokumentiert. Die Lichtemission ($\lambda=428\text{nm}$) kommt durch die Oxidation des zyklischen Diacylhydrazid-Luminols durch die am Sekundärantikörper gebundene Meerrettichperoxidase zustande. Die Detektion von Primärantikörpern mittels Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörpern über die Chemilumineszenz-Reaktion ist reversibel, so dass die an der Membran gebundenen Antikörper wieder entfernt werden können (sog. „*Stripping*“) und somit die Membran für weitere Antikörperfärbungen zur Verfügung steht. Hierzu wurde die Membran für 30min bei 70°C in „*Stripping*“-Puffer (Restore[™] Western Blot) inkubiert und anschließend für 15min mit T-TBS bei Raumtemperatur auf dem Schüttler gereinigt. Danach wurde die Membran entweder wie oben beschrieben erneut abgesättigt und direkt für eine neue Antikörperfärbung verwendet oder zwischen zwei Whatman-Papieren getrocknet bzw. bei 4°C in TBS zur späteren Verwendung gelagert.

2.3.6 Coomassie-Blau-Färbung der SDS-Polyacrylamidgele

Verwendete Lösungen:

Gel-Fixierungs-Lösung	50% v/v Ethanol, 10% v/v Essigsäure in Aqua bidest
Färbungslösung	0,1% w/v Coomassie Blau R250, 20% v/v Methanol, 10% v/v Essigsäure in Aqua bidest
Entfärbungslösung	50% v/v Methanol, 10% v/v Essigsäure in Aqua bidest
„ <i>Storage</i> “-Lösung	5% v/v Essigsäure in Aqua bidest

Tab.3

Zusammensetzung der für die Coomassie-Blau-Färbung verwendeten Lösungen.

Die gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden mit 0,1% Coomassie Blau R250 in 20% Methanol und 10% Essigsäure angefärbt. Bei Coomassie Blau handelt es sich um einen Triphenylmethanfarbstoff, der sich an basische Aminosäuren anlagert und damit Proteine unspezifisch anfärbt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel zunächst für 1h in Fixierungs-Lösung auf dem Schüttler inkubiert. Danach erfolgte die Färbung des Gels durch 3- bis 4-stündige Inkubation in der Coomassie-Blau-Lösung auf dem Schüttler bei Raumtemperatur. Die Entfärbung des Hintergrundes wurde durch mehrmalige Reinigung des gefärbten Gels mit Entfärbungslösung solange durchgeführt, bis die Proteinbanden deutlich ohne Hintergrundkontamination zu erkennen waren.

2.4 Vorbehandlung der Erythrozyten

2.4.1 L-N5-(1-Iminoethyl)-Ornithin (L-NIO)

Als Stammlösung wurde 50mM L-NIO in PBS-Puffer verwendet. Von dieser Stammlösung ausgehend wurde dann eine Endkonzentration von 3mM, jeweils auf ein Probenvolumen von 500 μ l, hergestellt. Die eingesetzte Konzentration des irreversiblen NOS-Inhibitors L-NIO befand sich somit in einem Bereich, von dem eine deutliche Enzyminhibition zu erwarten war. Schon eine L-NIO-Konzentration von 10–100 μ M hatte in früheren Arbeiten eine effektive NOS-Inhibition in Endothel- und phagozytierenden Zellen bewirkt (Rees et al., 1990; McCall et al., 1991).

2.4.2 Aminosäuren

Es wurden folgende Stammlösungen in PBS-Puffer angesetzt: 300mM L-Arginin, 300mM L-Lysin, 300mM L-Ornithin und 200mM L-Valin. Die 300mM L-Lysin- und die 300mM L-Ornithin-Stammlösung wurden zu je gleichen Anteilen zusammengemischt, so dass eine 150mM L-Lysin/L-Ornithin-Stammlösung erzielt wurde. Mit den D-Formen von Arginin, Lysin und Ornithin wurde in derselben Weise verfahren. Von diesen Stammlösungen ausgehend wurden folgende Endkonzentrationen in den jeweiligen Proben auf ein Endvolumen von je 500 μ l hergestellt: 3mM L-Arginin, 10mM L-Lysin/L-Ornithin und 20mM L-Valin. Die Endkonzentrationen der eingesetzten Reagenzien ergaben sich aus Vorarbeiten. L-Arginin, das über die beiden Transportsysteme γ^+ und γ^+L in den Erythrozyten gelangt (Devés und Boyd, 1998), liegt im Blutplasma in einer physiologischen Konzentration von ca. 0,1mM vor (Arnal et al., 1995). Die supraphysiologische Konzentration von 3mM wurde mit der Absicht gewählt, eine ausreichende Stimulation der NO-Synthase erzielen zu können. Die verwendete Endkonzentration von L-Ornithin und L-Lysin (jeweils 10mM) lag ebenfalls deutlich im supraphysiologischen Bereich, um die beiden Transportsysteme γ^+ und γ^+L effektiv zu blockieren und somit den Import des NOS-Substrates L-Arginin in den Erythrozyten zu unterbinden, wodurch die NOS-medierte NO-Produktion letztlich inhibiert werden würde. Während L-Lysin dabei sowohl über das γ^+ - als auch über das γ^+L -System transportiert wird, erfolgt der Transport von L-Ornithin nur über das γ^+ -System (White und Christensen, 1982; Angelo und Devés, 1994). L-Valin, das über das γ^+L -System in den Erythrozyten gelangt, zeigt einen konzentrationsabhängigen inhibitorischen Effekt auf die Arginase-Aktivität in Endothelzellen, was durch eine Abnahme der Harnstoffkonzentration und eine Zunahme der NO-Produktion gemessen werden konnte (Chicoine et al., 2004). Auf dieser Grundlage basierend und unter der Hypothese, dass L-Valin auch die erythrozytäre

Arginase-Aktivität inhibieren und dadurch zu einer verstärkten NO-Produktion führen würde, wurde L-Valin in einer Endkonzentration von 20mM eingesetzt.

2.4.3 Nitrit und Nitrat

Um zu überprüfen, ob auch die Nitrit-vermittelte NO-Formation mittels DAF-FM-Behandlung detektiert wird, wurde die Abhängigkeit des DAF-FM-Fluoreszenzsignals von der Nitrit- und Nitratkonzentration bei neutralem und saurem pH-Wert untersucht. Die verschiedenen pH-Werte (pH 7,4, pH 6,8 und pH 5,5) wurden mit Hilfe eines pH-Meters in dem Puffer eingestellt, der folglich jeweils für die Herstellung der Nitrit- und Nitrat-Stammlösungen und der weiteren Verdünnungen verwendet wurde. Daraufhin wurden für die drei verschiedenen pH-Werte jeweils eine 1M Nitrit- und eine 1M Nitrat-Stammlösung angefertigt. Diese Stammlösungen wurden dann schrittweise verdünnt, bis jeweils eine Nitritkonzentration von 10 μ M und eine Nitratkonzentration von 100 μ M vorlag, jeweils in einem Endvolumen von 500 μ l. Nach Zentrifugation (800xg) von jeweils 500 μ l Blut (1:500 verdünnt $\approx 10^4$ Erythrozyten/ μ l) für 10min bei 4°C und anschließender Verwerfung der flüssigen Phase wurden die pelletierten Erythrozyten jeweils in den 10 μ M Nitrit- und 100 μ M Nitratlösungen mit den drei verschiedenen pH-Werten resuspendiert.

2.5 Behandlung humaner Erythrozyten mit 4-Amino-5-Methylamino-2',7'-Difluorfluorescein-Diacetat (DAF-FM-Diacetat)

Für die Behandlung mit DAF-FM-Diacetat wurde das entnommene Blut stets 1:500 in PBS-Puffer verdünnt. Da die Erythrozytenkonzentration im Blut gesunder männlicher und weiblicher Erwachsener grob gemittelt bekanntermaßen ca. $5 \times 10^6/\mu$ l beträgt, entspricht dies ungefähr einer Erythrozytenzahl von $10^4/\mu$ l. Um die Abhängigkeit des DAF-FM-Fluoreszenzsignals von der Zellzahl zu untersuchen, wurden fünf weitere Blutverdünnungen hergestellt. Hierzu wurde zunächst das abgenommene Vollblut 1:50 verdünnt. Von dieser Konzentration ausgehend wurden dann die weiteren Konzentrationen hergestellt: 1:100, 1:250, 1:500 und 1:1000. Von der Verdünnungsstufe wurde auf die ungefähre Zahl der Erythrozyten in der jeweiligen Probe geschlossen.

Zur Messung der erythrozytären NOS-Aktivität bzw. der Nitrit-vermittelten NO-Bildung mittels DAF-FM-Diacetat wurden die Erythrozyten mit den in Kapitel 2.4 beschriebenen Substanzen vorbehandelt. Nachdem die Proben mit den jeweiligen Substanzen über 30min bei 37°C im Wasserbad inkubiert worden waren, erfolgte dann die Behandlung mit DAF-FM-Diacetat. Es wurden stets auch zwei unbehandelte Proben angefertigt: Die eine sollte als Negativkontrolle durchweg unbehandelt gelassen werden. Die andere wurde nicht

vorbehandelt, wohl aber darauffolgend mit DAF-FM-Diacetat inkubiert, so dass hier eine Positivkontrolle für das DAF-FM-induzierte Fluoreszenzsignal zur Verfügung stand. Bei den Nitrit- und Nitrat-Proben wurden Positiv- und Negativkontrollen für jeden pH-Wert angefertigt.

Die un- bzw. vorbehandelten Erythrozyten wurden zur Detektion des DAF-FM-Fluoreszenzsignals mittels Durchflusszytometrie mit 10 μ M DAF-FM-Diacetat behandelt bzw. unbehandelt gelassen (Negativkontrolle) und anschließend in einem Durchflusszytometer (BD FACSCanto II; Heidelberg) analysiert. Zur Herstellung einer 5mM Stammlösung von DAF-FM-Diacetat wurden je 50 μ g DAF-FM-Diacetat in 20 μ l Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst. Danach wurde je 1 μ l dieser Stammlösung in die jeweilige Probe (500 μ l) überführt, so dass sich eine Endkonzentration von 10 μ M DAF-FM-Diacetat ergab. Die Behandlung von DAF-FM-Diacetat erfolgte stets unter maximal möglichem Lichtausschluss und gekühlten Bedingungen, um die Sensitivität dieses Fluoreszenzfarbstoffes nicht zu beeinträchtigen.

Die Sättigungskurve für die Behandlung humaner Erythrozyten mit DAF-FM-Diacetat wurde bestimmt, indem die Erythrozyten mit ansteigenden DAF-FM-Diacetat-Konzentrationen behandelt wurden: 0 μ M (unbehandelt), 1 μ M, 10 μ M, 50 μ M, 100 μ M und 200 μ M. Für die Endkonzentration von 1 μ M wurde die 5mM Stammlösung nochmal 1:10 in DMSO verdünnt, so dass hier eine Arbeitslösung von 500 μ M zur Verfügung stand. Davon wurde dann 1 μ l in 500 μ l Probe für die Endkonzentration von 1 μ M überführt. Die restlichen Verdünnungen wurden von der 5mM Stammlösung ausgehend durchgeführt, immer auf ein Endvolumen von 500 μ l. Nach Inkubation der DAF-FM-Proben für 30min bei Raumtemperatur und anschließender Resuspension in je 1000 μ l PBS-Puffer (1:3-Verdünnung) wurden die Proben innerhalb der nächsten 15min parallel sowohl durchflusszytometrisch als auch fluorometrisch gemessen, um intrazelluläre und Gesamtfluoreszenz miteinander vergleichen zu können.

2.5.1 Messung der DAF-FM-Fluoreszenz mittels Durchflusszytometrie

Die Methodik der Durchflusszytometrie ermöglicht die Charakterisierung mikroskopisch kleiner Partikel wie Zellen nach Größe, Struktur und Oberflächeneigenschaften. Die zu untersuchende Zellsuspension wird von einem Gerät aufgenommen und durch eine Trägerflüssigkeit in einen laminaren Strom gebracht, in dem die Zellen einzeln hintereinander liegen. Während der Passage durch eine Messküvette treffen die Zellen einzeln auf einen Laser, der durch die speziellen Eigenschaften der Zelle messbar abgelenkt wird. Als *Forward scatter* (FSC) wird dabei die Messung der Vorwärtsstreuung bezeichnet und als *Sideward scatter* (SSC) die der Seitwärtsstreuung (Messung des im 90°-Winkel abgelenkten Lichts). Der *Forward scatter* gibt Auskunft über die Zellgröße, der *Sideward scatter* über die Granularität

(Beschaffenheit der Zelloberfläche) der Zelle. Bei der FACS-Messung macht man sich außerdem das Markieren von Zellen mit Fluorochromen zu nutze. Diese Substanzen absorbieren das monochrome Licht des Lasers und emittieren es in einem anderen Wellenlängenbereich, der spezifisch für das eingesetzte Fluorochrom ist. Durch Kopplung der Fluorochrome an Antikörper können so z.B. verschiedene Oberflächenstrukturen einer Zelle gleichzeitig charakterisiert werden. Des Weiteren können auch intrazelluläre Strukturen angefärbt werden, indem entweder eine vorherige Permeabilisierung der Zellmembran erfolgt oder ein zellpermeables Fluorochrom verwendet wird. Der in dieser Arbeit verwendete Fluoreszenzfarbstoff DAF-FM-Diacetat kann durch seine zellpermeablen Eigenschaften leicht durch passive Diffusion in die Zelle eindringen und intrazelluläres NO detektieren. Nach Deacetylierung zu DAF-FM durch intrazelluläre Esterasen entsteht durch die Reaktion mit NO/O₂ das intensiv fluoreszierende Benzotriazol DAF-FM-T. Mit einem Emissionsmaximum von 515nm kann DAF-FM durchflusszytometrisch in dem Wellenlängenbereich des Fluorochroms Fluoresceinisothiocyanat (FITC) detektiert werden.

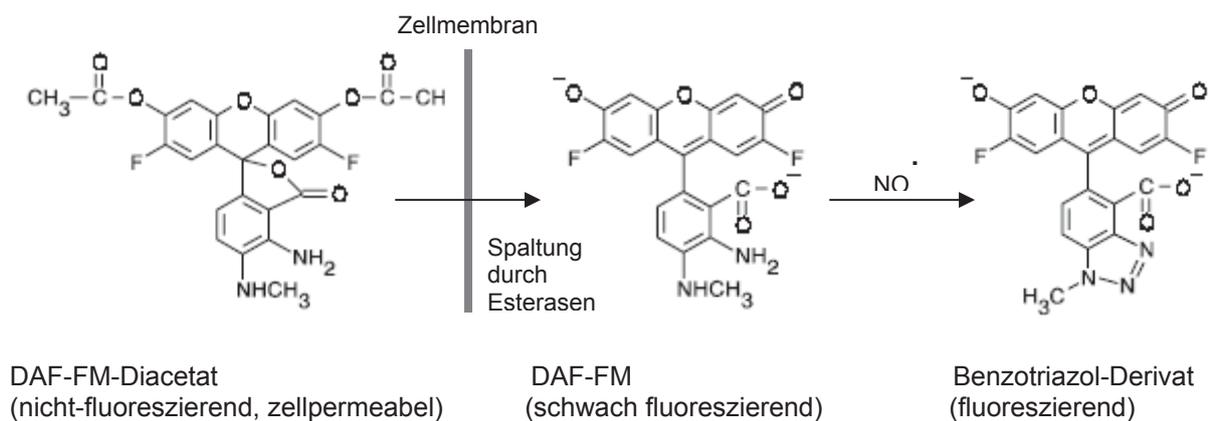


Abb.8

Reaktionsschema für die Detektion von intrazellulärem NO durch DAF-FM-Diacetat.

Die Proben wurden in einem Becton Dickinson FACSCanto II Durchflusszytometer (BD Bioscience, Heidelberg) gemessen. DAF-FM wurde angeregt mit einer Wellenlänge von 488nm durch den Argonlaser des Durchflusszytometers. Das resultierende Fluoreszenzsignal wurde innerhalb des FITC-Kanals (Em=530±30nm) detektiert. Die Daten wurden unter Verwendung der integrierten BD FACSDiva 5.0 Software gesammelt. Die Analyse der aufgezeichneten Daten erfolgte nachher mit der Software *FlowJo* V7.6 (TreeStar, Ashland, Oregon, USA). Für die DAF-FM-Behandlung wurden stets 30.000 *Events* pro Probe gezählt, so dass eine aussagekräftige mittlere Fluoreszenzintensität aufgezeichnet wurde. Der *Light scatter* und die Fluoreszenz-Kanäle wurden logarithmisch skaliert. Um sicherzustellen, dass auch wirklich nur das von den Erythrozyten ausgehende Fluoreszenzsignal gemessen wird,

wurde zunächst die Erythrozytenpopulation mittels Anlegen eines *Gates* im *Forward-scatter-Sideward-scatter*-Plot separiert. Somit wurde dann im Folgenden nur die mit intakten Erythrozyten korrelierende Fluoreszenzintensität gemessen. Bei der Datenanalyse mit der Software *FlowJo* wurde zunächst wieder die Erythrozytenpopulation identifiziert und anschließend dann die Intensitäten des DAF-FM-Fluoreszenzsignals der Proben in einem Verteilungshistogramm verglichen und statistisch analysiert.

2.5.2 Messung der DAF-FM-Fluoreszenz mittels Fluorometrie

Das Gesamtfluoreszenzsignal der Erythrozyten nach Behandlung mit DAF-FM-Diacetat wurde mit dem FLUOstar OPTIMA Fluorometer von BMG Labtech (Offenburg) gemessen. Es wurden jeweils zweimal 100µl der für die Durchflusszytometrie 1:3 verdünnten Proben (Doppelbestimmung!) in eine 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert und 5min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Dann erfolgte die fluorometrische Messung mit Anregung der Proben bei einer Wellenlänge von 485nm und Ermittlung der Emission bei 520nm.

2.6 Statistische Analyse

Für die statistischen Tests wurde das Programm *Graph Pad Prism 4.0* (GraphPad Software, San Diego, Kalifornien, USA) verwendet. Die statistischen Analysen zwischen den Gruppen erfolgten mittels *One-way-ANOVA*. Über den t-Test bzw. den Dunnett's Multiplen Vergleichstest wurden die Signifikanzen ermittelt (Konfidenzintervall 95%). Die Daten sind stets als Mittelwerte mit Standardfehler angegeben.

3. Ergebnisse

3.1 Isolierung der erythrozytären NO-Synthase mittels Immunpräzipitation und Western-Blot-Analyse

Erstes Ziel dieser Arbeit war die Isolierung einer in menschlichen Erythrozyten exprimierten NO-Synthase durch Immunpräzipitation und anschließende Western-Blot-Analyse.

Im Zuge der Optimierung des hierzu angewendeten Verfahrens wurde getestet, wie stark das hergestellte Erythrozytenlysat verdünnt werden kann, damit noch ein spezifisches Signal mittels Western-Blot-Analyse detektierbar ist. Dazu wurden drei Proteinkonzentrationen ausgewählt: 100mg/ml, 50mg/ml und 10mg/ml. Außerdem wurde der Einfluss der Menge der für die Immunpräzipitation verwendeten Antikörper auf die Stärke des resultierenden Signals untersucht. Bei einer Antikörpermenge von 1µg Kaninchen Anti-eNOS-Antikörper konnte bei allen drei Verdünnungsstufen des Erythrozytenlysats allenfalls ein schwaches Signal erhoben werden, während bei einer Antikörpermenge von 5µg die Intensität des eNOS-spezifischen Signals bei allen drei Verdünnungsstufen deutlich anstieg. Die Intensität dieses Signals war bei einer Proteinkonzentration des Lysats von 100mg/ml am höchsten.

Nach Separation des NOS-Proteins aus den lysierten Erythrozyten durch Immunpräzipitation mit Kaninchen Anti-eNOS-Antikörpern und Dynabeads[®] ProteinG erfolgte die Visualisierung des mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteins durch Coomassie-Blau-Färbung. Die Spezifität des hierbei detektierten Signals wurde durch Western-Blot-Analyse mit Maus Anti-eNOS-Antikörpern nachgewiesen. Behandlung der Membran mit Maus Anti-iNOS-Antikörpern hatte kein detektierbares Signal in Form sichtbarer Banden zur Folge, was die Spezifität des Signals für die endotheliale Isoform der NO-Synthase zeigt. Durch Verwendung von Maus Anti-eNOS-Antikörper als Primär- und Ziege Anti-Maus-Antikörper als Sekundäntikörper wurde eine Kreuzreaktion mit den IgG-Ketten der für die Immunpräzipitation verwendeten und in der SDS-PAGE mit aufgetrennten Kaninchen Anti-eNOS-Antikörper vermieden, so dass die Hintergrundkontamination der Membran geringer und die Detektion des eNOS-spezifischen Signals erleichtert wurde. Durch mehrfache Wiederholung des Versuches konnte das eNOS-spezifische Bandenmuster in der Coomassie-Blau-Färbung vielfach identisch nachgewiesen werden, das unten abgebildete gefärbte Gel kann somit als repräsentativ für alle anderen Färbungen gewertet werden.

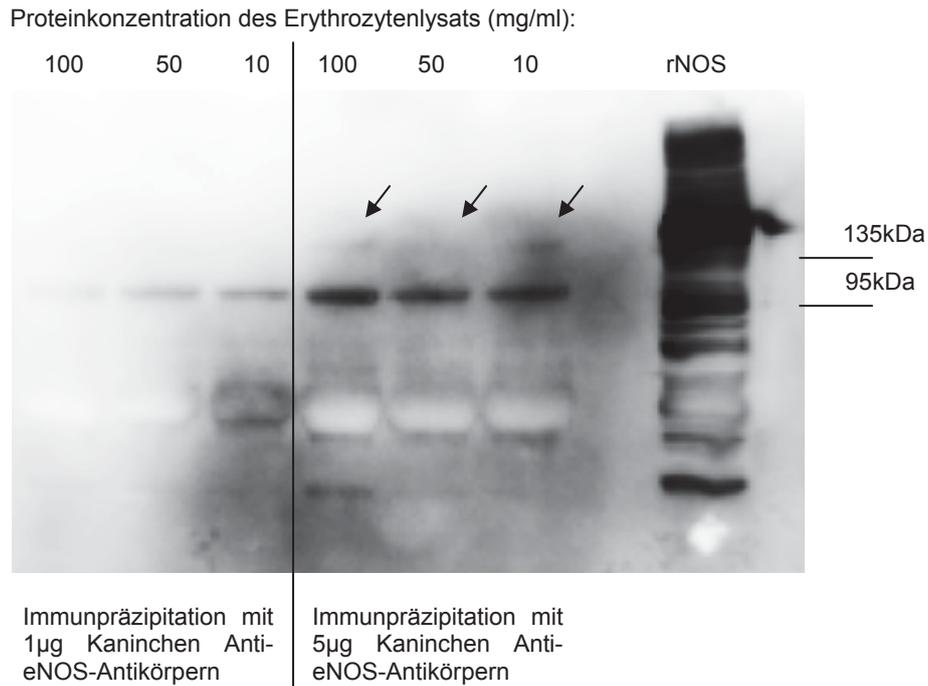


Abb.11

Abhängigkeit des mittels Western Blot detektierten eNOS-spezifischen Signals von der Verdünnung des Erythrozytenlysats und der für die Immunpräzipitation verwendeten Antikörpermenge. Das Signal mit der höchsten Intensität zeigte sich nach Immunpräzipitation mit einer Antikörpermenge von 5µg bei einer Proteinkonzentration des Lysats von 100mg/ml. Eine Antikörpermenge von 1µg erwies sich als zu gering, um ein aussagekräftiges eNOS-spezifisches Signal in der Western-Blot-Analyse zu gewinnen. Positivkontrolle mit rekombinantem NOS-Protein (rNOS).

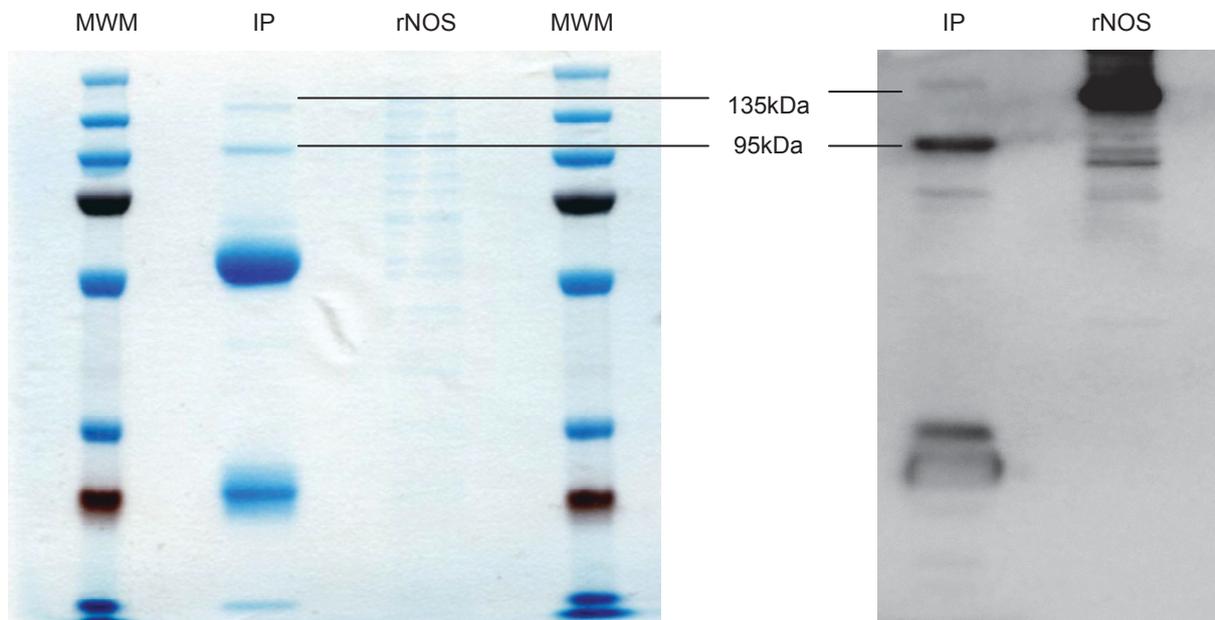


Abb.12

Das NOS-Protein wurde durch Immunpräzipitation aus humanen Erythrozyten isoliert und anschließend mittels Coomassie-Blau-Färbung analysiert. Die Spezifität des Signals wurde durch Western-Blot-Analyse mit Maus Anti-eNOS-Antikörpern überprüft. MWM = molekularer Gewichtsmarker, IP = Immunpräzipitat, Positivkontrolle mit rekombinantem NOS-Protein (rNOS).



Abb.13

Behandlung derselben Membran wie in Abbildung 11 mit Maus Anti-iNOS-Antikörpern. Das Fehlen eines Signals in Form sichtbarer Banden bei sämtlichen Proben zeigt die Spezifität des vorher detektierten Signals für eNOS. Lediglich in der Positivkontrolle für NOS (rNOS) finden sich positive Banden.

3.2 Bestimmung der intrazellulären NO-Produktion in humanen Erythrozyten durch Behandlung mit DAF-FM-Diacetat

3.2.1 Messung des DAF-FM-vermittelten Fluoreszenzsignals

Der Fluoreszenzfarbstoff DAF-FM-Diacetat reagiert mit Metaboliten, die aus der Reaktion von NO mit O₂ entstehen, und kann daher zur Detektion von NO verwendet werden (Williams, 2004). In dieser Arbeit wurden deshalb menschliche Erythrozyten mit DAF-FM-Diacetat behandelt, um die intrazelluläre NO-Produktion in diesen Zellen zu bestimmen. Die resultierende intrazelluläre Fluoreszenz wurde mittels Durchflusszytometrie gemessen, die Gesamtfluoreszenz mittels Fluorometrie. Zur Optimierung der Messung wurden für beide Messmethoden jeweils sowohl eine DAF-FM-Konzentrationskurve erstellt als auch das DAF-FM-Fluoreszenzsignal bei zunehmender Erythrozytenzahl ermittelt. Die resultierenden Ergebnisse sind im Folgenden aufgeführt.

3.2.1.1 Durchflusszytometrische Messungen

Beim Vergleich zwischen unbehandelter Probe und mit 10µM DAF-FM-Diacetat behandelter Probe konnte bei definierter Erythrozytenzahl ($\approx 10^4$ Zellen/µl) in allen Fällen eine deutliche spezifische Erhöhung des Fluoreszenzsignals detektiert werden, was an einer Rechtsverschiebung der Fluoreszenzkurve im Verteilungshistogramm und damit an der Abweichung von der Autofluoreszenz der Erythrozyten (unbehandelte Probe) abgelesen werden konnte. Weiterhin konnte anhand des FSC-SSC-Diagramms gesehen werden, dass die Behandlung der Erythrozyten mit DAF-FM-Diacetat weder Einfluss auf die Zellgröße noch auf die Zellstruktur hatte, da sich die Position der Erythrozytenpopulation durch die Behandlung nicht änderte.

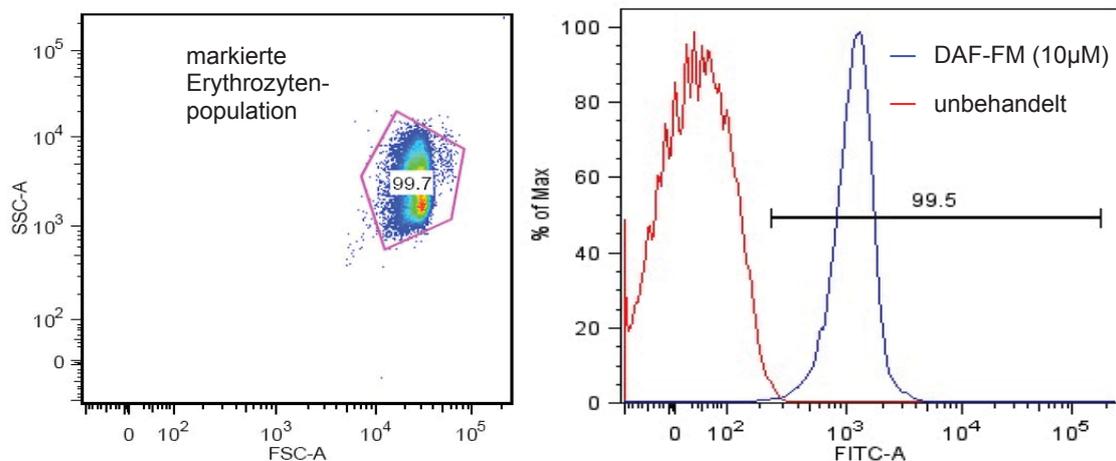


Abb.14

Humane Erythrozyten ($\approx 10^4/\mu\text{l}$) wurden mit 10µM DAF-FM-Diacetat behandelt bzw. unbehandelt gelassen. Durch durchflusszytometrische Analyse konnte die Erhöhung des Fluoreszenzsignals innerhalb der Erythrozytenpopulation (markiert im FSC-SSC-Diagramm) bei der behandelten Probe anhand eines Histogramms durch Vergleich mit der Autofluoreszenz der Erythrozyten abgelesen werden.

Durch Behandlung humaner Erythrozyten mit verschiedenen DAF-FM-Konzentrationen bei gleichbleibender Blutverdünnung (konstante Erythrozytenzahl, $\approx 10^4/\mu\text{l}$) sowie mit gleichbleibender DAF-FM-Konzentration ($10\mu\text{M}$) bei verschiedenen Blutverdünnungen (=unterschiedliche Zellzahl) konnte festgestellt werden, dass die Intensität des DAF-FM-Fluoreszenzsignals sowohl abhängig von der DAF-FM-Konzentration als auch von der Erythrozytenzahl ist.

Die Behandlung von $\approx 10^4$ Erythrozyten/ μl mit ansteigenden Konzentrationen von DAF-FM-Diacetat ergab die in der folgenden Tabelle dargestellten Werte für die durchflusszytometrisch gemessene mittlere intrazelluläre Fluoreszenzintensität. Die Werte sind im Folgenden als Prozent von der maximalen Fluoreszenzintensität angegeben. Diese ergibt sich aus der maximalen Differenz zwischen der Fluoreszenzintensität der behandelten und der der unbehandelten Proben (Fluoreszenzintensität (% von max.); Mittelwert aus n=5):

DAF-FM-Diacetat-Konzentration (μM)	Fluoreszenzintensität (% von max.)	Standardfehler
1	2,60	0,19
10	35,97	3,27
50	50,79	3,37
100	63,33	10,55
200	100,00	9,89

Tab.4

Abhängigkeit des durchflusszytometrisch ermittelten DAF-FM-Fluoreszenzsignals von der eingesetzten DAF-FM-Diacetat-Konzentration bei der Behandlung humaner Erythrozyten ($\approx 10^4/\mu\text{l}$). n=5.

Die intrazelluläre Fluoreszenz nimmt mit ansteigender DAF-FM-Konzentration in logarithmischer Weise zu und zeigt eine Sättigungstendenz. Die geringste DAF-FM-Konzentration mit dem besten Verhältnis von Fluoreszenzsignalerhöhung zu Standardfehler war $10\mu\text{M}$, so dass diese Konzentration als optimale Arbeitskonzentration für alle folgenden Experimente mit DAF-FM-Diacetat beibehalten wurde.

Für die Behandlung zunehmender Erythrozytenzahlen mit einer konstanten DAF-FM-Konzentration von je $10\mu\text{M}$ konnten die in der folgenden Tabelle dargestellten Werte für die durchflusszytometrisch gemessene mittlere intrazelluläre Fluoreszenzintensität ermittelt werden, wieder angegeben als Prozent von der maximalen Fluoreszenzintensität, die sich aus der maximalen Differenz zwischen der Fluoreszenzintensität der behandelten und der der unbehandelten Proben ergibt (Fluoreszenzintensität (% von max.); Mittelwert aus n=6):

Erythrozytenzahl $\times 10^3$ (μl)	Fluoreszenzintensität (% von max.)	Standardfehler
≈ 5	100,00	13,56
≈ 10	87,59	11,79
≈ 20	51,34	5,29
≈ 40	27,88	3,86
≈ 80	14,03	2,85

Tab.5

Abhängigkeit des durchflusszytometrisch ermittelten DAF-FM-Fluoreszenzsignals von der Erythrozytenzahl bei Behandlung mit konstanter DAF-FM-Konzentration (10 μ M). n=6.

Während sich die Autofluoreszenz der Erythrozyten (unbehandelte Proben) mit zunehmender Erythrozytenzahl nahezu nicht änderte, fiel mit zunehmender Erythrozytenzahl das DAF-FM-vermittelte Fluoreszenzsignal deutlich ab. Der stärkste Anstieg der Fluoreszenzintensität ließ sich bei einer Blutverdünnung von 1:500 (Erythrozytenzahl $\approx 10^4/\mu$ l) verzeichnen, so dass diese Verdünnung für alle weiteren Experimente mit DAF-FM-Diacetat verwendet wurde.

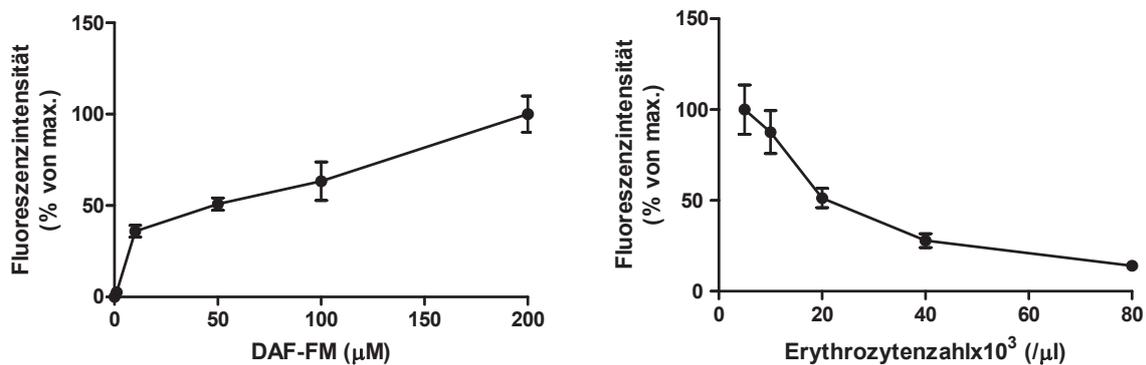


Abb.15

Durch Behandlung humaner Erythrozyten mit ansteigenden Konzentrationen von DAF-FM-Diacetat wurde die DAF-FM-Konzentrationskurve für die Messung der intrazellulären Fluoreszenz mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Hierbei zeigte sich eine Sättigungstendenz. Des Weiteren wurde durch zunehmende Verdünnung der Erythrozyten und anschließende Behandlung mit jeweils 10 μ M DAF-FM-Diacetat ermittelt, inwieweit das DAF-FM-vermittelte intrazelluläre Fluoreszenzsignal von der Erythrozytenzahl abhängt. Als Kontrolle wurde jeweils das Fluoreszenzsignal der unbehandelten Blutverdünnung bestimmt; die Fluoreszenzwerte sind jeweils als Differenz zwischen behandelter und unbehandelter Probe angegeben, außerdem in Prozent vom Maximalwert.

Diesen Ergebnissen zufolge wurde für die folgenden Experimente stets Vollblut 1:500 in PBS-Puffer verdünnt, was ungefähr einer Erythrozytenkonzentration von 10^4 Zellen/ μ l entspricht, und anschließend mit 10 μ M DAF-FM-Diacetat behandelt. Nach Inkubation im Dunkeln bei Raumtemperatur folgte dann eine weitere 1:3-Verdünnung, so dass die Proben im Durchflusszytometer gemessen und die jeweiligen Fluoreszenzintensitäten innerhalb der Erythrozytenpopulation detektiert werden konnten.

3.2.1.2 Fluorometrische Messungen

Die Messung der Gesamtfluoreszenz mit dem Fluorometer erfolgte für jede Probe immer in Doppelbestimmung in einer Mikrotiterplatte, so dass sich die aufgeführten Ergebnisse aus den jeweiligen Mittelwerten der Doppelbestimmungen zusammensetzen. Die Ergebnisse für die Gesamtfluoreszenzintensität sind im Folgenden wieder jeweils als Prozent von der maximalen Fluoreszenzintensität angegeben. Als maximale Fluoreszenzintensität gilt dabei wieder die maximale Differenz zwischen der Fluoreszenzintensität der behandelten und der der

unbehandelten Proben. Bei der Behandlung von $\approx 10^4$ Erythrozyten/ μl mit ansteigenden Konzentrationen von DAF-FM-Diacetat konnten die in der folgenden Tabelle dargestellten Werte für die mittels Fluorometrie gemessene Gesamtfluoreszenzintensität ermittelt werden (Fluoreszenzintensität (% von max.); Mittelwert aus $n=4$):

DAF-FM-Diacetat-Konzentration (μM)	Fluoreszenzintensität (% von max.)	Standardfehler
1	7,74	5,34
10	8,40	2,31
50	40,66	16,12
100	61,47	10,68
200	100,00	20,63

Tab.6

Abhängigkeit des fluorometrisch ermittelten Fluoreszenzsignals von der eingesetzten DAF-FM-Diacetat-Konzentration bei der Behandlung humaner Erythrozyten ($\approx 10^4/\mu\text{l}$). $n=4$.

Auch bei der mittels Fluorometrie gemessenen Gesamtfluoreszenz kann also mit ansteigender DAF-FM-Konzentration ein ansteigendes Fluoreszenzsignal detektiert werden.

Die Behandlung zunehmender Erythrozytenzahlen mit einer DAF-FM-Konzentration von je $10\mu\text{M}$ ergab die in der folgenden Tabelle dargestellten Werte für die mittels Fluorometrie gemessene Gesamtfluoreszenzintensität (Fluoreszenzintensität (% von max.); Mittelwert aus $n=3$):

Erythrozytenzahl $\times 10^3$ (μl)	Fluoreszenzintensität (% von max.)	Standardfehler
≈ 5	13,47	5,72
≈ 10	58,20	9,51
≈ 20	93,66	11,75
≈ 40	100,00	45,07
≈ 80	69,49	17,59

Tab.7

Abhängigkeit des fluorometrisch ermittelten Fluoreszenzsignals von der Erythrozytenzahl bei Behandlung mit konstanter DAF-FM-Konzentration ($10\mu\text{M}$). $n=3$.

Mit zunehmender Zellzahl nimmt also die Gesamtfluoreszenz der mit DAF-FM behandelten Zellen – im Gegensatz zur mittels Durchflusszytometrie gemessenen intrazellulären DAF-FM-Fluoreszenz – zu. Bei einer Erythrozytenkonzentration von ca. 4×10^4 Zellen/ μl erreicht die DAF-FM-Gesamtfluoreszenz einen Maximalwert (mit allerdings großem Standardfehler). Weitere Erhöhung der Erythrozytenzahl hat keine weitere Zunahme der Fluoreszenzintensität zur Folge.

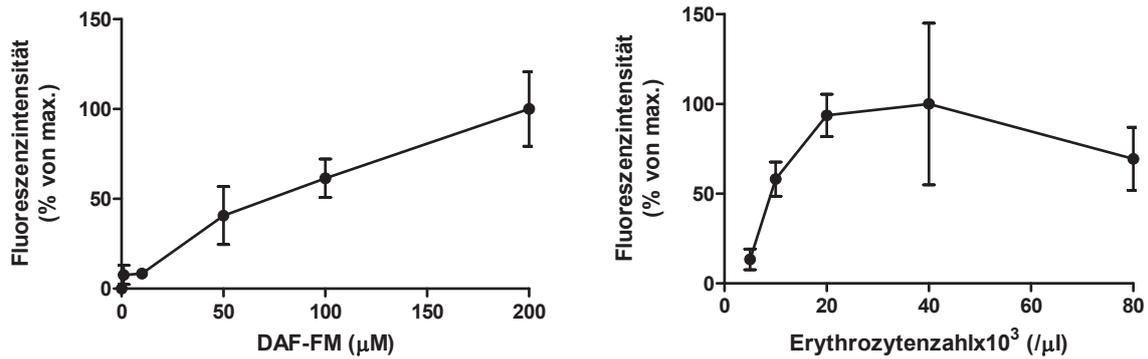


Abb.16

Durch Behandlung von Erythrozyten mit ansteigenden Konzentrationen von DAF-FM-Diacetat wurde die DAF-FM-Konzentrationskurve für die Messung der zellulären Gesamtfluoreszenz mittels Fluorometrie bestimmt. Bei Auftragen der DAF-FM-Konzentration gegen die Gesamtfluoreszenzintensität, angegeben als Prozent von der maximalen Fluoreszenzintensität, zeigt sich die positive Korrelation zwischen Fluoreszenzsignal und DAF-FM-Konzentration (linke Graphik). Durch zunehmende Verdünnung von Erythrozyten und anschließende Behandlung mit je 10µM DAF-FM-Diacetat wurde ermittelt, inwieweit das fluorometrisch gemessene Gesamtfluoreszenzsignal von der Zellzahl abhängt. Als Kontrolle wurde jeweils das Fluoreszenzsignal der unbehandelten Blutverdünnung bestimmt. Das Fluoreszenzsignal nimmt mit zunehmender Erythrozytenzahl zu, um bei einer Erythrozytenzahl von $\approx 4 \times 10^4$ Erythrozyten/µl ein Maximum zu erreichen. Weitere Zunahme der Zellzahl führt zu keiner weiteren Erhöhung des Fluoreszenzsignals (rechte Graphik).

3.2.2 Abhängigkeit des DAF-FM-Fluoreszenzsignals von der Aktivität der erythrozytären NO-Synthase

Um zu überprüfen, ob das DAF-FM-vermittelte intrazelluläre Fluoreszenzsignal von der Aktivität einer NO-Synthase in humanen Erythrozyten abhängt, wurde Blut gesunder Probanden mit Substanzen vorinkubiert, von denen erwartet wurde, dass sie Einfluss auf die NOS-Aktivität haben:

- L-Arginin = NOS-Substrat \rightarrow NO-Produktion durch NOS \uparrow
- L-N-1-Iminoethylornithin (L-NIO) = NOS-Inhibitor \rightarrow NO-Produktion durch NOS \downarrow
- L-Lysin und L-Ornithin \rightarrow Inhibition des Transports von L-Arginin in die Zelle via γ^+ - und γ^+ L-System \rightarrow Substratverfügbarkeit \downarrow \rightarrow NO-Produktion durch NOS \downarrow
- L-Valin:
 - a) Inhibition der Arginase \rightarrow Substratverfügbarkeit \uparrow \rightarrow NO-Produktion durch NOS \uparrow
 - b) Inhibition des Transports von L-Arginin in die Zelle via γ^+ L-System \rightarrow Substratverfügbarkeit \downarrow \rightarrow NO-Produktion durch NOS \downarrow

Die folgende Schemazeichnung veranschaulicht die hypothetischen Komponenten der intraerythrozytären NO-Produktion durch die NO-Synthase und deren Beeinflussung durch die eingesetzten Substanzen:

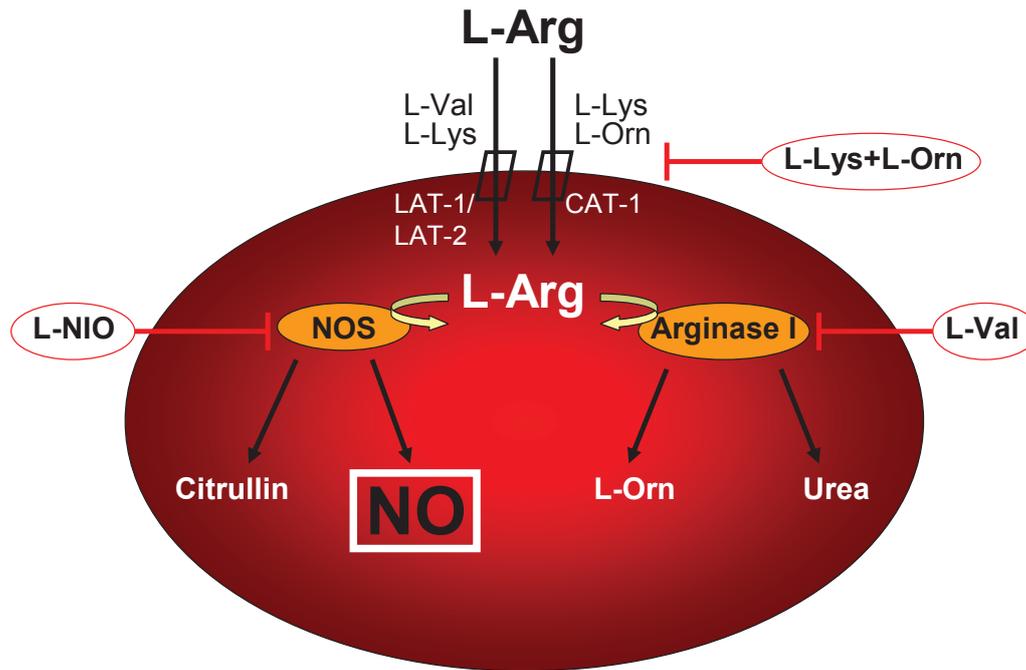


Abb.17

Hypothetisches Schema des L-Arginin/NO-Stoffwechselweges in Erythrozyten und seine Beeinflussung durch die von extern zugeführten Mediatoren L-NIO, L-Lysin/L-Ornithin und L-Valin. L-Arginin gelangt über die LAT-Transporter und den CAT1-Transporter in den Erythrozyten. Intraerythrozytär kompetitiert die erythrozytäre NO-Synthase mit der Arginase I um ihr Substrat L-Arginin. Während die erythrozytäre NO-Synthase für die enzymatische NO-Produktion aus L-Arginin verantwortlich ist, katalysiert die Arginase I die Umsetzung von L-Arginin zu L-Ornithin und Harnstoff. Exogene Zufuhr des NOS-Inhibitors L-NIO sollte durch Inhibition der erythrozytären NO-Synthase zu einer Verminderung der erythrozytären enzymatischen NO-Produktion führen. Blockade der für den L-Arginin-Import verantwortlichen Aminosäuretransporter durch einen Überschuss an L-Lysin und L-Ornithin sollte ebenfalls über eine Verminderung der intrazellulären Substratverfügbarkeit zur Inhibition der NOS-medierte NO-Produktion führen. L-Valin, welches ebenfalls über die LAT-Transporter in den Erythrozyten gelangt und damit den L-Arginin-Import behindert, gleichzeitig aber auch als intrazellulärer Arginase-Inhibitor fungiert, könnte zu einer verminderten oder gesteigerten NO-Produktion via NOS führen.

Die Werte für die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) sind im Folgenden wieder stets als Differenz zwischen der Fluoreszenzintensität der jeweiligen Probe und der der Negativkontrolle, d.h. der Autofluoreszenz der Erythrozyten, angegeben (Δ MFI). Die folgende Tabelle fasst die durchflusszytometrisch ermittelten Werte für die DAF-FM-Fluoreszenz der verschiedenen Proben zusammen:

Probe	n (Anzahl der Messungen)	Δ MFI	Standardfehler
Kontrolle (DAF-FM 10 μ M)	5	623,40	90,53
L-Arginin 3mM	5	586,60	117,95
D-Arginin 3mM	3	448,67	99,19
L-NIO 3mM	5	429,20 (**)	53,34
L-Lysin+L-Ornithin 10mM	5	157,60 (**)	18,84
D-Lysin+D-Ornithin 10mM	3	449,00	100,95
L-Valin 20mM	5	666,20	154,41
L-Valin 20mM + L-Arginin (3mM)	5	636,40	138,09

Tab.8

Einfluss NOS-stimulierender und -inhibierender Substanzen auf das durchflusszytometrisch gemessene DAF-FM-Fluoreszenzsignal bei der Behandlung humaner Erythrozyten. *=Signifikanz zum Kontrollwert (**=p<0,01).

Zugabe von 3mM L-Arginin, dem Substrat der NO-Synthase, führte zu keiner signifikanten Änderung des DAF-FM-Fluoreszenzsignals. Zur Kontrolle wurde auch das D-Isomer von Arginin zugegeben. Hierbei zeigte sich eine nicht signifikante Erniedrigung des DAF-FM-Fluoreszenzsignals. Zugabe des NOS-Inhibitors L-NIO in einer Konzentration von 3mM erniedrigte signifikant das DAF-FM-Fluoreszenzsignal. Auch Zugabe von 10mM L-Lysin +L-Ornithin erniedrigte signifikant das DAF-FM-Signal. Diese signifikante Erniedrigung des DAF-FM-Fluoreszenzsignals durch L-Lys+L-Orn konnte durch Zugabe der inaktiven, rechtsdrehenden Isoformen dieser Aminosäuren wieder aufgehoben werden. Die Erniedrigung des DAF-FM-Fluoreszenzsignals durch L-NIO und durch L-Lys+L-Orn zeigt, dass die intrazelluläre NO-Produktion von der Aktivität einer NO-Synthase und der Bioverfügbarkeit von L-Arginin abhängt. Unter der Vermutung, dass die Aminosäure L-Valin durch ihren inhibitorischen Effekt auf den L-Arginin-Transport und auf die Aktivität des Enzyms Arginase Einfluss auf die Verfügbarkeit von Arginin, dem Substrat der NOS, hat, wurde auch diese Substanz verwendet, um die Abhängigkeit des DAF-FM-Fluoreszenzsignals von der NOS-Aktivität in den Erythrozyten zu untersuchen. Hierbei zeigte sich sowohl bei der Zugabe von 20mM L-Valin alleine als auch von L-Valin und L-Arginin zusammen keine signifikante Veränderung des Fluoreszenzsignals.

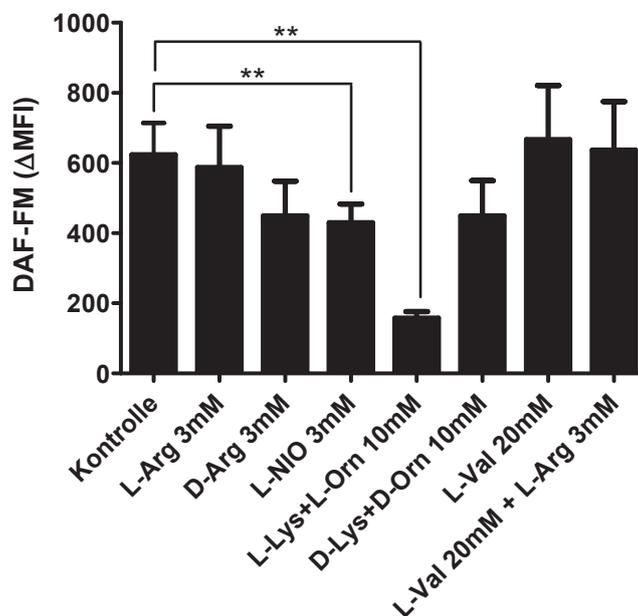


Abb.18

Zugabe des NOS-Substrats L-Arginin zeigte keine signifikante Auswirkung auf das DAF-FM-Fluoreszenzsignal, während die D-Isoform von Arginin das Fluoreszenzsignal nicht signifikant erniedrigte. Zugabe des NOS-Inhibitors L-NIO (3mM) erniedrigte signifikant das DAF-FM-Signal. Zugabe von L-Lysin+L-Ornithin (10mM) erniedrigte ebenfalls signifikant das DAF-FM-Signal (Verringerung der Bioverfügbarkeit von L-Arginin). Diese Ergebnisse zeigen, dass die enzymatische NO-Produktion durch eine erythrozytäre NO-Synthase maßgeblich für die Entstehung des Signals verantwortlich ist. Die signifikante Erniedrigung des DAF-FM-Fluoreszenzsignals durch L-Lysin+L-Ornithin konnte durch D-Lysin+D-Ornithin wieder aufgehoben werden. Die Überprüfung des Effektes von L-Valin bzw. L-Valin + L-Arginin auf die mittlere DAF-FM-Fluoreszenzintensität ergab keine signifikanten Änderungen hinsichtlich einer positiven oder negativen Auswirkung auf das Fluoreszenzsignal. **= $p < 0,01$.

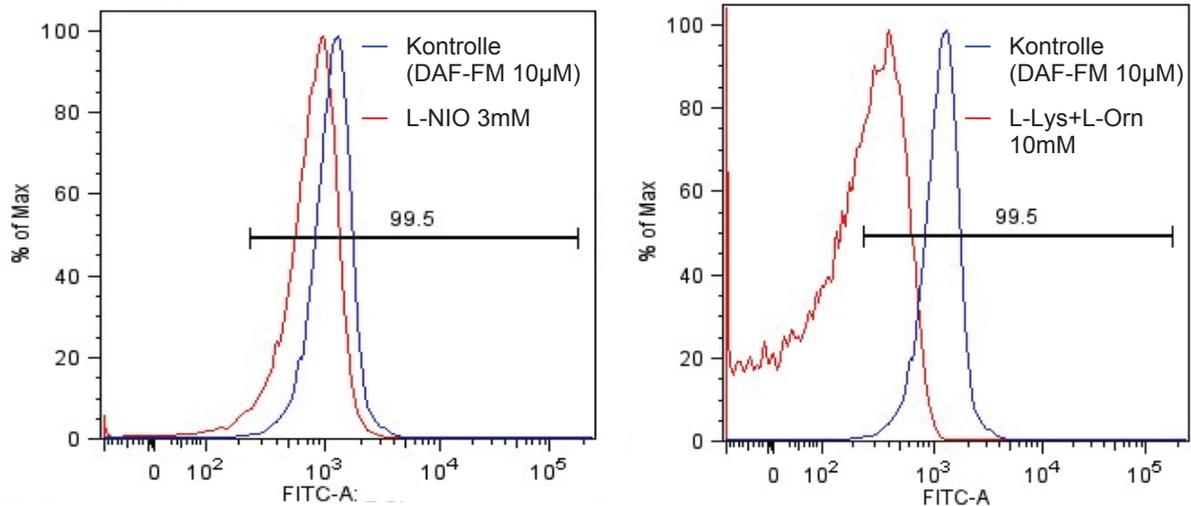


Abb.19

Inhibition des DAF-FM-Fluoreszenzsignals durch L-NIO und L-Lysin+L-Ornithin. Die Erniedrigung des Fluoreszenzsignals durch den NOS-Inhibitor L-NIO bzw. durch die Aminosäuren L-Lysin und L-Ornithin, die in supraphysiologischen Konzentrationen das γ^+ -Transportsystem blockieren, lässt sich anhand der Linksverschiebung der Verteilungskurve (rot) im Vergleich zur Positivkontrolle (blaue Kurve) quantifizieren.

3.2.3 Abhängigkeit des DAF-FM-Fluoreszenzsignals von der Nitrit- und Nitratkonzentration bei unterschiedlichen pH-Werten

Um der Frage nachzugehen, ob auch die Nitrit-abhängige NO-Bildung mittels DAF-FM-Behandlung detektiert wird, und um direkt auch den Einfluss des pH-Wertes auf die Nitrit-vermittelte NO-Bildung zu überprüfen, wurde die Abhängigkeit des DAF-FM-Fluoreszenzsignals von der Nitrit- und Nitratkonzentration bei neutralem (pH 7,4) und saurem (pH 6,8 und 5,5) pH-Wert untersucht. Die folgende Tabelle gibt eine Übersicht über die durchflusszytometrisch gemessenen Werte (Δ MFI; Mittelwert aus $n=3 \pm$ Standardfehler):

Probe	pH 7,4	pH 6,8	pH 5,5
Kontrolle (DAF-FM 10µM)	604,67 ± 185,18	783,00 ± 33,65 (**)	231,67 ± 119,78
NO ₂ ⁻ 10µM	633,33 ± 152,88 (**)	850,33 ± 4,41 (***)	80,00 ± 14,50
NO ₃ ⁻ 100µM	483,00 ± 53,079 (*)	810,67 ± 33,60 (***)	87,00 ± 44,55

Tab.9

Abhängigkeit des DAF-FM-Fluoreszenzsignals von der Nitrit- und Nitratkonzentration bei unterschiedlichen pH-Werten. *=Signifikanz zum Wert bei pH 5,5 (*= $p<0,05$; **= $p<0,01$; ***= $p<0,001$).

Unter den drei ausgewählten pH-Werten hatte der leicht saure pH von 6,8 die stärkste mittlere Fluoreszenzintensität sowohl bei der Kontrolle als auch bei den Proben mit 10µM Nitrit und 100µM Nitrat zur Folge. Bei allen Proben mit pH 6,8 war das DAF-FM-Fluoreszenzsignals hoch signifikant erhöht gegenüber den Proben mit pH 5,5 ($p<0,01$). Auch bei den Nitrit- und Nitrat-Proben mit pH 7,4 war die mittlere DAF-FM-Fluoreszenzintensität signifikant erhöht gegenüber den jeweiligen Proben bei pH 5,5. Bei der Analyse mit dem Durchflusszytometer zeigte sich im *Forward-scatter-Sideward-scatter*-Plot bei den Proben mit pH 5,5 eine große Menge an „Zelltrümmern“, so dass die Erniedrigung des Fluoreszenzsignals hier auf eine

säurebedingte Schädigung der Erythrozyten zurückzuführen ist. Insgesamt zeigt die Zugabe von Nitrit oder Nitrat unabhängig vom jeweiligen pH-Wert nur geringe Auswirkung auf das DAF-FM-Fluoreszenzsignal. Es ist jedoch eine geringe Erhöhung der intrazellulären DAF-FM-Fluoreszenzintensität nach Zugabe von Nitrit bei pH 7,4 und 6,8 im Vergleich zur unbehandelten DAF-FM-Kontrolle bei den gleichen pH-Werten zu erkennen, was auf eine basale intraerythrozytäre Reduktion von Nitrit zu NO hindeuten könnte.

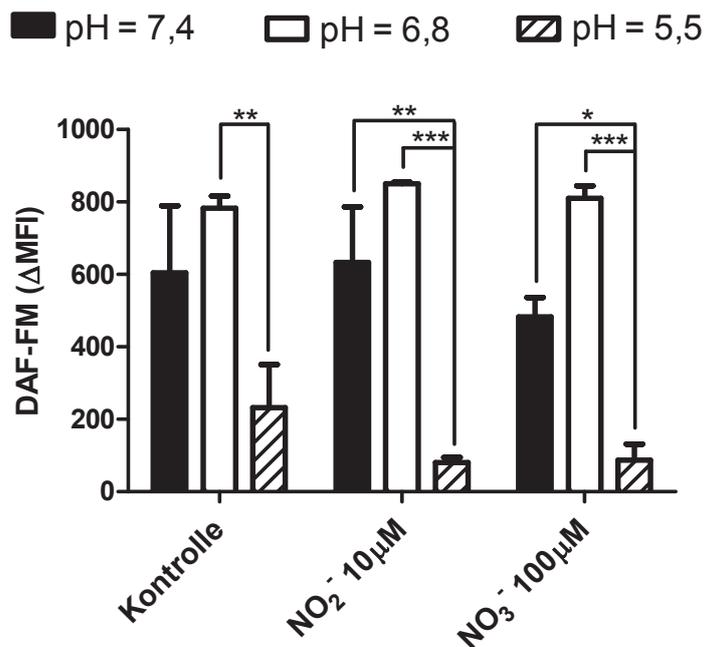


Abb.20

Zugabe von Nitrit oder Nitrat bei verschiedenen pH-Werten hatte insgesamt keine signifikante Auswirkung auf das DAF-FM-Fluoreszenzsignal. Durchführung der Messungen bei pH 5,5 führte in allen Untersuchungsgruppen zu einer starken (signifikanten) Erniedrigung der Fluoreszenzintensität, während bei pH 6,8 eine Erhöhung der Fluoreszenzintensität gegenüber den Messungen bei pH 7,4 zu erkennen ist. *= $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$.

3.2.4 Reproduzierbarkeit der Behandlung humaner Erythrozyten mit DAF-FM-Diacetat

Die Reproduzierbarkeit der intrazellulären NO-Messung in Erythrozyten mittels Behandlung mit DAF-FM-Diacetat wurde getestet, indem die Ergebnisse von zwei verschiedenen Untersuchern, die das Blut von zwei verschiedenen gesunden Probanden analysiert haben, verglichen wurden. Dasselbe Experiment wurde jeweils an drei verschiedenen Tagen wiederholt. Alle Messungen wurden immer dreifach ausgeführt. So konnte mit einem Experiment die Fehleranfälligkeit und somit die Validität dieser neuen Methode getestet werden.

Sowohl bei den DAF-FM-Behandlungen der Erythrozyten von Proband 1 und 2 durch Untersucher 1 als auch bei denen durch Untersucher 2 konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Untersuchungstagen festgestellt werden. Diese Tatsache ließ

sich sowohl bei den Proben, die nur mit DAF-FM behandelt worden waren (Positivkontrollen), als auch bei den Proben, die mit dem NOS-Inhibitor L-NIO vorbehandelt worden waren, erkennen. Die Vorbehandlung mit L-NIO bewirkte in allen vier Gruppen eine hoch signifikante Erniedrigung des DAF-FM-Fluoreszenzsignals. Die Werte für die jeweiligen Fluoreszenzintensitäten sind in der folgenden Tabelle dargestellt, angegeben jeweils als Prozent von der maximalen Fluoreszenzintensität (jeweils Mittelwert \pm Standardfehler aus den Experimenten aller drei Untersuchungstage, d.h. n=9):

	Kontrolle (DAF-FM 10μM)	L-NIO 3mM
Untersucher 1 / Proband 1	100 \pm 1,94%	37,13 \pm 1,77% (**)
Untersucher 1 / Proband 2	100 \pm 1,86%	37,88 \pm 1,43% (**)
Untersucher 2 / Proband 1	100 \pm 3,13%	36,22 \pm 1,57% (**)
Untersucher 2 / Proband 2	100 \pm 4,23%	38,82 \pm 2,53% (**)

Tab.10

Zugabe von L-NIO 3mM führt zu einer signifikanten Erniedrigung des DAF-FM-Fluoreszenzsignals, die unabhängig vom jeweiligen Untersucher und Probanden ist (** = p<0,01).

Diese Resultate bestätigen zum Einen die schon gewonnene Erkenntnis, dass das DAF-FM-Fluoreszenzsignal wesentlich durch enzymatische NO-Produktion durch eine NO-Synthase zustande kommt, zum Anderen repräsentiert die geringe Variabilität der Ergebnisse zwischen Probanden bzw. Untersucher die Validität der Methode. Auch bei den Proben ohne Zugabe von L-NIO gab es keine signifikanten Unterschiede und nur eine geringe Variabilität der Ergebnisse sowohl zwischen den beiden Probanden als auch zwischen den beiden Untersuchern.

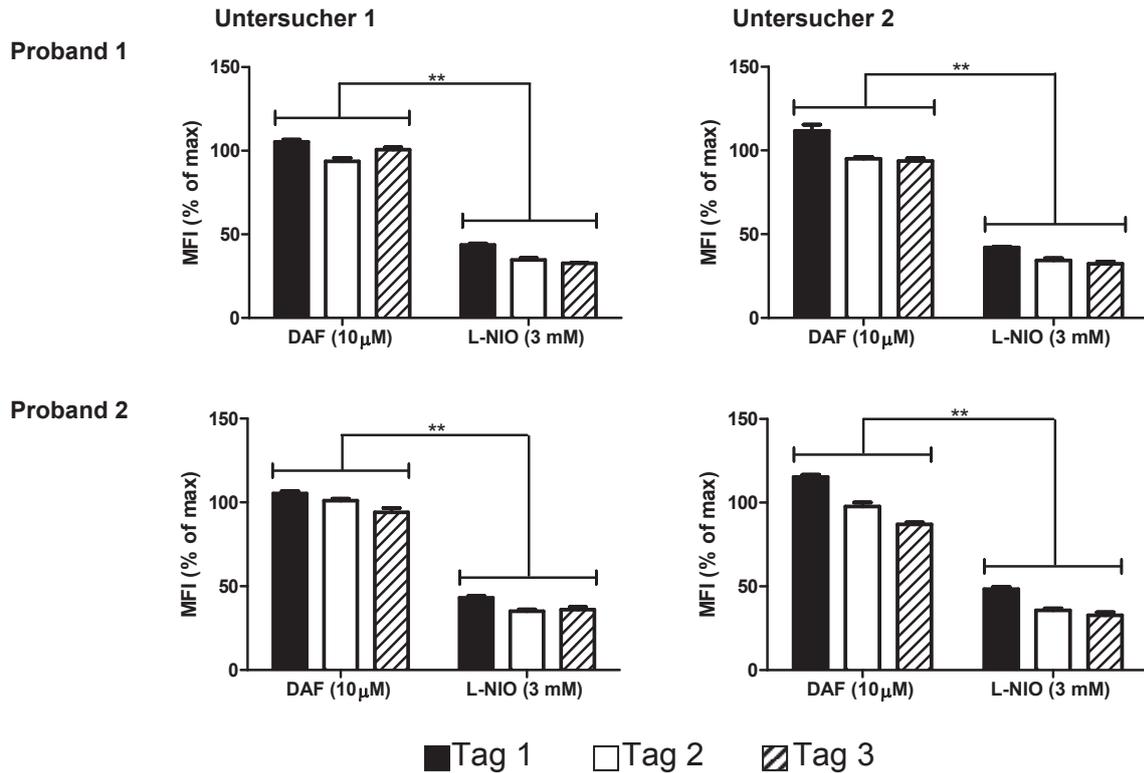


Abb.21

Dargestellt sind die Ergebnisse von Behandlungen humaner Erythrozyten mit DAF-FM-Diacetat, die von zwei verschiedenen Untersuchern (Untersucher 1 und Untersucher 2) mit zwei verschiedenen Probanden (Proband 1 und Proband 2) an jeweils drei verschiedenen Tagen (Tag 1, Tag 2, Tag 3) durchgeführt wurden. Alle Messungen wurden immer dreimal ausgeführt (jeweils n=3). Die DAF-FM-Fluoreszenzintensität ist als Prozent vom jeweiligen Maximalwert angegeben; dieser ist gleich der jeweilige Mittelwert der DAF-FM-Proben aus allen drei Tagen zusammen. Die Grafik zeigt die Untersucher- und die Probandenunabhängigkeit der Methode sowie die nur geringen Unterschiede zwischen den drei Untersuchungstagen und die geringen Standardfehler zwischen den einzelnen Messungen, was die Tatsache untermauert, dass die Messung der intrazellulären NO-Produktion mittels DAF-FM-Behandlung eine hohe Reproduzierbarkeit besitzt. **= $p < 0,01$.

4. Diskussion

In dieser Arbeit konnte eine eNOS aus menschlichen Erythrozyten isoliert werden und deren Aktivität in intakten Zellen bestimmt werden.

4.1 Isolierung der NO-Synthase aus humanen Erythrozyten

Nach zahlreichen Optimierungsversuchen wurde ein Protokoll entwickelt, das eine schnelle und sichere Isolierung des NOS-Proteins aus Erythrozyten erlaubt. Im Western-Blot konnte wiederholt ein charakteristisches Muster mit Banden bei 135 und 95kDa nachgewiesen werden. Durch die spezifische Antikörperbindung sowie den Vergleich des Bandenmusters mit der Positivkontrolle (rekombinante NOS) kann bestätigt werden, dass sich eine eNOS in humanen Erythrozyten befindet.

Die Expression einer NO-Synthase in Erythrozyten wird in der Literatur nach wie vor kontrovers diskutiert und insbesondere die Frage nach der vorherrschenden Isoform ist noch nicht abschließend geklärt worden (Kleinbongard et al., 2006). Die Aktivität einer NO-Synthase in Erythrozyten wurde erstmals durch Deliconstantinos et al. (1995) beschrieben: Durch oxidativen Stress und Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ließ sich eine Zunahme der erythrozytären NO-Produktion induzieren, die durch den NOS-Inhibitor L-NMMA hemmbar war. Es konnte gezeigt werden, dass die aus Hämolysaten isolierte NO-Synthase konstitutiv exprimiert wird und ihre Aktivität von den Kofaktoren NADPH, Ca^{2+} -Calmodulin, Tetrahydrobiopterin and Flavin abhängt (Deliconstantinos et al., 1995). Kang et al. (2000) konnten durch Western-Blot-Analysen eine parallele Expression von eNOS und iNOS innerhalb des Erythrozyten nachweisen. Durch Behandlung der Western-Blot-Membranen mit Maus Anti-iNOS-Antikörpern konnte in dieser Arbeit jedoch ausgeschlossen werden, dass es sich bei dem aus dem Zytosol der Erythrozyten isolierten Protein um die induzierbare Isoform der NO-Synthase handelt. Bhattacharya et al. (2001) konnten eine durch Insulin aktivierbare, in der Erythrozytenmembran lokalisierte NO-Synthase mit einem Gesamt-Molekulargewicht von 230kDa nachweisen, die sich unter reduzierenden Bedingungen – wie sie auch in dieser Arbeit vorlagen – in zwei Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von 135 und 95kDa auftrennen ließ. Demnach könnte es sich bei der in dieser Arbeit nachgewiesenen NO-Synthase um das von Bhattacharya et al. identifizierte membranständige Enzym bzw. dessen zytosolisches Äquivalent handeln. Allerdings sind die bekannten NOS-Isoformen allesamt als Homodimere beschrieben, d.h. sie setzen sich aus zwei gleichen Untereinheiten zusammen. Somit wurde vermutet, dass die Proteinstruktur der erythrozytären NO-Synthase von der der bekannten Isoformen abweicht. Wie auch immer,

durch die Antikörper-Spezifität, die hohe Qualität des Verfahrens der Immunpräzipitation und das ausbleibende Signal nach Behandlung mit Anti-iNOS-Antikörpern konnte in dieser Arbeit das erythrozytäre Enzym als endotheliale Isoform der NO-Synthase charakterisiert werden. Dies wirft jedoch Fragen hinsichtlich der tatsächlichen molekularen Struktur der NO-Synthase in Erythrozyten auf (Ozüyaman et al., 2008): Handelt es sich bei der erythrozytären NO-Synthase um eine „modifizierte“ Form der endothelialen Form? Oder muss gar eine neue Isoform in Betracht gezogen werden? Eine vollständige und eindeutige Entschlüsselung der Molekularstruktur der erythrozytären NO-Synthase könnte durch weitere proteinanalytische Methoden, wie z.B. massenspektrometrische Untersuchungen, gelingen. Untersuchungen auf DNA-Ebene sind dagegen weitestgehend ausgeschlossen, da ausgereifte Erythrozyten bekanntermaßen kein Genom mehr besitzen.

In dieser Arbeit konnte also durch Etablierung einer neuen Methode zur Darstellung der Expression der erythrozytären NO-Synthase eine eNOS in Erythrozyten nachgewiesen werden. Eine Kreuzreaktivität der Anti-eNOS-Antikörper mit einer potenziellen iNOS konnte durch Behandlung der Membranen mit Anti-iNOS-Antikörpern ausgeschlossen werden. Das spezifische Bandenmuster zeigt, dass die erythrozytäre NO-Synthase womöglich aus verschiedenen großen Untereinheiten besteht. Die Spezifität für die Anti-eNOS-Antikörper jedoch beweist, dass das nachgewiesene Protein die Epitope einer eNOS enthält. Somit könnten zwar Unterschiede zwischen dem endothelialen und erythrozytären Enzym bestehen, funktionell jedoch handelt es sich wohl um dasselbe Enzym. Diese Ergebnisse bestätigen die Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe, die nachweisen konnte, dass die erythrozytäre NO-Synthase sämtliche funktionelle Eigenschaften der endothelialen Isoform des Enzyms besitzt (Kleinbongard et al., 2006).

Durch Etablierung weiterer proteinanalytischer Verfahren zur Untersuchung der NOS-Expression in Erythrozyten sollte eine endgültige Charakterisierung des Enzyms in diesen Zellen angestrebt werden, um potenzielle Möglichkeiten der Regulation des Enzyms in Erythrozyten, z.B. spezifische sekundäre Modifikationen wie Phosphorylierung etc., analysieren und damit auch die klinische Relevanz der erythrozytären NO-Synthase erörtern zu können.

4.2 Messung der intrazellulären NO-Produktion in humanen Erythrozyten mittels DAF-FM-Diacetat

In dieser Arbeit wurden Erythrozyten mit DAF-FM-Diacetat behandelt und das resultierende Fluoreszenzsignal durchflusszytometrisch und fluorometrisch bestimmt. Mit dieser einfachen,

schnell durchzuführenden Methode lassen sich intrazelluläre NO-Metaboliten in Erythrozyten mit hoher Sensitivität nachweisen. Derivate von 4,5-Diaminofluorescein (DAF-2) wie das in dieser Arbeit verwendete DAF-FM reagieren nicht direkt mit NO, sondern mit einem instabilen Nitrosierungsprodukt aus der Reaktion von NO mit O₂, u.a. Distickstofftrioxid (N₂O₃) und Hydrogennitrit (HNO₂) (Williams, 2004). Durch Reaktion mit diesen instabilen Oxidationsprodukten von NO wird DAF-FM dann in ein stark fluoreszierendes Triazolderivat (DAF-FM-T) umgewandelt (Nagano und Yoshimura, 2002). Die resultierende Fluoreszenz lässt sich anschließend mit verschiedenen Methoden nachweisen und messen. In dieser Arbeit wurde die intrazelluläre Fluoreszenz in den mit DAF-FM-Diacetat behandelten Erythrozyten mittels Durchflusszytometrie quantifiziert. Das Verfahren der Durchflusszytometrie wurde schon erfolgreich angewandt, um den oxidativen Stress in Erythrozyten und seine Bedeutung bei hämatologischen Erkrankungen wie der Thalassämie oder der paroxysmalen nächtlichen Hämoglobinurie zu untersuchen (Amer et al., 2004 und 2008). Durch Piagnerelli et al. (2007) wurde die Durchflusszytometrie als einfache, schnell verfügbare Methode zur Untersuchung der Erythrozytenform angewandt, die erheblich dazu beitragen könnte, krankhafte Veränderungen der Erythrozytenmorphologie in verschiedenen pathologischen Zuständen zu entschlüsseln. Insgesamt wird der Durchflusszytometrie somit ein hoher Stellenwert in der Untersuchung von Erythrozyten beigemessen. Auch in dieser Arbeit erwies sich die Durchflusszytometrie als zuverlässiges Instrument bei der Untersuchung von Erythrozyten. Bei korrekter Handhabung des Protokolls und richtiger Bedienung der Geräteeinstellungen stellten sich die Ergebnisse als hoch reproduzierbar heraus. Ein weiterer Vorteil bestand darin, dass anhand des *Forward-scatter-Sideward-scatter*-Plots vor jeder Untersuchung eine Hämolyse ausgeschlossen werden konnte. Durch *Gating* und damit Identifizieren der „gesunden“ Erythrozytenpopulation konnte stets sichergestellt werden, dass nur das von intakten Erythrozyten ausgehende Fluoreszenzsignal gemessen wird. Das gemessene Signal war somit hoch spezifisch. Zum Vergleich von intrazellulärer mit totaler Fluoreszenz wurden die mit DAF-FM-Diacetat behandelten Erythrozyten auch fluorometrisch untersucht.

Die *in-vitro*-Sensitivität von DAF-2 wird von Kojima et al. (1998) mit einer NO-Konzentration von 5nM angegeben. Durch die Fähigkeit, NO-Spiegel im nanomolaren Bereich zu detektieren, eignet sich DAF-2 ideal zur Bestimmung der enzymatischen NO-Produktion (Räthel et al., 2003): Während die induzierbare NO-Synthase NO-Mengen im nano- bis mikromolaren Bereich produziert, liegt die NO-Produktion durch die konstitutiven NO-Synthasen (eNOS, nNOS) bei Konzentrationen im pico- bis nanomolaren Bereich (Moncada et al., 1991; Alderton et al., 2001). Rodriguez et al. (2005) zeigten jedoch durch

Untersuchungen an Aortengewebe von Ratten, dass die Sensitivität von DAF-2 in biologischen Systemen durch die Hintergrundfluoreszenz, die mit der intrazellulären Akkumulation des Fluoreszenzmoleküls einhergeht, sowie durch die Autofluoreszenz des zu untersuchenden Gewebes begrenzt wird. In dieser Arbeit konnte jedoch festgestellt werden, dass sich DAF-FM als Derivat von DAF-2 durchaus dazu eignet, den als gering einzuschätzenden enzymatischen NO-*Output* in Erythrozyten zu detektieren. Bislang wurde DAF-2 jedoch v.a. benutzt, um extrazelluläres NO zu messen, welches z.B. aus Endothelzellen freigesetzt wird (Kojima et al., 1998; Nakatsubo et al., 1998; Leikert et al., 2001). Das DAF-2-Derivat DAF-FM-Diacetat hingegen ist in der Lage, die Zellmembran zu permeieren und dadurch intrazelluläres NO zu detektieren. Kultivierte glatte Muskelzellen zeigen nach Behandlung mit DAF-FM-Diacetat ein intensives Fluoreszenzsignal (Itoh et al., 2000). Mittels DAF-FM-Diacetat konnte bereits eine Verminderung der intrazellulären NO-Synthese in menschlichen Endothelzellen durch einen erhöhten Blutzuckerspiegel nachgewiesen werden (Sheng et al., 2005). Durch Behandlung von Erythrozyten mit DAF-FM-Diacetat konnte außerdem bereits eine Scherstress-abhängige Erhöhung des intrazellulären NO-Spiegels in Erythrozyten nachgewiesen werden, und dass diese Erhöhung der intrazellulären NO-Konzentration durch die Aktivierung einer NO-Synthase in den Erythrozyten vermittelt wird (Ulker et al., 2011). Ansonsten sind Studien, in denen intraerythrozytäres NO mittels DAF-FM-Diacetat detektiert wird, noch rar, und es bedarf noch der endgültigen Validierung dieser Methode und Etablierung durch breite Anwendung in weiteren Studien, um das in Erythrozyten produzierte NO und seine Bedeutung abschließend evaluieren zu können.

Durch Erstellung von Sättigungskurven konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass der Fluoreszenzindikator innerhalb der Erythrozyten in Abhängigkeit von der DAF-FM-Diacetat-Konzentration und der Zellzahl akkumuliert. Die mittels Durchflusszytometrie gemessene intrazelluläre DAF-FM-Fluoreszenzaktivität steigt mit zunehmender Konzentration von DAF-FM-Diacetat an, wobei bei ca. 200µM nahezu ein Sättigungszustand erreicht wird, und fällt mit zunehmender Zellzahl ab. Die intrazelluläre Akkumulation von DAF-FM könnte eine Erklärung dafür liefern, warum die Nitrosierung von DAF-FM trotz der hohen intraerythrozytären Konzentrationen von Oxyhämoglobin und Antioxidanzien wie Glutathion oder Ascorbat, die allesamt NO „auffangen“ können, möglich ist. Rodriguez et al. (2005) fanden heraus, dass die Behandlung von Aortengewebe mit 10µM DAF-2-Diacetat eine intrazelluläre Akkumulation von DAF-2-assoziierten Spezies bis ca. 750µM zur Folge hat. Die Akkumulation des Fluoreszenzindikators innerhalb der Zellen geht dabei mit einer

Zunahme an Hintergrund-Autofluoreszenz der Probe einher. Diese entsteht durch nicht umgewandeltes DAF-2, wenn hohe Konzentrationen von DAF-2 in Systemen mit geringem NO-Output verwendet werden (Räthel et al., 2003). Räthel et al. (2003) schlugen daher vor, eine DAF-2-Konzentration von $<1\mu\text{M}$ zur Messung der NO-Freisetzung durch die NO-Synthase zu verwenden. Mit zunehmender DAF-2-Konzentration nimmt somit durch Zunahme der Hintergrund-Autofluoreszenz die Sensitivität des Verfahrens in Systemen mit geringer NO-Freisetzung ab, was den bedenkenlosen und unkritischen Einsatz in Experimenten zur Untersuchung der enzymatischen NO-Produktion limitiert. Hall und Garthwaite (2009) wiesen sogar darauf hin, dass eine einfache Veränderung im Redox-Potenzial der Zelle zu einer verstärkten Oxidation des Fluoreszenzmoleküls und damit zu einer unspezifischen Signalerhöhung führen kann. Vor diesem Hintergrund müssen auch die in dieser Arbeit ermittelten Werte für die Fluoreszenzintensität stets kritisch betrachtet werden. Auch die Tatsache, dass mit zunehmender Zellzahl die intrazelluläre DAF-FM-Fluoreszenz abnimmt, könnte mit der intrazellulären Akkumulation von DAF-FM zusammenhängen: Dadurch, dass sich der Fluoreszenzindikator auf eine größere Anzahl an Zellen verteilen muss, kann er intrazellulär nicht in diesem Maße akkumulieren, wie es bei einer geringeren Zellzahl möglich ist. Es könnte auch sein, dass die Zellen gegenseitig um die Aufnahme von DAF-FM-Diacetat kompetieren, und dass die intrazelluläre Fluoreszenzintensität deshalb mit zunehmender Zellzahl immer weiter absinkt.

Auch die mittels Fluorometrie ermittelte Gesamtfluoreszenz der mit DAF-FM-Diacetat behandelten Proben steigt mit zunehmender DAF-FM-Konzentration an. Im Vergleich zu den durchflusszytometrischen Messungen jedoch zeigt sich – bei Angabe der Werte in Prozent von der maximalen Fluoreszenz – ein eher linearer Anstieg der Fluoreszenzintensität bis zu einer DAF-FM-Konzentration von $200\mu\text{M}$. Dies liegt am ehesten begründet in der nun zusätzlichen Detektion von extrazellulärem DAF-FM, welches sich mit zunehmender DAF-FM-Konzentration immer weiter anreichert. Dies würde bedeuten, dass die Detektion von Hintergrund-Autofluoreszenz bei der NO-Messung mittels Fluorometrie eine wesentlich größere Rolle spielt als bei der Messung mittels Durchflusszytometrie. Der Anteil des fluorometrisch zusätzlich detektierten extrazellulären NO könnte bei der Entstehung der Gesamtfluoreszenzintensität jedoch von untergeordneter Bedeutung sein, insbesondere unter Berücksichtigung der extrazellulären Oxidation von NO zu Nitrit und Nitrat und der Tatsache, dass DAF-FM-Diacetat erst durch intrazelluläre Esterasen deacetyliert werden muss, um seine volle Reaktionsbereitschaft zu erlangen. Des Weiteren wurde fluorometrisch ermittelt, inwieweit die Gesamtfluoreszenzintensität der mit $10\mu\text{M}$ DAF-FM-Diacetat behandelten

Probe von der Erythrozytenkonzentration abhängt. Hierbei zeigte sich mit zunehmender Zellzahl eine Zunahme der Gesamtfluoreszenz, die bei ca. 4×10^4 Erythrozyten/ μl ein Maximum erreicht. Die Tatsache, dass die durchflusszytometrisch ermittelte intrazelluläre DAF-FM-Fluoreszenz mit zunehmender Zellzahl kontinuierlich abnimmt, während die fluorometrisch gemessene Gesamtfluoreszenz mit zunehmender Zellzahl zunächst zunimmt, könnte zeigen, dass bei der fluorometrischen Messung das Fluoreszenzsignal wesentlich von der Hintergrund-Fluoreszenz bestimmt wird, die bei zunehmender Zellzahl natürlich zunimmt. Erst bei weiterer Zunahme der Zellzahl bei gleichbleibender DAF-FM-Konzentration könnte somit der Anteil der Hintergrund-Fluoreszenz an der Gesamtfluoreszenz immer geringer und der der intrazellulären Fluoreszenz immer größer werden. Dies würde erklären, warum nach dem Maximum die Fluoreszenzintensität nicht mehr weiter ansteigt bzw. abfällt, da ab hier die fluorometrisch gemessene Gesamtfluoreszenz im Wesentlichen der durchflusszytometrisch ermittelten intrazellulären Fluoreszenz entspricht. Die Tatsache, dass bei einer Erythrozytenzahl von ungefähr $5 \times 10^3/\mu\text{l}$ (1:1000-Verdünnung) die Fluoreszenzintensität der mit $10\mu\text{M}$ DAF-FM-Diacetat behandelten Probe fast der der unbehandelten Probe entspricht und dann jedoch mit zunehmender Zellzahl von der Autofluoreszenz der Erythrozyten differiert, zeigt jedenfalls, dass mit zunehmender Zellzahl eine Zunahme DAF-FM-assoziiierter Spezies resultiert.

Durch Vergleich der durchflusszytometrisch ermittelten mit den fluorometrisch ermittelten DAF-FM-Sättigungskurven lassen sich die Vorteile der Durchflusszytometrie bei der Messung von intrazellulärem NO in Erythrozyten deutlich erkennen. Das Hintergrundsignal, welches sich aus der Autofluoreszenz der Zellen und der des Fluoreszenzindikators zusammensetzt, ist deutlich geringer, da die extrazellulären Einflüsse auf das detektierte Fluoreszenzsignal im Gegensatz zur fluorometrischen Messung entfallen. Die fluorometrischen Messungen erwiesen sich somit als deutlich störanfälliger und inkonsistenter, was auch die größeren Standardfehler belegen. Dies weist darauf hin, dass die Messung mittels Durchflusszytometrie auf akute Änderungen des intrazellulären NO-Stoffwechsels in Erythrozyten weitaus empfindlicher reagiert als die Messung mittels Fluorometrie.

Unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse wurde in den weiteren Experimenten, in denen intrazelluläres NO in Erythrozyten mittels Durchflusszytometrie detektiert werden sollte, die Zellzahl bei ca. 10^4 Erythrozyten/ μl durch die entsprechende Verdünnung (1:500) konstant gehalten und die geringste DAF-FM-Diacetat-Konzentration mit dem besten Verhältnis von Fluoreszenzintensität zu Störsignal gewählt ($10\mu\text{M}$). Um einer Erhöhung der Autofluoreszenz

der Proben durch UV-Licht oder Temperaturerhöhung (Wardman, 2007) vorzubeugen, wurden die behandelten Proben stets in kaltem PBS-Puffer verdünnt, auf Eis und unter Lichtausschluss (z.B. in Alu-Folie) aufbewahrt und innerhalb eines Zeitraums von max. 30min gemessen. Unter diesen Bedingungen zeigten sich die Ergebnisse stabil und hoch reproduzierbar. Die Reproduzierbarkeit wurde getestet, indem die Ergebnisse von zwei verschiedenen Untersuchern, die Erythrozyten von zwei verschiedenen gesunden Probanden untersucht haben, verglichen wurden. Durch Wiederholung desselben Experiments an drei verschiedenen Tagen und stets dreifacher Ausführung aller Messungen konnte somit in einem Experiment die Untersucherabhängigkeit, die Probandenabhängigkeit und die allgemeine Fehleranfälligkeit der Methode untersucht werden. Das Ausbleiben jedweder signifikanter Unterschiede und die Konstanz der Ergebnisse zeigt die hohe Validität der Methode und unterstreicht ihren hohen Stellenwert bei der Untersuchung des intrazellulären NO-Stoffwechsels in Erythrozyten.

Insgesamt lässt sich sagen, dass in dieser Arbeit durch Kombination der hohen Sensitivität des Fluoreszenzindikators DAF-FM-Diacetat mit dem Verfahren der Durchflusszytometrie eine überzeugende Methode zur Bestimmung der intrazellulären NO-Produktion in Erythrozyten etabliert wurde, die den anderen Messverfahren, insbesondere der Fluorometrie, bei der Intention, intrazelluläres NO zu quantifizieren, deutlich überlegen zu sein scheint. Die Methode ist einfach durchführbar, macht es möglich, niedrige NO-Spiegel intrazellulär zu detektieren, und benötigt kein spezifisches Equipment und keine gefährlichen Chemikalien, so dass sie in jedem Standardlabor angewandt werden kann. Durch Anwendung des Verfahrens in *in-vivo*-Modellen bzw. klinischen Studien könnte somit die intrazelluläre NO-Produktion in Erythrozyten hinsichtlich ihrer Quantität und auch qualitativen Bedeutung für den menschlichen Organismus schließlich ausreichend analysiert werden.

4.3 Herkunft des mittels DAF-FM-Diacetat detektierten NO innerhalb des Erythrozyten

Während unter Normoxie die rasche Inaktivierung von NO durch seine Reaktion mit Oxyhämoglobin innerhalb des Erythrozyten überwiegt (Doyle und Hoekstra, 1981; Kelm, 1999), sind Erythrozyten unter hypoxischen Bedingungen dazu befähigt, NO aus verschiedenen Quellen enzymatisch und nicht-enzymatisch herzustellen. Das durch die Reaktion von NO mit Sauerstoff im arteriellen Blut entstandene Nitrit kann in den Arteriolen, wenn der pO_2 abnimmt, durch das zunehmende desoxygenierte Hämoglobin in den Erythrozyten wieder reduziert werden. Dadurch entsteht Hb(III)NO, eine labile Form des

nitrosylierten Hämoglobins, aus der NO leicht freigesetzt werden kann. NO wird also in der Mikrozirkulation durch Desoxyhämoglobin-vermittelte Reduktion von Nitrit bei zunehmender pO_2 -Erniedrigung regeneriert, was schließlich zur Vasodilatation führt (Nagababu et al., 2003). Demzufolge konnten Cosby et al. (2003) durch Nitritinfusionen in die Arterie eine Erhöhung des Blutflusses im Unterarm vor und unter Belastung induzieren und zeigen, dass diese Nitrit-induzierte Vasodilatation mit einer Reduktion von Nitrit zu NO durch Desoxyhämoglobin zusammenhängt. Nagababu et al. (2003) konnten durch Kombination von Elektronenspin-Resonanz mit Chemilumineszenz herausfinden, dass Hb(III)NO mit einem Anteil von 75% den Großteil des Erythrozyten-NO darstellt. Dieser Anteil ist in venösem Blut noch höher als im arteriellen System, eine wichtige Tatsache, die auch in dieser Arbeit berücksichtigt werden muss, da nur venöses Blut untersucht wurde. Das mittels DAF-FM-Diacetat detektierte NO könnte somit wesentlich aus nitrosyliertem Hämoglobin entstammen. Webb et al. (2008) konnten nachweisen, dass eine Hypoxie-vermittelte Nitritreduktion zu NO auch enzymatisch durch die Xanthinoxidoreduktase (XOR) und die endotheliale NO-Synthase erfolgt. Durch den gleichzeitigen Nachweis dieser beiden Enzyme in der Erythrozytenmembran wird der potenzielle Vorteil der enzymatischen gegenüber der Desoxyhämoglobin-vermittelten Nitritreduktion deutlich: Die ideale Lokalisation der beiden Enzyme ermöglicht eine effektive NO-Freisetzung, indem die intrazelluläre, Hämoglobin-induzierte Inaktivierung von NO vermieden wird. Diese enzymatisch vermittelte Nitritreduktion in Erythrozyten scheint unter hypoxischen Bedingungen bei noch physiologischem pH v.a. durch die NO-Synthase zu erfolgen, bei zunehmender Azidose scheint der Anteil der XOR-vermittelten Nitritreduktion dann zuzunehmen. (Webb et al., 2008; Lundberg et al., 2009). Diese Ergebnisse unterstreichen die protektive Bedeutung der eNOS in frühen Ischämie-stadien (Endres et al., 2004).

Eine NOS-medierte NO-Produktion in Erythrozyten wird in der Literatur immer noch kontrovers diskutiert und insbesondere ihre Relevanz im Hinblick auf den Gesamt-NO-Pool im menschlichen Organismus und ihre Rolle unter normoxischen Bedingungen konnten bislang noch nicht ausreichend herausgearbeitet werden. Die Aktivität einer erythrozytären NO-Synthase ist durch die Konversion von L-Arginin zu L-Citrullin mit einer Rate von $0,3 \pm 0,1$ pmol/min/mg Protein durch Kleinbongard et al. (2006) belegt worden. Diese NOS wird konstitutiv exprimiert, ihre Aktivität ist Ca^{2+} -abhängig und sie enthält Epitope einer eNOS, hat also in vielerlei Hinsicht Ähnlichkeit mit der endothelialen Isoform des Enzyms (Kleinbongard et al., 2006; Webb et al., 2008). Auch in dieser Arbeit konnte eine NOS-abhängige NO-Generierung in Erythrozyten durch Behandlung mit dem NOS-Inhibitor

L-NIO sowie den Aminosäuren L-Lysin und L-Ornithin, die die intrazelluläre Verfügbarkeit des NOS-Substrates L-Arginin verringern, nachgewiesen werden. Die signifikante Verringerung des DAF-FM-Fluoreszenzsignals in den mit diesen Substanzen behandelten Blutproben belegt, dass erythrozytäres NO wesentlich der Produktion durch eine erythrozytäre NO-Synthase entstammt, also nicht ausschließlich extrazellulär aufgenommen wird (Wennmalm et al., 1992) oder der Konversion von Nitrit zu NO durch Desoxyhämoglobin (Rogers et al., 2005) bzw. der enzymatischen Nitritreduktion durch die Xanthinoxidoreduktase (Webb et al., 2008) entstammt.

Die mittels Durchflusszytometrie gemessene intraerythrozytäre DAF-FM-Fluoreszenz ist also abhängig von der Aktivität einer NO-Synthase. Die ausbleibende Erniedrigung des Fluoreszenzsignals nach Zugabe der D-Isoformen von Lysin und Ornithin zeigt, dass die Inhibition der NOS-Aktivität durch die Aminosäuren im Wesentlichen auf einer Einschränkung des Arginin-Imports in die Zelle beruht, da die inaktiven D-Isoformen weitaus geringere Affinität zu den entsprechenden Transportern besitzen sollten. Die Zugabe des NOS-Substrates L-Arginin hatte keinen signifikanten Effekt auf das DAF-FM-Fluoreszenzsignal. Die in dieser Arbeit gewählte L-Arginin-Konzentration von 3mM übersteigt dabei bei weitem die physiologische L-Arginin-Konzentration im Extrazellulärraum, die im Bereich von 50–200 μ M liegt (Wu und Morris, 1998). Die Arginin-Konzentration, bei der die endotheliale NO-Synthase halb gesättigt ist, beträgt 1–10 μ M (Palmer und Moncada, 1989; Pollock et al., 1991). Dennoch konnten Bohlen und Nase (2000) nachweisen, dass mit einer supraphysiologischen Arginin-Konzentration von 1mM fast eine Verdopplung der *in-vivo*-NO-Konzentration möglich ist. Diese Erhöhung der NO-Produktion durch extrazellulär zugefügtes Arginin trotz Vorliegen einer eNOS-sättigenden Argininkonzentration intrazellulär wird als „Arginin-Paradoxon“ bezeichnet (Kurz und Harrison, 1997). Dieses wurde durch McDonald et al. (1997) durch die Existenz eines eNOS-CAT1-Komplexes in Endothelzellen erklärt. CAT1 ist ein Arginin-Transporter, der zum γ^+ -Transportsystem gehört und clusterartig in bestimmten Regionen der Plasmamembran, den sog. Caveolae, lokalisiert ist (McDonald et al., 1997). Das Ausbleiben der Fluoreszenzerhöhung in den mit 3mM Arginin behandelten Proben in dieser Arbeit könnte durch ein Fehlen eines derartigen Enzym-Transporter-Komplexes in Erythrozyten bei intrazellulär gesättigter NO-Synthase erklärt werden. Allerdings könnte dadurch, dass DAF-FM-Diacetat nur das intrazellulär lokalisierte NO detektiert, die NO-Produktion durch einen derartigen Komplex einfach nicht detektiert werden, da das auf diese Weise produzierte NO direkt nach extrazellulär gelangt. Nähere Untersuchungen zur Identifizierung einer dem

eNOS-CAT1-Komplex analogen Struktur in Erythrozyten würden Klarheit in diesem Sachverhalt bringen.

Die Hypothese, dass L-Valin die erythrozytäre Arginase inhibieren und dadurch über eine Erhöhung der Substratverfügbarkeit zu einer erhöhten NOS-Aktivität führen würde, konnte nicht belegt werden. Auch ein synergistischer Effekt durch zusätzliche Zugabe von L-Arginin konnte nicht beobachtet werden. Dies könnte v.a. darin begründet liegen, dass L-Valin in einer Konzentration von 20mM auch effektiv den Arginin-Transport in den Erythrozyten via γ^+ L-System inhibiert. Diese beiden Effekte von L-Valin, die Inhibierung der Arginase auf der einen und die Inhibierung des Arginin-Transports auf der anderen Seite, könnten „netto“ dazu führen, dass keine Änderung des DAF-FM-Fluoreszenzsignals resultiert. Kim et al. (2002) konnten die Arginase I in Erythrozyten nachweisen. Der K_M -Wert der humanen Arginase für L-Arginin beträgt 1mM (Di Costanzo et al., 2005) und ist damit um ein Vielfaches höher als der der NO-Synthase mit 2–20 μ M (Griffith und Stuehr, 1995), so dass es normalerweise nicht zur direkten Competition der beiden Enzyme um ihr Substrat L-Arginin kommen sollte. Unter pathophysiologischen Zuständen jedoch kann die Arginase hochreguliert werden und dadurch funktionell die NOS-Aktivität hemmen (Zhang et al., 2004; Demougeot et al., 2005; Maarsingh et al., 2006). Die geringe Aktivität der erythrozytären Arginase unter physiologischen Bedingungen könnte auch mit erklären, warum Zugabe von L-Valin zu keiner signifikanten Veränderung der NO-Produktion führt.

Um herauszufinden, ob auch eine Nitrit-abhängige NO-Synthese innerhalb des Erythrozyten stattfindet, und um ggf. eine Nitrit-vermittelte NO-Bildung unter azidotischen Bedingungen zu messen, wurde die Abhängigkeit des DAF-FM-Fluoreszenzsignals von der Nitrit- und Nitratkonzentration bei neutralem (pH 7,4) und saurem (pH 6,8 und 5,5) pH-Wert untersucht. Dazu wurden die Erythrozyten jeweils in der Nitrit- bzw. Nitratlösung mit dem entsprechenden pH-Wert resuspendiert. Die verwendete Nitritkonzentration betrug 10 μ M und die Nitratkonzentration 100 μ M. Der pH-Wert von 6,8 und die Nitritkonzentration von 10 μ M wurden von Webb et al. (2008) schon erfolgreich eingesetzt, um die enzymatische Nitritreduktion in Erythrozyten zu demonstrieren. Die physiologische Nitritkonzentration im Plasma liegt allerdings im Bereich von 150–1000nM, so dass die hier eingesetzte Nitritkonzentration bis zu ca. 50-mal höher ist. Schon eine Nitritkonzentration von 500nM führt in Anwesenheit von Erythrozyten zu einer signifikant gesteigerten Aortendilatation (Cosby et al., 2003). Jeffers et al. (2005) konnten zeigen, dass supraphysiologische Nitritkonzentrationen durch Desoxyhämoglobin-vermittelte Nitritreduktion zu einer Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase führen. Es konnte also davon ausgegangen

werden, dass eine Nitritkonzentration von $10\mu\text{M}$ durch erhöhte Nitritreduktion zu einer effektiven Steigerung der NO-Produktion führt. Eine signifikante Erhöhung der intrazellulären DAF-FM-Fluoreszenz in Erythrozyten durch $10\mu\text{M}$ Nitrit konnte in dieser Arbeit allerdings nicht festgestellt werden. Untersuchungen mit höheren Nitritkonzentrationen durch unsere Arbeitsgruppe konnten jedoch bereits eine Nitrit-abhängige Erhöhung der intrazellulären DAF-FM-Konzentration in Erythrozyten nachweisen. Die physiologischen Nitratplasmaspiegel sind mit $5,7\text{--}60\mu\text{M}$ viel höher als die Nitritspiegel (Green et al., 1982; Bryan et al., 2004), dementsprechend wurde in dieser Arbeit eine Nitratkonzentration verwendet, die 10-mal so hoch wie die Nitritkonzentration ist. Auch durch Zugabe von Nitrat konnte keine signifikante Veränderung des DAF-FM-Fluoreszenzsignals bewirkt werden. Insgesamt zeigt die Tatsache, dass Zugabe von Nitrit bzw. Nitrat bei verschiedenen pH-Werten keine signifikanten Auswirkungen auf das DAF-FM-Fluoreszenzsignal hat, auch noch einmal die hohe Spezifität von DAF-FM für NO.

Bei einem pH-Wert von 6,8 zeigte sich sowohl bei der Kontrolle als auch bei den mit Nitrit und Nitrat behandelten Erythrozyten eine Erhöhung des DAF-FM-Fluoreszenzsignals gegenüber den Proben mit dem neutralen pH-Wert. Dies könnte auf einer Zunahme der Gesamt-Nitritreduktase-Aktivität in den Erythrozyten durch Abnahme des pH-Wertes beruhen. Hierbei könnte die enzymatische Nitritreduktion in den Erythrozyten wesentlich zur Entstehung der hohen DAF-FM-Fluoreszenzintensität beitragen. Allerdings zeigen die Messungen bei pH 5,5, dass die Behandlung von Erythrozyten mit DAF-FM-Diacetat und die anschließende Messung der Fluoreszenz mittels Durchflusszytometrie nicht als Methode der ersten Wahl zur Untersuchung der Nitrit-abhängigen NO-Bildung in Erythrozyten bei saurem pH angewandt werden sollte. Es zeigt sich eine hoch signifikante Erniedrigung des Fluoreszenzsignals aller Proben bei pH 5,5, was auf einer in der Durchflusszytometrie erkennbaren, säurebedingten Hämolyse zurückzuführen ist. Insgesamt würde man vermuten, dass durch einen so niedrigen pH-Wert ein noch stärkeres DAF-FM-Fluoreszenzsignal resultiert, bedingt durch die verstärkte Nitritreduktase-Aktivität in den Erythrozyten unter azidotischen Bedingungen. Die säureinduzierte Schädigung der Zellen allerdings lässt eine zuverlässige Quantifizierung der intrazellulären NO-Spiegel nicht mehr zu. Die Abhängigkeit der DAF-FM-Fluoreszenz vom pH-Wert bei der Untersuchung von Erythrozyten erfordert somit die regelmäßige pH-Kontrolle der Zellsuspensionen und limitiert den Nutzen der Methode bei der Messung der Nitritreduktaseaktivität in Erythrozyten.

Eine zentrale Herausforderung besteht darin, zu verstehen, wie das mittels DAF-FM-Diacetat detektierte intraerythrozytäre NO imstande ist, der schnellen und irreversiblen Reaktion mit

Oxyhämoglobin, aus der Nitrit hervorgeht, zu entgehen. Die Tatsache, dass die erythrozytäre NO-Synthase u.a. an der dem Zytoplasma zugewandten Seite der Erythrozyten-Plasmamembran lokalisiert ist (Kleinbongard et al., 2006), zeigt, dass die Erythrozytenmembran eine zentrale Rolle in diesem Mechanismus zu spielen scheint. In Analogie zu der Lokalisation des eNOS-CAT1-Komplexes in den Caveolae der Endothelzellmembran könnte ein solcher Komplex aus Transportprotein und NO-Synthase in den *Lipid rafts* der Erythrozytenmembran lokalisiert sein. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass ein stabiles Zwischenprodukt bei der Reduktion von Nitrit durch Hämoglobin gebildet wird, z.B. ein Nitrosothiol oder Peroxynitrit, welches dann leicht aus dem Erythrozyten herausdiffundieren und so NO-Bioaktivität transduzieren kann. Dies würde auch unterstreichen, warum sich die in dieser Arbeit angewandte Methode nicht zur Messung der Hämoglobin-medierten Nitritreduktion eignet, da ein solches Zwischenprodukt durch DAF-FM vermutlich nicht detektiert werden würde.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass sich die Behandlung von Erythrozyten mit DAF-FM-Diacetat und Messung des resultierenden Fluoreszenzsignals mittels Durchflusszytometrie hervorragend zur Messung der NOS-vermittelten intrazellulären NO-Produktion in Erythrozyten eignet, während der Nutzen dieser Methode bei der Messung der Nitrit-reduzierenden Aktivität in Erythrozyten eingeschränkt zu sein scheint. Die gleichzeitige Bestimmung von NO-Metaboliten im Plasma auf der einen und intrazellulärer NO-Produktion in Erythrozyten auf der anderen Seite in weiteren Studien könnte dazu beitragen, die Bedeutung der enzymatischen NO-Produktion in Erythrozyten zu definieren. Dabei könnte sich die in dieser Arbeit präsentierte Methode als sehr hilfreich erweisen.

4.4 Physiologische und klinische Bedeutung der eNOS in menschlichen Erythrozyten

Die entscheidende Frage ist, inwieweit die Aktivität der in dieser Arbeit untersuchten erythrozytären NO-Synthase *in vivo* die Homöostase im menschlichen Herz-Kreislauf-System beeinflusst. Wichtig ist dabei in Anbetracht der sich stellenden klinischen Fragestellungen insbesondere, ob eine strukturelle oder funktionelle Beeinträchtigung der erythrozytären NO-Synthase ähnliche pathologische Auswirkungen mit sich bringt wie die bereits bekannten Folgen des Enzymdefektes im Gefäßendothel. Dies würde das pathophysiologische Dogma der endothelialen Dysfunktion um einen entscheidenden Aspekt erweitern, nämlich dass die zugrundeliegenden biochemischen Veränderungen nicht nur auf die Gefäßwand beschränkt sind, sondern auch die zirkulierenden Blutzellen betreffen.

Man kann durchaus davon ausgehen, dass das in den Erythrozyten enzymatisch produzierte

NO ähnliche Bedeutung für die Mikrozirkulation hat wie das endothelial synthetisierte NO. Es ist hinlänglich bekannt, dass NO-Donoren die Verformbarkeit von Erythrozyten erhöhen (Bateman et al., 2001; Mesquita et al., 2001; Bor-Kucukatay et al., 2003). Des Weiteren haben Studien gezeigt, dass NOS-Inhibitoren die Erythrozytenverformbarkeit reduzieren (Bor-Kucukatay et al., 2003; Kleinbongard et al., 2006). Horn et al. (2011) konnten durch Experimente an der Chorioallantois von 7 Tage altem Hühnerembryo, in der die Gefäßwand noch keine glatten Muskelzellen aufweist und rheologische Veränderungen somit unabhängig vom Gefäßtonus sind, durch NOS-Inhibitor-Gabe eine Erniedrigung der Erythrozytenflussgeschwindigkeit allein durch Erniedrigung der Erythrozytenverformbarkeit, d.h. unabhängig vom Gefäßwiderstand, hervorrufen. Bezüglich der potenziellen Bedeutung des in Erythrozyten produzierten NO für die Mikrozirkulation ist auch die Arbeit von Uyklu et al. (2009) hochinteressant. Diese Arbeitsgruppe behandelte oxygenierte und desoxygenierte Erythrozyten mit dem Peroxynitrit-Donor Nitroprussid-Natrium und fand heraus, dass die Verformbarkeit der desoxygenierten Erythrozyten unter dieser Behandlung stärker zunimmt als die der oxygenierten Erythrozyten. Die Verformbarkeit des Erythrozyten ist also auch wesentlich abhängig von dessen Oxygenierungsstatus. Dies führten sie u.a. darauf zurück, dass aufgrund der geringeren NO-Inaktivierung durch Desoxyhämoglobin die basale intrazelluläre NO-Konzentration in desoxygenierten Erythrozyten größer ist als in oxygenierten. Es könnte also sein, dass desoxygenierte Erythrozyten versuchen, durch Erhöhung ihrer Verformbarkeit und die damit verbundene schnellere Passage durch die Mikrozirkulation die mangelnde Sauerstoffversorgung hypoxischen Gewebes zu kompensieren. Interessanterweise konnten Uyklu et al. (2009) durch Behandlung von desoxygenierten und oxygenierten Erythrozyten mit dem kompetitiven NOS-Inhibitor N-Omega-Nitro-L-Arginin-Methylester (L-NAME) in einer Konzentration von $1\mu\text{M}$ zeigen, dass die Verformbarkeit oxygenierter Erythrozyten wesentlich durch die Aktivität der erythrozytären NOS abhängt, während die Verformbarkeit desoxygenierter Erythrozyten durch andere NO-Quellen, z.B. Nitritreduktion durch Desoxyhämoglobin, determiniert zu sein scheint. Der Anteil der NOS-medierten Beeinflussung der zellulären Verformbarkeit hängt also vom Oxygenierungsstatus des Erythrozyten ab (Uyklu et al., 2009).

Der molekulare Mechanismus, wie NO die Erythrozytenverformbarkeit steuert, ist bislang noch nicht klar verstanden. NO könnte direkt durch Nitros(yl)ierung intrazellulärer Strukturproteine deren Funktion modulieren (Gödecke et al., 2008). Vergleicht man den Proteinhaushalt des Erythrozyten mit dem der Endothelzelle, fällt auf, dass die Erythrozyten ebenfalls Proteine besitzen, die die Wirkungen von NO auf die Physiologie der Zelle

vermitteln könnten, darunter die Guanylatzyklase und die cGMP-abhängige Proteinkinase (Barvitenko et al., 2005). Bor-Kucukatay et al. (2003) konnten festhalten, dass der regulatorische Effekt von NO auf die erythrozytäre Verformbarkeit jedoch nur teilweise von der Aktivität der erythrozytären Guanylatzyklase abhängt, und dass noch andere Mechanismen existieren müssen, die die Wirkung von NO auf die zelluläre Verformbarkeit vermitteln. Auch die Kontrolle der intrazellulären Ca^{2+} -Homöostase durch NO könnte hierbei eine Rolle spielen (Clementi, 1998). So konnte gezeigt werden, dass eine Inhibition der erythrozytären NO-Synthase zu einer signifikanten Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration führt und dass diese mit Veränderungen der rheologischen Eigenschaften der Erythrozyten verbunden ist (Bor-Küçükatay et al., 2000). Das in den Erythrozyten durch die NO-Synthase produzierte NO könnte somit eine Schutzfunktion erfüllen, die über die Aufrechterhaltung eines konstanten intrazellulären Ionen-Milieus zum Erhalt der Zellverformbarkeit führt. Des Weiteren konnte herausgefunden werden, dass NO die Leitfähigkeit der Erythrozytenmembran für Kalium reguliert (Caramelo et al., 1994; Adragna und Lauf, 1998). Auch diese Tatsache spricht für die potenzielle Bedeutung des durch NO kontrollierten intrazellulären Ionenhaushalts für den Erhalt der erythrozytären Verformbarkeit. Tatsächlich konnten Baskurt et al. (2004) zeigen, dass durch Kaliumkanalblockade der Erythrozyt vor einer Abnahme der Verformbarkeit geschützt wird. Dies zeigt, dass die Wirkung von NO auf die erythrozytäre Verformbarkeit über eine Inhibition des Kaliumausstroms aus der Zelle vermittelt werden könnte (Baskurt et al., 2004). Der Einfluss von NO auf die erythrozytäre Verformbarkeit scheint auch vom Alter der Erythrozyten abhängig zu sein. Behandlung älterer Erythrozyten mit Nitroprussid-Natrium hat keine Beeinflussung der erythrozytären Verformbarkeit zur Folge, während es bei jüngeren Erythrozyten unter dieser Behandlung zu einer signifikanten Verbesserung der Verformbarkeit kommt (Bor-Kucukatay et al., 2005). Dies lässt vermuten, dass es innerhalb des Erythrozyten ein Zielmolekül für NO geben muss, dessen intrazelluläre Konzentration oder Aktivität mit zunehmendem Alter der Zellen abnimmt. Um ein solches Zielmolekül jedoch intrazellulär erreichen zu können, muss NO zunächst einmal vor den raschen Inaktivierungsreaktionen mit Hämoglobin geschützt werden. In diesem Zusammenhang könnte die Lokalisation einer membranständigen erythrozytären NOS in unmittelbarer Nachbarschaft zu den Verankerungsstellen der erythrozytären Zytoskelettproteine, ja sogar deren funktionelle Verknüpfung, von großer Bedeutung sein.

Zusammenfassend lässt sich aus den zahlreichen Studien schlussfolgern, dass die erythrozytäre NO-Synthase eine wichtige Rolle im Erhalt der erythrozytären Verformbarkeit

zu spielen scheint, was ihr eine essenzielle Bedeutung in der Mikrozirkulation bescheinigt. Dieser Umstand – in Kombination mit der Entschlüsselung der Regulationsmechanismen der erythrozytären NOS – ist besonders im Hinblick auf therapeutische Perspektiven hoch interessant.

Cortese-Krott et al. (2012) konnten nachweisen, dass die Expression und Aktivität der erythrozytären NO-Synthase bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit signifikant erniedrigt sind. Durch Regressionsanalyse ließ sich feststellen, dass die erythrozytäre eNOS-Expression mit der Endothelfunktion korreliert. Dabei zeigte sich bei den KHK-Patienten eine signifikante Reduktion der Fluss-vermittelten Vasodilatation in der A. brachialis als Zeichen der endothelialen Dysfunktion, die begleitet war von einer verminderten erythrozytären eNOS-Expression, nachgewiesen durch Western-Blot-Analyse. Durch Messung der Konversionsrate von radioaktiv markiertem Arginin zu Citrullin als Zeichen der Aktivität des isolierten Enzyms konnte des Weiteren gezeigt werden, dass die erythrozytäre eNOS-Aktivität bei KHK-Patienten signifikant erniedrigt ist im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe (Cortese-Krott et al., 2012).

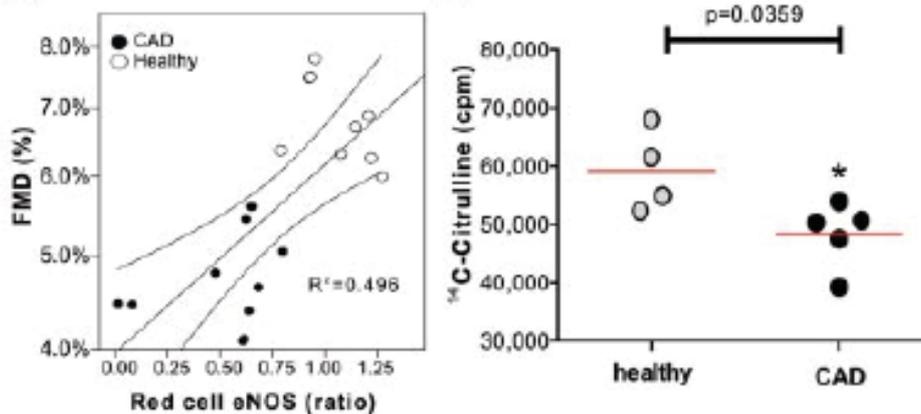


Abb.22

Durch univariate Regressionsanalyse zeigte sich bei Korrelation der Fluss-vermittelten Vasodilatation mit der erythrozytären eNOS-Expression, dass bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit die endotheliale Dysfunktion mit einer verminderten eNOS-Expression in den Erythrozyten einhergeht (linke Graphik). Durch Bestimmung der erythrozytären eNOS-Aktivität mittels Messung der Konversion von radiaktiv markiertem Arginin zu Citrullin konnte festgestellt werden, dass die Enzymaktivität bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit signifikant niedriger ist als bei Gesunden (rechte Graphik). CAD = *Coronary artery disease*, FMD = *Flow mediated dilatation*. (Cortese-Krott et al., 2012)

Die Tatsache, dass die Expression und Aktivität der erythrozytären NO-Synthase den „Gesundheitszustand“ des Gefäßendothels widerspiegeln, zeigt, dass der erythrozytären NO-Synthase eine wesentliche Bedeutung in der Pathophysiologie kardiovaskulärer Erkrankungen zuzuschreiben ist und dass die sog. endotheliale Dysfunktion stets als Systempathologie zu bewerten ist.

Die Resultate unterstreichen, warum Zustände, die mit einer verminderten Erythrozytenzahl

und -funktion einhergehen (insbesondere das weite Spektrum der Anämien), als eigenständige kardiovaskuläre Risikofaktoren erachtet werden müssen. Andererseits sollte die Entdeckung der erythrozytären eNOS v.a. zuversichtlich stimmen und Anlass zur Hoffnung geben, da sich durch sie zukünftig völlig neue diagnostische und therapeutische Ansätze zur Bekämpfung kardiovaskulärer Erkrankungen ergeben könnten.

5. Zusammenfassung

Es ist bekannt, dass Erythrozyten eine funktionelle NO-Synthase exprimieren, die weitestgehend der endothelialen NO-Synthase (eNOS) entspricht. Ein solches Enzym konnte jedoch bis dato noch nicht direkt nachgewiesen werden, und daher sind auch die (patho-)physiologische Bedeutung des in den Erythrozyten produzierten NO und seine klinische Relevanz bislang nicht ausreichend geklärt. Der experimentelle Zugang zur erythrozytären NOS-Aktivität wird dabei durch den Mangel an spezifischen Methoden erschwert.

In dieser Doktorarbeit konnte durch eine neue Strategie eine endotheliale NO-Synthase aus menschlichen Erythrozyten isoliert werden. Das Prinzip dieser Methode ist, dass die Erythrozyten zunächst lysiert werden und das erythrozytäre NOS-Protein dann über eine spezielle Immunpräzipitationsmethode aus diesem Lysat isoliert und dann mittels Gelelektrophorese aufgetrennt wird. Durch anschließende Visualisierung mittels Coomassie-Blau-Färbung und Überprüfung der Spezifität mit dem Verfahren der Western-Blot-Analyse konnte der Beweis für die Existenz einer eNOS in menschlichen Erythrozyten erbracht werden.

Des Weiteren wurde in dieser Arbeit eine neue Methode zur Messung der intrazellulären NO-Produktion in Erythrozyten etabliert und damit die Aktivität einer erythrozytären NO-Synthase nachgewiesen. Hierzu wurde die Sensitivität des zellpermeablen Fluoreszenzfarbstoffes 4-Amino-5-methylamino-2,7-difluorofluorescein Diacetat (DAF-FM-Diacetat) mit dem Verfahren der Durchflusszytometrie kombiniert, indem Erythrozyten gesunder Probanden mit DAF-FM-Diacetat behandelt wurden und anschließend die Fluoreszenz der Erythrozytenpopulation in einem Durchflusszytometer (BD FACS Canto II) gemessen und aufgenommen wurde. Dieses mittels Durchflusszytometrie gemessene intrazelluläre Fluoreszenzsignal wurde mit dem in einem Fluorometer gemessenen Gesamtfluoreszenzsignal verglichen. Die Etablierung dieses Verfahrens könnte durch Anwendung in *in-vivo*- und klinischen Studien dazu beitragen, dass schließlich auch die klinische Bedeutung des NOS-abhängigen NO in Erythrozyten entschlüsselt wird.

Durch den Nachweis der Expression einer aktiven eNOS in Erythrozyten wird das Verständnis von der Pathophysiologie der „endothelialen Dysfunktion“ um einen entscheidenden Aspekt erweitert, durch den sich zukünftig ein völlig neuer Ansatzpunkt für die Entwicklung neuer diagnostischer und therapeutischer Strategien zur Bekämpfung kardiovaskulärer Erkrankungen ergeben könnte.

6. Literaturverzeichnis

- Abu-Soud HM, Stuehr DJ 1993. *Nitric oxide synthases reveal a role for calmodulin in controlling electron transfer*. Proc Natl Acad Sci U S A. 90(22):10769-72.
- Adragna NC, Lauf PK 1998. *Role of nitrite, a nitric oxide derivative, in K-Cl cotransport activation of low-potassium sheep red blood cells*. J Membr Biol. 166(3):157-67.
- Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG 2001. *Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition*. Biochem J. 357(Pt 3):593-615.
- Amer J, Goldfarb A, Fibach E 2004. *Flow cytometric analysis of the oxidative status of normal and thalassemic red blood cells*. Cytometry A. 60(1):73-80.
- Amer J, Zelig O, Fibach E 2008. *Oxidative status of red blood cells, neutrophils, and platelets in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria*. Exp Hematol. 36(4):369-77.
- Angelo S, Devés R 1994. *Amino acid transport system γ +L of human erythrocytes: specificity and cation dependence of the translocation step*. J Membr Biol. 141(2):183-92.
- Arnal JF, Münzel T, Venema RC, James NL, Bai CL, Mitch WE, Harrison DG 1995. *Interactions between L-arginine and L-glutamine change endothelial NO production. An effect independent of NO synthase substrate availability*. J Clin Invest. 95(6):2565-72.
- Azarov I, Liu C, Reynolds H, Tsekouras Z, Lee JS, Gladwin MT, Kim-Shapiro DB 2011. *Mechanisms of Slower Nitric Oxide Uptake by Red Blood Cells and Other Hemoglobin-containing Vesicles*. J Biol Chem. 286(38):33567-79.
- Bachetti T, Comini L, Francolini G, Bastianon D, Valetti B, Cadei M, Grigolato P, Suzuki H, Finazzi D, Albertini A, Curello S, Ferrari R 2004. *Arginase pathway in human endothelial cells in pathophysiological conditions*. J Mol Cell Cardiol. 37(2):515-23.
- Barvitenko NN, Adragna NC, Weber RE 2005. *Erythrocyte signal transduction pathways, their oxygenation dependence and functional significance*. Cell Physiol Biochem. 15(1-4):1-18.
- Baskurt OK, Uyuklu M, Meiselman HJ 2004. *Protection of erythrocytes from sub-hemolytic mechanical damage by nitric oxide mediated inhibition of potassium leakage*. Biorheology. 41(2):79-89.
- Basu S, Grubina R, Huang J, Conradie J, Huang Z, Jeffers A, Jiang A, He X, Azarov I, Seibert R, Mehta A, Patel R, King SB, Hogg N, Ghosh A, Gladwin MT, Kim-Shapiro DB 2007. *Catalytic generation of N₂O₃ by the concerted nitrite reductase and anhydrase activity of hemoglobin*. Nat Chem Biol. 3(12):785-94.
- Bateman RM, Jagger JE, Sharpe MD, Ellsworth ML, Mehta S, Ellis CG 2001. *Erythrocyte deformability is a nitric oxide-mediated factor in decreased capillary density during sepsis*. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 280(6):H2848-56.
- Bernard A, Meier C, Lopez N, May J, Chang P, Boulanger B, Kearney P 2007. *Packed red blood cell-associated arginine depletion is mediated by arginase*. J Trauma. 63(5):1108-12; discussion 1112.
- Bhattacharya S, Chakraborty Patra S, Basu Roy S, Kahn NN, Sinha AK 2001. *Purification and properties of insulin-activated nitric oxide synthase from human erythrocyte membranes*. Arch Physiol Biochem. 109(5):441-9.

- Bivalacqua TJ, Hellstrom WJ, Kadowitz PJ, Champion HC 2001. *Increased expression of arginase II in human diabetic corpus cavernosum: in diabetic-associated erectile dysfunction*. Biochem Biophys Res Commun. 283(4):923-7.
- Böger RH, Bode-Böger SM, Szuba A, Tsao PS, Chan JR, Tangphao O, Blaschke TF, Cooke JP 1998. *Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a novel risk factor for endothelial dysfunction: its role in hypercholesterolemia*. Circulation. 98(18):1842-7.
- Bohlen HG, Nase GP 2000. *Dependence of intestinal arteriolar regulation on flow-mediated nitric oxide formation*. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 279(5):H2249-58.
- Bor-Kucukatay M, Wenby RB, Meiselman HJ, Baskurt OK 2003. *Effects of nitric oxide on red blood cell deformability*. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 284(5):H1577-84.
- Bor-Kucukatay M, Meiselman HJ, Başkurt OK 2005. *Modulation of density-fractionated RBC deformability by nitric oxide*. Clin Hemorheol Microcirc. 33(4):363-7.
- Bor-Küçükataay M, Yalçın O, Gökalp O, Kipmen-Korgun D, Yesilkaya A, Baykal A, Ispir M, Senturk UK, Kaputlu I, Başkurt OK 2000. *Red blood cell rheological alterations in hypertension induced by chronic inhibition of nitric oxide synthesis in rats*. Clin Hemorheol Microcirc. 22(4):267-75.
- Bröer A, Wagner CA, Lang F, Bröer S 2000. *The heterodimeric amino acid transporter 4F2hc/y+LAT2 mediates arginine efflux in exchange with glutamine*. Biochem J. 349 Pt 3:787-95.
- Brown LA, Key BJ, Lovick TA 1999. *Bio-imaging of nitric oxide-producing neurones in slices of rat brain using 4,5-diaminofluorescein*. J Neurosci Methods. 92(1-2):101-10.
- Berkels R, Dachs C, Roesen R, Klaus W 2000. *Simultaneous measurement of intracellular Ca(2+) and nitric oxide: a new method*. Cell Calcium. 27(5):281-6.
- Bryan NS, Bian K, Murad F 2009. *Discovery of the nitric oxide signaling pathway and targets for drug development*. Front Biosci. 14:1-18.
- Bryan NS, Rassaf T, Maloney RE, Rodriguez CM, Saijo F, Rodriguez JR, Feelisch M 2004. *Cellular targets and mechanisms of nitros(yl)ation: an insight into their nature and kinetics in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A. 101(12):4308-13.
- Buga GM, Singh R, Pervin S, Rogers NE, Schmitz DA, Jenkinson CP, Cederbaum SD, Ignarro LJ 1996. *Arginase activity in endothelial cells: inhibition by NG-hydroxy-L-arginine during high-output NO production*. Am J Physiol. 271(5 Pt 2):H1988-98.
- Busse R, Fleming I 1995. *Regulation and functional consequences of endothelial nitric oxide formation*. Ann Med. 27(3):331-40.
- Caramelo C, Riesco A, Outeiriño J, Millás I, Blum G, Monzú B, Casado V, Sánchez L, Mosquera JR, Casado S, et al 1994. *Effects of nitric oxide on red blood cells: changes in erythrocyte resistance to hypotonic hemolysis and potassium efflux by experimental maneuvers that decrease nitric oxide*. Biochem Biophys Res Commun. 199(2):447-54.
- Chakravorty D, Hensel M 2003. *Inducible nitric oxide synthase and control of intracellular bacterial pathogens*. Microbes Infect. 5(7):621-7.
- Chen LY, Mehta JL 1998. *Evidence for the presence of L-arginine-nitric oxide pathway in human red blood cells: relevance in the effects of red blood cells on platelet function*. J Cardiovasc Pharmacol. 32(1):57-61.

Chen ZP, Mitchelhill KI, Michell BJ, Stapleton D, Rodriguez-Crespo I, Witters LA, Power DA, Ortiz de Montellano PR, Kemp BE 1999. *AMP-activated protein kinase phosphorylation of endothelial NO synthase*. FEBS Lett. 443(3):285-9.

Chicoine LG, Paffett ML, Young TL, Nelin LD 2004. *Arginase inhibition increases nitric oxide production in bovine pulmonary arterial endothelial cells*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 287(1):L60-8.

Christensen HN 1964. *A transport system serving for mono- and diamino acids*. Proc Natl Acad Sci U S A. 51:337-44.

Clementi E 1998. *Role of nitric oxide and its intracellular signalling pathways in the control of Ca²⁺ homeostasis*. Biochem Pharmacol. 55(6):713-8.

Cooke JP 2000. *Does ADMA cause endothelial dysfunction?* Arterioscler Thromb Vasc Biol. 20(9):2032-7.

Cortese-Krott MM, Rodriguez-Mateos A, Sansone R, Kuhnle GG, Thasian-Sivarajah S, Krenz T, Horn P, Krisp C, Wolters D, Heiß C, Kröncke KD, Hogg N, Feelisch M, Kelm M 2012. *Human red blood cells at work: identification and visualization of erythrocytic eNOS activity in health and disease*. Blood. 120(20):4229-37.

Cosby K, Partovi KS, Crawford JH, Patel RP, Reiter CD, Martyr S, Yang BK, Waclawiw MA, Zalos G, Xu X, Huang KT, Shields H, Kim-Shapiro DB, Schechter AN, Cannon RO 3rd, Gladwin MT 2003. *Nitrite reduction to nitric oxide by deoxyhemoglobin vasodilates the human circulation*. Nat Med. 9(12):1498-505.

Das P, Lahiri A, Lahiri A, Chakravorty D 2010. *Modulation of the arginase pathway in the context of microbial pathogenesis: a metabolic enzyme moonlighting as an immune modulator*. PLoS Pathog. 6(6):e1000899.

Dedio J, König P, Wohlfart P, Schroeder C, Kummer W, Müller-Esterl W 2001. *NOSIP, a novel modulator of endothelial nitric oxide synthase activity*. FASEB J. 15(1):79-89.

Deliconstantinos G, Villiotou V, Stavrides JC, Salemes N, Gogas J 1995. *Nitric oxide and peroxynitrite production by human erythrocytes: a causative factor of toxic anemia in breast cancer patients*. Anticancer Res. 15(4):1435-46.

Demougeot C, Prigent-Tessier A, Marie C, Berthelot A 2005. *Arginase inhibition reduces endothelial dysfunction and blood pressure rising in spontaneously hypertensive rats*. J Hypertens. 23(5):971-8.

Devés R, Boyd CA 1998. *Transporters for cationic amino acids in animal cells: discovery, structure, and function*. Physiol Rev. 78(2):487-545.

Devés R, Chavez P, Boyd CA 1992. *Identification of a new transport system (y⁺L) in human erythrocytes that recognizes lysine and leucine with high affinity*. J Physiol. 454:491-501.

Di Costanzo L, Sabio G, Mora A, Rodriguez PC, Ochoa AC, Centeno F, Christianson DW 2005. *Crystal structure of human arginase I at 1.29-Å resolution and exploration of inhibition in the immune response*. Proc Natl Acad Sci U S A. 102(37):13058-63.

Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM 1999. *Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation*. Nature. 399(6736):601-5.

- Doyle MP, Hoekstra JW 1981. *Oxidation of nitrogen oxides by bound dioxygen in hemoproteins*. J Inorg Biochem. 14(4):351-8.
- Duncker DJ, Bache RJ 1994. *Inhibition of nitric oxide production aggravates myocardial hypoperfusion during exercise in the presence of a coronary artery stenosis*. Circ Res. 74(4):629-40.
- Durante W, Johnson FK, Johnson RA 2007. *Arginase: a critical regulator of nitric oxide synthesis and vascular function*. Clin Exp Pharmacol Physiol. 34(9):906-11.
- Durante W, Liao L, Reyna SV, Peyton KJ, Schafer AI 2000. *Physiological cyclic stretch directs L-arginine transport and metabolism to collagen synthesis in vascular smooth muscle*. FASEB J. 14(12):1775-83.
- Durante W, Liao L, Reyna SV, Peyton KJ, Schafer AI 2001. *Transforming growth factor-beta(1) stimulates L-arginine transport and metabolism in vascular smooth muscle cells: role in polyamine and collagen synthesis*. Circulation. 103(8):1121-7.
- Du XL, Edelstein D, Dimmeler S, Ju Q, Sui C, Brownlee M 2001. *Hyperglycemia inhibits endothelial nitric oxide synthase activity by posttranslational modification at the Akt site*. J Clin Invest. 108(9):1341-8.
- Endres M, Laufs U, Liao JK, Moskowitz MA 2004. *Targeting eNOS for stroke protection*. Trends Neurosci. 27(5):283-9.
- Feron O, Dessy C, Opel DJ, Arstall MA, Kelly RA, Michel T 1998. *Modulation of the endothelial nitric-oxide synthase-caveolin interaction in cardiac myocytes. Implications for the autonomic regulation of heart rate*. J Biol Chem. 273(46):30249-54.
- Fleming I, Fisslthaler B, Dimmeler S, Kemp BE, Busse R 2001. *Phosphorylation of Thr(495) regulates Ca(2+)/calmodulin-dependent endothelial nitric oxide synthase activity*. Circ Res. 88(11):E68-75.
- Förstermann U, Kleinert H, Gath I, Schwarz P, Closs EI, Dun NJ 1995. *Expression and expressional control of nitric oxide synthases in various cell types*. Adv Pharmacol. 34:171-86.
- Förstermann U, Closs EI, Pollock JS, Nakane M, Schwarz P, Gath I, Kleinert H 1994. *Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions*. Hypertension. 23(6 Pt 2):1121-31.
- Francis SH, Busch JL, Corbin JD, Sibley D 2010. *cGMP-dependent protein kinases and cGMP phosphodiesterases in nitric oxide and cGMP action*. Pharmacol Rev. 62(3):525-63.
- Ghosh DK, Stuehr DJ 1995. *Macrophage NO synthase: characterization of isolated oxygenase and reductase domains reveals a head-to-head subunit interaction*. Biochemistry. 34(3):801-7.
- Gladwin MT, Kim-Shapiro DB 2008. *The functional nitrite reductase activity of the heme-globins*. Blood. 112(7):2636-47.
- Gödecke A, Schrader J, Reinartz M 2008. *Nitric oxide-mediated protein modification in cardiovascular physiology and pathology*. Proteomics Clin Appl. 2(6):811-22.
- Gow AJ, Stamler JS 1998. *Reactions between nitric oxide and haemoglobin under physiological conditions*. Nature. 391(6663):169-73.

- Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR 1982. *Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids*. Anal Biochem. 126(1):131-8.
- Griffith OW, Stuehr DJ 1995. *Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanism*. Annu Rev Physiol. 57:707-36.
- Hall CN, Garthwaite J 2009. *What is the real physiological NO concentration in vivo?* Nitric Oxide. 21(2):92-103.
- Herold S 2004. *The outer-sphere oxidation of nitrosyliron(II)hemoglobin by peroxynitrite leads to the release of nitrogen monoxide*. Inorg Chem. 43(13):3783-5.
- Horn P, Cortese-Krott MM, Keymel S, Kumara I, Burghoff S, Schrader J, Kelm M, Kleinbongard P 2011. *Nitric oxide influences red blood cell velocity independently of changes in the vascular tone*. Free Radic Res. 45(6):653-61.
- Hunter CJ, Dejam A, Blood AB, Shields H, Kim-Shapiro DB, Machado RF, Tarekegn S, Mulla N, Hopper AO, Schechter AN, Power GG, Gladwin MT 2004. *Inhaled nebulized nitrite is a hypoxia-sensitive NO-dependent selective pulmonary vasodilator*. Nat Med. 10(10):1122-7.
- Ignarro LJ, Buga GM, Wei LH, Bauer PM, Wu G, del Soldato P 2001. *Role of the arginine-nitric oxide pathway in the regulation of vascular smooth muscle cell proliferation*. Proc Natl Acad Sci U S A. 98(7):4202-8.
- Itoh Y, Ma FH, Hoshi H, Oka M, Noda K, Ukai Y, Kojima H, Nagano T, Toda N 2000. *Determination and bioimaging method for nitric oxide in biological specimens by diamino fluorescein fluorometry*. Anal Biochem. 287(2):203-9.
- Jeffers A, Xu X, Huang KT, Cho M, Hogg N, Patel RP, Kim-Shapiro DB 2005. *Hemoglobin mediated nitrite activation of soluble guanylyl cyclase*. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol. 142(2):130-5.
- Jubelin BC, Gierman JL 1996. *Erythrocytes may synthesize their own nitric oxide*. Am J Hypertens. 9(12 Pt 1):1214-9.
- Kang ES, Ford K, Grokulsky G, Wang YB, Chiang TM, Acchiardo SR 2000. *Normal circulating adult human red blood cells contain inactive NOS proteins*. J Lab Clin Med. 135(6):444-51.
- Kelm M 1999. *Nitric oxide metabolism and breakdown*. Biochim Biophys Acta. 1411(2-3):273-89.
- Kim PS, Iyer RK, Lu KV, Yu H, Karimi A, Kern RM, Tai DK, Cederbaum SD, Grody WW 2002. *Expression of the liver form of arginase in erythrocytes*. Mol Genet Metab. 76(2):100-10.
- Kleinbongard P, Keymel S, Kelm M 2007. *New functional aspects of the L-arginine-nitric oxide metabolism within the circulating blood*. Thromb Haemost. 98(5):970-4.
- Kleinbongard P, Schulz R, Rassaf T, Lauer T, Dejam A, Jax T, Kumara I, Gharini P, Kabanova S, Ozüyan B, Schnürch HG, Gödecke A, Weber AA, Robenek M, Robenek H, Bloch W, Rösen P, Kelm M 2006. *Red blood cells express a functional endothelial nitric oxide synthase*. Blood. 107(7):2943-51.
- Kleinert H, Pautz A, Linker K, Schwarz PM 2004. *Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase*. Eur J Pharmacol. 500(1-3):255-66.
- Knowles RG, Moncada S 1994. *Nitric oxide synthases in mammals*. Biochem J. 298 (Pt2):249-58.

- Kojima H, Nakatsubo N, Kikuchi K, Kawahara S, Kirino Y, Nagoshi H, Hirata Y, Nagano T 1998. *Detection and imaging of nitric oxide with novel fluorescent indicators: diaminofluoresceins*. Anal Chem. 70(13):2446-53.
- Kojima H, Urano Y, Kikuchi K, Higuchi T, Hirata Y, Nagano T 1999. *Fluorescent Indicators for Imaging Nitric Oxide Production*. Angew Chem Int Ed Engl. 38(21):3209-3212.
- Kubes P, Suzuki M, Granger DN 1991. *Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion*. Proc Natl Acad Sci U S A. 88(11):4651-5.
- Kuhl SJ, Rosen H 1998. *Nitric oxide and septic shock. From bench to bedside*. West J Med. 168(3):176-81.
- Kurz S, Harrison DG 1997. *Insulin and the arginine paradox*. J Clin Invest. 99(3):369-70.
- Laemmli UK 1970. *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature. 227(5259):680-5.
- Leikert JF, Räthel TR, Müller C, Vollmar AM, Dirsch VM 2001. *Reliable in vitro measurement of nitric oxide released from endothelial cells using low concentrations of the fluorescent probe 4,5-diaminofluorescein*. FEBS Lett. 506(2):131-4.
- Leiper J, Vallance P 1999. *Biological significance of endogenous methylarginines that inhibit nitric oxide synthases*. Cardiovasc Res. 43(3):542-8.
- Leone AM, Palmer RM, Knowles RG, Francis PL, Ashton DS, Moncada S 1991. *Constitutive and inducible nitric oxide synthases incorporate molecular oxygen into both nitric oxide and citrulline*. J Biol Chem. 266(35):23790-5.
- Liu X, Miller MJ, Joshi MS, Sadowska-Krowicka H, Clark DA, Lancaster JR Jr 1998. *Diffusion-limited reaction of free nitric oxide with erythrocytes*. J Biol Chem. 273(30):18709-13.
- López-Figueroa MO, Day HE, Lee S, Rivier C, Akil H, Watson SJ 2000. *Temporal and anatomical distribution of nitric oxide synthase mRNA expression and nitric oxide production during central nervous system inflammation*. Brain Res. 852(1):239-46.
- López-Figueroa MO, Caamaño C, Morano MI, Rønn LC, Akil H, Watson SJ 2000. *Direct evidence of nitric oxide presence within mitochondria*. Biochem Biophys Res Commun. 272(1):129-33.
- Loscalzo J 2001. *Nitric oxide insufficiency, platelet activation, and arterial thrombosis*. Circ Res. 88(8):756-62.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ 1951. *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. J Biol Chem. 193(1):265-75.
- Lundberg JO, Gladwin MT, Ahluwalia A, Benjamin N, Bryan NS, Butler A, Cabrales P, Fago A, Feelisch M, Ford PC, Freeman BA, Frenneaux M, Friedman J, Kelm M, Kevil CG, Kim-Shapiro DB, Kozlov AV, Lancaster JR Jr, Lefler DJ, McColl K, McCurry K, Patel RP, Petersson J, Rassaf T, Reutov VP, Richter-Addo GB, Schechter A, Shiva S, Tsuchiya K, van Faassen EE, Webb AJ, Zuckerbraun BS, Zweier JL, Weitzberg E 2009. *Nitrate and nitrite in biology, nutrition and therapeutics*. Nat Chem Biol. 5(12):865-9.
- Maarsingh H, Leusink J, Bos IS, Zaagsma J, Meurs H 2006. *Arginase strongly impairs neuronal nitric oxide-mediated airway smooth muscle relaxation in allergic asthma*. Respir Res. 7:6.

- Marletta MA 1994. *Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis*. Cell. 78(6):927-30.
- McCall TB, Feelisch M, Palmer RM, Moncada S 1991. *Identification of N-iminoethyl-L-ornithine as an irreversible inhibitor of nitric oxide synthase in phagocytic cells*. Br J Pharmacol. 102(1):234-8.
- McDonald KK, Zharikov S, Block ER, Kilberg MS 1997. *A caveolar complex between the cationic amino acid transporter 1 and endothelial nitric-oxide synthase may explain the "arginine paradox"*. J Biol Chem. 272(50):31213-6.
- McMahon TJ, Moon RE, Lusching BP, Carraway MS, Stone AE, Stolp BW, Gow AJ, Pawloski JR, Watke P, Singel DJ, Piantadosi CA, Stamler JS 2002. *Nitric oxide in the human respiratory cycle*. Nat Med. 8(7):711-7.
- Mesquita R, Pires I, Saldanha C, Martins-Silva J 2001. *Effects of acetylcholine and spermineNONOate on erythrocyte hemorheologic and oxygen carrying properties*. Clin Hemorheol Microcirc. 25(3-4):153-63.
- Michel T, Feron O 1997. *Nitric oxide synthases: which, where, how, and why?* J Clin Invest. 100(9):2146-52.
- Michel T, Vanhoutte PM 2010. *Cellular signaling and NO production*. Pflugers Arch. 459(6):807-16.
- Mihov D, Vogel J, Gassmann M, Bogdanova A 2009. *Erythropoietin activates nitric oxide synthase in murine erythrocytes*. Am J Physiol Cell Physiol. 297(2):C378-88.
- Miyazaki H, Matsuoka H, Cooke JP, Usui M, Ueda S, Okuda S, Imaizumi T 1999. *Endogenous nitric oxide synthase inhibitor: a novel marker of atherosclerosis*. Circulation. 99(9):1141-6.
- Moncada S 1999. *Nitric oxide: discovery and impact on clinical medicine*. J R Soc Med. 92(4):164-9.
- Moncada S, Higgs A 1993. *The L-arginine-nitric oxide pathway*. N Engl J Med. 1993 329(27):2002-12.
- Moncada S, Palmer RM, Higgs EA 1991. *Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology*. Pharmacol Rev. 43(2):109-42.
- Morris SM Jr, Bhamidipati D, Kepka-Lenhart D 1997. *Human type II arginase: sequence analysis and tissue-specific expression*. Gene. 193(2):157-61.
- Murad F 1994. *Regulation of cytosolic guanylyl cyclase by nitric oxide: the NO-cyclic GMP signal transduction system*. Adv Pharmacol. 26:19-33.
- Musicki B, Kramer MF, Becker RE, Burnett AL 2005. *Age-related changes in phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase in the rat penis*. J Sex Med. 2(3):347-55; discussion 355-7.
- Nagababu E, Ramasamy S, Abernethy DR, Rifkind JM 2003. *Active nitric oxide produced in the red cell under hypoxic conditions by deoxyhemoglobin-mediated nitrite reduction*. J Biol Chem. 278(47):46349-56.
- Nagano T, Yoshimura T 2002. *Bioimaging of nitric oxide*. Chem. Rev 102:1235-1270.

Nakatsubo N, Kojima H, Kikuchi K, Nagoshi H, Hirata Y, Maeda D, Imai Y, Irimura T, Nagano T 1998. *Direct evidence of nitric oxide production from bovine aortic endothelial cells using new fluorescence indicators: diaminofluoresceins*. FEBS Letters 427:263-266.

Nathan C 1997. *Inducible nitric oxide synthase: what difference does it make?* J Clin Invest. 100(10):2417-23.

Nathan C, Xie QW 1994. *Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls*. Cell. 78(6):915-8.

Ogonowski AA, Kaesemeyer WH, Jin L, Ganapathy V, Leibach FH, Caldwell RW 2000. *Effects of NO donors and synthase agonists on endothelial cell uptake of L-Arg and superoxide production*. Am J Physiol Cell Physiol. 278(1):C136-43.

Ozüyaman B, Grau M, Kelm M, Merx MW, Kleinbongard P 2008. *RBC NOS: regulatory mechanisms and therapeutic aspects*. Trends Mol Med. 14(7):314-22.

Palmer RM, Moncada S 1989. *A novel citrulline-forming enzyme implicated in the formation of nitric oxide by vascular endothelial cells*. Biochem Biophys Res Commun. 158(1):348-52.

Palmer RM, Rees DD, Ashton DS, Moncada S 1988. *L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation*. Biochem Biophys Res Commun. 153(3):1251-6.

Parratt JR 1998. *Nitric oxide in sepsis and endotoxaemia*. J Antimicrob Chemother. 41 Suppl A:31-9.

Pawloski JR, Hess DT, Stamler JS 2001. *Export by red blood cells of nitric oxide bioactivity*. Nature. 409(6820):622-6.

Peyton KJ, Ensenat D, Azam MA, Keswani AN, Kannan S, Liu XM, Wang H, Tulis DA, Durante W 2009. *Arginase promotes neointima formation in rat injured carotid arteries*. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 29(4):488-94.

Piagnerelli M, Zouaoui Boudjeltia K, Brohee D, Vereerstraeten A, Piro P, Vincent JL, Vanhaeverbeek M 2007. *Assessment of erythrocyte shape by flow cytometry techniques*. J Clin Pathol. 60(5):549-54.

Pollock JS, Förstermann U, Mitchell JA, Warner TD, Schmidt HH, Nakane M, Murad F 1991. *Purification and characterization of particulate endothelium-derived relaxing factor synthase from cultured and native bovine aortic endothelial cells*. Proc Natl Acad Sci U S A. 88(23):10480-4.

Prins HA, Houdijk AP, Nijveldt RJ, Teerlink T, Huygens P, Thijs LG, van Leeuwen PA 2001. *Arginase release from red blood cells: possible link in transfusion induced immune suppression?* Shock. 16(2):113-5.

Radomski MW, Palmer RM, Moncada S 1991. *Modulation of platelet aggregation by an L-arginine-nitric oxide pathway*. Trends Pharmacol Sci. 12(3):87-8

Radomski MW, Palmer RM, Moncada S 1990. *Glucocorticoids inhibit the expression of an inducible, but not the constitutive, nitric oxide synthase in vascular endothelial cells*. Proc Natl Acad Sci U S A. 87(24):10043-7.

Räthel TR, Leikert J, Vollmar AM, Dirsch VM 2003. *Application of 4,5-diaminofluorescein to reliably measure nitric oxide released from endothelial cells in vitro*. Biol Proced Online. 5:136-142.

- Rassaf T, Kleinbongard P, Preik M, Dejam A, Gharini P, Lauer T, Erckenbrecht J, Duschin A, Schulz R, Heusch G, Feelisch M, Kelm M 2002. *Plasma nitrosothiols contribute to the systemic vasodilator effects of intravenously applied NO: experimental and clinical Study on the fate of NO in human blood.* Circ Res. 91(6):470-7.
- Razani B, Woodman SE, Lisanti MP 2002. *Caveolae: from cell biology to animal physiology.* Pharmacol Rev. 54(3):431-67.
- Rees DD, Palmer RM, Schulz R, Hodson HF, Moncada S 1990. *Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo.* Br J Pharmacol. 101(3):746-52.
- Rodriguez J, Specian V, Maloney R, Jourde'heuil D, Feelisch M 2005. *Performance of diamino fluorophores for the localization of sources and targets of nitric oxide.* Free Radic. Biol Med 38:356-368.
- Rogers SC, Khalatbari A, Gapper PW, Frenneaux MP, James PE 2005. *Detection of human red blood cell-bound nitric oxide.* J Biol Chem. 280(29):26720-8.
- Sahach VF, Baziliuk OV, Kotsiuruba AV, Buzhanevich OM 2000. *Disorders of endothelium-dependent vascular reactions and of the arginase and NO-synthase pathways of L-arginine metabolism in arterial hypertension.* Fiziol Zh. 46(3):3-13.
- Sasser JM, Sullivan JC, Elmarakby AA, Kemp BE, Pollock DM, Pollock JS 2004. *Reduced NOS3 phosphorylation mediates reduced NO/cGMP signaling in mesenteric arteries of deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats.* Hypertension. 43(5):1080-5.
- Schleicher M, Brundin F, Gross S, Müller-Esterl W, Oess S 2005. *Cell cycle-regulated inactivation of endothelial NO synthase through NOSIP-dependent targeting to the cytoskeleton.* Mol Cell Biol. 25(18):8251-8.
- Schulz R, Kelm M, Heusch G 2004. *Nitric oxide in myocardial ischemia/reperfusion injury.* Cardiovasc Res. 61(3):402-13.
- Scott-Burden T, Vanhoutte PM 1994. *Regulation of smooth muscle cell growth by endothelium-derived factors.* Tex Heart Inst J. 21(1):91-7
- Sheng JZ, Wang D, Braun AP 2005. *DAF-FM (4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein) diacetate detects impairment of agonist-stimulated nitric oxide synthesis by elevated glucose in human vascular endothelial cells: reversal by vitamin C and L-sepiapterin.* J Pharmacol Exp Ther. 315(2):931-40.
- Shima Y, Maeda T, Aizawa S, Tsuboi I, Kobayashi D, Kato R, Tamai I 2006. *L-arginine import via cationic amino acid transporter CAT1 is essential for both differentiation and proliferation of erythrocytes.* Blood. 107(4):1352-6.
- Stamler JS, Loh E, Roddy MA, Currie KE, Creager MA 1994. *Nitric oxide regulates basal systemic and pulmonary vascular resistance in healthy humans.* Circulation. 89(5):2035-40
- Stuehr DJ, Kwon NS, Nathan CF, Griffith OW, Feldman PL, Wiseman J 1991. *N omega-hydroxy-L-arginine is an intermediate in the biosynthesis of nitric oxide from L-arginine.* J Biol Chem. 266(10):6259-63.
- Teupser D, Burkhardt R, Wilfert W, Haffner I, Nebendahl K, Thiery J 2006. *Identification of macrophage arginase I as a new candidate gene of atherosclerosis resistance.* Arterioscler Thromb Vasc Biol. 26(2):365-71.

- Torrents D, Estévez R, Pineda M, Fernández E, Lloberas J, Shi YB, Zorzano A, Palacín M 1998. *Identification and characterization of a membrane protein (γ +L amino acid transporter-1) that associates with 4F2hc to encode the amino acid transport activity γ +L. A candidate gene for lysinuric protein intolerance.* J Biol Chem. 273(49):32437-45.
- Ulker P, Yaras N, Yalcin O, Celik-Ozenci C, Johnson PC, Meiselman HJ, Baskurt OK 2011. *Shear stress activation of nitric oxide synthase and increased nitric oxide levels in human red blood cells.* Nitric Oxide. 24(4):184-91.
- Uyuklu M, Meiselman HJ, Baskurt OK 2009. *Role of hemoglobin oxygenation in the modulation of red blood cell mechanical properties by nitric oxide.* Nitric Oxide. 21(1):20-6.
- Vallance P, Collier J, Moncada S 1989. *Effects of endothelium-derived nitric oxide on peripheral arteriolar tone in man.* Lancet. 2(8670):997-1000.
- Vaughn MW, Huang KT, Kuo L, Liao JC 2000. *Erythrocytes possess an intrinsic barrier to nitric oxide consumption.* J Biol Chem. 275(4):2342-8.
- Vaughn MW, Kuo L, Liao JC 1998. *Effective diffusion distance of nitric oxide in the microcirculation.* Am J Physiol. 274(5 Pt 2):H1705-14.
- Vockley JG, Jenkinson CP, Shukla H, Kern RM, Grody WW, Cederbaum SD 1996. *Cloning and characterization of the human type II arginase gene.* Genomics. 38(2):118-23.
- Wardman P 2007. *Fluorescent and luminescent probes for measurement of oxidative and nitrosative species in cells and tissues: progress, pitfalls, and prospects.* Free Radic Biol Med. 43(7):995-1022.
- Webb AJ, Milsom AB, Rathod KS, Chu WL, Qureshi S, Lovell MJ, Lecomte FM, Perrett D, Raimondo C, Khoshbin E, Ahmed Z, Uppal R, Benjamin N, Hobbs AJ, Ahluwalia A 2008. *Mechanisms underlying erythrocyte and endothelial nitrite reduction to nitric oxide in hypoxia: role for xanthine oxidoreductase and endothelial nitric oxide synthase.* Circ Res. 103(9):957-64.
- Wennmalm A, Benthin G, Petersson AS 1992. *Dependence of the metabolism of nitric oxide (NO) in healthy human whole blood on the oxygenation of its red cell haemoglobin.* Br J Pharmacol. 106(3):507-8.
- White MF, Christensen HN 1982. *The two-way flux of cationic amino acids across the plasma membrane of mammalian cells is largely explained by a single transport system.* J Biol Chem. 257(17):10069-80.
- Williams DL 2004. *Nitrosation reactions and the chemistry of nitric oxide.* Elsevier, eBook ISBN 9780080473604.
- Wu G, Morris SM Jr 1998. *Arginine metabolism: nitric oxide and beyond.* Biochem J. 336 (Pt 1):1-17.
- Yang BC, Nichols WW, Mehta JL 1996. *Cardioprotective Effects of Red Blood Cells on Ischemia and Reperfusion Injury in Isolated Rat Heart: Release of Nitric Oxide as a Potential Mechanism.* J Cardiovasc Pharmacol Ther. 1(4):297-306.
- Zhang C, Hein TW, Wang W, Miller MW, Fossum TW, McDonald MM, Humphrey JD, Kuo L 2004. *Upregulation of vascular arginase in hypertension decreases nitric oxide-mediated dilation of coronary arterioles.* Hypertension. 44(6):935-43.

Zimmermann K, Opitz N, Dedio J, Renne C, Muller-Esterl W, Oess S 2002. *NOSTRIN: a protein modulating nitric oxide release and subcellular distribution of endothelial nitric oxide synthase*. Proc Natl Acad Sci U S A. 99(26):17167-72.

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

25.05.2014, Tristan Römer