

Aus der
Medizinischen Klinik und Poliklinik
der Heinrich–Heine–Universität Düsseldorf
Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. B. E. Strauer

**Expression einer NO–Synthase im Erythrozyten:
Untersuchungen zur mRNA- und Protein-
Expression**

Dissertation

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

vorgelegt von

Jens-Peter Volkmer

2006

Aus der
Medizinischen Klinik und Poliklinik
der Heinrich–Heine–Universität Düsseldorf
Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. B. E. Strauer

**Expression einer NO–Synthase im Erythrozyten:
Untersuchungen zur mRNA- und Protein-
Expression**

Dissertation

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

vorgelegt von

Jens-Peter Volkmer

2006

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

Gez.:

Univ.-Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Bernd Nürnberg
Dekan

Referent: Univ.-Prof. Dr. Malte Kelm
Korreferent: Prof. Dr. Peter Rösen

„Die Praxis sollte das
Ergebnis des
Nachdenkens sein,
nicht umgekehrt“
Hermann Hesse

Liste der Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
BSA	Rinder-Serum (Bovines Serum) Albumin
CD45	Glykoprotein der Leukozytenmembran
CD62P	P-Selektin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglykoltetraacetat
eNOS	endotheliale NO-Synthase
eNOS(-/-)	Defiziente Allele des eNOS-Genes
FACS	Durchflusszytometrie (Fluorescence Aktivated Cell Sorting)
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
g	Gravitationsfeldstärke
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonat
HUVECs	Humane Nabelschnur Endothelzellen (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) synonym gebraucht zu Endothelzellen
iNOS	induzierbare NO-Synthase
MetHb	Methämoglobin
mRNA	Messenger-RNA
NaCl	Natriumchlorid
nNOS	nNOS neuronale NO-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid (im folgenden Text ohne Kennzeichnung des freien Elektrons)
NO ₂ ⁻	Nitrit
NO ₃ ⁻	Nitrat
NOS	NO-Synthase (EC 1.14.13.39)
OxyHb	Oxyhämoglobin
PBS	Saliner Phosphatpuffer

PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PE	Phycoerythrin
rpm	Umdrehung pro Minute (rotation per minute)
RSNO	S-Nitrosothiole
RT-PCR	PCR zur Amplifikation von RNA; vor der PCR erfolgt initial eine Umschreibung der RNA in DNA durch die Reverse Transkriptase
SDS	Natriumdodecylsulfat
s.o.	siehe oben
Tab.	Tabelle
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
VEGF-2	Rezeptor der Endothelzellen für das Wachstums-Hormon (Vascular-Endothelial-Cell-Groth-Factor-2-Receptor)

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	8
1.1	NO-Funktion und Synthese	8
1.2	NO-Speicherung und Transport im Blut	11
1.3	NO-Metabolismus im Erythrozyten	12
2	Material und Methoden.....	17
2.1	Probengewinnung und Probenaufarbeitung	17
2.1.1	Entnahme und Aufarbeitung von Blutproben.....	17
2.1.2	Zellkultur humaner Endothelzellen	19
2.2	Immunhistochemische Untersuchungen einer NO-Synthase im Erythrozyten	20
2.3	Untersuchungen zur eNOS-mRNA-Expression im Erythrozyten ...	22
2.3.1	RT-PCR der eNOS-mRNA im Erythrozyten	22
2.3.2	Restriktionsanalyse der RT-PCR Produkte	24
2.4	Untersuchung zur eNOS-Protein-Expression im Erythrozyten im Western-Blot.....	24
3	Ergebnisse	29
3.1	Reinheit der Blutzellseparationen.....	29
3.2	eNOS-Protein-Expression in der konfokalen Mikroskopie.....	31
3.2.1	eNOS-Protein-Expression im Erythrozyten	31
3.2.2	eNOS-Protein-Expression im Vollblut: Erythrozyten-spezifische eNOS-Expression.....	34
3.3	eNOS-mRNA-Expression im Erythrozyten	36
3.3.1	eNOS-mRNA im Erythrozyten	36
3.3.2	eNOS-mRNA im Vollblut: Erythrozyten-spezifische eNOS- mRNA-Expression.....	38
3.4	eNOS-Protein-Expression im Erythrozyten im Western-Blot.....	42
4	Diskussion	45
4.1.1	Proteinbiochemischer Nachweis einer eNOS im Erythrozyten	46
4.1.2	Molekularbiologischer Nachweis einer eNOS im Erythrozyten.....	47
4.2	Diskussion der Literatur.....	48
4.3	Physiologische Relevanz	53

4.4	Ausblick.....	56
5	Zusammenfassung.....	57
6	Literaturverzeichnis	58
7	Danksagung	67
8	Lebenslauf.....	68

1 Einleitung

Stickstoffmonoxid (NO) ist als wichtiges Regulationsmolekül der vaskulären Homöostase bekannt. NO wird in den Endothelzellen durch die NO-Synthase (NOS) gebildet und im Blut intra- und extrazellulär abgebaut oder proteingebunden gespeichert. Erythrozyten galten lange als Hauptabbauort des NO, mittlerweile sind Erythrozyten jedoch auch als Speicher und Transporter von NO identifiziert. Neuere Untersuchungen zeigen darüber hinaus *in vitro* auch eine NO-Bildung im Erythrozyten aus Nitrit. Noch ungeklärt ist dagegen, ob Erythrozyten durch eine zelleigene NOS am vaskulären NO-Metabolismus beteiligt sein könnten.

1.1 NO-Funktion und Synthese

NO ist ein zentraler Mediator in vielen unterschiedlichen biologischen Prozessen. Als intrazellulärer und extrazellulärer Botenstoff ist NO nicht nur an physiologischen Regulationsmechanismen im Herzkreislaufsystem, sondern auch im Zentralnervensystem, im peripheren Nervensystem und im Immunsystem beteiligt^{55;60;85}.

Durch kontinuierliche Freisetzung aus der Gefäßwand spielt NO eine zentrale Rolle in der Aufrechterhaltung der vaskulären Homöostase^{7;30;72}. NO moduliert im vaskulären System verschiedene Funktionen in der luminalen und abluminalen Gefäßwand. (a) NO bewirkt in den Leitungsarterien vom muskulären Typ und in den präkapillären Widerstandsgefäßen eine konstante Herabsetzung des Tonus und senkt so den Blutdruck. Darüber hinaus wirkt NO am Gefäßsystem anti-arteriosklerotisch, indem es die Mitogenese und die Proliferation der vaskulären glatten Muskelzellen (b) und die Zelladhäsion (c) von Monozyten, Neutrophilen-Granulozyten und Thrombozyten an die Gefäßwand hemmt und die Lipidoxidation reduziert. Es unterdrückt also infiltrative entzündliche Prozesse der Gefäßwand^{56;65;78;79}. An den Blutzellen sind verschiedene NO-vermittelte Funktionen beschrieben. Es hemmt die hämostatische Kaskade

und verhindert so eine intravasale Gerinnung, indem es (d) die Thrombozyten stabilisiert und plasmatische Gerinnungsfaktoren modifiziert. Neben diesen protektiven Mechanismen scheint (e) die Modulation der Erythrozytenverformbarkeit für die vaskuläre Homöostase von Bedeutung zu sein.

Im zentralen Nervensystem dient NO als Neurotransmitter und ist u.a. an der Vermittlung von Schmerzreizen beteiligt. Im peripheren Nervensystem wirkt NO an der Signalübertragung in Teilen des Gastrointestinaltraktes, der Atemwege und des Urogenitaltraktes mit. Außerdem ist NO an der Modulation der spezifischen und unspezifischen Abwehr beteiligt. Es wird in neutrophilen Granulozyten und Makrophagen gebildet⁸⁸, ist an der von Makrophagen vermittelten Immunantwort beteiligt und spielt eine Rolle in der Pathophysiologie der Sepsis^{36;56;62;85}.

Alle diese Vorgänge werden durch die Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase und den resultierenden Anstieg des zyklischen Guanosinmonophosphat in der Zielzelle vermittelt.

NO wird von der NO-Synthase gebildet, welche die Aminosäure L-Arginin unter Zuhilfenahme von Kofaktoren (FAD, FMN, NADPH, Tetrahydrobiopterin (BH₄)) und molekularem Sauerstoff zu NO und L-Citrullin umsetzt.

Bei den Isoformen der NOS unterscheidet man die Calcium/Calmodulin-abhängigen, konstitutiven NOS Formen (nNOS, eNOS), von der Calcium/Calmodulin-unabhängigen, induzierbaren Form (iNOS)⁵⁹. Die Aktivierung der konstitutiven NOS wird nach Rezeptorstimulation durch extrazelluläre Signale wie z.B. einen Anstieg der Schubspannung im Gefäß, oder durch Freisetzung rezeptorabhängiger Stimulatoren der NOS (z.B. Acetylcholin, Histamin, Serotonin, Bradikinin und Substanz P) über einen intrazellulären Anstieg der Calciumkonzentration und nachfolgender Calmodulin-NOS Assoziation vermittelt¹⁰. Calmodulin kontrolliert den Elektronenfluss zwischen der Reduktase- und der Oxygenase-Domäne der NOS, so dass der Anstieg

der Calciumkonzentration die NO-Bildung induziert¹. Bei der induzierbaren Form (iNOS) ist durch eine höhere Affinität das Calmodulin auch bei normaler intrazellulärer Calciumkonzentration an das Enzym gebunden. Sie wird durch Cytokine (TNF α) und Endotoxine (LPS) stimuliert.

Die ursprüngliche Unterteilung der NOS-Isoformen in die konstitutiven und die induzierbare Form wird jedoch immer mehr verlassen, da bestimmte Zelltypen auch eine konstante Expression der iNOS zeigen⁶⁰. Heute werden die NOS Formen basierend auf ihrer molekularen Struktur in drei Isoformen, die neuronale NOS (nNOS oder Typ I), die endotheliale NOS (eNOS oder Typ III) und die induzierbare NOS (iNOS oder Typ II) eingeteilt⁶⁰. Diese Isoformen wurden nach den Geweben, in denen sie zuerst nachgewiesen wurden, benannt. Die nNOS konnte jedoch zusätzlich in Skelettmuskelzellen⁵¹ und im respiratorischem Epithel⁶ nachgewiesen werden. Die eNOS konnte noch in Herzmuskelzellen, im Skelettmuskel, in renalen und pulmonalen Epithelzellen⁸⁰, sowie in Neuronen⁸⁴ identifiziert werden. Überdies sind die meisten Zellen in der Lage, durch inflammatorische Zytokine stimuliert, iNOS zu synthetisieren. Darüber hinaus wurde in jüngerer Zeit eine vierte Isoform in den Mitochondrien nachgewiesen^{26;27}. Diese so genannte mitochondriale NOS (mtNOS) scheint für die mitochondriale Homöostase durch Beteiligung an der pH-Regulation, der Aufrechterhaltung des transmembranösen Potentials und der Atmungskette von Bedeutung zu sein²⁶.

Alle NOS Isoformen haben eine vergleichbare basale Aktivität von ca. $1 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$. Die Angaben unterschiedlicher Enzymaktivitäten der Isoformen sind bedingt durch unterschiedliche Expressionsraten und nicht durch unterschiedliche katalytische Aktivitäten⁵⁹.

1.2 NO-Speicherung und Transport im Blut

Bis vor kurzem wurde angenommen, dass endothelial gebildetes NO ausschließlich parakrin, d.h. lokal in der Gefäßwand wirkt, weil das instabile NO-Molekül mit einer ultrakurzen Halbwertszeit von 0,05 bis 1 Sekunde schnell mit molekularem Sauerstoff zu Nitrit (NO_2^-) und mit dem Oxyhämoglobin (OxyHB) im Erythrozyten zu Nitrat (NO_3^-) reagiert (siehe Kapitel 1.3)^{20;69}. Es gibt jedoch Hinweise, dass die NO-Wirkung durch Speicherformen^{5;28;37} auch systemisch, Bildungsort-fern, also endokrin, vermittelt werden kann^{25;68}. Im Plasma und in den Erythrozyten (siehe Kapitel 1.3) wurden NO-Intermediate gefunden, an die NO reversibel binden kann und die NO vor dem direkten Abbau schützen können. Im Plasma wurden Nitrosothiole, sogenannte RSNOs nachgewiesen⁶⁸. RSNOs entstehen durch die Reaktion von NO mit den im Plasma zirkulierenden Thiolgruppen von Albumin, Glutathion und Cystein. Die genaue Reaktion, die zur RSNO-Bildung führt, ist noch nicht geklärt. Man geht jedoch davon aus, dass die Thiolgruppen in Anwesenheit von Elektronenakzeptoren über das Nitrosylkation zu RSNO¹⁵ und nicht wie lange angenommen direkt mit NO reagieren^{34;86}. Begünstigt wird die RSNO-Bildung durch die hohen Thiolkonzentrationen im Plasma (Albumin: 500 μM ^{34;86}; Glutathion: 4 μM ⁴⁴; Cystein: 200 μM ⁴⁴). Im Gegensatz hierzu bewegen sich die RSNO-Konzentrationen im nano- bis mikromolaren Bereich, wobei nitrosiertes Albumin den Hauptanteil des plasmatischen RSNO-Pools darstellt (0,025 bis 7 μM)^{42;67}. S-Nitrosocystein und S-Nitrosoglutathion machen mit 0,002 bis 0,3 μM nur einen geringen Anteil der Gesamt-RSNO-Konzentration aus¹¹. Die Stabilität der NO-Bindung hängt von den umgebenden Reaktionsbedingungen ab. *In vitro* wurden Halbwertszeiten der RSNOs zwischen 40 min für SNO-Albumin, 8 min bei S-Nitrosoglutathion und 1 min für S-Nitrosocystein bestimmt. Der Mechanismus der NO-Freisetzung aus den plasmatischen Speichern, den RSNOs, ist *in vivo* noch nicht nachgewiesen. Durch Untersuchungsergebnisse *in vitro* ist aber anzunehmen, dass Cu^{2+} -Ionen, die

in großen Mengen im menschlichen Organismus vorkommen (1 μmol gelöstes und 15 μmol Gesamtkupfer), einen Zerfall von RSNOs unter Bildung von Disulfiden und NO bewirken². Außerdem könnten durch Transnitrosierungsvorgänge aus stabileren Thiolen wie dem S-Nitroso-glutathion relativ instabilere Thiole wie das S-Nitrosocystein entstehen⁷⁷. Als weiterer Faktor könnte Ascorbinsäure, die in hohen Konzentrationen als Nucleophil agiert, durch Angriff an der Stickstoffgruppe NO freisetzen³³.

Neben den RSNOs scheint es einen weiteren physiologischen NO-Pool zu geben. Das im Vollblut befindliche Nitrit wurde primär als intermediäres Zwischenprodukt im Abbau von NO betrachtet (s.o.) und deswegen als biochemischer Marker der endothelialen NOS-Aktivität etabliert⁴³. Neuste Untersuchungen bestätigen jedoch eine ältere Hypothese, nach der auch im humanen Organismus, ähnlich der bakteriellen Nitrit-Reduktase, aus Nitrit NO gebildet werden kann^{20;93}. Drei Mechanismen sind beschrieben, die Xanthinoxidoreduktase⁴⁷, die nichtenzymatische Disproportionierung oder Säure-Reduktion^{54;76} und die nichtenzymatische NO-Bildung durch Deoxyhämoglobin^{17;20} (siehe Kapitel 1.3).

1.3 NO-Metabolismus im Erythrozyten

Erythrozyten nehmen nicht alleine durch ihren großen Anteil am Blutvolumen von bis zu 50% eine zentrale Rolle im vaskulären NO-Metabolismus ein. Erythrozyten, primär als Sauerstofftransporter bekannt, sind zellorganellfreie Blutzellen, die lediglich durch eine Plasmamembran vom Blutplasma abgegrenzt sind und vor allem das Protein Hämoglobin enthalten, welches 66% der zellulären Proteine ausmacht. Hämoglobin besteht aus vier Untereinheiten, von denen jede Untereinheit eine Hämgruppe trägt. Beim Sauerstofftransport wird der Sauerstoff reversibel an das Häm-Eisen angelagert (Oxygenierung). Je zwei der vier Untereinheiten besitzen identische Polypeptidketten, die α - und β - Ketten.

Die Erythrozyten wurden im Zusammenhang mit NO bis vor kurzem ausschließlich als NO-abbauende Blutbestandteile betrachtet. Im Mittelpunkt dieser Hypothese stand die Reaktion von NO mit Oxyhämoglobin (HbO_2) zu Methämoglobin (MetHb) und Nitrat (Abb. 1.1 A), die zu einem Funktionsverlust des NO führt^{20;69}. Diese Sichtweise wird jedoch durch Untersuchungen erweitert, die zeigen, dass Erythrozyten NO speichern, transportieren und wieder abgeben können. So kann ein Teil des NO mit dem Eisen der Hämgruppe des Deoxyhämoglobins (Hb) Nitrosylhämoglobin (NOHb) bilden (Abb. 1.1 B)³¹. Außerdem kann NO durch Bindung an das Cystein der β -Hämoglobinkette (HB- β Cys-SH) durch eine Transnitrosierung S-Nitrosohämoglobin (HB- β Cys-SNO) bilden (Abb. 1.1 C)³¹. Hämoglobin kommt in zwei verschiedenen Strukturen einer R-Form (mit hoher O_2 -Affinität) und einer T-Form (mit niedriger O_2 -Affinität) vor. Nach der von Jia et al. aufgestellten Hypothese³⁷ bedingt die R-Form eine Anlagerung von NO an das Cystein, während die T-Form eine Freisetzung des gebundenen NO begünstigt^{28;37;87}. Nach dieser Hypothese führt die Oxygenierung in der Lunge zu einer Bindung von NO, während die Sauerstoffabgabe in der Peripherie eine Freisetzung des NO und damit eine lokale Vasodilatation bewirkt⁸². Dagegen begünstigt Oxyhämoglobin durch seine R-Form das Abfangen von NO und führt damit zur Vasokonstriktion³⁷. Außerdem ist eine Beeinflussung der Thrombozytenaggregabilität durch das aus S-Nitrosohämoglobin freigesetzte NO beschrieben⁵². Wie das im Erythrozyten an Hämoglobin gebundene NO in das zellumgebende Plasma gelangt, konnte lange nicht geklärt werden. Inzwischen wird angenommen, dass ein in der Erythrozytenmembran lokalisierter AE1-Transporter NO über verschiedene Bindungen ins extrazelluläre Medium überführt⁶³. Erythrozyten sind also nicht nur Abbauort von NO, sondern auch ein regulatorischer Bestandteil der vaskulären NO-Bioverfügbarkeit (Abb.1.1).

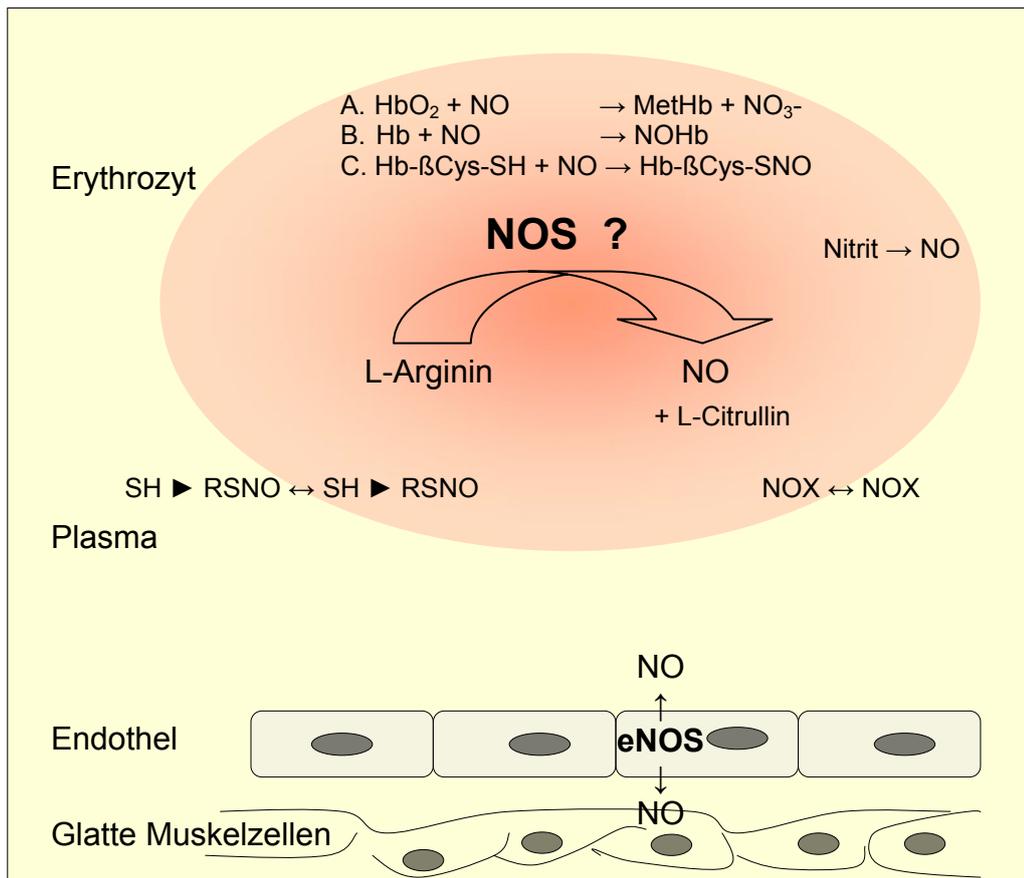


Abb.1.1 NO-Stoffwechsel im Erythrozyten

Neuere Erkenntnisse legen nahe, dass Erythrozyten nicht nur passiv am NO-Metabolismus beteiligt sind, sondern aus intraerythrozytär gespeichertem Nitrit auch NO bilden könnten (siehe Kapitel 1.2). *In vitro* sind drei mögliche Reaktionswege der NO-Bildung beschrieben: 1. durch die Xanthin-Oxidoreduktase⁴⁷, 2. die nichtenzymatische Disproportionierung oder Säure-Reduktion^{54;76} und 3. die nichtenzymatische NO-Bildung durch Deoxyhämoglobin^{17;20}. Allen gemeinsam ist, dass die NO-Bildung aus Nitrit primär unter hypoxischen Bedingungen erfolgt^{48;54}. Als zentrale Reaktion wird die 1981 von Doyle und Hoekstra erstmals beschriebene nichtenzymatische NO-Bildung durch Deoxyhämoglobin gesehen und damit der Erythrozyt als zentrales Kompartiment^{17;20}. Dafür spricht nicht nur die hohe Hämoglobinkonzentration im Vollblut, sondern auch die gemessene hohe intraerythrozytäre Nitritkonzentration (288±47 nmol/l)

im Vergleich zum Plasma (176 ± 17 nmol/l)¹⁸. Die physiologische Relevanz ist derzeit nur eingeschränkt zu beurteilen, weil die beschriebenen Reaktionen bisher nur *in vitro* für supraphysiologische Nitritkonzentrationen im μ molaren Bereich gezeigt werden konnten¹⁷. Sie könnte aber in der beschriebenen Abhängigkeit der Reaktionen von hypoxischem Milieu und dem *in vivo* gemessenen arterio-venösen Nitrit-Gradienten liegen. So wäre die nicht NOS-katalysierte NO-Bildung als physiologische Reaktion in physiologisch (Mikrozirkulation) oder pathophysiologisch hypoxischen Geweben (Infarkt) denkbar⁴⁹.

Das vom Erythrozyten freigesetzte NO stammt nicht ausschließlich aus den NO- bzw. Nitrit-Speichern, sondern kann möglicherweise vom Erythrozyt durch eine zelleigene NO-Synthese direkt aus L-Arginin gebildet werden. Eine aktive NO-Synthese durch eine NOS im Erythrozyten wurde 1995 erstmals durch Deliconstatinos et al.¹⁹ beschrieben. In der Literatur bestehen seitdem wenige, aber widersprüchliche Hinweise auf eine erythrozytäre NOS. In einem Teil der Literatur wird eine NOS-Aktivität in Zytosol oder Membran durch Nachweis einer NO-Bildung beschrieben^{19;22}. In anderen Publikationen konnte diese jedoch nicht bestätigt werden⁴¹. Demzufolge wird der Protein-Nachweis der erythrozytären NOS entweder als katalytisches Enzym oder inaktives Protein interpretiert^{41;53}. Auf Proteinebene konnte keine einheitliche Expression einer oder mehrerer der drei bekannten NOS Isoformen gezeigt werden^{9;14;38}. Eine mRNA-Expression wurde noch nicht untersucht. Außerdem finden sich einige Publikationen, die einen NOS-basierenden NO-Metabolismus im Erythrozyten unter spezifischen pathophysiologischen Fragestellungen untersucht haben und eine erythrozytäre NOS-Expression als bereits etabliert voraussetzten^{12;13;23;32;39}. Zusammenfassend kann man feststellen, dass abgesehen von der Widersprüchlichkeit der Ergebnisse in der Literatur aktuell keine Publikation zu finden ist, die eine mögliche NOS-Expression im Erythrozyten auch unter Berücksichtigung der Isoform eindeutig nachweisen oder widerlegen kann. Im Hinblick auf die

beschriebene Bedeutung des erythrozytären NO-Metabolismus für die vaskuläre Homöostase (siehe Kapitel 1.2 u. 4.3) ist die Frage einer erythrozytären NOS von zentralem Interesse.

Daraus ergaben sich folgende Ziele:

1. Nachweis oder Ausschluss einer NO-Synthase im Erythrozyten
2. Charakterisierung der Isoform
3. Nachweis der Expression auf RNA- und Proteinebene

2 Material und Methoden

Alle Chemikalien wurden, wenn nicht gesondert aufgeführt, von Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München, Deutschland) bezogen.

2.1 Probengewinnung und Probenaufarbeitung

2.1.1 Entnahme und Aufarbeitung von Blutproben

Blutentnahme: Als Antikoagulanzen wurden für alle Blutentnahmen (Mensch, Maus) Heparin eingesetzt ($10 \text{ IE}\cdot\text{ml}^{-1}$, Liquemin; Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland). Zur Separation von Thrombozyten (s.u.) wurde Lepirudin als Antikoagulanzen verwendet ($62,5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; Schering, Berlin, Deutschland).

Humanes Vollblut von gesunden Freiwilligen wurde über eine venöse Punktionskanüle (Butterfly, $\varnothing 0,6 \text{ mm}$; Abbott Ireland, Sligo, Irland) aus der gestauten Vena cubiti unter Vermeidung einer Hämolyse entnommen.

Venöses Blut aus ausgewachsenen transgenen Mäusen (eNOS(-/-), basierend auf C57BL6, von Prof. A. Gödecke (Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie, Univ. Düsseldorf) zur Verfügung gestellt²⁹) und entsprechenden Wildtypen (eNOS (+/+), C57BL6) wurde nach Anästhesie mittels intraperitonealer Gabe von Ketavet ($80 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ Körpergewicht; Pharmacia & Upjohn, Erlangen, Deutschland) und Rompun ($10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ Körpergewicht; Bayer Vital, Leverkusen, Deutschland) aus der unteren Hohlvene in der eröffneten Bauchhöhle entnommen.

Zur Separation der Blutzellen wurden verschiedene Verfahren ausgetestet. Ziel war es, ein Verfahren zu etablieren, das auch in parallel zu dieser Arbeit durchgeführten biochemischen Untersuchungen angewendet werden konnte. Dazu musste die Blutzellseparierung schnell, ohne Verwendung von Chemikalien, ohne Zellstress, durch ausgeprägte mechanische Belastung, und kostengünstig für große Volumina erfolgen. Ausgetestet wurden verschiedene

Verfahren differentieller Zentrifugation und Magnet-Ak-Bead-Separation, während Dichtegradienten, basierend auf unterschiedlichen Chemikalien, nicht angewendet werden konnten.

Vollblut wurde direkt verwendet. Für die Separation der *Erythrozyten* wurde Vollblut in einer an der Spitze verschlossenen Spritze ohne Kolben 10 min bei 800 x g und 4 °C mit ungebremst auslaufendem Rotor zentrifugiert und der plasmatische Überstand abgenommen. Nach Lösen des Verschlusses wurden ca. 2/3 der sedimentierten Erythrozyten durch vorsichtiges Abtropfen gewonnen, ohne dabei die leukozytäre Grenzschicht zu beschädigen.

Zur Isolation der *Leukozytenfraktion* wurde das Vollblut in hypotonem Lysepuffer (1:5, V/V, EL-Lysepuffer; Qiagen, Hilden, Deutschland) resuspendiert und unter mehrfachem Schütteln für ca. 25 min bis zur vollständigen Erythrozytenlyse auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation (10 min, 200 x g und 4 °C) wurde der Überstand aus Erythrozytenlysat und Thrombozyten verworfen.

Die *Thrombozyten* wurden durch differentielle Zentrifugation aus Vollblut gewonnen (20 min, 350 x g, 20 °C, mit ungebremst auslaufendem Rotor). Es wurden die oberen 2/3 des Überstandes (plättchenreiches Plasma (PRP)) verwendet.

Aufarbeitung der Blutproben: Für die weiteren Untersuchungen, die Protein- (siehe Kapitel 2.2 und 2.4) und die RNA-Analytik (siehe Kapitel 2.3), wurden die Zellen in jeweiliger Zellzahl in PBS (PBS-Puffer pH 7,5; Serag Wiessner GmbH, Naila, Deutschland) aufgenommen.

Die Reinheit der einzelnen Zellpräparationen wurde mittels Blut-Zell-Zähler (MÖLAB, Deutschland), durch FACS-Analyse (Leukozyten mit CD45-Ak und Thrombozyten mit CD42-Ak spezifisch markiert) (Beckmann Coulter Epics XL, Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland) und Lichtmikroskopie (Pappenheim-Färbung) kontrolliert.

2.1.2 Zellkultur humaner Endothelzellen

Zellkultur humaner Nabelschnur-Endothelzellen (Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs)):

Die Gewinnung und Kultivierung wurde unter sterilen Bedingungen in der Zell-Bank durchgeführt.

Zellpreparation: Endothelzellen wurden enzymatisch aus der Vene von Nabelschnüren gesunder Spender abgelöst. Die Vene wurde mit PBS gespült, mit Kollagenase A (0,1%; Roche, Grenzach-Whylen, Deutschland) gefüllt und nach Verschließen der Enden für 15 min bei 37 °C in PBS inkubiert. Durch Schwenken der Nabelschnur wurden die Zellen, zusätzlich zur enzymatischen Ablösung, mechanisch gelöst und mit der Kollagenase in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen (Greiner, Solingen, Deutschland) ausgestrichen. Nach Zentrifugation (5 min bei 300 x g und 4 °C) wurden die sedimentierten Zellen in 12 ml Endothelzell-Medium (C-22010; PromoCell, Heidelberg, Deutschland) resuspendiert, in zwei T-25 Zellkulturflaschen (Falcon™, BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) überführt und bei 37 °C und 5% CO₂ im Brutschrank (Jouan 150) inkubiert. Das Medium wurde jeden zweiten Tag gewechselt.

Ablösen / Passagieren: War ein konfluenten Zellrasen gewachsen, wurden die Zellen nach Abnahme des Mediums mit PBS gewaschen und durch 2 min Inkubation mit 2 ml Trypsin/EDTA (0,04/0,03%) (PromoCell, Heidelberg, Deutschland) vom Boden der Flasche gelöst. Die Zellen wurden als Positiv-Kontrolle zu Untersuchungen der Protein-Expression (siehe Kapitel 2.2 und 2.4) oder der eNOS-mRNA-Expression verwendet (siehe Kapitel 2.3), bzw. im Teilungsverhältnis 1:3 erneut ausplattiert und bis zur max. dritten Zellpassage wieder in Kultur genommen.

Die Reinheit der Zellen wurde durch Auflichtmikroskopie und in der FACS-Analyse mit VEGF-2-Ak Markierung der Endothelzellen bestimmt. In der Auflichtmikroskopie zeigte sich das typische homogene

Zellbild der Endothelzellen. In der FACS Analyse konnte eine Zellreinheit von 99,9% nachgewiesen werden.

2.2 Immunhistochemische Untersuchungen einer NO-Synthase im Erythrozyten

Die Annahme einer NO-Synthase innerhalb der Erythrozyten, basierend auf Hinweisen in der Literatur und biochemischen Ergebnissen der eigenen Arbeitsgruppe sollte im Rahmen dieser Arbeit durch immunhistochemische Untersuchungen überprüft werden.

Reine Erythrozyten (human) und Vollblut (human und murin) (siehe Kapitel 2.1.1) wurden jeweils 1:20 bzw. 1:10 mit PBS verdünnt und jeweils 10 µl auf Deckgläsern (24x32 mm) ausgestrichen. Die Zellen wurden mit Methanol/Formaldehyd (37%) (9:1, V/V) fixiert (30 sec bei 4 °C), dreimal mit PBS gewaschen und mit PBS/Triton-X-100 (0,1%) 5 min bei Raumtemperatur permeabilisiert. Nach drei Waschschritten mit PBS wurden die unspezifischen Bindungsstellen mit 5% Rinder-Serum Albumin (BSA) (bei Ausstrichen von humanem Blut) oder 5% Ziegen-Serum Albumin (bei Ausstrichen von murinem Blut) abgesättigt. Die Proben wurden über Nacht mit dem Primärantikörper inkubiert: für humane Erythrozyten und Vollblut: anti-eNOS (monoklonal IgG1 Maus; BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg, Deutschland), anti iNOS und anti nNOS (polyklonal IgG Kaninchen; Biomol GmbH, Deutschland) (1:100 in 5% BSA); für murines Blut: anti-eNOS (polyklonal Kaninchen; BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg, Deutschland) (1:100 in 5% Ziegenserum Albumin). Nach dreimaligem Waschen mit Tris-Bor-Säure-EDTA-Puffer (500 mM NaCl, 20 mM Tris, pH 7,5, Tween 20:1) wurden die Ausstriche 2 h mit dem sekundären Antikörper (Ak) inkubiert (humane Proben: mit Fluorescein-Isothiocyanat (FITC)-gekoppelte Mäuse-Ak (1:300 in Tris-Bor-Säure-EDTA-Puffer, 5% BSA); murine Proben: mit FITC-gekoppelte Kaninchen-Ak (1:300 in Tris-Bor-Säure-EDTA-Puffer, 5% Ziegen-Serum Albumin); Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland).

In einem weiteren Versuch wurden Ausstriche zur zellpopulationsspezifischen Kontrolle zusätzlich mit einem zellspezifischen, Phycoerythrin (PE) -Farbstoff-gekoppelten Primärantikörper inkubiert. In einem Ansatz wurden humane Vollblut-Ausstriche mit Erythrozyten-spezifischen Glycophorin-A-Ak (anti-Glycophorin-A-PE, 1:100 in Tris-Bor-Säure-EDTA-Puffer 5% BSA; BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg, Deutschland) und eNOS-Ak (s.o.) koinkubiert. In einem zweiten Ansatz wurden humane Erythrozyten-Ausstriche mit Thrombozyten-spezifischen CD62P-Ak (anti CD62P-PE, 1:100 in Tris-Bor-Säure-EDTA-Puffer 5% BSA; BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg, Deutschland) und eNOS-Ak (s.o.) koinkubiert.

Als Negativ-Kontrolle diente jeweils ein Ausstrich ohne Zugabe des Primärantikörpers. Die Zellen wurden mit einem konfokalen Laser-Mikroskop (LSM 5 Pascal, Zeiss, Jena, Deutschland) bei der Wellenlänge 505 nm (FITC) und 560 nm (PE) bei 100-facher Vergrößerung eingestellt und die Fluoreszenzsignale computergestützt dargestellt und dokumentiert.

2.3 Untersuchungen zur eNOS-mRNA-Expression im Erythrozyten

2.3.1 RT-PCR der eNOS-mRNA im Erythrozyten

Da biochemischen Untersuchungen auf eine konstitutive NOS-Isoform innerhalb der Erythrozyten hinwiesen und sich in den immun-histochemischen Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit ausschließlich eine eNOS-Expression in den Erythrozyten nachweisen ließ, wurde bei den mRNA-Untersuchungen lediglich die endotheliale Isoform (eNOS) berücksichtigt.

Die Gesamt-RNA wurde aus Vollblut, Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten (siehe Kapitel 2.1.1) mit dem PAXgene Blood RNA Validation Kit (PreAnalytiX, Qiagen, Hilden, Deutschland) isoliert. In einem ersten Ansatz wurden Erythrozyten in einer dem Vollblut entsprechenden Zellzahl eingesetzt ($4,5 \times 10^6$ Zellen $\cdot\mu\text{l}^{-1}$). Um ein späteres mögliches positives Signal primär als erythrozyten werten zu können und Leukozyten und Thrombozyten als Ursprung des Signals ausschließen zu können, wurde die RNA aus Leukozyten und Thrombozyten jeweils aus einer Zellzahl, zehnfach größer einer potentiellen Kontamination der erythrozytären Probe mit Leukozyten (1000 Zellen $\cdot\mu\text{l}^{-1}$) und Thrombozyten (100.000 Zellen $\cdot\mu\text{l}^{-1}$) (siehe Kapitel 3.1) isoliert.

In einem zweiten Ansatz wurden die RNA aus allen Zellpopulationen in einer der Vollblut entsprechenden Zellzahl (Erythrozyten, $4,5 \times 10^6$ Zellen $\cdot\mu\text{l}^{-1}$; Leukozyten 4000 Zellen $\cdot\mu\text{l}^{-1}$, Thrombozyten 300.000 Zellen $\cdot\mu\text{l}^{-1}$) extrahiert.

Die Gesamt-RNA aus Endothelzellen (HUVEC) der 2. bis 3. Kultivierungspassage ($2,5 \times 10^6$ Zellen/Ansatz) wurde als Positiv-Kontrolle für den eNOS-Nachweis mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) gewonnen.

Die RT-PCR wurde mit dem One Step RT-PCR Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) durchgeführt. Die Reaktionsansätze wurden nach

dem Protokoll des Herstellers aufgearbeitet und die RNA im Thermocycler (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) transkribiert und amplifiziert (30 min 50 °C RT-Reaktion, 15 min 95 °C Aktivierung der Taq-Polymerase; 35 Zyklen: 1 min 95 °C Denaturierung, 1 min 59 °C Annealing, 1 min 72 °C Extension; 10 min 72 °C abschließende Extension).

Für den eNOS-mRNA-Nachweis wurden mRNA-spezifische, Intron-spannende Primer mit der Sequenz-Analyse-Software (DNASar Inc., Madison, USA) (vom Biologisch-Medizinischen Forschungszentrum, Univ.-Düsseldorf zur Verfügung gestellt) erstellt (5'TGGCGAAGCGAGTGAAGGCGACAA 3'; 5'CAAAGGCGCAGAAGTGGGGGTATG 3'; Produkt: 450 bp) (mRNA Sequenz: GeneBank: XM 004684). Die Primer wurden an RNA aus Endothelzellen (HUVEC) unter Produktausschluss in der PCR gegenüber der RT-PCR auf Produkt- und mRNA-Spezifität getestet.

Zur zellpopulationsspezifischen Differenzierung der eNOS-mRNA-Expression im Vollblut wurden zellspezifische Primer eingesetzt: β -Globin Primer für Erythrozyten (Produkt: 187 bp) (Smith et al., 2000, Blood, 95:863)⁸³, CD45 Primer (Produkt: 388 bp) (Maxim Biotech, Inc., USA) für Leukozyten und Endoglin Primer (Produkt: 805 bp) (Li et al., 2001, Hypertension, 38: 1062)⁴⁶ für Endothelzellen. Zur Differenzierung thrombozytärer RNA wurden β -3-Integrin Primer (5'CACTGTGGCCTCTCAGATTAAAG 3'; 3'CATGAGTTGGCTGGGAATAAG 5'; Produkt: 127 bp) eingesetzt, die wie die eNOS Primer mit der Software DNA-Star (s.o.) erstellt wurden (mRNA Sequenz: G26607, M25108). Alle nicht kommerziell erhältlichen Primer wurden von der Firma Invitrogen (USA) synthetisiert. Die RT-PCR wurde wie oben beschrieben unter Berücksichtigung der jeweiligen Primer-spezifischen Annealing Temperatur durchgeführt.

Die RT-PCR-Produkte wurden jeweils in einem Agarose-Gel aufgetrennt (2% Agarose, 0,004% Ethidiumbromid; Biorad, München, Deutschland). Die Produktbanden wurden mit einer Auswerteeinheit

dokumentiert (Kodak Digital Science Electrophoresis Documentation and Analysis System 120; Eastman Kodak Company, New York, USA).

2.3.2 Restriktionsanalyse der RT-PCR Produkte

Zum detaillierteren Nachweis der eNOS-Spezifität der RT-PCR Produkte wurden die Produkte mit Restriktionsenzymen an spezifischen mRNA-Sequenzbereichen der eNOS geschnitten. Mit der Sequenz-Analyse-Software (s.o.) wurden in dem Amplifikationsbereich der Primer zwei eNOS-mRNA-sequenzspezifische Schnittstellen und entsprechende Restriktionsenzyme (Psi I (Schnittstelle bei Basenpaar 1846) und BstE II (Schnittstelle bei Basenpaar 1727); New England Biolabs, Frankfurt am Main, Deutschland) ausgewählt. Produkte der Erythrozyten aus oben genannter RT-PCR wurden nach Herstellerangaben geschnitten. Als Positiv-Kontrolle wurden Produkte der RT-PCR aus Endothelzellen verwendet (siehe Kapitel 2.3.1).

Die Produkte des Restriktionsverdau wurden in einer Agarose-Gel Elektrophorese aufgetrennt und ausgewertet (siehe Kapitel 2.3.1).

2.4 Untersuchung zur eNOS-Protein-Expression im Erythrozyten im Western-Blot

Der im Rahmen dieser Arbeit erbrachte Nachweis einer eNOS-Expression im Erythrozyten in der Immunhistochemie und der RT-PCR sollte durch eine Western-Blot Analyse ergänzt werden.

Es wurden verschiedene Methoden zum Aufschluss der Zellen und der Isolation der Proteine aus den Erythrozyten ausgetestet, um eine Methode für die Western-Blot Analyse zur Untersuchung einer eNOS-Expression im Erythrozyten zu etablieren (Tab.2.1).

Tab.2.1 Etablierungsversuche der Probenaufarbeitung zur Isolation der eNOS aus Erythrozyten

1	2	3	4	5	6	7
Kaliumphosphat ⁷³	High Salt	NP-40	Bhattacharya ⁹	Ruff ⁷⁴	Pollock ⁶⁴	HEPES
10 mM K-phosphat, pH 6,8	500 mM NaCl	150 mM NaCl	10 mM Tris-HCl, pH 7,4	50 mM Tris-HCl, pH 7,5	50 mM Tris-HCL, pH 7,5	25 mM HEPES
1 mM EDTA	1% NP-40	1% NP-40	300 µM Sucrose	1 mM EDTA	20 mM Chaps	100 mM NaCl
2 mM β-Mercapto ethanol	50 mM Tris- HCl, pH 8	50 mM Tris- HCl, pH 8	0,05% Triton X- 100	1 mM EGTA	25 mM NaCl	1 mM CaC ₂ l
0,5% Triton X-100				0,5% Triton X- 100	100 µM EGTA	1 mM MgC ₂ l
					4 µM Tetrahydro biopterin	1% Triton X-100
					1 mM L-Arginin	

Nach zahlreichen Versuchen zur Optimierung des Zellaufschlusses wurde folgendes Protokoll etabliert.

Probenaufarbeitung: Die NO-Synthase wurde in einem mehrschrittigen Ansatz differentieller Lyse-, Homogenisations-, und Zentrifugationsschritte aus der Membran der Erythrozyten isoliert.

Zum Aufschluss der Zellen wurden 4 ml Erythrozyten-PBS-Suspension (1:2, V/V) in 5 ml Eis-gekühlte Essigsäure (3%) (Proteinaseinhibitoren: 40 µg/ml Leupeptin, 40 µg/ml Benzamidin, 40 µg/ml Phenylmethylsulfonyl-Fluorid) gegeben. Die Zellen wurden mit dem Ultra Turrax T25 (Ika, Staufen, Deutschland) 30 sec bei 25000 rpm auf Eis homogenisiert. Nach Zugabe von NaCl Lösung (50 mM Endkonzentration) und 10 min Inkubation auf Eis, wurden die Zellmembranen 30 min bei 50000 x g und 4 °C abzentrifugiert. Der zytoplasmatische Überstand wurde verworfen, das Membranpellet in 1ml Puffer (25 mM Tris-HCL pH 7,5, 5 mM EDTA, 5 mM EGTA, 50 mM NaCl, Proteinaseinhibitoren: 40 µg/ml Leupeptin, 40 µg/ml Benzamidin, 40 µg/ml Phenylmethylsulfonyl-Fluorid) aufgenommen und 30 sec mit einem Ultraschall-Homogenisator (Labsonic U; B. Braun, Melsungen Deutschland) auf Eis homogenisiert. Die Membranfraktion wurde nach Verdünnung des Homogenisats mit Tris-Puffer (25 mM Tris-HCL pH 7,5, 5 mM EDTA, 5 mM EGTA) 30 min bei 50000 x g und 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Membranpellet in 100 µl Lyse-Puffer (Cell Lysis Buffer; Cell Signaling Technology, ProQinase GmbH, Freiburg, Germany) resuspendiert und mit dem Ultraschall-Homogenisator homogenisiert (s.o.). Die Proteinsuspension wurde mit einer DEAE-Sephacel Matrix (Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland) entsalzt. Nach Zugabe von 400 µl DEAE-Sephacel Lösung (50 %, W/V; 25 mM Tris-HCL pH 7,5, 5 mM EDTA, 5 mM EGTA) wurde die Probe 15 min auf Eis inkubiert. Die DEAE-Sephacel Matrix wurde 10 min bei 2500 x g abzentrifugiert und der salzfreie Probenüberstand in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80 °C gelagert.

Die Endothelzellen wurden jeweils aus einer T25 Zellkulturflasche gewonnen (siehe Kapitel 2.1.2) und nach Ermitteln der Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer (Superior, Deutschland) mittels Comassie-Blau Färbung, jeweils 1 Millionen Zellen entsprechend den Erythrozyten aufgearbeitet (s.o.).

Proteinbestimmung: Die Proteinkonzentrationen wurden gemäß Herstellerangaben mit dem DC-Proteinbestimmungsassay (Biorad, München, Deutschland), basierend auf der Biuretmethode über die Absorption bei 750 nm bestimmt.

Elektrophorese: Die aufgereinigten Proteine wurden unter denaturierenden Bedingungen mittels SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfat Polyacrylamid Gel Elektrophorese) aufgetrennt (7,5% Gel: Acrylamid, Sodiumdodecylsulfat, Amoniumpersulfat, Temed; Sammelgelpuffer 0,5 M TRIS pH 6,8; Trenngelpuffer: 1,5 M TRIS pH 8,8; Laufpuffer: 25 mM TRIS; 192 mM Glycine, 0,1% SDS pH 8,3; Probenpuffer (Lämmli): 62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 25% glycerol, 0.01% Bromophenol-Blau; Kammer: Protean-II-XL-Cell; Biorad, München, Deutschland). Nach Einwandern in das Trenngel bei initialen 16 mA wurden die Proteine über einen Zeitraum von ca. 5 h unter H₂O-Kühlung bei konstanten 24 mA getrennt.

Blotten: Die Proteine wurden nach Auftrennung im Semi-Dry-Blot Verfahren auf eine Nitrozellulosemembran überführt (55 min, 15 V) (Towbin-Blottingpuffer: 25 mM TRIS, 192 mM Glycine, 20% Etanol, pH 8,3, Nitrozellulose, Trans-Blot Cell; Biorad, München, Deutschland). Der Protein-Transfer wurde durch Färbung mit Ponceau-S überprüft (0,5% Ponceau S Natriumsalz W/V, 1% Essigsäure V/V; Merck, Darmstadt, Deutschland).

Detektion: Nach Blocken der freien Proteinbindungsstellen durch Inkubation mit Milchpulver (4% Milchpulver W/V, PBS, 0,3% Triton-X-100 V/V, 0,05% Teen 20 V/V) für 2 h bei 4 °C, erfolgte eine Inkubation mit dem Primärantikörper in Milchpulver (s.o) (1:10000 anti-eNOS monoklonal IgG1 Maus; BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg,

Deutschland) über Nacht. Die Nitrozellulose wurde dreimal 15 min bei 4°C mit PBS, 0,05% Tween 20 gewaschen, für 4 h bei 4 °C mit einem Peroxidase gekoppelten Sekundärantikörper in Milchpulver (s.o.) inkubiert (1:10000 anti-Maus Horse radish Peroxidase; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland). Nach erneutem Waschen (s.o.) wurde die Nitrozellulosemembran mit einer Luminol-Wasserstoffperoxid Lösung (ECL System, Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland) inkubiert und die Peroxidase abhängige Lumineszenz auf einem Röntgenfilm (Kodak X-OMAT AR) detektiert.

3 Ergebnisse

3.1 Reinheit der Blutzellseparationen

Bei der Separation der Blutzellen wurden folgende Populations-Reinheiten erreicht:

Tab.3.1 Reinheit der Erythrozyten nach Separation aus Vollblut

Methoden	Erythrozyten (Zellen· μl^{-1})	Leukozyten (Zellen· μl^{-1})	Thrombozyten (Zellen· μl^{-1})
Zytometer	$6,6 \pm 0,0020 \times 10^6$	n.d.#	n.d.#
FACS	$6,3 \pm 0,0015 \times 10^6$	n.d.	n.d.
Blutausstrich	$6,4 \pm 0,0001 \times 10^6$	0±0	2±1

Tab.3.2 Reinheit der Leukozyten nach Separation aus Vollblut

Methoden	Leukozyten (Zellen· μl^{-1})	Erythrozyten (Zellen· μl^{-1})	Thrombozyten (Zellen· μl^{-1})
Zytometer	$23 \pm 1 \times 10^3$	$0,02 \pm 0,043 \times 10^6$	$216,5 \pm 70 \times 10^3$
FACS	$21 \pm 2 \times 10^3$	$0,07 \pm 0,015 \times 10^6$	$272,5 \pm 31 \times 10^3$
Blutausstrich	$24 \pm 1 \times 10^3$	$0,05 \pm 0,080 \times 10^6$	$257,5 \pm 78 \times 10^3$

Tab.3.3 Reinheit der Thrombozyten nach Separation aus Vollblut

Methoden	Thrombozyten (Zellen· μl^{-1})	Erythrozyten (Zellen· μl^{-1})	Leukozyten (Zellen· μl^{-1})
Zytometer	$263 \pm 89 \times 10^3$	n.d.#	$0,5 \pm 0,08 \times 10^3$
FACS	$244 \pm 61 \times 10^3$	$0,01 \pm 0,01 \times 10^6$	$0,6 \pm 0,40 \times 10^3$
Blutausstrich	$288 \pm 36 \times 10^3$	$0,01 \pm 0,01 \times 10^6$	$0,9 \pm 0,39 \times 10^3$

n.d. Nicht detektierbar

Detektionsgrenze: $\geq 100 \text{ Zellen} \cdot \mu\text{l}^{-1}$

Bei der Separation der Erythrozyten (siehe Kapitel 2.1.1) aus Vollblut konnte eine Reinheit der Erythrozyten von $\geq 99\%$ erreicht werden (siehe Tabelle 3.1).

Bei der Isolation der Leukozyten und Thrombozyten (siehe Kapitel 2.1.1) konnten keine absolut reinen Zellpopulationen separiert werden (siehe Tabelle 3.2 u. 3.3). Die Leukozytenpräparationen enthielten noch etwa 25% der ursprünglichen Thrombozyten und die Thrombozytenseparationen 25% bis 50 % der im Vollblut befindlichen Leukozyten. Dies war für die weiteren Untersuchungen bedeutungslos, weil im Rahmen dieser Arbeit ausschließlich eine Abgrenzung der Erythrozyten gegenüber den übrigen Blutzellpopulationen erfolgen sollte. Der Anteil der Erythrozyten in Leukozyten- und Thrombozyten-Isolationen konnte um 98,6% bis 99,8% der Ausgangsmenge im Vollblut reduziert werden. Somit waren die Signale der RNA- und Protein-Expressions-Untersuchungen (siehe Kapitel 3.2, 3.3 und 3.4) als erythrozytären gegen leukozytären bzw. thrombozytären Ursprungs abzugrenzen.

3.2 eNOS-Protein-Expression in der konfokalen Mikroskopie

In der konfokalen Mikroskopie wurde untersucht, ob eine NO-Synthase im Erythrozyten nachzuweisen ist. Neben humanen Erythrozyten und Vollblut wurde murines Vollblut von Wildtyp im Vergleich zu eNOS-Knock-Out Mäusen untersucht.

3.2.1 eNOS-Protein-Expression im Erythrozyten

Im Erythrozyten wurde eine eNOS-Protein-Expression nachgewiesen.

Reine Erythrozyten (siehe Kapitel 2.1.1) wurden jeweils mit einem eNOS-Ak, iNOS-Ak und nNOS-Ak (Primärantikörper) inkubiert. Nach Inkubation mit einem gegen den Primärantikörper gerichteten FITC-Farbstoff (grün) markierten Sekundärantikörper wurden die Erythrozyten im Lasermikroskop eingestellt und die Antikörper durch Laseranregung des konjugierten Farbstoffes dargestellt (siehe Kapitel 2.2.1). Eine Probe ohne Inkubation mit dem Primärantikörper wurde zum Ausschluss unspezifischer Bindungen des Sekundärantikörpers mitgeführt (Negativ-Kontrolle).

Die im Mikroskop eingestellten Zellen zeigten eine Erythrozyten-spezifische Form und Größe, sowie eine deutliche Anreicherung der Farbstoff-markierten eNOS-Ak, welche primär im Bereich der Zellmembran lokalisiert war. Die Negativ-Kontrolle zeigte keine Anreicherung des Farbstoffes in den Erythrozyten (Abb.3.1).

In den mit iNOS und nNOS-Ak inkubierten Erythrozyten ließ sich kein positives Signal nachweisen (Abb.3.2).

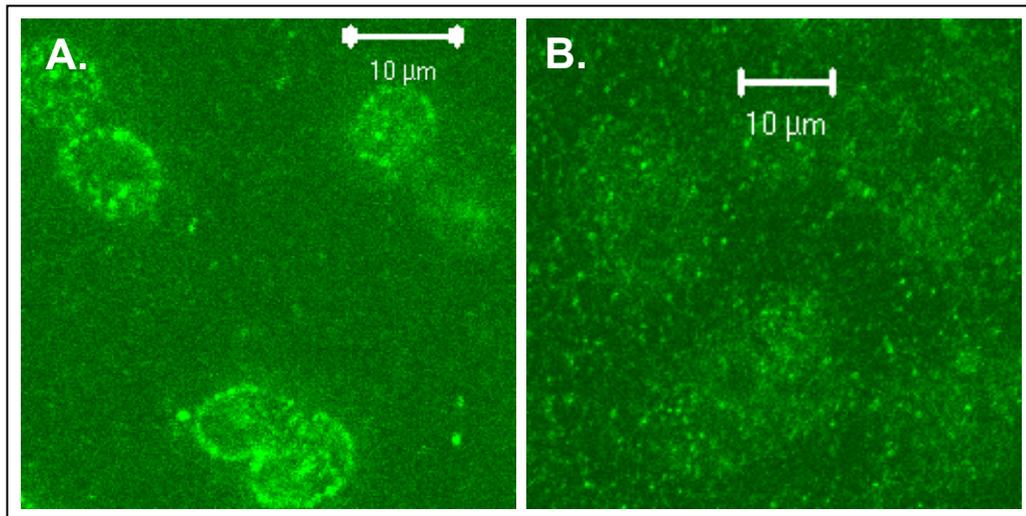


Abb.3.1. Nachweis einer eNOS-Expression in Ausstrichen humaner Erythrozyten (A) (eNOS-Ak + FITC (grün) markierter Sekundär-Ak). Kein Signal in der Negativ-Kontrolle (nur Sekundär-Ak).

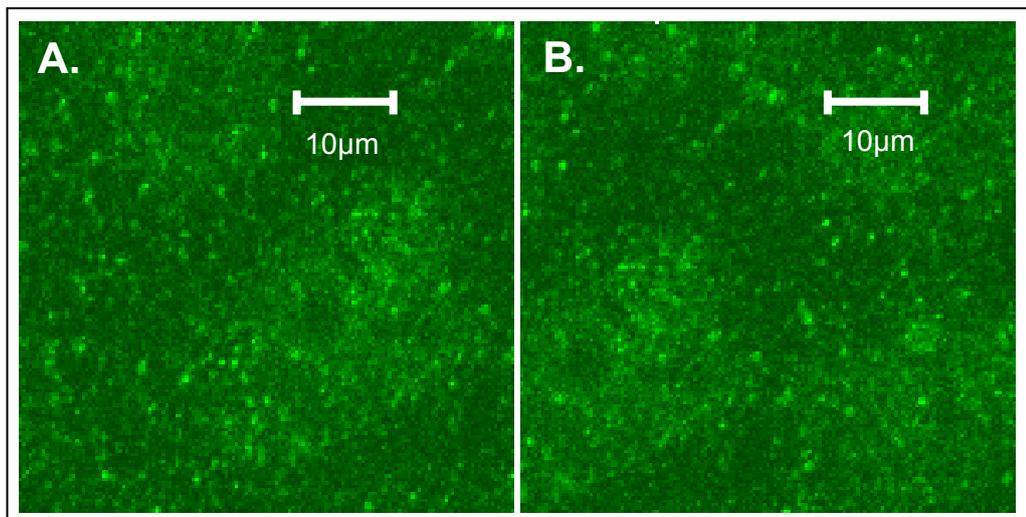


Abb.3.2 Ausschluß einer iNOS- (A) und nNOS- (B) Expression in Ausstrichen humaner Erythrozyten (iNOS-Ak / nNOS-Ak + FITC (grün) markierter Sekundär-Ak).

Eine eNOS-Proteinexpression der Erythrozyten konnte im murinen Vollblut von Wildtyp im Gegensatz zu eNOS-Knock-Out Mäusen gezeigt werden.

Um eine unspezifische Bindung der eNOS-Ak an einem anderen Protein der Erythrozyten eindeutig ausschließen zu können wurde die Protein-Expression der eNOS an dem spezifischen Modell der eNOS-Knock-Out Maus im Vergleich zum Wildtyp detaillierter untersucht. Bei eNOS-Knock-Out Mäusen ist die eNOS-Protein-Expression auf genomischer Ebene ausgeschaltet und den eNOS-spezifischen Antikörpern steht kein Epitop zur Verfügung, an das sie binden können. Aus Knock-Out Mäusen und Wildtypen isoliertes Vollblut (siehe Kapitel 2.1.1) wurde mit eNOS-Ak inkubiert und die Knockout- gegenüber den Wildtypausstrichen in der konfokalen Mikroskopie ausgewertet (siehe Kapitel 2.2.).

Das Blut der Wildtyp Tiere zeigte eine deutliche Anreicherung von FITC-Farbstoff als Zeichen einer eNOS-Expression in den durch Zellverteilung, Form und Größe als Erythrozyten charakterisierten Zellen. Im Blut der Knock-Out Tiere ließ sich kein eNOS-Signal durch FITC konjugierte Ak (grün) nachweisen (Abb.3.3).

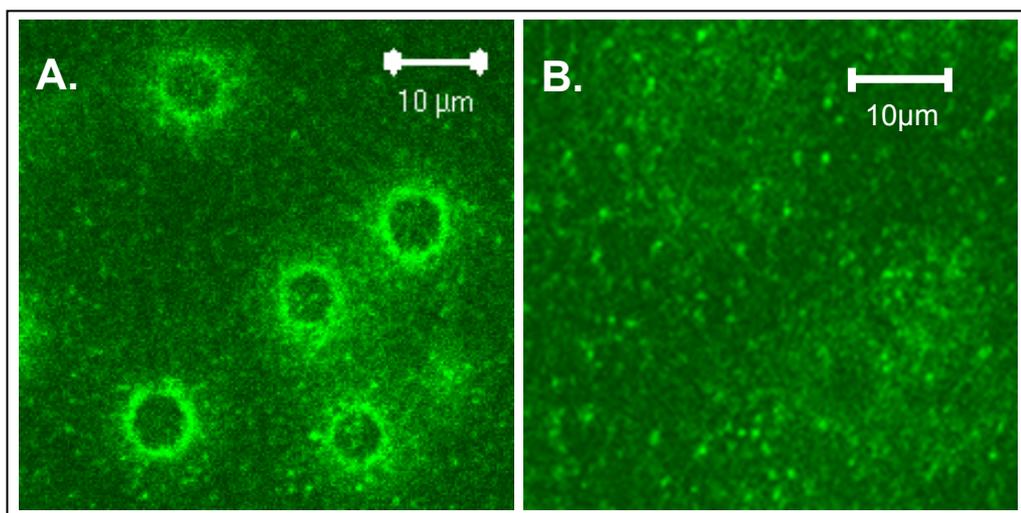


Abb.3.3 Nachweis einer eNOS-Protein-Expression im murinen Vollblut von Wildtypen (A) im Gegensatz zu eNOS-Knock-Out-Mäusen (eNOS-Ak; FITC-Farbstoff, grün) (B).

3.2.2 eNOS-Protein-Expression im Vollblut: Erythrozyten-spezifische eNOS-Expression

Die eNOS-Protein-Expression konnte im Vollblut eindeutig den Erythrozyten zugeordnet werden.

In Vollblutausstrichen wurde untersucht, ob außer den Erythrozyten auch Leukozyten und Thrombozyten das eNOS-Protein exprimieren. Humane Vollblutproben wurden nach der Inkubation mit dem eNOS-Ak (FITC-Farbstoff, grün) zusätzlich mit einem Glycophorin-A-Ak (PE-Farbstoff, rot) inkubiert (siehe Kapitel 2.2). Glycophorin-A ist ein Protein, das von den Erythrozyten in sehr hoher Zahl exprimiert wird. Da Leukozyten und Thrombozyten kein Glycophorin-A exprimieren, lassen sich die Erythrozyten durch Glycophorin-A Markierung im Vollblut spezifisch gegen die übrigen Blutzellpopulationen abgrenzen.

Die Auswertung der konfokalen Mikroskopie zeigte eine deutliche Anreicherung des FITC-Farbstoffes (grün) in den Glycophorin-A (rot) positiven Zellen. Glycophorin-A negative Zellen zeigten keine Anreicherung des FITC-Farbstoffes. Außerdem war die Anreicherung des FITC-Farbstoffes ausschließlich im Bereich der Zellmembran der Erythrozyten nachzuweisen (Abb.3.4).

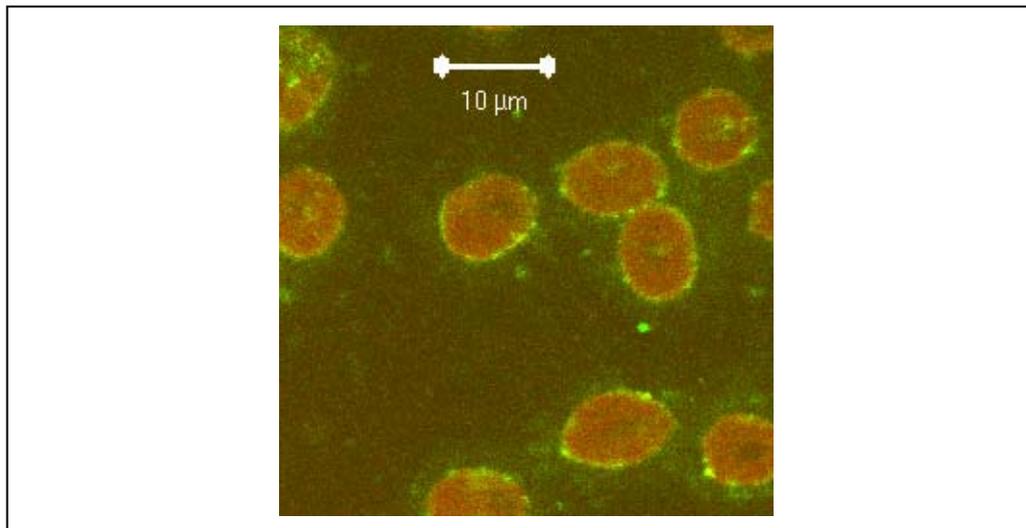


Abb.3.4 In Vollblut-Ausstrichen konnte die eNOS-Expression (eNOS-Ak markiert; FITC-Farbstoff, grün) eindeutig den Erythrozyten (Glycophorin-A-Ak markiert; PE-Farbstoff, rot) zugeordnet werden.

Die eNOS-Protein-Signale der Erythrozyten waren nicht auf eine Anlagerung eNOS-exprimierender Thrombozyten zurückzuführen.

In einem weiteren Ansatz wurde untersucht, ob die eNOS-AK Signale der Erythrozyten auf eine Anlagerung von eNOS-exprimierenden Thrombozyten an die Erythrozyten zurückzuführen sein könnten. Humane Erythrozyten wurden nach der Inkubation mit dem eNOS-Ak (FITC-Farbstoff, grün) zusätzlich mit einem CD62P-Ak (PE-Farbstoff, rot) inkubiert (siehe Kapitel 2.2). CD62P wird nur auf Thrombozyten exprimiert. Die eNOS-Ak markierten Erythrozyten zeigten keine Anreicherung des CD62P-Ak konjugierten FITC-Farbstoffs (Abb.3.5).

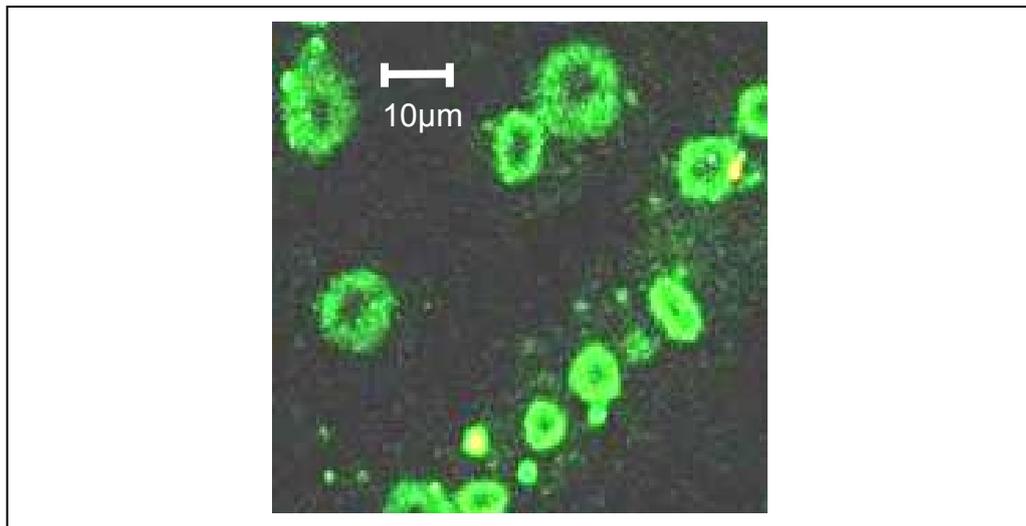


Abb.3.5 In Erythrozyten-Ausstrichen konnte eine Anlagerung potentiell eNOS-exprimierender Thrombozyten (CD62P-Ak markiert; PE-Farbstoff, rot) an die Erythrozyten (eNOS-Ak markiert; FITC-Farbstoff, grün) ausgeschlossen werden.

3.3 eNOS-mRNA-Expression im Erythrozyten

3.3.1 eNOS-mRNA im Erythrozyten

eNOS-mRNA wurde in Erythrozyten nachgewiesen.

Mit der RT-PCR wurden reine Erythrozyten (siehe Kapitel 2.1.1 u. 3.1) auf eine eNOS-mRNA-Expression untersucht. Nach der RT-PCR (siehe Kapitel 2.3.1) konnte in der elektrophoretischen Auftrennung ein eNOS-Primer-spezifisches Produkt erwarteter Fragmentgröße (450 bp) gezeigt werden. Dieses stimmte mit dem Produkt aus der als Positiv-Kontrolle eingesetzten HUVEC-RNA überein (Abb.3.6). Die mitgeführte Negativ-Kontrolle (H₂O statt RNA) blieb ohne Produkt.

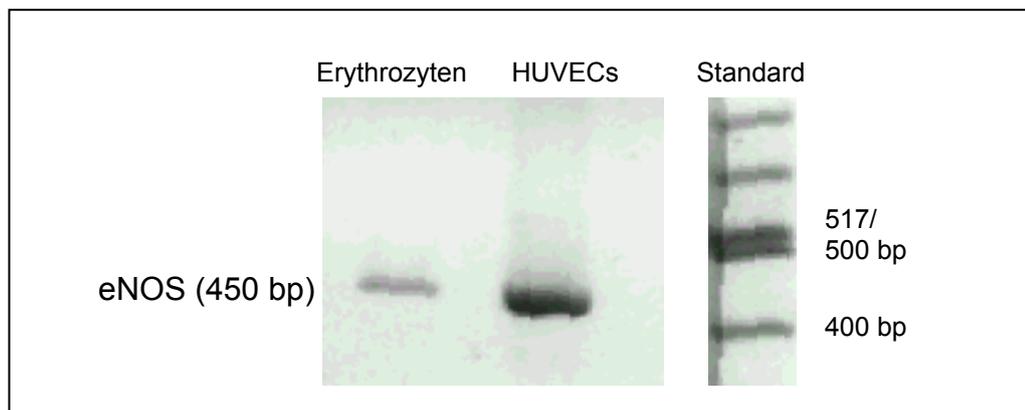


Abb.3.6 Nachweis der eNOS-mRNA-Expression durch RT-PCR im Erythrozyten im Vergleich zu Endothelzellen (Positiv-Kontrolle).

Eine mRNA-unspezifische Produktsynthese durch genomische DNA wurde ausgeschlossen.

Um eine mRNA-unspezifische Produkt-Synthese durch genomische DNA der eNOS auszuschließen, wurde parallel eine PCR durchgeführt. Die PCR wurde wie die RT-PCR durchgeführt und nur der initiale Schritt der Reversen Transkription im Thermocycler unterlassen. In der PCR konnte das eNOS-Produkt der RT-PCR (Abb.3.6) ausgeschlossen werden (Abb.3.7).

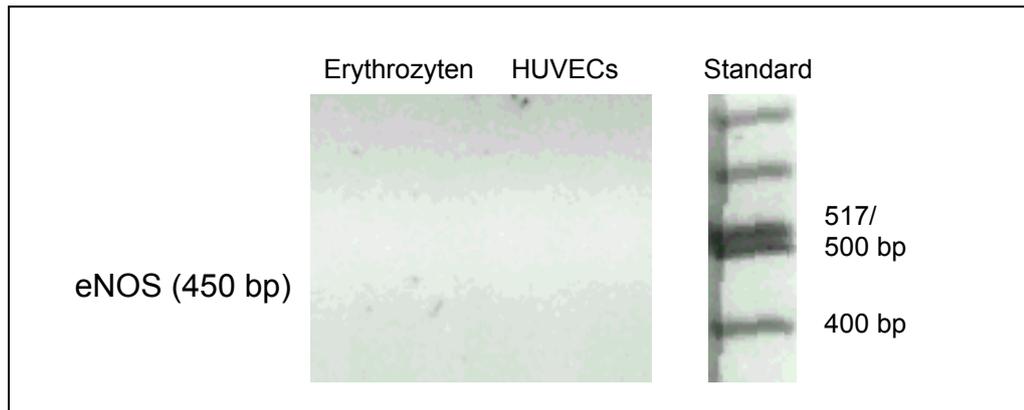


Abb.3.7 Ausschluss eines unspezifischen eNOS-mRNA-Produktes durch genomische DNA in der PCR.

Ein eNOS-mRNA-Sequenz-unspezifisches RT-PCR Produkt wurde durch Restriktionsanalyse des Produktes ausgeschlossen.

Zum Ausschluss einer eNOS-mRNA-unspezifischen Produktsynthese durch die eingesetzten eNOS Primer wurden die RT-PCR Produkte (s.o.) (Abb.3.8.A) an eNOS-mRNA-spezifischen Sequenzbereichen innerhalb der Amplifikationssequenz mit zwei Restriktionsenzymen geschnitten (Psi I: Schnittstelle bei Basenpaar 1846; BstE II: Schnittstelle bei Basenpaar 1727) (siehe Kapitel 2.3.2). RT-PCR Produkte der Endothelzellen wurden als Positiv-Kontrolle eingesetzt (s.o.). Die in der Gelelektrophorese aufgetrennten Produkte der erythrozytären Proben stimmten mit denen der Endothelzellen überein und entsprachen den erwarteten Fragmentgrößen (Abb.3.8.B u. Abb.3.8.C).

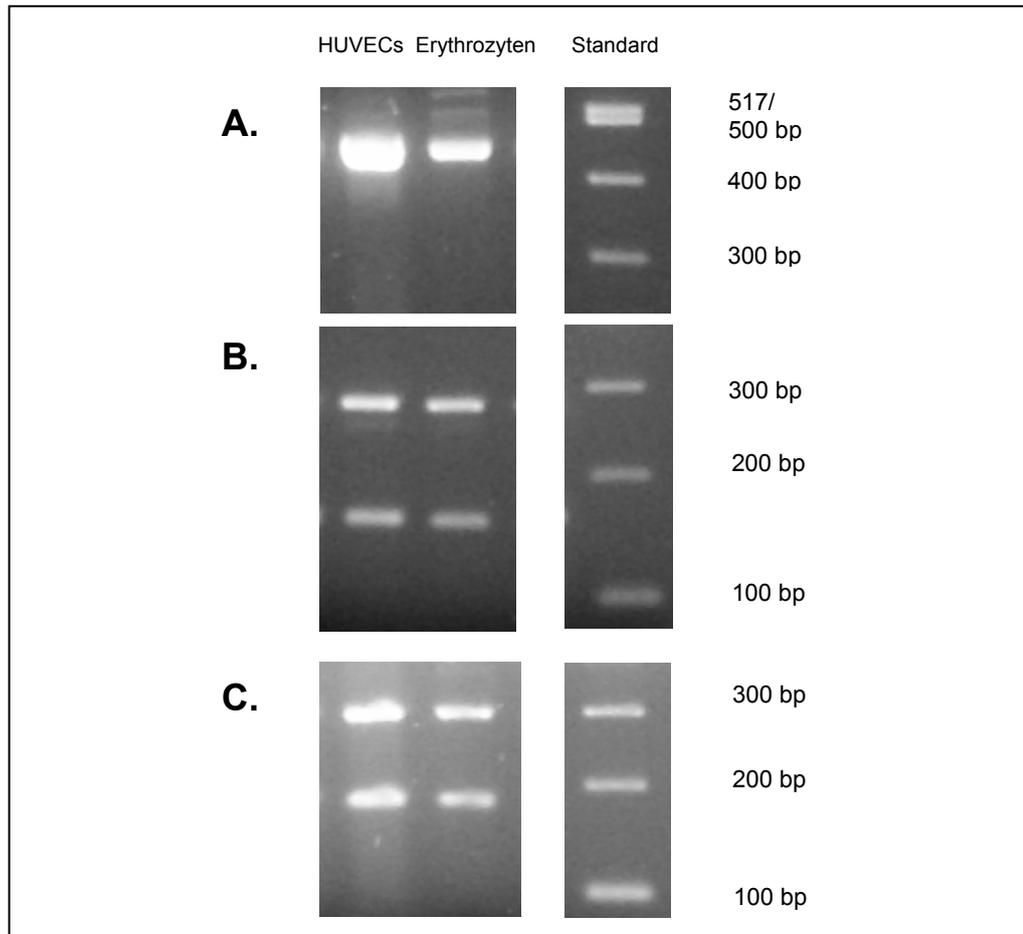


Abb.3.8 Nachweis der eNOS-Spezifität des RT-PCR Produktes (Amplifikationsprodukt: Basenpaar 1561 bis 2010) (A) für die Erythrozyten (HUVECs als Positiv-Kontrolle) durch Restriktionsanalyse des Produktes an eNOS-Sequenz-spezifischen Schnittstellen mit zwei Restriktionsenzymen: B. *Psi I*: Schnittstelle bei Basenpaar 1846; Produkte 285 bp und 164 bp; C. *BstE II*: Schnittstelle bei Basenpaar 1727; Produkte 166 bp und 283 bp.

3.3.2 eNOS-mRNA im Vollblut: Erythrozyten-spezifische eNOS-mRNA-Expression

Die eNOS-mRNA-Expression im Blut konnte den Erythrozyten zugeordnet werden.

Um auszuschließen, dass das eNOS-RT-PCR Produkt der Erythrozyten (Abb.3.6) auf eine Kontamination der Proben durch mRNA aus Leukozyten oder Thrombozyten (siehe Kapitel 3.1) zurückzuführen sein könnte, wurden auch Leukozyten und Thrombozyten auf eine

eNOS-mRNA-Expression untersucht. Die RT-PCR wurde, wie für die Erythrozyten beschrieben, durchgeführt (siehe Kapitel 2.3.1).

In einem ersten Ansatz wurden Leukozyten und Thrombozyten in einer Zellzahl zehnfach größer einer potentiellen Kontamination der Erythrozytenseparation mit Leukozyten bzw. Thrombozyten (Leukozyten: $1000 \cdot \mu\text{l}^{-1}$, Thrombozyten: $100000 \cdot \mu\text{l}^{-1}$) (siehe Kapitel 3.1) eingesetzt. Das eNOS-mRNA-Produkt konnte für die Erythrozyten bestätigt werden. Die Leukozyten und Thrombozyten zeigten kein Produkt (Abb. 3.9).

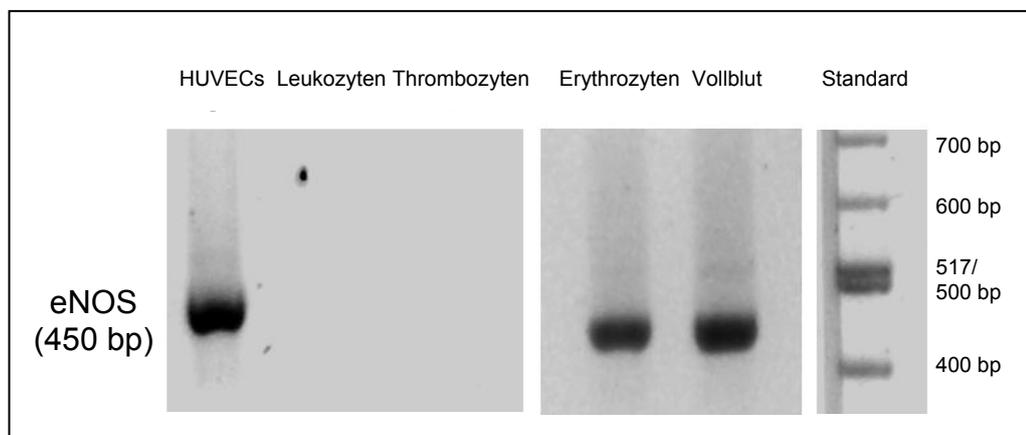


Abb.3.9 Ausschluss eines eNOS-mRNA-Produktes für Leukozyten und Thrombozyten in einer Zellzahl zehnfach größer einer möglichen Kontamination der erythrozytären Probe mit Leukozyten ($1000 \cdot \mu\text{l}^{-1}$) und Thrombozyten ($100000 \cdot \mu\text{l}^{-1}$) und Bestätigung des Produktes für die Erythrozyten. Endothelzellen (HUVEC) wurden als Positiv-Kontrolle eingesetzt.

Leukozyten und Thrombozyten sind nicht an dem eNOS-mRNA-Pool des Blutes beteiligt.

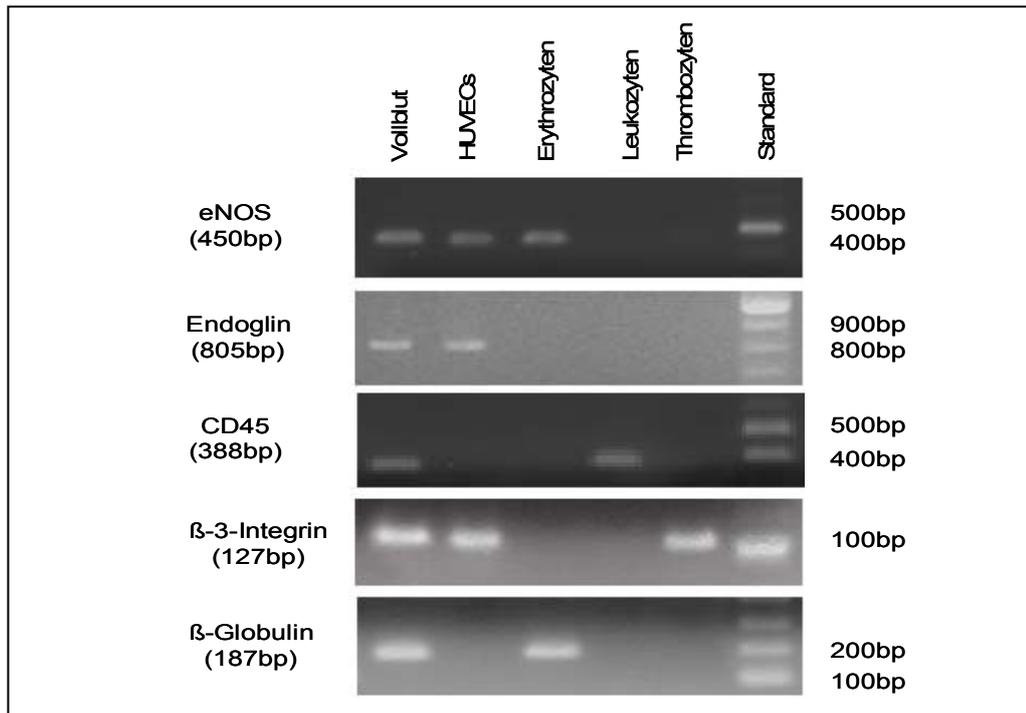
In einem zweiten Ansatz wurde untersucht, ob Leukozyten und Thrombozyten in physiologischer Zellzahl neben den Erythrozyten am eNOS-mRNA-Pool des Vollblutes beteiligt sind. Leukozyten und Thrombozyten wurden nach Separation entsprechend ihrer Zellzahl im Vollblut eingesetzt (Leukozyten $4000 \cdot \mu\text{l}^{-1}$, Thrombozyten $300000 \cdot \mu\text{l}^{-1}$). Zum Ausschluss einer Kontamination der RNA einer Blutzellpopulation mit RNA der übrigen Blutzellpopulationen wurden als Kontrolle

zellspezifische Primer eingesetzt (Erythrozyten: β -Globulin; Leukozyten: CD45; Thrombozyten: β -3-Integrin).

Um im Blut zirkulierende nonadhärente Endothelzellen als Quelle der eNOS-mRNA auszuschließen, wurde ein Endothelzell spezifischer Primer (Endoglin) mitgeführt. Die RT-PCR wurde nach gleichem Protokoll wie in den vorangegangenen Versuchen durchgeführt (siehe Kapitel 2.3.1).

Im Vollblut wurde für die eNOS und alle eingesetzten zell-spezifischen Primer ein Signal gezeigt. In den einzelnen Zellseparationen zeigten die zellspezifischen Primer für die jeweilige Blutzellfraktion ein positives Signal und waren in den jeweils anderen Blutzellfraktionen negativ. Ein positives eNOS Signal konnte im Vollblut, den Erythrozyten und den Endothelzellen nachgewiesen werden. Leukozyten und Thrombozyten zeigten kein Signal für die eNOS.

Im Vollblut wurde ein Signal für den Endothelzell-spezifischen Primer (Endoglin) gezeigt, das in den Erythrozyten Proben nicht nachweisbar war. Das positive eNOS-Signal der Erythrozyten konnte gegen eine Kontamination mit RNA der Endothelzellen abgegrenzt und den Erythrozyten eindeutig zugeordnet werden (Abb.3.10).



Zellen Primer	Vollblut	HUVECs	Erythro- zyten	Leukozyten	Thrombo- zyten
eNOS (450 bp)	+	+	+		
Endoglin (805 bp)	+	+			
CD45 (388 bp)	+			+	
β-3-Integrin (127 bp)	+	+			+
β-Globulin (187 bp)	+		+		

Abb.3.10 Leukozyten und Thrombozyten sind nicht am eNOS-mRNA-Pool des Blutes beteiligt. Im Vollblut nachweisbare eNOS-mRNA aus Endothelzellen ist nicht ursächlich für das eNOS-Signal der Erythrozyten.

3.4 eNOS-Protein-Expression im Erythrozyten im Western-Blot

Im Western-Blot konnte eine eNOS-Protein-Expression der Erythrozyten gezeigt werden.

Basierend auf den Ergebnissen der konfokalen Mikroskopie und der mRNA Untersuchung wurde auch im Western-Blot eine eNOS-Protein-Expression untersucht. Nach Proteinisolierung, SDS-Page, Membrantransfer und eNOS-Ak-Inkubation wurden die gebundenen eNOS-Ak mit einem Peroxidase-konjugierten Sekundär-Ak gekoppelt. Unter Umsatz von Cheminulmineszenz-Reagenz wurde das eNOS-Protein über die fluoreszierenden Ak auf einem Röntgenfilm dargestellt (siehe Kapitel 2.4). Als Positiv-Kontrolle wurden Endothelzellen (HUVECs) eingesetzt.

In der Auswertung konnte in den erythrozytären Proben eine Protein-Bande von eNOS-charakteristischer Größe (140 kd) nachgewiesen werden, die denen der endothelialen Proben (Positiv-Kontrolle) entsprach. Über die spezifische Ak-Bindung, die charakteristische Proteingröße und das Übereinstimmen mit der Positiv-Kontrolle ließ sich das Ergebnis des Western-Blots für die Erythrozyten als eNOS-spezifisch charakterisieren (Abb.3.12). Übereinstimmend mit den Ergebnissen der konfokalen Mikroskopie war die eNOS-Protein-Expression in der membranösen Fraktion der Erythrozyten nachzuweisen.

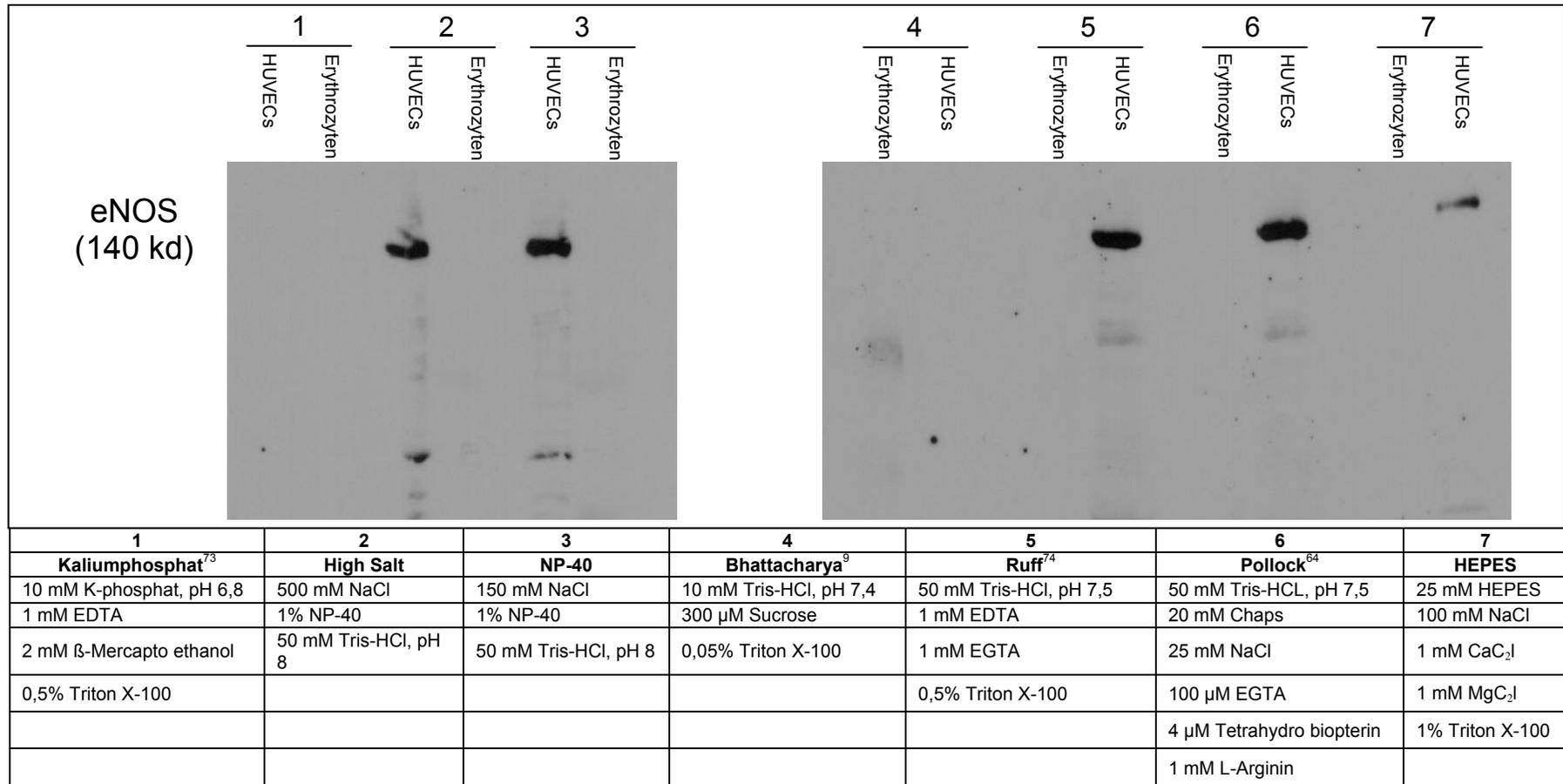


Abb.3.11 Etablierungsversuche der Probenaufarbeitung zur Untersuchung der eNOS-Protein-Expression im Erythrozyten (HUVECs als Positiv-Kontrolle) (siehe Kapitel 2.4 und Tab. 2.1).

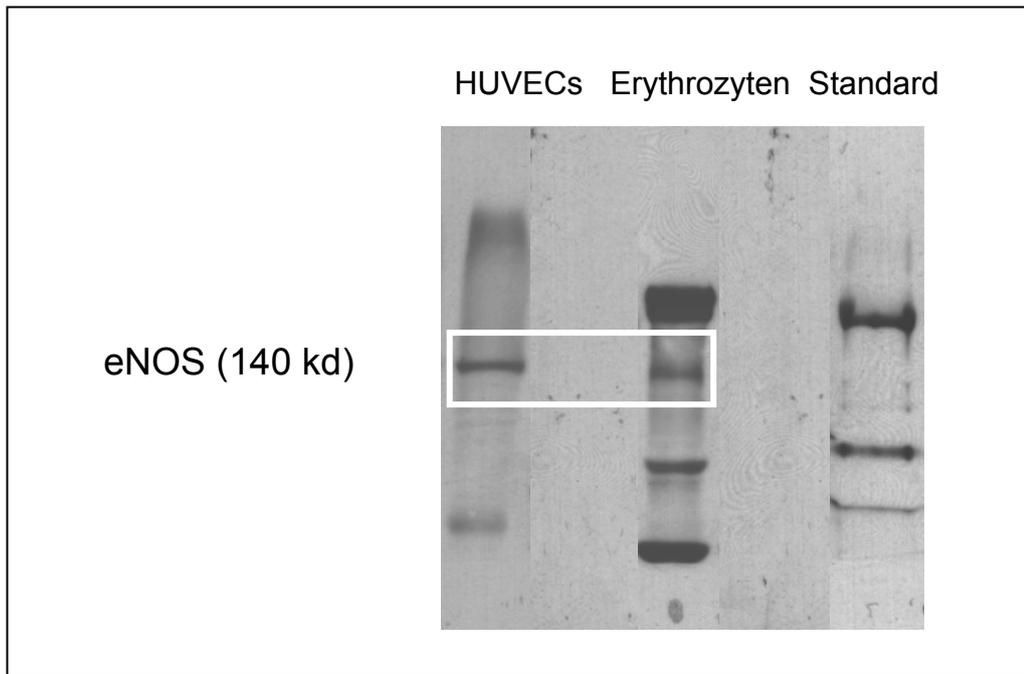


Abb.3.12 Nachweis einer eNOS-Protein-Expression der Erythrozyten im Western-Blot (HUVECs als Positiv-Kontrolle).

4 Diskussion

Der vaskuläre NO-Metabolismus wurde lange der endothelialen NO-Bildung gleichgesetzt. Erythrozyten galten lediglich als Kompartimente, in denen endothelial gebildetes NO abgebaut wird. Mittlerweile konnte jedoch gezeigt werden, dass Erythrozyten NO auch speichern, transportieren und wieder abgeben können. Neuere Untersuchungen konnten zusätzlich zeigen, dass Erythrozyten unter bestimmten Bedingungen in der Lage sind aus Nitrit, dem primären Abbauprodukt, wieder NO zu bilden. Außerdem fanden sich in der Literatur kontroverse und unvollständige Hinweise auf eine weitere Funktion der Erythrozyten im vaskulären NO-Metabolismus: Erythrozyten könnten über eine eigene NO-Synthase in der Lage sein, selbst NO zu bilden.

Erreicht endothelial gebildetes NO den Erythrozyten, kann es mit Hämoglobin drei Reaktionen eingehen. (1.) NO kann über die Reaktion mit Oxyhämoglobin zu Methämoglobin und Nitrat inaktiviert werden²⁰. (2.) Durch die Reaktion von NO mit dem Eisen der Hämgruppe des Deoxyhämoglobin zu Nitrosylhämoglobin kann es gespeichert werden³¹. (3.) Außerdem ist eine Speicherung von NO als S-Nitrosohämoglobin durch Transnitrosierung bei der Reaktion von NO mit dem Cystein der β -Hämoglobinkette möglich³¹. Damit ist der Erythrozyt in der Lage, endothelial gebildetes NO zu transportieren, so dass dieses auch Bildungsort fern, also endokrin und nicht wie lange angenommen nur parakrin wirken kann^{28;37}. Außerdem kann der Erythrozyt aus Nitrit, dem primären Abbauprodukt von NO, wieder NO bilden. Drei Reaktionen, die alle unter hypoxischen Bedingungen ablaufen, scheinen dies zu ermöglichen. (1.) Zum einen kann die Xanthin-Oxidoreduktase enzymatisch aus Nitrit NO bilden⁴⁷, zum anderen kann der Erythrozyt durch (2.) nichtenzymatische Dysproportionierung oder Säure-Reduktion^{54;76} sowie (3.) durch die

nichtenzymatische NO-Bildung durch Deoxyhämoglobin^{17;20} NO generieren.

Eine weitere zentrale Funktion des Erythrozyten im vaskulären NO-Metabolismus könnte die erstmals 1995 in der Literatur¹⁹ beschriebene NO-Bildung durch eine NO-Synthase im Erythrozyten selbst sein. Die Frage einer erythrozytären NOS wurde seitdem in den wenigen Veröffentlichungen kontrovers und ohne eine eindeutige Beweisführung diskutiert. In einem Teil der Publikationen wurden Hinweise auf eine enzymatische Aktivität gezeigt, andere beschreiben ein inaktives Enzym. Ein Proteinnachweis findet sich nur in einigen der Publikationen, ein Transkriptionsnachweis fehlt. Eine Einordnung der erythrozytären NOS in die bekannten Isoformen wird ebenso unterschiedlich beschrieben wie die grundlegende Fragestellung einer erythrozytären NOS-Expression selbst (siehe Kapitel 4.2).

Ziel dieser Arbeit war es eine NO-Synthase im Erythrozyten auf molekularbiologischer- und proteinbiochemischer Ebene nachzuweisen oder auszuschließen und die mögliche Isoform zu identifizieren (siehe Kapitel 4.1 und 4.2).

4.1.1 Proteinbiochemischer Nachweis einer eNOS im Erythrozyten

Die Expression einer NO-Synthase im Erythrozyten wurde mittels konfokaler Mikroskopie nachgewiesen. Diese ließ sich als endotheliale Isoform charakterisieren. Eine Expression von nNOS oder iNOS konnte nicht gezeigt werden. In der konfokalen Mikroskopie kann es durch eine Kreuzreaktivität der Antikörper zu falsch positiven Ergebnissen kommen. Dies konnte durch den Nachweis einer eNOS-Protein-Expression in den Erythrozyten von Wildtyp- im Gegensatz zu eNOS Knock-Out-Mäusen ausgeschlossen werden. Durch Verwendung Erythrozyten-spezifischer Antikörper wurde die eNOS-Expression eindeutig den Erythrozyten zugeordnet. Eine Anlagerung möglicherweise eNOS-exprimierender Thrombozyten wurde durch Verwendung Thrombozyten-spezifischer Antikörper ausgeschlossen. In der

konfokalen Mikroskopie war die eNOS ausschließlich im Bereich der Zellmembran zu detektieren.

Ergänzt wurden die Befunde der konfokalen Mikroskopie durch den Nachweis einer eNOS-Protein-Expression im Western-Blot. Übereinstimmend mit der konfokalen Mikroskopie war auch im Western-Blot das eNOS-Protein in der membranösen Zellfraktion nachzuweisen, was eine Membranständigkeit des Enzyms vermuten lässt. Die Western-Blot-Analyse ist ein etabliertes Verfahren welches wegen seiner Zweidimensionalität, durch Untersuchung der Proteingröße und gleichzeitige Isotop-spezifische Ak-Detektion in seiner Aussagefähigkeit als eindeutig gewertet werden kann.

4.1.2 Molekularbiologischer Nachweis einer eNOS im Erythrozyten

Eine eNOS-mRNA-Expression konnte in humanen Erythrozyten nachgewiesen und durch sequenzspezifische Untersuchungen als eNOS-spezifisch bestätigt werden. Durch den Einsatz zellspezifischer Marker konnte der hämatogene eNOS-mRNA-Pool den Erythrozyten zugeordnet werden. Leukozyten und Thrombozyten zeigten keine eNOS-mRNA-Expression. Transkriptionsuntersuchungen im Erythrozyten durch den Nachweis von mRNA aus Erythrozyten des peripheren Blutes werden in ihrer Aussagekraft zum Teil kritisch beurteilt, weil Erythrozyten während der Reifung ihren Kern und die RNA ausstoßen und ein reifer Erythrozyt keine RNA mehr enthält. Im peripheren Blut finden sich aber junge, noch kernhaltige Erythrozyten, so genannte Retikulozyten, die einen Anteil von 20-70% aller kernhaltigen Zellen im peripheren Blut einnehmen. Aus diesen Zellen lässt sich RNA isolieren, an der die Transkription in Erythrozyten untersucht werden kann. Dabei handelt es sich um ein etabliertes Verfahren^{21;35}.

4.2 Diskussion der Literatur

Eine NO-Synthase im Erythrozyten wurde erstmals 1995 durch Deliconstantinos et al. beschrieben¹⁹. Seitdem wurde die Frage einer NOS im Erythrozyten in den wenigen Publikationen vor allem durch Untersuchungen zur Enzymaktivität kontrovers diskutiert. Eine Protein-Expression und Isoform-Charakterisierung einer NOS im Erythrozyten wurde nur in sehr wenigen und ebenfalls widersprüchlichen Veröffentlichungen beschrieben. Untersuchungen zur Transkription fehlen völlig. Darüberhinaus finden sich weitere Publikationen, die eine erythrozytäre NOS indirekt beschreiben oder eine NOS ohne Beweisführung annehmen.

Biochemisch beschrieben Deliconstantinos et al.¹⁹ eine erythrozytäre, im Zytosol lokalisierte NOS, deren katalytische Aktivität durch Wasserstoff-Peroxid oder Calcium-Ionophor gesteigert werden konnte (Freisetzungsrates: $7 \cdot 10^7 \text{ pmol} \cdot \text{Zelle}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$). Diese Versuchsparameter stellen erhebliche Eingriffe in die physiologischen Bedingungen dar (Veränderungen von pH, PO_2 , Ca^{2+} -Konzentration) und hatten eventuell eine NOS-unabhängige NO-Freisetzung aus dem im Erythrozyten gebundenen NO-Pool stimuliert. Kritisch zu bewerten sind ebenfalls spätere Hinweise auf eine zytosolisch lokalisierte NOS-Aktivität²². Wird bei der Differenzierung zwischen zytosolischer und membranständiger Aktivität nicht sorgfältig eine Hämoglobinkontamination vermieden, kann es zu falsch positiven Ergebnissen kommen. Bei den zuerst aufgeführten Untersuchungen lag Hämoglobin durch die Erythrozytenlyse frei vor¹⁹. Dies bedingte eine „Konkurrenz“ zwischen dem NO-Fänger Hämoglobin und dem zur NO-Quantifizierung verwendeten NO-bindenden System. Durak et al.²² verwendeten zur Messung der NO-Bildung die Nitritkonzentrationsbestimmung über die Griess-Reaktion, die ebenfalls durch Hämoglobin stark beeinflusst wird.

Bei Versuchen zum Nachweis einer in der Membran lokalisierten NO-Synthase fand sich keine basale Aktivität⁹. Hingegen wies die über

eine Säule separierte, biochemisch aktive NO-synthetisierende Fraktion der solubilisierten Erythrozytenmembran eine Aktivität von $506 \text{ pmol} \cdot \text{Zelle}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ auf. Obwohl eine Steigerung der NO-Bildung des gereinigten Enzyms durch Insulingabe erreicht werden konnte, kann eine NOS-unspezifische Nitritproduktion nicht ausgeschlossen werden, da keine NOS-spezifische Inhibition oder Stimulation durchgeführt wurde. Bei einer Stimulation von Erythrozyten mit dem NOS-Substrat L-Arginin nahm die Umwandlung von L-Arginin zu L-Citrullin zu¹⁴. Kang et al.⁴¹ interpretierten die Verstoffwechslung des H³-markierten L-Arginins in den in Puffer hämolysierten Erythrozyten als Arginase-Aktivität, da diese nicht mit NOS-Inhibitoren, sondern mit dem Arginase-Inhibitor Norvalin zu unterdrücken war. Durch Erythrozyten-Lyse wird die Arginase-Aktivität erhöht und parallel gehen durch metabolische Prozesse die Kofaktoren verloren⁵³. Da aber zum Nachweis der katalytischen Aktivität der erythrozytären NOS weder für die NOS essentielle Kofaktoren noch ausreichend Substrat hinzugegeben wurden, konnte eine Aktivität der NOS nicht erwartet werden. Die für die NOS essentiellen Kofaktoren sind innerhalb der Erythrozyten, aber auch im Blutplasma vorhanden.

Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe konnten die in der Literatur kontrovers diskutierte NOS-Aktivität im Erythrozyten nachweisen. Durch die gemessene Calciumabhängigkeit wurde sie als konstitutive NOS differenziert. In Untersuchungen mit eNOS-spezifischen Inhibitoren und am Modell der eNOS-Knock-Out Maus konnte sie biochemisch als endotheliale NOS identifiziert werden.

Auch zur Protein-Expression sind keine einheitlichen Nachweise in der Literatur zu finden. Jubelin und Giermann³⁸ zeigten durch immunhistochemische Untersuchungen sowohl eine eNOS- als auch eine iNOS-Expression im Erythrozyten, die primär in der Membran lokalisiert war. Außerdem konnten sie Calmodulin im Erythrozyten nachweisen. Kang et al.⁴¹ konnten im Western-Blot nach vorheriger Immunpräzipitation ebenfalls eine eNOS- und iNOS-Expression zeigen,

ohne jedoch zwischen membranösem und zytosolischem Kompartiment zu differenzieren. Eine nNOS-Expression konnten sowohl Jubelin und Giermann³⁸ als auch Kang et al.⁴¹ nicht nachweisen. Chen und Metha¹⁴ zeigten im Western-Blot eine eNOS-Expression im Zytosol der Erythrozyten, konnten aber kein iNOS- und nNOS-Protein nachweisen. Bhattacharya et al.⁹ beschrieben eine so genannte Insulin-induzierbare NOS in der Erythrozytenmembran. Eine Antikörper-spezifische Untersuchung und damit eine Einordnung in die bekannten Isoformen leisteten sie nicht. Stattdessen zeigten sie in der Proteinelektrophorese unter nicht reduzierenden Bedingungen ein Protein von 230 kd, das sich unter reduzierenden Bedingungen in zwei Untereinheiten von 95 und 135 kd auftrennen ließ. Die bekannten NOS-Isoformen sind jedoch Dimere, die sich aus zwei gleichen Untereinheiten (nNOS: 150 kd; iNOS: 130 kd; eNOS: 140 kd) zusammensetzen.

Der im Rahmen dieser Arbeit erbrachte Nachweis einer eNOS-Expression im Erythrozyten bestätigt teilweise die immunhistochemischen Ergebnisse von Jubelin und Giermann³⁸, als auch die Western-Blot-Analysen von Kang et al.⁴¹ und Chen und Metha¹⁴. Im Unterschied zu diesen wurde jedoch keine der übrigen NOS-Isformen im Erythrozyten nachgewiesen. Wie von Jubelin und Giermann beschrieben, wurde die eNOS primär in der erythrozytären Membran identifiziert. In elektronenmikroskopischen Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe wurde die NOS dagegen, wie von Chen und Metha¹⁴ beschrieben, im Zytosol lokalisiert. Eine Erklärung könnte die für die eNOS bekannte Translokation des Proteins bei Aktivierung vom Zytosol in die Membran sein⁸¹. Ob diese Regulation auch bei der erythrozytären NOS von Bedeutung ist, kann jedoch aus den vorliegenden Ergebnissen nicht abgeleitet werden. Ein unspezifisch positives Signal durch eine Kreuzreaktivität der verwendeten Antikörper konnte erstmals ausgeschlossen werden, da in Untersuchungen an eNOS-defizienten Mäusen kein positives Signal darzustellen war. Außerdem konnte durch

Einsatz Blutzell-spezifischer Antikörper die eNOS-Expression erstmalig eindeutig den Erythrozyten zugeordnet werden.

Der in der Literatur fehlende Transkriptionsnachweis für die eNOS in Erythrozyten konnte mit der vorliegenden Arbeit erstmals erbracht werden. Dieser konnte durch Sequenz-spezifische Analysen als eNOS-spezifisch charakterisiert und durch Blutzell-spezifische Marker eindeutig den Erythrozyten zugeordnet werden. Bei Säugern sind 1 bis 2% der Erythrozyten noch kernhaltige Retikulozyten. Vergleicht man die Zellzahl der Retikulozyten mit denen der ebenfalls kernhaltigen Leukozyten, so nehmen die Retikulozyten einen Anteil von 20 bis 70% der im Vollblut vorhandenen kernhaltigen Zellen ein. Während ihrer Reifung werden die Mitochondrien abgebaut, die Ribosomen dissoziiert und durch Ribonukleasen in Ribozyme verdaut⁶⁶. Mit der Reifung der Retikulozyten geht ein Verlust der katalytischen Funktionen vieler Enzyme einher. In welchem Reifungsstadium die Transkription und die Translation der NOS stattfindet, kann mit den bisherigen Ergebnissen nicht eingeschätzt werden. Die eNOS könnte an der Ausdifferenzierung der Erythrozyten im Knochenmark beteiligt sein und mit fortschreitender Zellreifung abgebaut werden. Dafür sprechen Untersuchungen eines Kooperationspartners am NIH (National Institute of Health) in Washington. Dort konnte in unveröffentlichten Untersuchungen eine Abnahme der eNOS-Transkriptionsrate während der Erythrozyten-reifung gezeigt werden. Möglicherweise kann die eNOS-mRNA aber auch stabilisiert werden und im ausgereiften Erythrozyten translatiert werden. In Thrombozyten, die wie Erythrozyten im ausgereiften Stadium keine Ribosomen mehr besitzen, konnte eine extraribosomale Protein-Synthese nachgewiesen werden⁹¹. Unter Umständen können auch Erythrozyten Ribosomen-unabhängig Proteine synthetisieren. Die Regulation der NOS-Aktivität könnte damit nicht nur auf Enzymebene, sondern auch über die Translation gesteuert werden.

Neben den wenigen direkten Publikationen (s.o.) finden sich einige Untersuchungen, die indirekt eine NOS im Erythrozyten beschreiben oder als etabliert voraussetzen. Der bereits diskutierten Untersuchung von Bhattacharya et al.⁹ zu einer Membran-gebundenen, Insulin-induzierbaren NOS im Erythrozyten ging eine Arbeit aus der gleichen Arbeitsgruppe von Kahn et al.³⁹ voraus, die in verschiedenen murinen Geweben und humanen Erythrozyten eine durch Insulin stimulierbare NO-Bildung zeigen konnte. Sie postulierten daraus NO als second Messenger von Insulin. Zwei weitere Publikationen^{13;32} dieser Arbeitsgruppe knüpften an die Untersuchungen an. Sie beschrieben eine Östrogen-Stimulierbarkeit der so genannten Insulin-Induzierbaren NOS bei Patientinnen mit Brustkarzinom im Gegensatz zu gesunden Frauen. Dies werteten sie als Hinweis, daß NO ein pathophysiologischer Faktor des Brustkarzinoms sein könnte. Methodisch wurde die NO-Bildung wie von Bhattacharya⁹ bestimmt (s.o.). Durak et al.²², die eine Aspirin-induzierbare NOS-Aktivität im Erythrozyten postulierten, (s.o.) zeigten in einer neueren Arbeit²³ eine Abnahme der NOS-Aktivität in Erythrozyten bei Patienten mit chronischem Nierenversagen. Diese erklärten sie mit einer Substratabnahme durch gleichzeitige Zunahme der Arginase-Aktivität. Die Ergebnisse diskutierten sie als pathophysiologischen Bestandteil der renalen Minderperfusion bei chronischem Nierenversagen.

In der Literatur finden sich darüber hinaus Hinweise, welche die Annahme einer erythrozytären NOS unterstützen. So konnte im Erythrozyten ein Enzym gefunden werden, welches die physiologischen NOS-Inhibitoren Asymmetrisches-Dimethylarginin (ADMA) und N^G-Monomethyl-L-Arginin (L-NMMA) durch Hydrolyse abbauen kann⁴⁰. ADMA und L-NMMA wurden bei vielen pathophysiologischen Prozessen wie essentieller Hypertonie, Arteriosklerose, chronischem Nierenversagen und anderen nachgewiesen. Außerdem sind alle bekannten Regulationsmechanismen der eNOS auf Proteinebene, durch posttranslationale Modifikationen (Phosphorylierung,

Alkylierung^{3;24}) und Proteininteraktionen (Caveolin, Calmodulin, HSP 90, NOSIP, G-Protein-Rezeptor, Dynamin, Kinasen, und Phosphatasen^{3;24}) im Erythrozyten nachgewiesen¹⁶. Ob diese auch bei der Regulation der erythrozytären eNOS eine Rolle spielen, lässt jedoch nicht ableiten. In ihrer Summe unterstützten die aufgeführten Publikationen aber die Annahme einer eNOS-Expression und Aktivität im Erythrozyten.

Basierend auf den vorliegenden Daten konnte die in der Literatur kontrovers diskutierte Expression einer NOS im Erythrozyten nachgewiesen werden. Sie wurde in Übereinstimmung mit den biochemischen Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe als endotheliale Isoform charakterisiert und in Abgrenzung zu den übrigen Blutzellen eindeutig den Erythrozyten zugeordnet.

4.3 Physiologische Relevanz

Die erythrozytäre NO-Synthese kann im Vergleich zur endothelialen NO-Synthese nicht nur lokal wirken, sondern mit den zirkulierenden Erythrozyten im gesamten Gefäßsystem. Da die endotheliale NO-Synthese nicht in allen Gefäßabschnitten gleich ist⁸⁹, kann die für die Blutzirkulation neue "NO-Quelle" der Erythrozyten andere Funktionen übernehmen als endothelial gebildetes NO. Zusätzlich ist im krankhaft veränderten Endothel im Rahmen beginnender oder manifester arteriosklerotischer Veränderungen eine geringere oder völlig fehlende eNOS-Aktivität nachzuweisen⁵⁰. So könnte in den Arealen, in denen die endotheliale Synthese von NO deutlich geringer ist, die erythrozytäre NO-Bildung neben den zirkulierenden NO-Speichern eine entscheidende Rolle in der NO-Verfügbarkeit spielen.

Bei Gefäßerkrankungen konnte schon in der Vergangenheit die Relevanz von NO-Donatoren, z.B. Nitraten oder Nitroglycerin, in der Therapie gezeigt werden. Bei der oralen Applikation wirken die als Medikament eingesetzten NO-Donatoren nur kurzfristig, so dass eine

kontinuierliche intravenöse Gabe nötig werden kann. Von Interesse ist also eine Quelle, die kontinuierlich bioaktives NO freisetzt.

Erste Hinweise hierzu ergeben sich in einer Studie, bei der Patienten mit einem akuten Koronarsyndrom entweder das NOS-Substrat L-Arginin oder Nitroglycerin intravenös verabreicht wurde. Dabei zeigte sich in vorläufigen Ergebnissen, dass L-Arginin dem bisherigen Therapiestandard Nitroglycerin hinsichtlich der Beschwerdefreiheit gleichwertig war. Dieser Effekte könnte durch die gesteigerte endotheliale aber auch erythrozytäre NO-Synthese erklärt werden. Steigt durch L-Arginin Zugabe die NO-Synthese nicht nur im Endothel, sondern auch im Erythrozyten, geht damit eine erhöhte NO-Verfügbarkeit einher. Diese Effekte können nicht nur durch die gesteigerte NO-Synthese, sondern ebenfalls durch die Auffüllung zirkulierender NO-Speicher in Plasma oder Erythrozyten bedingt sein (Unveröffentlichte Daten, Kelm et al., Kardiologisches Labor, Universität Düsseldorf).

Vasodilatatorische Effekte einer intrakoronaren L-Arginin-Infusion wurden bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit untersucht. In arteriosklerotisch hochgradig stenosierte Segmenten epikardialer Gefäße wurde die Vasodilatation nach NOS-Stimulation (durch L-Arginin) im Vergleich zu einem Referenzgefäß untersucht. Hierbei löste eine erythrozytäre NOS die Vasodilatation selektiv in stenosierte Segmenten aus. Die Wirkung von endothelial gebildetem NO konnte durch die Kontrollen ausgeschlossen werden, in denen die Wirkung des L-Arginins außerhalb der Stenose und dem Referenzgefäß erfasst wurde (Unveröffentlichte Daten, Kelm et al., Kardiologisches Labor, Universität Düsseldorf). Ungeklärt ist jedoch, inwieweit eine erythrozytäre NO-Bildung an der Entstehung arteriosklerotischer Gefäßveränderungen oder anderen innerhalb der Arteriosklerose beschriebenen Prozessen selbst beteiligt ist.

An isolierten Rattenlungen konnte gezeigt werden, dass Erythrozyten bei einem Ischämie-Reperfusionsschaden mutmaßlich NO-

vermittelt protektiv wirken⁹². In diesen Lungenpräparaten war die Anwesenheit von Blut notwendig, um den pulmonalvaskulären Widerstand nach Ausschalten der endothelialen NO-Bildung durch NOS-Inhibitoren zu senken. Das könnte bedeuten, dass Erythrozyten durch die zelleigene NO-Bildung in der Lage sind die verminderte endotheliale NO-Bioverfügbarkeit zu kompensieren.

Bisher wurden pathologische Mikrozirkulationsstörungen zum Teil auf die veränderte NO-Verfügbarkeit und dadurch entstehende Veränderungen der Erythrozytenverformbarkeit zurückgeführt^{57;75}. Veränderungen in der Verformbarkeit von Erythrozyten treten bei verschiedenen Erkrankungen auf z.B. Arteriosklerose, Bluthochdruck und Diabetes, aber auch Sepsis⁸. In Erythropoitin-überexprimierenden, polyglobulen Mäusen führte die systemische Gabe von NOS-Inhibitoren zu einer Okklusion der terminalen Arteriolen durch die Erythrozyten und dem Tod aller Tiere innerhalb weniger Stunden⁷⁵. Diese Veröffentlichung unterstreicht die Bedeutung von NO für die Erythrozyten-Verformbarkeit. Auch wenn in der Arbeit nicht zwischen endothelialer und erythrozytärer NO-Bildung differenziert wurde, ist anzunehmen, dass besonders die Inhibition der erythrozytären NOS für die pathophysiologischen Ergebnisse der Untersuchungen von Bedeutung ist. Zum einen wird im Bereich der Mikrozirkulation physiologisch weniger NO durch das Endothel synthetisiert, zum anderen kann vor allem erythrozytär gebildetes NO direkt vor Ort in der Zelle wirken. Ähnliche Hinweise auf eine NO-Modulation der Erythrozyten-Verformbarkeit zur Verbesserung der Mikrozirkulation geben Publikationen zur Sichelzellanämie^{70;71}. Bei Patienten mit Sichelzellanämie konnte eine verminderte NO-Bioverfügbarkeit während der hämolytischen Krisen nachgewiesen werden. Dies könnte mit dem Abfangen von NO durch akut freigesetztes Hämoglobin erklärt werden. Umgekehrt konnte eine Reduktion der Gefäßokklusionen und eine Reduktion des pulmonalen Hochdruckes während der hämolytischen Krisen durch NO- oder L-Arginin-Substitution gezeigt

werden^{58;90}. Da die Synthese und der Abbau von NO innerhalb des Erythrozyten die basale Erythrozyten-Verformbarkeit beeinflussen, könnten Mikrozirkulationsstörungen eventuell durch eine Steigerung der NO-Synthese im Erythrozyten ausgeglichen werden.

4.4 Ausblick

Neben den Endothelzellen sind die Erythrozyten an der vaskulären NO-Bildung beteiligt. Erythrozyten sind nicht nur Speicher des vaskulären NO-Pools, sondern können diesen auch aktiv auffüllen. Herzinsuffizienz und Arteriosklerose sind neben anderen pathophysiologischen Prozessen beispielhaft assoziiert mit der Endothelialen-Dysfunktion und einer resultierenden Abnahme der NO-Bioverfügbarkeit. Bei Patienten mit Herzinsuffizienz oder Myokardinfarkt wird eine Verschlechterung der Prognose durch eine Anämie beobachtet^{4;61}. Diese könnte durch die gleichzeitige Verminderung der endothelialen und erythrozytären NO-Bioverfügbarkeit begründet sein. Dagegen könnte eine Stimulation der Expression und der Aktivität der erythrozytären NO-Synthase den Verlauf vaskulärer Erkrankungen entscheidend verbessern, während andere neue Therapiekonzepte, die in den NO-Stoffwechsel eingreifen, wie z.B. die vaskuläre Gentherapie in der Regel lokal begrenzt und nicht systemisch wirksam sind⁴⁵. Dazu müssen weitere Untersuchungen primär die Regulationsmechanismen der erythrozytären NO-Synthase aufklären. Langfristig könnten dadurch neue Therapiekonzepte für die Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen gewonnen werden.

5 Zusammenfassung

Die Bedeutung der Erythrozyten für den vaskulären NO-Metabolismus wurde in jüngster Zeit einem grundlegenden Wandel unterzogen. Erythrozyten entwickelten sich vom Abfänger und Vernichter von NO, über Speicher und Transporter hin zu Funktionseinheiten, die aus dem „Abfall-Produkt“ Nitrit unter bestimmten Bedingungen wieder NO generieren können. Diese Aspekte des erythrozytären NO-Metabolismus müssen möglicherweise um eine zentrale Funktion erweitert werden. Erythrozyten könnten in der Lage sein durch eine zelleigene NO-Synthase aus L-Arginin NO zu bilden.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es: 1. eine NO-Synthase im Erythrozyten nachzuweisen oder auszuschließen, 2. ggf. die Isoform zu charakterisieren und 3. die Expression auf RNA- und Proteinebene detailliert darzustellen.

Die Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1. Erythrozyten exprimieren eine NO-Synthase.
2. Die NO-Synthase im Erythrozyten kann eindeutig als endotheliale Isoform charakterisiert werden.
3. Sowohl Transkription als auch Translation der NO-Synthase im Erythrozyten können nachgewiesen werden.
4. Die Expression der NO-Synthase kann in Abgrenzung zu den übrigen Blutzellpopulationen eindeutig den Erythrozyten zugeordnet werden.

Die Expression einer NO-Synthase erweitert die Bedeutung der Erythrozyten im vaskulären NO-Metabolismus und gibt einen Hinweis auf neue physiologische und pathophysiologische Funktionen der Erythrozyten für die vaskuläre Homöostase. Erythrozyten können speziell dort eine NO-Wirkung vermitteln, wo die endotheliale NO-Bioverfügbarkeit eingeschränkt ist. Damit könnte die Expression einer NO-Synthase im Erythrozyten den Angriffspunkt neuer Therapiekonzepte zur Behandlung von Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems darstellen.

6 Literaturverzeichnis

1. Abu-Soud HM, Stuehr DJ. Nitric Oxide Synthases Reveal a Role for Calmodulin in Controlling Electron Transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90:10769-10772.
2. Al-Sa'doni HH, Megson IL, Bisland S, Butler AR, Flitney FW. Neocuproine, a selective Cu(I) chelator, and the relaxation of rat vascular smooth muscle by S-nitrosothiols. *Br J Pharmacol*. 1997;121:1047-1050.
3. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J*. 2001;357:593-615.
4. Anand I, McMurray JJV, Whitmore J, Warren M, Pham A, McCamish MA, Burton PBJ. Anemia and its relationship to clinical outcome in heart failure. *Circulation*. 2004;110:149-154.
5. Arnelo DR, Stamler JS. NO⁺, NO[•], and NO⁻ donation by S-nitrosothiols: implications for regulation of physiological functions by S-nitrosylation and acceleration of disulfide formation. *Arch Biochem Biophys*. 1995;318:279-285.
6. Asano K, Chee CBE, Gaston B, Lilly CM, Gerard C, Drazen JM, Stamler JS. Constitutive and inducible nitric oxide synthase gene expression, regulation, and activity in human lung epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91:10089-10093.
7. Bassenge E, Heusch G. Endothelial and neuro-humoral control of coronary blood flow in health and disease. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*. 1990;116:79-165.
8. Bateman RM, Jagger JE, Sharpe MD, Ellsworth ML, Mehta S, Ellis CG. Erythrocyte deformability is a nitric oxide-mediated factor in decreased capillary density during sepsis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001;280:H2848-H2856.
9. Bhattacharya S, Patra SC, Roy SB, Kahn NN, Sinha AK. Purification and properties of insulin-activated nitric oxide synthase from human erythrocyte membranes. *Arch Physiol Biochem*. 2001;109:441-449.
10. Busse R, Fleming I. Regulation and functional consequences of endothelial nitric oxide formation. *Ann Med*. 1995;27:331-340.
11. Butler AR, Rhodes P. Chemistry, analysis, and biological roles of S-nitrosothiols. *Anal Biochem*. 1997;249:1-9.

12. Carvalho FA, Martins-Silva J, Saldanha C. Amperometric measurements of nitric oxide in erythrocytes. *Biosens Bioelectron.* 2004;20:505-508.
13. Chakraborty S, Girish GV, Sinha AK. Impaired binding of insulin to erythrocyte membrane receptor and the activation of nitric oxide synthase by the hormone in human breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2004;130:294-300.
14. Chen LY, Mehta JL. 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.* 1998;32:57-61.
15. Clancy RM, Miyazaki Y, Cannon PJ. Use of thionitrobenzoic acid to characterize the stability of nitric oxide in aqueous solutions and in porcine aortic endothelial cell suspensions. *Anal Biochem.* 1990;191:138-143.
16. Cohen CM, Gascard P. Regulation and Post-translational Modification of Erythrocyte Membrane - Skeletal Proteins. *Semin Hematol.* 1992;29:244-292.
17. 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 III RO, Gladwin MT. Nitrite reduction to nitric oxide by deoxyhemoglobin vasodilates the human circulation. *Nat Med.* 2003;9:1498-1505.
18. Déjam A, Hunter CJ, Pelletier MM, Hsu LL, Machado RF, Shiva S, Power GG, Kelm M, Gladwin MT, Schechter AN. Erythrocyte are the Major Intravascular Storage Sites of Nitrite in Human Blood. *Blood.* 2005; 106(2):734-9
19. Deliconstantinos G, Villiotou V, Stavrides JC, Salemes N, Gogas J. Nitric oxide and peroxynitrite production by human erythrocytes: a causative factor of toxic anemia in breast cancer patients. *Anticancer Res.* 1995;15:1435-1446.
20. Doyle MP, Hoekstra JW. Oxidation of nitrogen oxides by bound dioxygen in hemoproteins. *J Inorg Biochem.* 1981;14:351-358.
21. DuPont BR, Grant SG, Oto SH, Bigbee WL, Jensen RH, Langlois RG. Molecular characterization of glycophorin A transcripts in human erythroid cells using RT-PCR, allele-specific restriction, and sequencing. *Vox Sang.* 1995;68:121-129.

22. Durak I, Cimen MYB, Kacmaz M, Gören D, Öztürk HS. Aspirin induces erythrocyte nitric oxide synthase activity in vivo. *Clin Chim Acta*. 2001;314:265-267.
23. Durak I, Ozturk HS, Elgun S, Cimen MY, Yalcin S. Erythrocyte nitric oxide metabolism in patients with chronic renal failure. *Clin Nephrol*. 2001;55:460-464.
24. Fleming I, Busse R. Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol*. 2003;284:R1-R12.
25. Fox-Robichaud A, Payne D, Hasan SU, Ostrovsky L, Fairhead T, Reinhardt P, Kubes P. Inhaled NO as a viable antiadhesive therapy for ischemia/reperfusion injury of distal microvascular beds. *J Clin Invest*. 1998;101:2497-2505.
26. Ghafourifar P, Richter C. Nitric oxide synthase activity in mitochondria. *FEBS Lett*. 1997;418:291-296.
27. Giulivi C, Poderoso JJ, Boveris A. Production of nitric oxide by mitochondria. *J Biol Chem*. 1998;273:11038-11043.
28. Gladwin MT, Lancaster jr JR, Freeman BA, Schechter AN. Nitric oxide's reactions with hemoglobin: a view through the SNO-storm. *Nat Med*. 2003;9:496-500.
29. Gödecke A, Decking UKM, Ding Z, Hirchenhain J, Bidmon H-J, Gödecke S, Schrader J. Coronary hemodynamics in endothelial NO synthase knockout mice. *Circ Res*. 1998;82:186-194.
30. Griendling K, Alexander RW. Endothelial control of the cardiovascular system: recent advances. *FASEB J*. 1996;10:283-292.
31. Gross SS, Lane P. Physiological reactions of nitric oxide and hemoglobin: a radical rethink. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:9967-9969.
32. Guha M, Biswas J, Tirkey J, Sinha AK. Impairment of stimulation by estrogen of insulin-activated nitric oxide synthase in human breast cancer. *Int J Cancer*. 2002;100:261-265.
33. Holmes AJ, Williams DLH. Reactions of S-nitrosothiols with ascorbate: clear evidence of two reactions. *Chem Commun*. 1998;16:1711-1712.
34. Hotchkiss JH. Nitrate, nitrite balance, and de novo synthesis of nitrate. *Am J Clin Nutr*. 1988;47:161-162.

35. Huang S, Zeng F, Chen M, Ren Z, Shen M, Rodgers GP, Schechter AN, Zeng Y. The Delta-Globin RNA Transcript Level in Beta-Thalassemia Carriers. *Acta Haematol.* 1999;102:1-6.
36. Ignarro LJ. Biosynthesis and metabolism of endothelium-derived nitric oxide. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1990;30:535-560.
37. Jia L, Bonaventura C, Bonaventura J, Stamler JS. S-nitrosohaemoglobin: a dynamic activity of blood involved in vascular control. *Nature.* 1996;380:221-226.
38. Jubelin BC, Gierman JL. Erythrocytes may synthesize their own nitric oxide. *Am J Hypertens.* 1996;9:1214-1219.
39. Kahn NN, Acharya K, Bhattacharya S, Acharya R, Mazumder S, Bauman W, Sinha AK. Nitric Oxide: The "Second Messenger" of Insulin. *IUBMB Life.* 2000;49:441-450.
40. Kang ES, Cates TB, Harper DN, Chiang TM, Myers LK, Acchiardo SR, Kimoto M. An enzyme hydrolyzing methylated inhibitors of nitric oxide synthase is present in circulating human red blood cells. *Free Radic Res.* 2001;35:693-707.
41. Kang ES, Ford K, Grokulsky G, Wang Y-B, Chiang TM, Acchiardo SR. Normal circulating adult human red blood cells contain inactive NOS proteins. *J Lab Clin Med.* 2000;135:444-451.
42. Kelm M. Nitric oxide metabolism and breakdown. *Biochim Biophys Acta.* 1999;1411:273-289.
43. Kleinbongard P, Dejam A, Lauer T, Rassaf T, Schindler A, Picker O, Scheeren T, Gödecke A, Schrader J, Schulz R, Heusch G, Schaub GA, Bryan NS, Feelisch M, Kelm M. Plasma nitrite reflects constitutive nitric oxide synthase activity in mammals. *Free Radic Biol Med.* 2003;35:790-796.
44. Kleinman WA, Richie JPjr. Status of glutathione and other thiols and disulfides in human plasma. *Biochem Pharmacol.* 2000;60:19-29.
45. Lewis BS, Flugelman MY, Weisz A, Keren-Tal I, Schaper W. Angiogenesis by gene therapy: a new horizon for myocardial revascularization? *Cardiovasc Res.* 1997;35:490-497.
46. Li D, Chen H, Mehta JL. Angiotensin II via activation of type 1 receptor upregulates expression of endoglin in human coronary artery endothelial cells. *Hypertension.* 2001;38:1062-1067.

47. Li H, Samouilov A, Liu X, Zweier JL. Characterization of the magnitude and kinetics of xanthine oxidase-catalyzed nitrite reduction. Evaluation of its role in nitric oxide generation in anoxic tissues. *J Biol Chem.* 2001;276:24482-24489.
48. Li H, Samouilov A, Liu X, Zweier JL. Characterization of the magnitude and kinetics of xanthine oxidase-catalyzed nitrate reduction: evaluation of its role in nitrite and nitric oxide generation in anoxic tissues. *Biochemistry (Mosc).* 2003;42:1150-1159.
49. Luchsinger BP, Rich EN, Yan Y, Williams EM, Stamler JS, Singel DJ. Assessments of the chemistry and vasodilatory activity of nitrite with hemoglobin under physiologically relevant conditions. *J Inorg Biochem.* 2005;99:912-921.
50. Lüscher TF. The endothelium and cardiovascular disease - a complex relation. *N Engl J Med.* 1994;330:1081-1083.
51. Masaki Nakane, Harald H.H.W.Schmidt, Jennifer S.Pollock, Ulrich Förstermann, Ferid Murad. Cloned human brain nitric oxide synthase is highly expressed in skeletal muscle. *FEBS Lett.* 1993;316:175-180.
52. Megson IL, Sogo N, Mazzei FA, Butler AR, Walton JC, Webb DJ. Inhibition of human platelet aggregation by a novel S-nitrosothiol is abolished by haemoglobin and red blood cells in vitro: implications for anti-thrombotic therapy. *Br J Pharmacol.* 2000;131:1391-1398.
53. Metha JL, Metha P, Li D. Nitric oxide synthase in adult red blood cells: vestige of an earlier age or a biologically active enzyme? *J Lab Clin Med.* 2000;135:430-431.
54. Modin A, Bjorne H, Herulf M, Alving K, Weitzberg E, Lundberg JO. Nitrite-derived nitric oxide: a possible mediator of 'acidic-metabolic' vasodilation. *Acta Physiol Scand.* 2001;171:9-16.
55. Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med.* 1993;329:2002-2012.
56. Moncada S, Higgs EA. Molecular mechanisms and therapeutic strategies related to nitric oxide. *FASEB J.* 1995;9:1319-1330.
57. Montes RAO, Eckamn JR, Hsu LL, Wick TM. Sickle erythrocyte adherence to endothelium at low shear: role of shear stress in propagation of vaso-occlusion. *Am J Hematol.* 2002;70:216-227.
58. Morris CR, Morris SM, Hagar W, van Warmerdam J, Claster S, Kepka-Lenhart D, Machado L, Kuypers FA, Vichinsky EP.

- Arginine therapy. A new treatment for pulmonary hypertension in sickle cell disease? *Am J Respir Crit Care Med.* 2003;168:63-69.
59. Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.* 1992;6:3051-3064.
 60. Nathan C, Xie Q. Nitric oxide synthases: Roles, tolls, and controls. *Cell.* 1994;78:915-918.
 61. Nikolsky E, Aymong ED, Halkin A, Grines CL, Cox DA, Garcia E, Mehran R, Tscheng JE, Griffin JJ, Guagliumi G, Stuckey T, Turco M, Cohen DA, Negoita M, Lansky AJ, Stone GW. Impact of anemia in patients with acute myocardial infarction undergoing primary percutaneous coronary intervention. *J Am Coll Cardiol.* 2004;44:547-553.
 62. Palmer RM. The discovery of nitric oxide in the vessel wall. *Arch Surg.* 1993;128:396-401.
 63. Pawlowski JR, Hess DT, Stamler JS. Export by red blood cells of nitric oxide bioactivity. *Nature.* 2001;409:622-xx.
 64. Pollock JS, Forstermann U, Mitchell JA, Warner TD, Schmidt HHHW, Nakane M, Murad F. 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.* 1991;88:10480-10484.
 65. Radomski MW, Moncada S. Regulation of vascular homeostasis by nitric oxide. *Thromb Haemost.* 1993;70:36-41.
 66. Rapoport SM. The reticulocyte. *Boca Raton, Florida: CRC Press Inc.* 1986;1:1.
 67. Rassaf T, Bryan NS, Kelm M, Feelisch M. Concomitant presence of N-nitroso and S-nitroso proteins in human plasma. *Free Radic Biol Med.* 2002;33:1590-1596.
 68. Rassaf T, Preik M, Kleinbongard P, Lauer T, Heiß C, Strauer BE, Feelisch M, Kelm M. Evidence for in vivo transport of bioactive nitric oxide in human plasma. *J Clin Invest.* 2002;109:1241-1248.
 69. Recchia FA, Vogel TR, Hintze TH. NO metabolites accumulate in erythrocytes in proportion to carbon dioxide and bicarbonate concentration. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000;279:H852-H856.
 70. Reiter CD, Gladwin MT. An emerging role for nitric oxide in sickle cell disease vascular homeostasis and therapy. *Curr Opin Hematol.* 2003;10:99-107.

71. Reiter CD, Wang X, Tanus-Santos JE, Hogg N, Cannon III RO, Schechter AN, Gladwin MT. Cell - free hemoglobin limits nitric oxide bioavailability in sickle - cell disease. *Nat Med*. 2002;8:1383-1389.
72. Rösen, P., Ballhausen, T., Stockklauser, K., and Hönack, C. Influence of glucose and diabetes on the endothelial NO-synthase. *Diabetologia* 38, A48. 1995.
73. Rubin CS. Characterization and comparison of membrane-associated and cytosolic cAMP-dependent protein kinases. Studies on human erythrocyte protein kinases. *J Biol Chem*. 1979;254:12439-12449.
74. Ruff P, Speicher DW, Husain-Chishti A. Molecular Identification of a Major Palmitoylated Erythrocyte Membrane Protein Containing the src Homology 3 Motif. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88:6595-6599.
75. Ruschitzka FT, Wenger RH, Stallmach T, Quaschnig T, Wit de C, Wagner K, Labugger R, Kelm M, Noll G, Rüllicke T, Shaw S, Lindberg RLP, Rodenwaldt B, Lutz H, Bauer C, Lüscher TF, Gassmann M. Nitric oxide prevents cardiovascular disease and determines survival in polyglobulic mice overexpressing erythropoietin. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000;97:11609-11613.
76. Samouilov A, Kuppusamy P, Zweier JL. Evaluation of the magnitude and rate of nitric oxide production from nitrite in biological systems. *Arch Biochem Biophys*. 1998;357:1-7.
77. Scharfstein JS, Keaney jr JF, Slivka A, Welch GN, Vita JA, Stamler JS, Loscalzo J. In vivo transfer of nitric oxide between a plasma protein-bound reservoir and low molecular weight thiols. *J Clin Invest*. 1994;94:1432-1439.
78. Schrör K. Endotheliale Faktoren und Thrombozytenfunktion. *Z Kardiol*. 1991;80:3-6.
79. Schrör K. Organische Nitrate. I. Wirkmechanismen und neue therapeutische Ansätze bei Myokardischämie. *Internist*. 1995;36:392-403.
80. Shaul PW, North AJ, Wu LC, Wells LB, Brannon TS, Lau KS, Michel T, Margraf LR, Star R.A. Endothelial nitric oxide synthase is expressed in cultured human bronchiolar epithelium. *J Clin Invest*. 1994;94:2231-2236.
81. Shaul PW, Smart EJ, Robinson LJ, German Z, Yuhanna IS, Ying Y, Anderson RGW, Michel T. Acylation Targets Endothelial

- Nitric-oxide Synthase to Plasmalemmal Caveolae. *J Biol Chem.* 1996;271:6518-6522.
82. Singel DJ, Stamler JS. CHEMICAL PHYSIOLOGY OF BLOOD FLOW REGULATION BY RED BLOOD CELLS. *Annu Rev Physiol.* 2005;67:99-145.
 83. Smith RD, Noguchi CT, Schechter AN. Quantitative PCR analysis of HbF induces in primary human adult erythroid cells. *Blood.* 2000;95:863-869.
 84. Snyder SH. More jobs for that molecule. *Nature.* 1994;372:504-505.
 85. Snyder SH, Brecht DS. Biological roles of nitric oxide. *Sci Am.* 1992;266 (5):68-77.
 86. Stamler JS, Jaraki O, Osborne J, Simon DI, Keaney J, Vita J, Singel D, Valeri CR, Loscalzo J. Nitric oxide circulates in mammalian plasma primarily as an S-nitroso adduct of serum albumin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89:7674-7677.
 87. Stamler JS, Jia L, Eu JP, McMahon TJ, Demchenko IT, Bonaventura J, Gernert K, Piantadosi CA. Blood flow regulation by S-nitrosohemoglobin in the physiological oxygen gradient. *Science.* 1997;276:2034-2037.
 88. Stuehr DJ, Kwon NS, Gross SS, Thiel BA, Levi R, Nathan CF. Synthesis of nitrogen oxides from L-arginine by macrophage cytosol: requirement for inducible and constitutive components. *Biochem Biophys Res Commun.* 1989;161:420-426.
 89. Teichert A-M, Miller TL, Tai SC, Wang Y, Bei X, Robb GB, Phillips MJ, Marsden PA. In vivo expression profile of an endothelial nitric oxide synthase promoter-reporter transgene. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000;278:H1352-H1361.
 90. Weiner DL, Hibberd PL, Betit P, Cooper AB, Botelho CA, Brugnara C. Preliminary assessment of inhaled nitric oxide for acute vaso-occlusive crisis in pediatric patients with sickle cell disease. *JAMA.* 2003;289:1136-1142.
 91. Weyrich AS, Lindemann S, Zimmermann GA. The evolving role of platelets in inflammation. *J Thromb Haemost.* 2003;1:1897-1905.
 92. Yang BC, Nichols WW, Mehta JL. 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 Therapeut.* 1996;1:297-305.

93. Zhang Z, Naughton D, Winyard PG, Benjamin N, Blake DR, Symons MCR. Generation of nitric oxide by a nitrite reductase activity of xanthine oxidase: a potential pathway for nitric oxide formation in the absence of nitric oxide synthase activity. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;249:767-772.

7 Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. M. Kelm danke ich für die Überlassung des Themas, seiner ständigen Diskussionsbereitschaft, sowie die Möglichkeit, selbständiges wissenschaftliches Arbeiten zu erlernen. Für seinen unermüdlichen Einsatz und seiner uneingeschränkten Unterstützung bin ich ihm zu großem Dank verpflichtet. Seine fachliche Kompetenz und sein Engagement werden mir immer ein Vorbild sein.

Frau Dr. rer. nat. Petra Kleinbongard danke ich für die Einführung in das experimentelle Arbeiten. Mit ausdauerndem Wohlwollen hat sie geduldig manchen „Umweg“ toleriert, um mich immer wieder in selbstständigem Arbeiten zu bestärken.

Frau BTA Gabi Schoder danke ich für die durchgehende Unterstützung bei den Arbeiten im Kardiologischen Labor.

Herr Dr. med. Thomas Jax beeindruckte mich immer wieder durch seine Faszination für „die Forschung“. Ihm danke ich für seine stetige Diskussionsbereitschaft, seine wertvollen Ratschläge und seine fruchtbaren Ideen. Außerdem bin ich ihm für sein kritisches Korrekturlesen zu Dank verpflichtet.

Herrn Prof. Dr. med. P. Rösen danke ich sehr für seine tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit und die wertvollen Anregungen. Ich freue mich, dass er diese Arbeit auch abschließend als Korreferent betreut.

Frau MTA Simone Matern bin ich sehr zu Dank verpflichtet. Ohne ihren unermüdlichen Einsatz für das Kardiologische Labor wäre diese Arbeit kaum durchführbar gewesen.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinen Eltern und bei meinen Geschwistern bedanken. Ihr fester Glaube an mich und ihr familiärer Rückhalt sind mir in allen Lebenslagen eine unersetzliche Hilfe. Ihnen ist diese Arbeit in Liebe und Dankbarkeit gewidmet.

8 Lebenslauf

Name: Jens-Peter Volkmer
Geburtsdatum: 04.08.1976
Geburtsort: Düsseldorf
Staatsangehörigkeit: deutsch
Konfession: römisch-katholisch
Eltern: Dr. med. Hans-Peter Volkmer
Rosemarie Volkmer, geb. Rudolph

Schulbildung

1982-1986 Evangelische Grundschule Wuppertal
1986-1989 Ernst-Moritz-Arndt-Gymnasium Remscheid
1989-1992 Vinzenz-Pallotti-Kolleg Rheinbach
1992-1995 Gertrud Bäumer Gymnasium Remscheid mit
Erlangung der Allgemeinen Hochschulreife

Zivildienst

1996-1997 Johanniter Unfallhilfe Remscheid (Ausbildung
zum Rettungssanitäter)

Hochschulbildung

1995-1996 Studium der Wirtschaftswissenschaften an der
Ruhr Universität Bochum
10/1997 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der
Heinrich Heine-Universität Düsseldorf
03/2001 Ärztliche Vorprüfung
03/2003 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
09/2004 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
10/2005 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Beruflicher Werdegang

Seit 11/2005 Wissenschaftlicher Mitarbeiter der Klinik für
Urologie, Universitätsklinik Düsseldorf

Publikationen

Zitierfähiges Abstract

„NACHWEIS eNOS SPEZIFISCHER mRNA IN
BLUTZELLEN“

J.-P. Volkmer, P. Kleinbongard, A. Dejam, T.

Lauer, M. Kelm

VIII. NO-Forum 2002