

Aus der für Klinik für Unfall- und Handchirurgie der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Nicht-enzymatische Kupfer-Albumin induzierte NO-Freisetzung *in vitro*

Dissertation

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

vorgelegt von

Alexander Brodski

aus Düsseldorf (2017)

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

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Christoph V. Suschek

Zweitgutachter: Priv. Doz. Dr. med. Christian Heiß

Science never solves a problem without creating ten more.

George Bernard Shaw

Teile dieser Arbeit wurden publiziert:

Christian Opländer, Julian Rösner, Alexander Gombert, Alexander Brodski, Tatsiana Suvorava, Vera Grotheer, Ernst E. van Faassen, Klaus-Dietrich Kröncke, Georg Kojda, Joachim Windolf, and Christoph V. Suschek.

Redox-mediated mechanisms and biological responses of copper-catalyzed reduction of the nitrite ion *in vitro*.

Nitric Oxide, 35:152 - 164, 2013 [1].

Zusammenfassung

Während einer Ischämie kann anorganisches Nitrit durch Reaktion mit Häm-tragenden Proteinen oder Thiolgruppen-tragenden Enzymen zu NO reduziert werden. NO ist ein bekannter Regulator der Vasodilatation sowie ein protektives Molekül gegen oxidativen Stress-induzierte Gewebsschäden. Ein wichtiger Vorgang des Ischämie-induzierten oxidativen Stresses, Hypoxie und Azidose ist die Dissoziation von proteingebundenen Metallen, wie des Fe^{2+} oder Cu^{2+} . In Anwesenheit geeigneter körpereigener Antioxidantien bzw. Reduktionsmittel könnte hierbei insbesondere die Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^{1+} ein bis dato noch nicht untersuchten Cu^{1+} -abhängigen Mechanismus der nicht-enzymatischen NO-Generierung durch Reduktion von Nitrit darstellen.

Im Rahmen der hier vorgelegten Arbeit sollte der Mechanismus der Kupfer-Dissoziation von Albumin-Kupfer-Komplexen unter ischämischen Bedingungen *in vitro* evaluiert werden, sowie die Nitrit-reduzierende Kapazität von Antioxidantien und bivalentem freien Kupfer charakterisiert werden. Des Weiteren sollte die Hypothese überprüft werden, dass Albumin aufgrund seiner Fähigkeit, Kupfer zu binden, sowie der Präsenz einer stark reduzierenden Thiolgruppe, über eine Cu^{1+} -medierte Nitritreduktase-Aktivität verfügt.

Es konnte gezeigt werden, dass unter Ischämie-charakteristischen Bedingungen, wie erniedrigtem pH und oxidativem Stress, die Kupferbindungskapazität vom Serumalbumin stark abnimmt und in einer signifikanten Dissoziation von Kupfer in die Lösung resultiert. Während der Verlust der Kupferbindungskapazität im Fall eines erniedrigten pH nahezu vollständig reversibel war, führte oxidativer Stress zu einem irreversiblen Verlust der Kupferbindungsfähigkeit des Albumins. In Anwesenheit von physiologisch-relevanten Antioxidantien wie Ascorbat oder Glutathion wurde das nunmehr proteinungebundene, freie Cu^{2+} zu Cu^{1+} reduziert, welches als ein starker Reduktor des Nitrits zu einer starken und signifikanten nicht-enzymatischen Generierung von NO führte. Ein besonders wichtiges Ergebnis war zudem der Befund, dass unter physiologischen sowie pathophysiologischen Bedingungen Albumin selbst eine Nitritreduktase-Aktivität ausübt. Diese ist im wesentlichen Maße abhängig von der Präsenz einer reduzierten Thiolgruppe des Proteins, sowie der Bindung von Kupfer an seine spezifische Kupferbindungsstelle. Interessanterweise kann die Nitritreduktaseaktivität des Albumins durch Beladung des Moleküls mit exogen zugesetztem Cu^{2+} und gleichzeitiger Exposition mit Antioxidantien zusätzlich signifikant erhöht werden.

Die hier vorgestellten Daten zeigen erstmals, dass unter ischämischen Bedingungen Kupfer-tragende Proteine ihre Bindungsfähigkeit zu diesem Metall verlieren können und dass das resultierende freie Cu^{2+} in Anwesenheit von Antioxidantien ein Nitrit-reduzierendes Prinzip der biologisch relevanten nicht-enzymatischen NO-Generierung darstellen kann. Weiterhin können hier erstmals Hinweise darauf gegeben werden, dass Albumin über eine Kupfer-medierte Nitritreduktaseaktivität verfügt und analog zu Hämproteinen einen physiologisch relevanten NO-abhängigen Schutzmechanismus gegen Ischämie-induzierte Schäden darstellen könnte.

Summary

During ischemia, inorganic nitrite can be reduced by heme proteins or thiol-containing enzymes to form nitric oxide (NO). NO is a known modulator of vasodilatation and displays protective properties against oxidative stress related tissue damage. The dissociation of protein bound metals such as Fe^{2+} and Cu^{2+} is a crucial process during ischemia induced oxidative stress, hypoxia and acidosis. In presence of intrinsic antioxidants, Cu^{2+} can be reduced to Cu^{1+} . Under these circumstances, this process could represent a novel, Cu^{1+} -dependent mechanism of non-enzymatic nitrite reduction leading to significant NO formation.

This dissertation studied mechanisms of copper dissociation from copper-albumin-complexes under ischemic conditions *in vitro*. The nitrite-reducing capacity of antioxidants and divalent copper was also investigated. Furthermore, albumin's capacity to act as a nitrite reductase secondary to its copper-binding ability as well as its potent thiol group, was evaluated.

It was demonstrated, that under ischemic conditions such as acidic pH and oxidative stress, albumin's ability to bind copper declined significantly with consequent formation of free copper ions. While acidosis-induced decline was reversible, oxidative stress lead to a permanent loss of albumin's copper binding capability. In presence of physiological antioxidants (such as ascorbate and glutathione), free Cu^{2+} was reduced to Cu^{1+} , which itself demonstrated potent nitrite reducing properties. An important finding was the identification of albumin as a nitrite reductase under physiological and pathological conditions. Proposed mechanisms of this finding rely on the reducing capacity of albumin's thiol group as well as copper binding to its specific site. Interestingly, the nitrite reducing capacity was increased when albumin was loaded with exogenous copper and when additional antioxidants were provided.

The demonstrated data show for the first time, that copper-containing proteins lose their ability to bind copper if subjected to ischemic conditions. In presence of antioxidants, the dissociated Cu^{2+} -ions can reduce nitrite to form NO. Moreover, this novel research indicates that in analogy to heme proteins, albumin exhibits a copper-mediated nitrite-reductase-activity leading to a NO-dependent protection against ischemia induced damage.

Glossar

ACC	Acetylcystein
AO	Aldehydoxidase
ARDS	<i>Acute Respiratory Distress Syndrome</i>
Asc	Ascorbat
BNP	<i>Brain natriuretic peptide</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
ca.	circa
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
cGMP	Zyklisches Guanosinmonophosphat
CLD	Chemilumineszenz-Detektion
CO	Kohlenstoffmonoxid
Cu	Kupfer
DETC	<i>Diethyldithiocarbamate trihydrate</i>
DMT-1	Divalenter Metalltransporter 1
dt.	deutsch
EDRF	<i>Endothelium-derived relaxing factor</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
engl.	englisch
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
Fe	Eisen
GSH	Glutathion

HSA	Humanes Serumalbumin
ICP-MS	<i>Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry</i>
IMA	<i>Ischemia modified albumin</i>
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
kDa	Kilodalton
L-NAME	NG-nitro-L-Arginin-Methyl-Ester
MLCP	<i>Myosin light chain phosphorylase</i>
MWCO	<i>Molecular weight cut-off</i>
NADPH	Nicotinamidadeninukleotidphosphat
NDP	<i>3,3'-(1,4-naphthylidene) dipropionate</i>
NEM	N-Ethylmaleinimid
Neo	Neocuproin
nNOS	neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
NO₂[•]	Stickstoffdioxid
NO₂⁻	Nitrit
NO₃⁻	Nitrat
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
O₂	Sauerstoff
p-GC	<i>particulate gyanalate cyclase</i>
pAVK	Periphere arterielle Verschlusskrankheit
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PDE	Phosphodiesterase
PDMS	Polydimethylsiloxan

PKG	Proteinkinase G
ppb	<i>parts per billion</i>
RIPA	<i>Radioimmunoprecipitation assay</i>
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
s-GC	<i>soluble gyanalate cyclase</i>
SDS	<i>Sodium lauryl sulfat</i>
SIN-1	<i>3-Morpholinosydnonimine hydrochloride</i>
sog.	sogenannt
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
XOR	Xanthinoxidoreduktase

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Physiologische Rolle des Stickstoffmonoxids (NO)	1
1.2	Enzymatische Synthese von NO	2
1.3	Nicht-enzymatische Synthese von NO	3
1.3.1	Nitrit und Nitrat im menschlichen Körper	3
1.3.2	Nitrit als Quelle von NO	4
1.3.3	Proteine agieren als Nitritreduktasen	5
1.4	Biochemischer Wirkungsmechanismus des Stickstoffmonoxids . .	8
1.5	Reperfusionsschaden	9
1.6	Biochemie des Eisens <i>in vivo</i>	11
1.7	Biochemie des Kupfers <i>in vivo</i>	12
1.8	Humanes und bovines Serumalbumin	14
2	Ziele der Arbeit	16
3	Material und Methoden	18
3.1	Material	18
3.2	Methoden	21
3.2.1	Probenvorbereitung	22
3.2.2	Oxidativer Stress	24
3.2.3	Proteinquantifizierung	25
3.2.4	Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma . .	26
3.2.5	Photometrie	27
3.2.6	Chemolumineszenzdetektion	27
3.2.7	Software und Datenanalyse	29

4	Ergebnisse	30
4.1	BSA-Cu	30
4.2	Nitrit und Kupfer in wässriger Lösung	39
4.3	BSA, BSA-Cu und Nitrit	44
5	Diskussion	53
6	Schlussfolgerungen	66
7	Literatur	68
8	Anhang	84
9	Danksagung	85

1 Einleitung

1.1 Physiologische Rolle des Stickstoffmonoxids (NO)

Stickstoffmonoxid (NO) wurde in den letzten Jahrzehnten als ein zentraler Modulator der Durchblutungsregulation erkannt. In seiner Reinform ist es ein farb- und geruchloses Gas, welches *in vivo* nur flüchtig vorhanden ist. Die chemische Struktur des ursprünglich von Furchgott und Zawadzki im Jahr 1980 als *endothelium-derived relaxing factor* (EDRF) bezeichneten Moleküls [2] wurde 1998 als eine Verbindung aus lediglich zwei Atomen, nämlich als NO beschrieben [3]. Davor und danach konnte in zahlreichen Arbeiten seine physiologische Bedeutung nachgewiesen werden. Durch die lokale und systemische Vasodilatation und über eine zentrale Wirkung im Hirnstamm (s.u.) nimmt NO Einfluss auf den arteriellen Blutdruck [4]. NO wirkt aber auch bei vielen anderen Vorgängen mit, so spielt es unter anderem bei Immunprozessen, Tumorgenese und -therapie eine wichtige Rolle [5, 6]. Eine Übersicht über die wichtigsten Funktionen des NOs ist in der Tabelle 1 zusammengefasst [6, 7, 8, 9, 10].

Klinisch wurde NO seit langer Zeit in Form von organischen Nitraten zur Behandlung der Angina Pectoris angewendet [11]. Diese Verbindungen sind nicht mit anorganischem Nitrit und Nitrat als Quelle für NO gleichzusetzen. Insbesondere bei kardiovaskulären Erkrankungen, etwa der Herzinsuffizienz, werden organische Nitrate auch heute noch therapeutisch eingesetzt. Interessant ist pharmakologisch außerdem die Möglichkeit der Modulation des nachgeschalteten Signalwegs durch Phosphodiesterasehemmer. Diese Pharmazeutika führen zum verminderten Abbau von cGMP, welches als *second messenger* von NO agiert (s.u.). So kann die Wirkung des endogen entstandenen NOs verstärkt werden. Phosphodiesterasehemmer werden vor allem bei pulmonaler Hypertonie, Herzinsuffizienz, peripherer arterieller Verschlusskrankheit (pAVK) und zur Behandlung der erektilen Dysfunktion verwendet [12].

NO kann auch in seiner Reinform therapeutisch eingesetzt werden. Dabei wird es über eine Inhalation verabreicht. Diese Art der Anwendung wurde bei *Acute Respiratory Distress Syndrome* (ARDS), pulmonaler Hypertonie, Sichelzellanämie

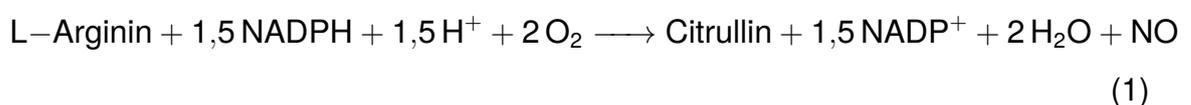
System	Funktion
Zentrales Nervensystem	Modulation der Transmitterfreisetzung, synaptische Plastizität
Kardiovaskuläres System	Vasodilatation, Thrombozytenaggregationshemmung, antioxidative und antiischämische Wirkung
Immunsystem	Antibakterielle und antitumoröse Aktivität, entzündungshemmende Wirkung
Gastrointestinaltrakt	Schleimhautprotektion, Verminderung der Magensäuresynthese
Tumorgenese	DNA-Modifizierung, Angiogenese, Metastasierung, Apoptose, invasives Wachstum

Tabelle 1: Übersicht über die Funktionen des Stickstoffmonoxids unter physiologischen und pathologischen Bedingungen.

und nach Lungentransplantation durchgeführt, allerdings nicht immer mit Erfolg [13]. Aktuell wird diese Art der Therapie bei akuter Hypoxämie und bei pulmonaler Hypertonie als potentiell nützlich angesehen.

1.2 Enzymatische Synthese von NO

Die Familie der Stickstoffmonoxid-Synthasen (NOS) besteht aus mindestens drei Vertretern: neuronale (nNOS), induzierbare (iNOS) und endotheliale (eNOS) NO-Synthase. Sie alle synthetisieren aus der Aminosäure L-Arginin, Sauerstoff (O₂) und Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH) die Aminosäure Citrullin und NO bzw. NO⁻ [14] (siehe (1)).



Zur Aktivierung der NOS-Enzyme wird Calmodulin benötigt [15], wobei die Elektronen für diese Reaktion von NADPH zur Verfügung gestellt werden. Arginin ist ein Zwischenprodukt des Harnstoffzyklus und ein zentrales Molekül dieses Signalweges. Vor einiger Zeit ist bestätigt worden, dass orale Argininsubstitution den Blutdruck senken kann [16], obwohl noch nicht gänzlich geklärt ist, ob eine Erhöhung der Substratmenge für die NOS-Enzyme hierfür direkt verantwortlich ist. Dafür spricht die Tatsache, dass ein NO-Mangel mit erhöhten arteriellen Blutdruck einhergehen kann [17] und dass eine NOS-Blockade ebenfalls zum Hypertonus führt. Eine weitere Komponente wird durch die Wirkung des NOs im Hirnstamm erzeugt, welche die sympathomimetische Aktivität und somit den Blutdruck zentral mitregelt. So konnte die blutdrucksteigernde Wirkung von kompetitiven NOS-Hemmer NG-nitro-L-Arginin-Methyl-Ester (L-NAME) sowohl durch eine Arginingabe (Substrat der NOS), als auch durch eine alpha-adrenerge Blockade mit Phentolamin (ein Inhibitor des sympathomimetischen Signalweges) abgeschwächt werden [18]. Eine gänzliche Unterbindung der NO-Bildung gelang mit L-NAME jedoch nicht, sodass ein koexistierender enzymunabhängiger Weg für die NO-Generierung angenommen werden muss [19].

1.3 Nicht-enzymatische Synthese von NO

1.3.1 Nitrit und Nitrat im menschlichen Körper

Nitrat (NO_3^-) und Nitrit (NO_2^-) entstehen im Körper auf zwei Wegen: durch Oxidation des durch Stickstoffmonoxid-Synthasen (NOS) synthetisierten NOs, sowie durch Nahrungsaufnahme. NO wird im Plasma u.a. durch Ceruloplasmin zu Nitrit oxidiert [20], während NO mit Oxyhämoglobin zu Nitrat und Methämoglobin reagiert [21]. Nitrat wird außerdem über die Nahrung aufgenommen und in den Speicheldrüsen durch fakultativ anaerobe Bakterien zu Nitrit reduziert [22]. Wenn Nitrit mit dem Speichel ins saure Milieu des Magens gerät, wird es zur salpetrigen Säure (HNO_2) protoniert, welche ihrerseits zu NO und weiteren Nebenprodukten zerfällt. Das entstandene NO trägt zur Regulation der Magenschleimhautdurchblutung bei. So war in einer Studie der NO-Spiegel bei intubierten Patienten deut-

lich erniedrigt, erholte sich jedoch rasch nach Zufuhr von Nitrit direkt in den Magen [23]. Es wird vermutet, dass dieser Pathomechanismus für die Entstehung eines sogenannten Stressulkus bei kritisch kranken Patienten mitverantwortlich ist.

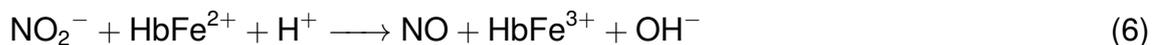
1.3.2 Nitrit als Quelle von NO

Die Forschung über die Synthese des NO-Moleküls hatte sich zunächst primär auf die NO-Synthasen konzentriert. In den letzten Jahren wurden allerdings zunehmend auch alternative Entstehungswege beschrieben. Hierbei ist das System aus Nitrat, Nitrit und NO vom großen Interesse. Nitrit kann insbesondere im sauren Milieu zu NO reduziert werden (beispielhaft dargestellt in Gleichung (2), (3), (4), (5), nach [24]), obwohl auch andere Wege diskutiert werden. Bei hypoxischen und azidotischen Bedingungen (Ischämie) gewinnen diese Signalwege vermehrt an Bedeutung, während die NOS-Enzyme unter diesen Umständen an Aktivität verlieren. Diese Mechanismen spielen z.B. bei der *reperfusion injury* (s.u.) des Herzens eine Rolle: so konnte die Inhibition der NOS-Enzyme durch L-NAME die NO-Freisetzung nicht gänzlich unterbinden, und durch die Markierung des Nitrits konnte die Herkunft des NO aus ebendieser Quelle im Ischämiemodell des Herzens belegt werden [25]. Ein weiterer Hinweis dafür ist die Tatsache, dass signifikante Gefälle zwischen arteriellen und venösen Nitritkonzentrationen besteht, was einen Verbrauch des Nitrits im Kapillarbett nahelegt [26]. Somit kann die Reduktion von Nitrit zu NO als Teil der physiologischen Antwort auf Hypoxämie und Ischämie angesehen werden, welche eine Anpassung der Durchblutung und der Zellatmung darstellt [1, 27, 28]. Während NO eine relativ kurze Halbwertszeit besitzt (0,05 - 1 s), ist Nitrit deutlich länger im Plasma vorhanden (110 s) [29] und dient somit als ein NO-Speicher, der bei ischämischen Bedingungen vermehrt NO zur Verfügung stellen kann [30], was auch durch weitere Untersuchungen zum Reperfusionsschaden am Myokard belegt werden konnte [31]. Die molekularen Mechanismen der NO-Entstehung aus Nitrit sind weiterhin Gegenstand aktueller Forschung und werden weiter unten ausführlicher dargestellt.



1.3.3 Proteine agieren als Nitritreduktasen

Noch bevor die Rolle des NOs als Vasodilatator bekannt war, haben Brooks (1937) und später Doyle *et al.* (1981) seine Entstehung aus Nitrit durch Desoxyhämoglobin beschrieben [32, 33]. Unter anderem wurde vermutet, dass Eisen durch den Wechsel der Oxidationsstufe von Fe^{2+} zu Fe^{3+} Nitrit reduziert und selbst zu Methämoglobin oxidiert wird, was bei niedrigem pH-Wert begünstigt wird. Diese Reaktion ist beispielhaft in der Reaktionsgleichung (6) nach [34] dargestellt. In den zahlreichen Arbeiten, welche Gladwin *et al.* dazu publiziert haben, konnte außerdem gezeigt werden, dass Oxyhämoglobin Nitrit zu Nitrat oxidieren kann [35]. Hämoglobin könnte somit als eine Art molekularer Sensor betrachtet werden: Im Falle einer Ischämie kommt es durch den verminderten O_2 -Partialdruck zunächst zur vermehrten Bildung des Desoxyhämoglobins. Durch die einhergehende Hämolyse kann Desoxyhämoglobin ins Plasma gelangen, wo es Nitrit zu NO umsetzen und eine vasodilatierende, also protektive, Wirkung ausüben kann.



Dasselbe Prinzip scheint für Myoglobin zu gelten, welches am Herzen bei physiologischen Bedingungen NO abfängt, bei ischämischen Bedingungen jedoch NO bereitstellt [36].

Auch weitere Proteine sind in diesem Zusammenhang als Nitritreduktoren *in vivo* erkannt worden [37]. So haben Zweier *et al.* eine nitritreduzierende Wirkung von

Xanthinoxidoreduktase (XOR) und Aldehydoxidase (AO) beschrieben [38]. Diese sind molybdänhaltige Enzyme. Die XOR ist bereits früher eingehend untersucht worden [39]. Dabei konnte festgestellt werden, dass ihre nitritreduzierende Wirkung durch einen sauren pH-Wert gesteigert und durch die Blockierung des Molybdäns herabgesetzt werden konnte. Auch an diesem Beispiel kann die zentrale Rolle der Metallionen bei der durch Proteine getriggerten Reduktion von Nitrit zu NO demonstriert werden. Andere Proteine, die mit Nitritreduktion in Verbindung gebracht wurden sind unter anderem auch Cytochrom P450-Proteine, welche als Hämproteine ebenfalls Metallionen besitzen.

Da Hämoglobin primär im Erythrozyten vorkommt und nur unter bestimmten Bedingungen in relevanten Mengen im Plasma vorzufinden ist, sind diese Zusammenhänge in erster Linie auf der Ebene eines Erythrozyten untersucht worden. Ein Schema aus [40] (ursprünglich aus [41]) fasst für diese Arbeit relevante Untersuchungsergebnisse zusammen (Abbildung 1).

Allen diesen Enzymen ist gemein, dass sie Metallionen besitzen, welche durch den Wechsel ihrer Oxidationsstufe einen Elektron zur Reduktion von Nitrit zu NO bereitstellen können. Insbesondere ist das Eisenatom des Hämoglobins in diesem Zusammenhang als eine Elektronenquelle vermutet worden. Obwohl dieses System in erster Linie im Erythrozyten eine wichtige Rolle spielt, können Hämoglobin und andere Proteine bei einer ischämiebedingten Hämolyse oder durch andere Prozesse ins Plasma gelangen und dort ebenfalls ihre Wirkung entfalten.

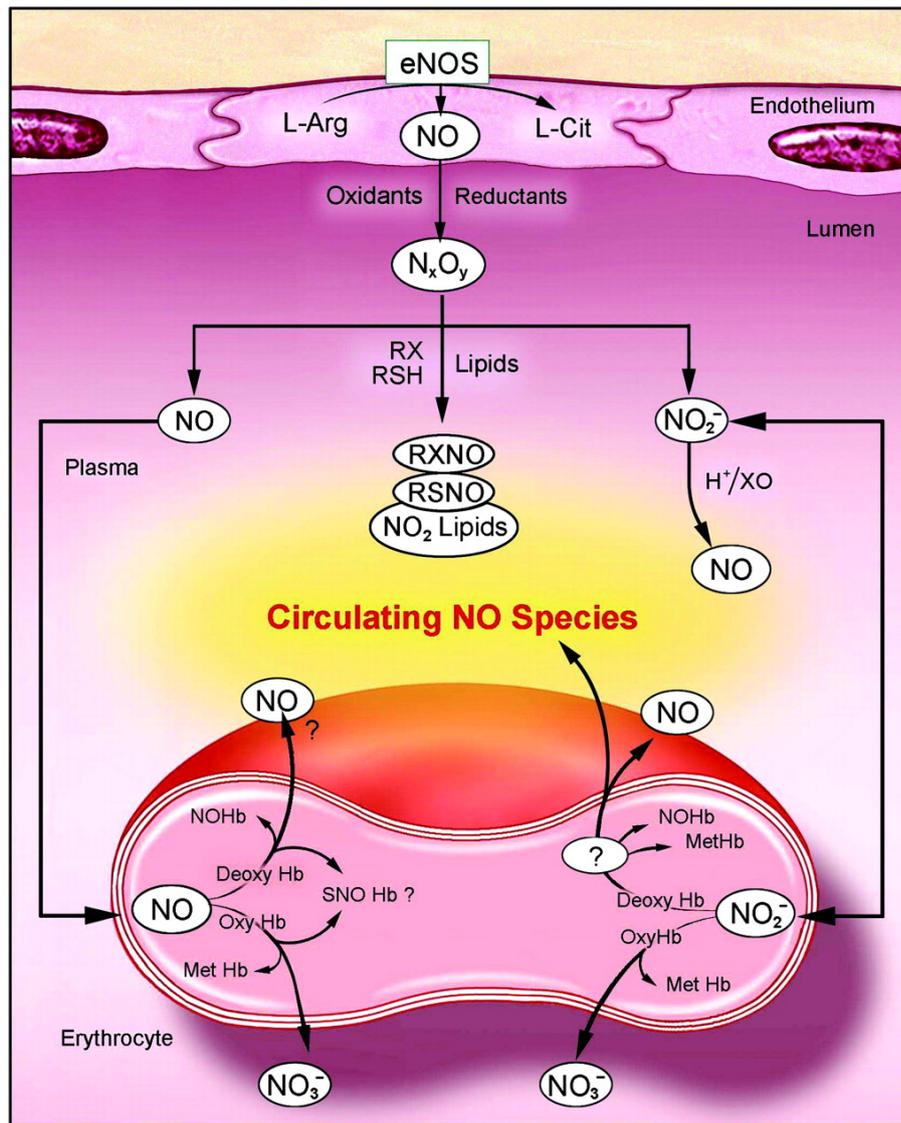


Abbildung 1: Übersicht über die Redoxreaktionen, die zur Entstehung von NO und Nitrit im Erythrozyten, im Plasma und im Endothel beitragen aus [40] (ursprünglich aus [41]). NO, welches durch die eNOS hergestellt wird, kann sowohl zu glatten Muskeln, als auch ins Gefäßlumen diffundieren. Es kann in Erythrozyten gelangen und dort durch Oxyhämoglobin zum Nitrat oxidiert werden. Zum kleinen Teil können auch andere nitrosierte Spezies und Nitrit entstehen, welche als NO-Speicher dienen können. Nitrit kann seinerseits in Erythrozyten diffundieren und dort von Desoxyhämoglobin zu NO reduziert werden, sodass Methämoglobin und andere Beiprodukte entstehen. NO kann seinerseits im Erythrozyten verbleiben oder wieder heraus diffundieren. "?" stellt die möglichen Zwischenmetabolite der Nitritbioaktivierung dar (Oxy-Hb - Oxyhämoglobin, NO_3^- - Nitrat, $RXNO$ - nitrosulierte Spezies, $RSNO$ - Nitrosothiols, NO_2 lipids - nitrierte Lipide, NO_2^- - Nitrit, Deoxy-Hb - Desoxyhämoglobin, Met-Hb - Methämoglobin, SNO-Hb - Nitroso-Hämoglobin, eNOS: endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase, L-Arg - L-Arginin, L-Cit - L-Citrullin, N_xO_y - höhere N-oxide oder NO).

1.4 Biochemischer Wirkungsmechanismus des Stickstoffmonoxids

Der für die Vasodilatation wichtigster *second messenger* des NOs ist das zyklische Guanosinmonophosphat (cGMP), obwohl es auch Hinweise für andere Signalwege gibt [42]. Das cGMP-Molekül wurde zuerst im Jahr 1963 beschrieben [43]; die Bedeutung dieses sekundären Botenstoffes wurde allerdings erst in den 1970er Jahren verstanden. cGMP scheint für die Relaxation der glatten Muskelzellen noch wichtiger als zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) zu sein [44]. Es entsteht durch das Enzym lösliche Guanylatzyklase (engl. *soluble guanylate cyclase*, s-GC) und wird durch zyklische Nukleotid-Phosphodiesterasen (engl. *cyclic nucleotide phosphodiesterases*, PDE) abgebaut. Nachdem NO in die Zielzelle diffundiert, aktiviert es durch die Reaktion mit der Häm-Gruppe die s-GC, sodass der cGMP-Spiegel steigt [44]. Neben NO kann noch Kohlenstoffmonoxid (CO) diese Signalkaskade auslösen und zu erhöhten cGMP-Spiegeln führen. Auf einem anderen Weg kann cGMP über die Aktivierung membranständiger *particulate guanylate cyclases* (p-GC) hergestellt werden, welche als Rezeptoren für die Familie der natriuretischen Peptide (engl. *natriuretic peptide family*) wie z.B. das *brain natriuretic peptide* (BNP) dienen [45]. Dies erscheint insofern logisch, als die physiologische Rolle dieser Proteine, welche bei vermehrter Anstrengung des Herzmuskels ausgeschüttet werden, die Blutdrucksenkung ist [46].

Das molekulare Ziel des cGMPs ist eine Reihe von intrazellulären Proteinen, von denen die Aktivierung der Proteinkinase G (PKG) für die Relaxation der glatten Muskulatur den wichtigsten Signalweg darstellt. Daneben sind zwei weitere Wege bekannt, deren Rolle für die Relaxation der glatten Muskulatur noch nicht etabliert ist: Aktivierung der cGMP-abhängige Ionenkanäle sowie der cGMP-bindenden Phosphodiesterasen [44]. Die aktivierte PKG phosphoryliert Proteine, welche über verschiedene Wege die zytosolische Calciumkonzentration senken und die Sensitivität für Calcium herabsetzen. Dadurch wird die *myosin light chain phosphorylase* (MLCP) aktiviert, was zur Dephosphorylierung des Myosins und damit zur Relaxation führt [47].

1.5 Reperfusionsschaden

Gewebe sind auf hinreichende Versorgung mit Sauerstoff angewiesen. *In vivo* ist dafür eine Oxygenierung des Blutes und dessen Transport in die Peripherie notwendig. Ist einer dieser Vorgänge gestört, so resultieren Gewebsschäden (anoxischer Schaden). Bei rechtzeitiger Wiederherstellung der Versorgung können die Zellen sich wieder erholen. Wird in einem nicht durchbluteten Gewebe die Perfusion wiederhergestellt, so kann es den gänzlichen Untergang dieses Zellverbandes (Nekrose) verhindern, führt jedoch paradoxerweise zu einer erneuten Verletzung des bereits angegriffenen Gewebes (Reperusionsphase) - man spricht in diesem Fall von sog. Reperfusionsschaden (engl. *reperfusion injury*). Unter Umständen kann dieser Schaden so erheblich sein, dass er die Nekrose auslöst bzw. beschleunigt. Reperfusionsschaden ist also durch eine Verletzung sowohl durch die Unterbrechung der Versorgung, als auch durch die Wiederherstellung ebendieser gekennzeichnet [48].

Klinische Beispiele des Reperfusionsschadens sind vielfältig. Jeder arterielle Verschluss (z.B. ein Herzinfarkt) oder auf einem anderen Wege auftretende kritische Perfusionsminderung führen zunächst zur Ischämie. Auch eine traumatische Einwirkung kann zum Reperfusionsschaden führen, wie z.B. bei einem Tourniquet Syndrom. Dabei wird durch ein Trauma die Durchblutung einer Extremität unterbrochen. Im Rahmen der ärztlichen Versorgung wird das ischämische Gebiet revascularisiert, wodurch es zum Reperfusionsschaden kommt.

In der anoxischen Phase sinkt durch die verminderte oxidative Phosphorylierung der ATP-Gehalt ab. Dies führt über die Steigerung der Glykolyse zur vermehrten Laktatbildung und auch über mögliche Zerstörung der Lysosomen zur Erhöhung der H^+ -Konzentration und damit zur Absenkung des pH-Wertes [49]. Die niedrige ATP-Konzentration führt außerdem zur verminderten Aktivität der Na^+/K^+ -ATPase, wodurch Na^+ sich vermehrt in den Zellen anreichert und zu einer Zellschwellung führt [50]. Diese und andere Mechanismen führen zur Steigerung der Membranpermeabilität und letztlich zum Untergang der Zellen. Die intrazelluläre Bestandteile gelangen so ins Interstitium: im Falle der Erythrozyten führt ihr Zelltod (Hämolyse) zur Freisetzung der intrazellulären Ionen und Proteine ins Plasma.

In der Reperfusionphase wird die Versorgung des ischämischen Gewebe wiederhergestellt. Experimentelle Studien haben gezeigt, dass Reperfusion die Entwicklung der Nekrose unter Umständen beschleunigen kann [51]. Dies ist wahrscheinlich der entzündlichen Antwort geschuldet, die durch die Wiederherstellung der Durchblutung resultiert und durch Zelltrümmer ausgelöst werden kann [48]. Auch ist es denkbar, dass die mit der Reperfusion einhergehende initiale pH-Wert-Absenkung [52] die Nekrose fördert.

Die Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) ist ein weiterer zentraler Vorgang, der sowohl während der anoxischen Phase, als auch bei der Reperfusionphase zum Tragen kommt [53]. ROS bilden von Sauerstoff abgeleitete Radikale, welche instabil und in höchstem Maße reaktionsfreudig sind. Sie selbst sind primär durch die veränderte Lipidmembranen, Proteine und andere Moleküle entdeckt worden, welche durch die Reaktion mit ihnen entstanden sind [54, 55, 56]. Durch das Abfangen der ROS konnte in Studien der Reperfusionsschaden vermindert werden, während durch ihre künstliche Erzeugung er wiederum simuliert werden konnte [53]. In diesem Zusammenhang spielt auch das NO eine wichtige Rolle. Es vermag nicht nur ROS abzufangen, sondern auch durch Veränderung der Genexpression gegenüber bei oxidativem Stress protektiv zu wirken [57]. NO ist außerdem ein potenter Inhibitor der Lipidperoxidation [58] und wirkt daher auch auf diesem Weg zytoprotektiv [59].

Reperfusionsschaden führt jedoch nicht nur zur Nekrose, sondern auch zur Apoptose, welche durch die Reperfusion nochmals gesteigert wird [60]. Hierfür wird unter Anderem die Wiederverfügbarkeit von Energieressourcen diskutiert, welche für den Apoptosevorgang notwendig sind. Der vermutete Anteil der Apoptose versus Nekrose an Zelltod variiert in der Literatur relativ stark, was unter anderem an verschiedenen Assays liegen könnte, welche zur Quantifizierung der beiden Phänomene benutzt worden sind [60]. In einer Studie an Rattenherzen war Apoptose schon während der ischämischen Phase die wichtigste Ursache für den Zelltod [61], während in einer anderen Studie an Kaninchenherzen die Apoptose primär für die Reperfusionphase kennzeichnend war [62]. Allgemein gilt die Apoptose jedoch als ein für den Reperfusionsschaden typischer Pathomechanismus. Obwohl naheliegend, hat sich die Unterbindung des Apoptosestoffwechsels klinisch

nicht als eine nützliche Behandlungsstrategie erwiesen [63].

Eine wichtige Rolle im Zusammenhang mit Reperfusionsschaden und Apoptose kommt auch dem NO zu. Es kann unter diesen Bedingungen sowohl Apoptose induzieren, als auch protektiv wirken [60]. Ein apoptosefördernder Effekt des NOs ist auf isolierte Zellen gezeigt worden [64, 65]. Auf der anderen Seite gibt es starke Evidenz, dass NO eine protektive Rolle spielt. In der Haut vermag es gegen UVA-Licht zu schützen [66]. Rakhit *et al.* fanden in ihrer Untersuchung, dass eine Vorbehandlung mit einem NO-Donor Kardiomyozyten vor Reperfusionsschaden schützt [67]. Auch in anderen Studien wurde ein protektiver Effekt beschrieben [68], welcher mit der Aktivität der eNOS korrelierte [69]. Weitere Hinweise für den protektiven Effekt des NOs kommen von pharmakologischen Studien mit Statinen, welche ebenfalls die eNOS aktivieren und vor Reperfusionsschaden schützen [70, 71, 72]. Dieser Effekt war von der Hemmung der HMG-CoA-Reduktase und den damit einhergehenden niedrigeren Cholesterinspiegeln unabhängig. Insgesamt ist daher, trotz der zum Teil widersprüchlichen Studienergebnisse, ein NO-abhängiger Schutz gegen Apoptose und gegen den Reperfusionsschaden im Ganzen gut belegt.

1.6 Biochemie des Eisens *in vivo*

Eisen spielt in der menschlichen Physiologie eine zentrale Rolle. Insgesamt besitzt ein gesunder Erwachsener eine Eisenmasse zwischen 1,5 und 6 g [73]. Circa 75% davon sind allein in den Erythrozyten und in ihren Vorstufen zu finden, wo Fe^{2+} als Teil des Hämoglobinmoleküls den Transport von Sauerstoff aus der Lunge in die Peripherie gewährleistet. Etwa 600 mg des Gesamteisens befinden sich in den Makrophagen, 300 mg im Myoglobin der Muskulatur und etwa 1 g ist in der Leber gespeichert. Pro Tag wird ca. 1 mg Eisen im Duodenum aufgenommen, wobei Eisen dafür als Fe^{2+} vorliegen muss. Die Aufnahme erfolgt über den divalenten Metalltransporter (DMT-1), welcher neben Eisen auch andere divalente Ionen transportiert, so z.B. auch das Kupferion. Im Blut wird Eisen an Transferrin gebunden transportiert und in den Geweben in seinem Speicherprotein - Ferritin - gespeichert [74, 75, 76]. Außer im Hämoglobin bildet Eisen auch in den Proteinen

der Atmungskette und anderen Cytochromen das zentrale Atom, wo es durch den Wechsel der Valenz an Redoxreaktionen beteiligt ist.

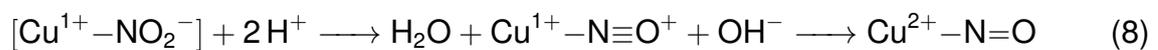
Es erscheint daher plausibel, dass Hämoglobin in der Lage ist, Nitrit zu NO zu reduzieren, während es selbst zu Methämoglobin oxidiert. Diese Reaktion ist von Brooks bereits 1937 beschrieben worden. Ihre Bedeutung, der aktuelle Stand der Forschung und die damit verbundene Fragestellungen werden in 1.3.3 detailliert erläutert.

1.7 Biochemie des Kupfers *in vivo*

Kupfer (lat. *cuprum* abgeleitet von *aer cyprum* - dt. etwa "das Erz Zyperns") spielt in der menschlichen Physiologie eine wichtige Rolle. So ist Kupfer im Reaktionszentrum vieler Enzyme zu finden und katalysiert dort durch den Wechsel der Oxidationsstufen (Cu^{2+} und Cu^{1+}) die für die Eukaryoten grundlegende biochemische Redoxreaktionen [77]. Kupferionen sind an oxidativer Phosphorylierung (Cytochrom-Oxidase), Umwandlung von reaktiven Sauerstoffspezies (Superoxid-dismutase) und vielen anderen Prozessen beteiligt. Die Gesamtkupferkonzentration im Blut liegt bei Gesunden im Bereich 10 - 22 μM [78]. Bei der Kupferspeicherkrankheit (Morbus Wilson) können Kupferionen wegen einer Mutation des hepatischen Kupfertransportproteins ATP7B nicht in ihr Speicher- und Transportprotein (Ceruloplasmin) eingeschleust werden, auch die Kupferausscheidung über die Galle ist durch diesen Defekt vermindert. Es kommt zur Einlagerung des Kupfers in den Hepatozyten, welche durch ihren Untergang Kupferionen in die Blutbahn abgeben [79]. Da die Konzentration des Ceruloplasmins im Blut bei Morbus Wilson erniedrigt ist, bindet Kupfer vermehrt an Albumin und an andere kleine Peptide (engl. *loosely bound copper* oder *nonceruloplasmin bound copper*). Obwohl die Gesamtkupferkonzentration durch das fehlende Ceruloplasmin paradoxerweise erniedrigt ist, kommt es durch den erhöhten Anteil des *nonceruloplasmin bound copper* zur Einlagerung von freien Kupferionen im Gehirn und in anderen Geweben und letztlich zum typischen klinischen Bild dieser Erkrankung [80].

Die Fähigkeit des Kupfers, Nitrit zu NO zu reduzieren, ist bekannt. So ist die Redoxreaktion am Kupferatom der kupferhaltigen Nitritreduktasen, (engl. *copper*

containing nitrite reductases) für diese Reaktion verantwortlich. Dadurch können Bakterien mit diesen Enzymen entscheidend zur Denitrifikation der Umgebung beitragen [81]. Aber auch frei in einer Lösung vorliegendes Kupfer kann Nitrit zu NO reduzieren, was unter anderem auch durch Burg *et al.* demonstriert wurde [82] (siehe Reaktionsgleichungen (7) bis (10) nach [1]). Es ist von großem Interesse, in welchen anderen Konstellationen Kupfer sowohl *in vitro*, als auch *in vivo*, Nitrit zu NO umsetzen kann.



Transport des Kupfers im Blut Kupfer wird mit der Nahrung aufgenommen und im Magen und Dünndarm absorbiert [83]. Der Transport erfolgt durch die P-Typ ATPase (ATP7A), danach wird Kupfer in das Pfortaderblut sezerniert. Da Kupfer in seiner freien Form oxidative Reaktionen katalysiert [84], liegt es unter physiologischen Bedingungen im Plasma nicht frei vor, sondern wird von verschiedenen Proteinen gebunden und transportiert. In der Pfortader bindet Kupfer unspezifisch an Albumin und Aminosäuren und wird zum Großteil in der Leber aufgenommen. Dort wird es in das Kupfertransportprotein Ceruloplasmin inkorporiert, welches Kupfer in die Peripherie bringt. Nach Bindung an seinen Rezeptor werden Kupferionen vom Ceruloplasmin in die Zelle geschleust. Kupferausscheidung geschieht zu etwa 50% über die Galle, wobei der Rest über andere Wege im gastrointestinalen System sezerniert wird. Auch dabei spielt das Transportprotein ATP7A eine entscheidende Rolle [75]. Während bei Morbus Wilson wegen des defekten ATP7B-Transporters unter anderem das Beladen des Ceruloplasmins mit Kupfer misslingt, ist bei Morbus Menke der ATP7A-Transporter funktionsuntüchtig, so dass Kupfer im Gastrointestinaltrakt nicht resorbiert wird und ein Kupfermangel

entsteht [85]. Diese Erkrankung hat einen gravierenden Verlauf. Sie präsentiert sich oft in früher Kindheit und ist unter anderem durch progressive neurologische Symptome gekennzeichnet [75].

1.8 Humanes und bovines Serumalbumin

Bovines Serumalbumin (BSA) ist ein einfach verfügbares Protein, welches bei Versuchen *in vitro* routinemäßig als Versuchsmodell für das humane Serumalbumin (HSA) genommen wird. Albumin ist bei den Wirbeltieren das Protein mit der höchsten Blutplasmakonzentration. Das BSA stimmt in seiner Struktur zu 76% mit HSA überein, seine Molekularmasse beträgt 66,4 kDA. Es besteht aus 583 Aminosäuren und besitzt 17 Cysteinreste, welche 8 Disulfidbrücken und eine freie Thiolgruppe bilden. Im Gegensatz zu BSA mit zwei Tryptophanresten, besitzt HSA nur einen Tryptophanrest [86]. Dieser Tryptophanrest, genauso wie die Thiolgruppe sind an der Interaktion des Albumins mit NO beteiligt [87]. Strukturell ähnelt BSA einem Herzen (*heart-shaped molecule*) und hat drei homologe Domänen, welche durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Die Sekundärstruktur ist zu 74% eine α -Helix (nach [88, 89]).

Albumin hat in der N-terminalen Region (Aspartyl-Alanyl-Histidyl-Lysin-Sequenz [90]) eine spezifische Bindungsstelle für Kupfer [91]. In einer Studie ist jedoch eine deutlich höhere Affinität für ein zweites Kupferatom beschrieben worden, als für das dritte oder vierte. Falls dies zuträfe, würde es das Vorhandensein von zwei spezifischen Bindungsstellen bedeuten [92]. Das Bindungsverhalten weiterer Kupferatome gilt als unspezifisch. Neben Ceruloplasmin ist Albumin ein wichtiges Protein, welches Kupfer *in vivo* transportiert [93]. Durch Bindung an das Albumin wird oxidativer Stress, welcher von freien Kupferatomen (und anderen reaktiven Spezies) ausgeht, verhindert [94]. Insgesamt ist es belegt, dass Albumin das Molekül mit der höchsten anti-oxidativen Wirkung des menschlichen Plasmas darstellt; außerdem zeigt es pseudo-enzymatische Eigenschaften [95]. Das durch Ischämie veränderte Albumin (engl. *ischemia modified albumin*, IMA) könnte jedoch ein Teil der antioxidativen Wirkung verlieren, da die N-Terminale Region, welche Metalle - unter anderem auch Kupfer - transportiert, durch die Sauerstoff-

radikale geschädigt wird [96]. Die Umgebung wird in so einer Situation vermehrt mit freien Kupferatomen belastet.

BSA ist aber auch selbst Ziel des NO-Moleküls. So reagiert das NO-Radikal mit dem Thiol-Rest des Albumins (dem Thiol mit der höchsten Konzentration des Menschen, etwa 0,5 mM) zu S-NO-BSA [97]. Dieser Rest wird als eine Art NO-Speicher angesehen, da eine Infusion von S-NO-Albumin in Studien zur Vasodilatation und Verbesserung der Perfusion geführt hat [98].

2 Ziele der Arbeit

Die Entdeckung des Nitrits als eine neuartige Quelle der nicht-enzymatischen Generierung von NO als Folge einer Ischämie-, Hypoxie- oder Azidose-induzierten Nitritreduktaseaktivität bekannter Hämproteine hat erst kürzlich ein neues Forschungsgebiet der kardiovaskulären Pathophysiologie entstehen lassen. Das in [1] beschriebene Kupfer-abhängige Prinzip der nicht-enzymatischen NO-Generierung aus Nitrit stellte in diesem Forschungsfeld einen bislang unbekannt, innovativen und höchst relevanten Aspekt dar. Das Ziel dieser Promotionschrift war die Charakterisierung physiologisch-relevanter Mechanismen der Cu^{2+} -Dissoziation und -Reduktion sowie der durch Cu^{1+} -induzierten Nitritreduktion als Folge einer experimentell gesetzten Ischämie und Hypoxie *in vitro*, aber auch bei physiologischen Versuchsbedingungen. Die Rolle des Albumins, welches bei Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^{1+} beteiligt sein könnte, wurde anhand eines Modellproteins, des bovinen Serumalbumins (BSA), welches Kupfer binden und transportieren kann, untersucht.

Diese Arbeit ist klinisch relevant, weil ein pathophysiologisches Verständnis der bei Hypo- und Normoxie wirkenden protektiven Mechanismen im Gefäßbett bei vielen klinischen Fragestellungen notwendig ist. So könnte zum Beispiel die Etablierung neuer auf anorganischem Nitrit basierender Therapieformen Ischämie-bedingter kardiovaskulärer Erkrankungen einen enormen klinisch-therapeutischen Nutzen für den Patienten beinhalten. Das Verständnis der Nitritreduktaseaktivität des Albumins könnte insofern verändert werden, als Kupfer (in physiologischen Konzentrationen aber auch im Sinne einer Kontamination) der eigentliche zentrale Vermittler der NO-Freisetzung durch Albumin sein könnte. Eine graphische Darstellung der vermuteten Vorgänge ist in der Abbildung 2 gezeigt.

3 Material und Methoden

3.1 Material

Reagenzien		
Substanz	Hersteller	Artikelnummer
Albumin Standard (Pierce™ BCA Protein Assay Kit)	Thermo Scientific, USA	23225
Antifoam SE-15	Sigma-Aldrich, Deisenhofen	A8582
Bengal Rose	Sigma-Aldrich, Deisenhofen	330000
Bovines Serumalbumin (BSA)	PAA, Freiburg	K45-001
Eisenchlorid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen	372870
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	Sigma, Deisenhofen	E-5134
GIBCO Distilled Water	Invitrogen, USA	10977-035
Glutathion (GSH)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen	G4251
Humanserumalbumin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen	A1887
Kupfer (I)-Chlorid (CuCl)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen	229628
Kupfer (II)-sulfat wasserfrei (CuSO ₄)	Merck, Darmstadt	102791
L-Ascorbic acid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen	A4544
3,3'-(1,4-naphthylidene) Dipropionat (NDP)	Santa Cruz Biotechnology, USA	sc-222050

3-Morpholinosydnonimine Hydrochlorid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen	M5793
Natriumchlorid	VWR, USA	27808.366
Natriumdeoxycholat	Sigma-Aldrich, Deisenhofen	30970
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Schweiz	0183.1
Neocuproine (Neo), (2,9-Dimethyl-1,10-Phenanthrolin)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen	N1501
Nonoxinol 40	USBiological, USA	9016-45-9
N-Ethylmaleimide (NEM)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen	E3876
PBS Dulbecco ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺ (<i>phosphate buffered saline</i>)	Biochrom, Berlin	L 1825
Peroxyinitrit	Sigma-Aldrich, Deisenhofen	20-107
Pierce™ BCA Protein Assay Kit Reagent A	Thermo Scientific, USA	23225
Pierce™ BCA Protein Assay Kit Reagent B	Thermo Scientific, USA	23225
Rhodium(III) sulfat Lösung	Sigma-Aldrich, Deisenhofen	398349
Salpetersäure (65%, suprapur)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen	V001612
Sodium diethyldithiocarbamate trihydrate (DETC)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen	D3506
Sodium Nitrite (Ni)	VWR, USA	27960.236
Sodium Nitrate	VWR, USA	27955.238
Stickstoffgas	Linde, München	
Trishydroxymethylaminomethan (TRIS)	Roth, Schweiz	AE15.2

Wasserstoffperoxid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen	16911
Pufferlösungen		
Puffer	Bestandteile/Bemerkung	
EDTA-Puffer	2,5 mM EDTA in PBS	
Essigsäure/Natriumazetat-Puffer	Pufferkapazität pH: 3,7 - 5,7	
DETC-Puffer	300 µM DETC in PBS	
NEM-Puffer	5 mM NEM in PBS	
Phosphate buffered saline	Pufferkapazität pH: 5,4 - 8,0	
Utensilien		
Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Units (30,000 MWCO)	EMD Millipore Corporation, Billerica, MA, USA	
Einmalküvetten	Sartedt, Nümbrecht	
Reaktionskammer des Chemolumineszenzdetektors (CLD)	Verhees, Neuss	
Parafilm "M" Bemis	VWR, USA	
Pipetten "Research" (10-1000 µl)	Eppendorf, Hambrg	
Pipettenspitzen (Filter Tips, 10/200/1000 µl)	Starlab, Belgien	
QS-Küvetten	HellmaA Analytics, Mühlheim	
Reaktionsgefäße (0,5/1/1,5/2ml)	Eppendorf, Hamburg	
Falkons (15/50 ml)	greiner bio-one, Österreich	
Stripetten (5/10/25 ml)	Sigma-Aldrich	
VIVASPIN-Röhrchen (30,000 MWCO)	Sartorius, Göttingen	
Geräte		
Gerät	Hersteller	Anwendung
Analysewaage ABJ 160	Kern & Sohn, Balingen	Probenvorbereitung
Chemolumineszenzdetektor 88e (CLD)	Eco Physics, Schweiz	NO-Detektion

Elan DRC II	Perkin Elmer, Waltham, MA, USA	ICP-MS
Heraeus Megafuge 16 R	ThermoFisher SCIENTIFIC	Zentrifuge
TESTCOM 200 (Druckkammer)	HAUX	Entlüftung der Proben
SPECORD 205 Photometer	analytikjena	Photometrie
VICTOR ³ 1420 Multilabel Counter	PerkinElmer precisely	Proteinquantifi- zierung
Software		
Excel	Microsoft	Erstellung von Graphen
OriginPro BG SR 4	OriginLab Corporation	VICTOR- Software
Powerpoint	Microsoft	Formatierung der Graphen
L ^A T _E X	Freie Software	Verfassung der Promotionsschrift
SPIROWARE	Eco Physics	CLD-Software
WinASPECT (2.5.0.0.)	analytikjena	Photometersoft- ware

Tabelle 2: Übersicht über die verwendeten Reagenzien, Pufferlösungen, Utensilien, Geräte und Software.

3.2 Methoden

Eine Übersicht über die verwendeten Reagenzien zeigt Tabelle 2.

3.2.1 Probenvorbereitung

Versuche im wässrigen Milieu. Versuche im wässrigen Milieu wurden bei angegebenen Konzentrationen und pH-Werten durchgeführt. Für Neocuproin-Kontrollen wurden Kupferproben (Cu^{2+} und Cu^{1+} , je 20 μM) bei einem pH-Wert von 5,5 im Essigsäure/Natriumazetat-Puffer inkubiert und mit Neocuproin (Neo, 1 mM) sowie je nach Fragestellung mit Ascorbat (100 μM) versetzt. Diese Proben wurden dann photometrisch untersucht (s.u.) Weitere Proben wurden in der CLD bei verschiedenen pH-Werten untersucht (s.u.).

Versuche mit BSA. Im Folgenden wird fürs native Bovine Serum Albumin die Abkürzung "BSA" benutzt, während mit Kupfer beladenes BSA als "BSA-Cu" bezeichnet wird. Die BSA- und Kupferkonzentrationen werden in Klammern angegeben.

Die benötigte Menge BSA wurde in PBS aufgenommen und mit Kupfer in verschiedenen Konzentrationen (wie bei Ergebnissen angegeben) versetzt. Je nach Fragestellung wurden weitere Zusätze hinzugefügt. Endkonzentration vor der Ultrazentrifugation betrug für NEM 5 mM, für EDTA 2,5 mM, sowie für DETC 300 μM . Die Proben wurden 30 min. lang bei Zimmertemperatur inkubiert und dann zu je 20 ml in Vivaspinröhrchen gegeben. Diese Röhrchen besitzen zwei Kammer, welche durch einen 30,000 MWCO (*molecular weight cut-off*) Filter getrennt sind. Durch hinreichende Zentrifugationskraft werden alle Moleküle, die eine kleinere atomare Masse haben, durch den Filter in die untere Kammer getrieben (Eluat), während größere Moleküle in der oberen Kammer zurückbleiben (Überstand, siehe Abbildung 3). Zur Ultrafiltration wurden die Proben 13 min. lang bei 1300 g zentrifugiert. Die Eluatmenge wurde bestimmt und zur Messung des freien Kupfergehaltes aufgehoben und analysiert. Entsprechend dieser Menge wurde der Überstand nach der Zentrifugation mit PBS restituiert. Diese Prozedur wurde insgesamt dreimal wiederholt, um eine gründliche Aufreinigung zu gewährleisten. Kontrollproben wurden bei jedem Schritt aus beiden Kammern des Vivaspinröhrchens entnommen. Die Proben wurden dann photometrisch oder in der CLD untersucht.

Für die Untersuchung in der ICP-MS (siehe unten) wurde eine ähnliche Vorgehensweise benutzt. In Fällen, bei denen Änderung des pH-Wertes vorgenommen wurde, wurden 500 μM BSA mit 8 μM CuCl_2 im 0,2 M Natriumazetat-Puffer für 30 Minuten bei 25 °C mit entsprechendem pH-Wert inkubiert. Es wurden Amicon-Röhrchen (15 ml, 30,000 MWCO) benutzt. Diese wurden ebenfalls mit PBS dreifach zentrifugiert und restituiert.

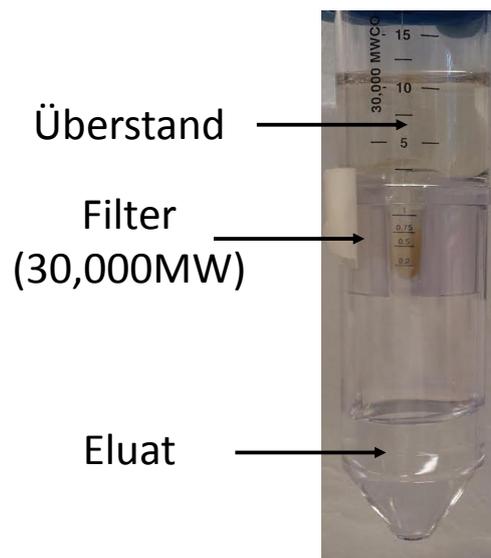


Abbildung 3: BSA-Lösung in Vivaspinröhrchen mit einem 30,000 MWCO-Filter nach Zentrifugation.

Die Modulation des nativen BSAs und des BSA-Cu^{2+} wurde mithilfe verschiedener Substanzen erreicht. DETC und EDTA sind unspezifische Chelatoren, welche in der Lage sind, das am BSA gebundene Kupfer zu entziehen und so kupferfreies bzw. -dezimiertes BSA zu generieren. EDTA-Cu-Komplex ist bei etwa 750 nm photometrisch detektierbar. Neocuproin ist ein spezifischer Chelator, der sich ausschließlich mit Cu^{1+} verbindet und als Neo- Cu^{1+} -Komplex bei 455nm photometrisch nachweisbar ist. Reduktion des Cu^{2+} zu Cu^{1+} wurde mithilfe von Ascorbat (Asc) und Glutathion (GSH) erreicht. N-Ethylmaleimid (NEM) wurde benutzt, um die Thiolgruppen am BSA zu alkylieren und so zu deaktivieren.

Um die Modulation des nativen BSAs und der BSA-Cu^{2+} -Komplexe zu untersuchen, wurden die Proben in den oben aufgeführten Puffern 20 min. lang inkubiert. Danach erfolgte die Ultrazentrifugation wie oben beschrieben. Die Überstände

wurden mit Puffern bei pH-Wert 7,4 restituiert. Bei Fragestellungen zur Reversibilität der BSA-Schädigung wurden die Proben erneut mit Cu^{2+} zu den Konzentrationen der entsprechenden Eluate reinkubiert und danach mittels der ICP-MS untersucht. Dadurch konnte festgestellt werden, ob die Veränderung des Kupferbindungsverhaltens des BSA permanent oder reversibel war.

3.2.2 Oxidativer Stress

BSA- Cu^{2+} -Komplexe wurden mit verschiedenen Substanzen inkubiert, um die Veränderungen des Verhaltens nach Behandlung mit radikalen Spezies zu untersuchen. Hierzu wurde Singulett-Sauerstoff und reaktive Stickstoffspezies auf verschiedenen Wegen hergestellt:

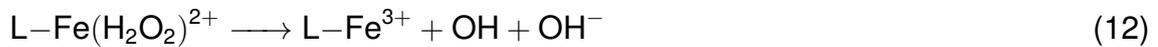
A. Photoexcitation: Beleuchtung einer 5 μM Rose-Bengal-Lösung durch eine Weisslichtlampe (500 W) für 15 min. aus einer Entfernung von 30 cm, wodurch Singulett-Sauerstoff entsteht [99].

B. Chemoexcitation: Durch Thermodekomposition des NDPO_2 -Endoperoxids. Hierzu wurde NDP bei 37 °C eine Woche lang gelagert und so thermolysiert; hierdurch entstehen NDP und Sauerstoff (NDPO_2), davon die Hälfte als Singulett-Sauerstoff. Die Proben wurden dann 30 min. lang mit NDPO_2 (10 mM) inkubiert, entsprechend einer Produktion von 30 $\mu\text{M}/\text{min}$ (freundliche Gabe von Prof. Oliver Klotz (Institut für Biochemie und Molekularbiologie 1, HHU Düsseldorf), hergestellt aus NDP nach [100]).

C. Kupfer-BSA-Lösung wurde mit Peroxynitrit (ONOO^-) bei einer Konzentration von 10 mM inkubiert, danach wurde der pH-Wert auf 7,4 eingestellt. Außerdem wurde SIN-1 (3-Morpholinosydnoniminehydrochlorid, 10 mM) benutzt, um gleichzeitig NO und $\text{O}_2^{\bullet-}$ herzustellen [101]. Hierdurch entsteht ONOO^- , ein potentes Oxidanz, und letztlich OH-Radikale (freundliche Gabe von Prof. Klaus Kröncke (Institut für Biochemie und Molekularbiologie 1, HHU Düsseldorf), hergestellt nach [102]).

D. Durch die Fentonreaktion des Fe^{2+} (200 μM) mit H_2O_2 (200 μM) bei einer Inkubation der Proben für 20 min. (Reaktionsgleichung siehe (11) und (12), nach

[103]).



3.2.3 Proteinquantifizierung

Die Proben wurden wie oben beschrieben dreifach ultrafiltriert und nach Restitution in mehreren Schritten verdünnt, wobei der Proteingehalt mithilfe von Pierce™ BCA Protein Assay Kit sowie photometrisch bestimmt wurde. Die erste Methode basiert auf der Biuretreaktion, also der Bildung eines Komplexes zwischen den Peptidbindungen und den Cu^{2+} -Ionen in alkalischer Lösung. Im nächsten Schritt wirkt dieser Komplex als Reduktor für Schwermetallionen im gelben Folin-Reagenz. Die entstandenen Verbindungen weisen eine Blaufärbung auf. Das Absorptionsmaximum liegt bei 750 nm, Absorptionsminimum bei 450 nm.

Für die Messung mit dem Pierce™ BCA Protein Assay Kit wurden Proben und eine Standardreihe (mit vorbekannter Proteinkonzentration) im RIPA-Puffer aufgenommen (*radioimmunoprecipitation assay*-Puffer). Dieser wurde aus folgenden Reagenzien zusammengestellt: 50 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0,5% Na-deocyclorat sowie 0,1% SDS.

Die Proteinbestimmung erfolgte stets in Duplets. Für den Standard wurden aus einer 1% BSA-Lösung Konzentrationen zwischen 0,2 und 1,4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ hergestellt. Die Proben wurden entsprechend vorverdünnt, um im kalibrierten Bereich gemessen werden zu können. Als *blanc* wurde RIPA-Buffer genommen. Die Standardreihe und die Proben wurden auf eine 96-well Platte pipettiert und mit Reagent A und Reagent B versetzt. Nach 15-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Absorption bei 750 nm im VICTOR³ 1420 Multilabel Counter bestimmt.

Die Proteinmenge wurde außerdem direkt photometrisch bei 280 nm bestimmt. Dazu wurde eine Verdünnungsreihe angesetzt. Vergleichsmessungen der Verdünnungsreihe mit dem Pierce™ BCA Protein Assay Kit und dem SPECORD-

ICP-MS Elan-DRCII (Perkin–Elmer) Nebulizer Spray chamber	Meinhard type A quartz (part no.: WE02-4372) Quartz cyclonic part no.: WE02-5222
RF power	1100 watt
Plasma Ar flow	15 L/min
Nebulizer Ar flow	0.93 L/min
Aux. Ar flow	1.1 L/min
Injector	2.0 mm i.d. Quartz (part no.: WE02-3916)
Monitored ion m/z CeO ⁺ /Ce ⁺	63 (63Cu) and 65 (65Cu) <3%

Tabelle 3: ICP-MS:Übersicht über die bei den Messungen verwendeten Geräteeinstellungen

Photometer ergaben identische Proteinkonzentrationen.

3.2.4 Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma

Die Kupferkonzentration in den BSA-Proben wurde mithilfe von Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (*inductively coupled plasma mass spectrometry*, ICP-MS) bestimmt. Diese Methode basiert auf der Ionisation der Atome bei extrem hohen Temperaturen (5000-10 000 °C) und deren Analyse durch ein Massenspektrometer; sie bietet eine hohe Genauigkeit selbst bei niedrigsten Metallkonzentrationen. Vor der Messung wurden alle Proben entsprechend dem Protokoll mit 20 µl suprapuren Salpetersäure angesäuert und mit 100 µl von 1 µg/ml Rhodiumlösung versetzt. Die bei der Messung benutzten Geräteeinstellungen sind in der Tabelle 3 zusammengefasst. Die Messungen wurden im Institut für Arbeitsmedizin und Sozialmedizin am Medizinklinikum der RWTH-Aachen durchgeführt und durch die Mitarbeiter des Instituts ausgewertet.

3.2.5 Photometrie

Die photometrische Messmethode basiert darauf, dass Veränderungen auf der molekularen Ebene durch die damit einhergehende Veränderung der Absorption beim Durchleuchten der Probe in einem bestimmten Wellenbereich detektierbar sind.

Die Proben wurden in QS-Küvetten gegeben und in einer Druckkammer bei 2,5 bar mit Stickstoff 30 min. lang entlüftet, um Sauerstoff als Oxidationsquelle zu eliminieren. Küvetten wurden danach sofort mit Parafilm versiegelt, um Artefakte durch Verdunstung und durch Oxidation während der Messung zu vermeiden. Für Reagenzien, die erst kurz vor oder während einer laufenden Messung hinzugefügt wurden, wurde die Versiegelung für wenige Sekunden geöffnet. Die Küvetten wurden vor und nach jeder Messung ausgiebig mit *aqua dest* gewaschen. Je nach Fragestellung wurden einzelne oder Serienmessungen in festgesetzten Zeitabständen vorgenommen. Für die Proteinbestimmung wurde die Absorption bei 280 nm gemessen, für die entsprechenden Proben wurden Spektren gegenüber einer Kontrollprobe (*blanc*) gefahren.

BSA-Cu²⁺-Komplexe wurden photometrisch bei 525 nm quantifiziert [93], als *blanc* wurde hierzu natives BSA mit gleicher Konzentration benutzt.

3.2.6 Chemolumineszenzdetektion

Die Chemolumineszenzdetektion (CLD) ist eine hochgenaue Messmethode, welche eine Lichtemission als Folge einer chemischen Reaktion misst und so NO-Konzentrationen bis in den ppb-Bereich (*parts per billion*) bestimmen kann. Für die Detektion von NO gelten die Gleichungen (13) und (14). Das durch Ozon (O₃) angeregte Stickstoffdioxid (NO₂[•]) emittiert Licht proportional zur NO-Menge, welche in die Reaktionskammer gelangt.



Durch die doppelwandige Struktur der Reaktionskammer (Gesamtvolumen 120 cm³) konnte die Temperatur mit außen zirkulierendem *aqua dest* bei 37 °C gehalten werden. Von unten wurde der Reaktionskammer Stickstoff mit konstanter Geschwindigkeit von 100 ml/min zugeführt, um das freiwerdende NO über den oberen Ausgang der Reaktionskammer dem NO-Detektor zu zuführen. Eine Übersicht über den Aufbau ist in Abbildung 4 zu sehen.

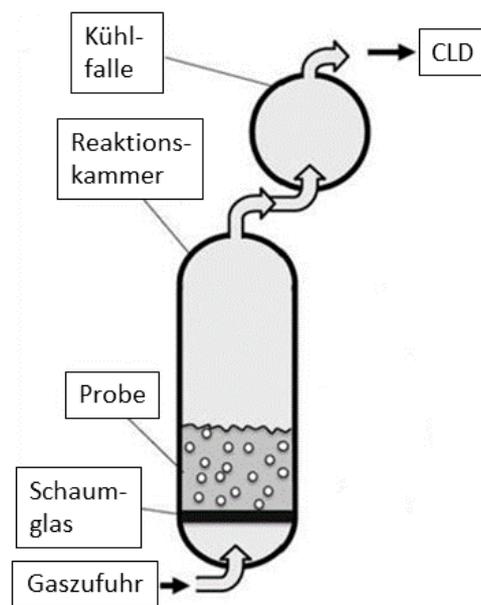


Abbildung 4: Aufbau der Reaktionskammer eines Chemilumineszenzdetektors (CLD). Trägergas gelangt von unten durch das Schaumglas in die Reaktionskammer und führt so das NO dem eigentlichen Detektor zu.

Die Proben wurden mit einer Geschwindigkeit von 100 µl/sek in die Reaktionskammer gegeben. Eine Antifoam-Lösung wurde zum Entschäumen aller proteinhaltigen Proben verwendet. Weitere Stoffe wurden je nach Fragestellung in die Kammer injiziert, um Modulation der NO-Freisetzung zu demonstrieren. Im Ergebnisteil beziehen sich alle Angaben auf die Endkonzentrationen in der Reaktionskammer; bei mehrfacher Gabe ergibt sich dadurch eine entsprechende Vervielfachung im Reaktionsgefäß. Die Ergebnisse wurden laufend in ppb aufgezeichnet.

3.2.7 Software und Datenanalyse

Die Rohdaten wurden von der geräteeigenen Software erfasst, wie sie in der Tabelle 2 angegeben wurde. Die Zusammenfassung der photometrischen Serienmessungen erfolgte mit WinASPECT. Weitere Analysen wurden mit Excel durchgeführt, die Graphenformattierung erfolgte in Powerpoint. Statistische Signifikanz wurde bei $p < 0,05$ angenommen. Die Promotionsschrift wurde im \LaTeX verfasst.

4 Ergebnisse

4.1 BSA-Cu

BSA kann mit Kupfer beladen werden. Um die Beladbarkeit von BSA mit Kupfer zu zeigen, wurde eine 2%-BSA-Lösung mit Kupfer (7,5 - 300 μM) inkubiert und danach aufgereinigt. Die Proben wurden dann photometrisch untersucht. Abbildung 5 zeigt die photometrische Erfassung der BSA-Cu-Komplexe bei 525 nm. Die Absorption nahm mit steigender Cu-Konzentration linear zu; weit im supra-physiologischen Bereich ließ sich keine Abflachung der BSA-Bindungskapazität feststellen.

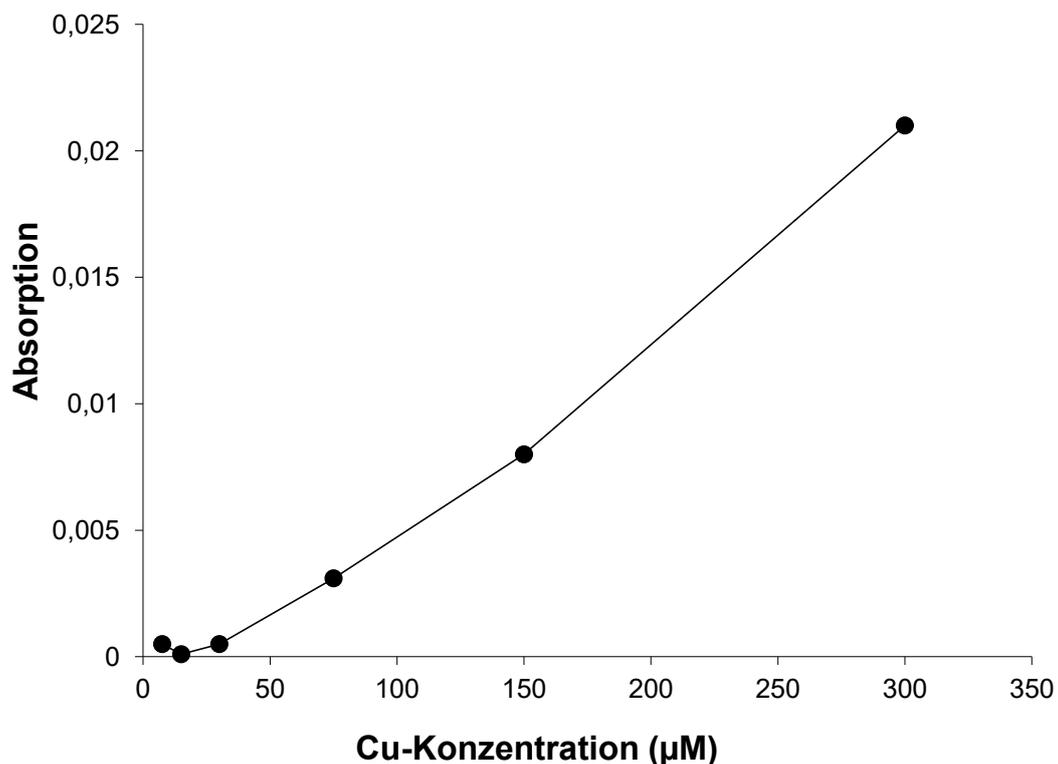


Abbildung 5: Photometer: Absorption bei 525 nm in Abhängigkeit der Kupferkonzentration in 2%-BSA-Lösung nach Ultrafiltration. Es zeigt sich eine proportionale Abhängigkeit, BSA kann auch im supra-physiologischen Bereich Kupfer binden (*blanc*: 2%-BSA Lösung ohne Kupfer).

BSA-Cu²⁺ bleibt dauerhaft stabil. Um die Stabilität der BSA-Cu-Komplexe zu überprüfen, wurde BSA (500 μM) zunächst mit Kupfer (8 μM) inkubiert. Vor der

Messung wurden die Proben wie oben beschrieben aufgereinigt. Die erste Bestimmung des Kupfersgehaltes mittels ICP-MS erfolgte sofort, sowie danach in verschiedenen zeitlichen Abständen. Die Messungen in der Zeitspanne von bis zu 480 Stunden zeigten, dass die BSA-Cu-Komplexe dauerhaft stabil blieben und Kupfer nicht vom BSA dissoziierte (Abbildung 6). Die Kupferkonzentration des nativen 500 μM BSAs betrug etwa 2,5 μM (Kontr.).

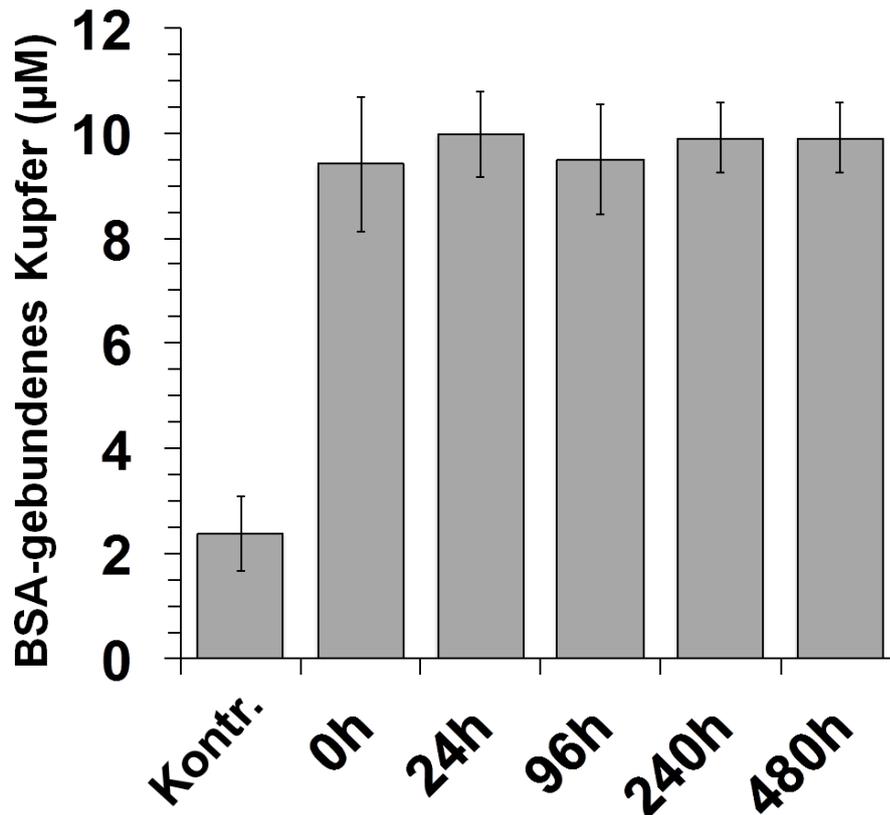


Abbildung 6: ICP-MS: BSA-Cu (BSA - 500 μM , Cu - 8 μM) in PBS bleibt dauerhaft stabil. Der Kupfergehalt der Proteinfraction des BSAs ist auch nach 480 h konstant (Kontr. - Kontrolle (BSA), vertikale Balken repräsentieren die Standardabweichung der Messung).

Kupfer dissoziiert vom BSA im sauren Milieu. Das Verhalten des BSA-Cu²⁺ bei verschiedenen pH-Werten wurde ebenfalls mithilfe der ICP-MS untersucht (siehe Abbildung 7), um den Dissoziationsgrad des Kupfers vom BSA-Cu²⁺ nach Inkubation im sauren Milieu zu analysieren. Hierzu wurde BSA-Cu²⁺ (BSA - 500 μM , Cu²⁺ - 9,6 μM) je 10 Minuten lang in Puffern mit pH-Werten im Bereich 5,5 - 8,0 inkubiert. Nach der Aufreinigung wurde anschließend die Kupferkonzentration in den Überständen (Proteinfraction, am BSA) und Eluaten (Ultrafiltrate,

dissoziiert) bei physiologischem pH-Wert bestimmt. Die beiden Linien zeigen den prozentualen Anteil des Kupfers, welcher BSA-gebunden blieb (Proteinfraktion, weiß), sowie der vom BSA dissoziierte (Ultrafiltrate, schwarz). Je niedriger der pH-Wert war, desto höher war der prozentuale Anteil der Kupferionen, welche vom BSA dissoziierten. Bei einem pH-Wert von 5,5 waren es über 60%. Saure Umgebung setzte also die Kupferbindungsfähigkeit des BSAs herab.

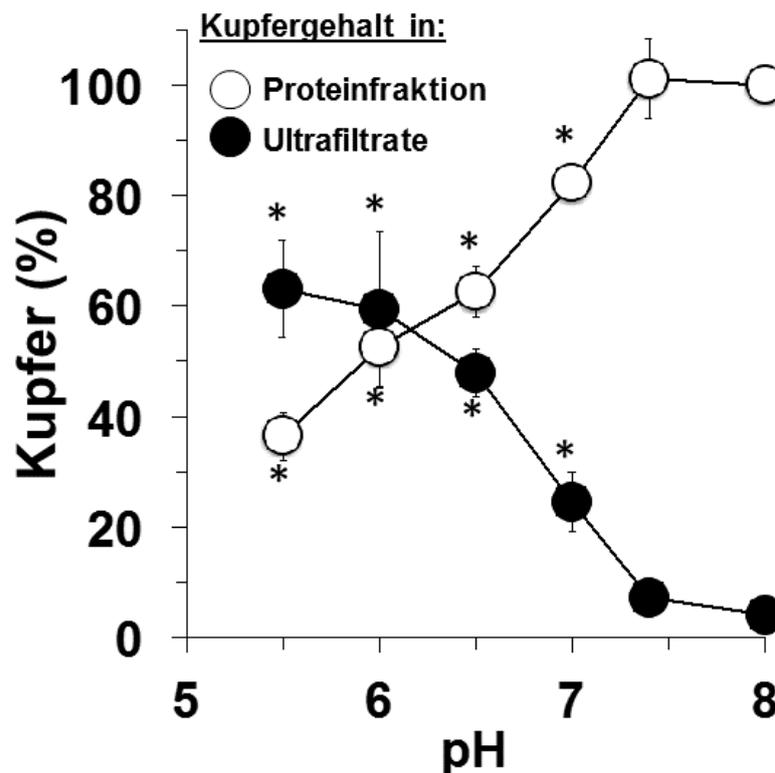


Abbildung 7: ICP-MS: Bestimmung des prozentualen Anteils des Kupfers in den Überständen (Proteinfraktion, weiß), sowie in den Eluaten (Ultrafiltrate, schwarz) nach Inkubation bei verschiedenen pH-Werten. Mit sinkendem pH-Wert dissoziieren vermehrt Kupferionen vom BSA-Cu²⁺ (BSA - 500 µM, Cu²⁺ - 9,6 ± 1,2 µM, * - p < 0.05 im Vergleich zu den Ergebnissen bei pH 7).

Oxidativer Stress moduliert die Kupferbindungskapazität von Albumin.

Das Verhalten des BSA-Cu²⁺ (BSA - 500 µM, Cu²⁺ - 9,6 ± 1,2 µM) bei oxidativem und nitrosativem Stress wurde ebenfalls untersucht. Hierzu wurden Proben mit verschiedenen Reagenzien, wie im Methodenteil beschrieben, vorbehandelt und danach aufgereinigt. Der Dissoziationsgrad des Kupfers vom BSA wurde mit-

tels ICP-MS bestimmt: Der Kupfergehalt wurde hierfür in den Überständen (am BSA) und in den Eluaten (frei) gemessen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 8 dargestellt (weiße Balken - Überstände, graue Balken - Eluate). In der Kontrollprobe (nicht vorbehandelt, "Kontr.") blieb das Kupfer am BSA gebunden. Nach Vorbehandlung mit BR waren nur noch ca. 60% des Kupfers im Überstand zu finden, ebenso nach Vorbehandlung mit NDPO₂, d.h. 40% des Kupfers waren unter diesen Bedingungen vom BSA dissoziiert. Nach Inkubation mit PN dissoziierte die Mehrheit des Kupfers (über 60%) vom BSA und war dadurch im Eluat zu finden. Im gleichen Versuchsaufbau jedoch bei einem pH-Wert von 6,5 konnte festgestellt werden, dass über 90% des Kupfers vom BSA dissoziierte. Nach Vorbehandlung mit SIN-1 sowie nach oxidativer Stress-Vorbehandlung nach Fenton war ebenfalls die Mehrheit des Kupfers vom BSA dissoziiert. Exposition des BSA-Cu²⁺ gegenüber oxidativem und nitrosativem Stress setzte die Fähigkeit des BSA, Kupfer zu binden, also herab.

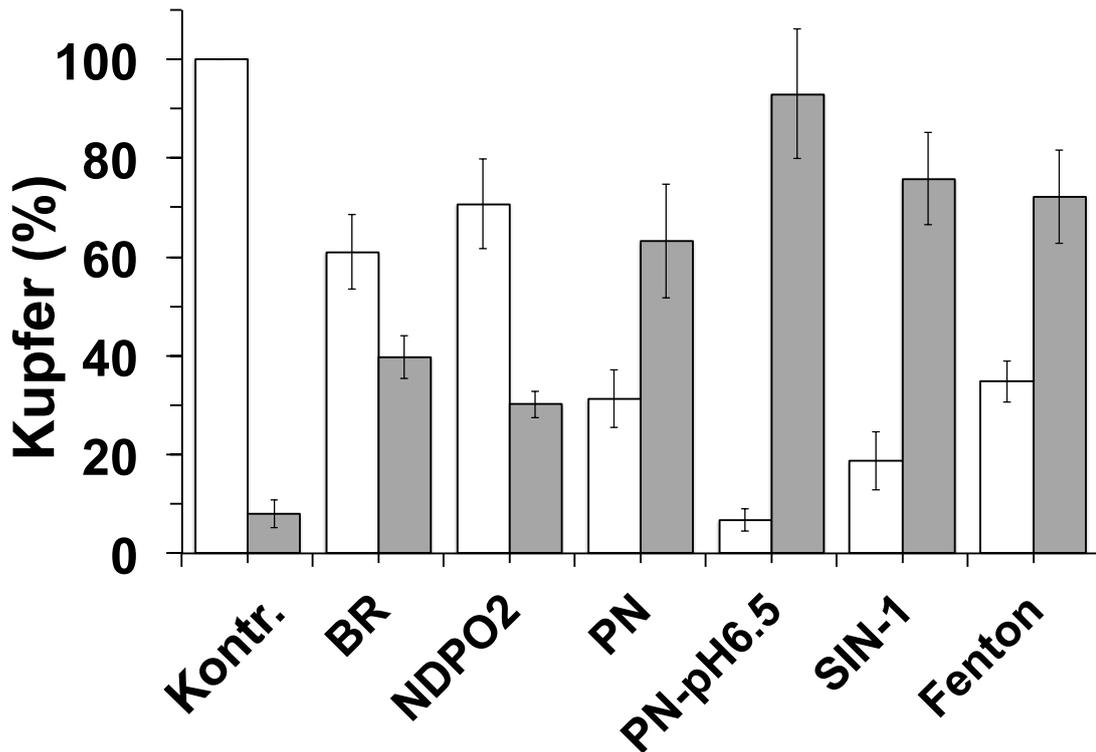


Abbildung 8: ICP-MS: Relativer Anteil des Kupfers in den Überständen (am BSA, weiße Balken) und Eluaten (frei, graue Balken) nach Vorbehandlung mit Sauerstoffradikalen in Form von *Bengal Rose* (BR, 5 μ M), sowie thermischen Abbauprodukten des NDPO₂ (10 mM). Nitrosativer Stress sowie Schädigung durch Hydroxylradikale wurde durch Vorbehandlung mit Peroxynitrit ausgeübt (PN, 10mM), sowie mit pH-Wert 6,5 kombiniert (PN-pH6.5). Es erfolgte außerdem eine Vorbehandlung mit SIN-1 (10 mM, setzt NO und O₂^{•-} frei), sowie mit Hydroxylradikalen aus der Fenton-Reaktion nach Zusatz von 200 μ M Fe²⁺ und 200 μ M H₂O₂. Durch Br, NDPO₂, PN, PN-pH 6,5, SIN-1, sowie durch die Fenton-Reaktion wird Kupfer des BSA-Cu zur Dissoziation gebracht. Kontr. - nicht vorbehandeltes BSA-Cu²⁺ (BSA - 500 μ M, Cu²⁺ - 9,6 \pm 1,2 μ M, vertikale Balken repräsentieren \pm 1 Standardabweichung).

Nur die pH-induzierte Modifikation der Kupferbindungskapazität ist reversibel. Ausgewählte Proben aus der Abbildung 7 und Abbildung 8 wurden weiterverwendet, um die Nachhaltigkeit der Schädigung der Kupferbindungsstellen des BSAs durch Radikale und durch einen sauren pH-Wert zu untersuchen. Die Menge des dissoziierten Kupfers, welche sich durch die Ultrazentrifugation in den Eluaten befand, wurde bei einem physiologischen pH-Wert in den Überständen entsprechend restituiert. Die Proben wurden dann erneut aufgereinigt. Der Kupfergehalt wurde in den Überständen (Proteinfraktion nach Reinkubation) mittels ICP-MS gemessen und mit dem Kupfergehalt der Proteinfraktion vor der Reinku-

bation mit Cu^{2+} verglichen (siehe Abbildung 9).

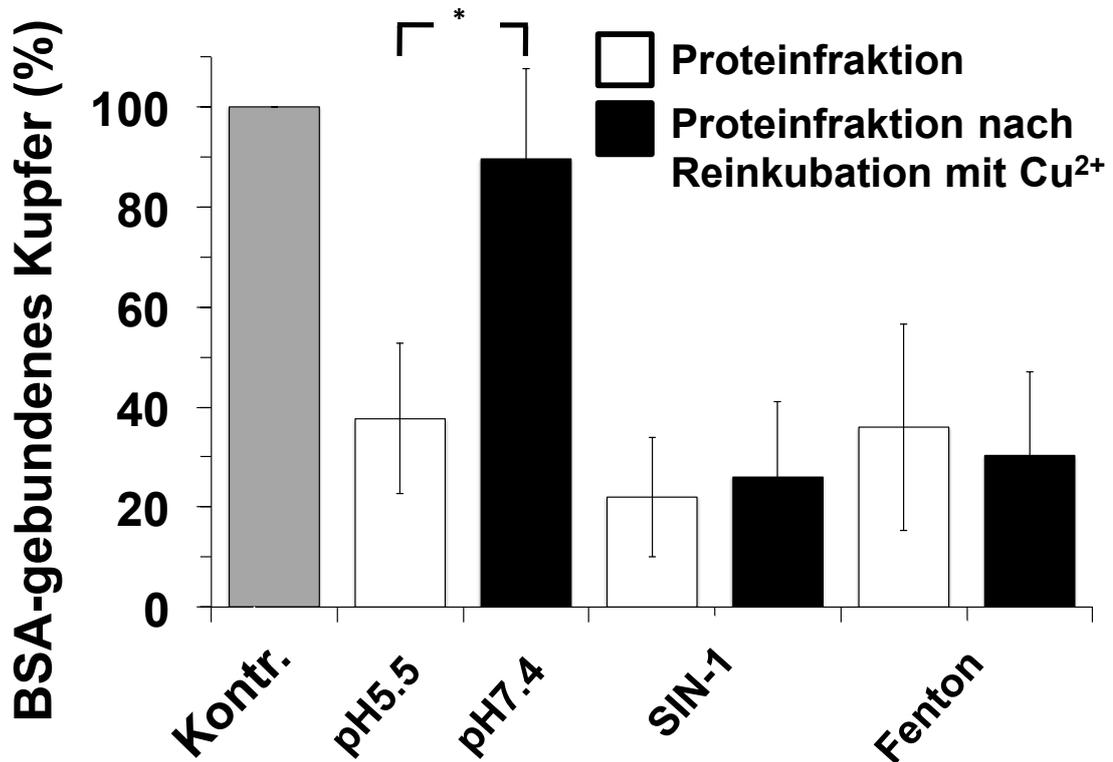


Abbildung 9: ICP-MS: Ausgewählte Proben aus Abbildung 7 und Abbildung 8 wurden erneut mit Kupfer inkubiert, dabei wurden die entsprechenden Mengen des zuvor dissoziierten Kupfers benutzt. Nach der Aufreinigung wurden die prozentuale Anteile der BSA- Cu^{2+} -Komplexe im Überstand vor der Reinkubation ("Proteinfraktion", weiße Balken) und danach bestimmt ("Proteinfraktion nach Reinkubation mit Cu^{2+} "). Die Schädigung durch einen sauren pH-Wert ist reversibel, während die Schädigung durch SIN-1 und Fenton-Reaktion die Fähigkeit des BSAs, Kupfer zu binden, irreversibel inhibiert. Kontr. - nicht behandeltes BSA- Cu^{2+} , SIN-1 und Fenton - entsprechende weiterverwendete Proben, * - statistisch signifikant, vertikale Balken repräsentieren ± 1 Standardabweichung.)

Proben, welche bei einem pH-Wert von 5,5 inkubiert waren, konnten bei physiologischen pH-Wert erneut Kupfer binden. Proben, welche mit SIN-1 oder durch die Fenton-Reaktion behandelt wurden, konnten Kupfer bei einem physiologischen pH-Wert nicht erneut binden. Schädigung des BSA- Cu^{2+} durch ein saures Milieu war also reversibel, während die Schädigung durch SIN-1 und durch die Fenton-Reaktion dauerhaft die Kupferbindungsfähigkeit des BSAs zerstörte.

Kupfer des BSA-Cu liegt auch als Cu^{1+} vor. Um Cu^{1+} photometrisch nachzuweisen, wurde Neocuproin (Neo), ein spezifischer Cu^{1+} -Chelator, verwendet. Neo- Cu^{1+} -Komplexe können bei etwa 450-455 nm detektiert werden [104].

Um die Spezifität der Neo-Cu¹⁺-Bindung zu demonstrieren wurden 4 Proben vorbereitet: Neo + Cu¹⁺, Neo + Cu²⁺ + Asc, Neo + Asc, sowie Neo + Cu²⁺ (siehe Abbildung 10). Damit Neocuproin Kupfer bindet, muss es entweder bereits als Cu¹⁺ vorliegen oder durch ein zur Verfügung stehendes Reduktionsmittel (hier Ascorbat) reduziert werden. Neocuproin bindet also spezifisch an Cu¹⁺.

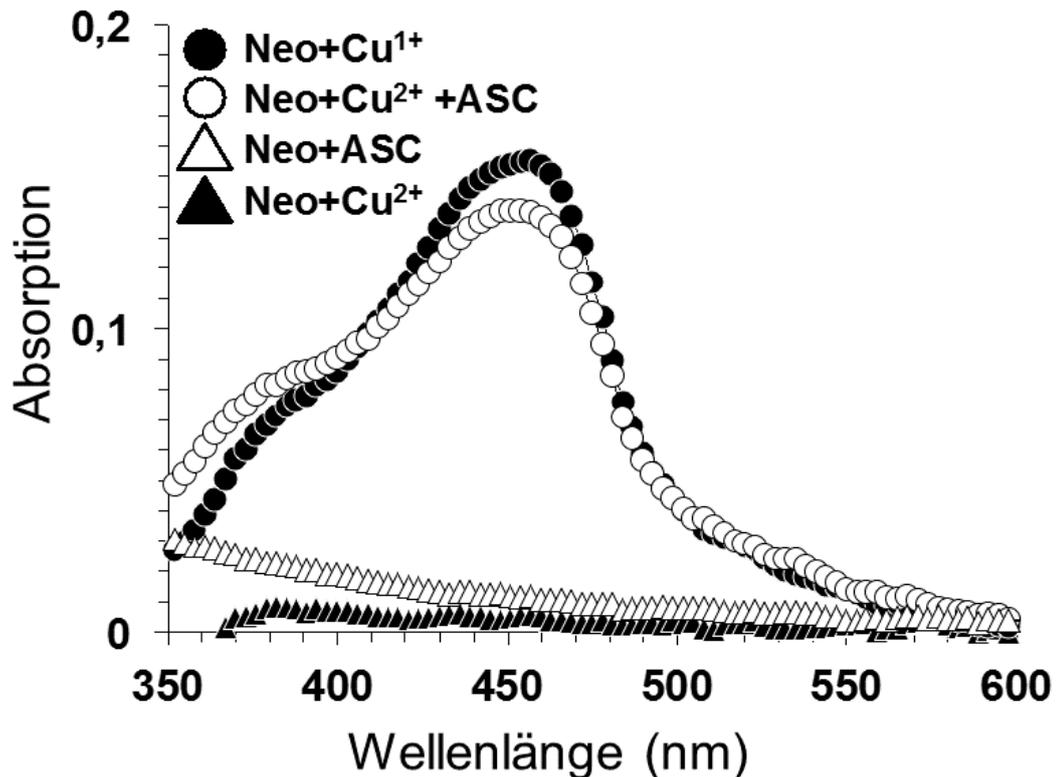


Abbildung 10: Photometer: Nachweis der Spezifität der Bindung des Kupfers (Cu¹⁺) an Neocuproin (Neo) bei einem pH-Wert von 5,5 (repräsentative Darstellung). Zur Reduktion des zweiwertigen Kupfers (Cu²⁺) wurde Ascorbat (Asc) verwendet. Der typische Peak lässt sich bei Neo + Cu¹⁺ (Positivkontrolle), sowie bei Neo + Cu²⁺ + Asc nachweisen, während Neo + Cu²⁺ und Neo + Asc zu keiner vermehrten Absorption führen. Neocuproin bindet also spezifisch Cu¹⁺-Ionen (Cu - 20 µM, Ascorbat - 100 µM, Neocuproin - 1 mM).

Der Valenzstatus des Kupfers bei mit Kupfer beladenem BSA wurde hiernach photometrisch untersucht. Zunächst wurde BSA (2%) mit Kupfer (300 µM) beladen. Im Photometer wurde die Probe dann unmittelbar vor Messbeginn mit Neocuproin (Neo) und nach etwa 35 min. mit Ascorbat (Asc) versetzt (siehe Abbildung 11). Allein durch die Neocuproin-Gabe nahm die Absorption bei 455 nm zu; durch eine Gabe von Ascorbat konnte ein erneuter, deutlicher Anstieg verzeichnet werden. Kupfer liegt also beim BSA-Cu auch als Cu¹⁺ vor; BSA scheint beim Abfangen

des Cu^{1+} durch Neocuproin auch ohne Zusatz von Reduktionsmitteln Cu^{1+} aus gebundenem Cu^{2+} generieren zu können. Durch Zusatz von Ascorbat wird noch mehr Cu^{2+} zu Cu^{1+} reduziert.

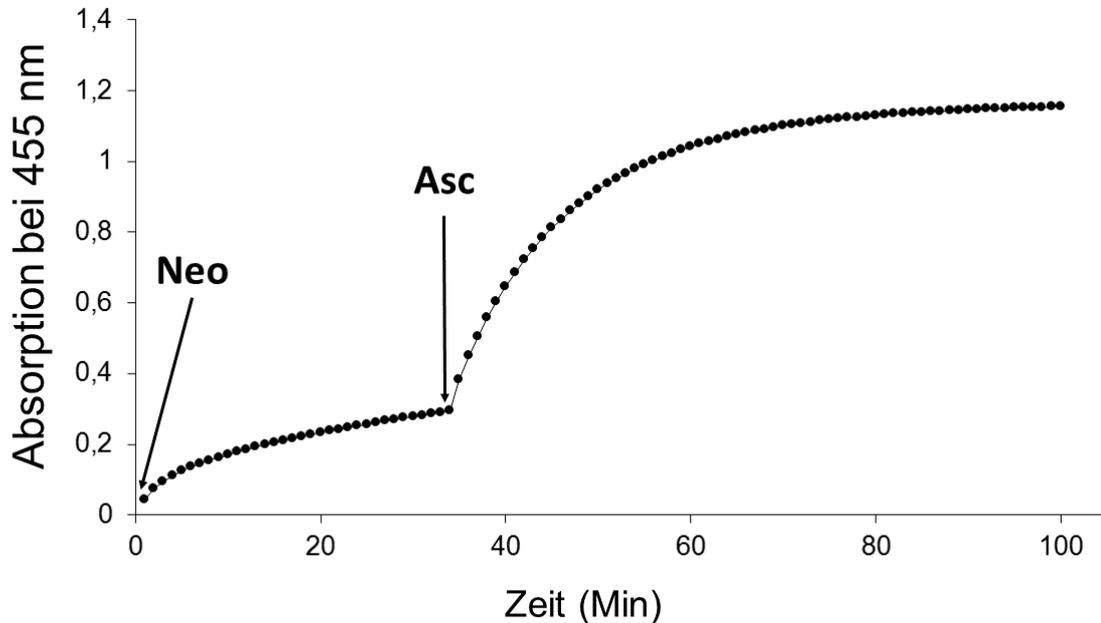


Abbildung 11: Photometer: Neocuproin (Neo) reagiert mit BSA-Cu^{2+} zu Neo-Cu^{1+} (sichtbar bei 455 nm), durch Zugabe von Ascorbat (Asc, 1 mM) wird diese Reaktion beschleunigt bzw. ein neues Gleichgewicht erreicht (BSA - 2%, Cu - 300 μM).

Die Thiolgruppe des BSA-Cu nimmt an Kupferreduktion teil. Die Rolle der Thiolgruppe des BSAs bei Reduktion des BSA-Cu^{2+} zu BSA-Cu^{1+} wurde im selben Versuchsaufbau untersucht. Mit Kupfer (240 μM) beladenes BSA (1,6%) wurde mit N-Ethylmaleimid (NEM, 5 mM), einem Thiolgruppen-Alkylanz, vorbehandelt [105]. Hierdurch wurde die Thiolgruppe des BSAs blockiert. Im Photometer wurde die Probe dann unmittelbar vor Messbeginn mit Neocuproin versetzt und die Absorption bei 455 nm gemessen. Die Messung wurde dann mit einer nicht vorbehandelten BSA-Cu-Probe verglichen (siehe Abbildung 12). Nach NEM-Vorbehandlung waren im Vergleich zum nicht vorbehandelten BSA-Cu photometrisch weniger Neo-Cu^{1+} nachzuweisen. Blockierung der Thiolgruppe durch das Alkylanz NEM setzte die Fähigkeit des BSAs, BSA-Cu^{2+} zu BSA-Cu^{1+} zu reduzieren also herab.

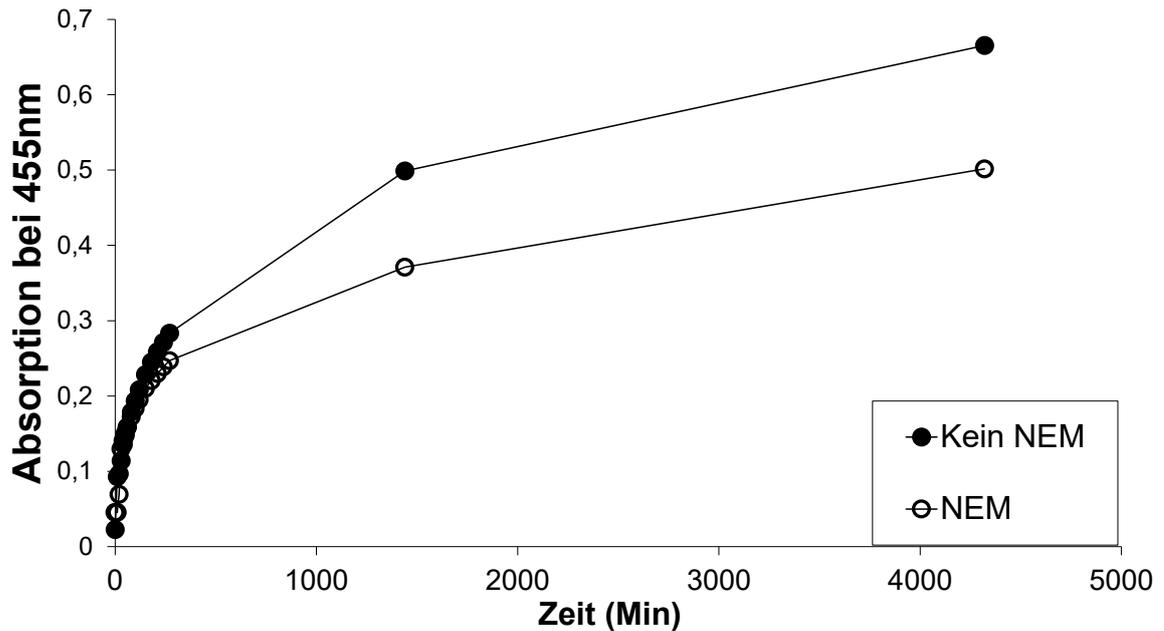


Abbildung 12: Photometer: Nach Vorbehandlung mit N-Ethylmaleimid ("NEM", 5 mM) sind bei 455 nm weniger Neocuproin-Cu-Komplexe (Neo-Cu¹⁺) gegenüber der nicht vorbehandelten Probe detektierbar ("Kein NEM", BSA: 1,6%, Cu: 240 µM).

Unspezifischer Chelator EDTA kann Kupfer dem BSA-Molekül entziehen.

Um das Verhalten des BSA-Cu gegenüber anderen Chelatoren zu untersuchen, wurden Versuche mit EDTA angefertigt. EDTA ist ein unspezifischer Chelator, der in Verbindung mit Kupfer photometrisch bei etwa 740 nm nachweisbar ist [106]. Dabei kann durch das Fahren eines Spektrums im Bereich 425 nm - 875 nm sowohl der BSA-Cu-Peak (525 nm) als auch der EDTA-Cu-Peak dargestellt werden. Die BSA-Cu-Probe (BSA - 1,6%, Cu - 240 µM) wurde unmittelbar vor Messbeginn mit EDTA (2,5 mM) versetzt, danach wurden in angegebenen zeitlichen Abständen Spektren von 425 nm bis 875 nm gefahren (siehe Abbildung 13). Nach Zusatz von EDTA flachte der BSA-Cu-Peak bei 525 nm zugunsten einer Zunahme des EDTA-Cu-Peaks bei 740 nm ab. Auch EDTA konnte also Kupfer dem BSA-Cu entziehen.

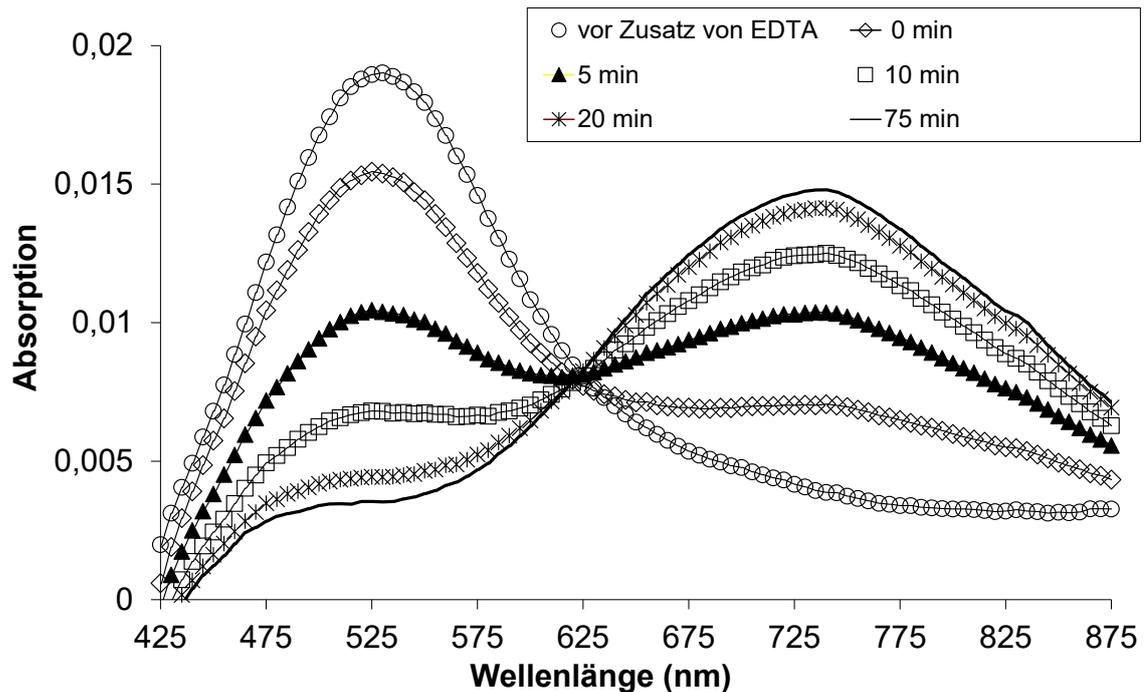


Abbildung 13: Photometer: Spektren von BSA-Cu (BSA - 1,6%, Cu - 240 μM) in zeitlich angegebenen Abständen zeigen nach Gabe von EDTA (2,5 mM) das zunehmende Abflachen des BSA-Cu-Peaks bei 525 nm zugunsten des EDTA-Cu-Peaks bei etwa 740 nm.

4.2 Nitrit und Kupfer in wässriger Lösung

Die NO-Freisetzung aus Nitrit im sauren Milieu erfolgt spontan. Um die Freisetzung von NO aus Nitrit direkt zu untersuchen, wurden Proben im wässrigen Milieu vorbereitet und in der CLD analysiert. Abbildung 14 zeigt die NO-Freisetzung aus Nitrit (NO_2^- , 10 μM) beim physiologischen pH-Wert (weißer Balken), und bei einem pH-Wert von 5,5 (grauer Balken). Während bei physiologischem pH-Wert keine NO-Freisetzung resultierte, wurde im sauren Milieu eine Freisetzung von etwa 0,4 pmo/s gemessen. Repräsentative CLD-Messungen sind exemplarisch in Abbildung 15 überlagert bei pH-Wert 5,5 und 7,4 dargestellt. Aus Nitrit entstand also im sauren Milieu NO, was beim physiologischen pH-Wert nicht der Fall ist.

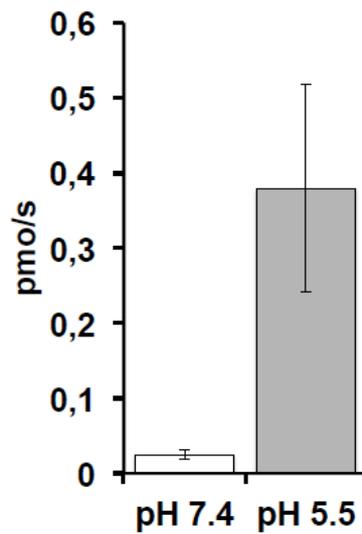


Abbildung 14: CLD: Die NO-Freisetzung aus 10 μM Nitrit ist deutlich höher beim pH-Wert von 5,5 als beim pH-Wert von 7,4 (vertikale Balken repräsentieren ± 1 Standardabweichung).

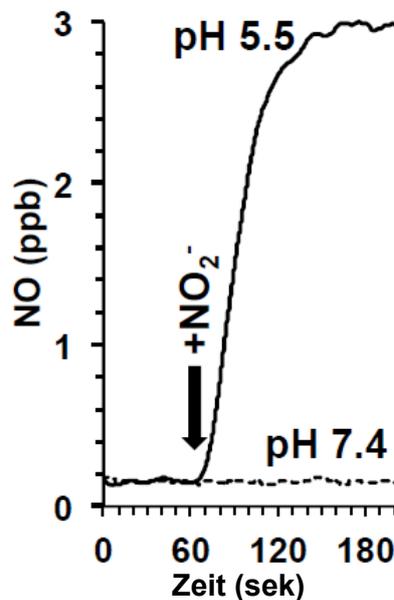


Abbildung 15: CLD: Die NO-Freisetzung ist deutlich höher im sauren Milieu (pH 5,5) gegenüber physiologischen Bedingungen (pH 7,4), wo keine nennenswerte NO-Freisetzung erfolgt (NO_2^- - Nitrit, 10 μM).

Kupfer verstärkt die NO-Freisetzung aus Nitrit im sauren Milieu deutlich.

Um die Rolle des Kupfers bei der NO-Freisetzung aus Nitrit im wässrigen Milieu und beim sauren pH-Wert zu untersuchen, wurde Kupfer, spezifischer Cu^{1+} -

Chelator Neocuproin, sowie das Reduktionsmittel Ascorbat in verschiedenen Kombinationen mit Nitrit in die CLD-Kammer gegeben. Abbildung 16 zeigt die NO-Freisetzung und ihre Modulation durch die Zusammensetzung der einzelnen Proben. Wurde Nitrit alleine in die Reaktionskammer der CLD gegeben, so resultierte eine NO-Freisetzung. Durch Zugabe von Ascorbat (Ni + Asc) wurde die NO-Freisetzung etwas erhöht. Wurde außerdem noch Neocuproin hinzugegeben (Ni + Asc + Neo), so ging die NO-Freisetzung auf das Niveau zurück, welches von Nitrit alleine erreicht wurde. Wurde nun zusammen mit Nitrit Ascorbat und Cu^{2+} (Ni + Asc + Cu (II)) in die Reaktionskammer der CLD injiziert, so resultierte eine etwa 80-fach erhöhte NO-Freisetzung, welche durch Zugabe von Neocuproin (Ni + Asc + Cu (II) + Neo) auf das Ausgangsniveau herabgesetzt werden konnte. Zugabe von Kupfer (II) und Ascorbat erhöhte also die NO-Freisetzung außerordentlich stark.

Um die spezifische Abhängigkeit dieses Effektes von Cu^{1+} auch ohne Reduktionsmittel zu zeigen, wurde ein Versuch mit sowohl Cu^{2+} als auch Cu^{1+} durchgeführt, hier als eine originale CLD-Aufzeichnung dargestellt (siehe Abbildung 17). Beim pH-Wert von 5,5 wurde Nitrit in die Reaktionskammer der CLD injiziert (+ Nitrit), woraufhin ein leichter Anstieg der NO-Freisetzung resultierte. Nach Zugabe von Kupfer (II) (+ Cu^{2+}) erhöhte sich die NO-Freisetzung nicht. Erst nach Zugabe von Kupfer (I) (+ Cu^{1+}) kam es zu einer überaus hohen NO-Freisetzung, welche durch Injektion vom Cu^{1+} -spezifischen Chelator Neocuproin (+ Neo) unterbunden wird. Die Verstärkung der NO-Freisetzung im sauren Milieu war also auf das Cu^{1+} zurückzuführen. Eine statistische Zusammenfassung dieser Ergebnisse ist in der Abbildung 18 dargestellt, wodurch die signifikante Rolle des Cu^{1+} noch einmal deutlich wird; durch Neocuproin wurde die NO-Freisetzung unterbunden.

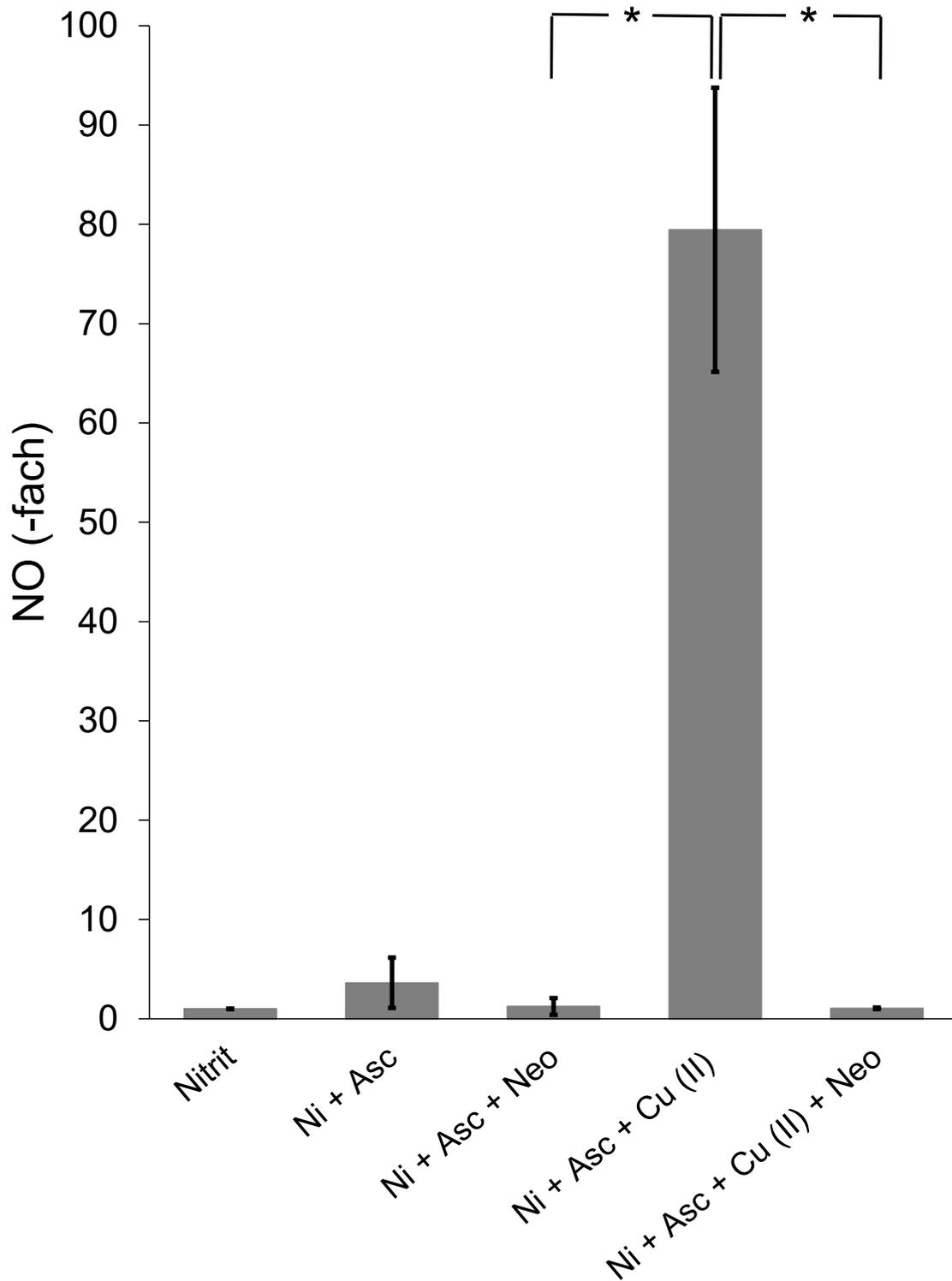


Abbildung 16: CLD: Modulation der NO-Freisetzung aus Nitrit (Ni, 14 μM) bei pH-Wert 5,5 durch Ascorbat (Asc, 140 μM), Neocuproin (Neo, 14 μM) und Kupfer (Cu (II), 14 μM). Erst durch gleichzeitige Gabe von Cu^{2+} und Ascorbat resultiert eine deutlich stärkere NO-Freisetzung (* - statistisch signifikant, vertikale Balken repräsentieren ± 1 Standardabweichung).

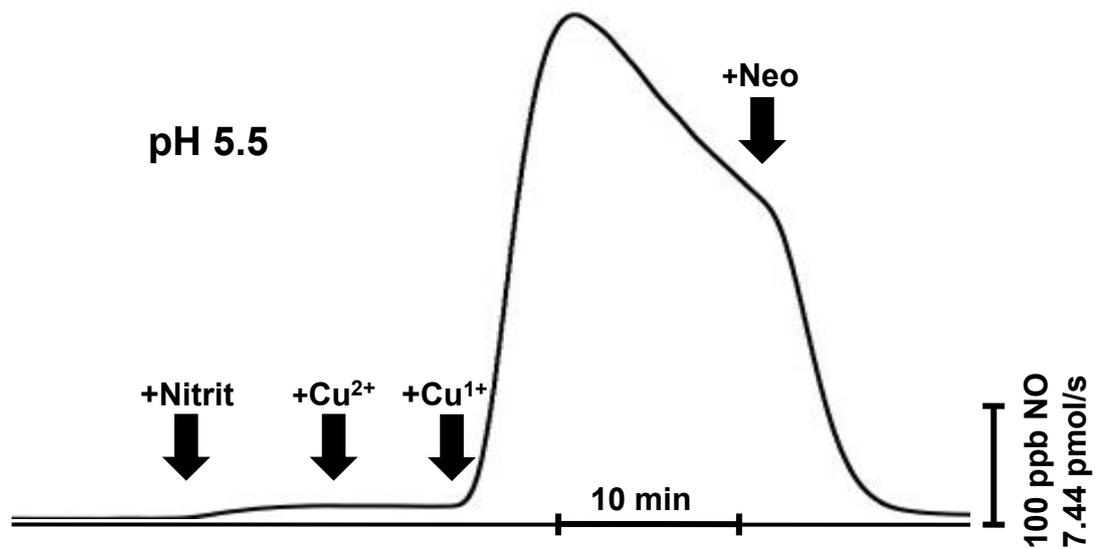


Abbildung 17: CLD: Effekt von Cu²⁺ und Cu¹⁺ (je 10 μM) auf Nitritreduktion im sauren Milieu (pH 5,5), inhibiert durch durch Cu¹⁺-spezifischen Chelator Neocuproin (Neo, 100 μM). Cu¹⁺ ist für die ausgedehnte NO-Freisetzung verantwortlich.

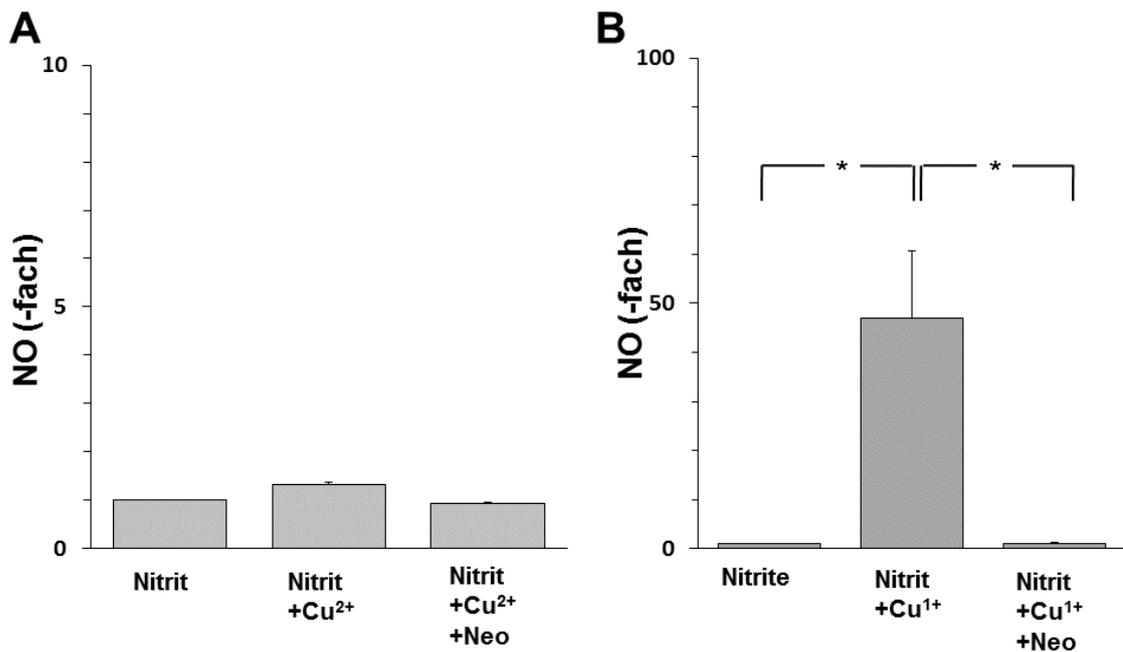


Abbildung 18: CLD: Effekt von Cu²⁺ (A) gegenüber Cu¹⁺ (B, je 10 μM) auf die Nitrit-getriggerte NO-Freisetzung im sauren Milieu (pH 5,5), inhibiert durch Neocuproin (Neo, 100 μM). Cu¹⁺ ist für die ausgedehnte NO-Freisetzung verantwortlich (* - statistisch signifikant, vertikale Balken repräsentieren ± 1 Standardabweichung).

4.3 BSA, BSA-Cu und Nitrit

Albumin agiert als eine Nitritreduktase. Bei der folgenden Versuchsreihe wurde die Rolle des BSA sowie des BSA-Cu bei der NO-Freisetzung aus Nitrit untersucht. Zunächst wurde die maximale NO-Freisetzung aus Nitrit in Abhängigkeit der Proteinkonzentration des nativen BSAs und HSAs in der CLD analysiert (siehe Abbildung 19). Hier ist eindeutig zu sehen, dass die Proteinkonzentration mit der maximalen NO-Freisetzung aus Nitrit ($70 \mu\text{M}$) korreliert, wobei BSA bei gleicher Konzentration mehr NO freisetzen konnte. BSA und HSA waren also beide in der Lage, die NO-Freisetzung aus Nitrit zu katalysieren, wobei BSA potenter wirkte.

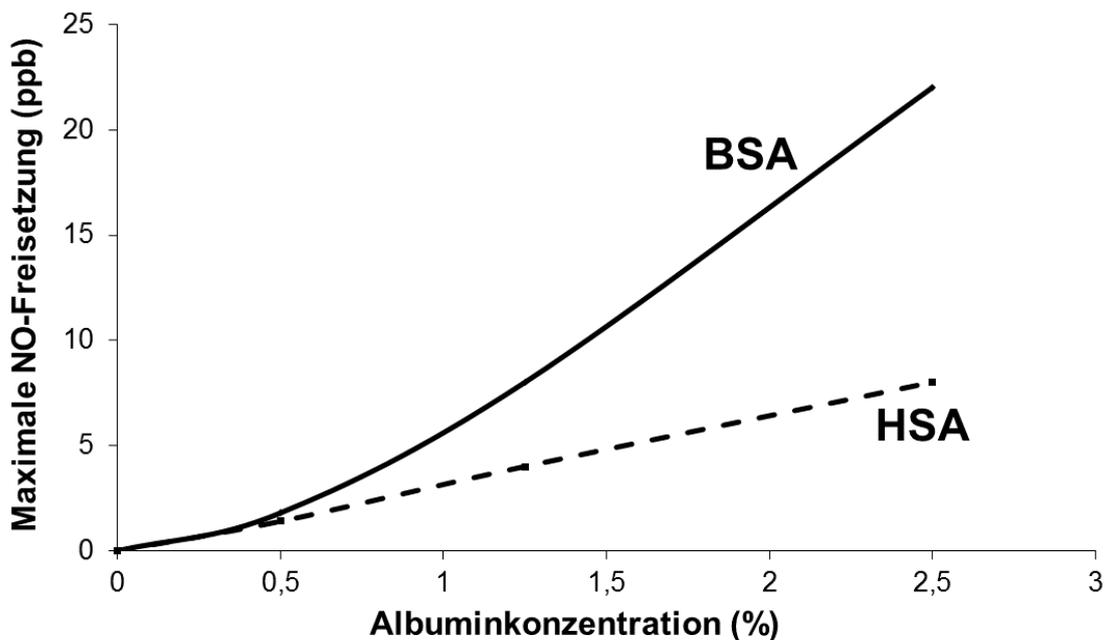


Abbildung 19: CLD: Maximale NO-Freisetzung in Abhängigkeit der Albuminkonzentration nach Zugabe von $70 \mu\text{M}$ Nitrit (Bovines Serumalbumin (BSA) - durchgezogene Linie, humanes Serumalbumin (HSA) - gestrichelte Linie). Es zeigt sich eine proportionale Abhängigkeit, wobei BSA bei gleicher Konzentration mehr NO aus Nitrit als HSA umsetzen kann.

Die NO-Freisetzung aus Nitrit wird durch einen niedrigen pH-Wert und durch Beladung des BSAs mit Kupfer verstärkt. Um die Modulation der BSA-getriggerten NO-Freisetzung durch Kupferbeladung des BSAs, Zugabe

von Reduktionsmittel (Asc) und Chelatoren (Neo, DETC), sowie durch BSA-Alkylierung (NEM) zu analysieren, wurden Versuche in der CLD durchgeführt. Ihre Zusammenfassung ist in Abbildung 20 dargestellt. Repräsentative Echtzeit-Aufzeichnungen der entsprechenden CLD-Versuche sind weiter unten exemplarisch abgebildet.

Bei Zugabe von Nitrit zu BSA (BSA + Ni) resultierte eine NO-Freisetzung, welche durch Ascorbat (BSA + Ni + Asc) nicht maßgeblich erhöht werden konnte. Durch DETC-Gabe (BSA + Ni + DETC) konnte eine Herabsetzung der NO-Freisetzung erzielt werden. Wenn Proben mit NEM (Thiolgruppen-Alkylierung) vorbehandelt wurden, resultierte keine nennenswerte NO-Freisetzung (NEM-BSA + Ni). Im sauren Milieu war die NO-Freisetzung durch BSA deutlich erhöht (BSA + Ni bei pH 6,5). Die mit Kupfer beladene BSA-Proben ("BSA-Cu") sind rechts des Doppelstrichs dargestellt. Hier resultierte bei Nitritgabe eine NO-Freisetzung (BSA-Cu + Ni), welche mit dem nativen BSA (BSA + Ni) vergleichbar war. Durch Zugabe von Ascorbat (BSA-Cu + Ni + Asc) resultierte eine deutlich erhöhte NO-Freisetzung. Mit DETC (BSA-Cu + Ni + Asc + DETC) ließ sich die NO-Freisetzung wieder auf das Niveau vor der Ascorbatgabe herabsetzen. BSA-Fähigkeit, Nitrit zu reduzieren, wurde durch eine NEM-Vorbehandlung also fast vollkommen blockiert; im sauren Milieu konnte BSA vermehrt NO freisetzen, dies wurde durch Ascorbatgabe nicht maßgeblich erhöht. Beim BSA-Cu war die NO-Freisetzung ohne Reduktionsmittel mit der des nativen BSAs vergleichbar. Wurde jedoch Ascorbat addiert, so resultierte ein deutlicher Anstieg, welcher beim nativen BSA nicht erreicht werden konnte.

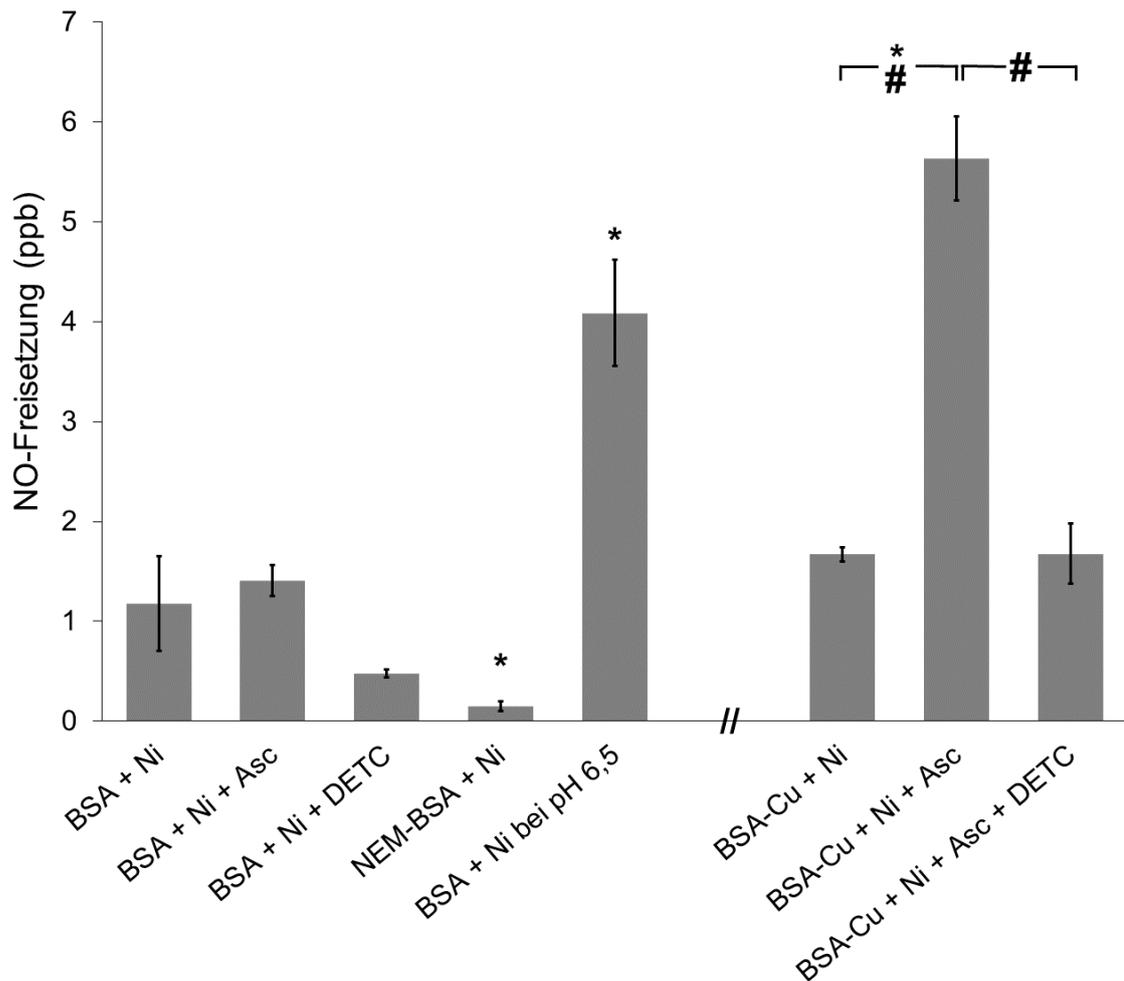


Abbildung 20: CLD: Übersicht über die durchschnittliche NO-Freisetzung unter verschiedenen Versuchsbedingungen. BSA ist in der Lage, Nitrit zu NO umzusetzen, was durch Ascorbat nicht maßgeblich verstärkt, durch den Chelator DETC jedoch unterdrückt wird. Durch eine NEM-Vorbehandlung wird die NO-Freisetzung fast vollständig blockiert. Beim pH-Wert 6,5 ist eine deutliche Steigerung der NO-Freisetzung zu sehen. Beim BSA-Cu (rechts des Doppelstrichs) resultiert eine NO-Freisetzung aus Nitrit, welche mit der des nativen BSAs zunächst vergleichbar ist. Bei Zugabe von Ascorbat wird jedoch ein deutlicher Anstieg verzeichnet, welcher durch DETC auf das ursprüngliche Niveau gebracht werden kann (BSA - 2%, Ni - Nitrit (10 μ M), Asc - Ascorbat (100 μ M), NEM - N-Ethylmaleimid (vorbehandelt), DETC - Diethyldithiocarbamat-Trihydrat (dreifach 100 μ M), BSA-Cu + Asc - auf 300 μ M Cu bezogen, vertikale Balken repräsentieren \pm 1 Standardabweichung, # - $p < 0.05$, * - $p < 0,05$ verglichen zu BSA + Ni (Statistischer Test: Student T-Test durchgeführt mit Excel).

Exemplarische Darstellung der einzelnen CLD-Ergebnisse. Bei Zugabe von Nitrit in die Reaktionskammer der CLD, welche eine 2%-ge BSA-Lösung bei physiologischem pH-Wert enthielt, resultierte eine NO-Freisetzung (Abbildung 21).

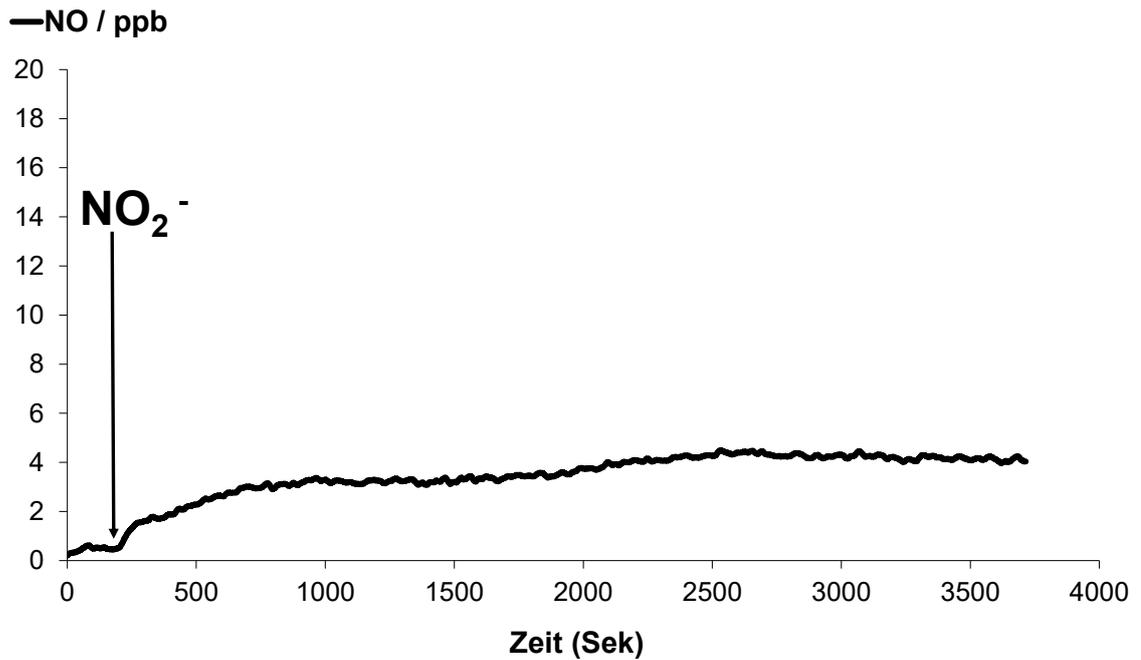


Abbildung 21: CLD: Zugabe von Nitrit (NO_2^- , $10 \mu\text{M}$) in die Reaktionskammer mit einer 2%-gen BSA-Lösung beim pH-Wert von 7,5 bewirkt eine NO-Freisetzung ($37 \text{ }^\circ\text{C}$, Antischäumer).

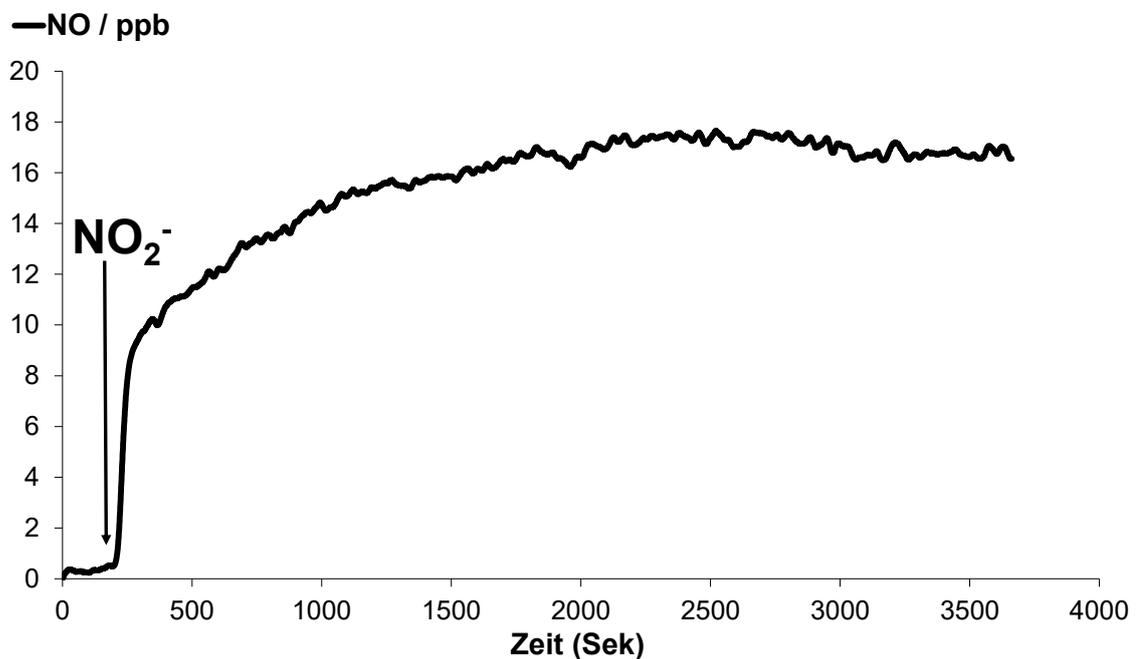


Abbildung 22: CLD: Zugabe von Nitrit (NO_2^- , $10 \mu\text{M}$) in die Reaktionskammer mit einer 2%-gen BSA-Lösung beim pH-Wert von 6,5 bewirkt eine deutlich stärkere NO-Freisetzung als beim physiologischen pH-Wert ($37 \text{ }^\circ\text{C}$, Antischäumer).

Bei Zugabe von Nitrit in die Reaktionskammer der CLD, welche eine 2%-ge

BSA-Lösung bei saurem pH-Wert enthielt, resultierte eine deutlich stärkere NO-Freisetzung (Abbildung 22).

Bei den BSA-Proben, welche mit Kupfer beladen worden sind, ließ sich ein initialer NO-Anstieg nach Nitritgabe feststellen, welcher mit dem des nativen BSAs vergleichbar war. Durch Zugabe von Ascorbat konnte eine kupferabhängige Steigerung der Freisetzung beobachtet werden (siehe Abbildung 23 und weiter unten). Die NO-Freisetzung konnte durch den unspezifischen Chelator Diethyldithiocarbamat-Trihydrat (DETC) auf das Niveau vor Ascorbatgabe gebracht werden.

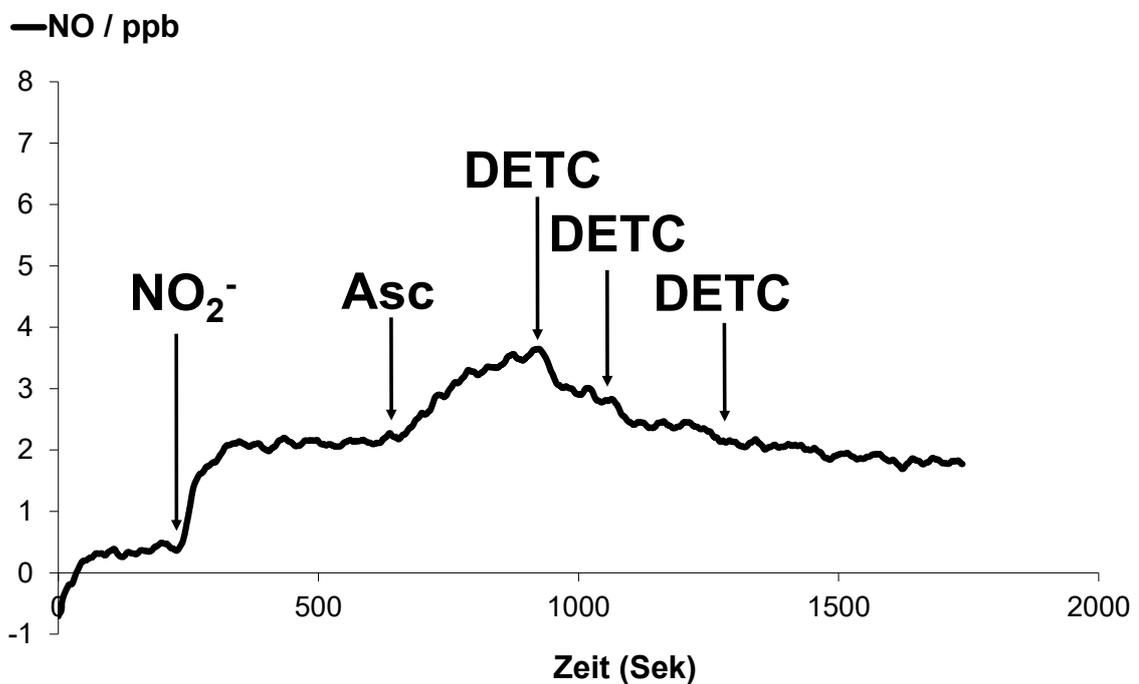


Abbildung 23: CLD: Bei Zugabe von Nitrit (NO_2^- , (10 μM) zu BSA- Cu^{2+} (BSA: 2,1%, Cu: 75 μM) resultiert eine NO-Freisetzung, welche durch Ascorbat (Asc, 100 μM) gesteigert werden kann. Durch 3-malige Gabe von Diethyldithiocarbamat-Trihydrat (DETC, 100 μM) wird die Reaktion auf das Niveau vor Ascorbatgabe gebracht (37 °C, Antischäumer).

Dasselbe Prinzip ließ sich auch bei höheren Kupferkonzentrationen (150 μM und 300 μM) bei gleichbleibender BSA-Konzentration (2%) feststellen (siehe Abbildung 24 und Abbildung 25). Hier wurde ebenso ein initialer Anstieg durch Nitritgabe festgestellt (vergleichbar mit Abbildung 23).

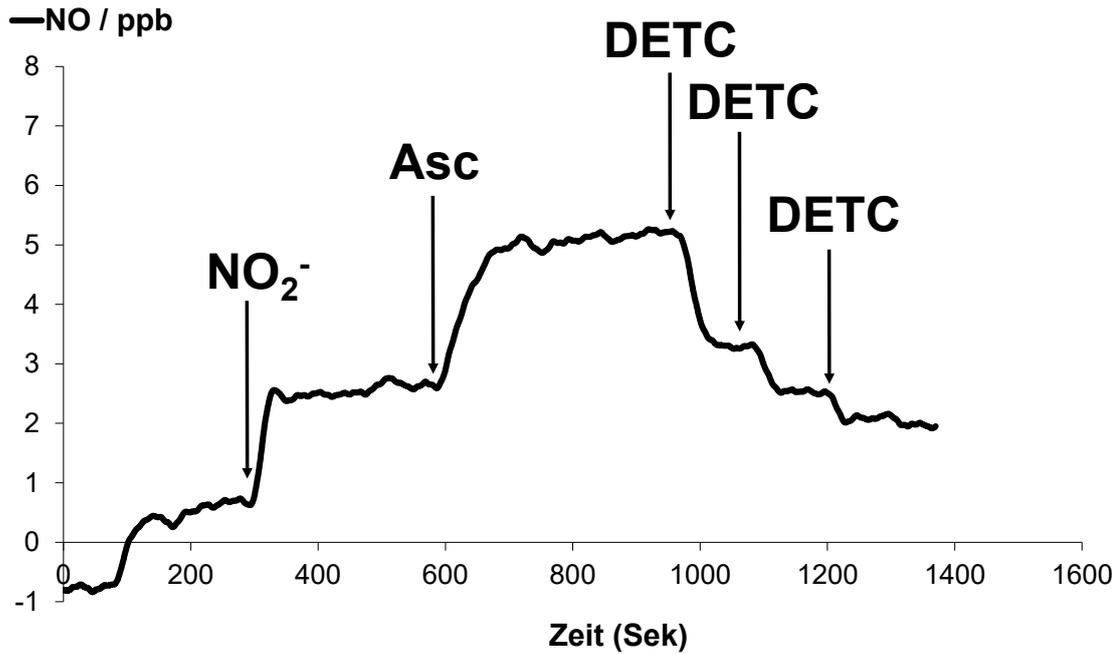


Abbildung 24: CLD: Bei Zugabe von Nitrit (NO_2^- , $10 \mu\text{M}$) zu BSA-Cu^{2+} (BSA: 2,1%, Cu: $150 \mu\text{M}$) resultiert eine NO-Freisetzung, welche durch Ascorbat (Asc, $100 \mu\text{M}$) gesteigert werden kann. Durch 3-malige Gabe von Diethyldithiocarbamat-Trihydrat (DETC, $100 \mu\text{M}$) wird die Reaktion auf das Niveau vor Ascorbatgabe gebracht (37°C , Antischäumer).

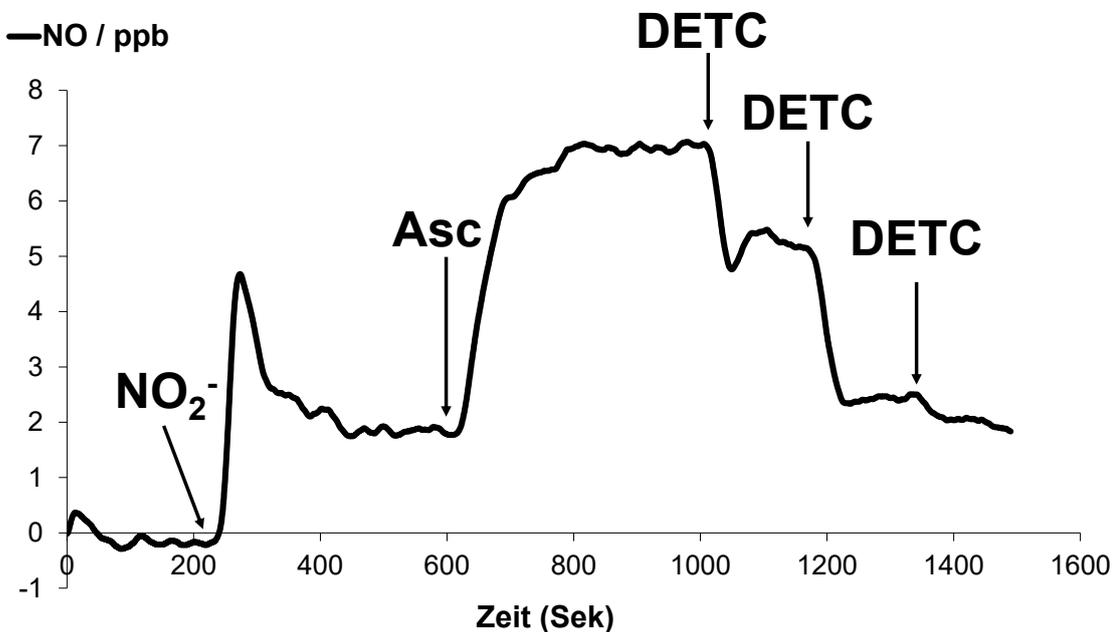


Abbildung 25: CLD: Bei Zugabe von Nitrit (NO_2^- , $10 \mu\text{M}$) zu BSA-Cu^{2+} (BSA: 2,1%, Cu: $300 \mu\text{M}$) resultiert eine NO-Freisetzung, welche durch Ascorbat (Asc, $100 \mu\text{M}$) deutlich gesteigert werden kann. Durch 3-malige Gabe von Diethyldithiocarbamat-Trihydrat (DETC, $100 \mu\text{M}$) wird die Reaktion auf das Niveau vor Ascorbatgabe gebracht (37°C , Antischäumer).

Durch Ascorbatgabe konnte dann ein kupferkonzentrationabhängiger Anstieg auf +2 bzw. + 4-5 ppb erreicht werden, welcher wiederum durch DETC auf das Niveau vor der Ascorbatgabe gebracht werden konnte. Ascorbat konnte also bei BSA-Cu²⁺ die NO-Freisetzung in Abhängigkeit von der Kupferkonzentration steigern.

In der Abbildung 26 ist exemplarisch dargestellt, dass bei der gleichzeitigen Gabe von Nitrit und Ascorbat zu BSA-Cu (BSA - 2,1%, Cu - 600 µM) ein Maximum der NO-Freisetzung von etwa 35 ppb erreicht werden konnte. Auch hier konnte die NO-Freisetzung mit DETC herabgesenkt, jedoch nicht gänzlich unterbunden werden. Gleichzeitige Gabe von Nitrit und Ascorbat zum BSA-Cu führte zu einer deutlich höheren NO-Freisetzung, als sukzessive Gaben derselben Reagenzien.

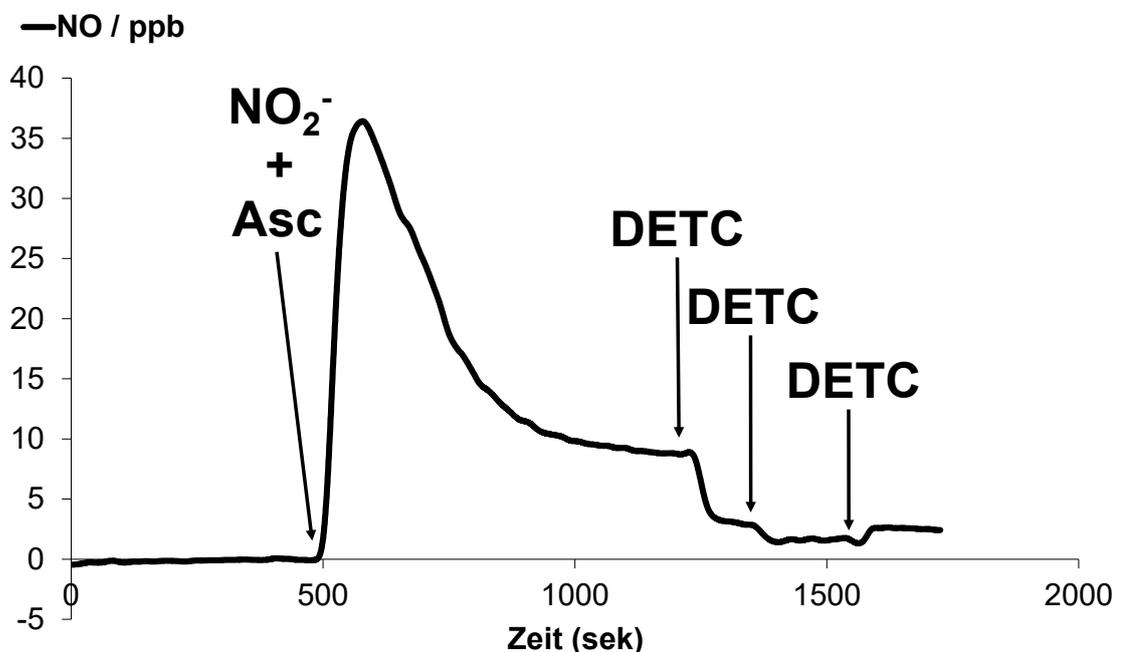


Abbildung 26: CLD: Durch die gleichzeitige Zugabe von Nitrit (NO₂⁻, 10 µM) und Ascorbat (Asc, 100 µM) zu BSA-Cu²⁺ (BSA: 2,1%, Cu: 600 µM) steigt die NO-Freisetzung stark an. Durch 3-malige Gabe von Diethyldithiocarbamat-Trihydrat (DETC, 100µM) wird die Freisetzung unterdrückt (37 °C, Antischäumer).

Abbildung 27 zeigt, dass Glutathion (GSH) die NO-Freisetzung durch BSA-Cu (BSA - 2%, Cu - 600 µM) ebenfalls steigern konnte. Neocuprion setzte die darauffolgende NO-Freisetzung rapide herab.

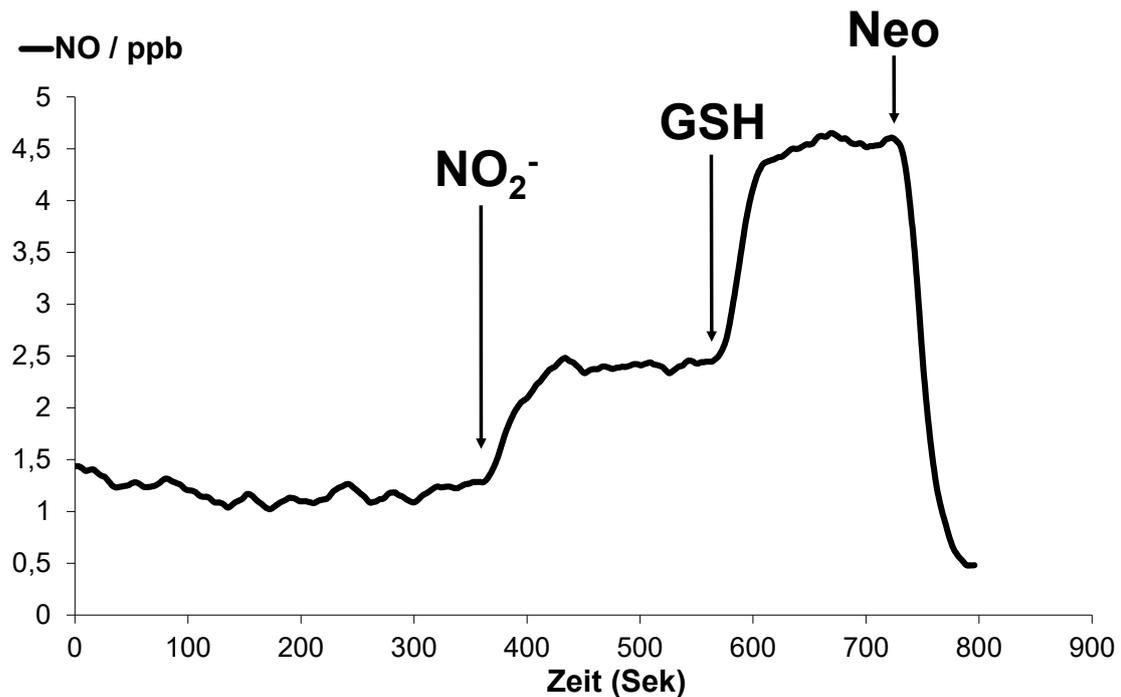


Abbildung 27: CLD: In die Reaktionskammer mit BSA- Cu^{2+} (BSA: 2%, Cu: 600 μM) wird Nitrit (NO_2^- , 10 μM) injiziert, was zu einer NO-Freisetzung führt. Nachfolgende Injektion von Glutathion (GSH, 25 μM) verstärkt die NO-Freisetzung, durch Neocuproin (Neo, 100 μM) wird die Reaktion unterbunden (37 °C, Antischäumer).

In Abbildung 28 ist erneut die NO-Freisetzung bei Zugabe von Nitrit zu BSA dargestellt. Neocuproin (Neo) konnte die NO-Freisetzung nur leicht unterbinden. In Abbildung 29 wurde der gleiche Versuch mit BSA durchgeführt, welches vorher mit dem Alkylanz N-Ethylmaleimid (NEM) vorbehandelt wurde. Dieses Reagenz blockiert die Thiolgruppe des BSAs. Es resultierte eine im Vergleich deutlich niedrigere NO-Freisetzung, welche durch Neocuproin (Neo, 100 μM) nicht verändert werden konnte. Durch eine NEM-Vorbehandlung konnte die Nitritreduktaseaktivität des BSAs also herabgesetzt werden.

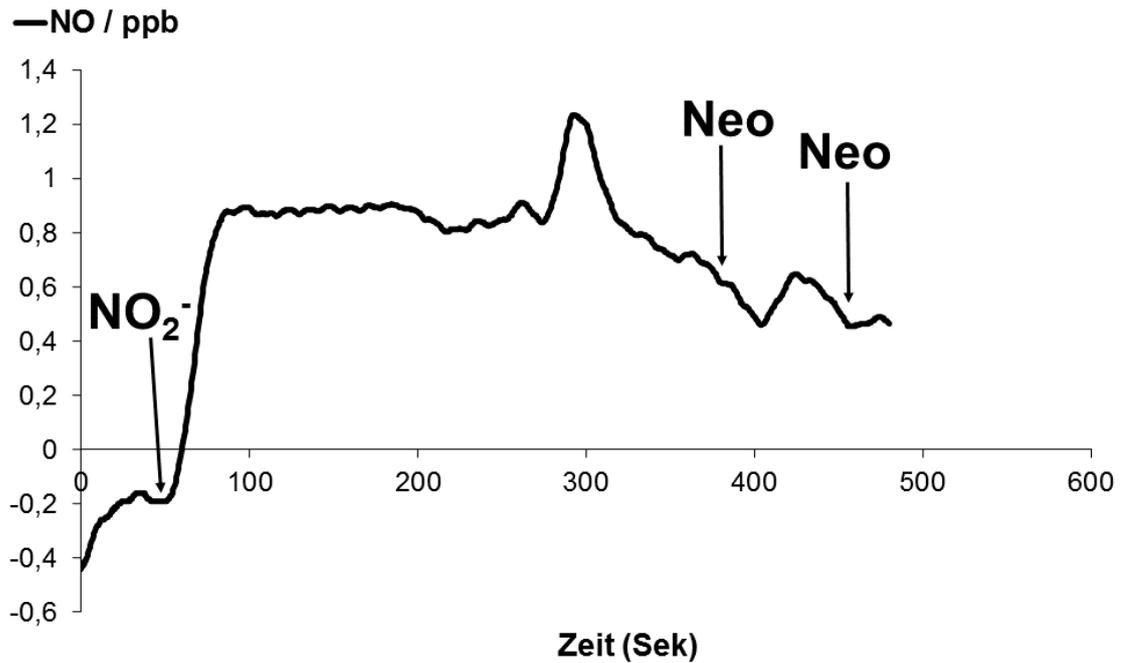


Abbildung 28: CLD: Zum BSA (2%) wird Nitrit (NO_2^- , 10 μM) hinzugegeben, was zu einer NO-Freisetzung führt. 2-malige Gabe von Neocuproin (Neo, je 100 μM) setzt die NO-Freisetzung nicht wesentlich herab (37 °C, Antischäumer).

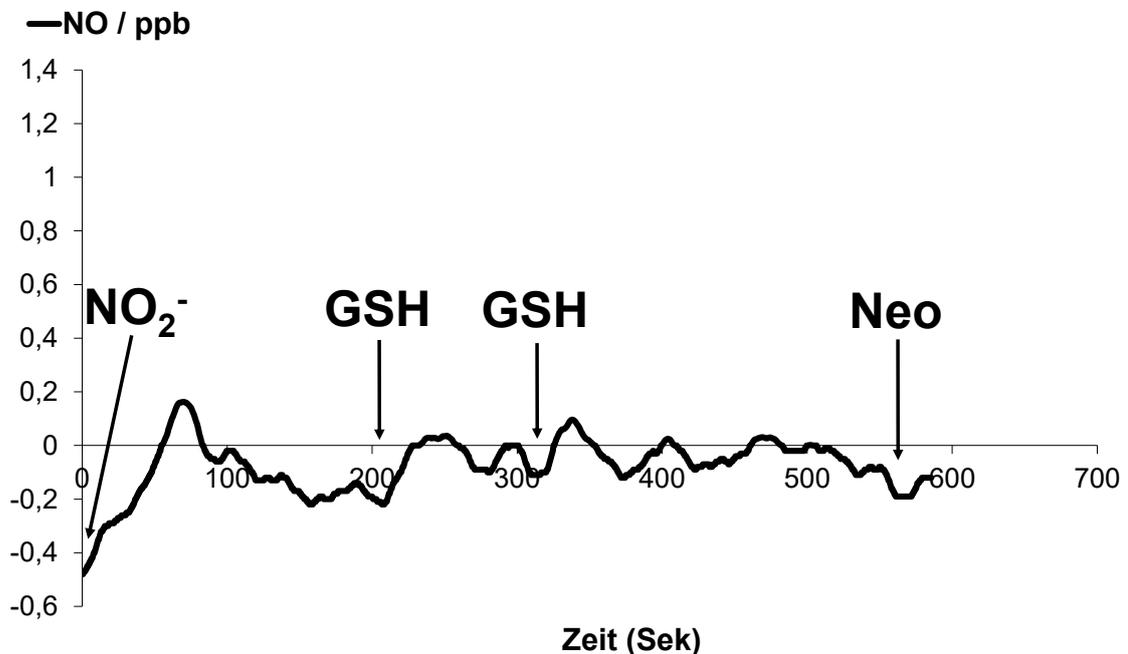


Abbildung 29: CLD: Zum mit NEM vorbehandelten BSA (2%) wird Nitrit (NO_2^- , 10 μM) hinzugegeben. Es resultiert nur eine sehr geringe NO-Freisetzung. Neocuproin (Neo, 100 μM) verändert diese nicht (37 °C, Antischäumer).

5 Diskussion

Die Forschung der letzten Jahre belegte wiederholt, dass Nitrit *in vivo* zu NO und anderen aktiven Stickoxiden umgesetzt werden kann. Verschiedene Entstehungswege sind beschrieben worden, wobei eisenhaltige Proteine wie Hämoglobin, Myoglobin und andere dabei eine wichtige Rolle spielen [27]. Während NO-Synthasen für die NO-Generierung auf Sauerstoff angewiesen sind, ist die nicht-enzymatische Entstehung des NOs aus Nitrit unter hypoxischen Bedingungen begünstigt. Dies legt eine besondere Bedeutung des Nitrits im ischämischen Stoffwechsel nahe, da eine vermehrte NO-Bereitstellung in diesem Zusammenhang eine protektive Wirkung hat [30].

Kupferhaltige Nitritreduktasen sind bakterielle Enzyme, die, durch den Wechsel der Valenz ihres Kupferatoms in Anwesenheit von Reduktionsmitteln, ein Elektron für die Nitritreduktion zu NO bereitstellen können [107]. Ihre Existenz wirft die Frage auf, in wie fern proteingebundenes (oder auch freies) Kupfer bei der Nitritreduktion *in vivo* eine Rolle spielt. Bei Ischämie mit einhergehender Azidose [108] sowie bei oxidativem Stress [109] dissoziieren die im Plasma normalerweise an Proteine gebundene Kupferionen. Dadurch könnten sie, ähnlich wie die Kupferatome der Nitritreduktasen, eine Nitritreduktion bewirken. Aber auch an Proteine gebundenes Kupfer könnte die Nitritreduktion zu NO katalysieren.

Kupfer kann von seinen Trägerproteinen dissoziieren. Abbildung 6 zeigt, dass beim physiologischen pH-Wert BSA-Cu dauerhaft stabil ist. Durch einen pathologischen pH-Wert dissoziierte Kupfer von BSA und konnte mittels ICP-MS nachgewiesen werden (Abbildung 7). Verantwortlich hierfür ist wahrscheinlich die durch Azidose hervorgerufene Modifikation der Kupferbindungsstelle der N-Region des BSA-Moleküls, welche für den Transport der Metalle, unter Anderem auch Kupfer, verantwortlich ist [96]. Das unter solchen Bedingungen entstehende *ischemia-modified albumin* ist ein Marker für Ischämie von verschiedenen Geweben [90] und hat dadurch eine direkte klinische Relevanz. Die hier modellierte Dissoziation des Kupfers vom Albumin führt zur Generierung von freiem Kupfer in wässriger Lösung, mit all den Konsequenzen, die es für die Nitritreduktion hat

(siehe weiter unten, sowie Abbildungen 15 bis 18).

Auch durch andere Einwirkungen konnte Kupfer von BSA getrennt werden. Abbildung 8 zeigt, dass durch oxidativen Stress Kupfer von BSA dissoziieren kann. Abbildung 9 zeigt allerdings, dass nicht alle hier durchgeführte Maßnahmen das BSA-Molekül dauerhaft schädigen und für eine permanente Dissoziation sorgen. So war es möglich, durch Azidose geschädigtes BSA nach Neutralisierung erneut mit Kupfer zu beladen. Nach Inkubation mit SIN-1 sowie nach Schädigung mittels Fenton-Reaktion war eine Restitution mit Kupfer jedoch nicht möglich. Man kann daher davon ausgehen, dass der pH-induzierten Dissoziation des Kupfers eine reversible Veränderung der Kupferbindungsstellen des BSAs zur Grunde liegt, während durch SIN-1 und die Fenton-Reaktion eine irreversible Zerstörung erfolgt.

Insbesondere im Rahmen eines Reperfusionsschadens sind diese Ergebnisse von Bedeutung. Sie demonstrieren die Anfälligkeit des BSA-Moleküls gegenüber den während einer Ischämie vorliegenden Stressoren, zeigen aber, dass BSA sich von bestimmten Einwirkungen erholen und während der Reperfusionsphase erneut Kupferionen binden kann. Damit kann das BSA-Molekül und insbesondere der BSA-Cu²⁺-Komplex als ein Sensor im Ischämienstoffwechsel betrachtet werden.

Kupfer kann Nitrit reduzieren. In einer Reihe von weiteren Versuchen untersuchten wir die Interaktion von Kupfer, Nitrit, Ascorbat und Neocuproin in wässriger Lösung und ohne das Mitwirken von BSA. Die Abbildungen 14 und 15 zeigen, dass im sauren Milieu eine spontane Reduktion des Nitrits zu NO erfolgte, während Nitrit bei einem pH-Wert von 7,4 stabil blieb. Interessanterweise konnte die NO-Generierung im sauren Milieu durch Zugabe von Ascorbat zwar nicht signifikant erhöht werden, jedoch durch Neocuproin tendenziell unterbunden werden (Abbildung 16). Da Neocuproin ein spezifischer Cu¹⁺-Chelator ist, deutet dieser Befund auf eine Kupferkontamination hin, welche ein häufiges Problem bei Laborarbeiten darstellt. Kupfer wird bei der Herstellung von vielen Utensilien benutzt, es ist daher sehr schwer, gänzlich kupferfrei zu arbeiten [1]. Nicht nur bei den Untersuchungen zur Kupferchemie, sondern auch bei vielen anderen Analysen muss deshalb auf eine solche Kontamination geachtet werden.

Des Weiteren ist in der Abbildung 16 zu sehen, dass erst durch Zugabe von Kupfer und einem Reduktionsmittel (Ascorbat) eine vielfach höhere NO-Freisetzung resultierte. Diese wurde durch Neocuproin auf das Ausgangsniveau herabgesetzt, was den kupferspezifischen Effekt der hohen NO-Freisetzung noch einmal belegt. Da eine ganz andere Ordnung der NO-Freisetzung erreicht werden konnte, ist freies Kupfer als ein sehr potenter Nitritreduktor anzusehen.

In Abbildung 17 erfolgte bei einem sauren pH-Wert ein kleiner Anstieg der NO-Freisetzung nach Zugabe von Nitrit und vor Zugabe von Kupfer. Während jedoch Nitrit zusammen mit Cu^{2+} zu keiner vermehrten NO-Freisetzung führte, wurde bei der Zugabe von Cu^{1+} eine sehr stark erhöhte NO-Freisetzung erreicht. Dieser Peak wurde durch Neocuproin rasch unterbunden. Abbildung 18 zeigt ebenso, dass, auch ohne Zugabe von Ascorbat, Cu^{1+} im Gegensatz zu Cu^{2+} in der Lage war, eine etwa 50-fache NO-Freisetzung gegenüber der Kontrolle zu erzeugen. Diese Ergebnisse belegen die Fähigkeit des freien Kupfers, im wässrigen Milieu Nitrit zu NO zu reduzieren. Dafür muss Kupfer im reduzierten Zustand vorliegen (Cu^{1+}), was in Abbildung 18 bei einem pathologischen pH noch mal gezeigt ist. Diese Versuche ahmen die Bedingungen im ischämischen Gewebe nach, wo Albumin durch Azidose die Fähigkeit zur Bindung des Kupfers verliert. Obwohl Kupfer in solchen Situationen bekannterweise toxisch sein kann [110], ist hier durch die erhöhte NO-Freisetzung ein Hinweis auf einen kompensatorischen, protektiven Effekt gezeigt worden. Bei Vorhandensein von Reduktoren kann Kupfer den NO-Spiegel erhöhen und durch die damit einhergehende Vasodilatation die Durchblutung im ischämischen Gebiet verbessern. Die während der Hypoxie vorherrschende Azidose würde die NO-Freisetzung unter diesen Bedingungen weiter steigern. Damit könnte freiem Kupfer insbesondere während einer Perfusionsstörung neben einer toxischen Komponente auch eine protektive Rolle *in vivo* zukommen.

BSA kann als eine Nitritreduktase agieren. Die im Unterabschnitt 4.3 dargestellten Versuche gingen einen Schritt weiter, indem sie die Fähigkeit des BSAs, Nitrit zu NO zu reduzieren direkt in der CLD untersuchten. In Abbildung 19 ist die konzentrationsabhängige Fähigkeit des Albumins dargestellt, die NO-Freisetzung

aus Nitrit zu katalysieren. Interessanterweise war dabei die Potenz des HSAs im Vergleich zu BSA niedriger. In diesem Zusammenhang ist Tryptophan als eine wichtige Aminosäure zu nennen - sie ist beim BSA zweifach, beim HSA jedoch nur einfach vorhanden [111, 112]. Das Tryptophan des BSAs kann durch Nitrit nitrosiert werden, wodurch Nitrit selbst abgefangen wird [113]. Im Gastrointestinaltrakt scheint dies primär der Neutralisierung der kanzerogenen Wirkung von Nitrit geschuldet zu sein [114]. So konnte die Entstehung der kanzerogenen Verbindungen durch Aminosäurengemische und BSA *in vivo* vermindert werden [115], was in Gesamtschau der Literatur zumindest zum Teil durch Nitrosierung des Tryptophans zu erklären ist. Auf der anderen Seite ist Tryptophan auch als ein Elektronendonator bekannt und könnte daher durchaus eine Rolle bei der BSA-katalysierten Nitritreduktion spielen [116]. Dafür spricht die Tatsache, dass auch bei einer Blockade der Thiolgruppe des BSAs mit NEM die NO-Freisetzung nicht vollständig unterdrückt werden konnte (s.u.). Weitere Untersuchungen sind notwendig um eine mögliche Modulation der NO-Freisetzung durch gezielte Tryptophan-Blockade zu demonstrieren.

Bei Zugabe von Nitrit in die Reaktionskammer mit einer BSA-Lösung resultierte bei einem physiologischen pH-Wert eine deutliche und reproduzierbare NO-Freisetzung (siehe Abbildungen 20 und 21). Durch Ascorbat wurde diese basale NO-Freisetzung deutlich, wenn auch nicht signifikant, erhöht; durch den Chelator DETC konnte sie jedoch unterbunden werden. Dies spricht für eine spontane Kupferaktivität des nativen BSAs hin. Offensichtlich ist auch ohne externe Beladung BSA-eigenes Kupfer an der Reaktion beteiligt. Im Vergleich zum physiologischen pH-Wert, war die Freisetzung bei einem pH-Wert von 6,5 deutlich stärker ausgeprägt (Abbildungen 20 und 22). In Abbildung 7 wurde bereits gezeigt, dass bei solchen pH-Werten etwa 45% des Kupfers vom BSA dissoziieren und frei in der Lösung vorliegen. Eines der Mechanismen, wodurch Kupfer zu einer erhöhten Freisetzung des NOs bei Azidose zumindest *in vitro* führen kann, ist also die Dissoziation des Kupfers vom BSA, wodurch frei vorliegendes Cu^{1+} vermehrt Nitrit zu NO umsetzen kann. Dieser Versuchsaufbau ahmt die Bedingungen in einem Ischämiegebiet nach, wo *ischemia modified albumin* entsteht, welches einerseits als Marker der Ischämie, andererseits aber auch als Mitauslöser der toxischen Wir-

kung agieren kann, da dissoziiertes Kupfer (und im Übrigen auch andere Metalle) für die hypoxischen Schäden mitverantwortlich sein kann [110]. So fand eine Studie, dass freies Kupfer und Eisen Marker für das Ausmaß des Gewebeschaadens darstellen könnten [108]. Unabhängig davon belegen diese Versuche, dass sowohl BSA als auch frei vorliegendes Cu^{1+} Nitritreduktoren *in vitro* sind. Interessanterweise ist aber auch Albumin selbst ein Ziel des NOs und kann durch NO nitrosiert werden. So kann Albumin NO speichern und bei Bedarf abgeben [117].

Um die Rolle der Thiolgruppe für die Reduktionsfähigkeit des BSAs zu untersuchen wurden Versuche mit NEM, einem Thiolgruppenalkylanz, durchgeführt (siehe Abbildungen 20, 28 und 29). Abbildung 28 zeigt, dass nach Zugabe von Nitrit zum BSA eine NO-Freisetzung resultierte. Die Zugabe des Chelators Neocuproin setzte diese Freisetzung leicht herab. Im gleichen Versuch wurde mit NEM vorbehandeltes BSA (NEM-BSA) untersucht (Abbildung 29). Hier resultierte nach Nitritzugabe keine nennenswerte NO-Freisetzung, was eine Schlüsselrolle der durch NEM blockierten Thiolgruppe des BSAs nahelegt. Die Zugabe des Reduktionsmittels Glutathion (welches neben Ascorbat Cu^{2+} zu Cu^{1+} reduzieren kann, abgekürzt GSH [118]) konnte interessanterweise diese NO-Freisetzung nicht weiter steigern. Auch Neocuproin konnte die Reaktion nicht modulieren. Eigentlich wäre hier zu erwarten gewesen, dass GSH durch seine Thiolgruppen eine NO-Freisetzung ermöglichen würde. Hier könnte eine NEM-Verunreinigung für die Unfähigkeit des GSHs, NO-Freisetzung zu induzieren, verantwortlich sein. Trotz mehrfacher Aufreinigung vor der Injektion in die CLD, könnten NEM-Reste immer noch in der Probe vorhanden sein. Dadurch könnten bei Zugabe von GSH auch dessen Thiolgruppen sofort blockiert werden. Diese Erklärung wird auch dadurch gestützt, dass in Abbildung 27, bei der keine Vorbehandlung mit NEM erfolgte, GSH zu einem deutlichen Anstieg der NO-Freisetzung führte. Versuche von Erturk *et al.* zum Verhalten der Thiolgruppen in hypoxischen Geweben *in vivo* konnten anhand von Acetylcystein (synthetisch hergestelltes Medikament, welches Thiolgruppen parat stellt, ACC) zeigen, dass Thiole gegen *reperfusion injury* nach Knieersatzoperationen schützen können [119]. Dies steht im Einklang mit dem BSA als dem am stärksten antioxidativ-wirkenden Protein des Blutplasmas [95] und deutet in Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen auf die zentrale Stellung dieser Thiol-

gruppe hin.

BSA-Cu ist eine potente Nitritreduktase. Im nächsten Schritt wurde die Wirkung BSA-Cu untersucht. Hierfür wurde erneut BSA mit Kupfer beladen, nun allerdings in deutlich höheren Konzentrationen. Versuche mit Kupfer und bovinem Serumalbumin zeigen im Einklang mit früheren Arbeiten die Fähigkeit des BSAs, mit Cu^{2+} beladen zu werden (BSA-Cu, [93]). Das Interessante hieran ist jedoch, dass BSA weit in den supraphysiologischen Bereich (bis 300 μM) mit Kupfer Komplexe bilden konnte. Diese BSA- Cu^{2+} -Komplexe konnten bei 525 nm photometrisch gemessen werden (Abbildung 5). Bei niedrigen Konzentrationen ist die ICP-MS der photometrischen Methoden klar überlegen, da bei photometrischen Messung erst bei Kupferkonzentrationen ab etwa 30 - 40 μM eine klare lineare Abhängigkeit zu sehen war. Normkonzentrationen des freien Kupfers (engl. *serum free copper*) befinden sich beim Menschen im Bereich 1,6 - 2,4 μM [120]. Obwohl der Begriff *serum free copper* häufig benutzt wird, ist es wohl zutreffender, dieses Kupfer als *nonceruloplasmin bound copper* zu bezeichnen, da es nicht frei im Blut vorliegt, sondern zum größten Teil an Albumin gebunden ist [121]. Die physiologische Gesamtkonzentration des Kupfers im menschlichen Blutes beträgt inklusive des am Ceruloplasmin gebundenen Kupfers 10 - 22 μM [78]. Somit ist die Konzentration des Kupfers am nativen, nicht mit Kupfer beladenem BSA vergleichbar mit der Konzentration des *nonceruloplasmin bound copper in vivo*.

In weiteren Versuchen wurde 2%-iges BSA mit Kupfer (75 μM) beladen und in der CLD untersucht. Dabei konnten zwei Komponenten der NO-Freisetzung festgestellt werden: eine BSA-abhängige und eine kupferabhängige. In der Abbildung 23 ist zu sehen, dass nach Zugabe von Nitrit zum BSA-Cu ein Anstieg der NO-Freisetzung folgte. Dieser Anstieg war mit dem initialem Anstieg des nativen BSAs vergleichbar (BSA-abhängige Komponente, siehe auch Abbildung 21). Bis hierhin schien die Tatsache, dass BSA mit Kupfer beladen wurde, keine Rolle zu spielen. Nach Zugabe von Ascorbat jedoch folgte ein erneuter Anstieg, welcher durch DETC unterbunden werden konnte (kupferabhängige Komponente). Erhöhte man nun die Kupferkonzentration bei konstanter BSA-Konzentration, so blieb der erste, BSA-abhängige Anstieg nach initialer Nitritgabe gleich. Der zweite An-

stieg nach Ascorbatgabe wurde jedoch zunehmend größer und korrelierte mit der Kupferkonzentration des BSA-Cu (hier dargestellt bei Kupferkonzentrationen von 150 μM und 300 μM , siehe Abbildungen 24 und 25). Die Nitritreduktaseaktivität des BSA-Cu war also sowohl von der BSA-, als auch von der Kupferkonzentration abhängig, wobei die kupferabhängige Aktivität auf Reduktionsmittel angewiesen war. Diese neue Erkenntnis hat unter bestimmten Umständen auch eine direkte klinische Relevanz (Morbus Wilson, s.u.). Zusammenfassend sind diese Ergebnisse auch in der Abbildung 20 rechts des Doppelstrichs dargestellt, um einen Vergleich mit der Nitritreduktaseaktivität des nativen BSAs zu ermöglichen.

In einem anderen Versuchsaufbau erfolgte die Gabe von Nitrit und Ascorbat zum BSA-Cu gleichzeitig (Abbildung 26). Dies führte zu einem deutlich höheren initialen Peak. Durch mehrfache DETC-Gabe ließ sich die NO-Freisetzung absenken. Offensichtlich war die zeitgleiche Gabe von Nitrit und Ascorbat der Grund für eine so ausgeprägte NO-Freisetzung.

Aufstellung einer allgemeinen Hypothese zum Verhalten des BSAs. Bei der kritischen Auswertung der oben dargestellten Befunde lässt sich eine Hypothese über das Verhalten des Kupfers und des BSAs und die damit verbundene NO-Freisetzung aufstellen. BSA kann mit Kupfer beladen werden, aber auch das native BSA besitzt eine nitritreduzierende Wirkung, die zum Teil durch Kupfer-Chelatoren vermindert werden konnte. Dies deutet zum Einen darauf hin, dass BSA selbst eine Nitritreduktase darstellt, da die Chelation die NO-Freisetzung nicht gänzlich zu unterbinden vermag. Es bedeutet aber auch, dass natives BSA eine relevante Menge an Kupferionen bereits gebunden hat. Bei Zugabe von Reduktionsmitteln steigt jedoch bei diesem Versuchsaufbau die NO-Freisetzung kaum. Daher liegt die Vermutung nahe, dass die beim nativem BSA vorhandene Kupferionen für eine externe Reduktion nicht zur Verfügung stehen. Denkbar ist aber auch, dass diese Kupferionen bereits maximal reduziert im BSA-Molekül vorliegen, sodass durch die exogene Zugabe zusätzlicher Reduktionsmittel kein weiterer Nitritreduktase-Effekt beobachtet werden kann. Als eine weitere aktive Stelle des BSAs ist die Thiolgruppe zu werten. Wird sie durch NEM blockiert, so resultiert bei Nitritgabe nur eine sehr niedrige NO-Freisetzung. Sie spielt für die

Nitritreduktion also eine entscheidende Rolle.

Wird nun das BSA mit Kupfer beladen, so entsteht das BSA-Cu. Bei Nitritgabe resultiert zunächst auch hier eine NO-Freisetzung, die mit der des nativen BSAs vergleichbar ist. Bei Zugabe von externen Reduktionsmitteln erfolgt jedoch eine kupferabhängige Steigerung der NO-Freisetzung, welche durch Chelation unterbunden werden kann. Es muss daher hier vermutet werden, dass die *in vitro* angehangenen Kupferionen eine andere Bindungsqualität zum BSA aufweisen und für die externen Reduktionsmittel verfügbar sind. Durch Beladung des BSA wird also die nitritreduzierende Wirkung des so entstandenen BSA-Cu bei Zugabe von externen Reduktionsmitteln gesteigert.

Diese Befunde können weitreichende Folgen für das Verständnis der nicht-enzymatischen NO-Freisetzung *in vivo* sowohl bei physiologischen als auch bei pathologischen Bedingungen haben. Es ist seit Langem bekannt, dass es Proteine gibt, deren Hauptaufgabe die Reduktion von Nitrit zu NO darstellt - die sog. kupferhaltigen Nitritreduktasen. Gladiwn *et al.* demonstrierten außerdem eindrucksvoll, dass Desoxyhämoglobin eine ähnliche Wirkung haben kann [122]. Hämoglobin besitzt jedoch selbst Bindungsstellen für Metalle, insbesondere für Kupfer [123, 124]. Inkubation von Hämoglobin mit freiem Kupfer führte zur seiner Oxidation, wobei diese Reaktion mit Desoxyhämoglobin mindestens eine Ordnung schneller war, als mit Oxyhämoglobin. Dasselbe ist bei Versuchen mit Myoglobin festgestellt worden: es kann ebenfalls Kupfer binden [125] und durch Kupfer oxidiert werden [126]. Das Kupfertransportprotein Ceruloplasmin hat interessanterweise ebenfalls eine eisenoxidierende Wirkung und wird bei dem Transport aus dem Enterozyten zur Oxidation von drei- zum zweiwertigen Eisen benötigt [76, 127]. Frei in Lösung vorliegende Eisenatome können Kupfer insbesondere im sauren Milieu reduzieren [128], was den Bedingungen bei einer Ischämie bzw. einer *reperfusion injury* nahe kommt. Wie oben beschrieben, können Kupferionen durch Azidose aus ihrer Bindung mit Albumin befreit werden. Unter physiologischen Bedingungen hat Kupfer nach Eisen und Zink die dritt höchste Konzentration im Blut [129] und es gab bereits Hinweise, dass auch die *in vivo* vorhandene Kupfermenge ausreichend ist, um Hämoglobin zu oxidieren [130].

Diese Erkenntnisse legen die Hypothese nahe, dass die in der Literatur mehrfach beschriebene Nitritreduktaseaktivität des Hämoglobins zu mindest zu einem Teil durch das am Hämoglobin gebundene Kupfer mitbedingt sein könnte. Außerdem kann Hämoglobin bei einer Hämolyse aus dem Erythrozyten ins Plasma gelangen und dort mit Kupfer-Ceruloplasmin, Kupfer-Albumin bzw. freiem Kupfer interagieren, wodurch es zur Oxidation des Hämoglobins kommen dürfte. Geschieht dies im Rahmen einer Ischämie bzw. einer *reperfusion injury*, so würde die damit einhergehende Azidose die Reduktion von Nitrit zu NO weiter fördern. Es stellt sich außerdem die Frage, in wie fern alle hier erwähnten Mechanismen sich bei einem Patienten mit Morbus Wilson (Kupferspeicherkrankheit) verändern. Durch die erhöhten Anteil des *nonceruloplasmin bound copper* und den ohnehin bestehenden Gewebsablagerungen, kann die Entstehung von NO aus Nitrit unter Umständen nochmals deutlich gesteigert sein.

Die Versuche mit BSA-Cu als Nitritreduktor können außerdem als ein *in vitro*-Modell für Kupferspeicherkrankheit betrachtet werden. Wie bereits im Unterabschnitt 1.7 erläutert, kommt es bei diesem Krankheitsbild zu Kupfereinlagerungen im Gewebe und zum typischen Bild einer Hepato- und Enzephalopathie. Da Kupfer wegen des defekten Transporters ATP7B nicht in Ceruloplasmin geschleust werden kann, werden weniger Ceruloplasminmoleküle in die Blutbahn sezerniert. Die Kupfergesamtkonzentration im Blut dieser Patienten ist daher zwar gegenüber Gesunden erniedrigt, jedoch ist der Anteil des *nonceruloplasmin bound copper* deutlich erhöht und kann im Bereich jenseits von 3 bis 4 μM liegen (bei Gesunden 1,6 - 2,4 μM). Bei akuter Verschlechterung können aber auch diese Werte deutlich steigen, falls in kurzer Zeit vermehrt Hepatozyten absterben und das im Übermaß gespeicherte Kupfer dabei freigesetzt wird [120, 131]. Leider lässt die Literatur eine genauere Konzentrationsspanne offen und erschwert damit einen Vergleich zu hier benutzten Kupferkonzentrationen und damit eine Aussage über die Repräsentativität unseres Modells. In jedem Fall würde bei erhöhten Spiegeln des *nonceruloplasmin bound coppers* unserer Hypothese zufolge vermehrt NO aus Nitrit entstehen, was allerdings *in vivo* schwer zu untersuchen ist.

Die Literatur zum NO bei Patienten mit Morbus Wilson ist spärlich. So fand Selimoglu *et al.* in einer kleinen Studie eine Erhöhung der NO-Spiegeln bei Kindern

mit Morbus Wilson ($156,8 \pm 28,2$ gegenüber $135,6 \pm 21,17 \mu\text{M}$), obwohl der Unterschied bei einem $n = 20$ nicht signifikant war [132]. Dabei ist anzumerken, dass in dieser (und anderen ähnlichen Studien) die NO-Spiegel aus Nitrit- und Nitratkonzentrationen im Blut der Probanden indirekt abgeleitet wurden. Obwohl die Autoren diese Methode für etabliert halten, gibt es durchaus Zweifel, in wie fern diese Messungen akkurat waren. Zum einen scheint die Nitritkonzentration eher mit der Aktivität der NO-Synthasen zu korrelieren und nicht direkt mit der NO-Konzentration [133]. Bei einer ähnlichen Fragestellung kamen die Autoren ebenfalls zum Schluss, dass die Nitritkonzentration vielmehr mit kurzfristigen Änderungen der regionalen eNOS-Aktivität korreliert und nicht mit dem NO-Spiegel als solchem [134]. Außerdem unterliegen Nitritwerte im Serum extremen Schwankungen aufgrund der mit der Nahrung im Laufe eines Tages aufgenommenen Nitritmengen. Im Lichte der Tatsache, dass Nitrit selbst zunehmend als eine Quelle für NO erkannt wurde, müssen die Ergebnisse der Studie von Selimoglu *et al.* kritisch bewertet werden. Im Zusammenhang mit dieser Promotionsschrift erscheint eine Abschätzung der NO-Spiegel durch Messungen der Nitritkonzentration fragwürdig, auch wenn eine Erklärung für die ggfs. erhöhten NO-Konzentrationen bei Morbus Wilson durch die hier durchgeführten Versuche geliefert werden könnte.

Ein weiteres interessantes Detail ist die Tatsache, dass in einer ebenfalls recht kleinen Studie die Ascorbatspiegel bei Patienten mit Morbus Wilson erniedrigt waren und nach einer Chelatortherapie anstiegen [135]. Es ist bekannt, dass höhere Kupferkonzentrationen zum oxidativen Stress führen, was die erniedrigten Spiegel von Ascorbat (und anderen Antioxidanzien) erklären könnte. Die Ergebnisse dieser Studie könnten aber auch die Hypothese stützen, dass *nonceruloplasmin bound copper* bzw. Albumin-Cu *in vivo* Nitrit zu NO reduziert, sodass Ascorbat im Blut verbraucht wird. Insbesondere, wenn man die Hinweise auf die erhöhten NO-Spiegel bei Morbus Wilson berücksichtigt, können diese Befunde die hier aufgestellte Hypothese stützen. Die Tatsache, dass die erniedrigten Ascorbatspiegel durch eine Chelatortherapie mit Penicillamin stiegen, legt ebenso einen Zusammenhang mit Kupfer und mit Albumin-Cu nahe. Größer angelegte Studien sind notwendig, um diese Vermutungen weiter zu untermauern. Interessant wäre auch eine einhergehende Untersuchung des Penicillamins selbst und seiner Interaktion

mit Ascorbat, Nitrit und NO.

Leider fehlt es auch an Studien, welche die klinisch relevanten Effekte des NOs bei Patienten mit Morbus Wilson untersuchen. Der vermehrte oxidative Stress, welcher durch Kupfer erzeugt wird, aber auch die ggfs. mit Kupfer einhergehende gleichzeitige protektive Wirkung durch das NO stellen die Frage, ob diese Patienten anfälliger für kardiovaskuläre Erkrankungen sind, und ob die mit dieser Erkrankung assoziierten Kardiomyopathie und plötzlicher Herztod eine Folge davon sind [136]. Auf der anderen Seite ist die kardiovaskuläre Protektion durch NO gut belegt [137], falls also die NO-Spiegel bei diesen Patienten tatsächlich erhöht sein sollten, so könnte damit auch ein schützender Effekt einhergehen. Die Pathophysiologie der *reperfusion injury* könnte außerdem bei diesen Patienten durch erhöhte Kupferkonzentration verändert sein. Im Zusammenhang mit den erhöhten Nitritkonzentrationen (und möglicherweise auch NO-Spiegeln) stellt sich die Frage, ob der arterielle Blutdruck im Vergleich zu Gesunden niedriger ist und ob er mit der Kupferkonzentration bzw. Albuminkonzentration korreliert. Noch schwieriger wird die Untersuchung dieser Fragestellungen bei Morbus Menke (hereditärer Kupfermangel) sein, da es zum Einen seltener ist und zum Anderen mit frühen und schweren Verläufen einhergeht [138], welche bei weitem nicht allein auf dem erniedrigten Blutkupferspiegel zurückzuführen sind [139].

Kritische Bewertung der eigenen Ergebnisse. Einige kritische Aspekte zu dieser Promotionsschrift sollen hier zusammenfassend zur Darstellung kommen. So fällt bei der Abbildung 20 auf, dass durch DETC auch bei nativem BSA (also ohne Kupferbeladung) eine Verminderung der NO-Freisetzung möglich war (Probe "BSA + Ni + DETC"). DETC ist auch beim BSA-Cu verwendet worden, um die NO-Freisetzung zu unterdrücken (Probe "BSA-Cu + Ni + Asc DETC"). Vergleicht man diese beiden Balken, so fällt auf, dass DETC beim BSA-Cu nicht in der Lage war, die NO-Freisetzung so weit wie bei nativem BSA zu begrenzen. Denkbare Erklärung wäre eine nicht hinreichende DETC-Dosis, sowie eine Veränderung der Kinetik durch das bei BSA-Cu verwendete Ascorbat. Eine Umverteilung des Kupfers im BSA-Molekül ist ebenfalls eine mögliche Erklärung, insbesondere wenn durch Ascorbat Kupfer vermehrt als Cu^{1+} vorliegt. Hier sind weitere Analysen not-

wendig, um diese Fragen zu klären.

Es stellt sich außerdem die Frage, in welchem Ausmaß die Dissoziation des Kupfers vom BSA eine zur Nitritreduktion notwendige Bedingung darstellt. Dies erscheint zwar nach unseren Analysen logisch, ist jedoch durch das hier verwendete Versuchsdesign nicht zweifelsfrei nachzuweisen. Im Photometer konnte beim physiologischen pH-Wert eine Dissoziation des Kupfers vom BSA durch Neocuproin gezeigt werden, welche durch Ascorbat beschleunigt wurde (siehe Abbildung 11). Da Neocuproin ein spezifischer Cu^{1+} Chelator ist, erscheint die Dissoziation des Kupfers unter diesen Bedingungen eindeutig. Løvstad stellte jedoch fest, dass Zusatz von Ascorbat allein Cu^{2+} nicht zur Dissoziation vom BSA-Molekül zwingt [93]. Obwohl die Zugabe von Neocuproin oder DETC (beides Kupferchelatoren) in der CLD bei mit Kupfer geladenen BSA-Proben stets zur Absenkung der NO-Freisetzung führte, bleibt unklar, ob Kupferionen vorher in Lösung gehen oder erst durch Zugabe von Neocuproin bzw. DETC dem BSA-Molekül entzogen werden. Die Versuche mit dem Kupfer in freier Lösung deuten jedoch ganz klar darauf hin, dass dieser Mechanismus - die ischämie- bzw. stressbedingte Dissoziation von Kupfer - viel wahrscheinlicher ist.

Es konnte außerdem eindeutig gezeigt werden, dass die Reduktion des Cu^{2+} zu Cu^{1+} allein durch Zugabe von Neocuproin und noch vor Zusatz von Ascorbat stattfand, was eine Rolle des BSAs als Autoreduktor des BSA-Cu^{2+} zu BSA-Cu^{1+} nahelegt. Eine der wichtigsten reaktiven Gruppen des BSA-Moleküls ist die freie Thiolgruppe, welche nicht durch Disulfidbrückebildung blockiert ist [88]. In Abbildung 12 ist nach Alkylierung mit NEM eine verminderte Bildung der Neo- Cu^{1+} photometrisch nachgewiesen, was diese Annahme weiter belegt. Obwohl die Wiederholung dieses Versuches zu uneindeutigen Resultaten führte (unter ähnlichen Versuchsbedingungen tauschen die Graphen nach einiger Zeit die Positionen, hier nicht dargestellt) wird diese Annahme weiter durch die Versuche in der CLD gestützt, welche eine deutlich reduzierte NO-Freisetzung nach NEM-Vorbehandlung zeigten. Die Tatsache, dass Kupfer von BSA auch ohne Zugabe von Reduktionsmitteln dissoziieren kann, ist mit einem anderen Chelator - EDTA - in Abbildung 13 gezeigt. Während der Peak bei 525 nm runter geht, steigt die Absorption bei etwa 740 nm (Absorptionspeak der EDTA-Cu-Komplexe), was das

gleichzeitige Abnehmen der Konzentration der BSA-Cu-Komplexe und Zunahme der EDTA-Cu-Komplexe darlegt.

Eine weitere Untersuchung erscheint in diesem Zusammenhang retrospektiv notwendig: die CLD-Analyse eines mit NEM vorbehandelten und mit Kupfer beladenen BSAs (NEM-BSA-Cu). Hierdurch könnte die Rolle der Thiolgruppe bei der Reduktion des geladenen Kupfers untersucht werden. Außerdem wäre eine bessere Aussage über das Zusammenspiel der externen Reduktionsmitteln mit der Thiolgruppe möglich gewesen.

6 Schlussfolgerungen

Mit dieser Promotionsschrift ist eine *bis dato* unbekannte Fähigkeit des Albumins und seines Kupfers zur Nitritreduktion und damit zur NO-Freisetzung *in vitro* gezeigt worden. Die BSA-abhängige Komponente der NO-Freisetzung konnte nur zum Teil durch Chelatoren, jedoch fast vollständig durch die Alkylierung der reaktiven Thiolgruppe des Albumins herabgesetzt werden. Die kupferabhängige Komponente konnte durch kupferreduzierende Substanzen potenziert und durch Chelatoren inhibiert werden. Somit fungiert Albumin selbst als eine Nitritreduktase, was zu den Daten in der Literatur passt, da seine protektive Rolle gegen oxidativen Stress bekannt ist. Es stellt sich die Frage, ob weitere Bestandteile des Albuminmoleküls eine Rolle bei der Nitritreduktion spielen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit können weitreichende Folgen für das Verständnis der physiologischen und pathologischen Prozesse *in vivo* haben. Durch die beschriebenen Eigenschaften von Albumin und Kupfer kann eine protektive Wirkung im ischämischen Gewebe vorliegen; die erhöhte NO-Freisetzung kann somit bei Gefäßverschlüssen (z.B. Infarkten), aber auch bei *reperfusion injury* (z.B. Tourniquet-Syndrome) als ein Anpassungsmechanismus angesehen werden. Vom besonderen Interesse ist die Rolle der beschriebenen Vorgänge bei Störungen des Kupferhaushaltes (Morbus Wilson und Morbus Menke). Einige Versuche in dieser Arbeit stellen ein *in vitro*-Modell der Kupferspeicherkrankheit dar und können einen Beitrag zum Verständnis ihrer Pathophysiologie leisten.

Die Ergebnisse dieser Arbeit beantworten Fragen über die nicht-enzymatische NO-Freisetzung aus Nitrit und sind in der Gesamtschau der Literatur plausibel. Es ergeben sich allerdings weitere, insbesondere klinische Fragestellungen, die soweit nicht Gegenstand der Untersuchungen waren. So muss geklärt werden, zu welchem Anteil eine NO-Freisetzung *in vivo* durch Albumin und andere Plasmaproteine katalysiert wird. Es ist außerdem unklar, in wie fern diese Prozesse durch die erhöhten Spiegel des *nonceruloplasmin bound copper* bei Morbus Wilson verändert sind und ob bei den betroffenen Patienten ein erhöhter NO-Spiegel vorliegt. Schließlich ist zu untersuchen, ob hieraus sich Therapiekonsequenzen in Form von Nitrit oder Reduktionsmitteln ergeben, welche bei angehender Ischämie oder

reperfusion injury gegen die bekannten Folgeerscheinungen Abhilfe verschaffen könnten.

7 Literatur

- [1] Christian Opländer, Julian Rösner, Alexander Gombert, Alexander Brodski, Tatsiana Suvorava, Vera Grotheer, Ernst E. van Faassen, Klaus-Dietrich Kröncke, Georg Kojda, Joachim Windolf, and Christoph V. Suschek. Redox-mediated mechanisms and biological responses of copper-catalyzed reduction of the nitrite ion in vitro. *Nitric Oxide*, 35:152 – 164, 2013.
- [2] R. F. Furchgott and J. V. Zawadzki. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, 288(5789):373–376, Nov 1980.
- [3] L. J. Ignarro, G. M. Buga, K. S. Wood, R. E. Byrns, and G. Chaudhuri. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 84(24):9265–9269, Dec 1987.
- [4] M. Sander, P. G. Hansen, and R. G. Victor. Sympathetically mediated hypertension caused by chronic inhibition of nitric oxide. *Hypertension*, 26(4):691–695, Oct 1995.
- [5] C. Bogdan. Nitric oxide and the immune response. *Nat. Immunol.*, 2(10):907–916, Oct 2001.
- [6] S. K. Choudhari, M. Chaudhary, S. Bagde, A. R. Gadbail, and V. Joshi. Nitric oxide and cancer: a review. *World J Surg Oncol*, 11:118, 2013.
- [7] Ted M. Dawson and Valina L. Dawson. Review: Nitric oxide: Actions and pathological roles. *The Neuroscientist*, 1(1):7–18, 1995.
- [8] L. Ying and L. J. Hofseth. An emerging role for endothelial nitric oxide synthase in chronic inflammation and cancer. *Cancer Res.*, 67(4):1407–1410, Feb 2007.
- [9] H. Strijdom, N. Chamane, and A. Lochner. Nitric oxide in the cardiovascular system: a simple molecule with complex actions. *Cardiovasc J Afr*, 20(5):303–310, 2009.

- [10] A. Lanas. Role of nitric oxide in the gastrointestinal tract. *Arthritis Res. Ther.*, 10 Suppl 2:S4, 2008.
- [11] V. E. Nossaman, B. D. Nossaman, and P. J. Kadowitz. Nitrates and nitrites in the treatment of ischemic cardiac disease. *Cardiol Rev*, 18(4):190–197, 2010.
- [12] V. Boswell-Smith, D. Spina, and C. P. Page. Phosphodiesterase inhibitors. *Br. J. Pharmacol.*, 147 Suppl 1:S252–257, Jan 2006.
- [13] Mark J.D. Griffiths and Timothy W. Evans. Inhaled nitric oxide therapy in adults. *New England Journal of Medicine*, 353(25):2683–2695, 2005. PMID: 16371634.
- [14] W. K. Alderton, C. E. Cooper, and R. G. Knowles. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem. J.*, 357(Pt 3):593–615, Aug 2001.
- [15] D. S. Bredt and S. H. Snyder. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 87(2):682–685, Jan 1990.
- [16] J. Y. Dong, L. Q. Qin, Z. Zhang, Y. Zhao, J. Wang, F. Arigoni, and W. Zhang. Effect of oral L-arginine supplementation on blood pressure: a meta-analysis of randomized, double-blind, placebo-controlled trials. *Am. Heart J.*, 162(6):959–965, Dec 2011.
- [17] R. A. Augustyniak, G. D. Thomas, R. G. Victor, and W. Zhang. Nitric oxide pathway as new drug targets for refractory hypertension. *Curr. Pharm. Des.*, 11(25):3307–3315, 2005.
- [18] M. Sander, B. Chavoshan, R. G. Victor, and C. G. Blomqvist. A large blood pressure-raising effect of nitric oxide synthase inhibition in humans. *Hypertension*, 33(4):937–942, Apr 1999.
- [19] J. L. Zweier, A. Samouilov, and P. Kuppusamy. Non-enzymatic nitric oxide synthesis in biological systems. *Biochim. Biophys. Acta*, 1411(2-3):250–262, May 1999.

- [20] S. Shiva, X. Wang, L. A. Ringwood, X. Xu, S. Yuditskaya, V. Annavajjhala, H. Miyajima, N. Hogg, Z. L. Harris, and M. T. Gladwin. Ceruloplasmin is a NO oxidase and nitrite synthase that determines endocrine NO homeostasis. *Nat. Chem. Biol.*, 2(9):486–493, Sep 2006.
- [21] S. Moncada and A. Higgs. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N. Engl. J. Med.*, 329(27):2002–2012, Dec 1993.
- [22] Sasaki T. and Matano K. Formation of nitrite from nitrate at the dorsum linguae. *J. Food Hyg. Soc. Jap*, 20, 1979.
- [23] H. Bjorne, M. Govoni, D. C. Tornberg, J. O. Lundberg, and E. Weitzberg. Intragastric nitric oxide is abolished in intubated patients and restored by nitrite. *Crit. Care Med.*, 33(8):1722–1727, Aug 2005.
- [24] E. Weitzberg and J.O.N. Lundberg. Nonenzymatic nitric oxide production in humans. *Nitric Oxide*, 2(1):1 – 7, 1998.
- [25] J. L. Zweier, P. Wang, A. Samouilov, and P. Kuppusamy. Enzyme-independent formation of nitric oxide in biological tissues. *Nat. Med.*, 1(8):804–809, Aug 1995.
- [26] M. T. Gladwin, J. H. Shelhamer, A. N. Schechter, M. E. Pease-Fye, M. A. Waclawiw, J. A. Panza, F. P. Ognibene, and R. O. Cannon. Role of circulating nitrite and S-nitrosohemoglobin in the regulation of regional blood flow in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 97(21):11482–11487, Oct 2000.
- [27] J. O. Lundberg, E. Weitzberg, and M. T. Gladwin. The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*, 7(2):156–167, Feb 2008.
- [28] J. O. Lundberg, E. Weitzberg, J. M. Lundberg, and K. Alving. Intragastric nitric oxide production in humans: measurements in expelled air. *Gut*, 35(11):1543–1546, Nov 1994.
- [29] Malte Kelm. Nitric oxide metabolism and breakdown. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1411(2–3):273 – 289, 1999.

- [30] M. T. Gladwin, R. Grubina, and M. P. Doyle. The new chemical biology of nitrite reactions with hemoglobin: R-state catalysis, oxidative denitrosylation, and nitrite reductase/anhydrase. *Acc. Chem. Res.*, 42(1):157–167, Jan 2009.
- [31] A. Webb, R. Bond, P. McLean, R. Uppal, N. Benjamin, and A. Ahluwalia. Reduction of nitrite to nitric oxide during ischemia protects against myocardial ischemia-reperfusion damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 101(37):13683–13688, Sep 2004.
- [32] J. Brooks. The action of nitrite on haemoglobin in the absence of oxygen. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 123(832):368–382, 1937.
- [33] M. P. Doyle, R. A. Pickering, T. M. DeWeert, J. W. Hoekstra, and D. Pater. Kinetics and mechanism of the oxidation of human deoxyhemoglobin by nitrites. *J. Biol. Chem.*, 256(23):12393–12398, Dec 1981.
- [34] P. C. Minneci, K. J. Deans, S. Shiva, H. Zhi, S. M. Banks, S. Kern, C. Natan-son, S. B. Solomon, and M. T. Gladwin. Nitrite reductase activity of hemoglobin as a systemic nitric oxide generator mechanism to detoxify plasma hemoglobin produced during hemolysis. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 295(2):H743–754, Aug 2008.
- [35] Mark T. Gladwin, Jack H. Crawford, and Rakesh P. Patel. The biochemistry of nitric oxide, nitrite, and hemoglobin: role in blood flow regulation. *Free Radical Biology and Medicine*, 36(6):707 – 717, 2004.
- [36] T. Rassaf, U. Flogel, C. Drexhage, U. Hendgen-Cotta, M. Kelm, and J. Schrader. Nitrite reductase function of deoxymyoglobin: oxygen sensor and regulator of cardiac energetics and function. *Circ. Res.*, 100(12):1749–1754, Jun 2007.
- [37] S. Shiva. Nitrite: A Physiological Store of Nitric Oxide and Modulator of Mitochondrial Function. *Redox Biol*, 1(1):40–44, 2013.

- [38] J. L. Zweier, H. Li, A. Samouilov, and X. Liu. Mechanisms of nitrite reduction to nitric oxide in the heart and vessel wall. *Nitric Oxide*, 22(2):83–90, Feb 2010.
- [39] H. Li, A. Samouilov, X. Liu, and J. L. Zweier. 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.*, 276(27):24482–24489, Jul 2001.
- [40] D. B. Kim-Shapiro, A. N. Schechter, and M. T. Gladwin. Unraveling the reactions of nitric oxide, nitrite, and hemoglobin in physiology and therapeutics. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 26(4):697–705, Apr 2006.
- [41] André Dejam, Christian J. Hunter, Mildred M. Pelletier, Lewis L. Hsu, Roberto F. Machado, Sruti Shiva, Gordon G. Power, Malte Kelm, Mark T. Gladwin, and Alan N. Schechter. Erythrocytes are the major intravascular storage sites of nitrite in human blood. *Blood*, 106(2):734–739, 2005.
- [42] F. Plane, A. Hurrell, J. Y. Jeremy, and C. J. Garland. Evidence that potassium channels make a major contribution to SIN-1-evoked relaxation of rat isolated mesenteric artery. *Br. J. Pharmacol.*, 119(8):1557–1562, Dec 1996.
- [43] D.F. Ashman, R. Lipton, M.M. Melicow, and T.D. Price. Isolation of adenosine 3',5'-monophosphate and guanosine 3',5'-monophosphate from rat urine. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 11(4):330–334, 1963.
- [44] J. A. Carvajal, A. M. Germain, J. P. Huidobro-Toro, and C. P. Weiner. Molecular mechanism of cGMP-mediated smooth muscle relaxation. *J. Cell. Physiol.*, 184(3):409–420, Sep 2000.
- [45] T. Maack. Receptors of atrial natriuretic factor. *Annu. Rev. Physiol.*, 54:11–27, 1992.
- [46] María de los Angeles Costa, Laura V. González Bosc, Mónica P. Majowicz, Norberto A. Vidal, Ana M. Balaszczuk, and Cristina T. Arranz. Atrial natri-

- uretic peptide modifies arterial blood pressure through nitric oxide pathway in rats. *Hypertension*, 35(5):1119–1123, 2000.
- [47] R. Clinton Webb. Smooth muscle contraction and relaxation. *Advances in Physiology Education*, 27(4):201–206, 2003.
- [48] H. de Groot and U. Rauen. Ischemia-reperfusion injury: Processes in pathogenetic networks: A review. *Transplantation Proceedings*, 39(2):481 – 484, 2007.
- [49] T. Kalogeris, C. P. Baines, M. Krenz, and R. J. Korthuis. Cell biology of ischemia/reperfusion injury. *Int Rev Cell Mol Biol*, 298:229–317, 2012.
- [50] L. Maximilian Buja. Myocardial ischemia and reperfusion injury. *Cardiovascular Pathology*, 14(4):170 – 175, 2005.
- [51] R. B. JENNINGS, H. M. SOMMERS, G. A. SMYTH, H. A. FLACK, and H. LINN. Myocardial necrosis induced by temporary occlusion of a coronary artery in the dog. *Arch Pathol*, 70:68–78, Jul 1960.
- [52] S. M. Cobbe, D. J. Parker, and P. A. Poole-Wilson. Tissue and coronary venous pH in ischemic canine myocardium. *Clin Cardiol*, 5(2):153–156, Feb 1982.
- [53] D. N. Granger and P. R. Kvietys. Reperfusion injury and reactive oxygen species: The evolution of a concept. *Redox Biol*, 6:524–551, Dec 2015.
- [54] C. Guarnieri, F. Flamigni, and C. M. Caldarera. Role of oxygen in the cellular damage induced by re-oxygenation of hypoxic heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 12(8):797–808, Aug 1980.
- [55] M. H. Schoenberg, B. B. Fredholm, U. Haglund, H. Jung, D. Sellin, M. Younes, and F. W. Schildberg. Studies on the oxygen radical mechanism involved in the small intestinal reperfusion damage. *Acta Physiol. Scand.*, 124(4):581–589, Aug 1985.
- [56] K. Kogure, B. D. Watson, R. Busto, and K. Abe. Potentiation of lipid peroxides by ischemia in rat brain. *Neurochem. Res.*, 7(4):437–454, Apr 1982.

- [57] D. Arora, P. Jain, N. Singh, H. Kaur, and S. C. Bhatla. Mechanisms of nitric oxide crosstalk with reactive oxygen species scavenging enzymes during abiotic stress tolerance in plants. *Free Radic. Res.*, 50(3):291–303, 2016.
- [58] C. V. Suschek, K. Briviba, D. Bruch-Gerharz, H. Sies, K. D. Kroncke, and V. Kolb-Bachofen. Even after UVA-exposure will nitric oxide protect cells from reactive oxygen intermediate-mediated apoptosis and necrosis. *Cell Death Differ.*, 8(5):515–527, May 2001.
- [59] V. B. O'Donnell, P. H. Chumley, N. Hogg, A. Bloodsworth, V. M. Darley-Usmar, and B. A. Freeman. Nitric oxide inhibition of lipid peroxidation: kinetics of reaction with lipid peroxy radicals and comparison with alpha-tocopherol. *Biochemistry*, 36(49):15216–15223, Dec 1997.
- [60] F. Eefting, B. Rensing, J. Wigman, W. J. Pannekoek, W. M. Liu, M. J. Cramer, D. J. Lips, and P. A. Doevendans. Role of apoptosis in reperfusion injury. *Cardiovasc. Res.*, 61(3):414–426, Feb 2004.
- [61] P. Anversa, W. Cheng, Y. Liu, A. Leri, G. Redaelli, and J. Kajstura. Apoptosis and myocardial infarction. *Basic Res. Cardiol.*, 93 Suppl 3:8–12, 1998.
- [62] R. A. Gottlieb, K. O. Burleson, R. A. Kloner, B. M. Babior, and R. L. Engler. Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes. *J. Clin. Invest.*, 94(4):1621–1628, Oct 1994.
- [63] P. Theroux, B. R. Chaitman, N. Danchin, L. Erhardt, T. Meinertz, J. S. Schroeder, G. Tognoni, H. D. White, J. T. Willerson, and A. Jessel. Inhibition of the sodium-hydrogen exchanger with cariporide to prevent myocardial infarction in high-risk ischemic situations. Main results of the GUARDIAN trial. Guard during ischemia against necrosis (GUARDIAN) Investigators. *Circulation*, 102(25):3032–3038, Dec 2000.
- [64] T. Uchiyama, H. Otani, T. Okada, H. Ninomiya, M. Kido, H. Imamura, S. Nogi, and Y. Kobayashi. Nitric oxide induces caspase-dependent apoptosis and necrosis in neonatal rat cardiomyocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 34(8):1049–1061, Aug 2002.

- [65] G. Taimor, A. Rakow, and H. M. Piper. Transcription activator protein 1 (AP-1) mediates NO-induced apoptosis of adult cardiomyocytes. *FASEB J.*, 15(13):2518–2520, Nov 2001.
- [66] C. V. Suschek, V. Krischel, D. Bruch-Gerharz, D. Berendji, J. Krutmann, K. D. Kroncke, and V. Kolb-Bachofen. Nitric oxide fully protects against UVA-induced apoptosis in tight correlation with Bcl-2 up-regulation. *J. Biol. Chem.*, 274(10):6130–6137, Mar 1999.
- [67] R. D. Rakhit, M. H. Mojet, M. S. Marber, and M. R. Duchon. Mitochondria as targets for nitric oxide-induced protection during simulated ischemia and reoxygenation in isolated neonatal cardiomyocytes. *Circulation*, 103(21):2617–2623, May 2001.
- [68] F. Brunner, R. Maier, P. Andrew, G. Wolkart, R. Zechner, and B. Mayer. Attenuation of myocardial ischemia/reperfusion injury in mice with myocyte-specific overexpression of endothelial nitric oxide synthase. *Cardiovasc. Res.*, 57(1):55–62, Jan 2003.
- [69] E. B. Loucks, D. V. Godin, K. R. Walley, B. M. McManus, R. Rahimian, D. J. Granville, J. M. Hong, F. M. Aktary, and A. K. Qayumi. Role of platelet activating factor in cardiac dysfunction, apoptosis and nitric oxide synthase mRNA expression in the ischemic-reperfused rabbit heart. *Can J Cardiol*, 19(3):267–274, Mar 2003.
- [70] R. M. Bell and D. M. Yellon. Atorvastatin, administered at the onset of reperfusion, and independent of lipid lowering, protects the myocardium by up-regulating a pro-survival pathway. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 41(3):508–515, Feb 2003.
- [71] U. Laufs, K. Gertz, U. Dirnagl, M. Bohm, G. Nickenig, and M. Endres. Rosuvastatin, a new HMG-CoA reductase inhibitor, upregulates endothelial nitric oxide synthase and protects from ischemic stroke in mice. *Brain Res.*, 942(1-2):23–30, Jun 2002.
- [72] P. Di Napoli, A. Antonio Taccardi, A. Grilli, R. Spina, M. Felaco, A. Barsotti, and R. De Caterina. Simvastatin reduces reperfusion injury by modulating

- nitric oxide synthase expression: an ex vivo study in isolated working rat hearts. *Cardiovasc. Res.*, 51(2):283–293, Aug 2001.
- [73] J. R. Hunt, C. A. Zito, and L. K. Johnson. Body iron excretion by healthy men and women. *Am. J. Clin. Nutr.*, 89(6):1792–1798, Jun 2009.
- [74] J. Wang and K. Pantopoulos. Regulation of cellular iron metabolism. *Biochem. J.*, 434(3):365–381, Mar 2011.
- [75] Sassan Pazirandeh MD, David L Burns MD, and Ian J. Griffin MB ChB. Overview of dietary trace minerals. *UpToDate, Waltham, MA*, assessed Feb 2017.
- [76] Florian Horn et al. Biochemie des Menschen. *Thieme*, 3. Auflage, 2005.
- [77] M. L. Turski and D. J. Thiele. New roles for copper metabolism in cell proliferation, signaling, and disease. *J. Biol. Chem.*, 284(2):717–721, Jan 2009.
- [78] Robert K. Murray, Molly Jacob, and Joe Varghese. Plasma proteins & immunoglobulins. *Harper's Illustrated Biochemistry. 29th. New York: McGraw-Hill*, Chapter 50, 2011.
- [79] M. Patil, K. A. Sheth, A. C. Krishnamurthy, and H. Devarbhavi. A review and current perspective on Wilson disease. *J Clin Exp Hepatol*, 3(4):321–336, Dec 2013.
- [80] Michael L. Schilsky MD, FAASLD. Wilson disease: Epidemiology and pathogenesis. *UpToDate, Waltham, MA*, assessed Feb 2017.
- [81] Y. Li, M. Hodak, and J. Bernholc. Enzymatic mechanism of copper-containing nitrite reductase. *Biochemistry*, 54(5):1233–1242, Feb 2015.
- [82] Ariela Burg, Evgenia Lozinsky, Haim Cohen, and Dan Meyerstein. Mechanism of reduction of the nitrite ion by cui complexes. *European Journal of Inorganic Chemistry*, 2004(18):3675–3680, 2004.
- [83] R. A. Wapnir. Copper absorption and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.*, 67(5 Suppl):1054S–1060S, May 1998.

- [84] G. Zeltcer, E. Berenshtein, A. Samuni, and M. Chevion. Nitroxide radicals prevent metal-aggravated reperfusion injury in isolated rat heart. *Free Radic. Res.*, 27(6):627–635, Dec 1997.
- [85] P. de Bie, P. Muller, C. Wijmenga, and L. W. Klomp. Molecular pathogenesis of Wilson and Menkes disease: correlation of mutations with molecular defects and disease phenotypes. *J. Med. Genet.*, 44(11):673–688, Nov 2007.
- [86] Nadim Tayeh, Tévamie Rungassamy, and Jihad René Albani. Fluorescence spectral resolution of tryptophan residues in bovine and human serum albumins. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 50(2):107 – 116, 2009.
- [87] K. Harohalli, C. E. Petersen, C. E. Ha, J. B. Feix, and N. V. Bhagavan. Site-directed mutagenesis studies of human serum albumin define tryptophan at amino acid position 214 as the principal site for nitrosation. *J. Biomed. Sci.*, 9(1):47–58, 2002.
- [88] T. Topal, A. Bodoki, L. Oprean, and R. Oprean. Bovine Serum Albumin Interactions with Metal Complexes. *Clujul Med*, 87(4):215–219, 2014.
- [89] K. A. Majorek, P. J. Porebski, A. Dayal, M. D. Zimmerman, K. Jablonska, A. J. Stewart, M. Chruszcz, and W. Minor. Structural and immunologic characterization of bovine, horse, and rabbit serum albumins. *Mol. Immunol.*, 52(3-4):174–182, Oct 2012.
- [90] E. Sbarouni, P. Georgiadou, and V. Voudris. Ischemia modified albumin changes - review and clinical implications. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 49(2):177–184, Feb 2011.
- [91] W. Bal, J. Christodoulou, P. J. Sadler, and A. Tucker. Multi-metal binding site of serum albumin. *J. Inorg. Biochem.*, 70(1):33–39, Apr 1998.
- [92] A. Zgirski and E. Frieden. Binding of Cu(II) to non-prosthetic sites in ceruloplasmin and bovine serum albumin. *J. Inorg. Biochem.*, 39(2):137–148, Jun 1990.

- [93] R. A. Løvstad. A kinetic study on the copper-albumin catalyzed oxidation of ascorbate. *Biometals*, 15(4):351–355, Dec 2002.
- [94] John M.C. Gutteridge and Stephanie Wilkins. Copper salt-dependent hydroxyl radical formation: Damage to proteins acting as antioxidants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 759(1–2):38 – 41, 1983.
- [95] G. Fanali, A. di Masi, V. Trezza, M. Marino, M. Fasano, and P. Ascenzi. Human serum albumin: from bench to bedside. *Mol. Aspects Med.*, 33(3):209–290, Jun 2012.
- [96] M. Kanko, S. Yavuz, C. Duman, T. Hosten, E. Oner, and T. Berki. Ischemia-modified albumin use as a prognostic factor in coronary bypass surgery. *J Cardiothorac Surg*, 7:3, Jan 2012.
- [97] J. F. Keaney, D. I. Simon, J. S. Stamler, O. Jaraki, J. Scharfstein, J. A. Vita, and J. Loscalzo. NO forms an adduct with serum albumin that has endothelium-derived relaxing factor-like properties. *J. Clin. Invest.*, 91(4):1582–1589, Apr 1993.
- [98] P. R. Myers, R. L. Minor, R. Guerra, J. N. Bates, and D. G. Harrison. Vaso-relaxant properties of the endothelium-derived relaxing factor more closely resemble S-nitrosocysteine than nitric oxide. *Nature*, 345(6271):161–163, May 1990.
- [99] Lars-Oliver Klotz, Karlis Briviba, and Helmut Sies. Singlet oxygen mediates the activation of {JNK} by {UVA} radiation in human skin fibroblasts. *{FEBS} Letters*, 408(3):289 – 291, 1997.
- [100] Paolo Di Mascio and Helmut Sies. Quantification of singlet oxygen generated by thermolysis of 3,3'-(1,4-naphthylene)dipropionate endoperoxide. monomol and dimol photoemission and the effects of 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane. *Journal of the American Chemical Society*, 111(8):2909–2914, 1989.

- [101] Robert E. Huie and S. Padmaja. The reaction of NO with superoxide. *Free Radical Research Communications*, 18(4):195–199, 1993. PMID: 8396550.
- [102] Rao M. Uppu. Synthesis of peroxynitrite using isoamyl nitrite and hydrogen peroxide in a homogeneous solvent system. *Analytical Biochemistry*, 354(2):165 – 168, 2006.
- [103] C. C. Winterbourn. Toxicity of iron and hydrogen peroxide: the Fenton reaction. *Toxicol. Lett.*, 82-83:969–974, Dec 1995.
- [104] H. H. Al-Sa'doni, I. L. Megson, S. Bisland, A. R. Butler, and F. W. Flitney. Neocuproine, a selective Cu(I) chelator, and the relaxation of rat vascular smooth muscle by S-nitrosothiols. *Br. J. Pharmacol.*, 121(6):1047–1050, Jul 1997.
- [105] B. G. Hill, C. Reilly, J. Y. Oh, M. S. Johnson, and A. Landar. Methods for the determination and quantification of the reactive thiol proteome. *Free Radic. Biol. Med.*, 47(6):675–683, Sep 2009.
- [106] M. Zaki and R. Alqasbi. Spectrophotometric determination of copper(II) as citrate or EDTA complex. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, Jan 1981.
- [107] Francesca Cutruzzolà. Bacterial nitric oxide synthesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1411(2–3):231 – 249, 1999.
- [108] M. Chevion, Y. Jiang, R. Har-El, E. Berenshtein, G. Uretzky, and N. Kitrossky. Copper and iron are mobilized following myocardial ischemia: possible predictive criteria for tissue injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 90(3):1102–1106, Feb 1993.
- [109] J. A. Swain, V. Darley-Usmar, and J. M. Gutteridge. Peroxynitrite releases copper from caeruloplasmin: implications for atherosclerosis. *FEBS Lett.*, 342(1):49–52, Mar 1994.
- [110] L. M. Gaetke and C. K. Chow. Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. *Toxicology*, 189(1-2):147–163, Jul 2003.

- [111] A. Filenko, M. Demchenko, Z. Mustafaeva, Y. Osada, and M. Mustafaev. Fluorescence study of Cu(2+)-induced interaction between albumin and anionic polyelectrolytes. *Biomacromolecules*, 2(1):270–277, 2001.
- [112] Y. Moriyama, D. Ohta, K. Hachiya, Y. Mitsui, and K. Takeda. Fluorescence behavior of tryptophan residues of bovine and human serum albumins in ionic surfactant solutions: a comparative study of the two and one tryptophan(s) of bovine and human albumins. *J. Protein Chem.*, 15(3):265–272, Apr 1996.
- [113] Y. Y. Zhang, A. M. Xu, M. Nomen, M. Walsh, J. F. Keaney, and J. Loscalzo. Nitrosation of tryptophan residue(s) in serum albumin and model dipeptides. Biochemical characterization and bioactivity. *J. Biol. Chem.*, 271(24):14271–14279, Jun 1996.
- [114] N. S. Bryan, D. D. Alexander, J. R. Coughlin, A. L. Milkowski, and P. Boffetta. Ingested nitrate and nitrite and stomach cancer risk: an updated review. *Food Chem. Toxicol.*, 50(10):3646–3665, Oct 2012.
- [115] T. Kato and K. Kikugawa. Proteins and amino acids as scavengers of nitrite: inhibitory effect on the formation of nitrosodimethylamine and diazoquinone. *Food Chem. Toxicol.*, 30(7):617–626, Jul 1992.
- [116] R. Monni, A. Al Haddad, F. van Mourik, G. Aubock, and M. Chergui. Tryptophan-to-heme electron transfer in ferrous myoglobins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 112(18):5602–5606, May 2015.
- [117] Y. Ishima, U. Kragh-Hansen, T. Maruyama, and M. Otagiri. Albumin as a nitric oxide-traffic protein: characterization, biochemistry and possible future therapeutic applications. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, 24(4):308–317, 2009.
- [118] H. Speisky, M. Gomez, F. Burgos-Bravo, C. Lopez-Alarcon, C. Jullian, C. Olea-Azar, and M. E. Aliaga. Generation of superoxide radicals by copper-glutathione complexes: redox-consequences associated with their interaction with reduced glutathione. *Bioorg. Med. Chem.*, 17(5):1803–1810, Mar 2009.

- [119] E. Erturk, B. Cekic, S. Geze, M. Kosucu, I. Coskun, A. Eroglu, H. Ulusoy, A. Mentese, C. Karahan, and S. Kerimoglu. Comparison of the effect of propofol and N-acetyl cysteine in preventing ischaemia-reperfusion injury. *Eur J Anaesthesiol*, 26(4):279–284, Apr 2009.
- [120] DL Longo, AS Fauci, DL Kasper, SL Hauser, JL Jameson, and J Loscalzo. Wilson's disease. *Harrison's Principles of Internal Medicine 18th ed.* New York: McGraw-Hill, pages 3188–90, 2012.
- [121] J. M. Walshe. Serum 'free' copper in Wilson disease. *QJM*, 105(5):419–423, May 2012.
- [122] M. T. Gladwin, J. H. Crawford, and R. P. Patel. The biochemistry of nitric oxide, nitrite, and hemoglobin: role in blood flow regulation. *Free Radic. Biol. Med.*, 36(6):707–717, Mar 2004.
- [123] M. Tabak and S. R. Wanderley Louro. Location of the higher affinity copper site on human hemoglobin by the use of the spin-label technique. *Journal of Magnetic Resonance*, 62:370–377, 1985.
- [124] C. C. Winterbourn and R. W. Carrell. Oxidation of human haemoglobin by copper. Mechanism and suggested role of the thiol group of residue beta-93. *Biochem. J.*, 165(1):141–148, Jul 1977.
- [125] E. BRESLOW. COMPARISON OF CUPRIC ION-BINDING SITES IN MYOGLOBIN DERIVATIVES AND SERUM ALBUMIN. *J. Biol. Chem.*, 239:3252–3259, Oct 1964.
- [126] K. Hegetschweiler, P. Saltman, C. Dalvit, and P. E. Wright. Kinetics and mechanisms of the oxidation of myoglobin by Fe(III) and Cu(II) complexes. *Biochim. Biophys. Acta*, 912(3):384–397, Apr 1987.
- [127] H. P. Roeser, G. R. Lee, S. Nacht, and G. E. Cartwright. The role of ceruloplasmin in iron metabolism. *J. Clin. Invest.*, 49(12):2408–2417, Dec 1970.
- [128] C. J. Matocha, A. D. Karathanasis, S. Rakshit, and K. M. Wagner. Reduction of copper(II) by iron(II). *J. Environ. Qual.*, 34(5):1539–1546, 2005.

- [129] D. G. Barceloux. Copper. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.*, 37(2):217–230, 1999.
- [130] C. Bonaventura, G. Godette, S. Tesh, D. E. Holm, J. Bonaventura, A. L. Crumbliss, L. L. Pearce, and J. Peterson. Internal electron transfer between hemes and Cu(II) bound at cysteine beta93 promotes methemoglobin reduction by carbon monoxide. *J. Biol. Chem.*, 274(9):5499–5507, Feb 1999.
- [131] Michael L. Schilsky MD, FAASLD. Wilson disease: Diagnostic tests. *UpToDate*, Waltham, MA, assessed Feb 2017.
- [132] M. A. Selimoglu, V. Ertekin, Y. Turkan, and F. Akcay. Serum nitric oxide levels in children with Wilson’s disease. *Int. J. Clin. Pract.*, 61(9):1530–1534, Sep 2007.
- [133] P. Kleinbongard, A. Dejam, T. Lauer, T. Rassaf, A. Schindler, O. Picker, T. Scheeren, A. Godecke, J. Schrader, R. Schulz, G. Heusch, G. A. Schaub, N. S. Bryan, M. Feelisch, and M. Kelm. Plasma nitrite reflects constitutive nitric oxide synthase activity in mammals. *Free Radic. Biol. Med.*, 35(7):790–796, Oct 2003.
- [134] T. Lauer, M. Preik, T. Rassaf, B. E. Strauer, A. Deussen, M. Feelisch, and M. Kelm. Plasma nitrite rather than nitrate reflects regional endothelial nitric oxide synthase activity but lacks intrinsic vasodilator action. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 98(22):12814–12819, Oct 2001.
- [135] H. Ogihara, T. Ogihara, M. Miki, H. Yasuda, and M. Mino. Plasma copper and antioxidant status in Wilson’s disease. *Pediatr. Res.*, 37(2):219–226, Feb 1995.
- [136] S. M. Factor, S. Cho, I. Sternlieb, I. H. Scheinberg, and S. Goldfischer. The cardiomyopathy of Wilson’s disease. Myocardial alterations in nine cases. *Virchows Arch A Pathol Anat Histol*, 397(3):301–311, 1982.
- [137] K. M. Naseem. The role of nitric oxide in cardiovascular diseases. *Mol. Aspects Med.*, 26(1-2):33–65, 2005.

- [138] Z. Tumer and L. B. Møller. Menkes disease. *Eur. J. Hum. Genet.*, 18(5):511–518, May 2010.
- [139] M. J. Niciu, X. M. Ma, R. El Meskini, G. V. Ronnett, R. E. Mains, and B. A. Eipper. Developmental changes in the expression of ATP7A during a critical period in postnatal neurodevelopment. *Neuroscience*, 139(3):947–964, 2006.

8 Anhang

Christian Opländer, Julian Rösner, Alexander Gombert, Alexander Brodski, Tatsiana Suvorava, Vera Grotheer, Ernst E. van Faassen, Klaus-Dietrich Kröncke, Georg Kojda, Joachim Windolf, and Christoph V. Suschek. Redox-mediated mechanisms and biological responses of copper-catalyzed reduction of the nitrite ion in vitro. *Nitric Oxide*, 35:152 - 164, 2013 [1].

9 Danksagung

Mein Dank gilt an erster Stelle Herrn Professor Christoph Suschek - meinem Doktorvater, der ein herausragender Forscher und ein großartiger Mentor ist. Die gemeinsame wissenschaftliche Arbeit und Austausch über viele andere Themen haben mir stets sehr viel Freude bereitet. Beim Herrn Professor Windolf möchte ich mich für die stetige Unterstützung meiner wissenschaftlichen und klinischen Arbeit bedanken, ohne welche ich nicht da wäre, wo ich heute bin. Weiterhin bedanke ich mich bei Dr. Vera "Labormutti" Grotheer, die von den ersten Tagen an mir die Schritte im Labor erleichtert und während der ganzen Zeit mit Rat und Tat zur Seite gestanden hat. Ich danke Herrn PD. Christian Opländer für die Kooperation im Rahmen meiner Arbeit und für die Einarbeitung in spezielle Forschungsmethoden. Ich danke Dr. Ceylan Windolf für interessante Gespräche, welche mir einen besseren Einblick in die Organisation und Durchführung von großen und spannenden Forschungsprojekten erlaubten. Für die außerordentlich kompetente, freundliche und geduldige (!) Unterstützung beim Erlernen und Optimieren der Labormethoden möchte ich mich herzlich bei Frau Samira Seghrouchni, Frau Jutta Schneider und Frau Christa Wilkens bedanken. Außerdem geht mein Dank an meine medizinische und biologische Mitstreiterinnen und Mitstreiter, von denen ich insbesondere zur späten Stunde viel gelernt habe.

Ich möchte meiner Familie danken, die mir die Möglichkeit gegeben hat, den spannenden Weg als Arzt zu gehen. Ich danke meinem Zwillingbruder Michael, der ein ganz besonderer Mensch ist und für mich immer sein wird. Meinem großen Bruder Boris danke ich für Ermunterung in entscheidenden Momenten und für die exzellente technische Unterstützung. Ich danke meiner Schwester Renata für ihre Hilfsbereitschaft und für lebensmitteltechnische Assistenz in allen Lebenslagen. Ich danke meiner Lebensgefährtin Myrella für ihre Zuwendung und Geduld während der Ausarbeitung von diesem und vielen anderen Projekten. Meinen Eltern danke ich für ihre Zuwendung und für den Mut, den es gebraucht hat, um nach Deutschland zu kommen und meinen Geschwistern und mir ein Leben mit einer besseren Zukunft zu ermöglichen. Ich danke meinem Onkel, der immer den Wissenschaftler in mir wecken wollte und ich danke meiner Tante, die mich immer

ermuntert und unterstützt hat. Ich danke Olga, Daniel, Ella und Leonid. Ich denke an meine Großeltern, die in schwierigsten Zeiten immer für die Zukunft ihrer Kinder und Enkelkinder gearbeitet haben. Vielen anderen Menschen möchte ich für ihre Hilfe danken, die zur unterschiedlichen und immer zur richtigen Zeit kam: Heidi Froehlich, Caroline Schneeberg, Michael "Hubs" Frösch, Michael Novoselsky, Jonas Graf, Prof. Dr. Sebastian Gehrmann und Dr. Joseph Loscalzo.