

**Die lösliche Guanylatcyclase als mögliches  
intraerythrozytäres Ziel im systemischen  
NO-Metabolismus**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

**Christian Marc Kramer**  
aus Oldenburg

Düsseldorf, Dezember 2017

---

aus der Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie  
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Malte Kelm)  
des Universitätsklinikums der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referentin: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Dr. Miriam M. Cortese-Krott  
Korreferent: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Lutz Schmitt

Tag der mündlichen Prüfung: 26.03.2018

---

Ich versichere an Eides Statt, dass die vorliegende Dissertation von mir selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt wurden. Sämtliche Stellen der Arbeit, die im Wortlaut oder dem Sinn nach anderen gedruckten oder im Internet verfügbaren Werken entnommen sind, habe ich durch genaue Quellenangaben kenntlich gemacht.

Diese Dissertation wurde weder in gleicher noch in ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegt. Außerdem erkläre ich, dass ich bisher noch keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht habe.

Düsseldorf, den 20.12.2017

Christian Marc Kramer

---



*Meinen Eltern gewidmet*

Teile dieser Arbeit wurden bereits publiziert, auf Fachtagungen vorgestellt oder befinden sich in Vorbereitung:

#### Originalpublikationen

Erkens, R., **Kramer, C.M.**, Lückstädt, W., Panknin, C., Krause, L., Weidenbach, M., Dirzka, J., Krenz, T., Mergia, E., Suvorava, T., Kelm, M., Cortese-Krott, M.M., *Left ventricular diastolic dysfunction in Nrf2 knock out mice is associated with cardiac hypertrophy, decreased expression of SERCA2a, and preserved endothelial function.* Free Radic Biol Med, 2015. **89**: p. 906-917.

Cortese-Krott, M.M., Mergia, E., **Kramer, C.M.**, Lückstädt, W., Yang, J., Wolff, G., Panknin, C., Bracht, T., Sitek, B., Pernow, J., Stasch, J.P., Feelisch, M., Koesling, D., Kelm, M., *Identification of a soluble guanylate cyclase in red blood cells: preserved activity in patients with coronary artery disease.* Redox Biol, 2018. **14**: p. 328-337.

#### Review-Artikel

Erkens, R., Suvorava, T., **Kramer, C.M.**, Diederich, L., Kelm, M., Cortese-Krott, M.M., *Modulation of local and systemic heterocellular communication by mechanical forces: a role of eNOS.* Antioxid Redox Signal, 2017. **26**(16): p. 917-935.

Kuhn, V., Diederich, L., Keller, T.C. 4th, **Kramer, C.M.**, Lückstädt, W., Panknin, C., Suvorava, T., Isakson, B.E., Kelm, M., Cortese-Krott, M.M., *Red blood cell function and dysfunction: redox regulation, nitric oxide metabolism, anemia.* Antioxid Redox Signal, 2017. **26**(13): p. 718-742.

#### Buchkapitel

Cortese-Krott, M.M., **Kramer, C.M.**, Kelm, M., *Chapter 14 - NOS, NO and the Red Cell - Ignarro, Louise J., in Nitric Oxide (Third Edition).* 2017, Academic Press: San Diego. p. 185-194. [ISBN: 9780128042731]

#### Poster

Cortese-Krott, M.M., Mergia, E., **Kramer, C.M.**, Panknin, C., Parco, C., Ziegler, M., Feelisch, M., Koesling, D., Kelm, M., *Purification and intracellular signaling of a NO sensitive guanylyl cyclase in RBCs.* Gordon Research Conference - Nitric Oxide, Ventura, CA, USA, 15.-20. Februar 2015.

Erkens, R., **Kramer, C.M.**, Panknin, C., Krause, L., Weidenbach, M., Krenz, T., Mergia, E., Kelm, M., Cortese-Krott, M.M., *The NO-cGMP pathway participates in vascular adaptation to oxidative stress in Nrf2 KO mice*. 7<sup>th</sup> International Conference on cGMP: Generators, Effectors and Therapeutic Implications, Trier, 19.-21. Juni 2015.

Cortese-Krott, M.M., **Kramer, C.M.**, Lückstädt, W., Kuhn, V., Panknin, C., Suvorava, T., Kelm, M., *Erythrocrine function in acute myocardial infarction*. 1<sup>st</sup> International Symposium „Master switches after myocardial infarction“, SFB 1116, Düsseldorf, 1.-3. Juli 2016.

#### In Vorbereitung befindliche Manuskripte

Diederich, L., Suvorava, T., Sansone, R., Keller, T.C. 4th, Barbarino, F., Sutton, R., **Kramer, C.M.**, Lückstädt, W., Isakson, B.E., Gohlke, H., Feelisch, M., Kelm, M., Cortese-Krott, M.M., *Nitric oxide preserves red blood cell deformability under conditions of oxidative stress*.

## Abstract

The soluble guanylate cyclase (sGC) is a receptor of nitric oxide (NO) and of high importance for cardiovascular functions including blood pressure regulation or homeostasis. Reduced activity of sGC (e.g. through oxidative stress) or diminished NO bioavailability play a role in progression of pathological conditions like high blood pressure or atherosclerosis. Erythrocytes were previously known to scavenge NO by a rapid reaction with haemoglobin and production of inert NO metabolites. However, more recent studies revealed that erythrocytes are involved in the reduction of these metabolites to NO under hypoxic conditions. It is unclear whether NO is exported or can react with intracellular targets, but the presence of an intraerythrocytic NO receptor has been questioned. It was shown that cGMP could modulate non-canonical functions of erythrocytes (deformability, removal of aged erythrocytes, export of vasoactive substances etc.). The aim of this study was to determine the “fate” of NO in vascular wall and erythrocytes and to clarify the role of erythrocytes in systemic NO metabolism, whether NO is exported from erythrocytes or if there are intracellular target proteins. Additionally, the role of NO in chronic adaptation of the vasculature to oxidative stress was investigated.

The main findings are: 1. A mouse model of chronic adaptation to oxidative stress by genetic knockout of Nrf2 (Nuclear factor (erythroid derived 2)-like 2) showed a reduced systemic blood pressure, which was present due to compensatory elevated expression of eNOS. 2. Erythrocytes participated in NO metabolism by scavenging NO, but NO release after hypoxia-dependent reduction of metabolites to NO was not observed. Addition of spin traps ( $\text{Fe}(\text{DETC})_2$  or  $\text{Fe}(\text{MGD})_2$ ) for accumulation of NO and quantification by electron paramagnetic resonance spectroscopy resulted in an unknown loss of signal. A two-chamber system for separation of source and trapping of NO was established and could be used for further experiments. 3. An intraerythrocytic sGC was identified by different methods as  $\alpha_1\beta_1$ -sGC (or GC-1), while there was no evidence of a  $\alpha_2$ -subunit. Pharmacological application of sGC stimulators, activators, inhibitors and NO donors showed PDE-dependent changes of intraerythrocytic cGMP levels and specific sGC activity was determined as 44 pmol/min/mg protein. The activity and responsiveness of erythrocytic sGC was fully conserved in patients with coronary artery disease. Downstream signaling led to activation of protein kinase G (PKG) and phosphorylation of vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP). cGMP-dependent changes of erythrocyte deformability could not be confirmed, but a model of isolated perfused hearts (Langendorff heart) revealed improved cardiac function after ischemia/reperfusion-

injury, when sGC stimulated erythrocytes were applied during ischemia, pointing out a possible cardioprotective role of erythrocytes.

In conclusion, the intraerythrocytic sGC may represent a novel target in NO metabolism and regulate non-canonical functions of erythrocytes. The detailed mechanisms of sGC activation and signal transduction need to be analysed in further studies and may be important targets for pharmacological intervention.

## Zusammenfassung

Die lösliche Guanylatcyclase (sGC) ist ein Rezeptor von Stickstoffmonoxid (NO) und vermittelt mit der Regulation von Blutdruck und Homöostase wichtige kardiovaskuläre Funktionen. Eine verminderte Aktivität der sGC (z.B. durch oxidativen Stress) oder eine verringerte Verfügbarkeit von NO spielen eine maßgebliche Rolle bei der Progression pathologischer Zustände, wie Bluthochdruck oder Atherosklerose. Erythrozyten waren bisher nur dafür bekannt, die Halbwertszeit von NO durch eine schnelle Reaktion mit (oxygeniertem) Hämoglobin zu verringern und NO-Metaboliten zu erzeugen, die vermeintlich keinen physiologischen Zweck erfüllen. Neuere Ergebnisse konnten aber zeigen, dass Erythrozyten unter hypoxischen Bedingungen an der Reduktion zu NO beteiligt sind und dieses exportiert oder auch intraerythrozytär wirken kann. Die Anwesenheit eines NO-Rezeptors wurde dabei kontrovers diskutiert und konnte nicht zweifelsfrei belegt werden, Änderungen des sekundären Botenstoffes cGMP könnten aber nichtkanonische Eigenschaften der Erythrozyten steuern (Verformbarkeit, Initiation des Abbaus gealterter Erythrozyten, Export von vasoaktiven Substanzen etc.). Die Zielsetzung dieser Studie bestand darin, das „Schicksal“ von NO in Gefäßwand und Erythrozyten zu ermitteln. Dabei sollte untersucht werden, welche Aufgaben die Erythrozyten im systemischen NO-Metabolismus erfüllen, ob NO auch wieder exportiert werden kann und/oder intraerythrozytäre Zielproteine vorliegen. Des Weiteren sollte (anhand eines Mausmodells) untersucht werden, welche Auswirkungen eine chronische Adaption an oxidativen Stress auf die vaskuläre Funktion hat.

Die Hauptaussagen sind: 1. In einem murinen Modell, das durch genetische Defizienz des Transkriptionsfaktors Nrf2 (*Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2*) eine chronische Adaption an oxidativen Stress darstellt, wurde ein erniedrigter systemischer Blutdruck gefunden, der im Rahmen dieser Studie durch eine kompensatorisch erhöhte Expression der eNOS erklärt werden konnte. 2. Erythrozyten nehmen durch Aufnahme von NO am systemischen NO-Metabolismus teil, ein Export von NO nach Hypoxie-induzierter Reduktion aus NO-Metaboliten konnte aber nicht beobachtet werden. Die direkte Addition von Spin Traps ( $\text{Fe}(\text{DETC})_2$  oder  $\text{Fe}(\text{MGD})_2$ ) zur Akkumulation von NO und Quantifizierung mittels Elektronenspinresonanz-Spektroskopie führte aus unbekanntem Gründen zu einem (fast) vollständigen Verlust des Signals. Ein Zwei-Kammer-System zur räumlichen Trennung vom Ort der Freisetzung und des *Trapping* von NO wurde aber erfolgreich etabliert und kann für weitere Experimente verwendet werden. 3. Ein mögliches intraerythrozytäres Ziel stellt die

sGC dar, die durch Verwendung mehrerer Methoden zweifelsfrei in der katalytisch aktiven Isoformzusammensetzung  $\alpha_1\beta_1$  identifiziert wurde (GC-1), während es keine Anhaltspunkte für die Anwesenheit einer  $\alpha_2$ -Untereinheit gab. Durch die pharmakologische Gabe von sGC-Stimulatoren, -Aktivatoren, -Inhibitoren und NO-Donoren wurden PDE-abhängige cGMP-Änderungen detektiert und die spezifische Aktivität mit 44 pmol/min/mg Protein bestimmt. Die Aktivierbarkeit der sGC war dabei in Erythrozyten von Patienten mit koronarer Herzkrankheit (KHK) vollständig konserviert. Die nachgeschaltete Aktivierung der Proteinkinase G (PKG) führte zur Phosphorylierung von Vasodilatator-stimuliertem Protein (VASP). Während es keine Hinweise für eine cGMP-abhängige Änderung der Erythrozytenverformbarkeit gab, zeigten erste Versuche im isoliert perfundierten Herzen nach Langendorff, dass die Stimulation der intraerythrozytären sGC (und Applikation dieser Erythrozyten in die Koronarien) zu einer signifikant verbesserten Funktion nach Ischämie und somit einer Kardioprotektion führte.

Zusammenfassend darf gesagt werden, dass die intraerythrozytäre sGC möglicherweise eine neuartige Rolle im systemischen NO-Metabolismus spielt und nichtkanonische Funktionen regulieren könnte. Die genauen Mechanismen bieten die Grundlage weiterer Studien und könnten wichtige Ziele einer pharmakologischen Intervention darstellen.

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abstract</b> .....	<b>VIII</b>
<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>X</b>
<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>XII</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>XIV</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>XVI</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>XVII</b>
<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1. Atherosklerose und endotheliale Dysfunktion .....	2
1.2. Die lösliche Guanylatcyclase.....	4
1.3. Die endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase .....	7
1.4. Die Rolle der Erythrozyten im NO-Metabolismus.....	9
1.5. Oxidativer Stress.....	12
<b>2. Zielsetzung dieser Studie</b> .....	<b>15</b>
<b>3. Material und Methoden</b> .....	<b>17</b>
3.1. Verwendung von murinen Geweben .....	17
3.2. Gewinnung humaner Blutproben und Verarbeitung .....	19
3.3. Klinische Studie zur koronaren Herzkrankheit .....	20
3.4. Proteinbestimmung.....	21
3.5. Glutathion als Marker von oxidativem Stress .....	21
3.6. Endothelabhängige Aktivierung der sGC mit Carbachol .....	22
3.7. Elektronenspinresonanz-Spektroskopie.....	23
3.8. Verwendung von Spin-Traps zur Akkumulation von Stickstoffmonoxid.....	24
3.9. Etablierung eines Zwei-Kammer-Systems .....	25
3.10. UV-Vis Absorptionsspektren .....	26
3.11. Chemilumineszenzdetektion von Stickstoffmonoxid.....	27
3.12. Pharmakologische Stimulation der intraerythrozytären sGC .....	27
3.13. Aktivierung der intraerythrozytären sGC nach Reduktion von Nitrit .....	29
3.14. Herstellung von Hämoglobin-freien Erythrozytenkonzentraten .....	30
3.15. Aktivitätsassay der löslichen Guanylatcyclase.....	30
3.16. Radioimmunoassay zur Bestimmung von cGMP und cAMP .....	31
3.17. Bestimmung der PDE-Aktivität.....	32
3.18. Bestimmung der PKG-Aktivität .....	33
3.19. Massenspektrometrische Proteinidentifikation.....	34
3.20. Nachweis einer cGMP-abhängigen VASP-Phosphorylierung .....	34
3.21. Ektazytometrische Untersuchung von Erythrozyten .....	35
3.22. Kardiale Funktion im Modell des isoliert-perfundierten Herzens.....	36
3.23. Western Blot Analyse zur Proteinidentifikation.....	37

---

3.24. Statistische Analyse .....	39
<b>4. Ergebnisse .....</b>	<b>41</b>
4.1. Vaskuläre Adaption des eNOS/sGC-Signalweges auf oxidativen Stress.....	41
4.2. Stickstoffmonoxid und Erythrozyten, eine EPR-Studie .....	46
4.3. Intraerythrozytäres <i>Signaling</i> von Stickstoffmonoxid.....	56
4.3.1. <i>Identifikation einer intraerythrozytären Guanylatcyclase</i> .....	56
4.3.2. <i>Aktivierbarkeit der intraerythrozytären sGC bei koronarer Herzkrankheit</i> .....	71
4.3.3. <i>Downstream signaling</i> .....	76
4.3.4. <i>Mögliche Effektorproteine oder physiologische Relevanz</i> .....	79
<b>5. Diskussion .....</b>	<b>85</b>
5.1. Vaskuläre Adaption an oxidativen Stress .....	86
5.2. Die Rolle von Erythrozyten im systemischen NO-Metabolismus.....	88
5.3. Identifikation einer löslichen Guanylatcyclase in Erythrozyten.....	92
5.4. Identifikation von Effektorproteinen und physiologische Konsequenz .....	104
<b>6. Zusammenfassung und Ausblick.....</b>	<b>109</b>
<b>7. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>111</b>
<b>Danksagung.....</b>	<b>124</b>
<b>Curriculum Vitae .....</b>	<b>126</b>

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Schematische Darstellung der Progression von Atherosklerose.....	3
<b>Abbildung 2:</b> Struktur und Aktivierungswege der löslichen Guanylatcyclase. ....	6
<b>Abbildung 3:</b> Mechanismen der eNOS-Aktivierung durch Scherkräfte.....	8
<b>Abbildung 4:</b> Graphische Zusammenfassung der Zielsetzungen dieser Studie.....	15
<b>Abbildung 5:</b> Reaktionsschema zur Akkumulation von Stickstoffmonoxid durch Spin-Traps. .....	25
<b>Abbildung 6:</b> Messprinzip und exemplarisches Diagramm der Ektazytometrie. ....	36
<b>Abbildung 7:</b> Ermittlung des Redox-Status in Herzen von Nrf2 KO-Mäusen durch GSH- Messung. ....	42
<b>Abbildung 8:</b> Ermittlung des Redox-Status in Aorten von Nrf2 KO-Mäusen durch GSH- Messung. ....	43
<b>Abbildung 9:</b> Basale Konzentrationen an cGMP und endothelabhängige sGC-Stimulation in Nrf2 KO-Mäusen.....	45
<b>Abbildung 10:</b> EPR-Spektren von Erythrozyten zur Zuordnung der detektierten Signale....	47
<b>Abbildung 11:</b> EPR-Experimente zur Nitrit-Reduktion unter hypoxischen Bedingungen....	48
<b>Abbildung 12:</b> EPR-Experimente zur Bindungsfähigkeit und Stabilität der Spin-Traps. ....	50
<b>Abbildung 13:</b> Etablierung eines Zwei-Kammer-Systems zur Messung von freigesetztem Stickstoffmonoxid. ....	53
<b>Abbildung 14:</b> UV-Vis-Absorptionsspektren der Fe-DETC-Spezies.....	55
<b>Abbildung 15:</b> Extraktion und partielle Aufreinigung einer intraerythrozytären sGC. ....	57
<b>Abbildung 16:</b> eNOS-abhängige Stimulation der intraerythrozytären sGC. ....	58
<b>Abbildung 17:</b> Hypoxieabhängige Nitrit-Reduktion und Stimulation der intraerythrozytären sGC.....	60
<b>Abbildung 18:</b> Stimulation der intraerythrozytären sGC durch Stickstoffmonoxid und PDE- Inhibition. ....	61
<b>Abbildung 19:</b> Pharmakologische Stimulation der intraerythrozytären sGC. ....	63
<b>Abbildung 20:</b> Aktivierung der oxidierten sGC durch BAY 60-2770 und variierende ODQ- Konzentrationen. ....	64
<b>Abbildung 21:</b> Anwendung muriner Modelle mit genetischer Defizienz der $\alpha$ -Untereinheit der sGC.....	66
<b>Abbildung 22:</b> Expression und Aktivität von sGC und PDE in Hämoglobin-freien Erythrozytenkonzentraten. ....	68
<b>Abbildung 23:</b> Massenspektrometrische Proteinidentifikation einer $\beta_1$ -sGC in Erythrozyten. .....	69
<b>Abbildung 24:</b> Aktivierbarkeit der intraerythrozytären sGC bei koronarer Herzkrankheit....	74
<b>Abbildung 25:</b> Aktivitätsassay der sGC in humanen und murinen Erythrozytenextrakten im Vergleich. ....	76
<b>Abbildung 26:</b> Expression und Aktivität einer Proteinkinase G in Hämoglobin-freien Konzentraten. ....	77
<b>Abbildung 27:</b> Nachweis einer cGMP-abhängigen VASP-Phosphorylierung in Erythrozyten. .....	78

<b>Abbildung 28:</b> Ektazytometrische Untersuchung von Erythrozyten. ....	80
<b>Abbildung 29:</b> Einfluss von Erythrozyten auf die kardiale Funktion im isoliert perfundierten Herzen. ....	82
<b>Abbildung 30:</b> Durchflusszytometrische Analyse zum Nachweis von Plättchen in Blutfraktionen (CD41 <sup>+</sup> ). ....	97
<b>Abbildung 31:</b> Graphische Zusammenfassung der Ziele dieser Studie. ....	109

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Nomenklatur der für das kardiovaskuläre System wichtigen löslichen und membranständigen/ partikulären Guanylatcyclasen.....	5
<b>Tabelle 2:</b> Liste der verwendeten Antikörper für die Western Blot Analyse.....	38
<b>Tabelle 3:</b> Fragment-Ionen für das Peptid EGLQDIVIGIHK der $\beta_1$ -sGC. ....	70
<b>Tabelle 4:</b> Fragment-Ionen für das Peptid INVSEYTYR der $\beta_1$ -sGC. ....	71
<b>Tabelle 5:</b> Patientendaten der Studie und klinische Charakteristika im Vergleich. ....	72
<b>Tabelle 6:</b> Spezifische Aktivitäten verschiedener Experimente im Vergleich.....	100

## Abkürzungsverzeichnis

8-pCPT-cGMP	8-(4-Chlorophenylthio)-cGMP, zellpermeables und hydrolysestabiles Analogon von cGMP
ANOVA	Varianzanalyse, engl. <i>analysis of variance</i>
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
AUC	Integral/Fläche unter der Kurve, engl. <i>area under the curve</i>
BAY 41	BAY 41-2272, sGC-Stimulator
BAY 60	BAY 60-2770, sGC-Aktivator
BH <sub>4</sub>	Tetrahydrobiopterin
C57BL/6J	„Black 6“-Mauslinie, verwendet als Wildtyp
cAMP	(Cyclisches) Adenosin-3',5'-monophosphat
cGMP	(Cyclisches) Guanosin-3',5'-monophosphat
CLD	Chemilumineszenzdetektion (von Stickstoffmonoxid)
CTRL	Kontrolle oder Kontrollgruppe
DEA/NO	Diethylamin-NONOate, Donor von Stickstoffmonoxid
DETC	Diethyldithiocarbamat
DMSO	Dimethylsulfoxid, organisches Lösungsmittel
dP/dt	Linksventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit
DT-2	Inhibitor-Peptid der PKG
DTT	Dithiothreitol
EC	Endothelzellen aus Kultur, s. HUVEC
EI	Elongationsindex, relative Einheit zur Beschreibung der Erythrozytenverformbarkeit
eNOS	Endotheliale NO-Synthase, auch NOS3
EPR	Elektronenspinresonanz, engl. <i>electron paramagnetic resonance</i>
Ery(s)	Erythrozyten oder rote Blutkörperchen
GSH	Glutathion, ein Tripeptid
GSSG	Glutathiondisulfid, Dimer von oxidiertem Glutathion
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
Hb	Hämoglobin
HBSS+	Puffer, engl. <i>Hanks' balanced salt solution</i> , mit Calcium und Magnesium
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure

Hkt	Hämatokrit, Volumenanteil der zellulären Blutbestandteile
HUVEC	Endothelzellen aus Kultur, engl. <i>human umbilical vein endothelial cells</i>
<i>i.p.</i>	intraperitoneal, Injektion in die Bauchhöhle
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin, PDE-Inhibitor
kDa	Kilodalton, atomare Masseneinheit der Biochemie
kg KG	Kilogramm Körpergewicht, Dosisergänzung für Medikamentenapplikation
KHK	Koronare Herzkrankheit
KO	Versuchstier mit genetischer Defizienz, engl. <i>knockout</i>
L-Arg	L-Arginin
L-NAME	L- <sup>N</sup> -Nitroargininmethylester, NOS-Inhibitor
LORCA	Ektazytometrie, engl. <i>laser optical rotational cell analyzer</i>
LVDP	Maximal entwickelter linksventrikulärer Druck
MGD	<i>N</i> -Methyl-D-glucamindithiocarbamat
mmHg	Millimeter-Quecksilbersäule, Nicht-SI-Einheit für den Blutdruck
MW	Mittelwert
MWCO	Ausschlussgrenze von Zentrifugeneinheiten, engl. <i>molecular weight cut-off</i>
NEM	<i>N</i> -Ethylmaleinimid
NO	Stickstoffmonoxid (auf die Nennung des Radikals wird im Text verzichtet)
norNOHA	<i>N</i> <sup>ω</sup> -Hydroxy-nor-Arginin, Arginase-Inhibitor
Nrf2	Transkriptionsfaktor für antioxidative Proteine, engl. <i>nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2</i>
ODQ	1 <i>H</i> -[1,2,4]Oxadiazolo[4,3- <i>a</i> ]quinoxalin-1-on, sGC-Inhibitor
PBS	Puffer, engl. <i>phosphate buffered saline</i>
PDE	(3',5'-Cyclonukleotid-) Phosphodiesterase
pGC	Partikuläre/Membranständige Guanylatcyclase
PKA	Proteinkinase A
PKG	Proteinkinase G oder auch cGK, engl. <i>cGMP-dependent protein kinase</i>
RIA	Radioimmunoassay
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung, engl. <i>standard deviation</i>
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SEM	Standardfehler, engl. <i>standard error of the mean</i>

sGC	Lösliche Guanylatcyclase, engl. <i>soluble guanylate cyclase</i>
Sper/NO	Spermine-NONOate, Donor von Stickstoffmonoxid
TBS	Puffer, engl. <i>Tris-buffered saline</i>
TEA	Triethylamin
TEMPOL	4-Hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidinyloxyl
TRIS	2-Amino-2-(hydroxymethyl)propan-1,3-diol
VASP	Vasodilatator-stimuliertes Phosphoprotein
WT	Wildtyp-Maus

---

## 1. Einleitung

Herz-Kreislauf-Erkrankungen gehören weltweit (und besonders in den Industrienationen) zu den mit Abstand häufigsten Todesursachen [1]. Alleine 2015 starben in Deutschland 76,013 Menschen (21.3% aller Sterbefälle) an der chronischen ischämischen Herzkrankheit (oder KHK: koronare Herzkrankheit) und 49,210 Menschen (13.8% aller Sterbefälle) an einem akuten Myokardinfarkt (Herzinfarkt). Zwar sind diese Zahlen seit Jahren kontinuierlich rückläufig, Herz-Kreislauf-Erkrankungen machen mit 37 Milliarden Euro (2008) aber den größten Kostenpunkt in unserem Gesundheitssystem aus (offizielle Daten des Statistischen Bundesamtes) und für eine Verbesserung der Lebensqualität bzw. -zeit stehen besonders die Fortschritte dieser Fachdisziplin im Mittelpunkt.

Die Risikofaktoren einer (frühzeitigen) Progression pathologischer Zustände bestehen u.a. in Bewegungsmangel, Adipositas (Übergewicht), Hypertonie (Bluthochdruck), Tabakrauchen, Hypercholesterinämie, Diabestes mellitus und unausgewogener Ernährung [2]. Personen aus sozial schwächerem Umfeld und mit niedrigerem Bildungsniveau haben dabei (aufgrund dieses Risikoprofils) ein signifikant erhöhtes Herzinfarktisiko, sind im Durchschnitt jünger und weisen eine schlechtere Überlebensrate auf [3, 4]. Daneben gibt es Risikofaktoren, die sich den äußeren Einflüssen entziehen und nicht-modifizierbar sind. Dazu gehören das Geschlecht (Männer und postmenopausale Frauen sind häufiger betroffen), ein erhöhtes Alter und eine genetische Prädisposition (z.B. in Form einer positiven Familienanamnese) [2].

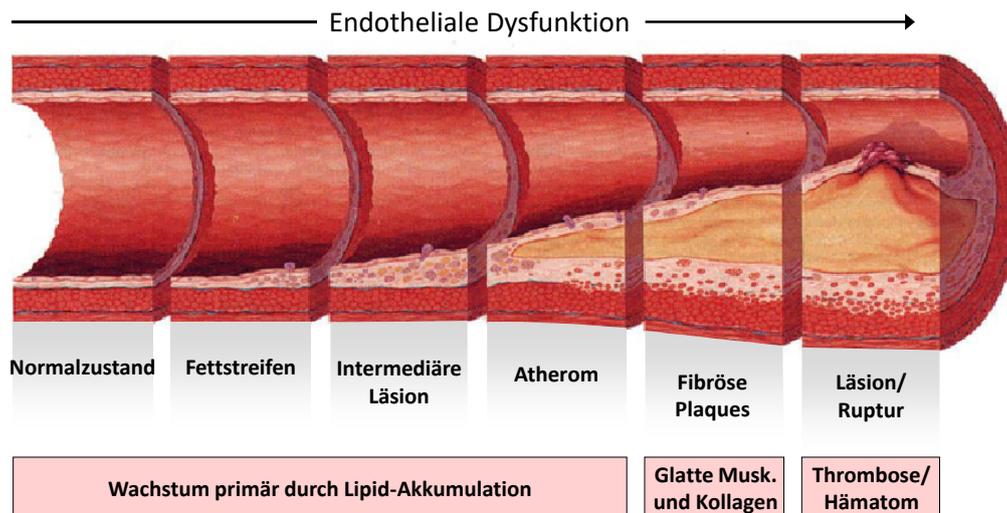
Die Grundlage der meisten kardiovaskulären Erkrankungen liegt in Veränderungen der Gefäße und dessen Funktion. Bei atherosklerotischen Veränderungen kommt es zu chronisch entzündlichen Prozessen und nach Einlagerung von Cholesterin und Fetten in die Gefäßwand (*Tunica intima*) zur Ausbildung von atherosklerotischen *Plaques*, die das Gefäßlumen stark einengen oder zur Bildung von Thromben führen können (s. Kapitel 1.1) [5, 6]. Diese Prozesse gehen mit einer verminderten Bioverfügbarkeit von Stickstoffmonoxid (NO) einher und werden vielleicht auch durch diesen Funktionsverlust (endotheliale Dysfunktion) ausgelöst, da NO ein wichtiger vaskulärer Regulator ist, der u.a. an der Vasodilatation (Gefäßerweiterung) und Inhibition der Plättchenaggregation beteiligt ist und antiinflammatorisch (entzündungshemmend) wirkt (s. Kapitel 1.2 und 1.3) [7].

## 1.1. Atherosklerose und endotheliale Dysfunktion

Die Arteriosklerose (wörtlich *Arterienverkalkung*) ist in der Pathologie ein Oberbegriff und umfasst neben der Atherosklerose noch die Mönckeberg-Sklerose (Ablagerung von Hydroxyapatit in der *Tunica media*) und die Arteriosklerose (Einlagerung von hyaliner Substanz in die Gefäßwand von Arteriolen) [8]. In den meisten Fällen wird von Atherosklerose gesprochen (aufgrund der großen Verbreitung und klinischen Relevanz), diese wird aber selbst im medizinischen Sprachgebrauch mit der Arteriosklerose synonym verwendet.

Im Normalzustand besteht die innerste Gefäßschicht (*Tunica intima*) aus einem einschichtigen Endothel und dem darunterliegenden Bindegewebe. Bei der Initiierung von atherosklerotischen Veränderungen kommt es durch eine Verletzung des Endothels (entsprechend dem *response-to-injury*-Modell [9]) zur erhöhten Membranpermeabilität und einer Ansammlung von Lipoproteinen (wie das LDL, engl. *low density lipoprotein*) im subendothelialen Bindegewebe. Dieses wird durch Peroxidasen oxidiert und wirkt dann proinflammatorisch, wodurch u.a. Monozyten (eine Unterart der Leukozyten) ins Gewebe migrieren, zu Makrophagen differenzieren und ungehemmt das oxidierte LDL aufnehmen. Durch die intrazelluläre Anreicherung von Lipidtropfen werden die Makrophagen zu Schaumzellen, die mikroskopisch sichtbar die Fettstreifen bilden (**Abb. 1**) [10]. Diese Fettstreifen können teils schon in den Arterien von Kindern beobachtet werden [11]. Wenn die Schaumzellen beginnen apoptotisch zu werden, kommt es auch zu extrazellulären Lipidtropfen und dem Bild des Atheroms. Das geschädigte Endothel wirkt zudem thrombogen und die rekrutierten Plättchen/Thrombozyten (sowie Makrophagen) sezernieren Wachstumsfaktoren (u.a. den PDGF, engl. *platelet-derived growth factor*), die eine Proliferation von Zellen der glatten Muskulatur zwischen Endothel und Atherom bewirken. Zusammen mit Bestandteilen der extrazellulären Matrix (u.a. Kollagen) entstehen faserige *Plaques*, die das Atherom stabilisieren sollen [5, 6, 12].

Diese Prozesse verlaufen über Jahre/Jahrzehnte und bleiben lange symptomlos, bis es zu einer signifikanten Verengung des Gefäßlumens (Stenose) und zur Minderversorgung des dahinterliegenden Gewebes kommt. Durch weiteres Wachstum des Atheroms und Defekte an der fibrösen Kappe (inflammatorisch und mechanisch) kann es schließlich zu komplizierten Läsionen/Rupturen und der Bildung von Thromben kommen, die das Gefäß an dieser Stelle komplett verschließen, oder erst weiter geschwemmt werden und dort eine (Thrombo-) Embolie auslösen [13, 14].



**Abbildung 1: Schematische Darstellung der Progression von Atherosklerose.**

Darstellung eines arteriellen Gefäßes im longitudinalen Schnitt und der Entwicklungsstadien atherosklerotischer Veränderungen. Im Normalzustand besteht die Tunica Intima aus Endothel und subendotheliales Bindegewebe. Durch Migration von Makrophagen und Bildung von Schaumzellen (mit intrazellulären Lipidtropfen) kommt es zu Fettstreifen. Das erstmalige Auftreten von extrazellulären Lipidtropfen wird als intermediäre Läsion oder Präatherom bezeichnet. Beim Fortschreiten des Atheroms kommt es durch Wachstumsfaktoren zur Proliferation von glatter Muskulatur zwischen Endothel und Atherom und der Ausbildung von fibrösen Plaques. Mit zunehmender Einengung des Gefäßlumens kommt es zur Stenose. Weisen diese Plaques zudem einen Oberflächendefekt auf, entstehen Thromben, die das Gefäß an dieser Stelle vollständig verschließen oder eine Thromboembolie auslösen können. Modifiziert nach [5, 6].

Atherosklerotische Veränderungen betreffen meist die mittleren und großen Arterien und treten nicht wahllos auf, sondern an „bevorzugten“ Orten im Körper. Häufige Stellen befinden sich am Aortenbogen und der abdominalen Aorta, den Halsarterien (*A. carotis communis* und *A. carotis interna*), den Koronargefäßen (Herzkranzgefäße) und den Beinarterien (*A. poplitea*) [15]. Veränderungen der Halsarterien bilden ein Risiko für Schlaganfälle, der Beinarterien für die periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK). Eine Manifestation der Atherosklerose in den Koronargefäßen wird als koronare Herzkrankheit (KHK) bezeichnet und führt im fortgeschrittenen Stadium zur *Angina pectoris* (Brustenge) als Leitsymptom und zum Myokardinfarkt [16]. Diese Lokalisationen beruhen u.a. darauf, dass die enzymatische Produktion von NO auch durch Scherkräfte ausgelöst wird (vgl. Kapitel 1.3, **Abb. 3**) und turbulente Strömungen (wie sie an diesen Stellen vorherrschen) nicht zu dieser Aktivierung führen [17]. Dadurch entfallen die protektiven Wirkungen von NO als Vasodilatator, Inhibitor der Plättchenaggregation, Verminderung der Proliferation von glatter Muskulatur und anderen antiinflammatorischen, sowie gefäßmodulierenden Wirkungen [7], wodurch auch eine initiiierende Verletzung des Endothels als Auslöser der Atherosklerose erleichtert wird.

Eine verringerte NO-Bioverfügbarkeit wird als endotheliale Dysfunktion bezeichnet und steht (neben der verringerten Aktivierung durch turbulente Strömung) in direkter Verbindung mit den eingangs genannten Risikofaktoren, die an der Erhöhung endogener Inhibitoren der NO-Synthase (NOS), Änderungen im L-Arginin-Stoffwechsel oder erhöhtem oxidativen Stress (s. Kapitel 1.5) beteiligt sind [18, 19]. Durch eine Umstellung der Lebensgewohnheiten und medikamentöser Therapie (zur Reduktion/Minimierung der Risikofaktoren) wird auch die endotheliale Dysfunktion wieder aufgehoben, die als unabhängiger Prädiktor für kardiovaskuläre Ereignisse gilt [20].

## 1.2. Die lösliche Guanylatcyclase

Die meisten protektiven Wirkungen von NO werden indirekt über den sekundären Botenstoff cGMP (cyclisches Guanosin-3',5'-monophosphat) vermittelt. cGMP kommt in fast allen Zellen des menschlichen Körpers vor (ubiquitär) und übt somit je nach Gewebe vielfältige Aufgaben aus, wobei die direkten Effektorproteine u.a. aus der Proteinkinase G (PKG) bestehen [21]. Erhöhte cGMP-Werte in den Zellen der glatten Muskulatur führen z.B. über Aktivierung der PKG, Phosphorylierung der Myosin-leichte-Ketten-Kinase (MLCK) und somit verringerten Aktivität zu einer Dephosphorylierung der leichten Kette des Myosins und damit zur Vasodilatation (zusammen mit Aktivierung der Myosin-leichte-Ketten-Phosphatase und Senkung des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegels) (s. **Abb. 3** und **4**) [22].

Die enzymatische Produktion von cGMP aus Guanosin-5'-triphosphat (GTP) geschieht durch die Guanylatcyclasen (GC). Aus historischen Gründen wurde dabei zwischen den löslichen (sGC, engl. *soluble guanylate cyclase*) und den partikulären/membranständigen Guanylatcyclasen (pGC) unterschieden. Während die pGC u.a. durch natriuretische Peptide aktiviert werden (**Tab. 1**), sind die sGC NO-sensitive Rezeptoren, deren  $\beta_1$ -Untereinheit analog zu Hämoglobin eine Häm-Gruppe besitzt (Porphyrinring mit Eisen-Zentralatom), an die das NO zur Aktivierung des Proteins bindet [23, 24]. Bei den zwei vorkommenden Isoformen der sGC dimerisiert eine  $\alpha$ -Untereinheit ( $\alpha_1$  oder  $\alpha_2$ ) mit einer  $\beta_1$ -Untereinheit, wodurch die beiden Proteine  $\alpha_1\beta_1$ -sGC (GC-1 nach neuer Nomenklatur) und  $\alpha_2\beta_1$ -sGC (GC-2) (**Tab. 1**) entstehen, die nicht anhand der enzymatischen Aktivität unterschieden werden können [25, 26]. Der Grund für das Vorhandensein zweier Isoformen mit gleichen spezifischen Aktivitäten ist noch nicht vollständig geklärt, die GC-1 scheint aber weiter verbreitet zu sein und kann in fast allen Zellen gefunden werden, während eine funktionelle Expression der GC-2 bisher nur im zentralen Nervensystem (ZNS), Plazenta, Uterus und Lunge gefunden wurde [27]. Interessanterweise

enthält die  $\alpha_2$ -Untereinheit eine spezifische Erkennungsdomäne, wodurch sie an die Membran assoziiert [28].

**Tabelle 1: Nomenklatur der für das kardiovaskuläre System wichtigen löslichen und membranständigen/partikulären Guanylatcyclasen.**

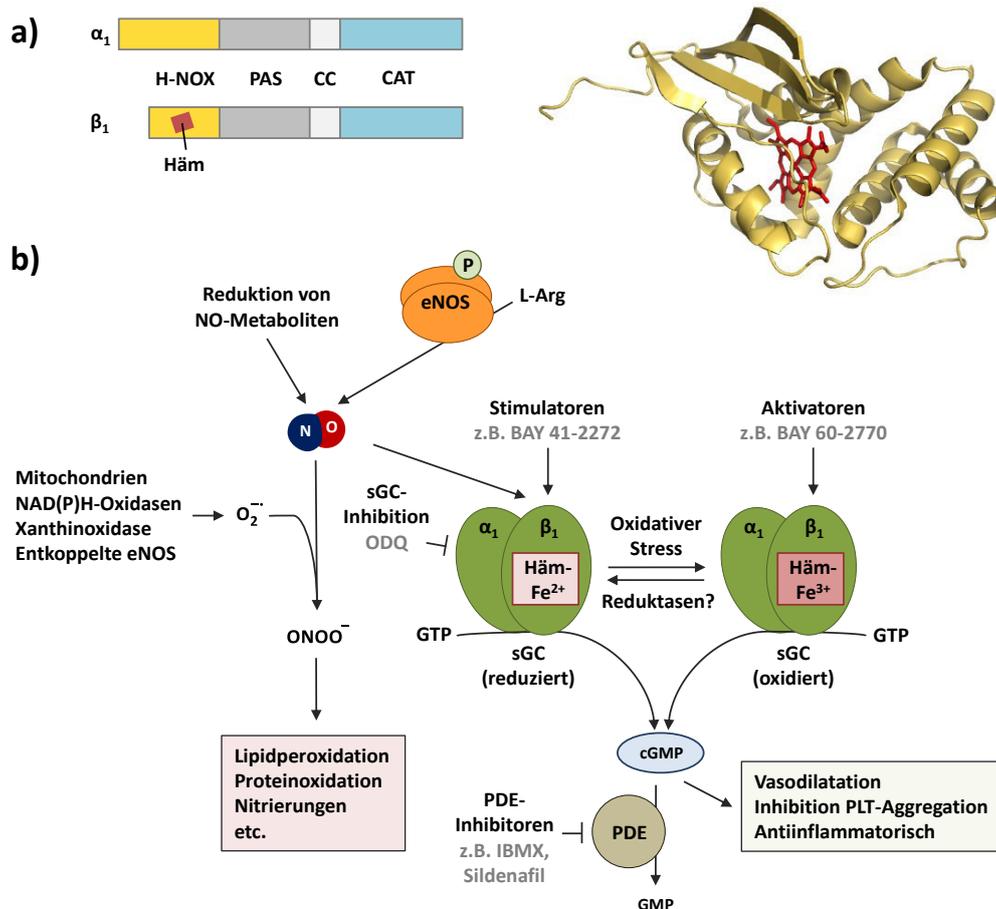
Die löslichen Guanylatcyclasen (sGC) sind NO-sensitive Rezeptoren und liegen in den Isoformen  $\alpha_1\beta_1$  (GC-1) und  $\alpha_2\beta_1$  (GC-2) vor. Die partikulären Guanylatcyclasen (pGC) werden u.a. durch natriuretische Peptide aktiviert (GC-A und GC-B). Nicht genannt sind GC-C (Intestinaler Ionentransport), GC-E und GC-F (Phototransduktion in der Retina). GC-D (Olfaktion) und GC-G (Thermozeption) wurden im Nager identifiziert und stellen im Menschen Pseudogene dar. ANP: Atriales natriuretisches Peptid, BNP: Natriuretisches Peptid Typ B oder engl. brain natriuretic peptide, CNP: Natriuretisches Peptid Typ C, CV: Kardiovaskulär, NPR: Natriuretischer Peptidrezeptor, ZNS: Zentrales Nervensystem. Modifiziert nach [29, 30].

Name	GC-1	GC-2	GC-A	GC-B
Alternativ	$\alpha_1\beta_1$ -sGC	$\alpha_2\beta_1$ -sGC	NPR1	NPR2
Lokalisation	Ubiquitär	ZNS, Plazenta, Uterus, Lunge	CV-System	CV-System, Knochen
Funktion	CV-Homöostase	Neurotransmission, CV-Homöostase	Blutdruck	Knochen- homöostase
Endogener Ligand	NO (CO)	NO (CO)	ANP, BNP	CNP

Besonders die sGC ist für das kardiovaskuläre System von hoher Bedeutung und stellt im Falle einer endothelialen Dysfunktion (und somit verringerter NO-Bioverfügbarkeit) ein wichtiges pharmakologisches Ziel dar. Bereits vor über 150 Jahren wurden bei *Angina pectoris* NO-Donoren wie Isoamylnitrit und Nitroglycerin verabreicht, ohne dessen Wirkungsweise zu kennen [31]. Eine langfristige Behandlung mit diesen Substanzen (abseits vom Notfallmedikament) führt aber zu einem raschen Wirkverlust (Toleranz), abgesehen vom Auftreten von „Nitroglycerin-Kopfschmerzen“ [32].

Neuartige pharmakologische Substanzen binden direkt an die sGC und werden als sGC-Stimulatoren und -Aktivatoren bezeichnet (**Abb. 2**). Der Stimulator BAY 41-2272 z.B. (einem potenteren Nachfolger des Stimulators YC-1) bindet außerhalb der Häm-Gruppe (an der  $\alpha_1$ -Untereinheit) und induziert durch eine Konformationsänderung die cGMP-Synthese [33]. Gleichzeitig wird auch der Nitrosyl-Häm-Komplex stabilisiert, so dass eine synergistische Wirkung mit (endogenem) NO entsteht [34, 35]. Die Stimulatoren binden aber nur an die reduzierte sGC (Häm-Fe<sup>2+</sup>). Durch oxidativen Stress (oder Applikation des sGC-Inhibitors

ODQ) kann die sGC in die oxidierte Form überführt werden (Häm-Fe<sup>3+</sup>), die nicht mehr durch NO (und sGC-Stimulatoren) aktiviert werden kann. Die sGC-Aktivatoren wie BAY 60-2770 (einem Analogon von Cinaciguat [36]) binden ebenfalls außerhalb der Häm-Gruppe und führen zur (NO-unabhängigen) cGMP-Synthese, sind aber im Gegensatz zu den Stimulatoren nicht von der Anwesenheit der Häm-Gruppe abhängig [34].



**Abbildung 2: Struktur und Aktivierungswege der löslichen Guanylatcylase.**

Modifiziert nach [24, 37, 38]. **(a)** Schematische Darstellung der Primärstrukturen der  $\alpha_1$ - und  $\beta_1$ -Untereinheiten und Röntgenkristallstruktur der HNOX-Bindungsdomäne (gelb) mit gebundenem Häm (rot). HNOX: Häm-NO/Sauerstoff-Bindungs-Domäne, PAS: Per/Arnt/Sim-Domäne, CC: Coiled-Coils-Domäne, CAT: Katalytische Domäne. PDB (Protein Data Bank) ID 1U55. **(b)** Die reduzierte sGC (Häm-Fe<sup>2+</sup>) kann durch NO (enzymatisch aus der endothelialen NO-Synthase (eNOS), oder durch Reduktion aus NO-Metaboliten) stimuliert werden, das dadurch entstehende cGMP bewirkt Vasodilatation, Inhibition der Plättchen-Aggregation und wirkt antiinflammatorisch. Der Abbau von cGMP erfolgt durch die Phosphodiesterasen (PDE). Durch oxidativen Stress oder Applikation des Inhibitors ODQ wird die sGC oxidiert (Häm-Fe<sup>3+</sup>) und kann nicht mehr durch NO stimuliert werden. Der Aktivator BAY 60-2770 bindet aber an die oxidierte sGC und aktiviert diese NO-unabhängig, Der Stimulator BAY 41-2272 hingegen bindet an die reduzierte sGC und wirkt synergistisch mit NO. Bei Anwesenheit von reaktiven Sauerstoffspezies kann aus Superoxid-Anionen und NO Peroxinitrit (ONOO<sup>-</sup>) gebildet werden, das zu Zellschäden führen kann (Lipidperoxidation, Proteinoxidation, Nitrierungen etc.).

Dieser Mechanismus kann z.B. im Falle von ischämiegeschädigten Kardiomyozyten nützlich sein, wo die sGC ebenfalls oxidiert vorliegt [39], oder bei atherosklerotischen Veränderungen mit erhöhtem oxidativen Stress und proinflammatorischem Milieu [40]. Neben der Oxidation der sGC führt erhöhter oxidativer Stress (s. Kapitel 1.5) durch Reaktion von Superoxid-Anionen mit NO zur Bildung von Peroxinitrit ( $\text{ONOO}^-$ ), das zusätzlich Zellschäden anrichten kann, wie Lipidperoxidation, Proteinoxidation und Nitrierungen [41].

Zur Unterstützung der protektiven cGMP-Wirkungen kann auch eine Inhibition der Phosphodiesterasen (PDE) stattfinden. Diese Gegenspieler der Guanylatcyclasen wandeln cGMP in GMP (Guanosin-5'-monophosphat) um und verringern somit dessen Wirkungsdauer. Sildenafil ist ein etablierter Inhibitor der PDE Isoform 5 [42] und wird (neben der erektilen Dysfunktion) bei der pulmonal-arteriellen Hypertonie eingesetzt [43].

### 1.3. Die endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase

Die enzymatische Produktion von NO wird durch NO-Synthasen (NOS) katalysiert, von denen es drei Isoformen gibt. Die neuronale NOS (nNOS) wird im Gehirn exprimiert, die induzierbare NOS (iNOS) in Makrophagen und Mikrogliazellen und die kardiovaskulär bedeutende endotheliale NOS (eNOS) überwiegend im Gefäßendothel. nNOS und eNOS sind konstitutiv exprimiert und werden lediglich in ihrer Aktivität reguliert, während die iNOS durch Zytokine induziert wird und als Bestandteil des Immunsystems zytotoxische Mengen an NO produzieren kann (wodurch ein septischer Schock zum lebensbedrohlichen Blutdruckabfall führen kann) [22].

Die eNOS braucht für die Umsetzung des Substrats L-Arginin zu NO die Anwesenheit der Kofaktoren Tetrahydrobiopterin ( $\text{BH}_4$ ), Flavin-Adenin-Dinukleotid, Flavinmononukleotid, Häm und Calmodulin [7, 44]. Calmodulin ist dabei in Anwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$  für die Ausbildung des katalytisch aktiven Homodimers notwendig und somit ein zentraler Regulator der eNOS-Aktivität. Bei einer eNOS-Entkopplung (wenn das Protein als Monomer vorliegt), produziert die Oxygenase-Domäne Superoxid-Anionen statt NO (da die Sauerstoff-Reduktion von der Reaktion mit L-Arginin entkoppelt ist) und bewirkt eine Senkung der NO-Bioverfügbarkeit [7]. Im Normalzustand aber werden von dem Homodimer 2 mol L-Arginin (in Anwesenheit von 4 mol  $\text{O}_2$  und 3 mol NADPH, Nicotinamidadenindinukleotidphosphat) zu 2 mol L-Citrullin und 2 mol NO umgesetzt:



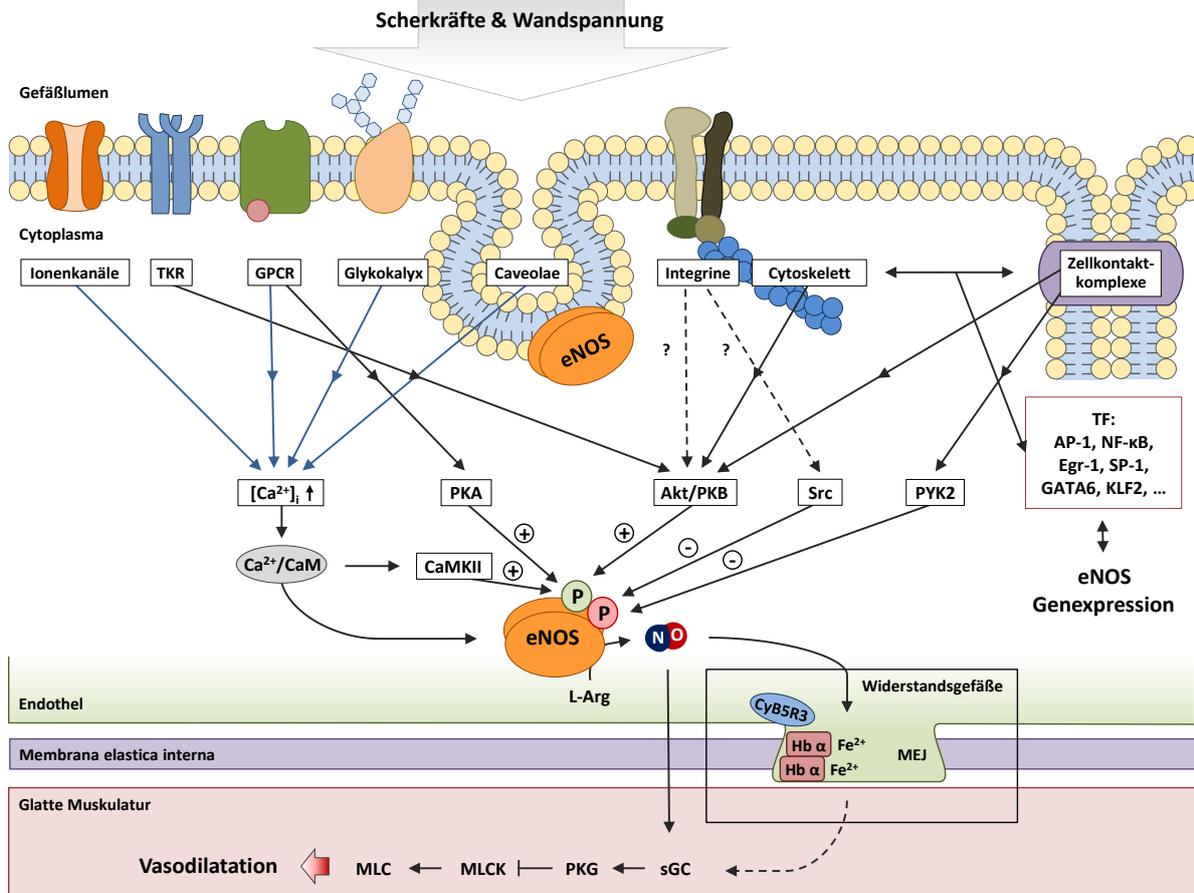


Abbildung 3: Mechanismen der eNOS-Aktivierung durch Scherkräfte.

Durch den Blutfluss verursachte Scherkräfte und Wandspannungen werden durch Mechanosensoren in der Membran detektiert und diese Aktivierung führt über einen Anstieg der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration oder Aktivierung von Kinasen zu einer kurzzeitigen eNOS-Regulation. Eine nachhaltige Regulation geschieht durch Aktivierung von Transkriptionsmechanismen und erhöhter eNOS-Expression. Das produzierte NO kann in die anliegende glatte Muskulatur diffundieren und eine Vasodilatation auslösen. In Widerstandsgefäßen wird diese Diffusion aber durch „myoendothelial junctions“ kontrolliert, wo NO in Abhängigkeit des Redox-Status durch Hämoglobin  $\alpha$  gebunden wird. Akt/PKB: Proteinkinase B, AP-1: Aktivatorprotein 1, CyB5R3: NADH-Cytochrom-b5-Reduktase 3, CaM: Calmodulin, CaMKII: CaM-abhängige Proteinkinase II, Egr-1: Early growth response protein 1, eNOS: endotheliale NO-Synthase, GATA6: GATA-bindendes Protein 6, GPCR: G-Protein-gekoppelter Rezeptor, Hb  $\alpha$ : Hämoglobin  $\alpha$ , KLF2: Krüppel-like factor 2, L-Arg: L-Arginin, MEJ: Myoendothelial Junction, MLC: Myosin-leichte-Kette, MLCK: Myosin-leichte-Ketten-Kinase, NF- $\kappa$ B: Nuclear factor ‚kappa-light-chain-enhancer‘ of activated B-cells, PKA: Proteinkinase A, PKG: Proteinkinase G, PYK2: Protein-Tyrosinkinase 2, sGC: lösliche Guanylatcyclase, SP-1: Specific protein 1, Src: Tyrosinkinase Src, TF: Transkriptionsfaktor(en), TKR: Rezeptor-Tyrosinkinase. Modifiziert nach [17].

Reguliert wird die eNOS-Aktivität neben dem  $Ca^{2+}$ -sensitiven Weg durch die Verfügbarkeit des Substrats L-Arginin (mit der Arginase als Gegenspieler [45]), der Konzentration an endogenen Inhibitoren (wie ADMA: asymmetrisches Dimethylarginin [46, 47]) und aktivierenden (z.B. Ser1177 [48]) bzw. inhibierenden (z.B. Ser114 [49]) Phosphorylierungs-

stellen, sowie über längere Zeiträume durch eine veränderte Expression [17, 50]. Die Signalwege zu diesen Modulationen sind sehr komplex und werden u.a. durch Wachstumsfaktoren (VEGF, engl. *vascular endothelial growth factor*) und Hormone (Insulin, Bradykinin) initiiert, sowie anderen Aktivatoren der Proteinkinasen (wie z.B. Carbachol über den muskarinischen Acetylcholinrezeptor) [51, 52]. Daneben gibt es den bereits erwähnten Signalweg über (physiologische) Scherkräfte an der Gefäßwand, die über Proteine auf der luminalen Seite detektiert werden. Über diesen als Mechanosensing bezeichneten Prozess und der nachfolgenden eNOS-Aktivierung, sowie der heterozellularen Kommunikation durch NO ist vor kurzem ein umfassender Review-Artikel in *Antioxidants & Redox Signaling* erschienen, aus dem auch die Übersichtsabbildung entnommen wurde (**Abb. 3**) [17].

Dass die eNOS von großer physiologischer Bedeutung ist, zeigt auch ein murines Modell mit genetischer Defizienz (eNOS KO, engl. *knockout*). Der globale Verlust der eNOS führte dort zu einem systemisch erhöhten Bluthochdruck (diastolisch und systolisch), einer endothelialen Dysfunktion mit erniedrigter NO-Bioverfügbarkeit und geringeren cGMP-Basalwerten (in Aortenringen), sowie einer Anfälligkeit für Atherosklerose. Außerdem schien die durchschnittliche Lebenszeit der Erythrozyten verkürzt zu sein (vermutlich durch einen erhöhten Abbau durch die Milz) [44, 53-55].

Zu erwähnen bleibt, dass NO neben dem eNOS/sGC-Signalweg auch cGMP-unabhängig wirken kann. Proteine können an Thiolgruppen (Cysteine) durch S-Nitrosierung reversibel modifiziert und so wahrscheinlich in ihrer Aktivität moduliert werden (häufig fälschlicherweise als S-Nitrosylierung bezeichnet, in Anlehnung an die Phosphorylierung als posttranslationale Modifikation). Daneben gibt es die Bildung von 3-Nitrotyrosin, Glutathionylierung, Nitrierung, die Interaktion mit reaktiven Sauerstoffspezies und einen komplexen „*crossstalk*“ mit Sulfid [56-59].

#### **1.4. Die Rolle der Erythrozyten im NO-Metabolismus**

NO ist ein freies Radikal mit relativ kurzer Lebensdauer und kann aufgrund seiner geringen Größe und der Abwesenheit einer Ladung frei durch biologische Membranen diffundieren, wodurch es vom Endothel aus auch in das Gefäßlumen gelangen kann. In *ex vivo*-Experimenten wurde ermittelt, dass NO in Plasma oder Puffer eine Halbwertszeit von 1.5 bis 6 min besitzt [60], während die Zugabe von Erythrozyten diese Halbwertszeit auf 1.8 ms reduziert. Interessanterweise ist diese Reaktion immer noch tausendfach langsamer als die „direkte“ Reaktion von NO mit freiem Hämoglobin [61, 62]. Diese Unterschiede werden in

physikalischen Modellen mit Transportwiderständen und der Membranpermeabilität begründet, oder mithilfe einer konvektionsarmen Schicht, die die Zelle umgibt und die Diffusion verlangsamt [63, 64].

Nichtsdestotrotz reagiert NO mit Hämoglobin (welches mehr als 97% des Trockengewichts von Erythrozyten ausmacht oder 10 mM pro Zelle, bzw. 12-18 g/dL Vollblut [61]) und es bilden sich Nitrat und Methämoglobin (diese Reaktion ist mit  $\approx 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  extrem schnell) [61, 62]:



Den oxidierten Produkten des NO-Stoffwechsels (wie Nitrat) konnte lange Zeit keine physiologische Funktion zugewiesen werden, weshalb sie auch als biologisch inert angesehen wurden. Aufgrund dieser vermeintlichen Senkung der NO-Bioverfügbarkeit wurden Erythrozyten auch als „*sink of NO*“ bezeichnet und es war nicht nachvollziehbar, wie ein so effektiver NO *scavenger* in direkter Nachbarschaft zum Endothel bestehen kann, der wichtigsten NO-Quelle für die vaskuläre Regulation. Mittlerweile wurde aber erkannt, dass Erythrozyten das NO nicht nur „inaktivieren“, sondern aktiv am NO-Metabolismus beteiligt sind, diese Spezies durch Zirkulation systemisch zur Verfügung stellen und unter bestimmten Umständen wieder zu NO reduzieren und vasoaktive Moleküle (wie NO oder ATP, Adenosin-5'-triphosphat) sezernieren [61, 65].

NO kann in vielfältigen Reaktionen in unterschiedliche NO-Metaboliten überführt werden, wie Nitrosothiole (RSNO), Nitrosamine (RNNO), Nitro-Fettsäuren und Nitrit. All diese Metaboliten wurden mittlerweile mit physiologischen Prozessen in Verbindung gebracht [66-75], Nitrit scheint aber eine besonders wichtige Rolle einzunehmen. Bei der sogenannten hypoxischen Vasodilatation kommt es aufgrund eines Abfalls der Sauerstoffsättigung zu einer kompensatorischen Dilatation des Gefäßes (um dem erhöhten Bedarf an Sauerstoff gerecht zu werden), und dieser Effekt wurde in Studien nur beobachtet (u.a. in Aortenringen), wenn sowohl Nitrit, als auch Erythrozyten anwesend waren [70, 76]. Vermutet wird eine Nitrit-abhängige Freisetzung von NO aus Erythrozyten [67], die auch eine Inhibition der Plättchenaggregation bewirkt [77]. Mechanistisch kommen für die Nitrit-Reduktion zu NO Proteine wie die Xanthinoxidase, Carboanhydrase und Deoxyhämoglobin (deoxyHb) in Frage [76, 78, 79], wobei neuere Publikationen für eine alleinige Relevanz des deoxyHb sprechen [62] (diese Reaktion wird durch Hypoxie und Azidose begünstigt [80]):



Die Frage, wie das in Erythrozyten gebildete NO die Zelle verlassen kann, ohne vorher erneut mit Hämoglobin zu reagieren (s. Formel 2 und 4), ist kontroverser Bestandteil aktueller Publikationen [81] und soll auch im Rahmen dieser Studie experimentell untersucht und diskutiert werden.



Neben der Aufnahme von NO aus dem Gefäßlumen könnten Erythrozyten auch selber an der enzymatischen NO-Produktion beteiligt sein. Bereits früher wurden bei Immunfärbungen von Erythrozyten-*Ghosts* NOS-Epitope nachgewiesen [82]. Ein überzeugenderer Nachweis geschah aber mittels Immunpräzipitation und anschließender massenspektrometrischer Identifikation dieses Proteins als eNOS (bzw. NOS3 Isoform 1) [83]. Zur Kontrolle wurden Erythrozyten von Mäusen mit globalem Verlust der eNOS (eNOS KO) verwendet, in denen dieses Protein nicht nachgewiesen werden konnte [83]. Der *in vivo*-Nachweis einer physiologischen Relevanz geschah durch Etablierung von Chimären, bei denen die eNOS im Blut oder im Rest des Körpers ausgeschaltet wurde. Dafür wurden Wildtypen oder eNOS KO-Mäuse bestrahlt und das Knochenmark von Spender-Mäusen (Wildtypen oder eNOS KO) transplantiert, wodurch die eNOS nur in Blutzellen exprimiert wurde (BC<sup>+</sup>/EC<sup>-</sup>) oder nur im Rest des Körpers (BC<sup>-</sup>/EC<sup>+</sup>), sowie die entsprechenden Kontrollen (BC<sup>+</sup>/EC<sup>+</sup> bzw. BC<sup>-</sup>/EC<sup>-</sup>) [84]. Ein Verlust der eNOS im Blut (BC<sup>-</sup>/EC<sup>+</sup>) führte dabei zu signifikant niedrigeren Mengen an zirkulierendem Nitrit und Nitrat (in Erythrozyten und Plasma), sowie zu einem im Vergleich zur Kontrolle systemisch erniedrigtem Blutdruck (diastolisch und systolisch), der auch nach Entfernung von Plättchen/Thrombozyten und Leukozyten bestehen blieb (durch die Zugabe von Anti-Plättchen-Serum und Anti-CD45-Antikörpern) [84]. In einem Modell des akuten Myokardinfarkts führte das Fehlen der eNOS im Blut (BC<sup>-</sup>/EC<sup>+</sup>) außerdem nach 60 min Ischämie und 24 Stunden Reperfusion zu einer im Vergleich zur Kontrolle erhöhten Infarktgröße (und verminderten Ejektionsfraktion) [85].

Die Nachteile bei der Verwendung von Chimären bestehen darin, dass eine Bestrahlungsabhängige Aktivierung von Entzündungsprozessen stattfindet (mit evtl. erhöhter Expression der iNOS), die Möglichkeit eines Proteintransfers vom Blut zum Endothel besteht (durch endotheliale Progenitorzellen) und die fehlende Spezifität für erythroide Zellen. Daher wäre die Etablierung eines spezifischeren Mausmodells (z.B. mit molekularbiologischen Methoden wie dem *Cre/loxP*- oder *CRISPR/Cas*-System [86]) sinnvoll, bzw. ebenso die weitere biochemische Untersuchung der Mechanismen und Relevanz einer intraerythrozytären eNOS.

Denn neben dem Export und einer heterozellulären Reaktion mit anderen Blutbestandteilen oder der Gefäßwand könnte NO (aus NO-Metaboliten reduziert oder durch die eNOS produziert) auch intraerythrozytär wirken. Hinweise auf intraerythrozytäre Änderungen von zyklischen Nukleotiden (cAMP und cGMP) gab es immer wieder, die entsprechenden Cyclasen konnten aber nie zweifelsfrei nachgewiesen werden [87-89]. Aufgrund der Beteiligung von Erythrozyten am systemischen NO-Metabolismus wäre aber die Identifikation einer intraerythrozytären sGC und dessen physiologische *Targets* höchst interessant. Mögliche nichtkanonische Eigenschaften der Erythrozyten, die solch einer Regulation unterstehen könnten, wären z.B. eine veränderte Verformbarkeit, Initiation des Abbaus gealterter Erythrozyten und Export von vasoaktiven Substanzen wie ATP und NO [65].

## 1.5. Oxidativer Stress

Viele Reaktionen sind vom oxidativen Status der Zelle abhängig und erhöhte Aufkommen von reaktiven Sauerstoffspezies (wie Superoxid-Anionen, Hydroxyl-Radikale, Wasserstoffperoxid) und reaktiven Stickstoffspezies (z.B. Peroxinitrit) können zu Zellschäden führen (Proteinoxidation, Lipidperoxidation, Schädigung der DNA) [41]. Dies begünstigt die Progression pathologischer Zustände, Inflammation und Apoptose, wie exemplarisch durch die eNOS-Entkopplung, endotheliale Dysfunktion und die Entwicklung von Atherosklerose verdeutlicht wurde [18, 90]. Weitere Quellen für diese reaktiven Spezies stellen die Mitochondrien, NAD(P)H-Oxidasen und die Xanthinoxidase dar [91].

Reaktive Sauerstoffspezies haben aber nicht nur pathophysiologische Eigenschaften, sie können auch physiologische Funktionen erfüllen und als Signalmoleküle wirken. So können sie Transkriptionsfaktoren aktivieren und eine erhöhte Genexpression bewirken, oder an der synaptischen Plastizität beteiligt sein [92, 93]. Eine genaue Kontrolle des oxidativen Status scheint daher von großer Bedeutung zu sein, weshalb die Zellen verschiedene antioxidative Systeme aufweisen. Vitamin C und Tetrahydrobiopterin (BH<sub>4</sub>) können z.B. mit Radikalen reagieren, eine Oxidation von BH<sub>4</sub> ist aber kontraproduktiv, da dieses dann nicht mehr als Kofaktor für die eNOS zur Verfügung steht [94].

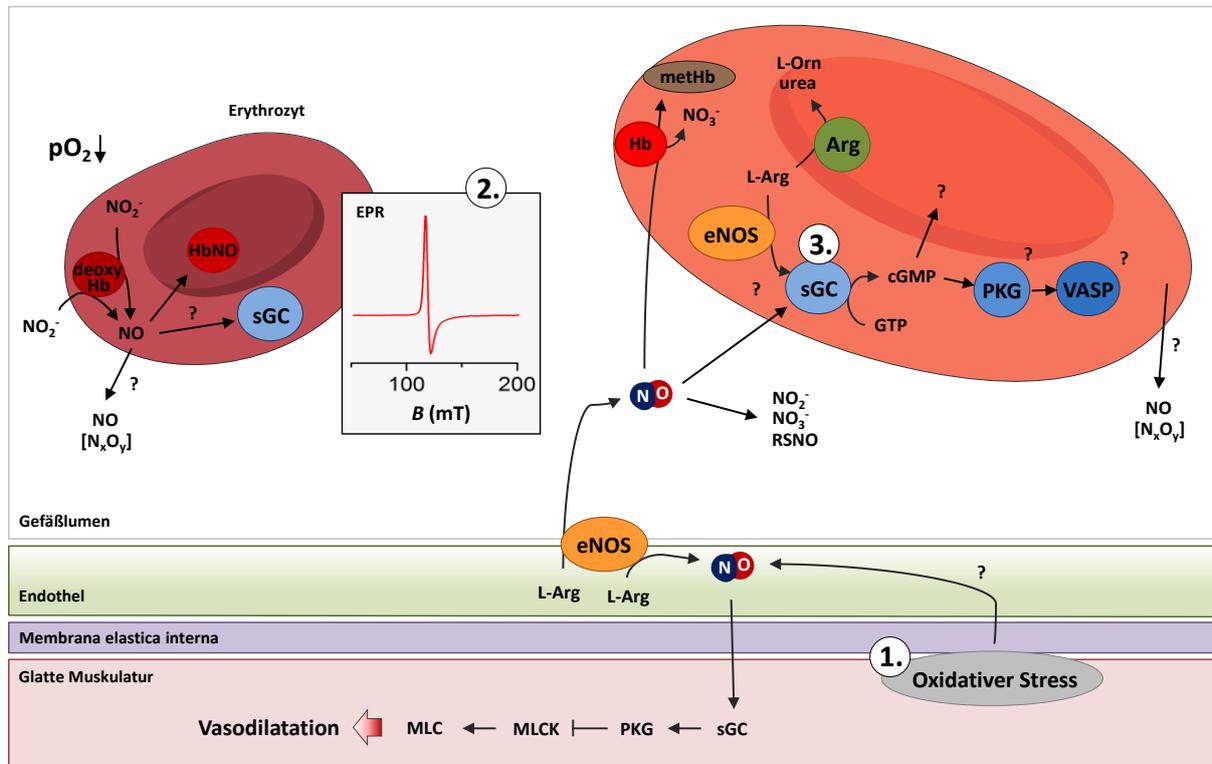
Das bekannteste antioxidative System besteht aus Superoxid-Dismutase (SOD) und dem Tripeptid Glutathion (GSH). Die SOD kann Superoxid-Anionen in Wasserstoffperoxid umwandeln, welches durch GSH (oder die Katalase) zu Wasser reduziert wird. Glutathion wird ubiquitär exprimiert und besteht aus der Peptidabfolge Glutaminsäure, Cystein und Glycin, wobei das Thiol bei der Reduktion von Wasserstoffperoxid durch die Glutathion-Peroxidase

oxidiert wird und mit einem weiteren GSH unter Ausbildung einer Disulfidbrücke zum Dimer GSSG reagiert. Eine Regeneration erfolgt durch die Glutathionreduktase und Reduktion der Disulfidbrücke (unter Verbrauch von NADPH) [95, 96].

Ein zentraler Transkriptionsfaktor für die Expression von antioxidativen und protektiven Enzymen ist der Nrf2 (engl. *nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2*) [97]. Die durch Nrf2 kontrollierten Gene sind an der Regulation biochemischer Prozesse zur Aufrechterhaltung des oxidativen Status beteiligt und eine pharmakologische Aktivierung von Nrf2 schützte Kardiomyozyten vor reaktiven Sauerstoffspezies und hämodynamischen Stress, während die Abwesenheit von Nrf2 diesen Effekt aufhob [98, 99]. Mäuse mit genetischer Defizienz für diesen Transkriptionsfaktor (Nrf2 KO) können daher als Modell zur chronischen Adaption an oxidativen Stress angesehen werden [100]. Diese Mäuse wurden schon umfassend charakterisiert [101-104], eine kardiovaskuläre Analyse des Phänotyps fand dabei aber nicht statt. Zu erwarten wäre, dass der erhöhte oxidative Stress zu einer endotheliale Dysfunktion, vaskulären Schäden und erhöhter Gefäßsteifigkeit führt.



## 2. Zielsetzung dieser Studie



1. Vaskuläre Adaption des eNOS/sGC-Signalweges auf oxidativen Stress
2. Stickstoffmonoxid (NO) in Erythrozyten / EPR-Studie
3. Intraerythrozytäre Signaltransduktion / Identifikation einer löslichen Guanylatcyclase

Abbildung 4: Graphische Zusammenfassung der Zielsetzungen dieser Studie.

Arg: Arginase, cGMP: cyclisches Guanosin-3',5'-monophosphat, deoxyHb: deoxygeniertes Hb, eNOS: endotheliale NO-Synthase, EPR: Elektronenspinresonanz-Spektroskopie, GTP: Guanosin-5'-triphosphat, Hb: Hämoglobin, L-Arg: L-Arginin, L-Orn: L-Ornithin, metHb: Methämoglobin, MLC: Myosin-leichte-Kette, MLCK: Myosin-leichte-Ketten-Kinase, NO: Stickstoffmonoxid, PKG: Proteinkinase G, RSNO: Nitrosothiol, sGC: lösliche Guanylatcyclase, VASP: Vasodilatator-stimuliertes Phosphoprotein.

Die Eingangshypothese dieser Studie ergab sich aufgrund der konträr wirkenden Tatsache, dass Erythrozyten an der Metabolisierung von NO beteiligt sind und so scheinbar dessen physiologische Wirkung begrenzen. Die Zielsetzung besteht daher darin, das „Schicksal“ von NO in Gefäßwand und Erythrozyten zu ermitteln. Dabei soll untersucht werden, welche Aufgaben die Erythrozyten im systemischen NO-Metabolismus erfüllen, ob NO auch wieder exportiert werden kann und/oder intraerythrozytäre Zielproteine vorliegen. Des Weiteren soll

(anhand eines Mausmodells) untersucht werden, welche Auswirkungen eine chronische Adaption an oxidativen Stress auf die vaskuläre Funktion hat.

Diese Zielsetzung kann in drei detailliertere Fragestellungen unterteilt werden:

1. Eine genetische Defizienz bezüglich Nrf2 kann als Modell zur chronischen Adaption an oxidativen Stress angesehen werden. Der oxidative Status soll daher in den Nrf2 KO-Mäusen anhand von Schlüsselenzymen wie dem GSH erfasst und die Auswirkungen dieses Modells auf die vaskuläre Funktion ermittelt werden. Der eNOS/sGC-Signalweg steht als wichtiger Regulator der Gefäßfunktion (Vasodilatation, Inhibierung der Plättchenaggregation, antiinflammatorisch etc.) im Mittelpunkt und kann vielfältig durch oxidativen Stress beeinflusst werden (eNOS-Entkopplung, Oxidation der sGC etc.).
2. NO, das in das Gefäßlumen diffundiert, wird rasch durch die Erythrozyten metabolisiert. Unter Verwendung der Elektronenspinresonanz-Spektroskopie sollen die Signale zugeordnet und eine in der Literatur beschriebene hypoxieabhängige Reduktion von Nitrit überprüft werden. Durch Verwendung von Spin Traps soll das NO (extrazellulär) akkumuliert und quantifiziert werden.
3. Neben dem Export könnte NO auch intraerythrozytär wirken. Hinweise auf Konzentrationsänderungen cyclischer Nukleotide wurden mehrfach beschrieben, die Anwesenheit von Cyclasen konnte allerdings nicht zweifelsfrei belegt werden. Aufgrund der Beteiligung von Erythrozyten am NO-Metabolismus soll die Präsenz einer intraerythrozytären sGC nachgewiesen werden (Aktivierbarkeit, Isoformzusammensetzung und pharmakologische Modulation), sowie mögliche Effektorproteine und eine physiologische Relevanz. Die Aktivierbarkeit der sGC soll auch im murinen Modell unter Verwendung von geeigneten Kontrollen und den Erythrozyten von Patienten mit koronarer Herzkrankheit nachgewiesen werden.

### 3. Material und Methoden

Soweit nicht anders beschrieben, wurden die verwendeten Chemikalien von Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA) in höchstmöglicher Reinheit (z.B. *p.a.* = *pro analysi* oder analysenrein) kommerziell erworben. Der sGC-Stimulator BAY 41-2272 und der sGC-Aktivator BAY 60-2770 wurden freundlicherweise durch die Bayer Pharma AG (Wuppertal) zur Verfügung gestellt. Reinstwasser wurde durch ein Wasseraufbereitungssystem (Milli-Q, Merck Millipore, Billerica, MA, USA) gewonnen, das an die uniinterne Versorgung mit demineralisiertem/vollentsalztem Wasser angeschlossen war. Das Abwiegen der Chemikalien geschah mit einer Feinwaage (A120S, Sartorius AG, Göttingen).

#### Zusammensetzung häufig verwendeter kommerzieller Puffer

PBS (*Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*, pH 7.4, Sigma Aldrich):

0.9 mM CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	1.5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
0.5 mM MgCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	136.9 mM NaCl
2.7 mM KCl	8.1 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>

HBSS+ (*Hanks' Balanced Salt Solution*, pH 7.0-7.4, Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham, MA, USA):

1.3 mM CaCl <sub>2</sub>	4.2 mM NaHCO <sub>3</sub>
0.5 mM MgCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	137.9 mM NaCl
0.4 mM MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0.3 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
5.3 mM KCl	5.6 mM D-Glukose
0.4 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	

#### 3.1. Verwendung von murinen Geweben

Für einige biochemische Untersuchungen wurde auf die Verwendung von murinen Geweben (Blut und Organe) zurückgegriffen. Alle Prozeduren wurden durch das Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen genehmigt (LANUV, Aktenzeichen 84-02.04.2013.A228) und gemäß den Vorgaben der *European Convention for the Protection of*

*Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes* durchgeführt. Für die basale Charakterisierung bzw. als Vergleich zu den Mäusen mit genetischer Defizienz (KO, engl. *knockout*) wurden Mäuse der Linie C57BL/6J von Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, Frankreich) verwendet. Die eNOS KO-Mäuse auf C57BL/6J-Hintergrund wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Axel Gödecke (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) zur Verfügung gestellt und wurden bereits zum Teil kardiovaskulär charakterisiert [105]. Nrf2 KO-Mäuse auf C57BL/6J-Hintergrund stammen vom Riken BioResource Center (Tsukuba (Ibaraki), Japan).  $\alpha_1$ -sGC KO- und  $\alpha_2$ -sGC KO-Mäuse auf C57BL/6J-Hintergrund wurden freundlicherweise durch Prof. Dr. Doris Koesling (Ruhr-Universität Bochum) zur Verfügung gestellt [25, 106]. Die Haltung der Mäuse geschah gemäß den institutionellen Richtlinien, der *ad libitum*-Zugang zu Wasser und gewöhnlichem Labortierfutter war gewährleistet. Zum Zeitpunkt des Versuches waren die Mäuse 12-20 Wochen alt. Soweit möglich, wurden lediglich männliche Tiere verwendet.

Die Entnahme von Vollblut geschah bei tief narkotisierten Mäusen durch intrakardiale Punktion mit einer heparinisierten Spritze (250 IU Heparin-Natrium, ratiopharm GmbH, Ulm). Das Blut wurde zeitnah in ein 1.5 mL Reaktionsgefäß (Eppendorf AG, Hamburg oder Sarstedt AG & CO, Nümbrecht) überführt und zentrifugiert (3,000 x g, 3 min, 4°C; Mikro 200R, Andreas Hettich GmbH, Tuttlingen). Plasma und Buffy-Coat (eine Grenzschicht aus Leukozyten und Plättchen/Thrombozyten) wurden, sofern nicht anderweitig gebraucht, verworfen. Das Erythrozytenpellet wurde dann in ein neues Reaktionsgefäß überführt, entsprechend der späteren Anwendung in PBS mit Protease- und Phosphatase-Inhibitor (Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham, MA, USA) oder in HBSS+ resuspendiert und zentrifugiert (300 x g, 10 min, 4°C). Dies geschah zwei weitere Male, wonach isolierte und gewaschene Erythrozyten erhalten wurden, die entweder sofort verwendet oder bis zum weiteren Gebrauch in flüssigem Stickstoff eingefroren (-196°C) und bei -80°C gelagert wurden.

Die Explantation der benötigten Organe (wie z.B. Herz und Aorta) erfolgte nach Thorakotomie und systemischer Perfusion mit kaltem PBS, durchgeführt mit einer Schlauchpumpe (Cole-Parmer GmbH, Wertheim) und kardialer Punktion nach Durchtrennung der *V. cava inferior*. Die Aorta wurde zusätzlich von umgebenem Fett befreit. Die Organe wurden gewogen und bis zum weiteren Gebrauch in Kryoröhrchen (VWR International, Radnor, PA, USA) in flüssigem Stickstoff eingefroren (-196°C) und bei -80°C gelagert.

### 3.2. Gewinnung humaner Blutproben und Verarbeitung

Bei den freiwilligen Probanden im Alter von 20-40 Jahren wurde die Blutabnahme nach schriftlicher Einwilligung (Studennummer 3857 der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät) durch Venenpunktion in der Ellenbeuge mit einer Flügelkanüle (21G, BD (Becton, Dickinson and Company), Franklin Lakes, NJ, USA) durchgeführt. Antikoaguliert wurde durch Verwendung von BD Vacutainer mit Heparin (17 IU/mL Lithium-Heparin, grüne Farbkodierung nach DIN/ISO 6710) oder Citrat (0.109 M Na<sub>3</sub>-Citrat, hellblaue Farbkodierung). Zur Gewinnung von isolierten und gewaschenen Erythrozyten wurde das Vollblut in eine mit Combi-Stopper versehene 20 mL Einmalspritze (B. Braun Melsungen AG, Melsungen) überführt, welche senkrecht in einem offenen 50 mL Zentrifugenröhrchen (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich) stand, und zentrifugiert (800 x g, 10 min, 4°C; Rotina 38R, Andreas Hettich GmbH). Anschließend wurden die Erythrozyten über die Öffnung der Spritze nach unten in ein neues Zentrifugenröhrchen abgelassen, wobei mindestens ein Zentimeter Abstand zum Buffy-Coat eingehalten wurde. Diese Vorgehensweise wurde angewandt, um eine „Kontamination“ des Erythrozytenpellet mit anderen Blutbestandteilen bereits im ersten Schritt möglichst gering zu halten. Nachfolgend wurden die Erythrozyten dreimal in HBSS+ resuspendiert, zentrifugiert (300 x g, 10 min, 4°C) und der Überstand verworfen. Die so gewonnenen Erythrozyten wurden entweder am gleichen Tag für biochemische Untersuchungen verwendet, oder in flüssigem Stickstoff eingefroren (-196°C) und bei -80°C bis zum weiteren Gebrauch gelagert. Sollten die Erythrozyten im Rahmen des Versuches in Puffer inkubiert werden, mussten notwendigerweise frische Erythrozyten verwendet werden. Das Einfrieren schädigt die Zellmembran und verhindert so bei der Zentrifugation eine effektive Trennung der Erythrozyten vom Inkubationsmedium. Wurden die Zellen ohne weitere Inkubation direkt lysiert (z.B. für Western Blot Analysen oder die Anfertigung Hämoglobin-freier Erythrozytenkonzentrate), konnte auf eingefrorene Proben zurückgegriffen werden.

Für die Gewinnung von humanen Thrombozyten/Plättchen (welche u.a. für die Western Blot Analysen als Kontrolle gebraucht wurden) wurden BD Vacutainer mit Citrat verwendet und zentrifugiert (200 x g, 15 min, Raumtemperatur). Der Überstand (das Plättchen-reiche Plasma) wurde in ein neues Gefäß überführt und zentrifugiert (1,000 x g, 10 min, Raumtemperatur). Das dadurch resultierende Pellet wurde in einem eigens angesetzten Puffer (5 mM HEPES, 150 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 7 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.55 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, D-Glukose, pH 7.4) resuspendiert, durch 30-sekündige Sonifikation lysiert (Sonorex, Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlin) und zentrifugiert (20,000 x g, 15 min, Raumtemperatur). Anschließend wurde der Überstand (das Plättchen-Homogenat, mit dem auch die Proteinbestimmung durchgeführt

wurde) abgenommen, in flüssigem Stickstoff (-196°C) eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

### 3.3. Klinische Studie zur koronaren Herzkrankheit

Neben dem Blut von gesunden und jungen Probanden wurden auch Blutproben aus einer Studie der Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie verwendet. Die Studie mit dem Titel „*Analysis of red cell eNOS regulation and signaling within red blood cells in patients with stable and unstable coronary artery disease*“, unter der Leitung von Prof. Dr. Malte Kelm und Prof. Dr. Dr. Miriam M. Cortese-Krott, beschäftigte sich mit der Expression und Aktivität der erythrozytären eNOS in Patienten mit koronarer Herzkrankheit, sowie einem Kontrollkollektiv gleichen Alters. Selektiert wurden diese Kohorten durch Koronarangiographie und durch die nicht-invasive Messung der flussvermittelten Vasodilatation (FMD, engl. *flow-mediated dilation*) mittels Ultraschalluntersuchung [107]. Primärer Endpunkt der Studie war die Bestimmung der erythrozytären eNOS-Expression und -Aktivität durch Western Blot Analysen, Citrullin-Assay und Bestimmung der zirkulierenden NO-Metaboliten bzw. des Stickstoffmonoxids in Plasma und Erythrozyten mit Hilfe von DAF-FM DA (4-Amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluoresceindiacetat, einem Fluoreszenzfarbstoff zur Semiquantifizierung von Stickstoffmonoxid) oder der Chemilumineszenzdetektion. Die Patientencharakteristika befinden sich im Ergebnisteil in Tabelle 5. Blutproben wurden wie bereits beschrieben durch venöse Punktion gewonnen und in ihre Blutbestandteile aufgeteilt. Die Prozeduren fanden in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki statt und wurden von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät (Studennummer 4460) genehmigt, sowie unter [clinicaltrials.org](https://clinicaltrials.org) registriert (NCT02265016). Ausschlusskriterien der Studie waren akute Entzündungen (C-reaktives Protein > 1 mg/dL oder Leukozyten > 11,000/μL), maligne Erkrankungen, Medikation mit Beeinflussung des eNOS/sGC-Signalweges (Isosorbidmononitrat, Isosorbiddinitrat, Nitroglycerin, Molsidomin, Ranolazin), Diabetes, hochgradige Arrhythmien, Herzinsuffizienz, Krankheiten der Herzklappen und STEMI (ST-Hebungs-Myokardinfarkt, engl. *ST-elevation myocardial infarction*) oder Hochrisiko-NSTEMI (Nicht-ST-Hebungs-Myokardinfarkt). An der Durchführung der Studie waren der Arzt Dr. Georg Wolff und zahlreiche medizinische Doktoranden beteiligt.

### 3.4. Proteinbestimmung

Für die Proteinbestimmung der Proben (z.B. Erythrozyten, Extrakte oder Organ-Lysate) wurde ein kommerzieller Assay (DC Protein Assay, Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA) verwendet, welcher einer modifizierten Proteinbestimmung nach Lowry [108] entspricht. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben unter Verwendung von BSA (Bovines Serumalbumin Fraktion V, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe) als Proteinstandard. Dieses wurde als Stocklösung jeweils frisch angesetzt und in dem gleichen Lösungsmittel wie die Proben, meist Reinstwasser oder Puffer, auf finale Konzentrationen von 0.2-2 mg/mL verdünnt (inkl. Nullwert/Puffer neun Konzentrationen). Pro 96-well Mikrotiterplatte (Greiner Bio-One) wurde eine komplette Standardkurve verwendet, wobei Standards und Proben mindestens als Duplikate aufgetragen wurden. Die Proben wurden so verdünnt, dass sie ungefähr im mittleren Konzentrationsbereich der Standardkurve lagen. Die Messung erfolgte nach 15-minütiger Inkubation (abgedunkelt) photometrisch bei 740 nm in einem Mikroplatten-Reader (FLUOstar Omega, BMG Labtech GmbH, Ortenberg) unter Verwendung der dazugehörigen Software (Version 3.00 R2). Die Proteinmenge wurde dann mit Hilfe der bekannten Konzentrationen der Standardkurve und unter Beachtung der Verdünnung der Proben berechnet.

### 3.5. Glutathion als Marker von oxidativem Stress

Das Tripeptid Glutathion (GSH) ist maßgeblich an der Regulation des zellulären Redox-Status beteiligt, indem es Elektronen auf reaktive Sauerstoffspezies (ROS) überträgt und selber oxidiert wird, wobei das Dimer GSSG entsteht. Durch die Messung von freiem und totalem Glutathion in Geweben kann somit ein Hinweis über das Ausmaß an oxidativem Stress gewonnen werden. Dafür wurden Herzen und Aorten von WT- und Nrf2 KO-Mäusen in 10 mM HCl homogenisiert (TissueRuptor, Qiagen N.V., Venlo, Niederlande) und für 30 s bei 4°C sonifiziert. Nach einer Zentrifugation (14,000 x g, 10 min, 4°C) wurde der Überstand mit 5% Sulfosalicylsäure vermischt (2.5% finale Konzentration), um die Proteine zu präzipitieren, und erneut wie oben beschrieben zentrifugiert. Der klare Überstand wurde sowohl für die GSH-Messung mit dem Glutathione Fluorescent Detection Kit (Arbor Assays, Ann Arbor, MI, USA) verwendet, die gemäß den Herstellerangaben durchgeführt wurde, als auch für die Proteinbestimmung zur späteren Normierung der Daten. Die Fluoreszenzintensität wurde durch Exzitation bei 390 nm und Messung bei 510 nm in einem Mikroplatten-Reader bestimmt. Da für die Bildung von oxidiertem Glutathion (GSSG) zwei GSH benötigt werden, berechnet sich dieses wie folgt:

$$GSSG = \frac{\text{Total GSH} - \text{Freies GSH}}{2} \quad (5)$$

### 3.6. Endothelabhängige Aktivierung der sGC mit Carbachol

Die kombinierte Funktion von Endothel und glatter Gefäßmuskulatur, die unter physiologischen Bedingungen zur Vasodilatation führt, kann durch Gabe von Carbachol und anschließender Messung der cGMP-Erhöhung getestet werden. Carbachol aktiviert indirekt die eNOS, dessen NO in die anliegende Gefäßmuskulatur diffundiert und dort die sGC aktiviert. Die Verwendung von murinen Aortenringen für diese Stimulation ist dabei bereits gut etabliert [25, 52]. Für den Versuch wurde der thorakale Teil der Aorta nach CO<sub>2</sub>-Betäubung, Dekapitation und Thorakotomie der Maus explantiert und in eine Petrischale mit Krebs-Henseleit-Puffer überführt (118 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, 2.55 mM CaCl<sub>2</sub>, 7.5 mM D-Glukose; durchgehend mit Carbogen begast, einer Mischung aus 5% CO<sub>2</sub> und 95% O<sub>2</sub>). Mit feinchirurgischem Besteck wurde das anhaftende Fett entfernt, ohne zu viele Scherkräfte auf das Gefäß zu übertragen. Die Aorta wurde dann in gleichmäßig große Ringe geschnitten und bei 37°C für 10 min in Krebs-Henseleit-Puffer inkubiert. Die Stimulation geschah durch Zugabe von 30 µM Carbachol oder einer Lösungsmittelkontrolle und weiteren 3 min Inkubation. Die Aortenringe wurden mit einer Pinzette entnommen und in Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff (-196°C) eingefroren und bei -80°C gelagert. Zur cGMP-Extraktion wurde die gefrorene Probe in 70% Ethanol homogenisiert und lysiert. Nach einer Zentrifugation (14,000 x g, 15 min, 4°C) wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und auf einer Heizplatte unter ständigem Stickstoffstrom vollständig eingedampft. Die so erhaltene Probe konnte bei -80°C gelagert und zu einem geeigneten Zeitpunkt durch den Radioimmunoassay (RIA) analysiert werden (siehe Kapitel 3.16.).

Die nach der Lyse und Zentrifugation übergebliebenen Pellets wurden in einem Thermoschüttler für 15 min bei 60°C und 400 rpm getrocknet (indem die Reaktionsgefäße offenblieben; TS-100, VWR) und in 0.1% SDS (Natriumdodecylsulfat) in 0.1 M NaOH resuspendiert. Durch weitere Inkubation bei 60°C und 700 rpm über zwei Stunden wurden die Pellets vollständig gelöst. Nach geeigneter Verdünnung wurde eine Proteinbestimmung durchgeführt, mit der die durch den RIA erhaltenen cGMP-Werte normiert werden konnten.

### 3.7. Elektronenspinresonanz-Spektroskopie

Mit der Elektronenspinresonanz-Spektroskopie (EPR, engl. *electron paramagnetic resonance*) können paramagnetische Substanzen untersucht werden (Substanzen mit ungepaarten Elektronen). Dafür wird eine Probe mit einer festen Mikrowellenfrequenz bestrahlt und das äußere Magnetfeld  $B$  variiert. Das so erhaltene Absorptionsspektrum bietet Rückschlüsse auf die magnetischen Momente. Dies beruht darauf, dass sich die entarteten Energieniveaus eines Elektronenspins in einem äußeren Magnetfeld aufspalten und diese Übergänge gezielt angeregt werden können. Da die meisten Substanzen allerdings diamagnetisch sind, ist die Einsetzbarkeit im Vergleich zur gängigeren Kernspinresonanz-Spektroskopie (NMR, engl. *nuclear magnetic resonance*) etwas geringer. Stickstoffmonoxid könnte als Radikal theoretisch direkt mit der EPR-Spektroskopie gemessen werden, dieses ergibt aber ein breites Spektrum, ist relativ kurzlebig und die biologisch relevanten Konzentrationen sind niedrig. Deshalb bietet sich häufig die indirekte Messung der NO-Metaboliten oder NO-Addukte an [109].

Ein Teil der Vorbereitungen dieser Versuche sowie die Messungen zur EPR-Spektroskopie wurden im Max-Planck-Institut für chemische Energiekonversion (MPI CEC) in Mühlheim an der Ruhr durchgeführt, aufgrund der freundlichen Kooperation mit Prof. Dr. Wolfgang Lubitz, Dr. Anton Savitsky, Dr. Michal Zalibera und Dr. Anna Nalepa. Für die EPR-Messungen wurde das Elexsys E-500 CW X-Band-Spektrometer (Bruker Corporation, Billerica, MA, USA) verwendet, unter Anwendung des *perpendicular mode* des ER 4116DM dual mode Resonators, und dem TE102. Die Mikrowellenfrequenz betrug 9.6 GHz. Die Skala des Landé-Faktor  $g$  (auch gyromagnetischer Faktor oder vereinfacht Faktor  $g$ ) wurde mit einem LiF-Standard kalibriert ( $g=2.0023$ ). Die Kühlung wurde mit einem Helium-Kryostaten und dem ITC 503 Temperaturregler (Oxford Instruments plc, Abingdon, UK) eingestellt und die Spektren bei 20 K ( $\approx -253^\circ\text{C}$ ) oder bei Raumtemperatur aufgenommen und so lange gemittelt, bis ein zufriedenstellendes Signal-Rausch-Verhältnis erreicht wurde. Alle Spektren wurden unter den gleichen experimentellen Bedingungen aufgezeichnet und konnten so innerhalb des Versuches direkt miteinander verglichen werden. Die Probenvorbereitung geschah entweder unter atmosphärischen Bedingungen oder in einer sogenannten Glovebox (Coy Laboratory Products Inc., Grass Lake, MI, USA) in einer hypoxischen bzw. anoxischen Atmosphäre von 98% Stickstoff und 2% Wasserstoff.

Vollblut oder isolierte und gewaschene Erythrozyten wurden in Suspension (HBSS+ oder 10 mM Tris, pH 7.4) für mindestens 15 min mit Raumluft oder einem Inertgas ( $\text{N}_2$  oder Ar) durchströmt, damit die Erythrozyten oxygeniert bzw. deoxygeniert wurden. Einige dieser

Proben wurden anschließend mit NO-Donoren behandelt (250  $\mu\text{M}$  DEA/NO oder 500  $\mu\text{M}$  Sper/NO).

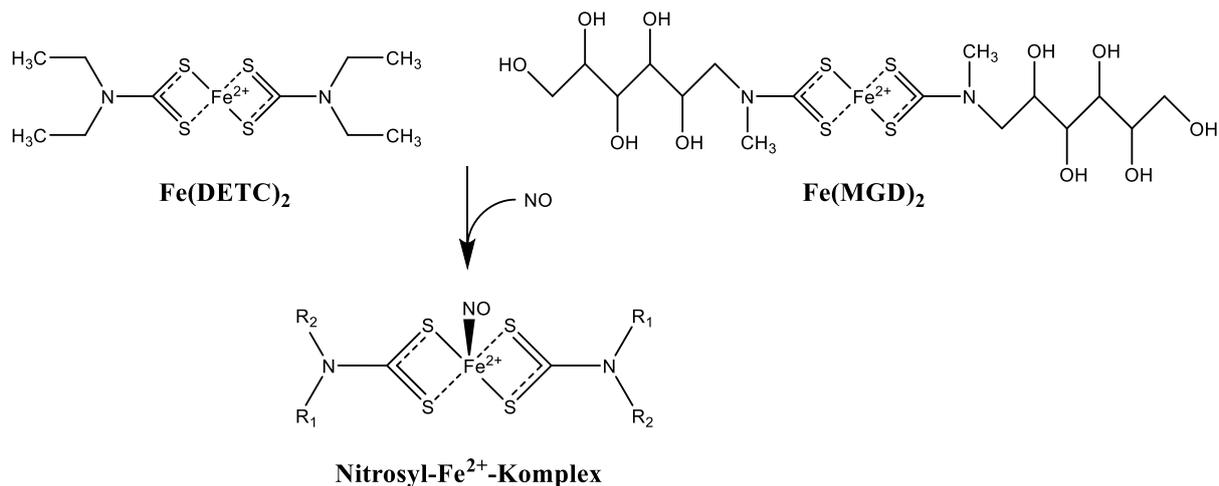
Für das Experiment zur Nitrit-Reduktion unter hypoxischen Bedingungen wurden 1 mL isolierte und gewaschene Erythrozyten (50% Hämatokrit in HBSS+) mit 2 mM Natriumnitrit oder einer Lösungsmittelkontrolle versetzt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Dabei fand die Inkubation entweder unter atmosphärischen Bedingungen statt oder unter hypoxischen Bedingungen in der Glovebox, wofür alle Lösungen zuvor mit einem Inertgas durchströmt wurden.

Für die Messung bei 20 K wurden jeweils 200  $\mu\text{L}$  der zentrifugierten Erythrozytenpellets (800 x g, 10 min, 4°C) in ein EPR-Röhrchen überführt.

### **3.8. Verwendung von Spin-Traps zur Akkumulation von Stickstoffmonoxid**

Zur Akkumulation von potentiell freigesetztem NO in einer EPR-detektierbaren Form sollten Spin-Traps eingesetzt werden. Diese Eisen-Dithiocarbamat-Komplexe können als NO-Addukte (Nitrosyl-Eisen-Komplex) stabil vorliegen und somit eine NO-Quantifizierung über einen bestimmten Inkubationszeitraum ermöglichen (**Abb. 5**). Zur Synthese dieser Spezies wurden 500  $\mu\text{M}$   $\text{FeSO}_4$  in 10 mM HCl limitierend vorgegeben und ein geeigneter Ligand wie *N*-Methyl-D-glucamindithiocarbamat (2 mM MGD in 150 mM HEPES) oder Diethyldithiocarbamat (2 mM DETC in variierenden Puffer/DMSO-Verhältnissen) im Überschuss hinzugegeben. Durch vorherige Begasung aller Lösung mit einem Inertgas und der Durchführung unter hypoxischen bzw. anoxischen Bedingungen sollte die Oxidation der Komplexe verhindert werden, da die oxidierten Komplexe nicht mehr EPR-detektierbar sind. Zur Ermittlung optimaler Reaktionsbedingungen und der Bindungseffizienz wurden NO-Donoren (DEA/NO oder Sper/NO) hinzugegeben. Anschließend wurde diese Reaktion in Anwesenheit von isolierten und gewaschenen Erythrozyten wiederholt (0.5-2.5% Hämatokrit, deoxygeniert), wobei ein fast vollständiger Signalverlust des NO-Adduktes stattfand, der auch durch Zugabe von 120-150  $\mu\text{M}$   $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  nicht wiederhergestellt werden konnte.

Die Quantifizierung der NO-Addukte erfolgte durch EPR-Spektroskopie und Vergleich mit dem Standard 4-Hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidinyloxy (TEMPOL).



**Abbildung 5: Reaktionsschema zur Akkumulation von Stickstoffmonoxid durch Spin-Traps.**

Eisen-Dithiocarbamat-Komplexe wie  $\text{Fe}(\text{DETC})_2$  und  $\text{Fe}(\text{MGD})_2$  können dafür verwendet werden, um in Anwesenheit von Stickstoffmonoxid stabile Nitrosyl-Eisen-Komplexe zu bilden, die durch die EPR-Spektroskopie detektiert und quantifiziert werden können.

### 3.9. Etablierung eines Zwei-Kammer-Systems

Bei der direkten Addition der Spin-Traps zu den Erythrozyten müssen Kompromisse bezüglich der Reaktionsbedingungen eingegangen werden. Die Erythrozyten verlangen z.B. eine annähernd physiologische Umgebung, während für die Spin-Traps andere Bedingungen ideal sind, wie z.B. organische Lösungsmittel im Fall von  $\text{Fe}(\text{DETC})_2$ . Wenn der Ort der  $\text{NO}$ -Freisetzung räumlich von dem Ort des  $\text{NO}$ -Trapping getrennt wird, können eventuell störende Interaktionen der Zellen mit den Spin-Traps oder unbekannte Gleichgewichts- und Konkurrenzreaktionen vermieden werden und jeweils optimale Versuchsbedingungen für diese beiden Reaktionen gewählt werden. Li *et al.* haben 2004 solch ein Zwei-Kammer-System verwendet, um enzymatische Versuche bezüglich der aeroben und anaeroben Produktion von  $\text{NO}$  durch die Xanthinoxidase zu untersuchen [110]. Die Glasapparatur mit zwei verbundenen Kammern wurde mit einem Trägergas bzw. einer Gasmischung beliebiger Zusammensetzung (um z.B. eine bestimmte Sauerstoffkonzentration vorzugeben) durchspült, welches das  $\text{NO}$  transportieren sollte, und der Auslass nach der zweiten Kammer entweder offengelassen oder an die Chemilumineszenzdetektion (CLD) angeschlossen. Diese Grundidee wurde im Rahmen dieser Studie adaptiert und eine modifizierte Variante durch eine Glasbläserei (Glastechnik Rathsack, Dormagen) angefertigt. Eine schematische Darstellung des Zwei-Kammer-Systems inklusive Beschriftung der einzelnen Kompartimente befindet sich im Ergebnisteil in **Abb. 13**. Die Kammer 1 der Apparatur konnte dabei durch ein Kugelgelenk ausgetauscht und beliebige Volumina für die Inkubation eingesetzt werden. Die Apparatur wurde mit einem Inertgas,

vorzugsweise He, durchspült und der konstante Gasstrom mittels Druckmanometer dem benötigten Gasteinstrom der nachgeschalteten CLD angepasst, da sich Druckschwankungen negativ auf die dort verwendeten massenflussempfindlichen Detektoren auswirken und zu Fehler in der Quantifizierung führen. Kammer 1 der Apparatur wurde durch einen Thermostaten und Wasserbad (Haake DC10 und Haake W15, Thermo Fischer Scientific Inc.) auf physiologische 37°C temperiert, während die beiden Kühler durch einen Kryostaten (DLK 602, Fryka-Kältetechnik GmbH, Esslingen) mit 4°C kaltem Wasser umspült wurden.

In Kammer 2 wurden unter hypoxischen Bedingungen die Spin-Traps synthetisiert und dafür verschiedene Reaktionsbedingungen (Lösungsmittelverhältnisse) ausprobiert. Die für alle folgenden Versuche optimierte Zusammensetzung bestand aus 1.8 mL DMSO, 2 mL 4 mM DETC (2 mM final) in DMSO und 200 µL 10 mM FeSO<sub>4</sub> (500 µM final) in 10 mM HCl und ergab eine errechnete Konzentration von 500 µM Fe(DETC)<sub>2</sub> in 4 mL Lösungsmittel.

In Kammer 1 wurde ein Puffer (z.B. 10 mL 150 mM Tris, pH 7.4) vorgelegt und nach Synthese des Spin-Traps der NO-Donor DEA/NO injiziert. Mit dem Wissen der injizierten Menge an NO-Donor und dem Volumenunterschied zwischen den beiden Kammern konnte die maximale Konzentration an NO in Kammer 2 berechnet und später mit der quantifizierten Menge des Nitrosyl-Eisen-Komplexes verglichen werden, um eine Bindungs-/*Trapping*-Effizienz zu erhalten. Nicht gebundenes NO wurde durch die nachfolgende Chemilumineszenz-Apparatur detektiert (siehe Kapitel 3.11.). Dafür wurde zuerst das CLD-Signal (als bestimmtes Integral oder AUC, engl. *area under the curve*) des NO-Donors ohne Spin-Trap in Kammer 2 gemessen und anschließend das niedrigere CLD-Signal der gleichen Menge NO-Donor in Anwesenheit des Spin-Traps. Die Berechnung der *Trapping*-Effizienz anhand der CLD-Signale geschah wie folgt:

$$\textit{Trapping-Effizienz (CLD, \%)} = \frac{\textit{AUC (+Fe(DETC)}_2)}{\textit{AUC (-Fe(DETC)}_2)} \cdot 100 \quad (6)$$

### 3.10. UV-Vis Absorptionsspektren

Die Bildung und Stabilität der Nitrosyl-Eisen-Komplexe sollte auch durch Messung von UV-Vis-Absorptionsspektren verfolgt werden. Die Fe(DETC)<sub>2</sub>-Spezies wurde wie bereits beschrieben unter hypoxischen Bedingungen im Zwei-Kammer-System synthetisiert und mit einer Nadel in eine 96-well-Platte transferiert (die zuvor mit Argon „gespült“ wurde). Sollte der Spin-Trap oxidiert werden, geschah eine Durchmischung/Begasung mit Raumluft. Ebenso angefertigt wurden NO-gebundene Addukte, indem vor der Entnahme ein Überschuss an

DEA/NO in Kammer 1 injiziert und 15 min inkubiert wurde. Die Messung erfolgte im Mikroplattenreader von 300 nm bis 700 nm. Als Vergleich diente das Lösungsmittel ohne Spin-Trap (DMSO und H<sub>2</sub>O im gleichen Verhältnis; CTRL).

### 3.11. Chemilumineszenzdetektion von Stickstoffmonoxid

Die Chemilumineszenzdetektion (CLD) ist eine sehr sensitive und spezifische Methode für die relative Quantifizierung von Stickstoffmonoxid in der Gasphase und basiert auf der Messung von emittiertem Licht, das nach einer Reaktion mit Ozon (O<sub>3</sub>) freigesetzt wird (Reaktion 7). Von dem entstehenden Produkt Stickstoffdioxid (NO<sub>2</sub>) befindet sich ein gewisser Anteil im elektronisch angeregten Zustand (NO<sub>2</sub>\*). Bei der Rückkehr in den Grundzustand werden Lichtquanten emittiert, die über einen Photoelektronenvervielfacher registriert und quantifiziert werden. Durch einen Überfluss an Ozon und konstanten Reaktionsbedingungen ist die Intensität des emittierten Lichtes direkt proportional zur NO-Konzentration, die damit bestimmt werden kann.



Häufig wird die CLD zur Bestimmung von NO-Metaboliten aus Geweben verwendet, da NO ein kurzlebiges Radikal ist, das rasch oxidiert wird. So können mit bestimmten Reaktionslösungen Nitrit, Nitrat, Nitrosamine, die Gesamtheit an Nitroso-Spezies, sowie indirekt Nitrosothiole bestimmt werden. Diese Methoden kamen im Rahmen dieser Studie nicht zum Einsatz, sondern es wurde die direkte Messung von freigesetztem NO angewendet. Für die Messungen wurde der Chemilumineszenzdetektor CLD 88 e (Eco Physics GmbH, München) verwendet, wobei die Signalumwandlung und -weiterleitung zum Computer mit dem PowerChrom 280 (eDAQ Pty Ltd, Sydney, Australien) geschah. Wichtig ist, dass es sich bei dieser Methode um massenflussempfindliche Detektoren handelte, weshalb der Gasstrom (z.B. He), der das NO zum Detektor beförderte, möglichst konstant gehalten wurde.

### 3.12. Pharmakologische Stimulation der intraerythrozytären sGC

Zum Nachweis einer intraerythrozytären sGC-Aktivität können verschiedene pharmakologische Substanzen verabreicht werden, die entweder indirekt wirken, z.B. über eine vorgeschaltete Signalkaskade unter Beteiligung der eNOS, oder direkt an die sGC binden und

so deren enzymatische Aktivität beeinflussen. Eine Änderung der sGC-Aktivität kann dann durch Bestimmung der intraerythrozytären cGMP-Konzentration mittels Radioimmunoassay (RIA) im Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle (CTRL) erfasst werden. Für diese Versuche wurden sowohl humane, als auch murine Erythrozyten verwendet, wobei die murinen Proben aufgrund des geringeren verfügbaren Volumens von mehreren Individuen gepoolt wurden. Alle Versuche fanden zum Zwecke der Vergleichbarkeit in ähnlicher Durchführung statt. Dafür wurden je 500 µL gewaschene und isolierte Erythrozyten in 30 mL vorgewärmten HBSS+ verdünnt und bei 37°C für 10 min mit Inhibitoren inkubiert (je nach Fragestellung 100 µM Sildenafil oder 300 µM IBMX, ± 5 µM des sGC-Inhibitors ODQ oder ± 3 mM des eNOS-Inhibitors L-NAME). Anschließend fanden unterschiedliche pharmakologische Behandlungen statt. Zur Stimulation der eNOS-abhängigen cGMP-Erhöhung wurden 1 mM norNOHA, 100 µM Carbachol oder 10 µM Isoprenalin hinzugegeben und unterschiedlich lange bei 37°C inkubiert (5, 10, 20 und 30 min). norNOHA ist ein Arginase-Inhibitor, Carbachol ein Struktur analogon des Acetylcholins und Isoprenalin ein Noradrenalin-Derivat.

Für die Kinetik der cGMP-Erhöhung nach Gabe von NO wurden 200 µM DEA/NO hinzu pipettiert und die Proben unterschiedlich lange bei 37°C inkubiert (0-60 min), wobei die Proben nach Inkubation aus logistischen Gründen bis zur Zentrifugation in Eiswasser zwischengelagert wurden.

Für die direkte pharmakologische Behandlung der sGC wurden 10 µM des Stimulators BAY 41-2272, 10 µM des Aktivators BAY 60-2770 und/oder 200 µM DEA/NO hinzugegeben und die Ansätze für 10 min bei 37°C inkubiert. Entsprechende Lösungsmittelkontrollen (z.B. für Reinstwasser oder DMSO) wurden selbstverständlich ebenfalls durchgeführt.

Anschließend wurden die Proben zentrifugiert (800 x g, 10 min, 4°C), die Überstände verworfen und die Pellets in neue Reaktionsgefäße überführt. Die Proben mit murinen Erythrozyten wurden abweichend zentrifugiert (2,000 x g, 5 min, 4°C). Bis zum weiteren Gebrauch wurden die Pellets in flüssigem Stickstoff (-196°C) eingefroren und bei -80°C gelagert.

Für die Extraktion des cGMP wurde jede Probe mit 500 µL Reinstwasser versetzt und 60 s lang gevortext (Vortex-Genie 2, Scientific Industries Inc., Bohemia, NY, USA). Das Lysat wurde auf zwei 2 mL-Reaktionsgefäße mit je 1.5 mL kaltem Ethanol aufgeteilt und invertiert. Nach einer Zentrifugation (14,000 x g, 10 min, 4°C) wurden die Überstände in neue Reaktionsgefäße pipettiert und bis zur Durchführung des RIAs bei -80°C gelagert. Die übriggebliebenen Pellets wurden in einem Thermoschüttler für 15 min bei 60°C und 400 rpm getrocknet (indem die

Reaktionsgefäße offenblieben). Nach Zugabe von 1.5 mL 0.1% SDS in 0.1 M NaOH wurden diese für zwei Stunden bei 60°C und 700 rpm vollständig gelöst. Die dann durchgeführte Proteinbestimmung wurde für die spätere Normierung der cGMP-Daten verwendet.

### **3.13. Aktivierung der intraerythrozytären sGC nach Reduktion von Nitrit**

Wenn NO-Metaboliten wie Nitrit unter hypoxischen Bedingungen durch Hämoglobin zu NO reduziert werden, dann wäre auch eine nachfolgende Aktivierung der sGC denkbar, die durch Anstieg der intraerythrozytären cGMP-Konzentration nachverfolgt werden könnte. Zu diesem Zwecke wurden unterschiedliche Versuchsansätze durchgeführt, deren Gemeinsamkeit in der Gabe von Nitrit zu (vollständig) deoxygenierten Erythrozyten bestand. Analog zur pharmakologischen Stimulation der intraerythrozytären sGC wurden 500 µL isolierte und gewaschene Erythrozyten in 30 mL vorgewärmten HBSS+ verdünnt und durch eine mindestens einstündige Begasung mit Argon deoxygeniert. Nach einer Vorinkubation mit 100 µM Sildenafil oder 300 µM IBMX für 10 min bei Raumtemperatur wurden 2 mM Natriumnitrit hinzugegeben und unterschiedlich lange inkubiert. Optional wurden 3 µM BAY 41-2272 hinzu pipettiert, um durch den synergistischen Effekt geringe Konzentrationen an NO verdeutlichen zu können. Ein Problem der notwendigerweise andauernden Deoxygenierung durch konstanten Argon-Zufluss durch die Suspension stellte aber ein gewisser Grad an Hämolyse dar. In einem anderen Ansatz wurde statt der direkten Begasung der Erythrozyten die zuvor erwähnte Glovebox verwendet, in die deoxygenierte Erythrozyten (durch 15-minütige langsame Begasung mit Argon) eingeschleust wurden, sowie die benötigten Chemikalien, die ebenfalls mit Argon durchspült wurden. Parallel fand eine Kontrolle mit oxygenierten Erythrozyten unter atmosphärischen Bedingungen statt. 500 µL isolierte und gewaschene Erythrozyten wurden in 500 µL HBSS+ verdünnt, mit 100 µM Sildenafil für 10 min bei 37°C vorinkubiert, 2 µL Natriumnitrit (für eine finale Konzentration von 2 mM) oder Lösungsmittelkontrolle (Reinstwasser) hinzugegeben und für 30 min in einem Thermoschüttler bei 37°C und 400 rpm inkubiert. Nach einer Zentrifugation (800 x g, 10 min, 4°C) wurde das Erythrozytenpellet in flüssigem Stickstoff (-196°C) eingefroren und bei -80°C gelagert. Die Extraktion wurde wie zuvor beschrieben durchgeführt, die Bestimmung der intraerythrozytären cGMP-Konzentration geschah durch einen RIA.

### 3.14. Herstellung von Hämoglobin-freien Erythrozytenkonzentraten

Erythrozyten bestehen zu 97% des Trockengewichts aus Hämoglobin [111], um effektiv Sauerstoff transportieren zu können. Diese Menge an Hämoglobin erschwert es aber auch, bestimmte biochemische Assays durchführen zu können, wie z.B. die pharmakologische Stimulation der intraerythrozytären sGC, denn Hämoglobin reagiert mit NO und senkt so die Bioverfügbarkeit, wodurch unter Umständen falsche Rückschlüsse auf die Menge der sGC geschlossen werden. Andere Probleme bestehen darin, dass die zu detektierenden Proteine bei Western Blot oder massenspektrometrischen Analysen durch die verhältnismäßig geringe Menge unter die Detektionsgrenze fallen. Daher sollten unter Anwendung chromatographischer Verfahren Proben hergestellt werden, bei denen das Hämoglobin entfernt und die cytosolischen Proteine aufkonzentriert werden. Für diese Zwecke wurde das kommerzielle Produkt HemoVoid (Biotech Support Group LLC, Monmouth, NJ, USA) getestet und verwendet. Dabei handelte es sich um eine Kieselgel-basierte (Siliziumdioxid) Matrix und fertige Puffer für die Anwendung von Proben mit gemischten Liganden (ionisch, hydrophob, aromatisch, polymer). Die Anwendung erfolgte nach Herstellerangaben, mit Ausnahme von kleineren Abweichungen. Die Erythrozyten wurden zuerst mit fünf Volumenanteilen Lysepuffer (150 mM NH<sub>4</sub>Cl, 2 mM DTT (Dithiothreitol), Protease- und Phosphatase-Inhibitor) versetzt und zentrifugiert (14,000 x g, 10 min, 4°C), und der Überstand mit den cytosolischen Proteinen für die weitere Reinigung verwendet. Zusätzlich wurden die mitgelieferten Puffer (Binde-, Wasch- und Elutionspuffer) frisch mit 2 mM DTT (zur Erhaltung des reduzierenden Milieus) und Protease- und Phosphatase-Inhibitor versetzt, damit die Eluate für nachfolgende Aktivitätsassays verwendet werden konnten. Je nach Anwendung wurden die Eluate mehrerer Säulen vereint und aufkonzentriert. Dies geschah mit Nanosep Zentrifugeneinheiten mit einem *Molecular weight cut-off* (MWCO) von 10 kDa (10K Omega, PALL Life Sciences, Port Washington, NY, USA). Durch serielle Zentrifugation (14,000 x g, 4°C) wurde das Volumen mehrerer Proben reduziert und gegebenenfalls gegen einen anderen Puffer ausgetauscht, wenn dies nötig war.

### 3.15. Aktivitätsassay der löslichen Guanylatcyclase

Um die enzymatische Aktivität der intraerythrozytären sGC zu bestimmen, wurde ein Assay durchgeführt, dessen Vorgehensweise bereits beschrieben wurde [112]. Dieser Assay mit gereinigten Proben des zu untersuchenden Gewebes beinhaltet alle notwendigen Kofaktoren (wie z.B. Mg<sup>2+</sup>) und das Substrat GTP, sowie zusätzlich Stimulatoren, um eine maximale enzymatische Aktivität der sGC über einen fest definierten Zeitraum zu ermöglichen. Die

cGMP-Konzentration in diesen Proben kann anschließend mit einem RIA bestimmt, auf die Proteinkonzentration normiert und als Syntheseleistung pro Minute dargestellt werden (pmol/min/mg Protein). Für den hier durchgeführten Assay wurden Hämoglobin-freie Erythrozytenkonzentrate verwendet, da das enthaltene Hämoglobin ansonsten die NO-Verfügbarkeit gesenkt und zu falsch-niedrigen Werten geführt hätte. Die restlichen cytosolischen Proteine wurden in diesen Proben hingegen erhalten bzw. aufkonzentriert. Der Ansatz wurde in 1.5 mL Reaktionsgefäßen durchgeführt und bestand aus 40 µL der (verdünnten) Probe, 50 µL eines Reaktionsgemisches (50 mM TEA/HCl, pH 7.4, 1 mM IBMX, 0.5 mg/mL BSA, 3 mM DTT, 5 mM Creatinphosphat, Creatin-Kinase, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, und 50 mM GTP) und 10 µL eines sGC-Stimulators (in diesem Fall 100 µM BAY 41-2272, vorverdünnt in Wasser). Dieses Gemisch wurde in einem Thermoschüttler für 30 min bei 37°C und 700 rpm inkubiert, wobei zu den Zeitpunkten 0, 10 und 20 min repetitiv je 2 µL DEA/NO (für eine finale Konzentration von 20 µM) hinzugegeben wurden. Dies ist notwendig, da DEA/NO bei 37°C und pH 7.4 lediglich eine Halbwertszeit von  $\approx 2$  min aufweist. Des Weiteren wurden Ansätze von den Proben durchgeführt, bei denen anstelle von BAY 41-2272 und DEA/NO Lösungsmittelkontrollen (10 mM NaOH und DMSO) hinzugegeben wurden, um die basale Aktivität zu erfassen und zu gewährleisten, dass die cGMP-Aktivität durch eine NO-abhängige Quelle stimuliert wurde. Die Durchführung geschah in Triplikaten. Gestoppt wurde die Inkubation, indem 10 µL der Probe in 90 µL kalten RIA-Puffer (100 mM Natriumacetat, pH 6.0) überführt, in flüssigem Stickstoff (-196°C) eingefroren und bei -80°C gelagert wurden. Die so gewonnenen Proben mussten für die nachfolgende Bestimmung der cGMP-Konzentration nicht weiter extrahiert, sondern nur adäquat für den Radioimmunoassay verdünnt werden.

### **3.16. Radioimmunoassay zur Bestimmung von cGMP und cAMP**

Die Radioimmunoassays zur quantitativen Bestimmung von cGMP und cAMP durften freundlicherweise in den (Isotopen-) Laboren des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie (Prof. Dr. Doris Koesling) der Ruhr-Universität Bochum unter der Aufsicht von Dr. Evanthia Mergia durchgeführt werden. Dabei handelt es sich um einen kompetitiven Assay, bei dem radioaktive Tracer (<sup>125</sup>I-cGMP oder <sup>125</sup>I-cAMP) mit den endogenen cyclischen Nukleotiden um die Bindungsstellen an hinzugegebenen spezifischen Antikörpern konkurrieren. Nach Fällung des Antikörpers kann mit Hilfe eines  $\gamma$ -Szintillationszählers dieses Gleichgewicht bestimmt werden. Wenn z.B. weniger cGMP in der Probe enthalten war, konnte mehr von dem

radioaktiven Tracer an den Antikörper binden und *vice versa*. Diese Methode wurde wie bereits publiziert durchgeführt [25, 113, 114] und die dafür angefertigten Proben auf Trockeneis (festes CO<sub>2</sub>, -78°C) nach Bochum transportiert. Die Proben aus dem sGC-Aktivitätsassay befanden sich bereits in RIA-Puffer (100 mM Natriumacetat, pH 6.0) und mussten nicht weiter aufgereinigt werden, wohingegen sich die Extrakte der pharmakologischen Stimulation der intraerythrozytären sGC in Ethanol befanden und nach Vereinigung der beiden Aliquote auf einer Heizplatte bei 80°C unter kontinuierlichem Stickstoffstrom vollständig eingedampft wurden. Die so getrockneten Proben wurden in 100 µL RIA-Puffer resuspendiert. Alle Proben wurden frisch mit 3 µL Acetylierungsreagenz (bestehend aus einem Teil Acetanhydrid und zwei Teilen Triethylamin) versetzt und innerhalb von einer Woche verwendet. Durch die Acetylierung von cGMP und cAMP an der 2'-OH-Position sollte eine 40-fach höhere Antikörperbindung stattfinden und der Radioimmunoassay somit wesentlich sensitiver werden [115]. Dies ist legitim, da auch die cGMP-Standards (0-512 fmol cGMP und 0-1024 fmol cAMP) im gleichen Verhältnis acetyliert und nicht länger als sieben Tage aufbewahrt wurden.

Der RIA-Ansatz bestand aus 10 µL der (verdünnten) Probe, 40 µL Tracer, 50 µL RIA-Puffer und 100 µL Antikörperserum (verdünnt in 0.5 mg/mL  $\gamma$ -Globulin; Tracer- und Antikörperkonzentrationen mussten dem Zerfall des <sup>125</sup>I-cGMP bzw. <sup>125</sup>I-cAMP entsprechend tageweise angepasst werden) in Duplikaten und wurde für mindestens vier Stunden oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Durch Zugabe von 3 mL Polyethylenglycol (16% PEG 6000 in 10 mM Tris/HCl, pH 7.5) wurde der Antikörper gefällt (30 min bei 4°C) und der Überstand nach einer Zentrifugation (6,000 x g, 30 min, 4°C) verworfen. Die Pellets wurden anschließend im  $\gamma$ -Szintillationszähler gemessen und die cGMP- bzw. cAMP-Konzentrationen anhand der Standardkurve berechnet.

### **3.17. Bestimmung der PDE-Aktivität**

Als Gegenspieler der Guanylatcyclasen stehen die Phosphodiesterasen, welche die cyclischen Nukleotide durch Hydrolyse abbauen (cGMP wird zu GMP, cAMP zu AMP). Die Aktivität dieser Enzyme kann ebenfalls radioaktiv bestimmt werden, indem z.B. <sup>32</sup>P-cGMP als Substrat hinzugegeben und das entstehende GMP durch eine alkalische Phosphatase in Guanosin und freiem Phosphat gespalten wird. Durch Aktivkohle wird dann das nicht umgesetzte <sup>32</sup>P-cGMP gebunden und in einer Zentrifugation abgetrennt, aber nicht das freie Phosphat, das durch einen  $\beta$ -Szintillationszähler im Überstand gemessen werden kann.

Diese Methode durfte freundlicherweise ebenfalls in den Isotopenlaboren des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie (der Ruhr-Universität Bochum) nach einer bereits publizierten Vorgehensweise durchgeführt werden [25]. Der Ansatz bestand aus 30 µL der Probe, 70 µL eines Reaktionsgemisches (50 mM TEA/HCl, pH 7.4, 0.5 mg/mL BSA, 3 mM DTT, 1 U alkalische Phosphatase, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 µM cGMP und eine aufgrund der Zerfalls tagesweise angepasste Konzentration an <sup>32</sup>P-cGMP), sowie 2 µL Sildenafil (für 100 nM bzw. 100 µM finale Konzentration) oder Lösungsmittelkontrolle. Die Inkubationszeit bei 37°C wurde auf 10 min festgelegt und in der späteren Auswertung beachtet. Durch Zugabe von 900 µL einer kalten Aktivkohlesuspension (30% in 50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 2.3) wurde die Reaktion gestoppt. Nach einer Zentrifugation (12,000 x g, 4 min, 4°C) wurde die Radioaktivität in 600 µL des Überstands gemessen. Die PDE-Aktivität wurde wie folgt berechnet und anschließend anhand der Proteinbestimmung normiert.

$$v(PDE) = \frac{C - C_0}{C_T} \cdot \frac{S}{V \cdot t} \quad (8)$$

$v(PDE)$	spez. Aktivität (pmol/min/mL)	$C_T$	Zählrate des Tracers (cpm)
$C$	Zählrate der Probe (cpm)	$S$	Eingesetzte Substratmenge
$C_0$	Zählrate ohne Probe (Leerwert)		(pmol cGMP)
$t$	Inkubationszeit (min)	$V$	Eingesetztes Vol. der Probe (mL)

### 3.18. Bestimmung der PKG-Aktivität

Die Proteinkinase G (PKG, oder cGK für engl. *cGMP-dependent protein kinase*) stellt ein mögliches Effektorprotein von cGMP dar. Um zu überprüfen, ob diese auch in Erythrozyten vorhanden ist, sollte deshalb versucht werden, die enzymatische PKG-Aktivität zu bestimmen. Dafür wurde das cGK Assay Kit (CycLex Co., Ltd., Nagano, Japan), entsprechend den Herstellerangaben, verwendet. Dieses ist ein halbquantitativer Immunoassay und basiert auf einer vorbeschichteten 96-well-Mikrotiterplatte, auf der sich ein rekombinantes Substrat der PKG befindet, das an Threonin phosphoryliert werden kann, sowie einem Antikörper (als Meerrettichperoxidase-Konjugat), der nur an diese phosphorylierte Variante bindet. Die katalytische Umwandlung von dem Substrat Tetramethylbenzidin kann dann photometrisch verfolgt werden. Eingesetzt wurden Hämoglobin-freie Erythrozytenkonzentrate, die in einem mitgelieferten Kinase-Puffer mit Mg<sup>2+</sup> und ATP verdünnt wurden. Zur Kontrolle wurden Proben ohne cGMP (um die PKG nicht zu aktivieren), ohne ATP (ein notwendiges Substrat der

Kinase) oder mit dem Peptid-basierten Inhibitor DT-2 durchgeführt. Alle Ansätze geschahen in Duplikaten. Die Messung erfolgte in einem Mikroplatten-Reader bei 450 nm.

### 3.19. Massenspektrometrische Proteinidentifikation

Die massenspektrometrische Proteinidentifikation erfolgte im Forschungsbereich Clinical Proteomics (Jun.-Prof. Dr. Barbara Sitek) des Medizinischen Proteom-Center der Ruhr-Universität Bochum durch den Arbeitsgruppenleiter Dr. Thilo Bracht. Dafür wurden humane Hämoglobin-freie Erythrozytenkonzentrate angefertigt und auf Trockeneis (festes CO<sub>2</sub>, -78°C) nach Bochum transportiert. 100 µg dieser Probe wurden auf einem 18%igen Tris-Glycin Polyacrylamid-Gel getrennt und manuell einzelne Banden/Bereiche herausgeschnitten. Diese wurden über Nacht bei 37°C mit Trypsin verdaut, einer Endopeptidase oder Serinprotease, die selektiv die Säureamidbindung nach Aminosäuren wie Lysin (K im Einbuchstabencode) oder Arginin (R) spaltet. Die Flüssigkeitschromatographie und Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) wurde mit einem Ultimate 3000 RSLCnano System und dem Orbitrap Elite (ein hybrides Ionenfallen-Orbitrap-) Massenspektrometer (Thermo Fischer Scientific Inc.) durchgeführt. Die Peptide wurden dafür mit einem Gradienten von 5-40% der Lösung B (Lösung A: 0.1% Ameisensäure, Lösung B: 0.1% Ameisensäure, 84% Acetonitril; bei einer Flussrate von 0.4 µL/min und einer Säulenofentemperatur von 60°C) über 218 min chromatographisch getrennt (auf der analytischen Säule Acclaim PepMap RSLC, 75 µm x 50 cm, nano Viper, C18, 2 µm, 100 Å) und das Massenspektrum nach kollisionsinduzierter Dissoziation der Precursor-Ionen aufgezeichnet. Für die Peptididentifikation wurde die Proteome Discoverer Software (Version 1.4.1.14, Thermo Fischer Scientific Inc.) und die UniProtKB/Swiss-Prot Datenbank (Release 2015\_11 vom 11.11.2015 mit 549,832 Einträgen; begrenzt auf *homo sapiens*) mit der Mascot Suchmaschine (Version 2.5, Matrix Science Inc., Boston, MA, USA) verwendet, bei einer Massentoleranz von 5 ppm für die Precursor-Ionen und 0.4 Da für die Fragment-Ionen. Die Falschpositivrate wurde mit dem Percolator Suchalgorithmus kleiner 1% (q-Wert <0.01) gehalten.

### 3.20. Nachweis einer cGMP-abhängigen VASP-Phosphorylierung

Das Vasodilatator-stimulierte Phosphoprotein (VASP) ist in fast allen Zellen des Körpers nachweisbar, wobei die präsenteste Funktion die Inhibition der Plättchenaggregation darstellt. NO bewirkt dabei über den sGC/PKG-Signalweg die Phosphorylierung von VASP an Serin 239

und beeinflusst somit dessen Aktivität [106, 116]. Um zu überprüfen, ob in den Erythrozyten ebenfalls ein VASP vorhanden ist und dieses über den hier identifizierten Signalweg phosphoryliert werden kann, wurden 500  $\mu\text{L}$  der gewaschenen und isolierten Erythrozyten analog zur pharmakologischen Stimulation der intraerythrozytären sGC in 30 mL vorgewärmten HBSS+ für 10 min mit Inhibitoren (100  $\mu\text{M}$  Sildenafil  $\pm$  5  $\mu\text{M}$  ODQ) inkubiert und nach Zugabe von 10  $\mu\text{M}$  BAY 41-2272 und 200  $\mu\text{M}$  DEA/NO, 100  $\mu\text{M}$  8-pCPT-cGMP (zellpermeables und hydrolysestabiles cGMP) oder einer Lösungsmittelkontrolle weitere 15 min bei 37°C inkubiert. Die Erythrozytenpellets wurden durch Zentrifugation erhalten (800 x g, 10 min, 4°C), in flüssigem Stickstoff (-196°C) eingefroren und bei -80°C gelagert. Durch Ansatz der Proben in Duplikaten stand genug Ausgangsmaterial für die Herstellung von Hämoglobin-freien Erythrozytenkonzentraten zur Verfügung. Die VASP-Stimulation in diesen Konzentraten wurde anschließend durch Western Blot Analyse der Phosphorylierung an Serin 239 visualisiert.

### 3.21. Ektazytometrische Untersuchung von Erythrozyten

Ein mögliches Target dieser Signalkaskade könnte die Änderung der Erythrozytenverformbarkeit darstellen. Bei der sogenannten Ektazytometrie kann die Verformbarkeit erfasst werden, indem eine Erythrozytensuspension in einem Doppelzylinder mit einem rotierenden inneren Zylinder verformt und die resultierende Elongation gemessen wird. Durch hohe Verdünnung der Erythrozyten in einer Lösung bekannter Viskosität und variabler Geschwindigkeit des rotierenden Zylinders können definierte Scherspannungen erzeugt werden. Durch einen die Suspension durchquerenden Laserstrahl entsteht dann ein Diffraktionsmuster, mit dem die Änderungen dieser Verformbarkeit in relativen Einheiten dargestellt werden. Ein exemplarisches Diagramm befindet sich in **Abb. 6**. Für diese Messung wurden isolierte und gewaschene Erythrozyten verwendet, die nicht älter als vier Stunden waren. 500  $\mu\text{L}$  dieser Erythrozyten wurden in 15 mL vorgewärmtem HBSS+ verdünnt und 10 min bei 37°C inkubiert ( $\pm$  5  $\mu\text{M}$  ODQ). Nach Zugabe von 100  $\mu\text{M}$  8-pCPT-cGMP und weiteren 10 min Inkubation, sowie einer Zentrifugation (800 x g, 10 min, RT), wurden die Erythrozytenpellets zuerst 1:2 in HBSS+ verdünnt und anschließend 1:200 in einer Lösung definierter Viskosität (PVP-Lösung, RR Mechatronics International B.V., Zwaag, Niederlande). Die Verformbarkeit wurde mit dem Lorrea (engl. *laser optical rotational cell analyzer*, RR Mechatronics International B.V.) unter Verwendung der dazugehörigen Software (Version 2.1) gemessen und der Doppelzylinder mittels Thermostat (Haake DC10 und Haake

W15, Thermo Fischer Scientific Inc.) auf 37°C temperiert. Die Vorbereitung der Proben und die Messungen zur Verformbarkeit wurden in Zusammenarbeit mit der Apothekerin Wiebke Lückstädt durchgeführt.

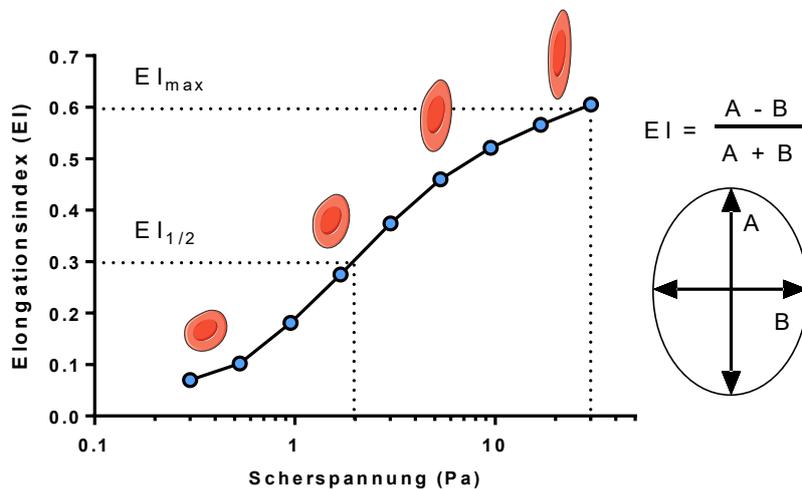


Abbildung 6: Messprinzip und exemplarisches Diagramm der Ektazytometrie.

Durch einen die Erythrozytensuspension durchquerenden Laserstrahl entsteht ein Diffraktionsmuster, aus dem der Elongationsindex (EI) nach der Formel  $EI = \frac{A - B}{A + B}$  berechnet wird. Aufgetragen gegen die Scherspannung entsteht dann ein Diagramm, das die Verformbarkeit von Erythrozyten (im Verhältnis zu einer unbehandelten Kontrolle) widerspiegelt. Abbildung modifiziert entsprechend dem Benutzerhandbuch von RR Mechatronics International B.V.

### 3.22. Kardiale Funktion im Modell des isoliert-perfundierten Herzens

Eine Möglichkeit zur Beurteilung der kardialen Funktion ohne systemische Einflüsse, wie die hormonelle oder neuronale Regulation, ist das *ex vivo*-Modell des isoliert-perfundierten Herzens nach Langendorff. Ein, in diesem Fall aus der Maus, explantiertes Herz wird dafür retrograd mit einer Nährlösung perfundiert und mit elektrischen Impulsen stimuliert. Prof. Dr. John Pernow und Dr. Jiangning Yang vom Karolinska-Institut (Karolinska Universitätskrankenhaus, Solna, Schweden) haben diese Methode unter Anwendung von Erythrozyten etabliert und optimiert [45], und freundlicherweise Versuche im Rahmen dieser Fragestellungen durchgeführt, wobei die Stimulation der intraerythrozytären sGC zur besseren Vergleichbarkeit nach den in dieser Studie verwendeten Methoden durchgeführt wurde. Die Herzen wurden auf einer bereits beschriebenen Weise isoliert [45]. Dafür wurden die Tiere *i.p.* mit 1 mg/kg KG Fentanyl und 50 mg/kg KG Fluanison (als Kombipräparat Hypnorm, Janssen Pharmaceutica N.V., Beerse, Belgien) und 25 mg/kg KG Midazolam (F. Hoffmann-La Roche

AG, Basel, Schweiz) anästhesiert und mit 250 IU Heparin antikoaguliert. Die Explantation des Herzens erfolgte nach Thorakotomie. Das Herz wurde über die aufsteigende Aorta an einer Nadel befestigt und retrograd mit einem konstanten Druck von 55 mmHg und bei 37°C mit begastem (Carbogen: 5% CO<sub>2</sub> und 95% O<sub>2</sub>) HBSS+ perfundiert. Ein Ballon im linken Ventrikel zeichnete über ein Mikromanometer den isovolumetrischen linksventrikulär entwickelten Druck (LVDP, engl. *left ventricular developed pressure*), sowie die linksventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit (dP/dt), erhalten durch die erste Ableitung des linksventrikulären Druckes, auf. Der linksventrikuläre enddiastolische Druck (LVEDP, engl. *left ventricular end-diastolic pressure*) wurde durch Inflation des Ballons auf 5-8 mmHg eingestellt. Nach Start der Perfusion konnte sich das Herz für 30 min stabilisieren. Die globale Ischämie von 40 min wurde durch eine Klammer am Zufluss der Lösung induziert. Anschließend wurde das Herz für 60 min reperfundiert und die Parameter aufgezeichnet.

Parallel zur Explantation des Herzens wurde Blut aus der offenen Brusthöhle entnommen und zentrifugiert (1,000 x g, 10 min, 4°C). Nach großzügiger Abnahme von Plasma und Buffy-Coat wurden die Erythrozyten drei Mal durch Zugabe von HBSS+ und Zentrifugation (300 x g, 10 min, 4°C) gewaschen. Die so gewonnenen Erythrozyten wurden 1:600 in HBSS+ (0.25 mL in 15 mL Puffer) verdünnt und mit 100 µM Sildenafil und 5 µM ODQ oder DMSO (als Lösungsmittelkontrolle) für 10 min bei 37°C inkubiert, gefolgt von 200 µM DEA/NO und 10 µM BAY 41-2272 für weitere 10 min bei 37°C. Die Proben wurden zentrifugiert (800 x g, 10 min, 4°C) und zwei Mal mit 15 mL HBSS+ gewaschen (300 x g, 10 min, 4°C). Das Erythrozytenpellet wurde 1:2 in HBSS+ verdünnt und 0.4 mL zu Beginn der Ischämie über einen Seitenarm des Perfusionssystems in die Koronarien injiziert. Ausschlusskriterien der Experimente waren irreversible ventrikuläre Tachykardien, Kammerflimmern und sichtbare Hämolyse der Erythrozyten während der Präparation.

### **3.23. Western Blot Analyse zur Proteinidentifikation**

Durch Western Blot Analysen können Proteine von Interesse mit Hilfe von speziellen Antikörpern in Proben nachgewiesen werden. Dafür werden die Proteine mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli [117] der Größe nach getrennt und durch Proteintransfer auf eine Membran übertragen. Durch Bindung spezieller (Primär-) Antikörper, die an Epitope des gesuchten Proteins binden, und den Sekundärantikörpern (z.B. Meerrettichperoxidase-gekoppelt), die an die ersten Antikörper binden, geschieht die Immundetektion. Ein Substrat wird dann in einer

Chemilumineszenzreaktion umgesetzt und kann durch spezielle Kamerasysteme sichtbar gemacht werden. Die Western Blot Analysen wurden freundlicherweise von der Apothekerin Wiebke Lückstädt nach einer bereits publizierten Weise durchgeführt [118]. Die Proben wurden auf ein 7% Tris-Acetat- oder 10% Bis-Tris-Gel entsprechend den Herstellerangaben (NuPAGE Novex, Thermo Fischer Scientific Inc.) aufgetragen. Ladekontrollen wurden ebenfalls auf demselben Gel aufgetragen. Endothelzellen aus Kultur (EC oder HUVECs, engl. *human umbilical vein endothelial cells*) wurden freundlicherweise von der Biotechnologin Dr. Christina Panknin zur Verfügung gestellt. Nach Transfer auf eine Nitrocellulosemembran (Amersham Protran 0.2, GE Healthcare, Chicago, IL, USA) wurde diese mit ECL Prime blocking agent (GE Healthcare) in TBS für eine Stunde bei Raumtemperatur blockiert und mit dem Primärantikörper über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach drei Waschschritten je 5 min mit TBS wurde die Membran mit einem Meerrettichperoxidase-konjugierten Sekundärantikörper inkubiert und erneut drei Mal je 5 min mit TBS gewaschen. Zur Detektion der Chemilumineszenz wurden das Amersham ECL Select Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare) und das Kamerasystem ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare) mit der dazugehörigen Software (Version 1.2) verwendet.

**Tabelle 2: Liste der verwendeten Antikörper für die Western Blot Analyse.**

*Aufgelistet sind die relevanten Herstellerangaben der Antikörper (Firmenname und Bestellnummer), sowie die hier verwendeten Verdünnungen. Die Verdünnungen fanden in TBS statt. Inkubiert wurde über Nacht bei 4°C.*

<b>Antikörper</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Bestellnummer</b>	<b>Verdünnung</b>
Anti-sGC- $\alpha_1$	Sigma Aldrich	G4280	1:1,000
Anti-sGC- $\beta_1$	Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA	160897	1:500
Anti-PDE5	Abnova, Taipei City, Taiwan	PAB12359	1:1,000
Anti-PKG	Enzo Life Sciences, Inc., Farmingdale, NY, USA	ADI-KAP-PK005	1:1,000
Anti-VASP	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA	3112	1:1,000
Anti-Phospho-VASP (Ser239)	Cell Signaling Technology	3114	1:500
Anti-Aktin	Sigma Aldrich	A2066	1:5,000

### 3.24. Statistische Analyse

Die graphische Darstellung und statistische Auswertung erfolgte mit GraphPad Prism (Version 6.01, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Für Vergleiche zwischen zwei Gruppen wurde der Student's t-Test verwendet, entweder ungepaart oder gepaart (Paardifferenzentest). Wurden mehrere Gruppen miteinander verglichen, erfolgte der statistische Vergleich mit der Varianzanalyse, im Text abgekürzt als ANOVA (engl. *analysis of variance*), entweder einfaktoriell (*1-way*) oder zweifaktoriell (*2-way*), gefolgt von einem geeigneten Post-hoc-Test, wie Dunnett's oder Tukey's. Bei einer gepaarten Varianzanalyse (wenn indiziert und durch gleiche n-Zahlen möglich) wurde dieses durch das vorangestellte Kürzel RM (engl. *repeated measures*) gekennzeichnet. Ein p-Wert kleiner 0.05 wurde für die statistische Signifikanz vorausgesetzt. Ausreißer wurden nur nach vorheriger Analyse entfernt. Die verwendeten Statistikmethoden sind in den jeweiligen Abbildungs- bzw. Tabellenbeschriftungen angegeben, ebenso wie die Anzahl der biologischen und/oder technischen Replikate.



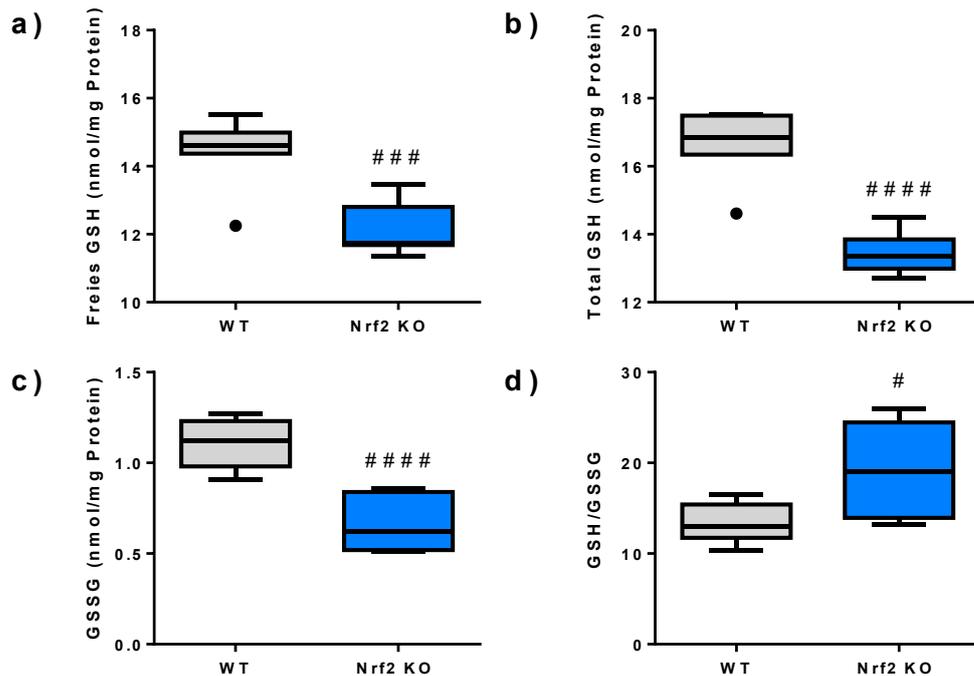
## 4. Ergebnisse

### 4.1. Vaskuläre Adaption des eNOS/sGC-Signalweges auf oxidativen Stress

Der eNOS/sGC-Signalweg stellt im kardiovaskulären Bereich eine extrem wichtige Signalkaskade dar, dessen Regulation nicht in allen Bereichen vollständig untersucht und verstanden wurde. Gerade der chronische Einfluss von erhöhtem oxidativen Stress kann die NO-Bioverfügbarkeit senken, zur Entkopplung der eNOS führen, die sGC oxidieren und zahlreiche anderen Zellschäden ausüben.

Nrf2 (engl. *nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2*) stellt dabei einen wichtigen Transkriptionsfaktor für die Expression antioxidativer Proteine dar. Das murine Nrf2 KO-Modell (KO, engl. *knockout*), welches defizient für diesen Transkriptionsfaktor ist, wurde in zahlreichen anderen Belangen untersucht, eine umfangreiche kardiovaskuläre und hämodynamische Charakterisierung hat aber nie stattgefunden, was unter anderem im Rahmen dieser Studie geschehen sollte.

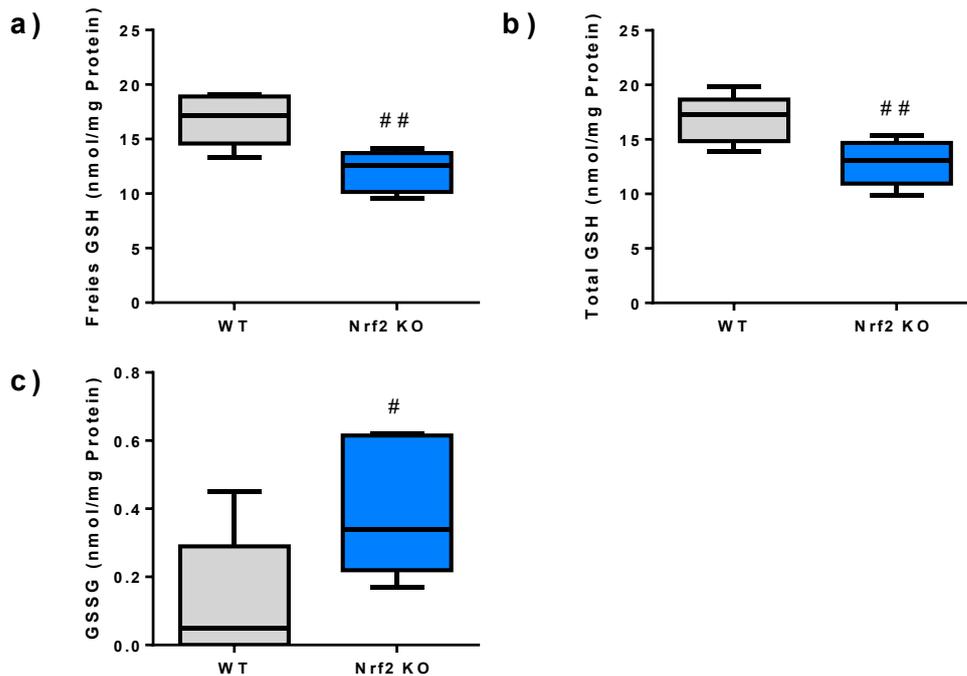
Zur anfänglichen Kontrolle bzw. zur Bestätigung des Modells sollte der Redox-Status in den Organen dieser Mäuse überprüft werden. Da die Nrf2 KO-Mäuse auf C57BL/6J-Hintergrund beruhten, wurde als Wildtyp und Kontrollgruppe dieselbe Linie (C57BL/6J) verwendet. Nach Thorakotomie, systemischer Perfusion mit PBS und Explantation wurden die Organe lysiert, zentrifugiert (14,000 x g, 10 min, 4°C) und im Überstand die Konzentration an GSH bestimmt. Die Menge dieses Tripeptids, sowie das Verhältnis zwischen reduzierter (GSH) und oxidiertes Form (GSSG), sollten Hinweise auf den Redox-Status geben. In **Abb. 7 a** wurden die gemessenen GSH-Konzentrationen in murinen Herzen aufgetragen, in **(b)** die Konzentrationen an totalem GSH (nach Reduktion des GSSG) und in **(c)** die Konzentrationen an GSSG (berechnet nach der Formel 5), welche in den Nrf2 KO-Mäusen im Vergleich zum Wildtypen (WT) alle signifikant verringert waren. Der Quotient aus GSH/GSSG war signifikant erhöht (n=7).



**Abbildung 7: Ermittlung des Redox-Status in Herzen von Nrf2 KO-Mäusen durch GSH-Messung.**

Mit PBS gespülte und explantierte Herzen wurden lysiert, zentrifugiert (14,000 x g, 10 min, 4°C) und im Überstand die Konzentration an freiem und totalem GSH (nach Reduktion von GSSG) gemessen und anhand einer später durchgeführten Proteinbestimmung entsprechend normiert. Konzentrationen an (a) freiem GSH, (b) totalem GSH und (c) GSSG (berechnet nach Formel 5) zeigten in Nrf2 KO-Mäusen signifikant verringerte Werte im Vergleich zu den WT-Mäusen, wodurch (d) der Quotient GSH/GSSG signifikant erhöht war ( $n=7$ ,  $t$ -Test #  $p<0.05$ , ###  $p<0.001$ , ####  $p<0.0001$ ). Darstellung als Box-Plot (Tukey's). Ausreißer sind als schwarze Kreise dargestellt.

Analog zum Redox-Status in den Herzen wurden auch murine Aorten präpariert und analysiert. In **Abb. 8 a** und **b** wurden signifikant verringerte Konzentrationen an (freiem) GSH und totalem GSH dargestellt. Die Konzentrationen an GSSG (berechnet nach Formel 5) waren in diesen Mäusen signifikant erhöht ( $n=7$ ) (c). Da die GSSG-Werte der Wildtypen teilweise nicht detektierbar waren, konnte der Quotient aus GSH/GSSG nicht berechnet und aufgetragen werden.



**Abbildung 8: Ermittlung des Redox-Status in Aorten von Nrf2 KO-Mäusen durch GSH-Messung.**

Mit PBS gespülte und explantierte Aorten wurden lysiert, zentrifugiert (14,000 x g, 10 min, 4°C) und im Überstand die Konzentration an freiem und totalem GSH (nach Reduktion von GSSG) gemessen und anhand einer später durchgeführten Proteinbestimmung entsprechend normiert. Konzentrationen an (a) freiem GSH und (b) totalem GSH zeigten signifikant verringerte Werte im Vergleich zu den WT-Mäusen. (c) Die Konzentrationen an GSSG (berechnet nach Formel 5) waren in Nrf2 KO-Mäusen signifikant höher. Da die WT-Werte für das GSSG teilweise nicht zu messen waren, konnte der Quotient GSH/GSSG nicht berechnet und dargestellt werden (n=7, t-Test # p<0.05, ## p<0.01). Darstellung als Box-Plot (Tukey's).

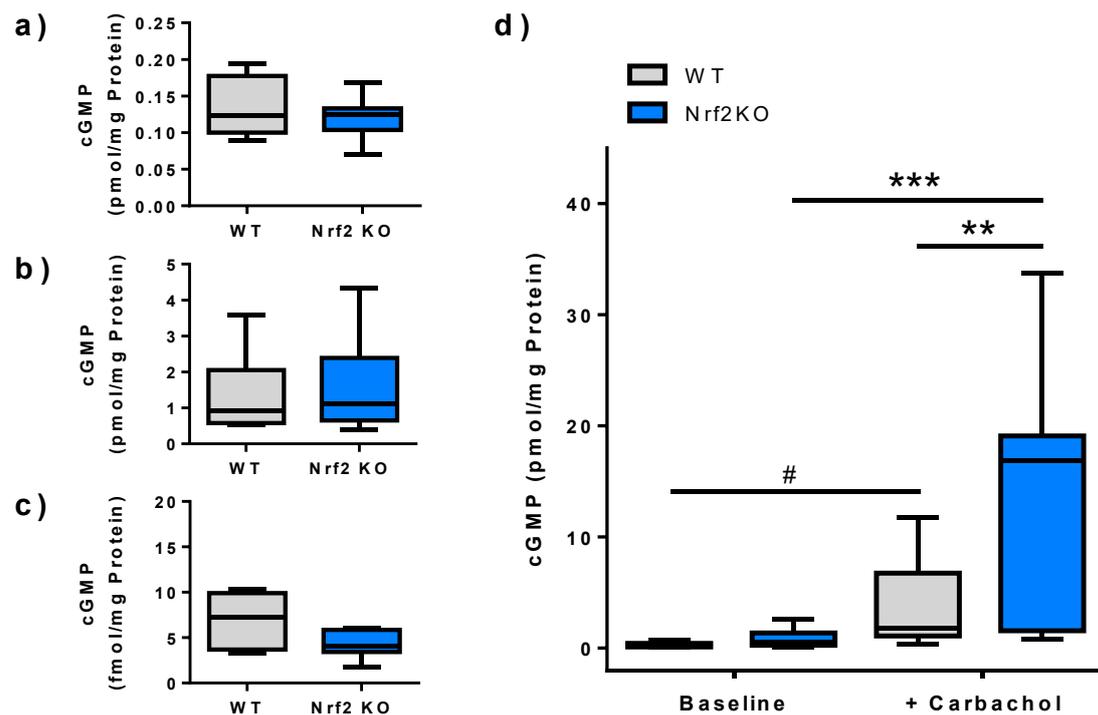
Bei der kardiovaskulären und hämodynamischen Charakterisierung dieser Mäuse durch Dr. Ralf Erkens und der veterinärmedizinisch-technischen Assistentin Stefanie Becher wurde entgegen den Erwartungen ein signifikant verringerter Blutdruck festgestellt [118]. Durch eine Millar-Katherisierung der *A. carotis communis* konnten invasiv die Drücke ermittelt werden, die in Nrf2 KO-Mäusen im Vergleich zum Wildtypen sowohl systolisch (t-Test, p<0.0001), als auch diastolisch (t-Test, p<0.001) verringert waren. Da der eNOS/sGC-Signalweg, wie bereits erwähnt, eine wichtige Rolle bei der Regulation des Blutdruckes spielt, sollte die Aktivität dieser Proteine untersucht werden.

Dafür wurden initial die basalen cGMP-Werte in den Organen (Herz und Aorta) und Erythrozyten der Mäuse bestimmt. Dies geschah durch Gewinnung von gespülten und explantierten Organen bzw. isolierten und gewaschenen Erythrozyten, die dann lysiert und zentrifugiert wurden (14,000 x g, 10 min, 4°C), um mit dem Überstand einen

Radioimmunoassay (RIA) zur Bestimmung der cGMP-Konzentration durchzuführen, die anschließend auf die Proteinmenge dieser Proben normiert wurde. In **Abb. 9** wurden die cGMP-Werte der Herzen (**a**), der Aorten (**b**) (WT: n=10, Nrf2 KO: n=12) und der Erythrozyten (**c**) (WT: n=5, Nrf2 KO: n=6) aufgeführt. Signifikante Unterschiede zwischen den beiden murinen Modellen konnten dabei nicht beobachtet werden.

Deshalb wurde ebenfalls die endothelabhängige Stimulation der sGC durchgeführt, die eine kombinierte Funktion von Endothel (eNOS) und glatter Muskulatur (sGC) untersucht. Dafür wurde der thorakale Teil muriner Aorten explantiert, vorsichtig von umgebenem Fett befreit und in Aortenringe geschnitten, die in einer Petrischale in Krebs-Henseleit-Puffer (welcher durchgehend mit Carbogen begast wurde, einer Mischung aus 5% CO<sub>2</sub> und 95% O<sub>2</sub>) für 10 min bei 37°C inkubiert wurden. Die Stimulation geschah durch Zugabe von Carbachol (30 µM, oder der gleichen Menge Puffer als Lösungsmittelkontrolle) und weiteren 3 min Inkubation bei 37°C. Anschließend wurden die Aortenringe entnommen, und die Inkubation durch Einfrieren in flüssigem Stickstoff (-196°C) beendet. Nach cGMP-Extraktion (Lyse in 70% Ethanol und Zentrifugation: 14,000 x g, 15 min, 4°C) wurde im Überstand die cGMP-Konzentration bestimmt und gegen die später ermittelte Proteinmenge normiert. In **Abb. 9 d** wurden diese Ergebnisse aufgetragen. Während es auch hier bei den basalen Proben keine Unterschiede gab, wiesen die Nrf2 KO-Mäuse in der endothelabhängigen sGC-Stimulation durch Carbachol signifikant höhere cGMP-Antworten auf (WT und Nrf2 KO: n=3, mit 2-5 Aortenringen pro Maus), was auf eine höhere Expression und/oder Aktivität der beteiligten Proteine hinwies.

Die so ermittelten Ergebnisse waren konsistent mit ebenfalls durchgeführten Western Blot Analysen, die der eNOS durch densitometrische Auswertung sowohl in den Herzen, als auch in den Aorten von Nrf2 KO-Mäusen eine höhere Expression bescheinigten. Eine im Vergleich zum Wildtypen erhöhte eNOS-Phosphorylierung (als Quotient Phospho-eNOS/eNOS) konnte nicht nachgewiesen werden [118].



**Abbildung 9: Basale Konzentrationen an cGMP und endothelabhängige sGC-Stimulation in Nrf2 KO-Mäusen.**

Zur Erklärung des verminderten Blutdrucks in Nrf2 KO-Mäusen wurde der eNOS/sGC-Signalweg untersucht, einerseits durch Messung der basalen cGMP-Konzentrationen in Organlysaten, andererseits durch endothelabhängige Stimulation der sGC in Aortenringen. Mit PBS gespülte und explantierte Organe oder isolierte und gewaschene Erythrozyten wurden lysiert und nach einer Zentrifugation (14.000 x g, 10 min, 4°C) mit dem Überstand ein Radioimmunoassay (RIA) zur Ermittlung der basalen cGMP-Konzentration durchgeführt. In (a) Herzen (WT: n=10, Nrf2 KO: n=12), (b) Aorten (WT: n=10, Nrf2 KO: n=12) und (c) Erythrozyten (WT: n=5, Nrf2 KO: n=6) waren keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyp- (WT) und Nrf2 KO-Mäusen zu sehen. (d) In einer endothelabhängigen sGC-Stimulation von Aortenringen jedoch bewirkte die Gabe von 30 μM Carbachol (für 3 min bei 37°C in einer Krebs-Henseleit-Lösung, begast mit Carbogen), einem Strukturanalogon des Acetylcholins, eine cGMP-Antwort, die in Nrf2 KO-Mäusen signifikant höher ausfiel als in den Wildtypen. Die basalen cGMP-Konzentrationen ohne Zugabe von Carbachol waren auch hier nicht signifikant unterschiedlich (WT: n=3, Nrf2 KO: n=3, mit 2-5 Aortenringen pro Maus; 1-way ANOVA  $p < 0.0001$ , Tukey's  $** p < 0.01$ ,  $*** p < 0.001$ ; t-Test #  $p = 0.0140$ ). Darstellung als Box-Plot (Tukey's).

## 4.2. Stickstoffmonoxid und Erythrozyten, eine EPR-Studie

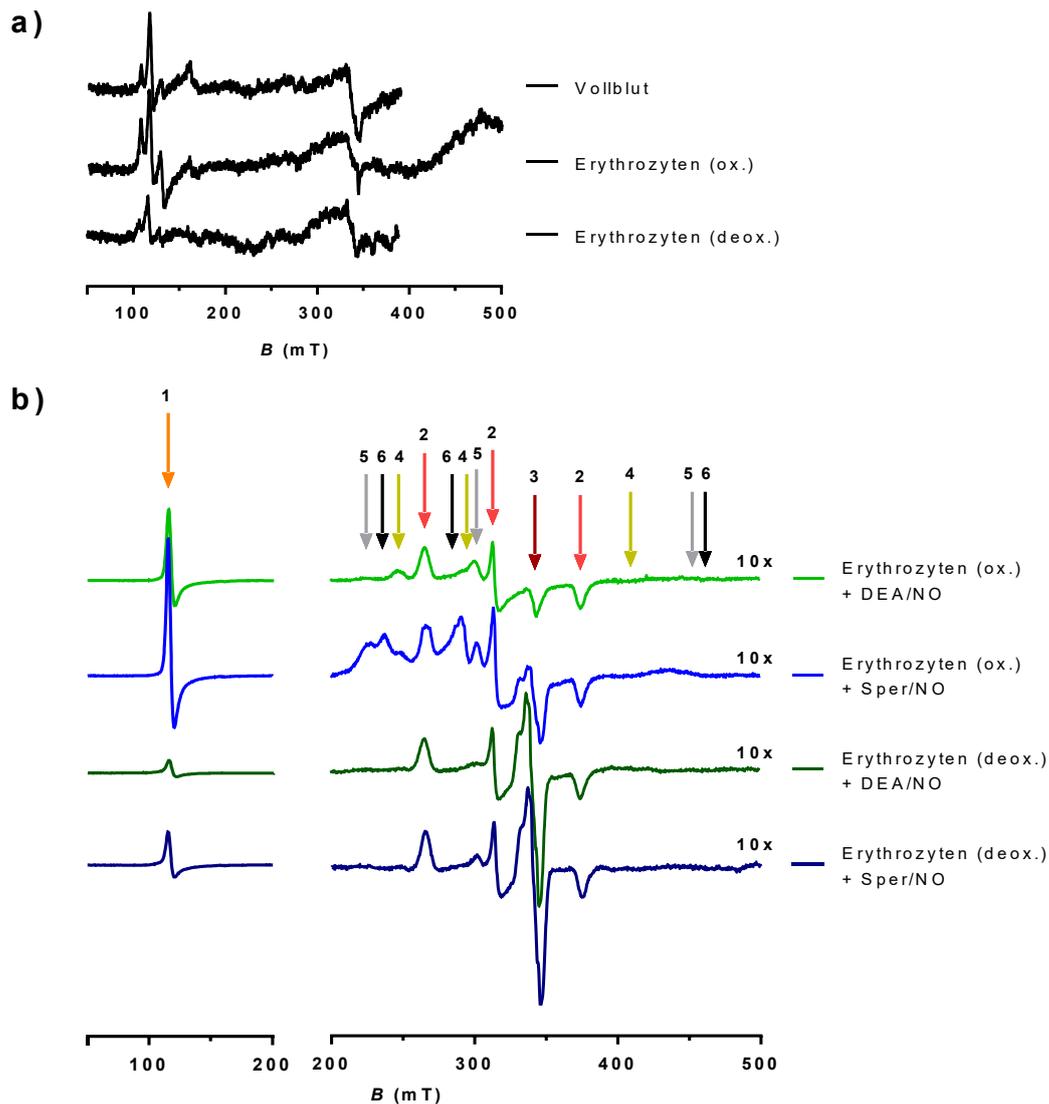
Die zweite Zielsetzung dieser Studie war die Frage nach der Beteiligung von Erythrozyten im NO-Metabolismus. Stickstoffmonoxid (NO), das vom Endothel in das Gefäßlumen/Plasma freigesetzt wird, erfährt rasch eine Metabolisierung zu Nitrit ( $\text{NO}_2^-$ ), Nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ) oder Nitrosothiolen (RSNO). Wie in der Einleitung bereits erwähnt wurde, werden diese Reaktionen in Anwesenheit von Erythrozyten nur noch beschleunigt. Was mit dem NO passiert und ob dieses unter bestimmten Bedingungen auch wieder freigesetzt wird, sollte im Folgenden untersucht werden, unter Verwendung der Elektronenspinresonanz-Spektroskopie (EPR, engl. *electron paramagnetic resonance*), mit der paramagnetische Substanzen (Substanzen mit ungepaarten Elektronen) detektiert werden können.

In ersten Versuchen wurde Vollblut benutzt, sowie isolierte und gewaschene Erythrozyten, die in oxygenierter Form oder durch Begasung mit einem Inertgas (wie  $\text{N}_2$ , He oder Ar) in deoxygenierter Form vorlagen. In **Abb. 10 a** wurden die relativen Intensitäten dieser EPR-Spektren (X-Band CW, gemessen bei 20 K oder  $\approx -253^\circ\text{C}$ ) gegen die magnetische Feldstärke  $B$  aufgetragen, um die Hintergrundsignale dieser Zellen zu ermitteln, die ohne zusätzliche pharmakologische Behandlung zu sehen waren.

Außerdem sollten NO-Donoren verwendet werden. NO-Donoren sind Substanzen, die in Abhängigkeit des pH-Wertes und der Temperatur NO freisetzen. Sper/NO z.B. ist mit 39 min (bei  $37^\circ\text{C}$ , pH 7.4) bzw. 230 min (bei  $22-25^\circ\text{C}$ , pH 7.4) ein eher langsamer Donor, während DEA/NO mit 2 min (bei  $37^\circ\text{C}$ , pH 7.4) bzw. 16 min (bei  $22-25^\circ\text{C}$ , pH 7.4) schneller zerfällt und dabei NO freisetzt. Bei geringeren pH-Werten wird die Freisetzung außerdem beschleunigt, hohe pH-Werte (und geringe Temperaturen) ermöglichen eine vorübergehende Lagerung der gelösten Substanzen bis zur Anwendung im Experiment.

Durch die Verwendung dieser Donoren sollte eine (extra- oder intraerythrozytäre) NO-Quelle simuliert und das Schicksal des NO identifiziert werden. Die Ergebnisse dieser Behandlung wurden in **Abb. 10 b** aufgetragen, wobei der Bereich von 200 mT bis 500 mT zur besseren Identifikation der Signale 10-fach vergrößert dargestellt wurde. Eine Zuordnung der aufgetretenen Signale geschah anhand von Literaturdaten [119-127], im Diagramm gekennzeichnet durch farbige Pfeile und Nummern: 1. metHb/ $\text{H}_2\text{O}$  ( $g=5.96, 1.99$ ), 2. metHb/ $\text{OH}^-$  ( $g=2.59, 2.18, 1.83$ ), 3. HbNO ( $g=2.02$ ), 4. metHb/His ( $g=2.77, 2.24, 1.70$ ), 5. metHb/ $\text{NO}_2^-$  Spezies 1 ( $g=3.06, 2.20, 1.45$ ), 6. metHb/ $\text{NO}_2^-$  Spezies 2 ( $g=2.90, 2.30, 1.45$ ). Wobei Spezies 1 und 2 zwei vorläufige Bezeichnungen für die dem Nitrit-Methämoglobin (metHb/ $\text{NO}_2^-$ ) zugeordneten Signale darstellten [119]. Die Nennung des Landé-Faktors oder

Faktor  $g$ , einer Bezeichnung für das gyromagnetische Verhältnis, ist bei der Zuordnung von EPR-Signalen gängig. Wie erwartet, war das metHb/H<sub>2</sub>O-Signal in Anwesenheit von oxygenierten Erythrozyten von der Intensität betrachtet am prominentesten, während unter hypoxischen Bedingungen/Einsatz von deoxygenierten Erythrozyten vermehrt HbNO entstehen konnte.



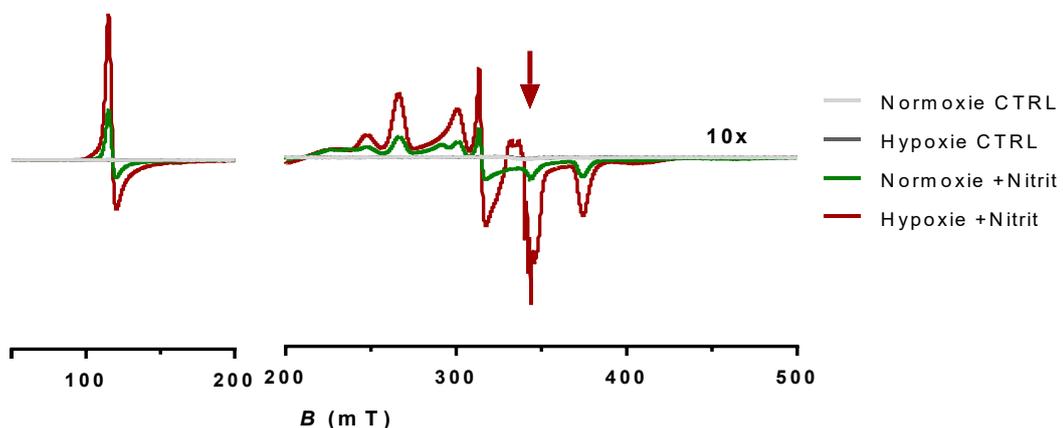
**Abbildung 10: EPR-Spektren von Erythrozyten zur Zuordnung der detektierten Signale.**

Isolierte und gewaschene Erythrozyten wurden durch eine EPR-Spektroskopie (X-Band CW, 20 K) analysiert, um den Hintergrund unbehandelter Proben zu ermitteln und nach Gabe von NO-Donoren Signalzuordnungen vorzunehmen. Die  $y$ -Achse mit der relativen EPR-Signalintensität wurde aufgrund der Darstellungsweise nicht eingetragen, die Spektren wurden aber in der gleichen Skalierung miteinander verglichen. **(a)** Vollblut, oxygenierte und deoxygenierte Erythrozyten (durch Begasung mit einem Inertgas gewonnen) wurden direkt ohne weitere Behandlung analysiert, um den Hintergrund dieser Proben zu ermitteln ( $n=1$ ). **(b)** Oxygenierte und deoxygenierte Erythrozyten wurden mit zwei verschiedenen Arten von NO-Donoren behandelt, dem langsameren

*Sper/NO (500  $\mu\text{M}$ ), und dem schnelleren DEA/NO (250  $\mu\text{M}$ ), und die auftretenden Signale anhand von Literaturdaten zugeordnet (markiert durch farbige Pfeile und Nummern) [119-127]: 1. metHb/H<sub>2</sub>O, 2. metHb/OH, 3. HbNO, 4. metHb/His, 5. metHb/NO<sub>2</sub><sup>-</sup> Spezies 1, 6. metHb/NO<sub>2</sub><sup>-</sup> Spezies 2. Der Bereich 200-500 mT wurde im Vergleich zum Bereich 50-200 mT 10-fach vergrößert dargestellt (n=1).*

Diese Versuchsbedingungen wurden ebenfalls dafür verwendet, um einen NO-Metaboliten zu applizieren. Nach Gabe von 2 mM Nitrit zu oxygenierten (normoxische Bedingungen) und deoxygenierten Erythrozyten (hypoxische bzw. anoxische Bedingungen) sollte die Bildung eines HbNO-Signales verfolgt werden. Wie in **Abb. 11** dargestellt wurde, konnte das HbNO-Signal nur in Anwesenheit von deoxygenierten Erythrozyten beobachtet werden, was für die hypoxieabhängige Nitrit-Reduktion sprechen würde (exemplarisches Diagramm mehrerer Versuche, n=2-3). Die Entwicklung der metHb-Signale war wenig verwunderlich, da ein Überschuss an Nitrit zur Methämoglobinämie führen kann. Verwunderlich war bloß, dass diese unter hypoxischen Bedingungen stärker ausgeprägt zu sein schien.

Die direkte Bildung von NO oder sogar die Freisetzung aus Erythrozyten konnte unter diesen Bedingungen nicht erfasst werden. Dafür wäre eine Substanz notwendig, die das kurzlebige NO zuverlässig über eine gewisse Inkubationszeit bindet.



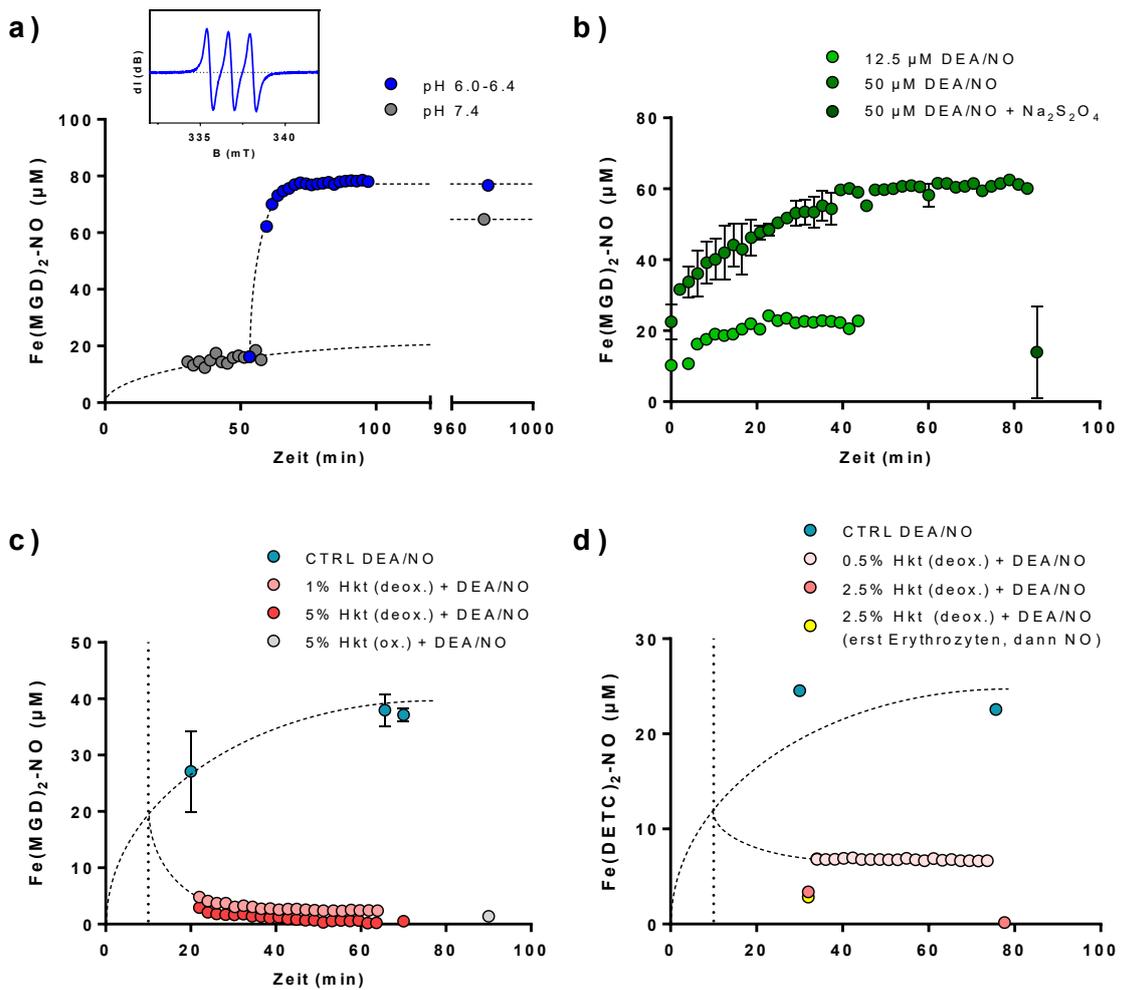
**Abbildung 11: EPR-Experimente zur Nitrit-Reduktion unter hypoxischen Bedingungen.**

*Isolierte und gewaschene Erythrozyten wurden unter normoxischen (oxygeniert) und hypoxischen Bedingungen (deoxygeniert, durchgeführt in einer Glovebox) mit 2 mM Nitrit versetzt und durch eine EPR-Spektroskopie (X-Band CW, 20 K) analysiert, um die hypoxieabhängige Nitrit-Reduktion zu NO zu beobachten, in indirekter Form als Ausprägung eines HbNO-Signales. Die y-Achse mit der relativen EPR-Signalintensität wurde aufgrund der Darstellungsweise nicht eingetragen. Die Spektren wurden aber in der gleichen Skalierung miteinander verglichen. Der Bereich 200-500 mT wurde im Vergleich zum Bereich 50-200 mT 10-fach vergrößert dargestellt. Exemplarisches Diagramm mehrerer Versuche (n=2-3).*

Da die auftretenden Signale in den EPR-Spektren von Erythrozyten zuverlässig zugeordnet und Änderungen sinnvoll nachverzogen werden konnten, sollten im nächsten Schritt sogenannte Spin-Traps eingesetzt werden, die von Erythrozyten freigesetztes NO binden, über die Zeit akkumulieren und detektierbar machen sollten. Synthetisiert wurden diese durch die limitierende Vorlage von  $\text{FeSO}_4$  und der Zugabe (im Überschuss) eines geeigneten Liganden wie *N*-Methyl-D-glucamindithiocarbamat (MGD) oder Diethyldithiocarbamat (DETC), wodurch ein Eisen-Dithiocarbamat-Komplex entstand ( $\text{Fe}(\text{MGD})_2$  bzw.  $\text{Fe}(\text{DETC})_2$ ), der als NO-Addukt (Nitrosyl-Eisen-Komplex) in der EPR-Spektroskopie detektierbar ist. Die Strukturen dieser Spin-Traps wurden in **Abb. 5** dargestellt. Eine komfortable Eigenschaft von  $\text{Fe}(\text{MGD})_2$  lag darin, dass es besser wasserlöslich war als  $\text{Fe}(\text{DETC})_2$ , bei dem DMSO hinzugegeben werden musste.

In ersten Versuchen zur Bildung und Stabilität dieser Spezies wurden Spin-Traps vorgelegt und durch Zugabe von NO-Donoren die Bildung der Nitrosyl-Eisen-Komplexe beobachtet (durch EPR-Spektroskopie (X-Band CW) und Vergleich mit dem Standard TEMPOL). In **Abb. 12 a** wurden  $500 \mu\text{M}$   $\text{Fe}(\text{MGD})_2$  mit  $50 \mu\text{M}$  des langsamen NO-Donors Sper/NO gemischt. Da dies bei Raumtemperatur (und pH 7.4) stattfand, erhöhte sich die Halbwertszeit des Donors von 39 min (bei  $37^\circ\text{C}$ ) auf 230 min [128, 129], so dass nach  $\approx 16$  h lediglich etwas mehr als vier Halbwertszeiten verstrichen waren. In einem Teil des Inkubationsansatzes wurde deshalb bei 50 min der pH-Wert auf 6.0-6.4 gesenkt, um die Freisetzung zu beschleunigen. Dort war gegen Ende des Versuches eine *Trapping*-Effizienz (Bindungseffizienz) von  $\approx 80\%$  zu sehen (da ca.  $80 \mu\text{M}$  des Nitrosyl-Eisen-Komplexes gemessen wurden). Bei Verwendung des schnelleren NO-Donors DEA/NO ( $12.5 \mu\text{M}$  und  $50 \mu\text{M}$ ,  $n=1-2$ ) ergab sich, dass geringere Konzentrationen zu einer besseren Bindung führten ( $\approx 80\%$ ) als höhere ( $\approx 60\%$ ) (**Abb. 12 b**). Dies könnte am günstigeren Donor/Trap-Verhältnis liegen oder an der Kinetik der Bindung. Eine vorsorgliche oder nachträgliche Gabe von Natriumdithionit ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ ), um eine Oxidation des Komplexes zu verhindern bzw. bereits oxidierte Spezies wieder zu reduzieren (da die oxidierten Spezies nicht gemessen werden können), führte entgegen der Erwartung zu einem verringerten Signal (exemplarisch gezeigt für  $50 \mu\text{M}$  DEA/NO) ( $n=2$ ). Ebenso unerwartet gestaltete sich die Zugabe von Erythrozyten zu bereits gebildeten Nitrosyl-Eisen-Komplexen. In **Abb. 12 c** wurden  $250 \mu\text{M}$   $\text{Fe}(\text{MGD})_2$  mit  $25 \mu\text{M}$  DEA/NO gemischt und nach 10 min isolierte und gewaschene Erythrozyten (oxygeniert oder deoxygeniert und in verschiedenen Konzentrationen von 1% Hkt und 5% Hkt) hinzugegeben, was zu einem fast vollständigen Verlust des Signals führte, verglichen mit der Kontrolle ohne Erythrozyten ( $n=1$ , CTRL DEA/NO:  $n=2$ ). In **Abb. 12 d** wurden  $250 \mu\text{M}$   $\text{Fe}(\text{DETC})_2$  mit  $12.5 \mu\text{M}$  DEA/NO gemischt

und ebenfalls nach 10 min isolierte und gewaschene Erythrozyten hinzugegeben, wobei auch hier ein enormer Signalverlust auftrat (n=1). Die Reihenfolge der Zugabe spielte dabei keine Rolle. Die initiale Gabe von Erythrozyten und darauffolgende Applikation von DEA/NO zeigte das gleiche Ergebnis. Der Grund für diese Signalverluste konnte dabei nicht ermittelt werden. Denkbar wären Gleichgewichts- und Konkurrenzreaktionen mit den Erythrozyten, verminderte Stabilität oder Oxidation der Spin-Traps.



**Abbildung 12: EPR-Experimente zur Bindungsfähigkeit und Stabilität der Spin-Traps.**

Die NO-Bindungsfähigkeit und Stabilität der beiden Spin-Traps  $Fe(MGD)_2$  und  $Fe(DETC)_2$  wurde unter Verwendung von zwei NO-Donoren (Sper/NO und DEA/NO) und in An- oder Abwesenheit von Erythrozyten getestet und die EPR-Spektren (X-Band CW) aufgezeichnet. Die Quantifizierung der NO-Addukte (Nitrosyl-Eisen-Komplexe) fand durch einen Vergleich mit dem Standard TEMPOL statt. Die gestrichelten Linien entsprechen frei eingezeichneten Verläufen/Extrapolationen zum besseren Verständnis der Daten und spiegeln keine reellen Messpunkte wider. (a)  $500 \mu M Fe(MGD)_2$  wurden vorgelegt und die Bildung von  $Fe(MGD)_2-NO$  als Funktion der Zeit nach Zugabe des langsamen NO-Donors Sper/NO ( $50 \mu M$ ) bei pH 7.4 und Raumtemperatur beobachtet. Zur Beschleunigung der NO-Freisetzung wurde in einem zweiten Ansatz der pH-Wert gesenkt (auf pH 6.0-6.4). Die

Bindungseffizienz lag bei  $\approx 80\%$  ( $n=1$ ). **(b)** Bildung von  $\text{Fe}(\text{MGD})_2\text{-NO}$  als Funktion der Zeit nach Zugabe des schnelleren NO-Donors DEA/NO ( $12.5 \mu\text{M}$  und  $50 \mu\text{M}$ ) bei pH 7.4 und Raumtemperatur ( $n=1-2$ ). Eine geringere NO-Menge wurde besser gebunden ( $\approx 80\%$ ) als die höhere ( $\approx 60\%$ ). Die nachträgliche Gabe des Reduktionsmittels Natriumdithionit ( $120-150 \mu\text{M Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ ) führte zu einer Verringerung des Signals. **(c)** Die Zugabe von isolierten und gewaschenen Erythrozyten (oxygeniert oder deoxygeniert und in verschiedenen Konzentrationen von 1% Hkt und 5% Hkt), 10 min nach Zugabe von  $250 \mu\text{M Fe}(\text{MGD})_2$  und  $25 \mu\text{M DEA/NO}$ , führte zu einem drastischen und fast vollständigen Verlust des gemessenen  $\text{Fe}(\text{MGD})_2$ -Signals, verglichen mit der Kontrolle ohne Erythrozyten („CTRL DEA/NO“) ( $n=1$ , CTRL DEA/NO:  $n=2$ ). **(d)** Bei Vorlage von  $250 \mu\text{M Fe}(\text{DETC})_2$  und  $12.5 \mu\text{M DEA/NO}$  und der nachträglichen Gabe von Erythrozyten bei 10 min (deoxygeniert und in Konzentrationen von 0.5% Hkt und 2.5% Hkt) war ebenfalls ein Signalverlust zu sehen, im Vergleich zur Kontrolle ohne Erythrozyten („CTRL DEA/NO“). Die Reihenfolge der Zugabe (erst Erythrozyten, dann DEA/NO) änderte nichts am Ausgang des Experiments ( $n=1$ ). Bei der Verwendung von  $\text{Fe}(\text{DETC})_2$  musste zudem mit der Zugabe von DMSO experimentiert werden (nicht gezeigt).

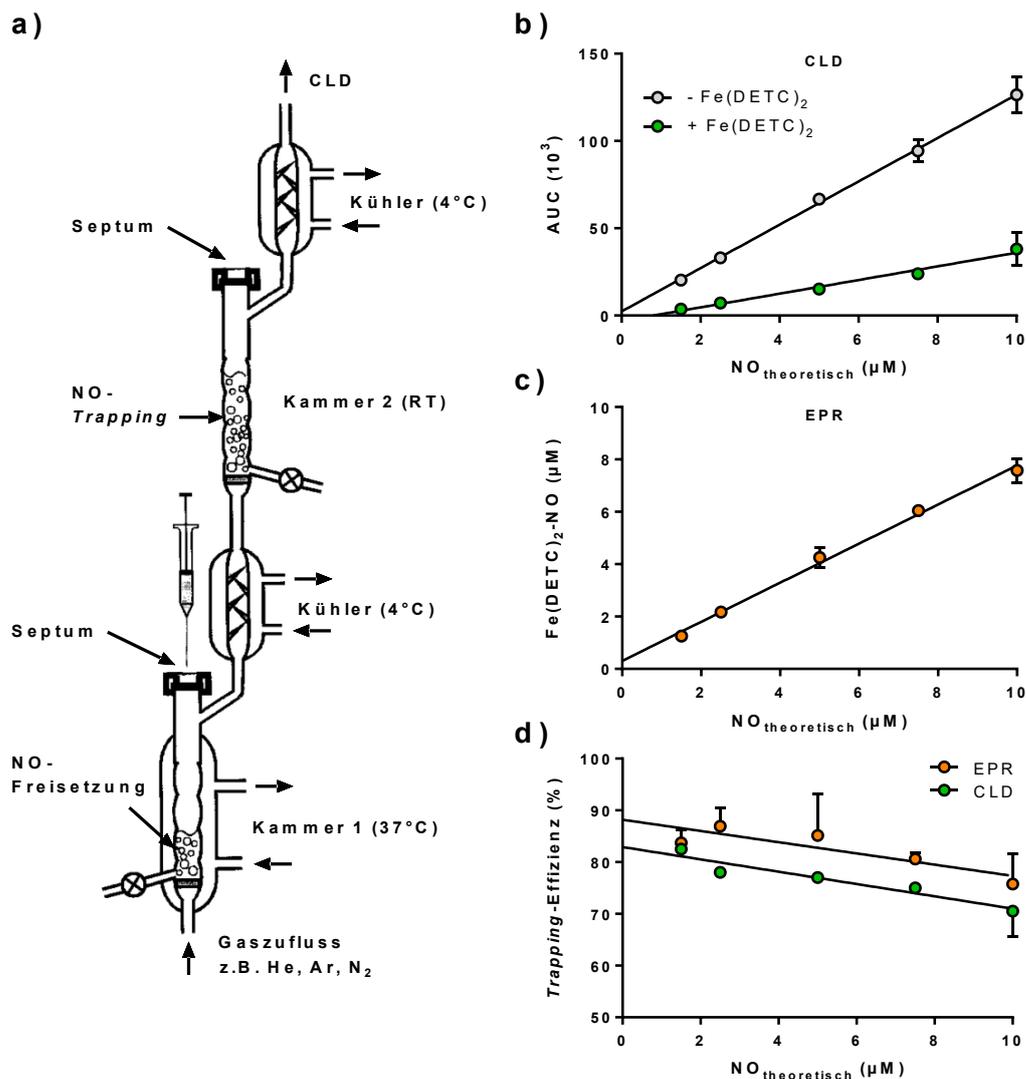
Da die direkte Addition von Spin-Traps zu den Erythrozytensuspensionen nicht zweckmäßig war und aus unbekanntem Gründen zum (fast vollständigen) Verlust des Signals führte, wurde eine räumliche Trennung von dem Ort der NO-Freisetzung und dem Ort des NO-Trapping angestrebt. Solch ein Zwei-Kammer-System wurde bereits 2004 von Li *et al.* verwendet, um enzymatische Versuche zur NO-Produktion durch die Xanthinoxidase durchzuführen [110]. Dabei wurde eine Glasapparatur mit zwei verbundenen Kammern mit einem Gas durchströmt, welches das NO vom Ort der Freisetzung in die zweite Kammer mit einem Spin-Trap transportierte, wo das NO gebunden werden konnte. Die Vorteile in diesem Aufbau lagen darin, dass jeweils optimale Reaktionsbedingungen gewählt werden konnten und keine unbekanntem Gleichgewichts- und Konkurrenzreaktionen stattfanden. Daher wurde die Apparatur im Rahmen dieser Studie adaptiert und optimiert. Eine schematische Darstellung mit Beschriftung der einzelnen Kompartimente wurde in **Abb. 13 a** aufgetragen. Der Kontakt zwischen Kammer 1 und Kühler 1 wurde dabei durch ein Kugelgelenk (Kugelflansch) hergestellt, damit bei Bedarf die Kammer gewechselt und abweichende Inkubationsvolumina eingesetzt werden konnten. Kammer 2 wurde zur Vergrößerung der Kontaktfläche und -zeit zwischen Gas und Flüssigkeit als längliches Rohr gewählt. Das NO, welches nicht durch die Spin-Traps in Kammer 2 gebunden wurde, konnte (bei Bedarf) durch die nachgeschaltete Chemilumineszenzdetektion (CLD) gemessen werden.

In Vorversuchen wurden unterschiedliche Konzentrationen an  $\text{Fe}(\text{MGD})_2$  und  $\text{Fe}(\text{DETC})_2$  ausprobiert, sowie unterschiedliche Reinstwasser zu DMSO-Verhältnisse für  $\text{Fe}(\text{DETC})_2$ , welches weniger wasserlöslich ist als  $\text{Fe}(\text{MGD})_2$  (nicht gezeigt). In Kammer 1 wurde dann  $37^\circ\text{C}$  warmes HBSS+ (pH 7.4) vorgelegt und eine definierte Menge DEA/NO injiziert. Während dieser NO-Freisetzung wurde ein kontinuierliches CLD-Signal aufgezeichnet, welches das nicht gebundene NO widerspiegelte. Durch Vergleich mit einer Referenzmessung

ohne Spin-Trap (aber der gleichen Menge NO-Donor) konnte das CLD-Signal für die „vollständige“ NO-Menge integriert und mit dem vorherigen Signal verglichen werden, wodurch sich eine *Trapping*-Effizienz ergab. Ebenfalls quantifiziert (durch eine EPR-Messung und Vergleich mit TEMPOL) wurde die Lösung mit dem Spin-Trap aus Kammer 2, wodurch mit dem Wissen um die eingesetzte Menge an NO-Donor (und der theoretisch freigesetzten Menge an NO) eine zweite *Trapping*-Effizienz ermittelt werden konnte. Die *Trapping*-Effizienz der EPR-Messung beinhaltet jedoch gleichzeitig die Stabilität des jeweiligen Spin-Traps und war von dessen Oxidationsstatus abhängig. Die so erhaltenen Ergebnisse waren keinerseits konsistent und hohe mit der CLD-ermittelte *Trapping*-Effizienzen von  $\text{Fe}(\text{MGD})_2$  waren mit der EPR-Spektroskopie nicht zu erkennen, vermutlich aufgrund einer nicht gewollten Oxidation und somit einem Signalverlust. Diese Probleme tauchten bei Verwendung von  $\text{Fe}(\text{DETC})_2$  nicht auf. Deshalb wurde in den folgenden Versuchen lediglich mit  $\text{Fe}(\text{DETC})_2$ , unter Verwendung eines hohen DMSO-Anteils (1:20 Reinstwasser zu DMSO), weitergearbeitet. So blieb der Nitrosyl-Eisen-Komplex in Lösung und die EPR-Messungen waren mit den CLD-Signalen vergleichbar/vereinbar.

Zur Ermittlung der genauen *Trapping*-Effizienzen wurde eine konstante Konzentration von  $500 \mu\text{M}$   $\text{Fe}(\text{DETC})_2$  vorgelegt. Die Synthese des Spin-Traps geschah durch Zugabe von  $2 \text{ mM}$  DETC und  $500 \mu\text{M}$   $\text{FeSO}_4$  (das Eisen wurde limitiert und der Ligand im Überschuss eingesetzt). Alle Lösungen wurden durch vorherige Begasung mit einem Inertgas von gelöstem Sauerstoff befreit. In Kammer 1 wurden dann unterschiedliche Konzentrationen an DEA/NO appliziert. In **Abb. 13 b** wurden die CLD-Signale dieser Versuche aufgeführt, einerseits die Referenzmessungen für die insgesamt freigesetzte NO-Menge („-  $\text{Fe}(\text{DETC})_2$ “), andererseits die reduzierten Signale in Anwesenheit von  $\text{Fe}(\text{DETC})_2$  ( $n=2$ ). Auf der Abszisse wurde die theoretische NO-Konzentration, wie sie bei vollständiger Bindung in Kammer 2 vorliegen würde, aufgetragen. Wurden z.B. in Kammer 1 in  $10 \text{ mL}$  HBSS+  $2 \mu\text{M}$  DEA/NO injiziert, ergab dies durch die Stöchiometrie von zwei mol NO pro mol DEA/NO, und dem Volumenunterschied zwischen den Kammern von  $10 \text{ mL}$  zu  $4 \text{ mL}$ , eine theoretische NO-Konzentration von  $10 \mu\text{M}$ . In **Abb. 13 c** befinden sich die Ergebnisse der bei diesen Versuchen angefallenen Proben an  $\text{Fe}(\text{DETC})_2$ -NO, die nach einer EPR-Messung (X-Band CW) und Vergleich mit dem Standard TEMPOL quantifiziert wurden ( $n=2$ ). Durch den Unterschied zwischen gemessener Menge an  $\text{Fe}(\text{DETC})_2$ -NO und theoretisch freigesetzter NO-Menge konnte für die EPR-Spektroskopie ebenfalls eine *Trapping*-Effizienz ermittelt werden. Die *Trapping*-Effizienz anhand der CLD-Signale wurde durch Formel 7 berechnet. Beide Effizienzen im Vergleich wurden in **Abb. 13 d** aufgetragen. Niedrige NO-Konzentrationen

ergaben die höchste Effizienz/Bindung von knapp über 80%. Bei höheren Konzentrationen sank diese leicht, was einerseits an einem ungünstigeren Donor zu Trap-Verhältnis liegen könnte oder daran, dass die NO-Menge aufgrund der geringen Halbwertszeit von DEA/NO zu schnell freigesetzt und nicht vollständig gebunden werden konnte.



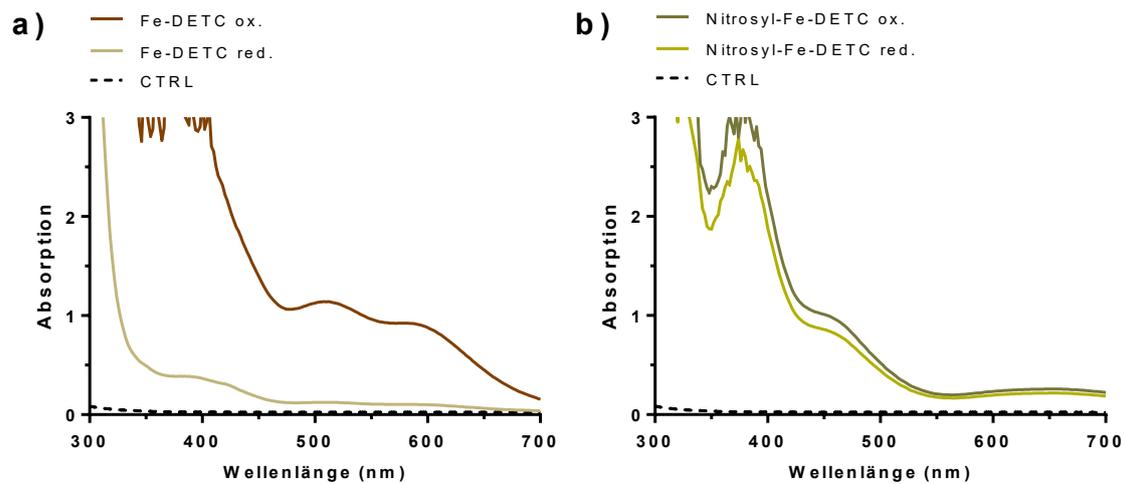
**Abbildung 13: Etablierung eines Zwei-Kammer-Systems zur Messung von freigesetztem Stickstoffmonoxid.**

Eine mit einem Inertgas durchströmte Zwei-Kammer-Apparatur wurde dafür verwendet, um die räumliche Trennung vom Ort der NO-Freisetzung und dem Ort des NO-Trapping zu gewährleisten und jeweils optimale Reaktionsbedingungen zu bestimmen. (a) Schematische Darstellung dieser Apparatur mit Beschriftung der einzelnen Kompartimente. In der (auf 37°C) temperierten Kammer 1 wurden Lösungen/Suspensionen injiziert, aus denen NO freigesetzt wurde. Ein Inertgas (N<sub>2</sub>, He oder Ar) durchströmte die Kammer von unten und trug das NO durch einen Kühler (4°C) zur (nicht temperierten) Kammer 2, wo optional Spin-Traps (oder eine Lösungsmittelkontrolle) vorgelegt wurden. Nicht gebundenes NO gelangte über den zweiten Kühler (4°C) in die nachgeschaltete Chemilumineszenzdetektion (CLD) und konnte dort detektiert/quantifiziert werden. Abbildung modifiziert nach [110]. Zur Bestimmung der Trapping-Effizienz von Fe(DETC)<sub>2</sub> wurden in Kammer 2 500 μM

dieses Traps in 4 mL Lösungsmittel (1:20 Reinstwasser und DMSO) vorgelegt. In Kammer 1 wurden unterschiedliche Konzentrationen an DEA/NO in 10 mL HBSS+ injiziert. **(b)** Integrierte CLD-Signale gegen die unterschiedlichen (theoretischen) NO-Mengen in An- und Abwesenheit von Fe(DETC)<sub>2</sub> in Kammer 2 (n=2). **(c)** Durch EPR-Spektroskopie (X-Band CW) quantifizierte Mengen an Fe(DETC)<sub>2</sub>-NO (im Vergleich mit dem Standard TEMPOL) (n=2). **(d)** Durch die vorherigen Signale konnten die Trapping-Effizienzen durch die beiden Methoden berechnet werden. Bei niedrigeren Konzentrationen war die Trapping-Effizienz mit knapp über 80% am größten. Bei höheren NO-Mengen sank diese leicht.

Die Bildung des Nitrosyl-Eisen-Komplexes, sowie dessen (ungewollte) Oxidation, konnten zu einem gewissen Grad visuell beobachtet werden. Nach Synthese von Fe(DETC)<sub>2</sub> wies die Lösung eine blassgelbe Färbung auf. Kam es zu einer Verunreinigung mit Sauerstoff, färbte sich diese dunkelbraun. Bei Gabe einer größeren Menge an NO hingegen, um z.B. die obere Grenze der Bindungsfähigkeit und die Stabilität des Traps zu untersuchen, intensivierte sich die Färbung ins gelblich-türkise. Diese Beobachtungen wurden deshalb durch Anfertigung von UV-Vis-Absorptionsspektren in einem Mikroplattenreader (300 nm bis 700 nm) näher untersucht. In **Abb. 14 a** wurden die Fe(DETC)<sub>2</sub>-Komplexe in reduzierter und in oxidierter Form (durch gezielte Begasung mit Raumluft) gemessen. Als Kontrolle diente das Lösungsmittel ohne Spin-Trap (CTRL).

Laut Literatur sind Absorptionsmaxima bei 342, 385 und 515 nm charakteristisch für sechsfach-koordinierte Fe<sup>3+</sup>-Dithiocarbamat-Komplexe [130]. Demnach würde der oxidierte Komplex drei Dithiocarbamat-Liganden aufweisen (Fe<sup>3+</sup>(DETC)<sub>3</sub>). Der Einfachheit halber und da diese Formen nicht unterschieden werden konnten, wurde die Bezeichnung der Komplexe unter Benutzung von „Fe-DETC“ etwas unspezifischer gewählt. Nach Vermischen mit Raumluft kam es zu einem enormen Anstieg der Absorption, wobei das Maximum bei 515 nm tatsächlich gut unterscheidbar war. In **Abb. 14 b** wurden die Nitrosyl-Fe-Komplexe gemessen, bei denen entweder der Kontakt zu Sauerstoff gezielt unterbunden wurde („Nitrosyl-Fe-DETC red.“) oder im Nachhinein eine gezielte Durchmischung mit Raumluft stattfand („Nitrosyl-Fe-DETC ox.“). Dabei war zu beobachten, dass der nachträgliche Kontakt mit Sauerstoff, sobald einmal der Nitrosyl-Fe-Komplex gebildet wurde, keine großen Auswirkungen mehr hatte und das prominente Maximum bei 515 nm fehlte. Bestätigt wurde dies durch EPR-Messungen dieser Komplexe, bei denen es bezüglich der Quantifizierung keine Unterschiede gab. Dies spricht für eine gute Stabilität von Fe(DETC)<sub>2</sub>-NO und dass es durch nachträglichen Kontakt mit Sauerstoff zu keinem Signalverlust kommt.



**Abbildung 14:** UV-Vis-Absorptionsspektren der Fe-DETC-Spezies.

Durch Messung der UV-Vis-Absorptionsspektren sollten Unterschiede hinsichtlich Oxidation der Fe-DETC-Spezies und Stabilität der Nitrosyl-Fe-DETC-Komplexe sichtbar gemacht werden. **(a)** Gemessen wurden eine Lösungsmittelkontrolle (CTRL), der reduzierte Fe-DETC-Komplex, sowie der Komplex, welcher zur Oxidation mit Raumluft durchmischt wurde (Fe-DETC ox.) ( $n=1$ ). Laut Literatur sind Maxima bei 342, 385 und 515 nm charakteristisch für sechsfach-koordinierte  $Fe^{3+}$ -Dithiocarbamat-Komplexe [130]. **(b)** Durch hohe Mengen an NO-Donor angefertigte Nitrosyl-Eisen-Komplexe, die unter Ausschluss von Sauerstoff (Nitrosyl-Fe-DETC red.) oder nach gezielter Durchmischung mit Raumluft gemessen wurden (Nitrosyl-Fe-DETC ox.) ( $n=1$ ). Die geringe Änderung des Spektrums nach Kontakt mit Sauerstoff wies auf eine hohe Stabilität des NO-Adduktes hin.

Apparative Schwierigkeiten mit der Detektionsmethode, sowie Kontaminationen im System verhinderten vorläufig weitere Versuche mit diesem Aufbau, die Etablierung und Optimierung eines Zwei-Kammer-Systems zur Messung von freigesetztem NO unter Verwendung von Spin-Traps konnte aber erfolgreich abgeschlossen werden. Diese Methode könnte zukünftig dafür verwendet werden, um die unter hypoxischen Bedingungen exportierte Menge von NO zu quantifizieren oder die Mechanismen der Reduktion von NO-Metaboliten zu NO zu untersuchen. Für die Bindung von NO unter normoxischen Bedingungen müssten andere Komplexe verwendet werden, denkbar wäre zum Beispiel Hämoglobin.

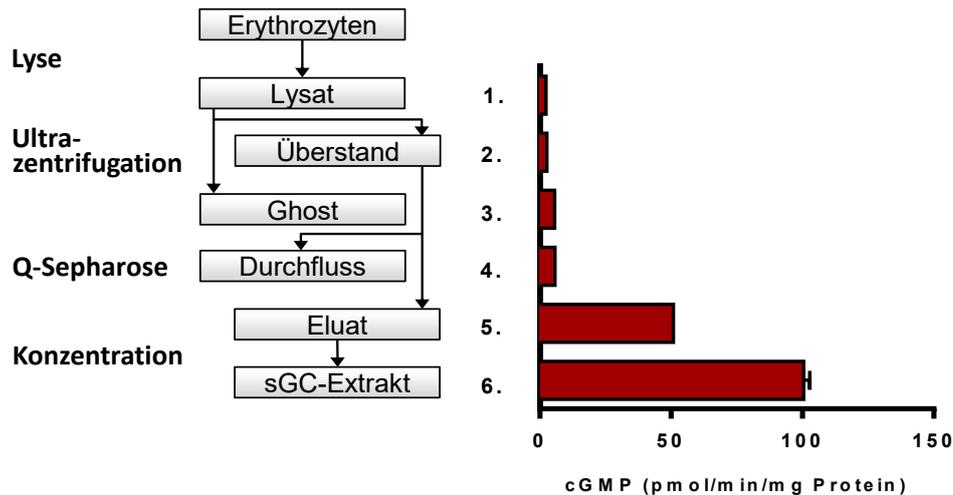
### 4.3. Intraerythrozytäres *Signaling* von Stickstoffmonoxid

Die dritte Zielsetzung dieser Studie bestand darin, eine mögliche intraerythrozytäre Signalkaskade zu identifizieren. Wenn das NO in Erythrozyten nicht (vollständig) exportiert wird, wäre das Vorliegen eines intraerythrozytären NO-Rezeptors, wie z.B. der löslichen Guanylatcyclase (sGC), denkbar.

#### 4.3.1. Identifikation einer intraerythrozytären Guanylatcyclase

Der Nachweis eines Proteins kann einerseits funktionell erfolgen, durch (pharmakologische) Stimulation und Messung der Reaktionsprodukte, idealerweise ergänzt durch vielfältige Kontrollen, wie z.B. murine Modelle mit genetischer Defizienz. Die zweite Möglichkeit ist ein qualitativer Nachweis, der direkt auf die Anwesenheit dieses Proteins zielt, z.B. durch Western Blot Analyse mit spezifischen Antikörpern oder massenspektrometrische Analyse und Identifikation von Peptidfragmenten, deren Primärstruktur mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit nur in diesem Protein vorliegt.

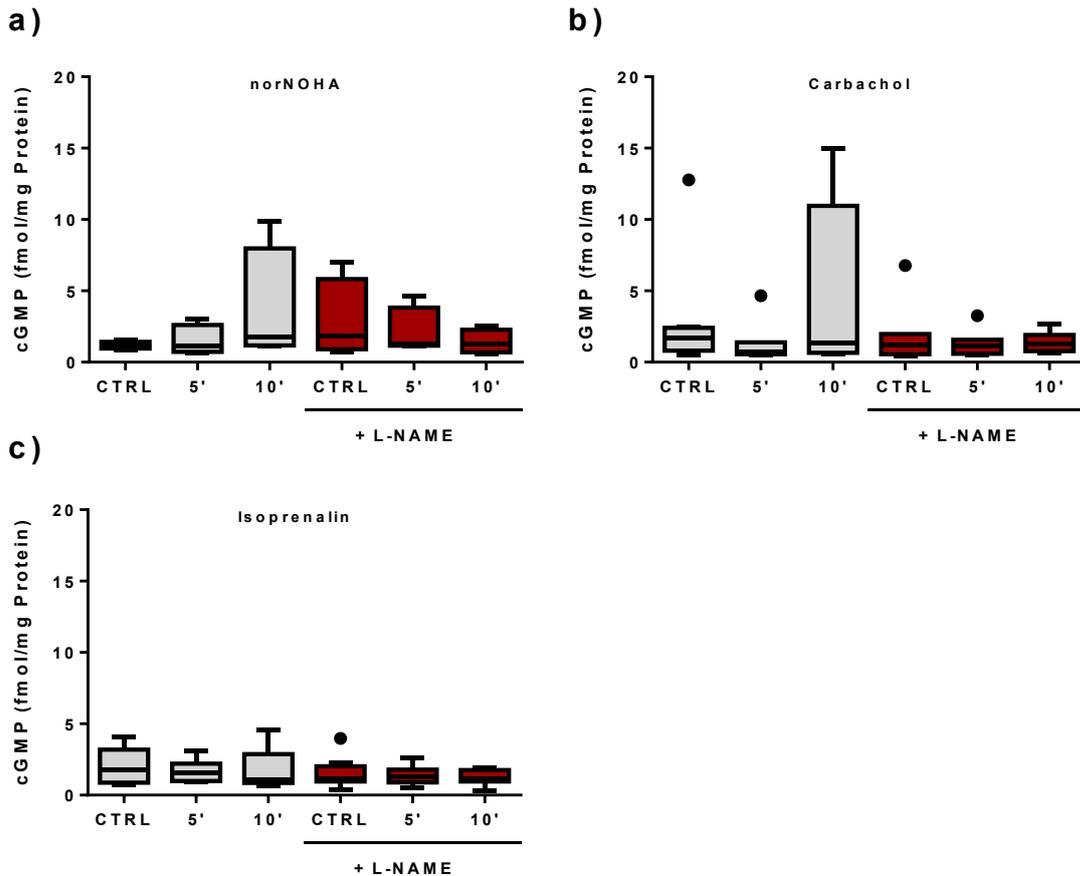
In Vorversuchen, die 2014 von Prof. Dr. Dr. Miriam M. Cortese-Krott durchgeführt wurden und auf denen diese Studie beruht, konnte bereits gezeigt werden, dass bei der Bestimmung der spezifischen sGC-Aktivität von gewaschenen und isolierten Erythrozyten nur eine geringe cGMP-Syntheseleistung detektiert werden konnte (in pmol/min/mg Protein). Durch Anwendung eines etablierten Extraktionsprozesses mittels Ionenaustauschchromatographie wurde gezeigt, dass Erythrozyten eine sGC enthalten und diese durch Extraktion aufkonzentriert werden kann (**Abb. 15**). Zwar scheint die Anwesenheit der großen Menge an Hämoglobin bestimmte Assays und Nachweise zu stören, dennoch sollten im Rahmen dieser Studie auch (pharmakologische) Stimulationen mit intakten Erythrozyten durchgeführt werden.



**Abbildung 15: Extraktion und partielle Aufreinigung einer intraerythrozytären sGC.**

Die Anwesenheit einer intraerythrozytären sGC wurde 2014 in Vorversuchen durch eine etablierte Extraktion und Aufreinigung mittels Ionenaustauschchromatographie (Q-Sepharose) und anschließender Bestimmung der spezifischen sGC-Aktivität nachgewiesen (in pmol/min/mg Protein). Während in dem Lysat nahezu keine Aktivität detektiert werden konnte, führte die Aufreinigung zur Entfernung des Hämoglobins und Konzentration der sGC. In dem sGC-Extrakt konnte eine spezifische Aktivität von 97 pmol/min/mg Protein bestimmt werden (repräsentative Daten von 5 unabhängigen Experimenten, modifiziert nach [131]).

Initial sollte durch Stimulation der eNOS eine intraerythrozytäre cGMP-Antwort erzeugt werden. Dafür wurden norNOHA (ein Inhibitor der Arginase), Carbachol (ein Struktur analogon des Acetylcholins) und Isoprenalin (ein Noradrenalin-Derivat) verwendet. 500  $\mu$ L isolierte und gewaschene Erythrozyten wurden für 10 min bei 37°C mit 100  $\mu$ M Sildenafil, einem PDE-Inhibitor und optional 3 mM L-NAME, einem NOS-Inhibitor, inkubiert. Anschließend wurden 1 mM norNOHA, 100  $\mu$ M Carbachol oder 10  $\mu$ M Isoprenalin hinzugegeben und unterschiedlich lange inkubiert. Nach einer Zentrifugation (800 x g, 10 min, 4°C) wurden die Erythrozytenpellets aufgeschlossen und die cGMP-Konzentration durch einen Radioimmunoassay (RIA) analysiert. Einige Ergebnisse dieser Versuche sind in **Abb. 16** zu sehen, wobei in diesen Fällen nach Zugabe des Stimulators 5 min und 10 min inkubiert wurde. Signifikante cGMP-Änderungen, weder durch Vergleich mit der unbehandelten Probe (CTRL), noch durch zusätzliche NOS-Inhibition, waren nicht zu sehen.



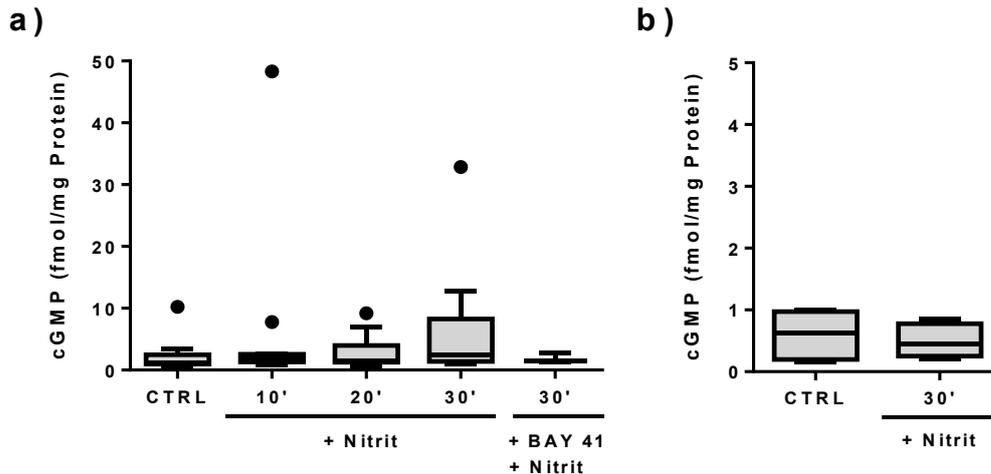
**Abbildung 16: eNOS-abhängige Stimulation der intraerythrozytären sGC.**

Verschiedene indirekte Stimulatoren der eNOS wurden getestet, um eine sGC-abhängige Erhöhung der cGMP-Konzentration zu bewirken. Isolierte und gewaschene Erythrozyten wurden für 10 min bei 37°C in Anwesenheit von 100 µM Sildenafil und optional 3 mM L-NAME inkubiert. Nach Zugabe von (a) 1 mM norNOHA, einem Inhibitor der Arginase (n=4, keine signifikanten Unterschiede), (b) 100 µM Carbachol, einem Strukturanalogon des Acetylcholins (n=7-8, keine signifikanten Unterschiede) oder (c) 10 µM Isoprenalin, einem Noradrenalin-Derivat (n=7-8, keine signifikanten Unterschiede) wurden die Proben für variable Zeiten (5 min oder 10 min) bei 37°C inkubiert und die cGMP-Konzentration bestimmt. Darstellung als Box-Plot (Tukey's). Ausreißer sind als schwarze Kreise dargestellt.

Zusätzlich zu den gezeigten Ergebnissen wurden auch abweichende Inkubationszeiten (bis zu 30 min) ausprobiert, sowie Proben einer medizinischen Doktorandin analysiert, die sich ebenfalls mit diesem Thema beschäftigte. Die dort benutzten Konzentrationen (50 µM bis 1 mM norNOHA), unterschiedlichen Inkubationszeiten (1 min bis 30 min) und zusätzlich verwendeten Stimulatoren, wie z.B. Forskolin (ein direkter Stimulator der Adenylatcyclase, 5-50 µM), konnten ebenfalls keine signifikanten cGMP-Erhöhungen provozieren. Durch Zugabe von 200 µM DEA/NO (einem Donor von NO) konnte aber sichergestellt werden, dass

die Erythrozyten intakt und die Messung einer cGMP-Änderung durch diesen Assay grundsätzlich möglich waren.

In vorherigen Versuchen konnte bereits gezeigt werden, dass unter Bedingungen verringerter Sauerstoffverfügbarkeit (Hypoxie oder Anoxie) eventuell Nitrit zu NO reduziert wird. Dies könnte eine weitere Möglichkeit zur indirekten Stimulation der intraerythrozytären sGC darstellen (unter Nichtbeachtung der eNOS). Deshalb wurden 500  $\mu$ L isolierte und gewaschene Erythrozyten für mindestens eine Stunde mit einem Inertgas ( $N_2$ , He oder Ar) begast/durchspült und 10 min vor Beginn des Versuches 100  $\mu$ M Sildenafil hinzugegeben. Während der gesamten Zeit des Versuches wurde die Suspension weiterhin begast. Nach Zugabe von 2 mM Nitrit wurde unterschiedlich lange bei Raumtemperatur inkubiert (10 min bis 30 min) und die Proben anschließend zentrifugiert (800 x g, 10 min, 4°C). Die so erhaltenen cGMP-Werte wiesen zum Vergleich mit der deoxygenierten, aber unbehandelten Kontrolle (CTRL) keine signifikanten Änderungen auf (n=9-12, **Abb. 17 a**). Um auch geringe Mengen von NO detektieren zu können, wurde in einem Versuch der sGC-Stimulator BAY 41-2272 hinzugegeben, der synergistisch wirkt und zusammen mit NO zu einer Potenzierung der cGMP-Antwort führen sollte, die aber nicht stattfand (n=3, **Abb. 17 a**). Auffallend war, dass durch die lange Begasung der Erythrozytensuspension nach der Zentrifugation immer ein gewisser Grad an Hämolyse (Hämoglobin im Überstand) zu sehen war. Sobald die Membran nicht mehr intakt ist, kann auch cGMP die Zelle verlassen und nicht mehr bei der Analyse des Erythrozytenpellet erfasst werden. Deshalb wurde ein Ansatz ausprobiert, bei dem die Erythrozyten nur für kurze Zeit durch Begasung deoxygeniert (15 min) und anschließend in eine Glovebox eingeschleust wurden, wo aufgrund der komplett anoxischen Atmosphäre von 98% Stickstoff und 2% Wasserstoff keine weitere Begasung nötig war. Dort wurden 500  $\mu$ L Erythrozyten mit 500  $\mu$ L HBSS+ verdünnt, 100  $\mu$ M Sildenafil hinzugegeben und für 10 min in einem Thermoschüttler bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 2 mM Nitrit wurden die Proben für weitere 30 min bei 37°C inkubiert und nach einer Zentrifugation (800 x g, 10 min, 4°C) die cGMP-Konzentration bestimmt. Im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle (CTRL), die ebenfalls für 30 min bei 37°C inkubiert wurde, waren keine signifikanten Änderungen zu sehen (**Abb. 17 b**).



**Abbildung 17: Hypoxieabhängige Nitrit-Reduktion und Stimulation der intraerythrozytären sGC.**

Eine mögliche hypoxieabhängige Nitrit-Reduktion zu NO sollte zur Stimulation der intraerythrozytären sGC genutzt werden. Darstellung als Box-Plot (Tukey's). Ausreißer sind als schwarze Kreise dargestellt. **(a)** Isolierte und gewaschene Erythrozyten wurden zur Deoxygenierung für mindestens eine Stunde mit einem Inertgas ( $N_2$ , He oder bevorzugt Ar) begast/durchspült und mit  $100 \mu M$  Sildenafil für 10 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Nach Zugabe von  $2 \text{ mM}$  Nitrit ( $n=9-12$ ) und unterschiedlich langer Inkubation bei RT (10-30 min) wurde die cGMP-Konzentration bestimmt. Bei der kombinierten Zugabe von  $2 \text{ mM}$  Nitrit und  $10 \mu M$  BAY 41-2272 ( $n=3$ ) wurden die Proben für 30 min bei RT inkubiert (keine signifikanten Unterschiede). **(b)** Isolierte und gewaschene Erythrozyten wurden lediglich für 15 min deoxygeniert und eine Glovebox mit vollständig anoxischer Atmosphäre eingeschleust. Die weitere Behandlung und Zugabe von  $2 \text{ mM}$  Nitrit erfolgte analog zur vorherigen Beschreibung. Die Inkubation geschah für 30 min bei  $37^\circ C$  in einem Thermoschüttler, die Lösungsmittelkontrolle (CTRL) wurde eben solange inkubiert ( $n=4$ ; keine signifikanten Unterschiede).

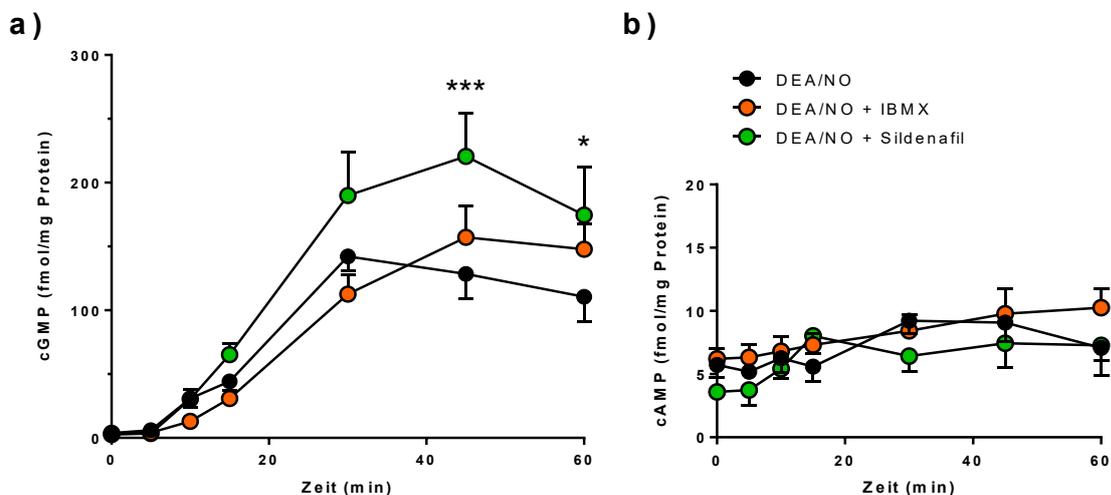
Die vorherigen Versuche zur indirekten Stimulation einer potentiell vorhandenen intraerythrozytären sGC führten zu keinem signifikanten cGMP-Anstieg. Daher wurde auf die Identifikation einer vorgeschalteten Signalkaskade (*upstream signaling*) bzw. möglicher physiologischer Quellen des NO verzichtet und die direkte Stimulation der sGC mit NO-Donoren durchgeführt, wie auch schon vorher geschehen, sowie unter Verwendung verschiedener PDE-Inhibitoren.

Isolierte und gewaschene Erythrozyten wurden in An- oder Abwesenheit verschiedener Inhibitoren ( $100 \mu M$  des PDE5-Inhibitors Sildenafil,  $300 \mu M$  des globalen PDE-Inhibitors IBMX oder einer Lösungsmittelkontrolle) für 10 min bei  $37^\circ C$  inkubiert und  $200 \mu M$  des NO-Donors DEA/NO (2 min Halbwertszeit bei pH 7.4 und  $37^\circ C$  [128, 132]) hinzugegeben. Nach unterschiedlichen Zeiten (5 min bis 60 min) bei  $37^\circ C$  wurde die Inkubation durch Zentrifugation ( $800 \times g$ , 10 min,  $4^\circ C$ ) gestoppt und die intraerythrozytäre cGMP-Konzentration

bestimmt. Aufgrund der begrenzten Anzahl verfügbarer Zentrifugen wurden die zuerst entnommenen Proben bis zur Zentrifugation in Eiswasser zwischengelagert.

In **Abb. 18 a** wurden die cGMP-Konzentrationen aufgetragen (n=6), wobei bei allen Behandlungen mit zunehmender Zeit ein signifikanter cGMP-Anstieg im Vergleich zu Zeitpunkt 0 min zu sehen war (RM 2-way ANOVA). Die Proben ohne PDE-Inhibition („DEA/NO“) waren dabei nicht signifikant unterschiedlich im Vergleich zur globalen PDE-Inhibition mit IBMX. Bei der Inhibition mit Sildenafil waren die letzten beiden Zeitpunkte (45 min und 60 min) signifikant höher als die unbehandelte Kontrolle (Vergleich mit Dunnett's).

Vier der sechs Replikate wurden dafür verwendet, um in diesen Proben auch die cAMP-Konzentration zu bestimmen (n=4, **Abb. 18 b**). Hier waren ebenfalls signifikante Anstiege mit der Zeit zu beobachten (RM 2-way ANOVA), deren Relevanz (weniger als 2-facher Anstieg) jedoch fragwürdig ist. Signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungen lagen nicht vor.



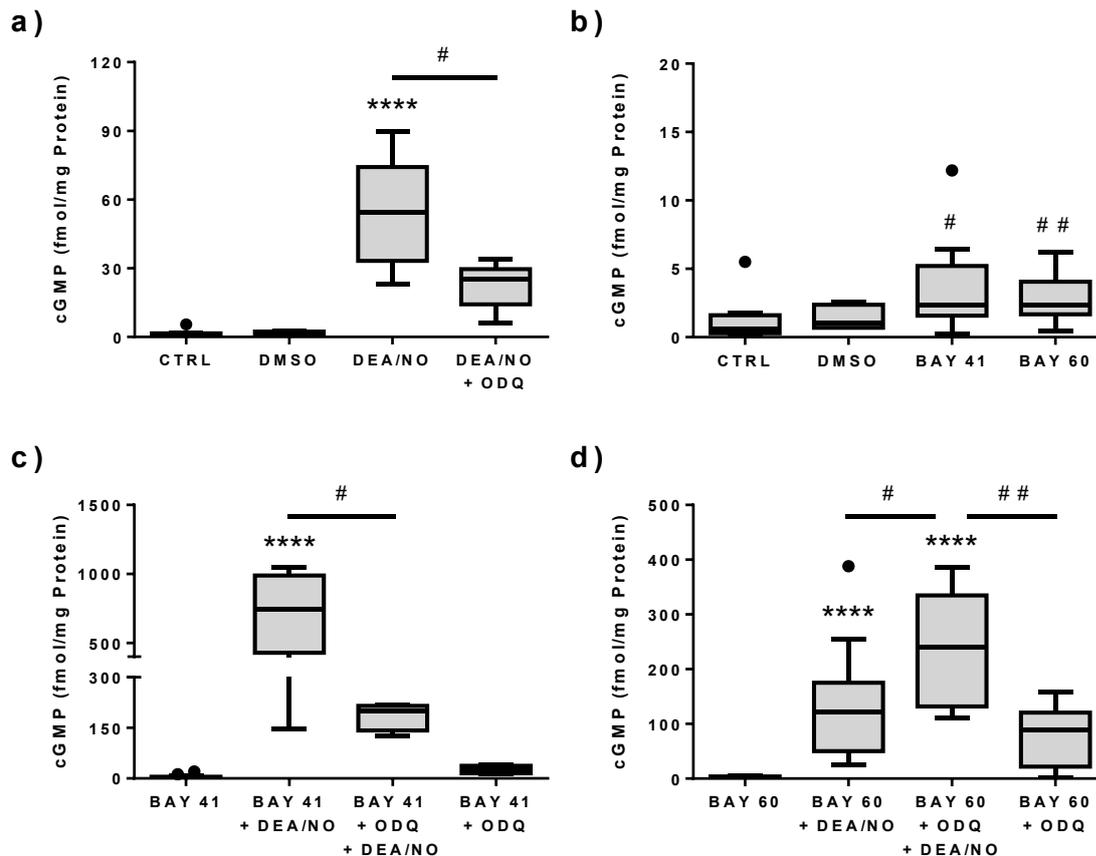
**Abbildung 18: Stimulation der intraerythrozytären sGC durch Stickstoffmonoxid und PDE-Inhibition.**

Isolierte und gewaschene Erythrozyten wurden in An- oder Abwesenheit eines PDE-Inhibitors (100  $\mu$ M Sildenafil, 300  $\mu$ M IBMX oder Lösungsmittelkontrolle) für 10 min bei 37°C inkubiert und 200  $\mu$ M des NO-Donors DEA/NO hinzugegeben. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurde die Inkubation gestoppt und die cGMP- oder cAMP-Konzentration bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte (MW)  $\pm$  Standardfehler (SEM). **(a)** cGMP-Konzentration in Abhängigkeit der inkubierten Zeit (n=6; RM 2-way ANOVA Zeit  $p < 0.0001$ , Behandlung nicht signifikant (n.s.), Dunnett's DEA/NO vs. DEA/NO + Sildenafil \*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ). **(b)** cAMP-Konzentration in Abhängigkeit der inkubierten Zeit (n=4; RM 2-way ANOVA Zeit  $p < 0.0001$ , Behandlung n.s.).

Neben Substanzen, die in Abhängigkeit des pH-Wertes und der Temperatur NO freisetzen, gibt es andere Möglichkeiten zur direkten pharmakologischen Stimulation der sGC, wie z.B. mit den sGC-Stimulatoren (u.a. BAY 41-2272), die an die reduzierte sGC binden und synergistisch mit NO wirken, oder den sGC-Aktivatoren (u.a. BAY 60-2770), die an die oxidierte sGC binden und so NO-unabhängig aktivieren. Im Folgenden wurden daher verschiedene Kombinationen dieser Pharmazeutika verwendet, um sGC-abhängige cGMP-Antworten zu erzeugen.

Isolierte und gewaschene Erythrozyten wurden für 10 min bei 37°C mit dem globalen PDE-Inhibitor IBMX (300 µM) und optional mit dem sGC-Inhibitor ODQ (5 µM) oder einer Lösungsmittelkontrolle inkubiert und 10 µM BAY 41-2272, 10 µM BAY 60-2770 und/oder 200 µM DEA/NO hinzugegeben. Nach weiteren 10 min bei 37°C wurde die Inkubation durch Zentrifugation (800 x g, 10 min, 4°C) beendet und die cGMP-Konzentration bestimmt.

Zwischen der unbehandelten Probe (CTRL, n=13) und der Lösungsmittelkontrolle (DMSO, n=6) gab es keine signifikanten Unterschiede, die Zugabe von DEA/NO (n=12) bewirkte wie zuvor gezeigt einen cGMP-Anstieg, der durch die zusätzliche Gabe des sGC-Inhibitors ODQ reduziert wurde (n=10) (**Abb. 19 a**). Die alleinige Zugabe des sGC-Stimulators BAY 41-2272 (n=14) oder des sGC-Aktivators BAY 60-6770 (n=14) zeigte jeweils eine Signifikanz gegenüber der CTRL (Gepaarter t-Test,  $p=0.0128$  bzw.  $p=0.0047$ ) (**Abb. 19 b**). Die kombinierte Gabe von BAY 41-2272 und DEA/NO führte zu einem synergistischen Effekt und somit der unter diesen Umständen maximalen Stimulation der sGC (n=10). Eine zusätzliche Gabe von ODQ reduzierte diese cGMP-Antwort deutlich (n=4) (**Abb. 19 c**). Bei der Kombination von BAY 60-2770 und ODQ (n=8) kam es im Vergleich zur alleinigen Gabe von BAY 60-2770 zu einer signifikant höheren cGMP-Antwort (Gepaarter t-Test,  $p=0.0074$ , nicht eingezeichnet). ODQ inhibiert die sGC normalerweise durch Oxidation bzw. macht sie NO-unempfindlicher. BAY 60-2770 bindet aber an diese oxidierte Form und aktiviert so NO-unabhängig die sGC. Die höhere Antwort in Anwesenheit von ODQ spricht daher dafür, dass zuvor wenig oxidierte sGC vorlag. Bei der Gabe von BAY 60-2770 und DEA/NO (n=14) wurden sowohl reduzierte, als auch oxidierte sGC stimuliert, was durch die additive Gabe von ODQ (n=8) erhöht werden konnte (**Abb. 19 d**).

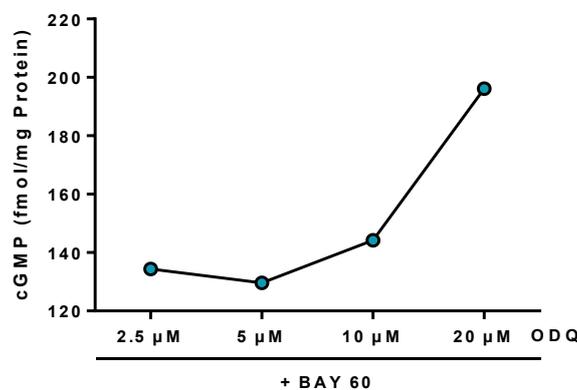


**Abbildung 19: Pharmakologische Stimulation der intraerythrozytären sGC.**

Isolierte und gewaschene Erythrozyten wurden für 10 min bei 37°C mit dem globalen PDE-Inhibitor IBMX (300 µM) und optional dem sGC-Inhibitor ODQ (5 µM) inkubiert und anschließend mit einem sGC-Stimulator (10 µM BAY 41-2272), einem sGC-Aktivator (10 µM 60-2770), 200 µM DEA/NO oder einer Lösungsmittelkontrolle versetzt. Nach weiteren 10 min bei 37°C wurde die Inkubation gestoppt und die cGMP-Konzentration bestimmt. Darstellung als Boxplot (Tukey's). Ausreißer sind als schwarze Kreise dargestellt. **(a)** CTRL (n=13) und DMSO (n=6) als Lösungsmittelkontrolle im Vergleich zur DEA/NO-Stimulation (n=12), sowie mit Zugabe des sGC-Inhibitors (n=10) (1-way ANOVA  $p < 0.0001$ , Dunnett's vs. CTRL \*\*\*\*  $p < 0.0001$ ; t-Test #  $p = 0.0232$ ). **(b)** Die Zugabe von BAY 41-2272 (n=14) und BAY 60-2770 (n=14) bewirkt nur eine leichte cGMP-Erhöhung (keine signifikanten Unterschiede in der Varianzanalyse, Gepaarter t-Test vs. CTRL #  $p = 0.0128$ , ##  $p = 0.0047$ ; der korrekte Test gegen DMSO führt jedoch zu keinem Ergebnis). **(c)** Die gleichzeitige Applikation von BAY 41-2272 und DEA/NO (n=10) führt zu einer maximalen Stimulation, die durch Zugabe von ODQ (n=4) signifikant verringert wird. BAY 41-2272 + ODQ im Vergleich (n=4) (1-way ANOVA  $p < 0.0001$ , Dunnett's vs. BAY 41 \*\*\*\*  $p < 0.0001$ ; t-Test #  $p = 0.0460$ ). **(d)** BAY 60-2770 aktiviert die oxidierte sGC und zeigt daher in Kombination mit ODQ (n=8) einen Effekt, der durch Zugabe von DEA/NO (n=8) erhöht wird. BAY 60-2770 + DEA/NO im Vergleich (n=14) (1-way ANOVA  $p < 0.0001$ , Dunnett's vs. BAY 60 \*\*\*\*  $p < 0.0001$ ; t-test #  $p = 0.0287$ , ##  $p = 0.0020$ ).

Überraschend war, dass die Zugabe des sGC-Inhibitors ODQ bei einer Stimulation durch DEA/NO oder der Kombination aus DEA/NO und BAY 41-2272 nicht zu einer vollständigen Inhibition und damit Rückgang der cGMP-Synthese auf das Niveau der Kontrolle führte

(Abb. 19 a, c). Ebenso bewirkte die zusätzliche Gabe von DEA/NO bei der Kombination aus BAY 60-2770 und ODQ eine weitere Erhöhung der cGMP-Konzentration (Abb. 19 d), obwohl die sGC durch das ODQ vollständig in der oxidierten Form mit einem  $\text{Fe}^{3+}$ -Häm hätte vorliegen sollen und die oxidierte Form nicht durch NO stimuliert werden kann. Die eingesetzte ODQ-Konzentration von  $5 \mu\text{M}$  wurde anhand früherer Studien gewählt, bei denen der  $\text{IC}_{50}$ -Wert (mittlere inhibitorische Konzentration) im nM-Bereich geschätzt und nur  $0.3\text{-}3 \mu\text{M}$  ODQ eingesetzt wurden [133-136]. Retrospektiv betrachtet könnte es aber sein, dass diese Konzentration nicht für die Anwendung in Erythrozyten reichte, da ODQ u.a. auch mit Hämoglobin wechselwirkt [137]. Zur Kontrolle dieser Vermutung wurden Ansätze mit BAY 60-2770 ( $10 \mu\text{M}$ ) durchgeführt, bei denen die eingesetzte ODQ-Konzentration variiert wurde ( $2.5\text{-}20 \mu\text{M}$ ) (Abb. 20). Dabei handelte es sich um eine einfache Durchführung ohne Replikate ( $n=1$ ), die Ergebnisse weisen jedoch trotzdem darauf hin, dass es bis zur maximal eingesetzten Konzentration von  $20 \mu\text{M}$  zu einer Steigerung der cGMP-Antwort kam und eine Konzentration von  $5 \mu\text{M}$  ODQ daher nicht für eine vollständige Inhibition/Oxidation der sGC ausreichte.



**Abbildung 20: Aktivierung der oxidierten sGC durch BAY 60-2770 und variierende ODQ-Konzentrationen.**

Isolierte und gewaschene Erythrozyten wurden analog zur pharmakologischen Stimulation der intraerythrozytären sGC für 10 min bei  $37^\circ\text{C}$  mit dem globalen PDE-Inhibitor IBMX ( $300 \mu\text{M}$ ) und variierenden Konzentrationen an ODQ ( $2.5\text{-}20 \mu\text{M}$ ) inkubiert, und anschließend mit  $10 \mu\text{M}$  BAY 60-2770 versetzt. Nach weiteren 10 min bei  $37^\circ\text{C}$  wurde die Inkubation gestoppt und die cGMP-Konzentration bestimmt ( $n=1$ ).

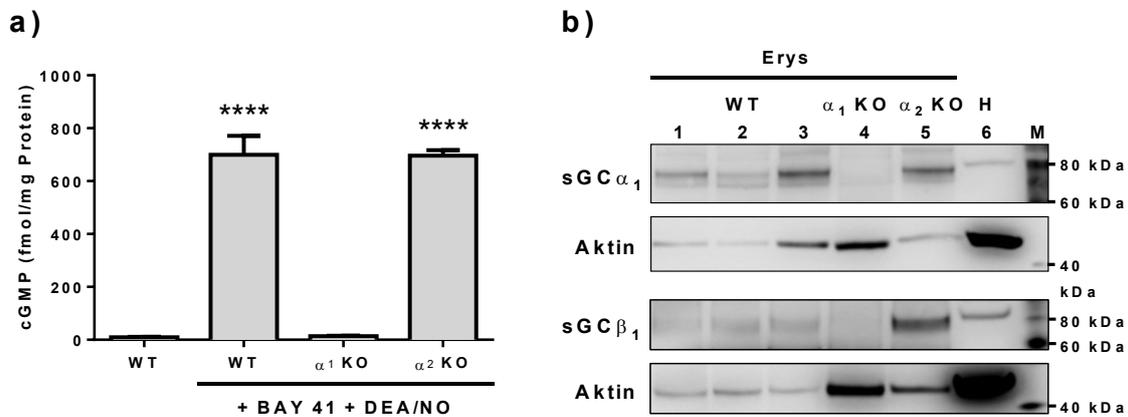
In den humanen Blutproben konnte die direkte Stimulation der intraerythrozytären sGC durch Anwendung mehrerer pharmakologischer Substanzen erfolgreich durchgeführt werden. Diese Experimente sollten ebenfalls für Blutproben aus Mäusen etabliert werden. Dadurch konnten neben gewöhnlichen Wildtypen (WT; C57BL/6J) auch Mäuse mit genetischer Defizienz

verwendet werden. Diese wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Doris Koesling (Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Ruhr-Universität Bochum) zur Verfügung gestellt und wiesen einen *knockout* (KO) bezüglich der  $\alpha_1$ - bzw.  $\alpha_2$ -Untereinheit der sGC auf, basierend auf einem C57BL/6J-Hintergrund. Eine Charakterisierung dieser Phänotypen fand bereits früher statt [25, 106], allerdings nicht mit Augenmerk auf die Erythrozyten. Im Rahmen dieser Studie sollte mit den murinen Modellen gezeigt werden, dass die gemessenen cGMP-Änderungen in Reaktion auf die verabreichten pharmakologischen Substanzen ausschließlich von der intraerythrozytären sGC herrühren können, wenn die cGMP-Antwort in den Mäusen mit entsprechender genetischer Defizienz vermindert ist oder vollständig ausbleibt, was gewissermaßen ein *Proof of concept* darstellt. Außerdem konnten so Vermutungen über die Isoformzusammensetzung der intraerythrozytären sGC angestellt werden.

Ein Unterschied in der Durchführung der Experimente lag darin, dass nach der Aufreinigung und Gewinnung von isolierten und gewaschenen Erythrozyten aus Mäusen nicht immer das nötige Volumen von 500  $\mu\text{L}$  zur Verfügung stand, um die Ansätze in der gleichen Versuchsanordnung wie mit humanen Erythrozyten durchführen zu können. Deshalb wurden die isolierten und gewaschenen Erythrozyten von je fünf Mäusen einer gleichen Linie gepoolt (vereint), und damit Versuche in Triplikaten ( $n=3$ ) durchgeführt. Nach 10 min Inkubation bei 37°C in Anwesenheit von 100  $\mu\text{M}$  Sildenafil wurde entweder eine Lösungsmittelkontrolle hinzugegeben, um die basalen cGMP-Werte zu messen, oder 10  $\mu\text{M}$  BAY 41-2272 und 200  $\mu\text{M}$  DEA/NO für eine maximale Stimulation der sGC. Nach weiteren 10 min bei 37°C wurde die Inkubation gestoppt (2,000 x g, 5 min, 4°C) und mit dem Erythrozytenpellet ein RIA durchgeführt. In **Abb. 21 a** ist zu sehen, dass bei der Kontrolle (WT CTRL) kein signifikanter cGMP-Anstieg zu beobachten war, die maximale sGC-Stimulation im WT mit einem Mittelwert von  $\approx 700$  fmol/mg Protein aber mit den humanen Proben vergleichbar war. Und während die cGMP-Antwort in den  $\alpha_2$  KO-Mäusen vollständig konserviert war, sah dies bei den  $\alpha_1$  KO-Mäusen anders aus. Dies könnte dafürsprechen, dass für die cGMP-Syntheseleistung in Erythrozyten lediglich eine  $\alpha_1\beta_1$ -sGC verantwortlich ist.

Die Western Blot Analysen in **Abb. 21 b** bestätigen die Anwesenheit einer  $\alpha_1$ - und einer  $\beta_1$ -Untereinheit in den Erythrozyten (775  $\mu\text{g}$ ) von Wildtypen und bestätigen die Annahme, dass die genetischen Modelle auch für die Erythrozyten zutreffen, da in den  $\alpha_1$  KO-Mäusen mit dem sGC- $\alpha_1$ -Antikörper keine Bande im Bereich von  $\approx 80$  kDa [138, 139] zu sehen war. Die  $\beta_1$ -Untereinheit sollte aufgrund der Primärstruktur eine Größe von  $\approx 70$  kDa aufweisen [140], wobei die entsprechende Bande hier geringfügig höher lag. Daneben wurde als Kontrolle das lysierte Herz (H, 10  $\mu\text{g}$ ) einer WT-Maus aufgetragen, in der die entsprechenden Banden

ebenfalls zu sehen waren, wenn auch leicht verschoben (möglicherweise aufgrund unterschiedlicher Puffer in den Proben).



**Abbildung 21: Anwendung muriner Modelle mit genetischer Defizienz der  $\alpha$ -Untereinheit der sGC.**

Stimulation der sGC und Western Blot Analysen in isolierten und gewaschenen Erythrozyten von Wildtyp-Mäusen (WT), sowie von Mäusen mit genetischer Defizienz bezüglich der  $\alpha_1$ - bzw.  $\alpha_2$ -Untereinheit der sGC ( $\alpha_1$  KO bzw.  $\alpha_2$  KO). **(a)** Die Erythrozyten wurden mit dem PDE-Inhibitor Sildenafil (100  $\mu$ M) für 10 min bei 37°C inkubiert und für eine maximale cGMP-Antwort 10  $\mu$ M BAY 41-2272 und 200  $\mu$ M DEA/NO hinzugegeben. Nach weiteren 10 min bei 37°C wurde die Inkubation gestoppt und die cGMP-Konzentration bestimmt (Darstellung als Mittelwert (MW)  $\pm$  Standardabweichung (SD));  $n=3$  aus gepoolten Proben von je 5 Mäusen, 1-way ANOVA  $p<0.0001$ , Dunnett's vs. WT CTRL \*\*\*\*  $p<0.0001$ ). **(b)** Lysierte Erythrozyten (775  $\mu$ g) zeigen in der Western Blot Analyse die Anwesenheit einer  $\beta_1$ -Untereinheit der sGC. Ebenso eine  $\alpha_1$ -Untereinheit, die in den WT-Mäusen vorhanden und in den  $\alpha_2$  KO-Mäusen konserviert, aber in den  $\alpha_1$  KO-Mäusen nicht sichtbar ist. Als Kontrolle wurde das lysierte Herz einer WT-Maus (H, 10  $\mu$ g) aufgetragen, bei der die entsprechenden Banden etwas höher liegen. M ist ein Größenmarker oder Komigrationsstandard, dessen Banden mit bekannter Größe mit den relativen Laufweiten der Proteine verglichen werden können. Die Western Blot Analysen wurden von Wiebke Lückstädt durchgeführt.

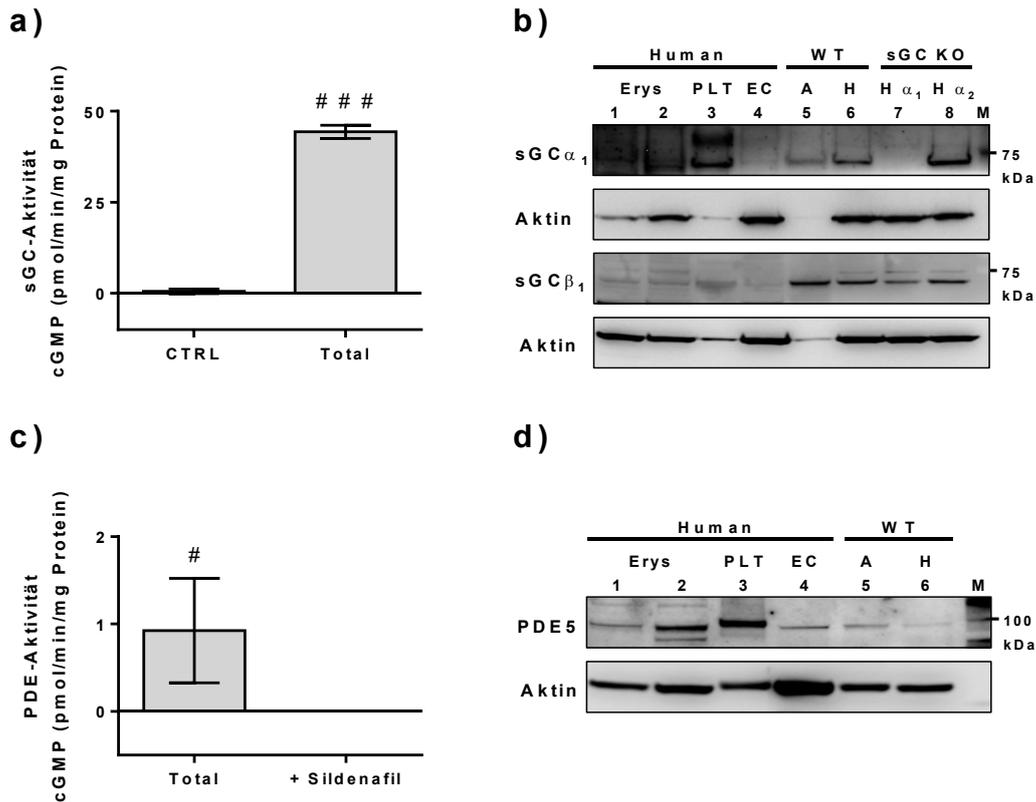
Die Anwesenheit einer großen Menge an Hämoglobin wird für die primäre Aufgabe der Erythrozyten, effektiv Sauerstoff zu binden und in die Peripherie zu transportieren, benötigt. Diese große Menge kann aber die Durchführung von Aktivitätsassays stören, u.a. indem es NO „wegfängt“ bzw. oxidiert, oder ein Problem für die Nachweisgrenzen bei Proteinidentifikationen darstellen. Deshalb wurde ein kommerzielles Produkt zur Entfernung von Hämoglobin getestet und für diese Zwecke entsprechend optimiert. Die so erhaltenen Hämoglobin-freien Erythrozytenkonzentrate sollten mit Ausnahme von Hämoglobin (und verminderter  $\alpha$ -Carboanhydrase) alle cytosolischen Proteine beinhalten [141, 142]. Zum Erhalt der Aktivitäten wurden alle verwendeten Puffer mit 2 mM Dithiothreitol (DTT) und Protease- und Phosphatase-Inhibitor versetzt, sowie alle Schritte der Aufreinigung bei 4°C durchgeführt.

Durch serielle Zentrifugation in Zentrifugeneinheiten mit 10 kDa MWCO (engl. *molecular weight cut-off*) wurden diese Eluate auf das gewünschte Volumen konzentriert oder ein anderer Puffer hinzugefügt.

Durch einen mit diesen Proben (aus drei Eluaten konzentriert) durchgeführten Assay konnte für die intraerythrozytäre sGC eine spezifische Aktivität von 44 pmol/min/mg Protein ermittelt werden, die ohne die Zugabe von BAY 41-2272 und DEA/NO nicht stattfand (n=3) (**Abb. 22 a**). Dieser Assay, der in Anwesenheit der Kofaktoren und Stimulatoren der sGC über einen Zeitraum von 30 min und repetitiver Gabe von DEA/NO durchgeführt wurde, sollte optimale Bedingungen für die maximale cGMP-Synthese dieses Proteins gewährleisten und so die Ermittlung der spez. Aktivität ermöglichen [112]. Die durch einen RIA gemessene cGMP-Konzentration wurde dafür entsprechenden der Inkubationszeit und der Proteinmenge normiert.

Außerdem durchgeführt wurde ein PDE-Aktivitätsassay (jeweils aus sechs Eluaten konzentriert), bei dem der Umsatz von radioaktivem  $^{32}\text{P}$ -cGMP beobachtet wurde. Die spezifische PDE-Aktivität hierfür wurde mit 0.92 pmol/min/mg Protein ermittelt (n=6) (**Abb. 22 c**). Dabei reichte die Zugabe von 100 nM Sildenafil bereits aus, um die PDE-Aktivität vollständig zu inhibieren, was für die Anwesenheit der PDE Isoform 5 sprechen würde [42]. Eine ebenfalls getestete höhere Sildenafil-Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  wurde deshalb nicht mit aufgetragen.

In **Abb. 22 b** und **d** befinden sich die mit diesen Konzentraten durchgeführten Western Blot Analysen, die analog zu den Western Blot Analysen der murinen Erythrozyten die Anwesenheit einer  $\alpha_1$ - und einer  $\beta_1$ -Untereinheit der sGC zeigen, jedoch in humanen Erythrozytenkonzentraten. Ebenso konnte die Anwesenheit einer PDE Isoform 5 gezeigt werden. Als Kontrollen wurden humane Plättchen (PLT, 5  $\mu\text{g}$ ), Endothelzellen aus Kultur (EC, 10  $\mu\text{g}$ ; auch bezeichnet als HUVECs: engl. *human endothelial umbilical vein cells*) oder Aorten und Herzen (A bzw. H, 10  $\mu\text{g}$ ) aus Wildtypen und den Mäusen defizient bezüglich der  $\alpha_1$ - bzw.  $\alpha_2$ -Untereinheit der sGC, aufgetragen.

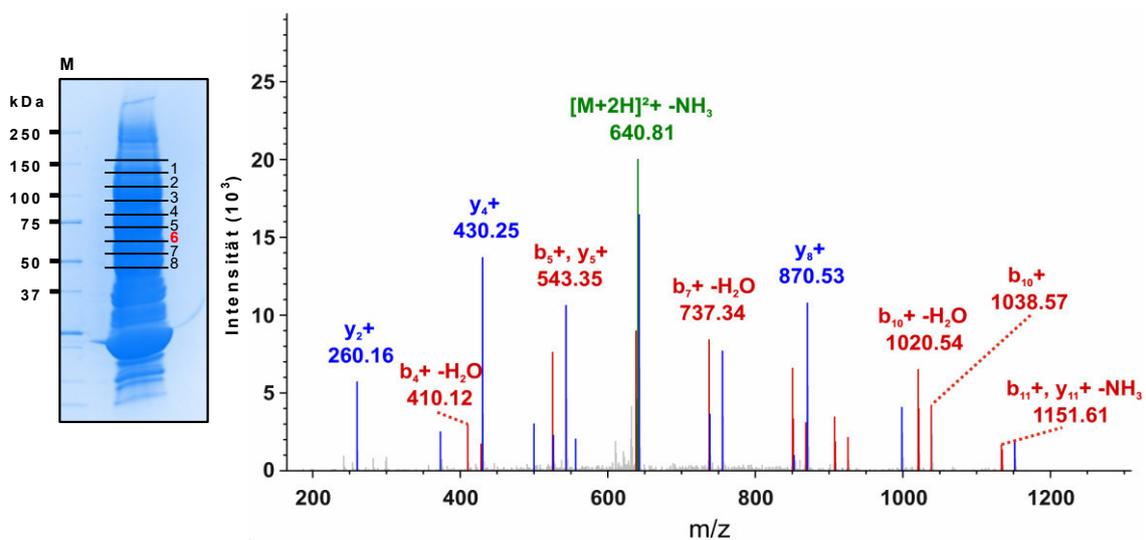


**Abbildung 22: Expression und Aktivität von sGC und PDE in Hämoglobin-freien Erythrozytenkonzentraten.**

Die Anfertigung von Hämoglobin-freien Erythrozytenkonzentraten wurde genutzt, um spezifische Aktivitäten zu ermitteln und Western Blot Analysen durchzuführen. **(a)** Die spezifische sGC-Aktivität in diesen Konzentraten beträgt 44 pmol/min/mg Protein, wobei ohne die Zugabe von BAY 41-2272 und DEA/NO (CTRL) keine signifikante cGMP-Synthese stattfand (Darstellung als Mittelwert (MW)  $\pm$  Standardabweichung (SD);  $n=3$ , Gepaarter t-Test ###  $p=0.007$ ). **(b)** Eine Western Blot Analyse bestätigt die Anwesenheit der sGC-Untereinheiten  $\alpha_1$  und  $\beta_1$  in diesen Konzentraten (50  $\mu$ g) und zeigt verschiedene Kontrollen wie Plättchen (PLT, 5  $\mu$ g), Endothelzellen aus Kultur (EC, 10  $\mu$ g), sowie Aorten (A, 10  $\mu$ g) und Herzen (H, 10  $\mu$ g) aus WT-Mäusen und  $\alpha_2$  bzw.  $\alpha_2$  KO-Mäusen. M ist ein Größenmarker oder Komigrationsstandard, dessen Banden mit bekannter Größe mit den relativen Laufweiten der Proteine verglichen werden können. **(c)** Die spezifische PDE-Aktivität in diesen Konzentraten wurde mit 0.92 pmol/min/mg Protein bestimmt und kann bereits durch die Zugabe von 100 nM Sildenafil vollständig inhibiert werden (Darstellung als Mittelwert (MW)  $\pm$  Standardabweichung (SD);  $n=6$ , Gepaarter t-Test #  $p=0.0129$ ). **(d)** Eine Western Blot Analyse bestätigt die Anwesenheit einer PDE5 und vergleicht diese mit Kontrollen wie Plättchen und Endothelzellen aus Kultur, sowie Aorten und Herzen von WT-Mäusen. Die Beschriftung ist analog zum oben gezeigten Western Blot. Die Western Blot Analysen wurden von Wiebke Lückstädt durchgeführt.

Im Rahmen einer Literaturrecherche über Proteomanalysen von Erythrozyten konnte kein Hinweis über eine frühere Identifikation der intraerythrozytären sGC gefunden werden. Deshalb wurde die hier optimierte Aufreinigung zur Gewinnung von Hämoglobin-freien Erythrozytenkonzentraten ebenfalls dafür verwendet, um in einer Kooperation mit dem Forschungsbereich Clinical Proteomics (unter der Leitung von Jun.-Prof. Dr. Barbara Sitek) des Medizinischen Proteom-Center (Ruhr-Universität Bochum) eine eigene zielgerichtete

massenspektrometrische Identifikation durchzuführen. Die dafür angefertigten Proben (aus sechs Eluaten konzentriert) wurden auf Trockeneis (festes CO<sub>2</sub>, -78°C) nach Bochum transportiert und dort von dem Arbeitsgruppenleiter Dr. Thilo Bracht untersucht. Durch eine Gelelektrophorese wurden die Proteine der Größe nach getrennt, einzelne Bereiche ausgeschnitten und mit der Serinprotease Trypsin verdaut. Die so erhaltenen Peptide konnten durch eine Kombination aus Flüssigkeitschromatographie und Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) analysiert werden.



**Abbildung 23:** Massenspektrometrische Proteinidentifikation einer  $\beta_1$ -sGC in Erythrozyten.

Die Proteine eines Hämoglobin-freien Erythrozytenkonzentrates wurden in einer Gelelektrophorese der Größe nach getrennt und bestimmte Bereiche (1-6) nach einem Verdau massenspektrometrisch analysiert. In der Gelbande Nummer 6 (rot markiert), welche einem ungefähren Massenbereich von  $\approx 65$ -75 kDa entspricht, wurden zwei individuelle Peptide der sGC-Untereinheit  $\beta_1$  gefunden (UniProt #Q02153). Ein dazugehöriges Massenspektrum mit den gemessenen Masse-zu-Ladungs-Verhältnissen ( $m/z$ ) und der relativen Intensität (counts in  $10^3$ ) ist auf der rechten Seite zu sehen, wobei das doppelt geladene Precursor-Ion grün, die b-Fragment-Ionen rot und die y-Fragment-Ionen blau gekennzeichnet sind.

In **Abb. 23** wird das Ergebnis dieser Analyse gezeigt. In der rot markierten Gelbande Nummer 6, die einem Massenbereich von  $\approx 65$ -75 kDa entspricht, wurden zwei individuelle Peptide der  $\beta_1$ -Untereinheit der sGC identifiziert (EGLQDIVIGIIK und INVSEYTYR). Durch die Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) konnten diese Peptide/Precursor-Ionen in einer kollisionsinduzierten Dissoziation fragmentiert werden. Dabei kommt es häufig zum Bruch an der Säureamid-/Peptidbindung, wo auch die enzymatische Hydrolyse stattfindet. Daneben gibt es zahlreiche andere Möglichkeiten, wie Fragmente entstehen können, was der Einfachheit

halber hier aber nicht detaillierter vertieft wird. Erwähnenswert ist jedoch, dass lediglich die geladenen Teilchen gemessen werden, da die neutralen Bruchstücke nicht den Detektor erreichen. Das N-terminal zur gebrochenen Peptidbindung entstandene Fragment-Ion wird b-Fragment und das C-terminal zur gebrochenen Peptidbindung entstandene Fragment-Ion wird y-Fragment genannt. In **Tab. 3** und **Tab. 4** wurden die theoretischen Fragmente dieser beiden Peptide aufgeführt, die entstehen können. Konnten diese Fragmente auch experimentell gefunden werden, wurden die entsprechenden Masse-zu-Ladungs-Verhältnisse (m/z) rot (für b-Fragment-Ionen) oder blau (für y-Fragment-Ionen) hervorgehoben.

**Tabelle 3: Fragment-Ionen für das Peptid EGLQDIVIGIHK der  $\beta_1$ -sGC.**

Aufgelistet sind die möglichen b-Fragment- (N-terminales Bruchstück) bzw. y-Fragment-Ionen (C-terminales Bruchstück) des Peptids EGLQDIVIGIHK mit den dazugehörigen theoretischen Masse-zu-Ladungs-Verhältnissen (m/z), sowie die experimentell gefundenen Fragment-Ionen, die durch farbige Markierung hervorgehoben sind (rot für b- und blau für y-Ionen). Precursor Ladung: +2, Monoisotopisches m/z: 649.39008 Da (+0.11 mmu/+0.17 ppm). Identifiziert mit Mascot, Ion Score: 67, Experimenteller Wert: 2.2E-007, mit 13/112 Treffern durch die Suchmaschine, bei einer Toleranz von 0.4 Da.

#1	b <sup>+</sup>	b <sup>2+</sup>	Seq.	y <sup>+</sup>	y <sup>2+</sup>	#2
1	130.04988	65.52858	E			12
2	187.07135	94.03931	G	1168.73005	584.86866	11
3	300.15542	150.58135	L	1111.70858	556.35793	10
4	428.21400	214.61064	Q	998.62451	499.81589	9
5	543.24095	272.12411	D	870.56593	435.78660	8
6	656.32502	328.66615	I	755.53898	378.27313	7
7	755.39344	378.20036	V	642.45491	321.73109	6
8	868.47751	434.74239	I	543.38649	272.19688	5
9	925.49898	463.25313	G	430.30242	215.65485	4
10	1038.58305	519.79516	I	373.28095	187.14411	3
11	1151.66712	576.33720	I	260.19688	130.60208	2
12			K	147.11281	74.06004	1

**Tabelle 4: Fragment-Ionen für das Peptid INVSEYTYR der  $\beta_1$ -sGC.**

Aufgelistet sind die möglichen b-Fragment- (N-terminales Bruchstück) bzw. y-Fragment-Ionen (C-terminales Bruchstück) des Peptids INVSEYTYR mit den dazugehörigen theoretischen Masse-zu-Ladungs-Verhältnissen (m/z), sowie die experimentell gefundenen Fragment-Ionen, die durch farbige Markierung hervorgehoben sind (rot für b- und blau für y-Ionen). Precursor Ladung: +2, Monoisotopisches m/z: 572.78754 Da (+2.23 mmu/+3.9 ppm). Identifiziert mit Mascot, Ion Score: 43, Experimenteller Wert: 1.9E-004, mit 8/84 Treffern durch die Suchmaschine, bei einer Toleranz von 0.4 Da.

#1	b <sup>+</sup>	b <sup>2+</sup>	Seq.	y <sup>+</sup>	y <sup>2+</sup>	#2
1	114.09135	57.54931	I			12
2	228.13428	114.57078	N	1031.47926	516.24327	11
3	327.20270	164.10499	V	917.43633	459.22180	10
4	414.23473	207.62100	S	818.36791	409.68759	9
5	543.27733	272.14230	E	731.33588	366.17158	8
6	706.34065	353.67396	Y	602.29328	301.65028	7
7	807.38833	404.19780	T	439.22996	220.11862	6
8	970.45165	485.72946	Y	338.18228	169.59478	5
9			R	175.11896	88.06312	4

#### 4.3.2. Aktivierbarkeit der intraerythrozytären sGC bei koronarer Herzkrankheit

Neben den Erythrozyten junger und verhältnismäßig gesunder Probanden wurden humane Blutproben einer Studie verwendet, bei der Patienten mit stabiler koronarer Herzkrankheit (KHK) untersucht wurden. Die Studie mit dem Titel „*Analysis of red cell eNOS regulation and signaling within red blood cells in patients with stable and unstable coronary artery disease*“ wurde von Prof. Dr. Malte Kelm und Prof. Dr. Dr. Miriam M. Cortese-Krott angemeldet. Bereits bekannt war, dass in KHK-Patienten die erythrozytäre eNOS-Aktivität verringert war [83], die Expression und Aktivität einer erythrozytären sGC war allerdings ungewiss und sollte im Rahmen dieser Studie untersucht werden. Die Einschlusskriterien wurden durch eine koronarangiographisch gesicherte koronare Herzkrankheit definiert, wobei in den letzten drei Monaten kein akutes Koronarsyndrom vorliegen sollte. Die Kontrollgruppe bestand aus Patienten gleichen Alters ohne klinisch apparente Atherosklerose.

In **Tab. 5** wurden die Patientendaten und klinischen Charakteristika dieser beiden Kollektive aufgeführt. Neben einer zufällig signifikant unterschiedlichen Größe wiesen die KHK-Patienten zum Zeitpunkt der Untersuchung verringerte Cholesterin- und LDL-Werte (*Low Density Lipoprotein*), eine höhere Zahl an Risikofaktoren (0-4 möglich) und mehr Packungsjahre auf (eine in der medizinischen Statistik anerkannte Beschreibung der Anzahl

regelmäßig konsumierter Zigaretten). Eine erhöhte Intima-Media-Dicke (IMT) wurde bei der Ultraschalluntersuchung der *A. carotis communis* festgestellt. Eine verringerte flussvermittelte Vasodilatation (FMD, engl. *flow-mediated dilation*), die mittels ultrahochauflösendem Dopplerultraschall ermittelt wurde, wies auf eine endotheliale Dysfunktion hin [107]. Diese Untersuchungen wurden primär von dem Arzt Dr. Georg Wolff durchgeführt.

**Tabelle 5: Patientendaten der Studie und klinische Charakteristika im Vergleich.**

Aufgeführt sind die klinischen Charakteristika von Patienten mit koronarer Herzkrankheit (KHK, n=20) und einem Kontrollkollektiv gleichen Alters („Gesund“, n=26). Die Daten sind angegeben als Mittelwert (MW)  $\pm$  Standardabweichung (SD). Für die statistische Analyse zwischen den beiden Gruppen wurde ein t-Test verwendet, wobei ein p-Wert  $< 0.05$  als statistisch signifikant vorausgesetzt wurde, n.s.: nicht signifikant; BMI: Body-Mass-Index, RR: Blutdruckmessung nach Riva-Rocci (sys: systolisch, dia: diastolisch), HF: Herzfrequenz, HbA<sub>1c</sub>: Glykiertes Hämoglobin, GFR: Glomeruläre Filtrationsrate nach der MDRD-Formel (Modification of diet in renal disease), LDL: Low Density Lipoprotein, HDL: High Density Lipoprotein, CRP: C-reaktives Protein, FMD: Flussvermittelte Vasodilatation (Flow-mediated dilation), GMD: Nitroglyzerinvermittelte Vasodilatation (GTN-mediated dilation), IMT: Intima-Media-Dicke, PWV: Pulswellengeschwindigkeit (Pulse wave velocity).

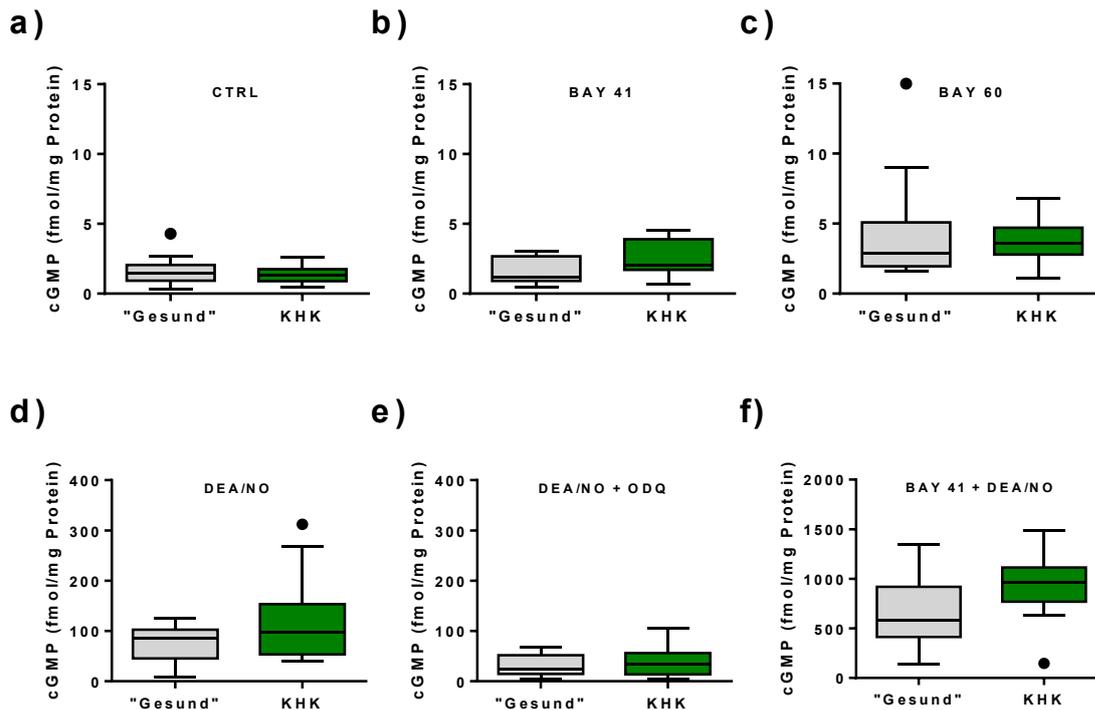
	„Gesund“ (n=26)	Stabile KHK (n=20)	p-Wert
Alter (Jahre)	54 $\pm$ 6	59 $\pm$ 10	n.s.
Männl. Geschlecht (%)	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0	n.s.
Gewicht (kg)	88 $\pm$ 9	82 $\pm$ 12	n.s.
Größe (cm)	<b>180 <math>\pm</math> 7</b>	<b>175 <math>\pm</math> 6</b>	<b>0.0035</b>
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	27.5 $\pm$ 3.3	26.8 $\pm$ 4.1	n.s.
RR <sub>sys</sub> (mmHg)	133 $\pm$ 9	131 $\pm$ 14	n.s.
RR <sub>dia</sub> (mmHg)	85 $\pm$ 10	79 $\pm$ 11	n.s.
HF (min <sup>-1</sup> )	68 $\pm$ 7	63 $\pm$ 9	n.s.
HbA <sub>1c</sub> (%)	5.4 $\pm$ 0.3	5.5 $\pm$ 0.4	n.s.
Kreatinin (mg/dL)	1.0 $\pm$ 0.2	1.0 $\pm$ 0.2	n.s.
GFR (MDRD; mL/min)	82 $\pm$ 17	79 $\pm$ 16	n.s.
Cholesterin (mg/dL)	<b>209 <math>\pm</math> 43</b>	<b>163 <math>\pm</math> 31</b>	<b>0.0002</b>
LDL (mg/dL)	<b>147 <math>\pm</math> 40</b>	<b>96 <math>\pm</math> 21</b>	<b>&lt; 0.0001</b>
HDL (mg/dL)	57 $\pm$ 14	53 $\pm$ 14	n.s.
CRP (mg/dL)	0.3 $\pm$ 0.2	0.3 $\pm$ 0.2	n.s.
Packungsjahre	<b>12 <math>\pm</math> 14</b>	<b>32 <math>\pm</math> 29</b>	<b>0.0035</b>
Anzahl Risikofaktoren	<b>1.2 <math>\pm</math> 0.9</b>	<b>3.3 <math>\pm</math> 0.9</b>	<b>&lt; 0.0001</b>
FMD (%)	<b>7.8 <math>\pm</math> 3.0</b>	<b>4.7 <math>\pm</math> 2.9</b>	<b>0.0009</b>

GMD (%)	11.6 ± 3.9	12.1 ± 5.1	n.s.
IMT (mm)	<b>0.58 ± 0.08</b>	<b>0.73 ± 0.16</b>	<b>0.0001</b>
PWV (m/s)	7.99 ± 1.19	9.90 ± 2.38	0.0009

Nach einer venösen Blutabnahme wurden isolierte und gewaschene Erythrozyten gewonnen, die zeitnah von medizinischen Doktoranden (v.a. Thirumakal Manokaran) nach dem Protokoll der pharmakologischen Stimulation der intraerythrozytären sGC behandelt wurden. Dafür wurden 500 µL Erythrozyten mit 300 µM IBMX und optional 5 µM ODQ für 10 min bei 37°C inkubiert und 10 µM BAY 41-2272, 10 µM BAY 60-2770 und/oder 200 µM DEA/NO hinzugegeben. Nach weiteren 10 min bei 37°C und einer Zentrifugation (800 x g, 10 min, 4°C) wurden die Erythrozytenpellets in flüssigem Stickstoff (-196°C) eingefroren und bis zur weiteren Analyse durch einen RIA bei -80°C gelagert.

Analog zur gezeigten pharmakologischen Stimulation der Erythrozyten junger und gesunder Probanden in **Abb. 19** lagen in den getrennt betrachteten Kollektiven dieser Studie nahezu die gleichen Trends und Signifikanzen vor. Zwischen der unbehandelten Kontrolle (CTRL) und der Lösungsmittelkontrolle (DMSO), die hier gleichermaßen für alle Proben durchgeführt wurden (CTRL: n=14, KHK: n=11-12), gab es keine Unterschiede. Die Zugabe von DEA/NO führte zu einer Erhöhung der cGMP-Konzentration, die durch zusätzliche Gabe des sGC-Inhibitors ODQ signifikant verringert war. Und die Kombination aus BAY 41-2272 und DEA/NO bewirkte auch hier eine maximale Aktivierung.

Von größerem Interesse waren jedoch Abweichungen bei den Werten des untersuchten Patientenkollektives (KHK) im Vergleich zur Kontrollgruppe („Gesund“). Eine vergleichende Auftragung zwischen den Kollektiven befindet sich in **Abb. 24**. Bei den dort aufgetragenen cGMP-Antworten waren für die unterschiedlichen Behandlungen der Erythrozyten keine signifikanten Unterschiede vorhanden. Dies deutet darauf hin, dass die bei den Patienten mit koronarer Herzkrankheit erfassten Änderungen bezüglich des Gesundheitszustandes, speziell die endotheliale Dysfunktion, scheinbar keinen Einfluss auf den Status bzw. die Aktivierbarkeit der intraerythrozytären sGC hatten und diese sGC somit weiterhin als mögliches pharmakologisches *Target* zur Verfügung steht.



**Abbildung 24: Aktivierbarkeit der intraerythrozytären sGC bei koronarer Herzkrankheit.**

Isolierte und gewaschene Erythrozyten von Patienten mit koronarer Herzkrankheit (KHK) und einem Kontrollkollektiv gleichen Alters („Gesund“) wurden für 10 min bei 37°C mit 300  $\mu$ M IBMX und optional 5  $\mu$ M ODQ inkubiert und anschließend mit 10  $\mu$ M BAY 41-2272, 10  $\mu$ M BAY 2770 und/oder 200  $\mu$ M DEA/NO oder einer Lösungsmittelkontrolle versetzt. Nach weiteren 10 min bei 37°C wurde die Inkubation gestoppt und die cGMP-Konzentration bestimmt. Darstellung als Boxplot (Tukey's; „Gesund“: n=12-14, KHK: n=11-12, keine signifikanten Unterschiede). Ausreißer sind als schwarze Kreise dargestellt. Gezeigt sind (a) die unbehandelten Proben (CTRL), sowie nach Zugabe von (b) 10  $\mu$ M BAY 41-2272, (c) 10  $\mu$ M BAY 60-2770, (d) 200  $\mu$ M DEA/NO, (e) 200  $\mu$ M DEA/NO + 5  $\mu$ M ODQ oder (f) 10  $\mu$ M BAY 41-2272 + 200  $\mu$ M DEA/NO.

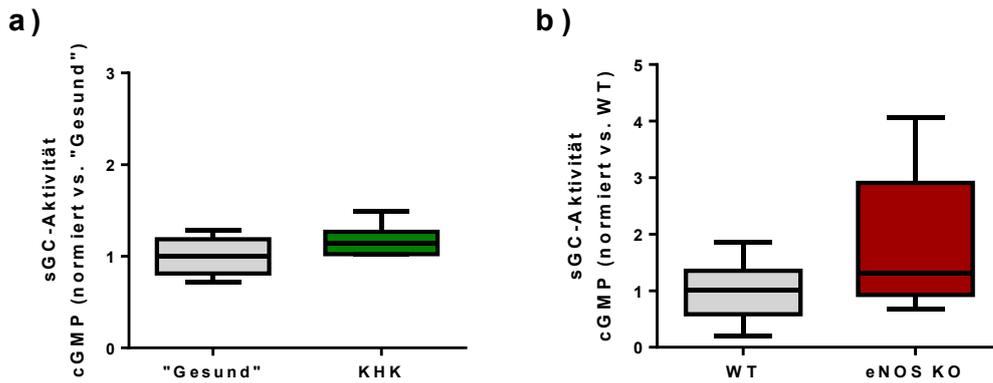
Der hier durchgeführte t-Test zum Vergleich der cGMP-Antwort nach Behandlung mit BAY 41-2272 und DEA/NO (Abb. 24 f) zeigte mit einem p-Wert von 0.0711, wie bereits beschrieben, keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Patientenkollektiven (Signifikanz ab  $p < 0.05$ ). In einer gruppierten Auftragsweise hingegen mit den Ergebnissen der unbehandelten Proben (CTRL) und den behandelten Proben (BAY 41-2272 + DEA/NO) nebeneinander (nicht gezeigt) zeigte der hierfür angebrachte 2-way ANOVA mit einem Mehrfachvergleich (engl. *multiple comparison*, Sidak's) bei den cGMP-Konzentrationen nach BAY 41-2272 und DEA/NO signifikante Unterschiede zwischen den Patientenkollektiven. Eine höhere Antwort bei dieser maximalen Stimulation könnte darauf hindeuten, dass die sGC-Aktivierbarkeit in Erythrozyten von Patienten mit koronarer Herzkrankheit nicht nur konserviert, sondern eventuell sogar kompensatorisch erhöht war. Ebenso dafürsprechen

würde, dass die alleinige Behandlung mit BAY 41-2272 nur in der KHK-Gruppe zu einer signifikanten Erhöhung führte (sowohl gegen CTRL, als auch DMSO) und nicht im gesunden Vergleichskollektiv. Die Behandlung mit BAY 60-2770 war hingegen in beiden Patientenkollektiven signifikant.

Diese Überlegung sollte durch einen sGC-Aktivitätsassay überprüft und untersucht werden, ob dort ebenfalls eine signifikante Erhöhung vorlag. Dafür wurden randomisiert unbehandelte Erythrozyten beider Patientenkollektive, die bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert wurden, ausgesucht und davon Hämoglobin-freie Erythrozytenkonzentrate angefertigt. Der damit durchgeführte Assay (pro Proband wurden je drei Eluate konzentriert,  $n=6$  pro Kollektiv), dessen spezifische Aktivitäten (pmol/min/mg Protein) auf die Ergebnisse des Kontrollkollektiv gleichen Alters („Gesund“) normiert wurden, bestätigte diese Annahme nicht, hier waren keine signifikanten Unterschiede vorhanden (**Abb. 25 a**).

Ebenfalls getestet wurde ein murines Modell, welches eine genetische Defizienz bezüglich der endothelialen NO-Synthase aufweist. Durch den globalen Verlust der eNOS zeigten diese Mäuse analog zum Patientenkollektiv der koronaren Herzkrankheit eine endotheliale Dysfunktion, gemessen anhand der verschlechterten flussvermittelten Vasodilatation (FMD) [118]. Da für die Anfertigung von Hämoglobin-freien Konzentraten nicht so viel Ausgangsmaterial benötigt wurde, mussten in diesem Fall keine murinen Proben gepoolt werden. Es konnte somit pro Maus eine individuelle Probe im Aktivitätsassay eingesetzt werden (aus je drei Eluaten konzentriert,  $n=6$  pro Mauslinie), um zu testen, ob in diesem Modell eine unterschiedliche Aktivierbarkeit der intraerythrozytären sGC vorlag. Auch die hier ermittelten spezifischen Aktivitäten wurden auf das Kontrollkollektiv (WT: Wildtyp) normiert und zeigten keine signifikanten Unterschiede (**Abb. 25 b**).

Es bleibt aber die Erkenntnis, dass die intraerythrozytäre sGC unabhängig von der enzymatischen NO-Syntheseleistung und somit der Funktion des Endothels direkt aktiviert werden kann.



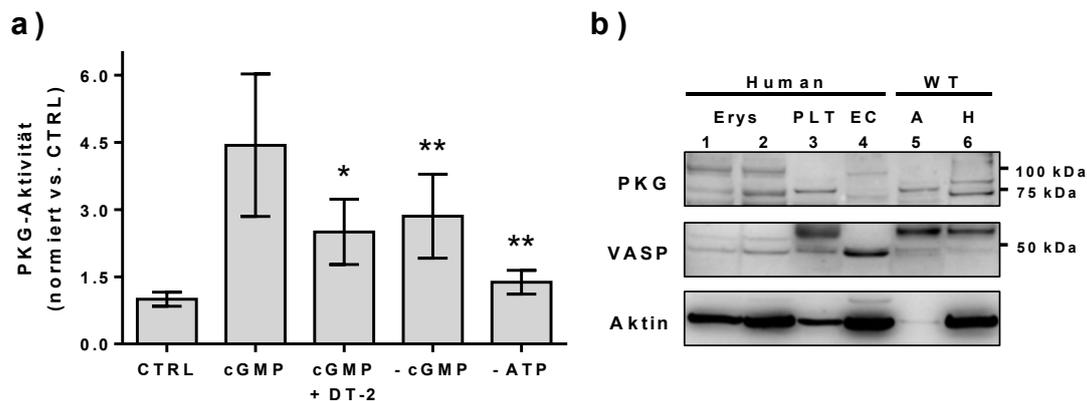
**Abbildung 25: Aktivitätsassay der sGC in humanen und murinen Erythrozytenextrakten im Vergleich.**

Humane und murine Hämoglobin-freie Erythrozytenkonzentrate wurden dafür verwendet, um damit Assays zur Bestimmung der spezifischen sGC-Aktivität durchzuführen. Darstellung als Box-Plot (Tukey's). (a) Die spezifische sGC-Aktivität in Erythrozytenextrakten von Patienten mit koronarer Herzkrankheit (KHK) zeigt bei einer Normierung auf die Ergebnisse des Kontrollkollektiv gleichen Alters („Gesund“) keine signifikanten Unterschiede ( $n=6$ ). (b) Ebenso scheint der globale Verlust der eNOS (eNOS KO) im murinen Modell nicht zu einer veränderten Menge bzw. Aktivierbarkeit an intraerythrozytärer sGC zu führen, gemessen an den spezifischen Aktivitäten, die auf die Ergebnisse der Wildtypen (WT) normiert sind und somit eine relative Änderung darstellen ( $n=6$ ).

#### 4.3.3. Downstream signaling

Die Expression und Aktivierbarkeit einer intraerythrozytären sGC konnte bisher durch die Verwendung mehrerer Methoden zweifelsfrei belegt werden, sowohl für humane, als auch murine Proben. Der Sinn dieses Enzyms in Erythrozyten und dessen mögliche Effekte stellen allerdings ebenso wichtige Fragen dar. Deshalb sollte die mögliche Anwesenheit einer Proteinkinase G (PKG oder auch cGK, engl. *cGMP-dependent protein kinase*) in Erythrozyten untersucht werden. Dies geschah durch Herstellung Hämoglobin-freier Erythrozytenkonzentrate und Verwendung des cGK Assay Kit, entsprechend den Herstellangaben. Bei diesem halbquantitativen Immunoassay wurde ein künstliches Substrat der PKG, welches an die Mikrotiterplatte gebunden ist, phosphoryliert und später indirekt nach Zugabe eines spezifischen Phospho-Antikörpers und Chemilumineszenzreaktion bei 450 nm gemessen. Die Ergebnisse wurden in **Abb. 26 a** aufgetragen. In Anwesenheit von  $Mg^{2+}$ , ATP und 100  $\mu M$  cGMP war eine relative PKG-Aktivität messbar, die 4.5-fach höher war als die Kontrolle ohne Erythrozyten (CTRL). Durch Zugabe des Inhibitor-Peptids DT-2 (20  $\mu M$ ) kam es zu einer signifikant niedrigeren Antwort. Ebenso wurde cGMP weggelassen, wodurch die PKG nicht mehr aktiviert wurde oder ATP, wodurch aufgrund des Substratmangels keine Aktivität der Kinase mehr stattfinden durfte.

Eine Western Blot Analyse in **Abb. 26 b** bestätigte die Anwesenheit einer PKG in Erythrozyten durch Anfärbung einer Bande bei  $\approx 75$  kDa. Ebenso bestätigt wurde die Anwesenheit eines Vasodilatator-stimulierten Phosphoproteins (VASP), einem Protein, das möglicherweise durch die PKG an Serin 239 phosphoryliert wird. Diese Bande war bei  $\approx 46$  kDa zu sehen. Als Kontrollen fanden Plättchen (PLT, 5  $\mu$ g), Endothelzellen aus Kultur (EC, 10  $\mu$ g), sowie Aorten und Herzen (A bzw. H, 10  $\mu$ g) aus Wildtyp-Mäusen Anwendung.

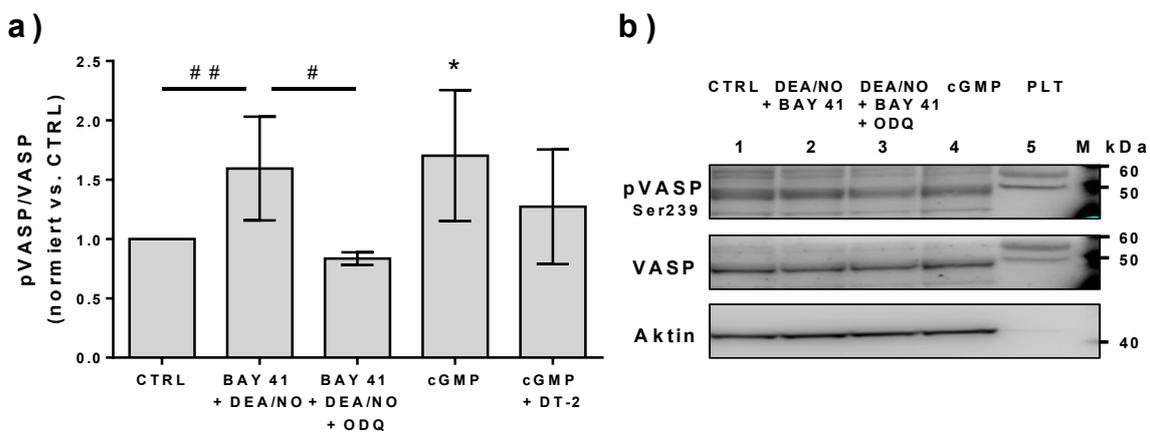


**Abbildung 26: Expression und Aktivität einer Proteinkinase G in Hämoglobin-freien Konzentraten.**

Humane Hämoglobin-freie Erythrozytenkonzentrate wurden verwendet, um die Expression und Aktivität einer Proteinkinase G (PKG) nachzuweisen. **(a)** In Anwesenheit von 100  $\mu$ M cGMP war eine PKG-Aktivität messbar, die signifikant ist zu der Kontrolle ohne Erythrozyten (CTRL). Eine zusätzliche Gabe des PKG-Inhibitors (20  $\mu$ M DT-2) verringerte diese Aktivität, ebenso wie der Entzug von cGMP oder ATP (Darstellung als Mittelwert (MW)  $\pm$  Standardabweichung (SD);  $n=6$ , RM 1-way ANOVA  $p=0.0031$ , Dunnett's vs. cGMP (ohne CTRL) \*  $p<0.05$ , \*\*  $p<0.01$ ). **(b)** Western Blot Analyse zum Nachweis einer PKG, sowie des Vasodilatator-stimulierten Phosphoproteins (VASP) in diesen Konzentraten. Daneben wurden verschiedene Kontrollen aufgetragen, wie Plättchen (PLT, 5  $\mu$ g), Endothelzellen aus Kultur (EC, 10  $\mu$ g), sowie Aorten (A, 10  $\mu$ g) und Herzen (H, 10  $\mu$ g) aus Wildtyp-Mäusen (WT). Der Größenmarker ist auf diesem Ausschnitt nicht sichtbar, die Lagen der entsprechenden Banden zum Vergleich mit den relativen Laufweiten der Proteine sind jedoch markiert und beschriftet. Die Western Blot Analysen wurden von Wiebke Lückstädt durchgeführt.

Für den Nachweis einer sGC- und PKG- abhängigen VASP-Phosphorylierung (an Ser239) wurden 500  $\mu$ L Erythrozyten für 10 min bei 37°C in An- oder Abwesenheit von 5  $\mu$ M ODQ oder 20  $\mu$ M DT-2 inkubiert und 10  $\mu$ M BAY 41-2272, 200  $\mu$ M DEA/NO oder 100  $\mu$ M 8-pCPT-cGMP (zellpermeables und hydrolysestabiles Analogon von cGMP) hinzugegeben. Nach weiteren 15 min bei 37°C und einer Zentrifugation (800 x g, 10 min, 4°C) wurden aus den Pellets Hämoglobin-freie Erythrozytenkonzentrate angefertigt und die VASP-Phosphorylierung mit Hilfe von Antikörpern in Western Blot Analysen bestimmt und durch

densitometrische Auswertung quantifiziert. Ein repräsentativer Western Blot davon wurde in **Abb. 27 b** aufgetragen, das Ergebnis der quantitativen Auswertung in **Abb. 27 a**. Dort war zu sehen, dass sowohl die Zugabe von BAY 41-2272 und DEA/NO, als auch die Zugabe von cGMP (n=6) zu einer signifikanten Erhöhung der VASP-Phosphorylierung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (CTRL, n=6) führte. Die zusätzliche Gabe von ODQ (n=3) verhinderte den Effekt von BAY 41-2272 und DEA/NO. Bei der Zugabe von DT-2 konnte aufgrund der geringen n-Zahl (n=2) keine Signifikanz ermittelt werden.



**Abbildung 27: Nachweis einer cGMP-abhängigen VASP-Phosphorylierung in Erythrozyten.**

Isolierte und gewaschene Erythrozyten wurden für 10 min bei 37°C in An- oder Abwesenheit von 5 µM ODQ oder 20 µM DT-2 inkubiert, und 10 µM BAY 41-2272, 200 µM DEA/NO, 100 µM 8-pCPT-cGMP oder eine Lösungsmittelkontrolle hinzugegeben. Nach weiteren 10 min bei 37°C wurde die Inkubation gestoppt und damit Hämoglobin-freie Erythrozytenkonzentrate angefertigt. Diese Proben wurden durch eine Gelelektrophorese der Größe nach getrennt, auf eine Membran übertragen und mit dem Phospho-VASP-Antikörper (gegen Phosphoserin an der Stelle 239), und dem VASP-Antikörper inkubiert. **(a)** Nach einer densitometrischen Auswertung wurde der Quotient aus den Intensitäten von Phospho-VASP und (totalem) VASP gebildet und gegen die Kontrolle (CTRL, n=6) normiert. BAY 41-2272 + DEA/NO und cGMP (n=6) zeigen einen signifikanten Anstieg, BAY 41-2272 + DEA/NO + ODQ (n=3) und cGMP + DT-2 (n=2) hingegen nicht (Darstellung als Mittelwert (MW) ± Standardabweichung (SD); 1-way ANOVA  $p=0.0120$ , Dunnett's vs. CTRL \*  $p<0.05$ ; t-Test #  $p=0.0230$ , ## $p=0.0076$ ). **(b)** Repräsentativer Western Blot dieser Quantifizierung. M ist ein Größenmarker oder Komigrationsstandard, dessen Banden mit bekannter Größe mit den relativen Laufweiten der Proteine verglichen werden können. Die Western Blot Analysen wurden von Wiebke Lückstädt durchgeführt.

Auffallend ist, dass trotz einer kombinierten Stimulation mit BAY 41-2272 und DEA/NO, was in anderen Versuchen zu einer ca. 500-fachen Erhöhung der cGMP-Konzentration führte, oder der Gabe von 100 µM hydrolysestabilem cGMP, eine im Mittel lediglich 1.5-fache Erhöhung der VASP-Phosphorylierung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle stattfand. In Plättchen

hingegen konnte durch die Gabe von 10  $\mu\text{M}$  Natrium-Nitroprussid (ebenfalls ein NO-Donor) eine fünffache VASP-Phosphorylierung an Ser239 bzw. doppelte VASP-Phosphorylierung an Ser157 gezeigt werden [143].

Dies spricht nicht gegen einen Effekt dieser VASP-Phosphorylierung, aber für die Schwierigkeit dieses Nachweises in Erythrozyten. Denn neben der Anfertigung von Hämoglobin-freien Konzentraten aus behandelten Erythrozyten und der nachfolgenden Western Blot Analyse wurden bereits andere, eigentlich für Plättchen optimierte Methoden ausprobiert, die trotz Positivkontrolle (mit Plättchen) scheinbar nicht für die Zwecke dieser Studie bzw. für die Anwendung mit Erythrozyten geeignet waren. Verwendet wurde z.B. das für die Durchflusszytometrie entwickelte VASPFix (Platelet Solutions Ltd, Nottingham, UK), das mit VASP-Antikörper beschichtete *beads* enthält, sowie Phospho-VASP-Antikörper (gegen Ser157), die aufgrund von Fluoreszenzfarbstoffen detektiert werden können. Separat bestellt wurde ein Phospho-VASP-Antikörper (FITC-konjugiert, gegen Ser239). Das ermittelte Verhältnis von VASP zu Phospho-VASP konnte so für verschiedene Behandlungen verglichen werden, ergab aber für beide Phosphorylierungsstellen keine Ergebnisse. Außerdem verwendet wurde das Kit CY-QUANT VASP/P2Y12 (BioCytex SARL, Marseille, Frankreich), welches einen enzymgekoppelten Immunadsorptionstest darstellte, dessen Mikrotiterplatte mit einem VASP-Antikörper beschichtet war. Nach Gabe eines Meerrettichperoxidase-gekoppelten Phospho-VASP-Antikörpers (gegen Ser239) konnte die Chemilumineszenzreaktion bei 450 nm gemessen werden. Der Einsatz von stimulierten und lysierten Erythrozyten oder Hämoglobin-freien Erythrozytenkonzentraten brachte allerdings kein Ergebnis in Bezug auf die VASP-Phosphorylierung.

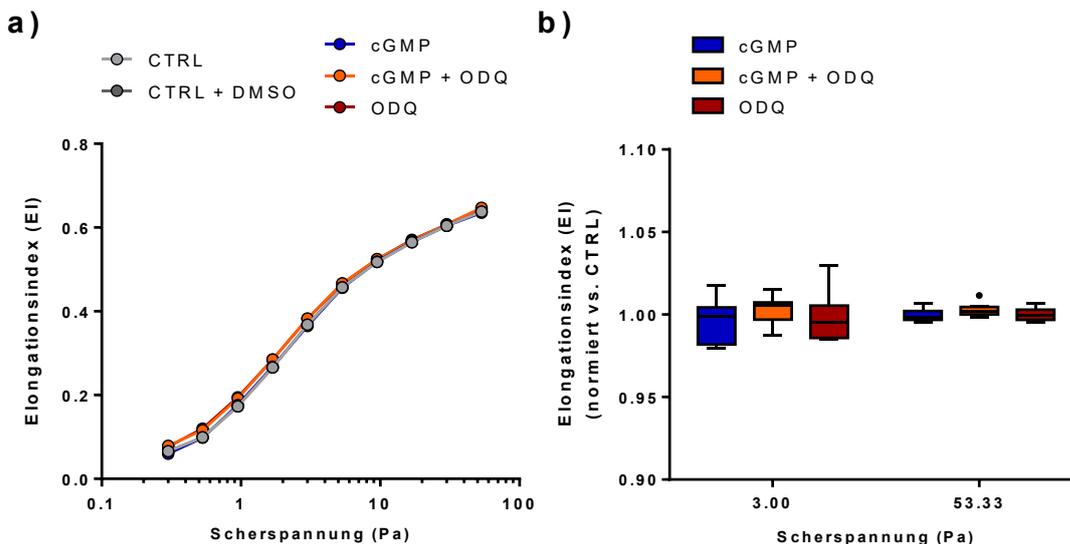
#### **4.3.4. Mögliche Effektorproteine oder physiologische Relevanz**

Die hier identifizierte intraerythrozytäre Signalkaskade umfasst neben der sGC auch die PKG und das VASP. Dieser Signalweg ist in Plättchen dafür bekannt, bei Aktivierung die Plättchenaggregation zu inhibieren [144]. Um zu untersuchen, ob dieser Signalweg in Erythrozyten ebenfalls einen Einfluss auf die Cytoskelett-Organisation nimmt, wurde die Verformbarkeit von Erythrozyten durch die Ektazytometrie untersucht. Dabei wurden die Erythrozyten in dem Zwischenraum eines Doppelzylinders, wovon der innere rotiert, mit einer definierten Scherspannung verformt und diese Verformung über einen Laser und Aufzeichnung des Diffraktionsmuster registriert. Der relative Wert wurde als Elongationsindex (EI)

bezeichnet und konnte zwischen den verschiedenen pharmakologischen Stimulationen verglichen werden.

Isolierte und gewaschene Erythrozyten wurden unmittelbar nach der Blutabnahme verwendet und für 10 min bei 37°C optional mit 5 µM ODQ oder einer Lösungsmittelkontrolle, und anschließend für 10 min bei 37°C mit oder ohne 100 µM 8-pCPT-cGMP inkubiert. Nach einer Zentrifugation (800 x g, 10 min, 4°C) wurden die Erythrozyten in einer Lösung definierter Viskosität (PVP-Lösung) verdünnt und ektazytometrisch analysiert.

Da es leichte tageweise Schwankungen der Messwerte gab, wurden nicht alle Rohdaten in einem Diagramm dargestellt. In **Abb. 28 a** wurde das exemplarische Diagramm einer Durchführung (n=1) aufgetragen. In **Abb. 28 b** konnten die Behandlungen verschiedener Durchführungen miteinander verglichen werden, indem die Effektstärke der Stimulation anhand einer Normierung auf die jeweils interne Kontrolle (CTRL oder CTRL + DMSO, abhängig vom verwendeten Lösungsmittel) durchgeführt wurde. Zwischen cGMP (n=10), cGMP und ODQ, sowie ODQ alleine (n=8) waren dabei für die ausgewählten Scherspannungen von 3.00 und 53.3 Pa keine signifikanten Unterschiede zu sehen, die auf eine cGMP-abhängige Änderung der Verformbarkeit schließen könnten.



**Abbildung 28: Ektazytometrische Untersuchung von Erythrozyten.**

Die Verformbarkeit von Erythrozyten sollte in Abhängigkeit einer pharmakologischen Stimulation durch die Ektazytometrie untersucht werden. Isolierte und gewaschene Erythrozyten wurden für 10 min bei 37°C in An- oder Abwesenheit von 5 µM ODQ inkubiert und optional 100 µM 8-pCPT-cGMP hinzugegeben. Nach weiteren 10 min Inkubation bei 37°C und einer Zentrifugation (800 x g, 10 min, 4°C) wurden das Erythrozytenpellet verdünnt und

gemessen. **(a)** Exemplarisches Diagramm der Ektazytometrie einer Durchführung ( $n=1$ ). **(b)** Normierung aller Datensätze gegen die jeweils angemessene interne Kontrolle und Auftragung als relative Änderungen für ausgewählte Scherspannungen (3.00 und 53.33 Pa). Darstellung als Boxplot (Tukey's; cGMP:  $n=10$ , cGMP + ODQ und ODQ:  $n=8$ , keine signifikanten Unterschiede). Ausreißer sind als schwarze Kreise dargestellt.

Eine weitere mögliche physiologische Relevanz konnte durch Verwendung des Langendorff-Modells untersucht werden. Dieses Modell des isoliert perfundierten Herzens untersucht *ex vivo* die kardiale Funktion (durch Messung der Kontraktion/der Drücke im linken Ventrikel), indem ein explantiertes Herz weiterhin mit Nährlösung retrograd perfundiert und durch einen Schrittmacher stimuliert wird. Dadurch können neuronale und humorale Einflüsse ausgeschlossen und die isolierte Wirkung auf ein Organ beobachtet werden. Prof. Dr. John Pernow und Dr. Jiangning Yang vom Karolinska-Institut (Universitätskrankenhaus Solna, Schweden) haben dieses Modell dabei um die Applikation von Erythrozyten in die Koronarien (Herzkranzgefäße) ergänzt und konnten 2013 zeigen, dass eine Inhibition der intraerythrozytären Arginase kardioprotektiv war und diese vermutlich (direkt oder indirekt) am Export von NO-Spezies beteiligt war [45]. Freundlicherweise wurden im Rahmen dieser Studie Langendorff-Experimente von der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. John Pernow durchgeführt und zur Verfügung gestellt, die sich an den hier verwendeten Behandlungsprotokollen orientierten und somit mit den bisher erworbenen Ergebnissen vergleichbar waren.

In **Abb. 29 a** befindet sich ein Behandlungsprotokoll, in dem die Stimulation der Erythrozyten und die zeitliche Durchführung der Ischämie und Reperfusion beschrieben werden. Nach Thorakotomie und Herzexplantation wurde Blut aus der offenen Brusthöhle entnommen und gewaschen. Die so isolierten Erythrozyten wurden mit 100  $\mu\text{M}$  Sildenafil und optional mit 5  $\mu\text{M}$  ODQ für 10 min bei 37°C inkubiert und anschließend 10  $\mu\text{M}$  BAY 41-2272 und 200  $\mu\text{M}$  DEA/NO hinzugegeben. Nach weiteren 10 min bei 37°C wurden die Erythrozyten erneut gewaschen, verdünnt und ein Teil zu Beginn der Ischämiephase in die Koronarien des murinen Herzens injiziert. Nach 40 min begann die 60-minütige Reperfusionsphase und die Aufzeichnung der Funktionsparameter. In **Abb. 29 b** wurde der maximal entwickelte linksventrikuläre Druck (LVDP, engl. *left ventricular developed pressure*) und in **Abb. 29 c** die linksventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit ( $dP/dt_{\text{max}}$ ) als Funktion der Reperfusionszeit aufgetragen. Dort kann beobachtet werden, dass bei der alleinigen Gabe von Erythrozyten ( $n=6$ ) initial nach der globalen Ischämie ein signifikanter Funktionsverlust zu sehen war und sich diese kardialen Funktionsparameter während der 60-minütigen Reperfusionsphase wieder auf 40% der ursprünglichen Werte (vor Ischämie) erholt haben. Wurden nun zuvor mit BAY

41-2272 und DEA/NO stimulierte Erythrozyten in die Koronarien injiziert, ergab sich eine signifikante Verbesserung gegenüber der Kontrolle und die Funktionsparameter erreichten einen Wert von 60% der ursprünglichen Leistung (n=6). Durch zusätzliche Gabe von ODQ wurde dieser Effekt wieder aufgehoben (n=5). Die alleinige Zugabe der pharmakologischen Substanzen ohne die Erythrozyten hatte hingegen keine protektiven Effekte zur Folge (n=6).

Dieser Versuch scheint somit ein erster Hinweis auf die kardioprotektive Funktion von Erythrozyten zu sein, die in Abhängigkeit von der intraerythrozytären sGC stattfindet.

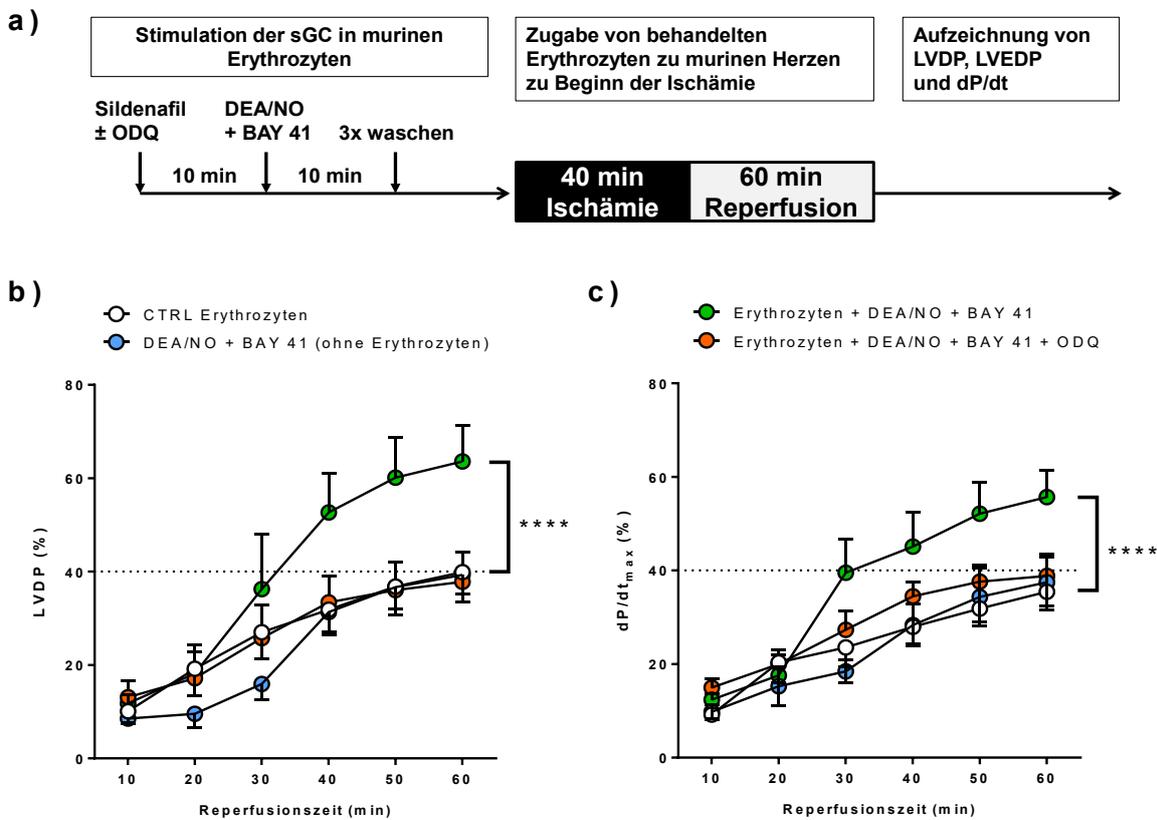


Abbildung 29: Einfluss von Erythrozyten auf die kardiale Funktion im isoliert perfundierten Herzen.

Im isoliert perfundierten Herzen nach Langendorff wurde ex vivo die kardiale Funktion untersucht. Durch Zugabe von vorher behandelten Erythrozyten in die Koronarien konnte so ein möglicher Einfluss des intraerythrozytären signalings auf das Outcome nach globaler Ischämie untersucht werden. (a) Durchgeführtes Behandlungsprotokoll. Die murinen isolierten und gewaschenen Erythrozyten wurden für 10 min bei 37°C mit 100 µM Sildenafil ± 5 µM ODQ inkubiert, 10 µM BAY 41-2272 und 200 µM DEA/NO hinzugegeben und weitere 10 min bei 37°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit HBSS+ wurden die (behandelten) Erythrozyten zu Beginn der 40-minütigen Ischämie in die Koronarien injiziert. Während der 60-minütigen Reperfusion wurde beobachtet, wie sich die Funktionsparameter des Herzens wieder erholen. (b) Maximal entwickelter linksventrikulärer Druck (LVDP, engl. left ventricular developed pressure) und (c) linksventrikuläre Druckerhöhungsgeschwindigkeit (dP/dt<sub>max</sub>) als Funktion der Reperfuionszeit (Darstellung als Mittelwert (MW) ± Standardfehler (SEM); n=5-6, 2-way ANOVA Zeit p<0.0001, Behandlung p<0.0001, Tukey's CTRL

---

*Erythrozyten vs. Erythrozyten + DEA/NO + BAY 41 \*\*\*\*  $p < 0.0001$ , Erythrozyten + DEA/NO + BAY 41 vs. Erythrozyten + DEA/NO + BAY 41 + ODQ \*  $p < 0.05$  ( $dP/dT_{max}$ ) bzw. \*\*  $p < 0.01$  (LVDP)). Das Experiment wurde durch Prof. Dr. John Pernow durchgeführt (unveröffentlichte Ergebnisse).*



## 5. Diskussion

Die Zielsetzung dieser Studie bestand darin, das „Schicksal“ von NO in Gefäßwand und Erythrozyten zu ermitteln. Dabei sollte untersucht werden, welche Aufgaben die Erythrozyten im systemischen NO-Metabolismus erfüllen, ob NO auch wieder exportiert werden kann und/oder intraerythrozytäre Zielproteine vorliegen. Des Weiteren sollte (anhand eines Mausmodells) untersucht werden, welche Auswirkungen eine chronische Adaption an oxidativen Stress auf die vaskuläre Funktion hat.

Basierend auf den durchgeführten Experimenten und dargestellten Ergebnisse dürfen drei Kernaussagen zusammenfassend dargestellt werden, die im Anschluss näher diskutiert werden:

1. Nach Bestätigung des oxidativen Status in diesem Mausmodell (Nrf2 KO) wurde eine kompensatorisch erhöhte Antwort des eNOS/sGC-Signalweges gefunden, die auf einer Überexpression der eNOS beruht und in einen im Vergleich zur Kontrolle systemisch erniedrigten Blutdruck resultierte.
2. Durch die Anfertigung von EPR-Spektren konnten die paramagnetischen Substanzen identifiziert werden, die in Erythrozyten nach Gabe von NO-Donoren oder Nitrit unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen zu sehen waren. Die direkte Zugabe von Nitrosyl-Eisen-Komplexen zu Erythrozyten führte zu einem vollständigen Signalverlust dieser Positivkontrolle, durch die Etablierung eines Zwei-Kammer-Systems konnte aber eine Methode entwickelt werden, mit der das unter hypoxischen Bedingungen freigesetzte NO akkumuliert und quantifiziert werden kann.
3. Die Anwesenheit einer intraerythrozytären sGC (in der Isoform GC-1) konnte durch die Anwendung zahlreicher Methoden zweifelsfrei belegt werden, ebenso wie die Anwesenheit der nachgeschalteten Proteine PKG und VASP. Während eine veränderte Erythrozytenverformbarkeit durch diese Signalkaskade nicht nachgewiesen werden konnte, ergaben sich erste Hinweise auf eine kardioprotektive Wirkung von Erythrozyten in Abhängigkeit dieser Signalkaskade (bei Ischämie/Reperfusion im isoliert perfundierten Herzen). Des Weiteren war die sGC-Aktivität in Erythrozyten von Patienten mit koronarer Herzkrankheit vollständig erhalten.

### 5.1. Vaskuläre Adaption an oxidativen Stress

Mit Bestimmung der GSH-Mengen in murinen Herzen und Aorten konnte die Mauslinie des Nrf2 KO als Modell für die chronische Adaption an oxidativen Stress bestätigt werden. Im Herzen wurden erniedrigte Mengen an freiem GSH und totalem GSH gefunden, während die Menge der oxidierten Spezies GSSG kompensatorisch erniedrigt und dessen Quotient GSH/GSSG deshalb erhöht war. In den Aorten waren die Mengen an freiem und totalem GSH ebenfalls erniedrigt, dafür aber die oxidierte Spezies GSSG erhöht, was mit Literaturdaten zur reduzierten Expression von antioxidativen Enzymen der Phase II, die auch an der Synthese von GSH beteiligt sind, übereinstimmt [99, 145].

Unerwartet war aber, dass die Mäuse bei einer Millar-Katherisierung der *A. carotis communis* einen im Vergleich zum Wildtypen systemisch erniedrigten Blutdruck aufwiesen (diastolisch und systolisch) [118]. Die Messungen der cGMP-Basalwerte in Herzen, Aorten und Erythrozyten zeigten keine signifikanten Unterschiede. Durch Applikation von Carbachol, einem Struktur analogon des Acetylcholins, zu Aortenringen wurde aber gezeigt, dass die kombinierte Antwort aus eNOS und sGC (gemessen als cGMP) erhöht war, was auf einer Überexpression der eNOS beruht, aber einer unveränderten eNOS-Phosphorylierung (an Ser1177) [118].

Nrf2 ist an der Regulation/Expression von antioxidativen und protektiven Enzymen beteiligt [97] und *in vitro*-Studien haben gezeigt, dass eine NO-abhängige Nrf2-Aktivierung zur endothelialen Protektion gegen oxidativen Stress beiträgt [146, 147]. Oxidativer Stress, z.B. ausgelöst durch einen Verlust von Nrf2, wird mit der Entwicklung von Atherosklerose und anderen pathologischen Entwicklungen in Verbindung gebracht [18]. Das dabei erhöhte Vorkommen von reaktiven Sauerstoffspezies, wie Superoxid-Anionen (bzw. Hyperoxid-Anionen), Hydroxyl-Radikalen, Wasserstoffperoxid und anderen, führt zu oxidativen Veränderungen in der Zelle (Proteinoxidation, Lipidperoxidation, Schädigung der DNA), wodurch auch die Gefäßwand Schaden nimmt und eine erhöhte Gefäßsteifigkeit die Folge ist (die damit in Verbindung stehende Pulswellengeschwindigkeit, die von der Gefäßsteifigkeit abhängt, ist ein direktes Maß für das kardiovaskuläre Risiko) [18]. Besonders bekannt ist die Wirkung auf die eNOS, bei der es unter oxidativem Stress zur Störung der Dimerisierung kommen kann und zur Entkopplung der enzymatischen Reduktion von Sauerstoff von der katalytischen Reaktion mit L-Arginin, was zur weiteren Bildung von Superoxid-Anionen und (mit NO) zu Peroxinitrit führt [18, 148], verstärkt durch eine (Nrf2-abhängige) verminderte Tetrahydrobiopterin-Synthese [148].

Aufgrund der Literatur wäre daher zu erwarten gewesen, dass ein Nrf2 KO (als Modell zur chronischen Adaption an oxidativen Stress) zu einer verminderten bzw. dysfunktionellen eNOS, einer verringerten NO-Bioverfügbarkeit (und somit verringerten cGMP-Antwort auf Carbachol) und dementsprechend einem Bluthochdruck führen sollte. Überraschenderweise war der systemische Blutdruck, wie bereits erwähnt, im Vergleich zum Wildtypen signifikant erniedrigt und die eNOS-abhängige Antwort auf Carbachol erhöht. Die eNOS-Abhängigkeit des Blutdruckes konnte durch Applikation eines NOS-Inhibitors gezeigt werden. Außerdem war die Scherkraft-abhängige flussvermittelte Vasodilatation (FMD) voll erhalten und eine erhöhte Gefäßsteifigkeit (gemessen als Pulswellengeschwindigkeit) nicht vorhanden [118].

In einigen Publikationen konnte dieser Zusammenhang bereits festgestellt werden, so wurde 2009 gezeigt, dass reaktive Sauerstoffspezies (durch Applikation von Wasserstoffperoxid) auch zu einer erhöhten eNOS-Expression und veränderter Aktivität (durch  $\text{Ca}^{2+}$ -*Signaling*) führen können [149]. Eine Änderung der eNOS-Phosphorylierung (an Ser1177) als Reaktion auf oxidativen Stress scheint dabei nicht vorzuliegen [150], und eine eNOS-Überexpression konnte auch in atherosklerotisch veränderten Gefäßen von bestimmten Mäusen gefunden werden [151]. Diese Korrelationen müssen nicht auf einer Kausalität beruhen, es wäre aber möglich, dass ein Nrf2 KO über eine Erhöhung der reaktiven Sauerstoffspezies direkt zu kompensatorischen Änderungen der eNOS-Expression führt, ohne dass eine (in diesem Stadium) sichtbare Entkopplung der eNOS und pathologische Veränderung der Gefäßwand stattfindet.

Bei der weiteren kardiovaskulären Charakterisierung wurde herausgefunden, dass die Nrf2 KO-Mäuse eine linksventrikuläre diastolische Dysfunktion (verschlechterte Füllung des linken Ventrikels) aufweisen, die mit einer kardialen Hypertrophie und verminderten Expression der sarkoplasmatischen Retikulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (SERCA2a) assoziiert ist [118]. Interessant dabei ist, dass diese Parameter unabhängig von der vaskulären Funktion und der systemischen Hämodynamik zu sein scheinen.

Da die linksventrikuläre Dysfunktion eine pathologische Veränderung ist, von der viele Patienten mit Herzinsuffizienz betroffen sind, könnte der Nrf2 KO ein nützlicher Modellorganismus sein, um die molekularen Mechanismen zu untersuchen, die an der Entwicklung einer linksventrikulären Dysfunktion, der veränderten  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase in Kardiomyozyten oder der kompensatorischen Reaktion des eNOS/sGC-Signalweges auf oxidativen Stress beteiligt sind [152].

## 5.2. Die Rolle von Erythrozyten im systemischen NO-Metabolismus

Durch die EPR-Spektroskopie konnten die paramagnetischen Substanzen identifiziert und anhand der Literatur zugeordnet werden, welche unter basalen Bedingungen im Vollblut und Erythrozyten unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen vorhanden sind. Nach Zugabe von NO-Donoren (Sper/NO, DEA/NO) und Nitrit unter diesen Bedingungen konnte dann beobachtet werden, wie sich die entsprechenden Spezies ändern. Wie erwartet konnte die Bildung von HbNO nach NO-Gabe primär unter hypoxischen Bedingungen beobachtet werden, während unter normoxischen Bedingungen bevorzugt metHb entstand. Eine HbNO-Bildung konnte ebenso unter hypoxischen Bedingungen nach Nitrit-Gabe beobachtet werden, was für eine hypoxieabhängige Reduktion von Nitrit zu NO spricht.

Der Export von NO aus Erythrozyten sollte im nächsten Schritt eigentlich durch die Bildung von Nitrosyl-Eisen-Komplexen quantifiziert werden (da NO für die direkte Detektion zu kurzlebig ist), die Zugabe von diesen NO-Addukten zu Erythrozyten als Positivkontrolle führte allerdings zum (fast) vollständigen Signalverlust, der auch mit Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> nicht wiederhergestellt werden konnte. Daher wurde ein Zwei-Kammer-System etabliert, bei dem durch räumliche Trennung vom Ort der NO-Produktion und dem Ort des NO-*Trapping* die Versuchsbedingungen optimiert werden konnten. Mit Hilfe von NO-Donoren (DEA/NO) wurde gezeigt, dass bei Verwendung von Fe(DETC)<sub>2</sub> als Spin-Trap eine zufriedenstellende *Trapping*-Effizienz vorhanden ist und exportiertes NO unter hypoxischen Bedingungen über einen gewissen Zeitraum akkumuliert werden kann.

Die generelle Frage nach der Beteiligung von Erythrozyten am NO-Metabolismus ist nicht trivial, denn bisher wurde davon ausgegangen, dass Erythrozyten lediglich die NO-Bioverfügbarkeit senken, weshalb sie auch als „*sink of NO*“ bezeichnet wurden. Die Reaktion von (oxygeniertem) Hämoglobin mit NO unter Bildung von Methämoglobin und Nitrat geschieht dabei sehr schnell ( $\approx 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) [61, 62]:



Je nach Reaktion kann NO in Metaboliten wie Nitrosothiole (RSNO), Nitrosamine (RNNO), Nitrit und andere überführt werden, die ursprünglich als inert angesehen wurden. Erst mit Entdeckung der „hypoxischen Vasodilatation“ konnte diese Sichtweise geändert werden. Dabei wurde beobachtet, dass eine NO- bzw. Nitrit-abhängige Vasorelaxation von Gefäßen unter hypoxischen Bedingungen nur in Anwesenheit von Erythrozyten stattfindet [67, 70, 76]. Das heißt, dass Erythrozyten zwar an der Bildung und Transport von NO-Metaboliten beteiligt sind, diese unter bestimmten Umständen (wie Hypoxie) aber auch wieder reduziert werden können.

Als mögliche Mechanismen für die Reduktion von Nitrit wurde u.a. die Beteiligung von Xanthinoxidase [76], Carboanhydrasen [79] und deoxygeniertem Hämoglobin (deoxyHb) hypothetisiert [70, 78], die auch durch eine geringe Sauerstoffsättigung begünstigt werden. In einer detaillierten Studie von Liu *et al.* in *Journal of Biological Chemistry* konnte 2015 gezeigt werden, dass eine NO-Produktion durch die Xanthinoxidase vernachlässigbar gering ist (ohne die Zugabe von exogenem Enzym) und eine Reduktaseaktivität der Carboanhydrasen durch physiologische CO<sub>2</sub>-Konzentrationen inhibiert wird [62]. Zur Untersuchung der Relevanz einer Nitrit-Reduktion durch deoxyHb wurde ebenfalls eine EPR-Studie durchgeführt, bei der die Bildung von HbNO (u.a. im zellfreien Hämoglobin im Überstand) verfolgt wurde [62]. Diese Ergebnisse sind inhaltlich mit den hier erzielten Ergebnissen vereinbar, da im Rahmen dieser Studie auch eine Nitrit-abhängige HbNO-Bildung unter hypoxischen Bedingungen beobachtet werden konnte. Das spricht für deoxyHb als wichtigste Nitritreduktase unter physiologischen Bedingungen und bestätigt die Wichtigkeit dieser Fragestellung.

Einzig zu hinterfragen ist die Durchführung der Experimente von Liu *et al.*, denn HbNO im Überstand könnte auch durch einen gewissen Grad an Hämolyse entstanden sein, was nicht vom zugegebenen Hämoglobin zu unterscheiden ist. Ein spezifischer Nachweis wäre daher zu begrüßen, so wie eine Akkumulation von NO durch Spin-Traps in einem zweiten Kompartiment und anschließender EPR-Messung, wie sie hier geschehen ist.

Die Frage nach dem Export von NO aus Erythrozyten ist für dessen Funktion nicht unerheblich und wird in der Literatur deshalb kontrovers diskutiert. Erst 2016 wurde eine Studie veröffentlicht, die diesen Export anzweifelt und primär mit Durchflusszytometrie (FACS) und Analyse der VASP-Phosphorylierung (an Ser239) in Plättchen belegen wollte, dass die sGC-Signalkaskade und somit inhibierte Plättchenaggregation nicht durch Erythrozyten (und dessen exportiertes NO) bewirkt wird [81], was durch den Autor auch in anderen Kommentaren vertreten wird [153, 154]. Dagegen spricht aber, dass unterschiedliche und unabhängige Arbeitsgruppen seit Jahren *in vitro*- und *in vivo*-Studien veröffentlichen, die positive Ergebnisse für die Interaktion von Erythrozyten und Plättchen zeigen und für Nitrit als Mediator sprechen [155-161], auch wenn dabei häufig wenig mechanistische Erklärungen geliefert werden.

Mechanistische Erklärungen für den Export von NO müssen beinhalten, wie NO nach intraerythrozytärer Bildung (z.B. durch Reduktion aus NO-Metaboliten wie Nitrit) einer erneuten Reaktion mit Hämoglobin entkommen kann (wenn das Hämoglobin nicht vollständig deoxygeniert vorliegt) und somit nicht erneut oxidiert bzw. in NO-Metaboliten überführt wird (s. Formel 2 und 4). Möglich wäre dies durch die Interaktion verschiedener Proteine an der

Membran. Ein Komplex aus Cytoskelett-, Transmembran- und cytosolischen Proteinen wie Anionen-Austauscher 1/Bande 3, deoxyHb, Carboanhydrase, Aquaporin und Rhesusprotein-Kanälen könnte aufgrund der räumlichen Nähe zur Membran den Export erleichtern [162]. Dazu passt, dass deoxyHb mit Ankyrin um die Bindung an Bande 3 konkurriert, wodurch eine reversible, Sauerstoff-abhängige Regulation der erythrozytären Eigenschaften entsteht [163]. Erweitert wird diese Ansicht durch ein hypothetisches Konzept mit zwei metastabilen Intermediaten aus Nitrit gebunden an deoxyHb [ $\text{Fe}^{\text{II}}\text{Hb}\cdots\text{NO}_2^-$ ], und einer Hybrid-Spezies [ $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Hb-NO} \leftrightarrow \text{Fe}^{\text{II}}\text{Hb-NO}^+$ ], die bei der Reaktion von Nitrit mit Hämoglobin zu 75% entstehen sollen (während 25% Nitrit zu NO reduziert und unmittelbar in HbNO ( $\text{Fe}^{\text{II}}\text{Hb-NO}$ ) überführt werden) [164]. Diese Intermediate sollen eine 100-fach höhere Affinität zur Membran besitzen als deoxyHb und somit die Freisetzung von NO und Nitrit durch eine Membran-induzierte Konformationsänderung vermitteln. Cortese-Krott *et al.* haben außerdem vorgeschlagen, dass eine lokale Bildung von methHb (vor allem um die intraerythrozytäre eNOS herum) weiteres NO vor der Oxidation bewahren soll und dieses dann ebenfalls exportiert oder mit Proteinen in der unmittelbaren Nähe interagieren kann [65].

Die intraerythrozytäre eNOS ist neben der Aufnahme von NO aus dem Gefäßlumen und der intraerythrozytären Produktion aus NO-Metaboliten eine Möglichkeit zur enzymatischen Produktion von NO. Entsprechend einer Immunogoldmarkierung und Elektronenmikroskopie wurde die eNOS ebenfalls in der Nähe der Membran vorgefunden [165]. Eine offene Frage bei der enzymatischen NO-Produktion liegt aber darin, dass diese bevorzugt unter normoxischen Bedingungen stattfinden sollte und eine geschätzte NO-Produktion pro Erythrozyt bei  $3.2 \cdot 10^{-6}$  fmol pro 30 min (bei Raumtemperatur) liegt [83]. Die Versuche zur Detektion einer eNOS-abhängigen cGMP-Erhöhung unter normoxischen Bedingungen ergaben leider auch keine positiven Ergebnisse. Möglich wäre, dass unter normoxischen Bedingungen intraerythrozytär NO-Metaboliten akkumuliert werden (oder NO direkt exportiert), die dann unter hypoxischen Bedingungen ihre Wirkung entfalten können. Denn analog dazu kam es bei der alleinigen Gabe des sGC-Stimulators BAY 41-2272 nur zu einer geringen cGMP-Antwort, die in Anwesenheit von endogenem NO aufgrund des synergistischen Effekts hätte höher ausfallen können. Der Nachweis einer cGMP-Erhöhung unter hypoxischen Bedingungen nach zusätzlicher Nitrit-Gabe zeigte ebenfalls keine cGMP-Erhöhung, was vielleicht an methodischen Mängeln liegen könnte und noch keine Falsifizierung darstellt.

Zusammenfassend konnte durch diese Arbeit gezeigt werden, dass die erfolgreiche Etablierung eines Zwei-Kammer-Systems zur Akkumulation von freigesetztem NO und Quantifizierung als Nitrosyl-Eisen-Komplex eine neuartige Methode darstellt, die künftig dafür verwendet werden

kann, die Mechanismen der hypoxieabhängigen Reduktion von NO-Metaboliten zu NO näher zu untersuchen und damit die Ursache der hypoxischen Vasodilatation aufklären zu können. Eine Verwendung dieser Methode unter normoxischen Bedingungen scheitert bislang daran, dass die Spin-Traps (v.a. Fe(DETC)<sub>2</sub>) erst als NO-Addukt stabiler bzw. unempfindlicher gegen Oxidation (und damit Verlust des EPR-Signals) zu sein schein. Eine Erweiterung dieses Systems für normoxische Zwecke wäre aber sinnvoll, um die Frage nach der Aktivität der intraerythrozytären eNOS und dem Export von NO beantworten zu können.

### 5.3. Identifikation einer löslichen Guanylatcyclase in Erythrozyten

Wenn das NO, welches in Erythrozyten produziert oder aus Metaboliten reduziert wird, nicht (vollständig) exportiert wird, wäre das Vorliegen eines intraerythrozytären Rezeptors bzw. einer Signalkaskade denkbar, wobei die lösliche Guanylatcyclase (sGC) der einzig bekannte NO-Rezeptor ist.

Im Rahmen dieser Studie konnte eine intraerythrozytäre sGC durch die Anwendung unterschiedlicher Methoden zweifelsfrei identifiziert werden. Es wurde funktionell gezeigt, dass NO-Donoren, sGC-Stimulatoren und -Aktivatoren zu einer veränderten cGMP-Antwort führen, die durch sGC-Inhibition/-Oxidation gesenkt werden kann. Das Protein wurde durch Western Blot Analyse und Massenspektrometrie nachgewiesen und die Isoform als  $\alpha_1\beta_1$ -sGC (bzw. GC-1) mit einer spezifischen Aktivität von 44 pmol/min/mg Protein bestimmt. Diese Versuche konnten außerdem erfolgreich im murinen Modell wiederholt werden. Die PDE5, als Gegenspieler der sGC, wurde ebenfalls per Western Blot identifiziert und die spezifische Aktivität mit 0.92 pmol/min/mg Protein bestimmt.

Historisch gesehen wurde die Vermutung, dass cyclische Nukleotide (wie cGMP und cAMP) auch in Erythrozyten von Bedeutung sind, bereits vor mehr als vier Jahrzehnten geäußert, als bestimmte Funktionen in Abhängigkeit von cAMP postuliert wurden [87, 88], aber keine oder nur eine vernachlässigbare intraerythrozytäre Adenylatcyclase-Aktivität bestimmt werden konnte [166, 167]. Durch zwei Studien, die eine Aufnahme von cAMP aus der extrazellulären Flüssigkeit bzw. Plasma zeigten, war der Nachweis für eine *in situ* Produktion von cAMP zur Begründung der Relevanz auch nicht mehr zwingend notwendig [168, 169].

Obwohl bis dahin primär intraerythrozytäre Änderungen von cAMP untersucht wurden und für cGMP noch keine Funktion in Erythrozyten vorgeschlagen wurde, untersuchten DeBari und Bennun 1982 u.a. die Aufnahme von  $8\text{-}^3\text{H-cGMP}$  (Tritium-markiert) in Erythrozyten über einen Inkubationszeitraum von mehreren Stunden und verglichen die resultierenden Werte (im Bereich von pmol/mL Erythrozyten) von gesunden Probanden mit denen von Dialysepflichtigen Patienten [89]. So konnten sie nicht nur zeigen, dass dieses Patientenkollektiv, welches erhöhte Plasmawerte an cAMP und cGMP aufweist [170], höhere Basalwerte an intraerythrozytärem cGMP zeigte, sondern deren Erythrozyten *ex vivo* auch mehr cGMP aufnahmen (was die erhöhten Basalwerte bei Nichtbeachtung einer intraerythrozytären cGMP-Quelle erklären würde) [89]. Durch diesen bilanzierten Einstrom von cGMP, den geringen cGMP-Basalwerten, und Schwierigkeiten beim Nachweis einer Guanylatcyclase-Aktivität in

Erythrozytenhomogenaten [171] war die passive Beteiligung von Erythrozyten am cGMP-Stoffwechsel anerkannt, aber das Vorliegen einer aktiven cGMP-Syntheseleistung umstritten.

1994-1996 zeigten Petrov *et al.* die ersten erfolgreichen Nachweise von Guanylatcyclase-Aktivität in Erythrozyten und schrieben diese der partikulären (pGC) und der löslichen Guanylatcyclase (sGC) zu [172-174]. Als Nachweis wurden relative cGMP-Änderungen (ohne Nennung der Absolutwerte, normiert gegen eine unbehandelte Kontrolle) gezeigt, die sich in Abhängigkeit von  $Mn^{2+}$  und Ionophor (als Aktivator der pGC und sGC [175]), Natrium-Nitroprussid und Natriumnitrit (zur Stimulation der sGC) und verschiedenen Formen des atrialen natriuretischen Peptids (ANP, zur Stimulation der pGC) änderten. Ebenso wurde postuliert, dass die durch diese Behandlungen ausgelösten cGMP-Änderungen zu einer Änderung des  $Na^+/H^+$ -Austausches führten und diese möglicherweise über einige Zwischenschritte mediiert wurde (wie z.B. Proteinkinasen und Phosphorylierung der Effektorproteine), da die gesteigerte Aktivität noch nach Absinken der cGMP-Werte anhielt.

In der Literatur finden sich neben diesem Nachweis wenige Veröffentlichungen zur direkten Guanylatcyclase-Aktivität in Erythrozyten und/oder dessen Stimulation. 2001 zeigten Ikuta *et al.*, dass eine Aktivierung der sGC in erythroiden Zelllinien und primären Erythroblasten zu einer erhöhten  $\gamma$ -Globin Gentranskription und somit HbF-Produktion (fetales Hämoglobin) führte [176]. In Erythrozyten von Patienten mit Sichelzellanämie wurden daraufhin erhöhte cGMP-Werte gefunden, die bei Patienten unter Hydroxyurea-Therapie weiter erhöht waren und mit der Menge an HbF korrelierten [177]. Bei der Sichelzellanämie, wo es durch eine Punktmutation der  $\beta$ -Untereinheit des Hämoglobins zu einer Polymerisation und veränderten Zellform kommt, sind erhöhte Werte an HbF (nicht mutiertem Hämoglobin) erwünscht und verringern das Auftreten lebensbedrohlicher vaso-okklusiver Krisen [178]. In dieser Studie befindet sich auch ein Diagramm, bei dem adulte Erythrozyten mit NO-Donoren (Natrium-Nitroprussid) behandelt und cGMP-Änderungen betrachtet wurden, allerdings bei verhältnismäßig hohen NO-Konzentrationen (50-500  $\mu$ M), einer kürzeren Inkubationszeit (5 min) und ohne Nennung der Absolutwerte (was einen Vergleich erschwert) [177]. Daneben beschäftigten sich viele Veröffentlichungen mit dem Transport von cGMP über die Erythrozytenmembran und der Aufklärung, welche Transporter daran beteiligt sind [179-183], meist unter Verwendung von *inside-out* Vesikeln (sogenannten *ghosts*).

Mögliche physiologische Effekte einer (NO-induzierten) cGMP-Änderung in Erythrozyten könnten eine veränderte Verformbarkeit [184], erhöhte Membranviskosität [185], Membran-*scrambling* (Phosphatidylserinexposition und die nachfolgende Eryptose) [55], der bereits

erwähnte  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austausch, eine ATP-Freisetzung (Teil der erythrokrinen Funktion) [186], oder eine verringerte cAMP-Hydrolyse durch Inhibition der PDE3 sein [187]. Durch Betrachtung der Phänotypen von murinen Modellen, die genetische Defizienzen bezüglich der eNOS oder PKG aufweisen und wo eine erhöhte Erythrozytenaufnahme durch die Milz stattfindet [55, 188], könnte auch eine Beteiligung dieses Signalweges an der Regulation der Lebensdauer von Erythrozyten möglich sein. Eine erhöhte Erythropoese durch Aktivierung der sGC (in erythroiden Zellen) konnte schon gezeigt werden [189]. Erschwerend ist die Tatsache, dass mögliche Funktionen in Erythrozyten auch in Abhängigkeit von NO, aber sGC-unabhängig stattfinden könnten, weshalb adäquate Kontrollen und das Wissen um die Funktionen der sGC unerlässlich sind.

Da die Anwesenheit einer sGC in Erythrozyten stets indirekt erfolgte und kontrovers diskutiert wurde, sollte eine zweifelsfreie Identifikation im Rahmen dieser Studie und der dritten Zielsetzung nachgeholt werden. Durch Anwendung verschiedener Methoden konnte die pharmakologische Stimulation, spezifische Aktivität und Isoformzusammensetzung einer intraerythrozytären sGC gezeigt werden, unter Verwendung von murinen Kontrollen. Das Vorliegen einer partikulären GC konnte durch Gabe von 10 pM ANPIII und unterschiedlichen Inkubationszeiten bei 37°C (analog zu [172]) hingegen nicht bestätigt werden (n=2, nicht gezeigt), weshalb sich die Experimente primär mit der sGC beschäftigten (nicht zuletzt aufgrund der Beteiligung der Erythrozyten am NO-Metabolismus und der Logik über die Präsenz eines NO-Rezeptors).

Die Anwesenheit einer sGC wurde durch Western Blot Analysen gezeigt, bei denen durch spezifische Antikörper Banden für die  $\alpha_1$ - und  $\beta_1$ -Untereinheit der sGC angefärbt wurden, wobei sich in Erythrozyten von  $\alpha_1$  KO-Mäusen keine entsprechende Bande (der  $\alpha_1$ -Untereinheit) befand und somit die Spezifität dieses Nachweises sichergestellt wurde. Eine Western Blot Analyse zum Nachweis einer  $\alpha_2$ -Untereinheit brachte keine Ergebnisse (aufgrund fehlender Kontrollen nicht gezeigt). Zusätzlich erfolgte die Bestätigung durch massenspektrometrische Analyse von Hämoglobin-freien Erythrozytenkonzentraten, in denen zwei Peptide der  $\beta_1$ -Untereinheit der sGC gefunden wurden. Aufgrund dieser zweier Methoden konnte nicht nur gezeigt werden, dass die sGC in humanen Erythrozyten vorliegt, sondern auch, dass es sich vermutlich um die  $\alpha_1\beta_1$ -Isoformzusammensetzung (oder GC-1) handelt. Ein Vergleich mit murinen Erythrozyten zeigte in der Western Blot Analyse ähnliche Ergebnisse und durch Stimulation der Erythrozyten von  $\alpha_1$  KO- und  $\alpha_2$  KO-Mäusen konnte gezeigt werden, dass die Anwesenheit einer  $\alpha_1$ -Untereinheit der sGC (und nicht die  $\alpha_2$ ) für die vollständige

cGMP-Syntheseleistung verantwortlich ist (zusammen mit der  $\beta_1$ ) und im murinen Modell die gleiche Isoformzusammensetzung vorliegt.

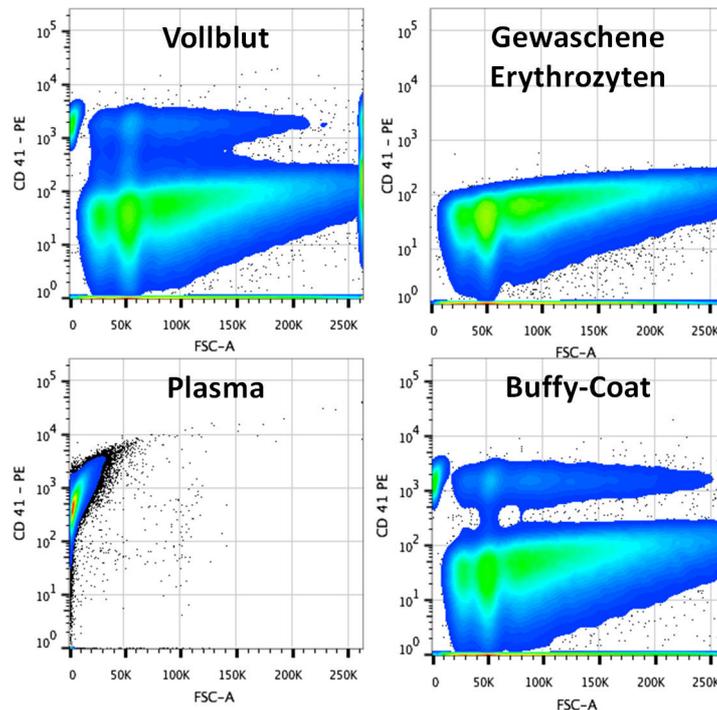
Behandlungen der Erythrozyten mit PDE-Inhibitoren, NO-Donoren, sGC-Stimulatoren, sGC-Aktivatoren, sowie sGC-Inhibitoren in verschiedenen Kombinationen (und teilweise verschiedenen Konzentrationen), zeigten in Abhängigkeit der Inkubationszeit die Möglichkeiten der pharmakologischen Stimulation und brachten zahlreiche Erkenntnisse über die intrazelluläre Situation dieses Proteins. So darf vermutet werden, dass die sGC in Erythrozyten primär in der reduzierten Variante mit dem  $\text{Fe}^{2+}$ -Häm vorliegt, vielleicht aufgrund eines ausgeprägten reduzierenden Milieus, welches für die große Menge an Hämoglobin notwendig ist, um dieses in der Sauerstoff-bindenden Form zu halten. So führte die alleinige Gabe von BAY 60-2770 in Erythrozyten nur zu einer geringen cGMP-Erhöhung und erst die zusätzliche Gabe von ODQ brachte eine Verstärkung des Signals (ODQ „inhibiert“ die sGC durch Oxidation bzw. überführt sie in eine NO-unempfindliche Form). In der Gefäßwand hingegen führt die Applikation von BAY 60-2770 zu einer ausgeprägteren Antwort [34], besonders unter Bedingungen von erhöhtem oxidativen Stress [190], und bietet dort deshalb mehr Potential zur pharmakologischen Intervention. Erythrozyten profitieren wahrscheinlich mehr von der Gabe von sGC-Stimulatoren (wie z.B. BAY 41-2272), idealerweise in Kombination mit NO-Donoren. Denn die alleinige Gabe von BAY 41-2272 konnte unter diesen Bedingungen zwar einen signifikanten cGMP-Anstieg verursachen, im Vergleich mit der *in vitro* sGC-Stimulation in der Literatur [33] und dem synergistischen Effekt bei der kombinierten Gabe von BAY 41-2272 und DEA/NO, scheint aber kein endogenes NO vorgelegen zu haben. Wie schon zuvor diskutiert, findet sich unter normoxischen Bedingungen eventuell kein freies NO, das nicht mit oxygeniertem Hämoglobin reagiert.

Durch die Anfertigung Hämoglobin-freier Konzentrate konnte zudem verhindert werden, dass es in Anwesenheit von Hämoglobin und der Gabe von NO zu einer verzögerten Reaktion/Kinetik oder Problemen mit der jeweiligen Versuchsdurchführung kommt (z.B. durch Störung der Nachweisgrenze). So konnten unterschiedliche Assays durchgeführt und auch die spezifische Aktivität der intraerythrozytären sGC mit 44 pmol/min/mg Protein bestimmt werden.

Die Anwendung verschiedenster Methoden und zahlreicher Kontrollen sollte dazu führen, dass es weniger Möglichkeiten gibt, wie diese Aktivitäten missinterpretiert werden könnten. Die einzige Möglichkeit, dass die cGMP-Syntheseleistung nicht von den Erythrozyten herrührt, und häufiger Kritikpunkt von Gutachtern/*Reviewern*, besteht in der Verunreinigung der isolierten

und gewaschenen Erythrozyten mit anderen Blutbestandteilen, wie z.B. Leukozyten (4,000-10,000/ $\mu$ L Vollblut), Thrombozyten/Plättchen (150,000-400,000/ $\mu$ L Vollblut) oder Mikropartikeln, die bekanntermaßen ebenfalls eine sGC enthalten [191, 192]. So haben Yang *et al.* in ihrer Veröffentlichung von 2013 zu den kardioprotektiven Eigenschaften von Erythrozyten (dessen Inhalt im Rahmen der Langendorff-Experimente diskutiert wird) eine Aussage zur Reinheit der isolierten und gewaschenen Erythrozyten vorweg genommen und mit der Durchführung eines Differentialblutbildes bestätigt, dass nach der Aufreinigung sämtliche Leukozyten (>99%) und Plättchen ( $\geq$ 98%) entfernt wurden bzw. deren Präsenz soweit reduziert wurde, dass eine Einflussnahme nominell nicht von Bedeutung wäre [45].

Eine interne Kontrolle des Kardiologischen Labors bestätigte diese Aussage mit Hilfe einer durchflusszytometrischen Analyse und Fluoreszenz-Markierung des Oberflächen- oder Membranproteins CD41 (auch Integrin  $\alpha$ -IIb), welches für die Zelladhäsion zuständig ist und primär von Thrombozyten/Plättchen, aber auch einigen Stammzellen/Vorläuferzellen exprimiert wird [193]. Die Ordinate zeigt das Signal der Fluoreszenzmarkierung, während auf der Abszisse das sogenannte Vorwärtsstreulicht (FSC, engl. *forward scatter*) aufgetragen ist, welches aufgrund der Beugung das Volumen der Zelle widerspiegelt. Das Seitwärtsstreulicht (SSC, engl. *side scatter*) hingegen würde auf die Granularität der Zelle hindeuten (nicht aufgetragen). Während im Vollblut noch alle Fraktionen vorhanden sind und im Plasma einige Plättchen zu sehen sind, befinden sich in den isolierten und gewaschenen Erythrozyten nach Durchführung des hier verwendeten Waschprotokolls keine CD-positiven Events (CD41<sup>+</sup>) mehr, was die Reinheit dieser Aufreinigung bestätigt und eine signifikante sGC-Aktivität aus Plättchen ausschließt.



**Abbildung 30: Durchflusszytometrische Analyse zum Nachweis von Plättchen in Blutfraktionen (CD41<sup>+</sup>).**

Vollblut und verschiedene Blutfraktionen wurden durchflusszytometrisch analysiert und das Oberflächen- oder Membranprotein CD41 (auch Integrin  $\alpha$ -IIb) fluoreszenzmarkiert. CD41<sup>+</sup>-Events befinden sich auf der Ordinate und kennzeichnen vorhandene Plättchen (oder auch bestimmte Stammzellen/Vorläuferzellen). Aufgetragen wurde gegen das sogenannte Vorwärtsstreulicht (FSC-A, engl. forward scatter), das ein Maß des Zellvolumens darstellt. In der Fraktion der isolierten und gewaschenen Erythrozyten waren keine CD41<sup>+</sup>-Events mehr zu sehen. Exemplarische Durchführung mit humanem Blut (100,000 Gesamtereignisse) (modifiziert nach Cortese-Krott et al. [131]).

Die Fragestellung zur Identifikation einer intraerythrozytären sGC beruht auf Vorergebnissen von Cortese-Krott et al. (Abb. 30). Dabei wurden die Fraktionen einer Vollblutprobe getrennt und mit den Rohextrakten Assays zur Bestimmung der spezifischen sGC-Aktivität durchgeführt. Im Buffy-Coat (der Grenzschicht, die primär aus Leukozyten und Plättchen besteht) war mit 3,253 pmol/min/mg Protein die mit Abstand höchste Aktivität vorhanden, gefolgt vom Plasma mit 12.9 pmol/min/mg Protein (n=3). In Erythrozyten hingegen war die Aktivität mit  $\approx$  2.3 pmol/min/mg Protein (n=3) nahe der Nachweisgrenze und nur unwesentlich höher als die basale Kontrolle ohne YC-1 (ebenfalls ein sGC-Stimulator wie BAY 41-2272) und repetitiver Zugabe von DEA/NO. Dies lag vermutlich an den bereits bekannten Problemen, dass die hohe Konzentration an Hämoglobin den Assay sowohl aufgrund der reinen Proteinmenge, als auch durch Interaktion mit dem zugegebenen NO stört und zu falsch-niedrigen Messwerten führt. Deshalb wurde eine Aufreinigung der intraerythrozytären sGC durchgeführt, nach einer bereits publizierten Weise [112] unter Verwendung einer Q-Sepharose

(zur Anionenaustauschchromatographie), bei der durch Analyse der einzelnen Aufreinigungsschritte beobachtet werden konnte, wie die spezifische Aktivität zunehmend anstieg und in einem konzentrierten Eluat  $\approx 100$  pmol/min/mg Protein betrug (repräsentative Messung mehrerer Durchführungen). In demselben Eluat wurde die sGC-Aktivität durch Einsatz von  $^{32}\text{P}$ -GTP und Umsatz zu  $^{32}\text{P}$ -cGMP in Abhängigkeit von DEA/NO und YC-1 zweifelsfrei bestätigt [112].

Auch wenn die spezifische Aktivität unter optimalen Bedingungen ein genaues Maß für die maximale Syntheseleistung und somit der vorliegenden Menge an sGC ist, ist ein direkter Vergleich dieser Werte von unterschiedlichen Versuchsdurchführungen nicht immer zielführend. Die Aufreinigung mittels Q-Sepharose stellte eine eigens für diese Zwecke optimierte Methode dar, um gezielt die sGC zu isolieren, während die im Rahmen dieser Studie verwendete und schnellere Variante unter Benutzung von HemoVoid „lediglich“ das Hämoglobin entfernt und die cytosolischen Proteine nahezu vollständig isoliert bzw. konzentriert. Dadurch sind die Proteinmengen in den Eluaten, gegen die normiert wurde, unterschiedlich. Die resultierenden Aktivitäten können so ohne dieses Wissen nicht adäquat interpretiert werden. Um diese Werte sinnvoll miteinander zu vergleichen, wurden die Aktivitäten deshalb auf die eingesetzte Menge an Erythrozyten umgerechnet.

Eine Beispielrechnung für die sGC-Aktivität in Hämoglobin-freien Erythrozytenkonzentraten sieht so aus, dass die totale Stoffmenge an cGMP (/min) berechnet wird, die im Gesamtvolumen des Eluats vorhanden war (durch Multiplikation mit der totalen Proteinmenge des Eluats). Diese Stoffmenge wurde durch das entsprechende Volumen Erythrozyten synthetisiert, das bei diesem Experiment eingesetzt wurde, und gegen das normiert werden sollte. Da bei der Gewinnung von Hämoglobin-freien Erythrozytenkonzentraten für diese Versuche die Eluate dreier Säulen vereint wurden, auf die ursprünglich je 300  $\mu\text{L}$  Lysat aufgetragen wurden (1:5 verdünnt in Lysepuffer), ergab dies 180  $\mu\text{L}$  Erythrozytenpellet. Der so normierte Wert (pmol/min/mL Erythrozyten) ist in **Tab. 6** für mehrere Experimente aufgeführt. Danach kann beobachtet werden, dass die Aktivität pro eingesetztes Volumen an Erythrozyten in den Hämoglobin-freien Konzentraten höher ist als bei der sGC-Isolation durch die Q-Sepharose (2 mL Eluat mit 7 mg Protein, erhalten aus 7.5 mL isolierten und gewaschenen Erythrozyten), obwohl die spezifischen Aktivitäten (normiert gegen die Proteinmenge) einen anderen Schluss zuließen. Demnach war die schnellere Methode unter Verwendung von HemoVoid auch effizienter bezüglich der sGC-Aufreinigung (geringerer Proteinverlust).

Werden diese Werte durch die Zellzahl an Erythrozyten dividiert, ergibt dies eine Stoffmenge pro einzelnen Erythrozyten (zeptomol ( $10^{-21}$ )/min/Erythrozyt, nicht gezeigt). Die dafür verwendete Zellzahl von  $9.6 \cdot 10^9$  Erythrozyten/mL wurde durch eine interne Zählung ermittelt (durch eine Zählkammer und Mikroskop) und entspricht im Vergleich mit der durchschnittlichen Anzahl an Erythrozyten im Vollblut ( $4.5 \cdot 10^9$ , bei 45% Hkt [194]) einem Hämatokrit von 96% in den gewaschenen Erythrozytenpellets. Durch Multiplikation mit der Avogadro-Konstante ( $6.022 \cdot 10^{23}$ ) wurden die absoluten Syntheseleistungen errechnet (in Moleküle (cGMP)/min/Erythrozyt). Für die sGC-Isolation durch die Q-Sepharose beträgt diese 5678 Moleküle/min/Erythrozyt, bei der sGC-Aktivität in Hämoglobin-freien Erythrozytenkonzentraten 8611 Moleküle/min/Erythrozyt (**Tab. 6**).

Ebenfalls durchgeführt wurde diese Rechnung für die pharmakologische Stimulation in intakten Erythrozyten. Dieser Vergleich ist etwas problematisch, da die pharmakologische Stimulation nicht den Aktivitätsassays mit gereinigten Proben entspricht, wo optimale Kofaktor/Substrat-Bedingungen vorlagen ( $Mg^{2+}$ , GTP) und kein störendes Hämoglobin vorhanden war, das zudem NO abfängt. Außerdem wurde für eine abweichende Zeit inkubiert (10 min). Zum Vergleich wurden diese aber trotzdem umgerechnet und sind ebenfalls in der Tabelle aufgeführt. Bei der Gabe von 10  $\mu$ M BAY 41-2272 und 200  $\mu$ M DEA/NO zu intakten Erythrozyten (die für 10 min mit 100  $\mu$ M Sildenafil vorinkubiert wurden) betrug die durchschnittliche cGMP-Antwort 798 fmol/mg Protein (n=10), die um die durchschnittliche Gesamtproteinmenge (90 mg), die Inkubationszeit (10 min) und die eingesetzte Menge an isolierten und gewaschenen Erythrozyten (500  $\mu$ L) korrigiert wurde. Wie erwartet, ergab sich so eine drastisch reduzierte spezifische sGC-Aktivität.

Laut Literatur beträgt die basale Wechselzahl  $k_{cat}$  für die  $\alpha_1\beta_1$ -sGC (GC-1)  $0.029 \pm 0.001 \text{ s}^{-1}$  (in Abwesenheit von NO) und erhöht sich bei Überschuss an NO auf  $15.0 \pm 0.6 \text{ s}^{-1}$  [195]. Die Wechselzahl dient zur Beschreibung der katalytischen Aktivität und gibt die Menge an Substrat wieder, die ein Enzym pro Sekunde umsetzt. Ist der Substratumsatz bekannt, kann durch Division mit der Wechselzahl die Enzymmenge abgeschätzt werden. Wird für diese Rechnung die spezifische sGC-Aktivität von Hämoglobin-freien Erythrozytenkonzentraten zugrunde gelegt (wenn man davon ausgeht, dass die spez. Aktivität eher falsch-niedrig ausfällt, anstatt falsch-hoch), ergibt dies pro Erythrozyt zirka 10 Moleküle sGC pro Sekunde.

**Tabelle 6: Spezifische Aktivitäten verschiedener Experimente im Vergleich.**

Die spezifischen Aktivitäten (pmol/min/mg Protein), die unterschiedlichen Experimenten entsprangen, wurden zur besseren Vergleichbarkeit auf das jeweils eingesetzte Volumen an isolierten und gewaschenen Erythrozyten normiert (pmol/min/mL Erys). Durch Division mit der Anzahl an Zellen pro Volumen Erythrozytenpellet ( $9.6 \cdot 10^9$ , interne Zählung) wurde eine Stoffmenge erhalten, die sich auf einen Erythrozyten bezieht (zeptomol ( $10^{-21}$ )/min/Erythrozyt, nicht gezeigt). Die Multiplikation mit der Avogadro-Konstante ( $6.022 \cdot 10^{23}$ ) ergab die absolute Syntheseleistung (Moleküle (cGMP)/min/Erythrozyt). Die pharmakologische Stimulation intakter Erythrozyten entsprach nicht den Aktivitätsassays, die mit den gereinigten Proben durchgeführt wurden, weil dort keine Kofaktoren und Substrate (GTP) gegeben und für eine abweichende Zeit inkubiert wurde, sowie störendes Hämoglobin enthalten war. Zum Vergleich wurden diese aber trotzdem umgerechnet und sind ebenfalls aufgeführt. Außerdem vorhanden ist die PDE-Aktivität, die nicht eine Synthese von cGMP, sondern deren Abbau beschreibt, gemessen durch Umsatz von  $^{32}\text{P}$ -cGMP (unter Verwendung der gleichen Einheit: pmol/min/mg Protein).

Zugrundeliegendes Experiment	Spezifische Aktivität		
	(pmol/min/ mg Protein)	(pmol/min/ mL Erys)	(Moleküle/min/ Erythrozyt)
sGC-Isolation durch Q-Sepharose (Abb. 15)	97	90.5	5678
sGC-Aktivität (Abb. 22 a)	44	137.5	8611
Intakte Erythrozyten (Abb. 19 c)	0.08	14.4	897
PDE-Aktivität (Abb. 22 c)	0.92	0.85	53

Intuitiv scheint dieser Wert sehr niedrig zu klingen, dies spricht jedoch nicht gegen eine mögliche physiologische Relevanz in Erythrozyten. Denn analog zur Diskussion um die Relevanz der erythrozytären eNOS könnte es gewisse räumlich-zeitliche Regulationsmechanismen geben, die in der Literatur auch im Rahmen der cyclischen Nukleotide hypothetisiert werden. Obwohl die cyclischen Nukleotide hohe Diffusionskonstanten aufweisen (cAMP z.B.  $270\text{-}780 \mu\text{m}^2/\text{s}$  [196]) und damit sämtliche Effektorproteine der Zelle erreichen könnten, scheint häufig eine gewisse Kompartimentierung stattzufinden (unabhängig von dem Begriff der membranumschlossenen Organellen), vermittelt durch physikalische Beschränkung (z.B. Membranassoziation), Zusammenschluss zu Proteinkomplexen mit den Effektorproteinen oder selektiven Abbau (Phosphodiesterasen) [197, 198]. Die cAMP-abhängigen Signalwege sind weitaus besser untersucht, aber zur sGC sind ebenso interessante Daten vorhanden. Zabel *et al.* haben 2002 gezeigt, dass die sGC (obwohl als löslich bezeichnet) an die Zellmembran mehrerer Zelltypen assoziiert, ausgelöst durch intrazelluläre Stimuli wie steigende  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration [199]. Andere Studien beobachteten ähnliche Ergebnisse oder die Assoziation zu Caveolae, wo auch die PKG aktiviert

wurde [200, 201], während eine Studie nur die über PSD-95 stattfindende Membranassoziation der  $\alpha_2\beta_1$ -sGC (GC-2) fand [28]. Die  $\alpha_2\beta_1$ -sGC ist aber nicht so ubiquitär exprimiert wie die  $\alpha_1\beta_1$ -sGC und konnte bisher nur in Plazenta, Uterus, Lunge und in neuronalen Geweben (zentrales Nervensystem) nachgewiesen werden. Im Rahmen dieser Studie verdichteten sich die Hinweise ebenfalls auf die Präsenz einer  $\alpha_1\beta_1$ -sGC in Erythrozyten, eine  $\alpha_2\beta_1$ -sGC konnte, wie bereits erwähnt, nicht gefunden werden und ob eine Zusammenlagerung zu Proteinkomplexen mit potentiellen Effektorproteinen stattfindet, wurde im Falle der Erythrozyten noch nicht untersucht, würde aber eine wichtige Erkenntnis darstellen.

Einen Gegenspieler zur Guanylatcyclase-Aktivität stellt die Phosphodiesterase-Aktivität dar, durch welche nicht die Synthese, sondern der Abbau von cGMP beschrieben wird (in pmol/min/mg Protein), gemessen nach Zugabe und Umsatz von  $^{32}\text{P}$ -cGMP. Diese war mit 0.92 pmol/min/mg Protein ungewöhnlich niedrig und befand sich nur knapp oberhalb der Nachweisgrenze (n=6, aus je 6 Eluaten konzentriert). Aufgrund der Spezifität dieses Nachweises und einem kompletten Signalverlust nach Gabe von nur 100 nM Sildenafil (einem spezifischen Inhibitor gegen die PDE5) gab es trotzdem keine Zweifel an der Anwesenheit von Phosphodiesterasen in Erythrozyten, auch wenn die Aktivität aus unbekanntem Gründen sehr niedrig war. Möglicherweise fehlten Regulationsmechanismen, die nur in intakten Zellen stattfinden, und nach Verlust der Integrität die dafür nötigen Bedingungen nicht mehr gegeben waren. So wird beschrieben, dass eine steigende cGMP-Konzentration eine PKG-abhängige Phosphorylierung der PDE5 an Serin 102 auslöst und dies über eine erhöhte cGMP-Bindungsaffinität in der regulatorischen Domäne zu einer erhöhten Aktivität führt [202-204]. Ebenso wurde eine PDE5-Phosphorylierung durch die Proteinkinase A (PKA) hypothetisiert [205]. Überprüft werden könnten diese Thesen nur, indem sowohl in intakten Zellen, als auch Hämoglobin-freien Erythrozytenkonzentraten eine cGMP-Erhöhung verursacht und die PDE5-Phosphorylierung bestimmt würde, was eine vorherige und zuverlässige/reproduzierbare Etablierung dieser Methoden mit verschiedenen Ausgangsmaterialien voraussetzt (in An- und Abwesenheit von Hämoglobin).

Die Anwesenheit einer PDE5 in Erythrozyten wurde im Rahmen dieser Studie auch durch eine Western Blot Analyse bestätigt, bei der auf Höhe von  $\approx 90$  kDa eine Bande zu sehen war, angefärbt durch einen spezifischen Antikörper. In der Literatur finden sich über die Phosphodiesterasen in Erythrozyten erstaunlicherweise mehr Daten als zu der direkten Anwesenheit einer sGC in Erythrozyten. 1980 wurde zum ersten Mal erwähnt, dass in Erythrozyten von Hühnern (die im Gegensatz zu den Erythrozyten der Mammalia noch Nuclei und andere Zellorganellen enthalten) eine cAMP-spezifische PDE-Aktivität gefunden wurde

[206]. Dieses Thema wurde ab 2001 primär von Sprague *et al.* aufgegriffen und bearbeitet [207]. So haben diese gezeigt, dass eine von den G-Protein gekoppelten Rezeptoren abhängige ATP-Freisetzung aus u.a. humanen Erythrozyten (in der Einleitung als Teil der erythrokrinen Funktion vorgestellt) von intraerythrozytären cAMP-Änderungen und den PDE-Aktivitäten abhängig ist [208, 209]. Von den elf verschiedenen Phosphodiesterasen, die bekannt sind (und die sich in Struktur, Substratspezifität und inhibitorischer Sensitivität unterscheiden) [210], wurden daraufhin mehrere identifiziert. Es wurden die PDE2 (die durch cGMP-aktiviert wird), die PDE3 (die durch cGMP-inhibiert wird), sowie die PDE4 identifiziert [211-213]. PDE2 und 3 zeigen duale Aktivitäten für cAMP und cGMP, PDE4 ist cAMP-spezifisch [214]. Die PDE2A und die 3B wurden dabei in bzw. an der Membran gefunden [211, 213]. An diesem Beispiel sollte beachtet werden, dass bei der Lyse und Anfertigung Hämoglobin-freier Erythrozytenkonzentrate auch membranständige oder membranassoziierte Proteine verloren gehen könnten. Im Rahmen dieser Studie konnte durch Verwendung eines spezifischen Inhibitors und durch Western Blot Analyse lediglich die Anwesenheit einer PDE5 zweifelsfrei gezeigt werden.

Analog dazu haben Adderley *et al.* ebenfalls die PDE5 (cGMP-spezifisch) durch Western Blot Analysen und pharmakologische Stimulation identifiziert [215]. Die pharmakologische Stimulation intakter Erythrozyten in dieser Veröffentlichung von 2011 zeigte nach 30 min Vorinkubation mit dem PDE5-Inhibitor Zaprinast (10  $\mu\text{M}$ ) und 20 min Inkubation nach Gabe von YC-1 (100  $\mu\text{M}$ ) und Sper/NO eine cGMP-Erhöhung von  $\approx 11$  fmol (CTRL) auf  $\approx 15$  fmol pro  $10^{10}$  Erythrozyten. Dieser (signifikante) cGMP-Anstieg ist im Vergleich mit der hier durchgeführten pharmakologischen Stimulation in intakten Erythrozyten erstaunlicherweise um den Faktor  $10^5$  niedriger, was vielleicht unter anderem daran liegt, dass ein NO-Donor mit für diese Inkubationszeit ungeeigneter Halbwertszeit von 39 min (bei 37°C und pH 7.4) und dazu in bedeutend niedrigerer Konzentration eingesetzt wurde (100 nM Sper/NO), so dass rein rechnerisch nach 20 min lediglich 30 nM Sper/NO „zerfallen“ sind (und 60 nM NO freigesetzt wurden).

Ein weiteres Problem liegt darin, dass bei vielen Untersuchungen der Endpunkt dieser cAMP/cGMP- und PDE-abhängigen Signalkaskade in der Messung von freigesetztem ATP bestand und 2014 eine kontroverse Studie mit dem Titel „*Hemolysis is a primary ATP-release mechanism in human erythrocytes*“ veröffentlicht wurde [216]. Dort wurde gezeigt, dass die Arbeit mit Erythrozyten ihre eigenen Schwierigkeiten besitzt und viele Behandlungen (Mechanischer Stress, Hypoxie und Pharmazeutika in <10% DMSO) zu einer teilweisen Hämolyse und somit einem falsch-positiven Signal an extrazellulärem ATP führen.

Andererseits sind die cyclischen Nukleotide ausreichend wasserlöslich und die zellpermeablen cGMP-Analoga wie z.B. das 8-pCPT-cGMP, das in dieser Studie verwendet wurde, gut wasserlöslich und können somit in Puffer (ohne organische Lösungsmittel) appliziert werden. In einer Dissertation aus der Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie wurden diese Mechanismen zur ATP-Freisetzung und die Methode zu dessen Detektion kritisch untersucht und parallel der jeweilige Grad an Hämolyse bestimmt, wobei unter anderem eine PDE-Abhängigkeit der ATP-Freisetzung (unabhängig von der Hämolyse) bestätigt wurde [217].

Das Vorliegen einer intraerythrozytären sGC wurde nicht nur im Fall von jungen und gesunden Probanden untersucht. Eine parallel laufende Studie mit dem Titel „*Analysis of red cell eNOS regulation and signaling within red blood cells in patients with stable and unstable coronary artery disease*“ wurde dafür genutzt, um die Aktivität und Stimulierbarkeit der intraerythrozytären sGC auch in Patienten mit koronarer Herzkrankheit (KHK) zu untersuchen (im Vergleich zu einer Kontrollgruppe gleichen Alters ohne klinisch apparente Atherosklerose). Diese Patienten wiesen eine vollständig erhaltene Aktivität der intraerythrozytären sGC auf, die in therapeutischen Ansätzen durch NO-Donoren und sGC-Stimulatoren aktiviert werden könnte. Durch einen Aktivitätsassay wurde auch die spezifische sGC-Aktivität bestimmt, die sich nicht signifikant vom Kontrollkollektiv unterscheidet.

Zusammenfassend darf gesagt werden, dass die Anwesenheit, Isoformzusammensetzung und spezifische Aktivität einer intraerythrozytären sGC zweifelsfrei nachgewiesen werden konnte und deren Aktivierbarkeit in den Erythrozyten von Patienten mit KHK vollständig erhalten bleibt. Ebenso konnte die Anwesenheit einer PDE5 gezeigt werden, die in Erythrozyten cGMP durch Hydrolyse abbaut.

## 5.4. Identifikation von Effektorproteinen und physiologische Konsequenz

Infolge der Identifikation einer intraerythrozytären sGC wurden auch mögliche Effektorproteine und physiologische Konsequenzen untersucht. Der Nachweis einer intraerythrozytären PKG wurde durch Verwendung Hämoglobin-freier Erythrozytenkonzentrate und Western Blot Analyse, sowie Stimulation der PKG-Aktivität in Abhängigkeit verschiedener Bedingungen und Kontrollen durchgeführt, wie z.B. in Abwesenheit von cGMP und ATP (die für eine Aktivität der PKG zwingend erforderlich sind), oder in Anwesenheit eines PKG-Inhibitors. Ebenfalls positiv nachgewiesen wurde die Anwesenheit eines Vasodilatator-stimulierten Phosphoproteins (VASP), das durch die PKG phosphoryliert werden kann. Durch Stimulation von intakten Erythrozyten mit BAY 41-2272 und DEA/NO oder cGMP wurde ein signifikanter Anstieg der VASP-Phosphorylierung an Serin 239 bewirkt. Eine Veränderung der Erythrozytenverformbarkeit in Folge dieser Signalkaskade (sGC/PKG/VASP) konnte nicht gezeigt werden, aber erste Ergebnisse im isoliert perfundierten Herzen nach Langendorff weisen darauf hin, dass diese Signalkaskade einen positiven Einfluss auf den Ischämie-/Reperfusionsschadens nimmt und somit kardioprotektiv wirken könnte.

Generell sind die möglichen Effekte von cGMP als sekundärer Botenstoff vielfältig, so kann es mit zahlreichen intrazellulären *Targets*/Proteinen interagieren, wozu u.a. die cGMP-gesteuerten (Ionen-) Kanäle, *Multidrug*-Transporter, die cGMP-abhängigen Proteinkinasen (oder Proteinkinase G, PKG) und die Phosphodiesterasen gehören [21, 218, 219], wobei eine PDE-Aktivität in Erythrozyten bereits gezeigt werden konnte.

Passend zu den Ergebnissen, dass eine Aktivierung der sGC (in erythroiden Zellen) zu einer erhöhten Erythropoese führt [189], wurde in der Literatur die Beteiligung von NO an der allgemeinen Regulation/Inhibition der Apoptose postuliert, dem „programmierten Zelltod“ (der Abbau von Erythrozyten (durch die Milz), gekennzeichnet durch vorherige Exposition von Phosphatidylserin, wird hingegen als Eryptose bezeichnet) [220-222], wenn auch teilweise kontrovers diskutiert oder in Abhängigkeit der NO-Konzentration und weiteren Faktoren [223]. Da diese NO-abhängige Inhibition (in neuronalen Zellen) auch durch die direkte Gabe von cGMP imitiert werden konnte und eine Beteiligung der PKG hypothetisiert wurde [224], untersuchten Föller *et al.* 2008 die Auswirkungen eines PKG-Verlustes durch Anwendung spezifischer KO-Modelle [188]. Dabei konnte gezeigt werden, dass ein globaler Verlust der PKG zu einem ausgeprägten Phänotyp führt, der primär die Erythrozytenparameter betrifft. So wiesen diese Mäuse im Vergleich zur WT-Kontrolle eine reduzierte Erythrozytenanzahl,

verringerte Hämoglobinkonzentration und eine stark vergrößerte Milz (Splenomegalie) auf (während die Subpopulationen der Leukozyten unverändert waren). Dagegen war die Anzahl an Retikulozyten und die Erythropoetin-Konzentration im Plasma erhöht, was auf eine kompensatorische Gegenregulation infolge eines erhöhten Erythrozytenabbaus hindeuten könnte. Die verringerte Lebensdauer von Erythrozyten *in vivo* konnte ebenfalls gezeigt und mit erhöhten  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen und einer vermehrten Phosphatidylserinexposition in Verbindung gebracht werden. So wurde gezeigt, dass erythroide Zellen eine PKG enthalten, diese wichtige Funktionen ausübt und antiapoptotisch wirkt.

Die Anwesenheit einer PKG in adulten Erythrozyten konnte in dieser Studie ebenfalls bestätigt werden, ebenso wie die Anwesenheit des Vasodilatator-stimulierten Phosphoproteins (VASP), was nur ein mögliches Ziel darstellt, das durch die PKG phosphoryliert werden kann. VASP wird ubiquitär exprimiert und findet sich in den meisten Zellen der Körpers [225], die bekannteste Funktion stellt jedoch die Inhibition der Plättchenaggregation dar, wo es in Abhängigkeit von NO phosphoryliert wird und mit dem Cytoskelett interagiert [116]. VASP bietet zwei prominente Phosphorylierungsstellen, das Serin an Position 157, das primär durch die Proteinkinase A (in Abhängigkeit von cAMP) phosphoryliert wird, und das Serin an Position 239, das primär durch die PKG (in Abhängigkeit von cGMP) phosphoryliert wird [226]. Zur Untersuchung einer VASP-Phosphorylierung in Abhängigkeit des sGC/PKG-Signalweges wurde dementsprechend die Phosphorylierungsstelle an Ser239 gewählt, wofür zuerst intakte Erythrozyten stimuliert, Hämoglobin-freie Erythrozytenkonzentrate angefertigt und Western Blot Analysen durchgeführt wurden. In der Normierung gegen die jeweils unbehandelte Kontrolle waren durch Stimulation mit BAY 41-2272 und DEA/NO oder cGMP signifikante Anstiege (pVASP/VASP) zu verzeichnen, die (im Fall von BAY 41-2272 und DEA/NO) durch die zusätzliche Gabe von ODQ verhindert werden konnten. Wie bereits erwähnt, war der Anstieg der VASP-Phosphorylierung im Vergleich zu den Literaturwerten in Plättchen (im Verhältnis zur eingesetzten Menge an NO oder cGMP) aber eher gering [143].

Eine Hypothese ist, dass VASP in Erythrozyten ebenfalls an der Cytoskelettorganisation beteiligt ist. Erythrozyten besitzen einen geringeren Durchmesser ( $\approx 8 \mu\text{M}$ ) als die kleinsten Kapillaren, die sie durchqueren ( $\geq 3 \mu\text{M}$ ), weshalb eine gewisse (passive oder aktive) Verformbarkeit vonnöten ist [227]. Bor-Kucukatay zeigte u.a., dass diese Verformbarkeit durch die Gabe von NO (Natrium-Nitroprussid) verbessert werden kann [184], während andere lediglich eine Scherkraft-induzierte Änderung fanden [228], oder eine NO-abhängige Verbesserung nur nach vorherigem  $\text{Ca}^{2+}$ -induzierten Schaden stattfand (durch Gabe von  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionophor). Horn *et al.* zeigten auch *in vivo* eine NO-induzierte Verbesserung der

Verformbarkeit und somit verbesserte Mikrozirkulation und konnten dabei sicher gehen, dass der applizierte NO-Donor keinen Einfluss auf die vaskuläre Situation hatte, da sie die Chorioallantoismembran eines Hühnereis verwendeten und diese an Tag 7 nach Befruchtung noch keine glatte Muskulatur aufweist, die durch NO beeinflusst werden könnte [229].

Eine Änderung der Verformbarkeit von Erythrozyten durch Applikation von cGMP, ODQ oder der kombinierten Gabe, um NO auszulassen und den potentiell darauffolgenden Signalweg zu identifizieren, konnte in dem hier durchgeführten Versuchsaufbau keine signifikanten Unterschiede aufzeigen. Die Möglichkeit, dass Effekte in Abhängigkeit von NO, aber unabhängig von der Aktivität der sGC stattfinden, könnte hier also vorliegen. So wurde eine verbesserte Verformbarkeit von Erythrozyten bereits mit der S-Nitrosierung (oder S-Nitrosylierung in Anlehnung an die Phosphorylierung als posttranslationale Modifikation, aber chemisch weniger korrekt) von Proteinen des Cytoskeletts in Verbindung gebracht [230]. Wenn dies korrekt ist, hätte die intraerythrozytäre sGC entweder keinen Einfluss auf die Verformbarkeit, oder eine zusätzliche, die durch diese Versuchsdurchführung nicht gezeigt werden konnte.

Eine andere vielversprechende Möglichkeit für eine physiologische Relevanz wurde durch Yang *et al.* aufgezeigt, die murine Erythrozyten behandelt und *ex vivo* in die Koronarien isoliert perfundierter Herzen injiziert haben. Dies geschah während eines Protokolls zur Induktion eines Ischämie-/Reperfusionsschadens. So konnte gezeigt werden, dass eine Inhibition der Arginase, die mit der eNOS in Konkurrenz um das Substrat L-Arginase steht, kardioprotektive Eigenschaften zeigte und sich die kardialen Funktionsparameter im Vergleich zur Kontrolle (die Applikation unbehandelter Erythrozyten) besser erholten [45]. Hypothesiert wurde, dass die Arginase-Inhibition zu einer höheren eNOS-Aktivität und somit vermehrtem Export von NO führte, was durch einen Anstieg von Nitrit und Nitrat im Überstand von behandelten Erythrozyten bekräftigt wurde [45].

Freundlicherweise wurden durch dieselbe Arbeitsgruppe um Prof. Dr. John Pernow (Karolinska-Institut, Universitätskrankenhaus Solna, Schweden) Langendorff-Experimente im Rahmen dieser Studie durchgeführt, durch die demonstriert werden konnte, dass die intraerythrozytäre sGC eventuell an diesen Mechanismen beteiligt ist und ebenfalls kardioprotektive Eigenschaften vermittelt. Eine Stimulation der Erythrozyten mit BAY 41-2272 und DEA/NO (in Anwesenheit von 100  $\mu$ M Sildenafil) führte zu einer signifikanten Verbesserung der kardialen Funktionsparameter (gemessen als LVDP und

$dP/dt_{max}$ ) im Vergleich zur Applikation von unbehandelten Erythrozyten und die zusätzliche Gabe von ODQ verhinderte diesen Effekt vollständig.

Diese Ergebnisse bieten sehr gute Hinweise auf eine kardioprotektive Wirkung von Erythrozyten in Abhängigkeit der sGC-Aktivität, für eine zweifelsfreie Interpretation und dem Ausschluss möglicher anderer Ursachen, die diese Ergebnisse ebenfalls erklären könnten, sollten aber zusätzliche Kontrollen durchgeführt werden. Denn die Möglichkeit, dass die zusätzlich zum sGC-Stimulator (BAY 41-2272) gegebene NO-Menge (DEA/NO) diese Effekte alleine verursacht hat, bestünde auch. Die kombinierte Gabe von 10  $\mu$ M BAY 41-2272 und 200  $\mu$ M DEA/NO (in Anwesenheit von 100  $\mu$ M Sildenafil) zur Stimulation der intraerythrozytären sGC wurde geplant, da in Vorversuchen gezeigt werden konnte, dass die alleinige Gabe von BAY 41-2272 nur zu einem minimalen cGMP-Anstieg führt (evtl. aufgrund niedriger endogener NO-Level unter diesen Bedingungen) und die synergistische Gabe mit einem sGC-Stimulator zu einer höheren Antwort führte, die hier gebraucht wurde.

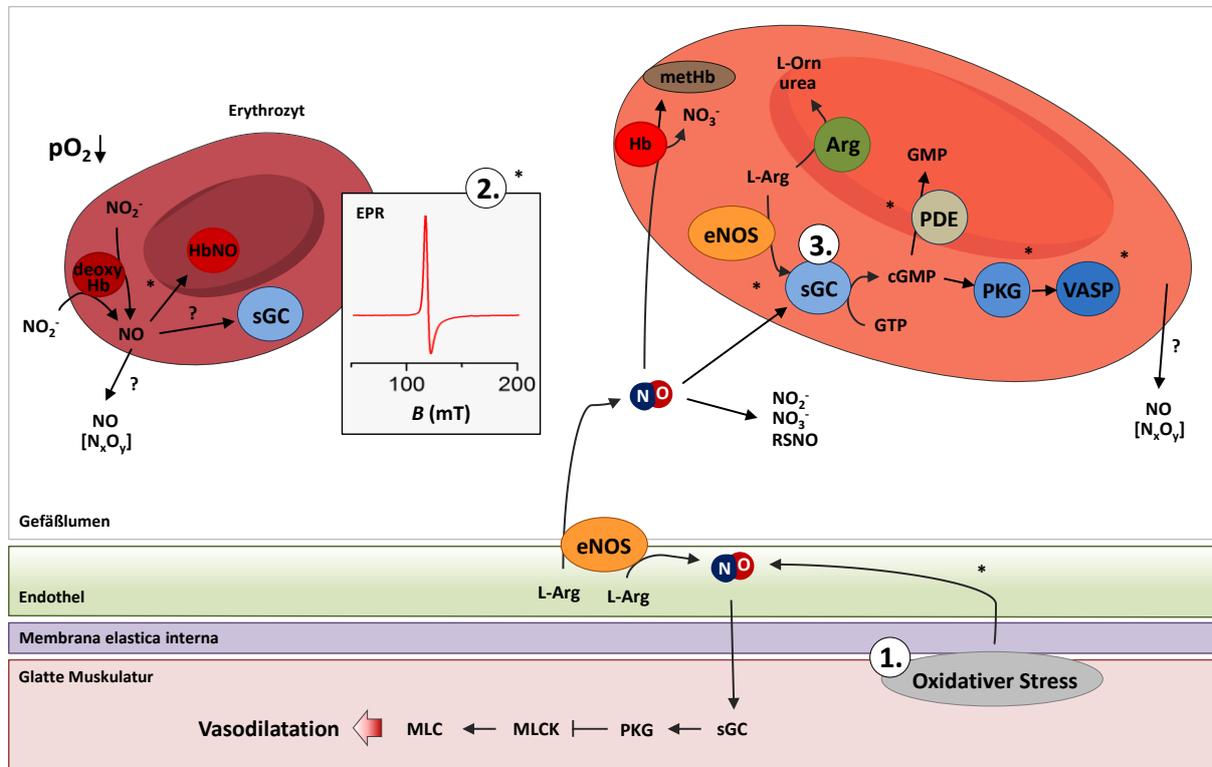
Die Erythrozyten könnten das zugegebene NO während der Inkubation unter normoxischen Bedingungen in NO-Metaboliten überführt haben, die nach Injektion in die Koronarien während der Ischämie (also unter hypoxischen Bedingungen) wieder zu NO reduziert und exportiert wurden, und so kardioprotektive Effekte sGC-unabhängig vermittelt haben. Zwar wurde eine Kontrolle mit der zusätzlichen Gabe von ODQ durchgeführt, dieses oxidiert aber nicht nur die sGC, sondern interagiert auch mit Hämoglobin. Alzawahra *et al.* haben in ihrer Publikation zur hypoxieabhängigen Reduktion von Nitrit erwähnt, dass ODQ auch als Inhibitor von Hämoglobin wirkt und in der Anwesenheit von ODQ keine Nitrit-mediierte NO-Produktion stattfindet [137].

Mögliche Kontrollen könnten so aussehen, dass die murinen Erythrozyten z.B. nur mit DEA/NO behandelt werden, um zu vergleichen, ob die Effektstärke gleich hoch ist. Ebenso könnte nur BAY 41-2272 verabreicht werden, das in Kombination mit endogenen NO-Metaboliten (die in Hypoxie reduziert werden) oder zusätzlichem Nitrit zu einer Kardioprotektion führt.

Die spezifischere und vermutlich beste Möglichkeit wäre jedoch die Verwendung von Erythrozyten aus  $\alpha_1$  KO-Mäusen und Herzen aus Wildtyp-Mäusen. Würde die kombinierte Gabe von BAY 41-2272 und DEA/NO hier zu keiner Verbesserung der kardialen Funktion (im Vergleich zu unbehandelten Erythrozyten) führen, wären diese Effekte vollständig sGC-vermittelt. Eine Durchführung dieser Experimente befindet sich durch Prof. Dr. Dr. Miriam M. Cortese-Krott und den Kooperationspartnern bereits in Planung.

Daneben gibt es zahlreiche andere Effekte der Erythrozyten, die in der Literatur postuliert wurden und in Abhängigkeit der intraerythrozytären sGC reguliert werden könnten. Die Identifikation einer intraerythrozytären sGC und dessen Aktivität bietet eine thematische Erweiterung der Forschung rund um die Erythrozyten und die Möglichkeit für viele weitere spannende Experimente.

## 6. Zusammenfassung und Ausblick



1. Vaskuläre Adaption des eNOS/sGC-Signalweges auf oxidativen Stress
2. Stickstoffmonoxid (NO) in Erythrozyten / EPR-Studie
3. Intraerythrozytäre Signaltransduktion / Identifikation einer löslichen Guanylatcyclase

Abbildung 31: Graphische Zusammenfassung der Ziele dieser Studie.

Mit \* markierte Strukturen/Signalwege konnten im Rahmen dieser Studie nachgewiesen werden. Arg: Arginase, cGMP: cyclisches Guanosin-3',5'-monophosphat, deoxyHb: deoxygeniertes Hb, eNOS: endotheliale NO-Synthase, EPR: Elektronenspinresonanz-Spektroskopie, GTP: Guanosin-5'-triphosphat, Hb: Hämoglobin, L-Arg: L-Arginin, L-Orn: L-Ornithin, metHb: Methämoglobin, MLC: Myosin-leichte-Kette, MLCK: Myosin-leichte-Ketten-Kinase, NO: Stickstoffmonoxid, PKG: Proteinkinase G, RSNO: Nitrosothiol, sGC: lösliche Guanylatcyclase, VASP: Vasodilatator-stimuliertes Phosphoprotein.

Die Eingangshypothese dieser Studie ergab sich aufgrund der konträr wirkenden Tatsache, dass Erythrozyten an der Metabolisierung von NO beteiligt sind und so scheinbar dessen physiologische Wirkung begrenzen. Daher sollte untersucht werden, welche Aufgaben die Erythrozyten im systemischen NO-Metabolismus erfüllen, ob NO auch wieder exportiert werden kann und/oder intraerythrozytäre Zielproteine vorliegen. Des Weiteren sollte (anhand eines Mausmodells) untersucht werden, welche Auswirkungen eine chronische Adaption an oxidativen Stress auf die vaskuläre Funktion hat.

Durch die im Rahmen dieser Studie durchgeführten Versuche konnte gezeigt werden, dass Erythrozyten durch Aufnahme und Metabolisierung von NO am systemischen NO-Metabolismus beteiligt sind und neben dem möglichen Export von NO ein intraerythrozytäres Zielprotein in Form der sGC vorliegt, das eine nachgeschaltete cGMP-abhängige Signalkaskade aktivieren kann (bestehend aus PKG und VASP). Aufgrund des reduzierenden Milieus in den Erythrozyten (welches gebraucht wird, um Hämoglobin in der O<sub>2</sub>-bindenden Form zu bewahren) scheint auch die sGC vorwiegend in der reduzierten Form vorzuliegen. Ebenso war die Aktivierbarkeit der intraerythrozytären sGC in Patienten mit stabiler KHK vollständig erhalten und kann ein mögliches pharmakologisches Ziel darstellen.

Zukünftige Studien könnten sich mit der Fragestellung beschäftigen, welche endogenen Signalwege zur Aktivierung der intraerythrozytären sGC führen und ob diese unter physiologischen Bedingungen (*in vivo*) von Relevanz sind. Neben NO aus dem Gefäßlumen könnte dieses auch aus intraerythrozytären Quellen stammen, wie der dort identifizierten eNOS, oder aus der Reduktion von NO-Metaboliten. Versuche zu diesen Signalwegen führten unter den hier angewandten Bedingungen zu keiner sGC-Aktivierung und Anstieg der cGMP-Menge, aber es konnte bestätigt werden, dass NO-Metaboliten wie Nitrit unter hypoxischen Bedingungen umgesetzt werden.

Die Identifikation einer intraerythrozytären sGC stellt ein komplett neues Forschungsgebiet dar und zeigt, dass Erythrozyten nicht „nur Transporter“ von respiratorischen Gasen sind, sondern aktiv am systemischen NO-Metabolismus teilnehmen und möglicherweise nicht-kanonische Funktionen ausüben (z.B. Export von vasoaktiven Substanzen). *Ex vivo*-Versuche weisen darauf hin, dass diese Signalkaskade einen Ischämie-/Reperfusionsschaden am Herzen verringern und somit kardioprotektiv wirken könnte.

Daneben zeigt auch der eNOS/sGC-Signalweg in der Gefäßwand, dass der oxidative Status einen hohen Einfluss besitzt und noch nicht alle Regulationsmechanismen vollständig verstanden sind. Im Falle eines Mausmodells zur chronischen Adaption an oxidativen Stress wurde eine kompensatorisch erhöhte Expression der eNOS gefunden, die in einem systemisch erniedrigten Blutdruck resultierte. Die zugrundeliegenden Prozesse könnten dabei helfen, Regulationsmechanismen zur Expression und Regulation des eNOS/sGC-Signalweges besser zu verstehen.

## 7. Literaturverzeichnis

1. Benjamin, E.J., et al., *Heart Disease and Stroke Statistics-2017 Update: A Report From the American Heart Association*. Circulation, 2017. **135**(10): p. e146-e603.
2. Braunwald, E., *Shattuck lecture--cardiovascular medicine at the turn of the millennium: triumphs, concerns, and opportunities*. N Engl J Med, 1997. **337**(19): p. 1360-9.
3. Kargoli, F., et al., *Socioeconomic Status as a Predictor of Mortality in Patients Admitted With Atrial Fibrillation*. Am J Cardiol, 2017. **119**(9): p. 1378-1381.
4. Agarwal, S., et al., *Changing Trends of Atherosclerotic Risk Factors Among Patients With Acute Myocardial Infarction and Acute Ischemic Stroke*. Am J Cardiol, 2017. **119**(10): p. 1532-1541.
5. Stary, H.C., et al., *A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association*. Circulation, 1995. **92**(5): p. 1355-74.
6. Pepine, C.J., *Systemic hypertension and coronary artery disease*. Am J Cardiol, 1998. **82**(3A): p. 21H-24H.
7. Forstermann, U. and W.C. Sessa, *Nitric oxide synthases: regulation and function*. Eur Heart J, 2012. **33**(7): p. 829-37, 837a-837d.
8. Fishbein, M.C. and G.A. Fishbein, *Arteriosclerosis: facts and fancy*. Cardiovasc Pathol, 2015. **24**(6): p. 335-42.
9. Ross, R., J. Glomset, and L. Harker, *Response to injury and atherogenesis*. Am J Pathol, 1977. **86**(3): p. 675-84.
10. Yu, X.H., et al., *Foam cells in atherosclerosis*. Clin Chim Acta, 2013. **424**: p. 245-52.
11. Napoli, C., et al., *Fatty streak formation occurs in human fetal aortas and is greatly enhanced by maternal hypercholesterolemia. Intimal accumulation of low density lipoprotein and its oxidation precede monocyte recruitment into early atherosclerotic lesions*. J Clin Invest, 1997. **100**(11): p. 2680-90.
12. Raines, E.W., *The extracellular matrix can regulate vascular cell migration, proliferation, and survival: relationships to vascular disease*. Int J Exp Pathol, 2000. **81**(3): p. 173-82.
13. Badimon, L. and G. Vilahur, *Thrombosis formation on atherosclerotic lesions and plaque rupture*. J Intern Med, 2014. **276**(6): p. 618-32.
14. Libby, P., *Inflammation in atherosclerosis*. Nature, 2002. **420**(6917): p. 868-74.
15. Frangos, S.G., V. Gahtan, and B. Sumpio, *Localization of atherosclerosis: role of hemodynamics*. Arch Surg, 1999. **134**(10): p. 1142-9.
16. Nabel, E.G. and E. Braunwald, *A tale of coronary artery disease and myocardial infarction*. N Engl J Med, 2012. **366**(1): p. 54-63.
17. Erkens, R., et al., *Modulation of Local and Systemic Heterocellular Communication by Mechanical Forces: A Role of Endothelial Nitric Oxide Synthase*. Antioxid Redox Signal, 2017. **26**(16): p. 917-935.
18. Li, H., S. Horke, and U. Forstermann, *Vascular oxidative stress, nitric oxide and atherosclerosis*. Atherosclerosis, 2014. **237**(1): p. 208-19.

19. Boger, R.H., *Asymmetric dimethylarginine, an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase, explains the "L-arginine paradox" and acts as a novel cardiovascular risk factor*. J Nutr, 2004. **134**(10 Suppl): p. 2842S-2847S; discussion 2853S.
20. Hadi, H.A., C.S. Carr, and J. Al Suwaidi, *Endothelial dysfunction: cardiovascular risk factors, therapy, and outcome*. Vasc Health Risk Manag, 2005. **1**(3): p. 183-98.
21. Francis, S.H., et al., *cGMP-dependent protein kinases and cGMP phosphodiesterases in nitric oxide and cGMP action*. Pharmacol Rev, 2010. **62**(3): p. 525-63.
22. Zhao, Y., P.M. Vanhoutte, and S.W. Leung, *Vascular nitric oxide: Beyond eNOS*. J Pharmacol Sci, 2015. **129**(2): p. 83-94.
23. Cary, S.P., et al., *Nitric oxide signaling: no longer simply on or off*. Trends Biochem Sci, 2006. **31**(4): p. 231-9.
24. Derbyshire, E.R. and M.A. Marletta, *Structure and regulation of soluble guanylate cyclase*. Annu Rev Biochem, 2012. **81**: p. 533-59.
25. Mergia, E., et al., *Spare guanylyl cyclase NO receptors ensure high NO sensitivity in the vascular system*. J Clin Invest, 2006. **116**(6): p. 1731-7.
26. Russwurm, M. and D. Koesling, *Isoforms of NO-sensitive guanylyl cyclase*. Mol Cell Biochem, 2002. **230**(1-2): p. 159-64.
27. Budworth, J., et al., *Tissue distribution of the human soluble guanylate cyclases*. Biochem Biophys Res Commun, 1999. **263**(3): p. 696-701.
28. Russwurm, M., N. Wittau, and D. Koesling, *Guanylyl cyclase/PSD-95 interaction: targeting of the nitric oxide-sensitive alpha2beta1 guanylyl cyclase to synaptic membranes*. J Biol Chem, 2001. **276**(48): p. 44647-52.
29. Sharma, R.K., T. Duda, and C.L. Makino, *Integrative Signaling Networks of Membrane Guanylate Cyclases: Biochemistry and Physiology*. Front Mol Neurosci, 2016. **9**: p. 83.
30. Kuhn, M., *Molecular Physiology of Membrane Guanylyl Cyclase Receptors*. Physiol Rev, 2016. **96**(2): p. 751-804.
31. Marsh, N. and A. Marsh, *A short history of nitroglycerine and nitric oxide in pharmacology and physiology*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2000. **27**(4): p. 313-9.
32. Sage, P.R., et al., *Nitroglycerin tolerance in human vessels: evidence for impaired nitroglycerin bioconversion*. Circulation, 2000. **102**(23): p. 2810-5.
33. Stasch, J.P., et al., *NO-independent regulatory site on soluble guanylate cyclase*. Nature, 2001. **410**(6825): p. 212-5.
34. Evgenov, O.V., et al., *NO-independent stimulators and activators of soluble guanylate cyclase: discovery and therapeutic potential*. Nat Rev Drug Discov, 2006. **5**(9): p. 755-68.
35. Schmidt, P., et al., *Mechanisms of nitric oxide independent activation of soluble guanylyl cyclase*. Eur J Pharmacol, 2003. **468**(3): p. 167-74.
36. Thoonen, R., et al., *Cardiovascular and pharmacological implications of haem-deficient NO-unresponsive soluble guanylate cyclase knock-in mice*. Nat Commun, 2015. **6**: p. 8482.
37. Greene, S.J., et al., *The cGMP signaling pathway as a therapeutic target in heart failure with preserved ejection fraction*. J Am Heart Assoc, 2013. **2**(6): p. e000536.
38. Nossaman, B., E. Pankey, and P. Kadowitz, *Stimulators and activators of soluble guanylate cyclase: review and potential therapeutic indications*. Crit Care Res Pract, 2012. **2012**: p. 290805.

39. Lee, K.H., et al., *Cardioprotective effects of PKG activation by soluble GC activator, BAY 60-2770, in ischemia-reperfusion-injured rat hearts*. PLoS One, 2017. **12**(7): p. e0180207.
40. Melichar, V.O., et al., *Reduced cGMP signaling associated with neointimal proliferation and vascular dysfunction in late-stage atherosclerosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(47): p. 16671-6.
41. Bartosz, G., *Peroxynitrite: mediator of the toxic action of nitric oxide*. Acta Biochim Pol, 1996. **43**(4): p. 645-59.
42. Turko, I.V., et al., *Inhibition of cyclic GMP-binding cyclic GMP-specific phosphodiesterase (Type 5) by sildenafil and related compounds*. Mol Pharmacol, 1999. **56**(1): p. 124-30.
43. Barnett, C.F. and R.F. Machado, *Sildenafil in the treatment of pulmonary hypertension*. Vasc Health Risk Manag, 2006. **2**(4): p. 411-22.
44. Alderton, W.K., C.E. Cooper, and R.G. Knowles, *Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition*. Biochem J, 2001. **357**(Pt 3): p. 593-615.
45. Yang, J., et al., *Arginase regulates red blood cell nitric oxide synthase and export of cardioprotective nitric oxide bioactivity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(37): p. 15049-54.
46. Boger, R.H., et al., *Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a novel risk factor for endothelial dysfunction: its role in hypercholesterolemia*. Circulation, 1998. **98**(18): p. 1842-7.
47. Sibal, L., et al., *The Role of Asymmetric Dimethylarginine (ADMA) in Endothelial Dysfunction and Cardiovascular Disease*. Curr Cardiol Rev, 2010. **6**(2): p. 82-90.
48. Dimmeler, S., et al., *Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation*. Nature, 1999. **399**(6736): p. 601-5.
49. Fleming, I., et al., *Phosphorylation of Thr(495) regulates Ca(2+)/calmodulin-dependent endothelial nitric oxide synthase activity*. Circ Res, 2001. **88**(11): p. E68-75.
50. Suvorava, T., N. Lauer, and G. Kojda, *Physical inactivity causes endothelial dysfunction in healthy young mice*. J Am Coll Cardiol, 2004. **44**(6): p. 1320-7.
51. Fleming, I., *Molecular mechanisms underlying the activation of eNOS*. Pflugers Arch, 2010. **459**(6): p. 793-806.
52. Broekmans, K., et al., *Angiotensin II-Induced Hypertension Is Attenuated by Reduction of Sympathetic Output in NO-Sensitive Guanylyl Cyclase 1 Knockout Mice*. J Pharmacol Exp Ther, 2016. **356**(1): p. 191-9.
53. Godecke, A. and J. Schrader, *Adaptive mechanisms of the cardiovascular system in transgenic mice--lessons from eNOS and myoglobin knockout mice*. Basic Res Cardiol, 2000. **95**(6): p. 492-8.
54. Brandes, R.P., et al., *Increased nitrovasodilator sensitivity in endothelial nitric oxide synthase knockout mice: role of soluble guanylyl cyclase*. Hypertension, 2000. **35**(1 Pt 2): p. 231-6.
55. Nicolay, J.P., et al., *Inhibition of suicidal erythrocyte death by nitric oxide*. Pflugers Arch, 2008. **456**(2): p. 293-305.
56. Godecke, A., J. Schrader, and M. Reinartz, *Nitric oxide-mediated protein modification in cardiovascular physiology and pathology*. Proteomics Clin Appl, 2008. **2**(6): p. 811-22.

57. Handy, D.E. and J. Loscalzo, *Nitric oxide and posttranslational modification of the vascular proteome: S-nitrosation of reactive thiols*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006. **26**(6): p. 1207-14.
58. Cortese-Krott, M.M., et al., *Key bioactive reaction products of the NO/H<sub>2</sub>S interaction are S/N-hybrid species, polysulfides, and nitroxyl*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015. **112**(34): p. E4651-60.
59. Cortese-Krott, M.M., et al., *Inorganic sulfur-nitrogen compounds: from gunpowder chemistry to the forefront of biological signaling*. *Dalton Trans*, 2016. **45**(14): p. 5908-19.
60. Liu, X., et al., *Diffusion-limited reaction of free nitric oxide with erythrocytes*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(30): p. 18709-13.
61. Helms, C. and D.B. Kim-Shapiro, *Hemoglobin-mediated nitric oxide signaling*. *Free Radic Biol Med*, 2013. **61c**: p. 464-472.
62. Liu, C., et al., *Mechanisms of human erythrocytic bioactivation of nitrite*. *J Biol Chem*, 2015. **290**(2): p. 1281-94.
63. Vaughn, M.W., et al., *Erythrocytes possess an intrinsic barrier to nitric oxide consumption*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(4): p. 2342-8.
64. Deonikar, P. and M. Kavdia, *Contribution of membrane permeability and unstirred layer diffusion to nitric oxide-red blood cell interaction*. *J Theor Biol*, 2013. **317**: p. 321-30.
65. Cortese-Krott, M.M. and M. Kelm, *Endothelial nitric oxide synthase in red blood cells: key to a new erythrocrine function?* *Redox Biol*, 2014. **2**: p. 251-8.
66. Bryan, N.S., et al., *Nitrite is a signaling molecule and regulator of gene expression in mammalian tissues*. *Nat Chem Biol*, 2005. **1**(5): p. 290-7.
67. Crawford, J.H., et al., *Hypoxia, red blood cells, and nitrite regulate NO-dependent hypoxic vasodilation*. *Blood*, 2006. **107**(2): p. 566-574.
68. van Faassen, E.E., et al., *Nitrite as regulator of hypoxic signaling in mammalian physiology*. *Med Res Rev*, 2009. **29**(5): p. 683-741.
69. Totzeck, M., et al., *Nitrite regulates hypoxic vasodilation via myoglobin-dependent nitric oxide generation*. *Circulation*, 2012. **126**(3): p. 325-34.
70. Cosby, K., et al., *Nitrite reduction to nitric oxide by deoxyhemoglobin vasodilates the human circulation*. *Nat Med*, 2003. **9**(12): p. 1498-1505.
71. Gladwin, M.T., et al., *Role of circulating nitrite and S-nitrosohemoglobin in the regulation of regional blood flow in humans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000. **97**: p. 11482-11487.
72. Lundberg, J.O., et al., *Nitrate and nitrite in biology, nutrition and therapeutics*. *Nat Chem Biol*, 2009. **5**(12): p. 865-9.
73. Shiva, S. and M.T. Gladwin, *Nitrite mediates cytoprotection after ischemia/reperfusion by modulating mitochondrial function*. *Basic Res Cardiol*, 2009. **104**(2): p. 113-9.
74. Hendgen-Cotta, U.B., et al., *Nitrite reductase activity of myoglobin regulates respiration and cellular viability in myocardial ischemia-reperfusion injury*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(29): p. 10256-61.
75. Murillo, D., et al., *Nitrite as a mediator of ischemic preconditioning and cytoprotection*. *Nitric Oxide*, 2011. **25**(2): p. 70-80.

76. Webb, A., et al., *Mechanisms underlying erythrocyte and endothelial nitrite reduction to nitric oxide in hypoxia: role for xanthine oxidoreductase and endothelial nitric oxide synthase*. *Circulation Research*, 2008. **103**(9): p. 957-964.
77. Srihirun, S., et al., *Platelet inhibition by nitrite is dependent on erythrocytes and deoxygenation*. *PLoS One*, 2012. **7**(1): p. e30380.
78. Nagababu, E., et al., *Active nitric oxide produced in the red cell under hypoxic conditions by deoxyhemoglobin-mediated nitrite reduction*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(47): p. 46349-56.
79. Aamand, R., et al., *Generation of nitric oxide from nitrite by carbonic anhydrase: a possible link between metabolic activity and vasodilation*. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol*, 2009. **297**(6): p. H2068-H2074.
80. Huang, K.T., et al., *The reaction between nitrite and deoxyhemoglobin. Reassessment of reaction kinetics and stoichiometry*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(35): p. 31126-31.
81. Gambaryan, S., et al., *Erythrocytes do not activate purified and platelet soluble guanylate cyclases even in conditions favourable for NO synthesis*. *Cell Commun Signal*, 2016. **14**(1): p. 16.
82. Bhattacharya, S., et al., *Purification and properties of insulin-activated nitric oxide synthase from human erythrocyte membranes*. *Arch Physiol Biochem*, 2001. **109**(5): p. 441-9.
83. Cortese-Krott, M.M., et al., *Human red blood cells at work: identification and visualization of erythrocytic eNOS activity in health and disease*. *Blood*, 2012. **120**(20): p. 4229-37.
84. Wood, K.C., et al., *Circulating blood endothelial nitric oxide synthase contributes to the regulation of systemic blood pressure and nitrite homeostasis*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2013. **33**(8): p. 1861-71.
85. Merx, M.W., et al., *Depletion of circulating blood NOS3 increases severity of myocardial infarction and left ventricular dysfunction*. *Basic Res Cardiol*, 2014. **109**(1): p. 398.
86. Wang, H., M. La Russa, and L.S. Qi, *CRISPR/Cas9 in Genome Editing and Beyond*. *Annu Rev Biochem*, 2016. **85**: p. 227-64.
87. Delaunay, J., et al., *Human red blood cell membrane adenylate cyclase in sickle-cell disease*. *Isr J Med Sci*, 1978. **14**(11): p. 1170-2.
88. Farfel, Z., H.R. Kaslow, and H.R. Bourne, *A regulatory component of adenylate cyclase is located on the inner surface of human erythrocyte membranes*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1979. **90**(4): p. 1237-41.
89. DeBari, V.A. and A. Bennun, *Cyclic GMP in the human erythrocyte. Intracellular levels and transport in normal subjects and chronic hemodialysis patients*. *Clin Biochem*, 1982. **15**(4): p. 219-21.
90. Khansari, N., Y. Shakiba, and M. Mahmoudi, *Chronic inflammation and oxidative stress as a major cause of age-related diseases and cancer*. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov*, 2009. **3**(1): p. 73-80.
91. Holmstrom, K.M. and T. Finkel, *Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signalling*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014. **15**(6): p. 411-21.

92. Beckhauser, T.F., J. Francis-Oliveira, and R. De Pasquale, *Reactive Oxygen Species: Physiological and Physiopathological Effects on Synaptic Plasticity*. J Exp Neurosci, 2016. **10**(Suppl 1): p. 23-48.
93. Zuo, L., et al., *Biological and physiological role of reactive oxygen species--the good, the bad and the ugly*. Acta Physiol (Oxf), 2015. **214**(3): p. 329-48.
94. Li, H. and U. Forstermann, *Nitric oxide in the pathogenesis of vascular disease*. J Pathol, 2000. **190**(3): p. 244-54.
95. Zitka, O., et al., *Redox status expressed as GSH:GSSG ratio as a marker for oxidative stress in paediatric tumour patients*. Oncol Lett, 2012. **4**(6): p. 1247-1253.
96. Kuhn, V., et al., *Red Blood Cell Function and Dysfunction: Redox Regulation, Nitric Oxide Metabolism, Anemia*. Antioxid Redox Signal, 2017. **26**(13): p. 718-742.
97. Suzuki, T. and M. Yamamoto, *Molecular basis of the Keap1-Nrf2 system*. Free Radic Biol Med, 2015. **88**(Pt B): p. 93-100.
98. Calvert, J.W., et al., *Hydrogen sulfide mediates cardioprotection through Nrf2 signaling*. Circ Res, 2009. **105**(4): p. 365-74.
99. Li, J., et al., *Nrf2 protects against maladaptive cardiac responses to hemodynamic stress*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2009. **29**(11): p. 1843-50.
100. Enomoto, A., et al., *High sensitivity of Nrf2 knockout mice to acetaminophen hepatotoxicity associated with decreased expression of ARE-regulated drug metabolizing enzymes and antioxidant genes*. Toxicol Sci, 2001. **59**(1): p. 169-77.
101. Iizuka, T., et al., *Nrf2-deficient mice are highly susceptible to cigarette smoke-induced emphysema*. Genes Cells, 2005. **10**(12): p. 1113-25.
102. Zhao, Z., et al., *Age-related retinopathy in NRF2-deficient mice*. PLoS One, 2011. **6**(4): p. e19456.
103. Chartoumpakis, D.V., et al., *Hepatic gene expression profiling in Nrf2 knockout mice after long-term high-fat diet-induced obesity*. Oxid Med Cell Longev, 2013. **2013**: p. 340731.
104. Beyer, T.A., et al., *Impaired liver regeneration in Nrf2 knockout mice: role of ROS-mediated insulin/IGF-1 resistance*. EMBO J, 2008. **27**(1): p. 212-23.
105. Godecke, A., et al., *Coronary hemodynamics in endothelial NO synthase knockout mice*. Circ Res, 1998. **82**(2): p. 186-94.
106. Friebe, A., et al., *Fatal gastrointestinal obstruction and hypertension in mice lacking nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(18): p. 7699-704.
107. Heiss, C., et al., *Plasma nitroso compounds are decreased in patients with endothelial dysfunction*. J Am Coll Cardiol, 2006. **47**(3): p. 573-9.
108. Lowry, O.H., et al., *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. J Biol Chem, 1951. **193**(1): p. 265-75.
109. Hogg, N., *Detection of nitric oxide by electron paramagnetic resonance spectroscopy*. Free Radic Biol Med, 2010. **49**(2): p. 122-9.
110. Li, H., et al., *Characterization of the effects of oxygen on xanthine oxidase-mediated nitric oxide formation*. J Biol Chem, 2004. **279**(17): p. 16939-46.
111. Weed, R.I., C.F. Reed, and G. Berg, *Is hemoglobin an essential structural component of human erythrocyte membranes?* Journal of Clinical Investigation, 1963. **42**(4): p. 581.

112. Russwurm, M. and D. Koesling, *Purification and characterization of NO-sensitive guanylyl cyclase*. *Methods Enzymol*, 2005. **396**: p. 492-501.
113. Steiner, A.L., C.W. Parker, and D.M. Kipnis, *Radioimmunoassay for cyclic nucleotides. I. Preparation of antibodies and iodinated cyclic nucleotides*. *J Biol Chem*, 1972. **247**(4): p. 1106-13.
114. Brooker, G., et al., *Radioimmunoassay of cyclic AMP and cyclic GMP*. *Adv Cyclic Nucleotide Res*, 1979. **10**: p. 1-33.
115. Harper, J.F. and G. Brooker, *Femtomole sensitive radioimmunoassay for cyclic AMP and cyclic GMP after 2'0 acetylation by acetic anhydride in aqueous solution*. *J Cyclic Nucleotide Res*, 1975. **1**(4): p. 207-18.
116. Benz, P.M., et al., *Vasodilator-Stimulated Phosphoprotein (VASP)-dependent and -independent pathways regulate thrombin-induced activation of Rap1b in platelets*. *Cell Commun Signal*, 2016. **14**(1): p. 21.
117. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. *Nature*, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
118. Erkens, R., et al., *Left ventricular diastolic dysfunction in Nrf2 knock out mice is associated with cardiac hypertrophy, decreased expression of SERCA2a, and preserved endothelial function*. *Free Radic Biol Med*, 2015. **89**: p. 906-917.
119. Schwab, D.E., J.S. Stamler, and D.J. Singel, *Nitrite-methemoglobin inadequate for hypoxic vasodilation*. *Nat Chem Biol*, 2009. **5**(6): p. 366; author reply 367.
120. Schwab, D.E., J.S. Stamler, and D.J. Singel, *EPR spectroscopy of nitrite complexes of methemoglobin*. *Inorg Chem*, 2010. **49**(14): p. 6330-7.
121. Goetz, B.I., et al., *An electron paramagnetic resonance study of the affinity of nitrite for methemoglobin*. *Nitric Oxide*, 2010. **22**(2): p. 149-54.
122. Svistunenko, D.A., et al., *The pH dependence of naturally occurring low-spin forms of methaemoglobin and metmyoglobin: an EPR study*. *Biochem J*, 2000. **351 Pt 3**: p. 595-605.
123. Piknova, B., et al., *Electron paramagnetic resonance analysis of nitrosylhemoglobin in humans during NO inhalation*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(49): p. 40583-8.
124. Grubina, R., et al., *Concerted nitric oxide formation and release from the simultaneous reactions of nitrite with deoxy- and oxyhemoglobin*. *J Biol Chem*, 2007. **282**(17): p. 12916-27.
125. Yonetani, T., et al., *Electron paramagnetic resonance and oxygen binding studies of alpha-Nitrosyl hemoglobin. A novel oxygen carrier having no-assisted allosteric functions*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(32): p. 20323-33.
126. Solano-Peralta, A., et al., *Magnetic and high-frequency EPR studies of an octahedral Fe(III) compound with unusual zero-field splitting parameters*. *Dalton Trans*, 2009(9): p. 1668-74.
127. Kleschyov, A.L., et al., *Spin trapping of vascular nitric oxide using colloid Fe(II)-diethyldithiocarbamate*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000. **275**(2): p. 672-7.
128. Maragos, C.M., et al., *Complexes of .NO with nucleophiles as agents for the controlled biological release of nitric oxide. Vasorelaxant effects*. *J Med Chem*, 1991. **34**(11): p. 3242-7.

129. Keefer, L.K., et al., "*NONOates*" (*1-substituted diazen-1-ium-1,2-diolates*) as nitric oxide donors: convenient nitric oxide dosage forms. *Methods Enzymol*, 1996. **268**: p. 281-93.
130. Tsuchiya, K., et al., Nitric oxide-forming reactions of the water-soluble nitric oxide spin-trapping agent, MGD. *Free Radic Biol Med*, 1999. **27**(3-4): p. 347-55.
131. Cortese-Krott, M.M., et al., Identification of a soluble guanylate cyclase in RBCs: preserved activity in patients with coronary artery disease. *Redox Biology*, 2018. **14**(Supplement C): p. 328-337.
132. Ferrero, R., et al., Comparative effects of several nitric oxide donors on intracellular cyclic GMP levels in bovine chromaffin cells: correlation with nitric oxide production. *Br J Pharmacol*, 1999. **127**(3): p. 779-87.
133. Garthwaite, J., et al., Potent and selective inhibition of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase by 1*H*-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-*a*]quinoxalin-1-one. *Mol Pharmacol*, 1995. **48**(2): p. 184-8.
134. Schrammel, A., et al., Characterization of 1*H*-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-*a*]quinoxalin-1-one as a heme-site inhibitor of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. *Mol Pharmacol*, 1996. **50**(1): p. 1-5.
135. Brunner, F., H. Stessel, and W.R. Kukovetz, Novel guanylyl cyclase inhibitor, ODQ reveals role of nitric oxide, but not of cyclic GMP in endothelin-1 secretion. *FEBS Lett*, 1995. **376**(3): p. 262-6.
136. Feelisch, M., et al., The soluble guanylyl cyclase inhibitor 1*H*-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-*a*]quinoxalin-1-one is a nonselective heme protein inhibitor of nitric oxide synthase and other cytochrome P-450 enzymes involved in nitric oxide donor bioactivation. *Mol Pharmacol*, 1999. **56**(2): p. 243-53.
137. Alzawahra, W.F., et al., Heme proteins mediate the conversion of nitrite to nitric oxide in the vascular wall. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2008. **295**(2): p. H499-508.
138. Koesling, D., et al., The primary structure of the larger subunit of soluble guanylyl cyclase from bovine lung. Homology between the two subunits of the enzyme. *FEBS Lett*, 1990. **266**(1-2): p. 128-32.
139. Nakane, M., et al., Molecular cloning and expression of cDNAs coding for soluble guanylate cyclase from rat lung. *J Biol Chem*, 1990. **265**(28): p. 16841-5.
140. Koesling, D., et al., The primary structure of the 70 kDa subunit of bovine soluble guanylate cyclase. *FEBS Lett*, 1988. **239**(1): p. 29-34.
141. Walpurgis, K., et al., Validated hemoglobin-depletion approach for red blood cell lysate proteome analysis by means of 2D PAGE and Orbitrap MS. *Electrophoresis*, 2012. **33**(16): p. 2537-45.
142. Barasa, B. and M. Slijper, Challenges for red blood cell biomarker discovery through proteomics. *Biochim Biophys Acta*, 2014. **1844**(5): p. 1003-10.
143. Sudo, T., H. Ito, and Y. Kimura, Phosphorylation of the vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) by the anti-platelet drug, cilostazol, in platelets. *Platelets*, 2003. **14**(6): p. 381-90.
144. Gambaryan, S., A. Friebe, and U. Walter, Does the NO/sGC/cGMP/PKG pathway play a stimulatory role in platelets? *Blood*, 2012. **119**(22): p. 5335-6; author reply 5336-7.

145. He, X. and Q. Ma, *Redox regulation by nuclear factor erythroid 2-related factor 2: gatekeeping for the basal and diabetes-induced expression of thioredoxin-interacting protein*. Mol Pharmacol, 2012. **82**(5): p. 887-97.
146. Cortese-Krott, M.M., et al., *Nitric oxide-mediated protection of endothelial cells from hydrogen peroxide is mediated by intracellular zinc and glutathione*. Am J Physiol Cell Physiol, 2009. **296**(4): p. C811-20.
147. Cortese, M.M., et al., *Zinc protects endothelial cells from hydrogen peroxide via Nrf2-dependent stimulation of glutathione biosynthesis*. Free Radic Biol Med, 2008. **44**(12): p. 2002-12.
148. Heiss, E.H., et al., *Active NF-E2-related factor (Nrf2) contributes to keep endothelial NO synthase (eNOS) in the coupled state: role of reactive oxygen species (ROS), eNOS, and heme oxygenase (HO-1) levels*. J Biol Chem, 2009. **284**(46): p. 31579-86.
149. Balligand, J.-L., O. Feron, and C. Dessy, *eNOS activation by physical forces: from short-term regulation of contraction to chronic remodeling of cardiovascular tissues*. Physiol. Rev., 2009. **89**(2): p. 481-534.
150. Suvorava, T., et al., *Impact of eNOS-Dependent Oxidative Stress on Endothelial Function and Neointima Formation*. Antioxid Redox Signal, 2015. **23**(9): p. 711-23.
151. Laursen, J.B., et al., *Endothelial regulation of vasomotion in apoE-deficient mice: implications for interactions between peroxynitrite and tetrahydrobiopterin*. Circulation, 2001. **103**(9): p. 1282-8.
152. Owan, T.E., et al., *Trends in prevalence and outcome of heart failure with preserved ejection fraction*. N Engl J Med, 2006. **355**(3): p. 251-9.
153. Gambaryan, S., et al., *Erythrocytes do not produce biologically active NO*. BMC Pharmacology & Toxicology, 2015. **16**(Suppl 1): p. A53-A53.
154. Bohmer, A., S. Gambaryan, and D. Tsikas, *Human blood platelets lack nitric oxide synthase activity*. Platelets, 2015. **26**(6): p. 583-8.
155. Park, J.W., et al., *Effect of blood nitrite and nitrate levels on murine platelet function*. PLoS One, 2013. **8**(2): p. e55699.
156. Parakaw, T., et al., *Platelet inhibition and increased phosphorylated vasodilator-stimulated phosphoprotein following sodium nitrite inhalation*. Nitric Oxide, 2017. **66**: p. 10-16.
157. Apostoli, G.L., et al., *Role of inorganic nitrate and nitrite in driving nitric oxide-cGMP-mediated inhibition of platelet aggregation in vitro and in vivo*. J Thromb Haemost, 2014. **12**(11): p. 1880-9.
158. Dautov, R.F., et al., *Hypoxic potentiation of nitrite effects in human vessels and platelets*. Nitric Oxide, 2014. **40**: p. 36-44.
159. Akrawinthawong, K., et al., *A Flow Cytometric Analysis of the Inhibition of Platelet Reactivity Due to Nitrite Reduction by Deoxygenated Erythrocytes*. PLoS ONE, 2014. **9**(3): p. e92435.
160. Corti, P., J. Tejero, and M.T. Gladwin, *Evidence mounts that red cells and deoxyhemoglobin can reduce nitrite to bioactive NO to mediate intravascular endocrine NO signaling: commentary on "Anti-platelet effects of dietary nitrate in healthy volunteers: involvement of cGMP and influence of sex"*. Free Radic Biol Med, 2013. **65**: p. 1518-20.

161. Velmurugan, S., et al., *Antiplatelet effects of dietary nitrate in healthy volunteers: involvement of cGMP and influence of sex*. Free Radic Biol Med, 2013. **65**: p. 1521-32.
162. Gladwin, M.T., et al., *The emerging biology of the nitrite anion in signaling, blood flow and hypoxic nitric oxide homeostasis*. Nature Chemical Biology, 2005. **1**: p. 308-314.
163. Chu, H., et al., *Characterization of the deoxyhemoglobin binding site on human erythrocyte band 3: implications for O<sub>2</sub> regulation of erythrocyte properties*. Blood, 2008. **111**(2): p. 932-8.
164. Salgado, M.T., et al., *Red Blood Cell Membrane-Facilitated Release of Nitrite-Derived Nitric Oxide Bioactivity*. Biochemistry, 2015. **54**(44): p. 6712-23.
165. Kleinbongard, P., et al., *Red blood cells express a functional endothelial nitric oxide synthase*. Blood, 2006. **107**(7): p. 2943-51.
166. Sheppard, H. and C. Burghardt, *Adenyl cyclase in non-nucleated erythrocytes of several mammalian species*. Biochem Pharmacol, 1969. **18**(10): p. 2576-8.
167. Sheppard, H. and C.R. Burghardt, *The stimulation of adenyl cyclase of rat erythrocyte ghosts*. Mol Pharmacol, 1970. **6**(4): p. 425-9.
168. Thomas, E.L., L.E. King, Jr., and M. Morrison, *The uptake of cyclic AMP by human erythrocytes and its effect on membrane phosphorylation*. Arch Biochem Biophys, 1979. **196**(2): p. 459-64.
169. Tsukamoto, T., et al., *Adenosine cyclic 3',5'-monophosphate uptake and regulation of membrane protein kinase in intact human erythrocytes*. Biochemistry, 1980. **19**(5): p. 918-24.
170. Hamet, P., et al., *Studies of the elevated extracellular concentration of cyclic AMP in uremic man*. J Clin Invest, 1975. **56**(2): p. 339-45.
171. Bohme, E., R. Jung, and I. Mechler, *Guanylate cyclase in human platelets*. Methods Enzymol, 1974. **38**: p. 199-202.
172. Petrov, V. and P. Lijnen, *Regulation of human erythrocyte Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange by soluble and particulate guanylate cyclase*. Am J Physiol, 1996. **271**(5 Pt 1): p. C1556-64.
173. Petrov, V., A. Amery, and P. Lijnen, *Role of cyclic GMP in atrial-natriuretic-peptide stimulation of erythrocyte Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange*. Eur J Biochem, 1994. **221**(1): p. 195-9.
174. Lijnen, P. and V. Petrov, *Atrial natriuretic peptide II and III stimulation of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange in human erythrocytes*. Methods Find Exp Clin Pharmacol, 1995. **17**(1): p. 5-13.
175. Waldman, S.A. and F. Murad, *Cyclic GMP synthesis and function*. Pharmacol Rev, 1987. **39**(3): p. 163-96.
176. Ikuta, T., S. Ausenda, and M.D. Cappellini, *Mechanism for fetal globin gene expression: role of the soluble guanylate cyclase-cGMP-dependent protein kinase pathway*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(4): p. 1847-52.
177. Conran, N., et al., *Increased soluble guanylate cyclase activity in the red blood cells of sickle cell patients*. Br J Haematol, 2004. **124**(4): p. 547-54.
178. Steinberg, M.H., et al., *Effect of hydroxyurea on mortality and morbidity in adult sickle cell anemia: risks and benefits up to 9 years of treatment*. JAMA, 2003. **289**(13): p. 1645-51.
179. Schultz, C., et al., *Cyclic AMP stimulates the cyclic GMP egression pump in human erythrocytes: effects of probenecid, verapamil, progesterone, theophylline, IBMX,*

- forskolin, and cyclic AMP on cyclic GMP uptake and association to inside-out vesicles. Biochemistry, 1998. 37(4): p. 1161-6.*
180. Boadu, E. and G. Sager, *ATPase activity and transport by a cGMP transporter in human erythrocyte ghosts and proteoliposome-reconstituted membrane extracts. Biochim Biophys Acta, 2000. 1509(1-2): p. 467-74.*
181. Klokouzas, A., et al., *cGMP and glutathione-conjugate transport in human erythrocytes. Eur J Biochem, 2003. 270(18): p. 3696-708.*
182. Wu, C.P., et al., *cGMP (guanosine 3',5'-cyclic monophosphate) transport across human erythrocyte membranes. Biochem Pharmacol, 2005. 69(8): p. 1257-62.*
183. de Wolf, C.J., et al., *cGMP transport by vesicles from human and mouse erythrocytes. FEBS J, 2007. 274(2): p. 439-50.*
184. Bor-Kucukatay, M., et al., *Effects of nitric oxide on red blood cell deformability. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003. 284: p. H1577-H1584.*
185. Tsuda, K., et al., *Nitric oxide improves membrane fluidity of erythrocytes in essential hypertension: An electron paramagnetic resonance investigation. Biochem Biophys Res Commun, 2000. 275(3): p. 946-54.*
186. Ellsworth, M.L., C.G. Ellis, and R.S. Sprague, *Role of erythrocyte-released ATP in the regulation of microvascular oxygen supply in skeletal muscle. Acta Physiol (Oxf), 2015.*
187. Baumann, R., et al., *Ontogeny of catecholamine and adenosine receptor-mediated cAMP signaling of embryonic red blood cells: role of cGMP-inhibited phosphodiesterase 3 and hemoglobin. Blood, 1999. 94(12): p. 4314-20.*
188. Foller, M., et al., *Anemia and splenomegaly in cGKI-deficient mice. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. 105(18): p. 6771-6.*
189. Ikuta, T., et al., *Nitric Oxide-cGMP Signaling Stimulates Erythropoiesis through Multiple Lineage-Specific Transcription Factors: Clinical Implications and a Novel Target for Erythropoiesis. PLoS One, 2016. 11(1): p. e0144561.*
190. Stasch, J.P., et al., *Targeting the heme-oxidized nitric oxide receptor for selective vasodilatation of diseased blood vessels. J Clin Invest, 2006. 116(9): p. 2552-61.*
191. Stasch, J.P., P. Pacher, and O.V. Evgenov, *Soluble guanylate cyclase as an emerging therapeutic target in cardiopulmonary disease. Circulation, 2011. 123(20): p. 2263-73.*
192. Siljander, P.R., *Platelet-derived microparticles - an updated perspective. Thromb Res, 2011. 127 Suppl 2: p. S30-3.*
193. Schmitz, G., et al., *European Working Group on Clinical Cell Analysis: Consensus protocol for the flow cytometric characterisation of platelet function. Thromb Haemost, 1998. 79(5): p. 885-96.*
194. Schmidt, R.F., F. Lang, and M. Heckmann, *Physiologie des Menschen - Mit Pathophysiologie. Vol. 31. 2011: Springer-Verlag Berlin.*
195. Surmeli, N.B., F.M. Muskens, and M.A. Marletta, *The Influence of Nitric Oxide on Soluble Guanylate Cyclase Regulation by Nucleotides: ROLE OF THE PSEUDOSYMMETRIC SITE. J Biol Chem, 2015. 290(25): p. 15570-80.*
196. Chen, C., T. Nakamura, and Y. Koutalos, *Cyclic AMP diffusion coefficient in frog olfactory cilia. Biophys J, 1999. 76(5): p. 2861-7.*
197. Arora, K., et al., *Compartmentalization of cyclic nucleotide signaling: a question of when, where, and why? Pflugers Arch, 2013. 465(10): p. 1397-407.*

198. Zaccolo, M., et al., *Restricted diffusion of a freely diffusible second messenger: mechanisms underlying compartmentalized cAMP signalling*. *Biochem Soc Trans*, 2006. **34**(Pt 4): p. 495-7.
199. Zabel, U., et al., *Calcium-dependent membrane association sensitizes soluble guanylyl cyclase to nitric oxide*. *Nat Cell Biol*, 2002. **4**(4): p. 307-11.
200. Linder, A.E., et al., *Dynamic association of nitric oxide downstream signaling molecules with endothelial caveolin-1 in rat aorta*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2005. **314**(1): p. 9-15.
201. Feussner, M., et al., *Association of soluble guanylate cyclase with the sarcolemma of mammalian skeletal muscle fibers*. *Acta Histochem*, 2001. **103**(3): p. 265-77.
202. Thomas, M.K., S.H. Francis, and J.D. Corbin, *Substrate- and kinase-directed regulation of phosphorylation of a cGMP-binding phosphodiesterase by cGMP*. *J Biol Chem*, 1990. **265**(25): p. 14971-8.
203. Rybalkin, S.D., et al., *Regulation of cGMP-specific phosphodiesterase (PDE5) phosphorylation in smooth muscle cells*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(5): p. 3310-7.
204. Francis, S.H., et al., *Phosphorylation of isolated human phosphodiesterase-5 regulatory domain induces an apparent conformational change and increases cGMP binding affinity*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(49): p. 47581-7.
205. Corbin, J.D. and S.H. Francis, *Cyclic GMP phosphodiesterase-5: target of sildenafil*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(20): p. 13729-32.
206. Gorin, E. and S. Dickbuch, *Adenosine 3':5'-monophosphate phosphodiesterase in chicken erythrocytes*. *FEBS Lett*, 1980. **110**(2): p. 287-91.
207. Sprague, R.S., A.H. Stephenson, and M.L. Ellsworth, *Red not dead: signaling in and from erythrocytes*. *Trends Endocrinol Metab*, 2007. **18**(9): p. 350-5.
208. Olearczyk, J.J., et al., *Receptor-mediated activation of the heterotrimeric G-protein Gs results in ATP release from erythrocytes*. *Med Sci Monit*, 2001. **7**(4): p. 669-674.
209. Sprague, R.S., et al., *Prostacyclin analogs stimulate receptor-mediated cAMP synthesis and ATP release from rabbit and human erythrocytes*. *Microcirculation*, 2008. **15**(5): p. 461-71.
210. Conti, M. and J. Beavo, *Biochemistry and physiology of cyclic nucleotide phosphodiesterases: essential components in cyclic nucleotide signaling*. *Annu Rev Biochem*, 2007. **76**: p. 481-511.
211. Adderley, S.P., et al., *Iloprost- and isoproterenol-induced increases in cAMP are regulated by different phosphodiesterases in erythrocytes of both rabbits and humans*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2009. **296**(5): p. H1617-24.
212. Adderley, S.P., et al., *Protein kinases A and C regulate receptor-mediated increases in cAMP in rabbit erythrocytes*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2010. **298**(2): p. H587-93.
213. Hanson, M.S., et al., *Phosphodiesterase 3 is present in rabbit and human erythrocytes and its inhibition potentiates iloprost-induced increases in cAMP*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2008. **295**(2): p. H786-93.
214. Tsai, E.J. and D.A. Kass, *Cyclic GMP signaling in cardiovascular pathophysiology and therapeutics*. *Pharmacol Ther*, 2009. **122**(3): p. 216-38.
215. Adderley, S.P., et al., *Identification of cytosolic phosphodiesterases in the erythrocyte: a possible role for PDE5*. *Med Sci Monit*, 2011. **17**(5): p. CR241-7.

216. Sikora, J., et al., *Hemolysis is a primary ATP-release mechanism in human erythrocytes*. Blood, 2014. **124**(13): p. 2150-7.
217. Panknin, C., *Characterization of RBC function in health and coronary artery disease*, in *Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie*. 2017, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf: Düsseldorf.
218. Friebe, A. and D. Koesling, *Regulation of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase*. Circ Res, 2003. **93**(2): p. 96-105.
219. Hofmann, F., et al., *Function of cGMP-dependent protein kinases as revealed by gene deletion*. Physiol Rev, 2006. **86**(1): p. 1-23.
220. Dimmeler, S., J. Haendeler, and A.M. Zeiher, *Regulation of endothelial cell apoptosis in atherothrombosis*. Curr Opin Lipidol, 2002. **13**(5): p. 531-6.
221. Liu, L. and J.S. Stamler, *NO: an inhibitor of cell death*. Cell Death Differ, 1999. **6**(10): p. 937-42.
222. Lang, E. and F. Lang, *Triggers, inhibitors, mechanisms, and significance of eryptosis: the suicidal erythrocyte death*. Biomed Res Int, 2015. **2015**: p. 513518.
223. Brune, B., *Nitric oxide: NO apoptosis or turning it ON?* Cell Death Differ, 2003. **10**(8): p. 864-9.
224. Nagai-Kusuhara, A., et al., *cAMP-responsive element binding protein mediates a cGMP/protein kinase G-dependent anti-apoptotic signal induced by nitric oxide in retinal neuro-glial progenitor cells*. Exp Eye Res, 2007. **84**(1): p. 152-62.
225. Sechi, A.S. and J. Wehland, *ENA/VASP proteins: multifunctional regulators of actin cytoskeleton dynamics*. Front Biosci, 2004. **9**: p. 1294-310.
226. Aktas, B., et al., *Dipyridamole enhances NO/cGMP-mediated vasodilator-stimulated phosphoprotein phosphorylation and signaling in human platelets: in vitro and in vivo/ex vivo studies*. Stroke, 2003. **34**(3): p. 764-9.
227. Shevkoplyas, S.S., et al., *Direct measurement of the impact of impaired erythrocyte deformability on microvascular network perfusion in a microfluidic device*. Lab Chip, 2006. **6**(7): p. 914-20.
228. Meram, E., et al., *Shear stress-induced improvement of red blood cell deformability*. Biorheology, 2013. **50**(3-4): p. 165-76.
229. Horn, P., et al., *Nitric oxide influences red blood cell velocity independently of changes in the vascular tone*. Free Radic Res, 2011. **45**(6): p. 653-61.
230. Grau, M., et al., *RBC-NOS-dependent S-nitrosylation of cytoskeletal proteins improves RBC deformability*. PLoS One, 2013. **8**(2): p. e56759.

## Danksagung

Diese Arbeit wurde im Zeitraum von 07/2014 bis 12/2017 im Kardiologischen Labor der Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie des Universitätsklinikums Düsseldorf angefertigt und dabei aus Mitteln der Graduiertenschule vivid (*in vivo investigations in metabolic pathomechanisms and diseases in Düsseldorf*, von 07/2014 bis 07/2015), sowie des Sonderforschungsbereichs 1116 der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Teilprojekt B06, von 08/2015 bis 09/2016) finanziell unterstützt.

Prof. Dr. Dr. Miriam M. Cortese-Krott (Leiterin des Kardiologischen Forschungslabors) gilt mein besonderer Dank für die Überlassung des Themas, der umfangreichen Betreuung und die vielen produktiven Diskussionen über dieses Thema.

Prof. Dr. Lutz Schmitt aus der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät möchte ich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens und die Rolle des Mentors danken.

Prof. Dr. Malte Kelm (Direktor der Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie) danke ich für die Möglichkeit, dass ich als naturwissenschaftlicher Doktorand an einer medizinischen Klinik promovieren und somit viel Neues lernen durfte.

Prof. Dr. Doris Koesling, Dr. Evanthia Mergia, Arkadius Pacha, Caroline Vollmers, Medah Özcan und Ulla Krabbe aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Ruhr-Universität Bochum danke ich für die Zeit, die ich dort verbringen durfte und die zahlreichen Methoden, die ich dabei gelernt habe.

Prof. Dr. Wolfgang Lubitz, Dr. Anton Savitsky, Dr. Michal Zalibera (jetzt Slowakische Technische Universität Bratislava, Slowakei) und Dr. Anna Nalepa vom MPI für chemische Energiekonversion in Mühlheim an der Ruhr möchte ich für die tolle Kooperation in Sachen EPR-Spektroskopie danken und für die Versuche, die wir dort durchführen durften.

Jun.-Prof. Barbara Sitek und Dr. Thilo Bracht vom Medizinischen Proteom-Center der Ruhr-Universität Bochum danke ich für die massenspektrometrische Identifikation, die eine wichtige Bestätigung für dieses Thema darstellt.

Prof. Dr. John Pernow und Dr. Jiangning Yang vom Karolinska Institut des Universitätskrankenhauses in Solna (Schweden) danke ich für die Durchführung der Langendorff-Experimente mit Erythrozyten, die sehr wichtige und interessante Ergebnisse ergeben haben.

Prof. Dr. Martin Feelisch von der Universität Southampton (UK) danke ich für die Kooperation und die interessante Woche, die ich in Southampton verbringen durfte.

Den Mitgliedern des Kardiologischen Labors, darunter Stefanie Becher, Wiebke Lückstädt, Dr. Christina Panknin und Thirumakal Manokaran, danke ich für die tolle Zeit in Düsseldorf und die stets freundliche (Arbeits-) Atmosphäre.

Dr. Stefan Sulmann und Dr. Henning Großekappenberg danke ich für die gute Zeit während des Erststudiums.

Danke an alle, die diese Arbeit Korrektur gelesen haben!

Nicht zu erwähnen brauche ich meine Familie, die mich immer unterstützt hat, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre und der diese Arbeit gewidmet ist.

Für die Erstellung einiger Abbildungen wurden graphische Elemente (z.B. Erythrozyten) von Servier Medical Art (Les Laboratoires Servier, Suresnes, Frankreich) verwendet, die unter der *Creative Commons Attribution 3.0 Unported*-Lizenz veröffentlicht wurden ([creativecommons.org/licenses/by/3.0](https://creativecommons.org/licenses/by/3.0)).

## Curriculum Vitae

### Persönliche Daten

Geburtsdatum: 07. Februar 1987  
Geburtsort: Oldenburg (Oldb)  
Familienstand: ledig, keine Kinder  
Staatsangehörigkeit: deutsch



### Hochschulbildung

seit 07/2014 Naturwissenschaftliche Promotion mit dem Titel „Die lösliche Guanylatcyclase als mögliches intraerythrozytäres Ziel im systemischen NO-Metabolismus“

seit 10/2016 laufend Studium der Humanmedizin an der Georg-August-Universität Göttingen

07/2014 - 09/2016 Wissenschaftlicher Mitarbeiter im Kardiologischen Forschungslabor der Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie, Universitätsklinikum Düsseldorf

10/2011 - 04/2014 Masterstudium der Chemie an der Carl-von-Ossietzky Universität Oldenburg

Abschluss: Master of Science (Note: sehr gut)  
Masterarbeit: „Funktionelle Charakterisierung von Recoverin-Isoformen und der Opsin-Kinase GRK7“, AG Biochemie der Signaltransduktion/ Neurosensorische Prozesse (Note: sehr gut)

10/2008 - 12/2011 Bachelorstudium der Chemie an der Carl-von-Ossietzky Universität Oldenburg

Abschluss: Bachelor of Science (Note: gut)  
Bachelorarbeit: „Molekulare Analyse von gelöstem organischen Material mittels ultrahochauflösender Massenspektrometrie, ein Mesokosmen-Experiment“, Max-Planck-Forschungsgruppe für Marine Geochemie (Note: sehr gut)

### Zivildienst und schulische Bildung

07/2007 - 03/2008 Fahrdienst für medizinische Proben im Großraum Niedersachsen, DRK Kreisverband Oldenburg-Stadt

08/2004 - 06/2007 Fachgymnasium für Technik, Bildungszentrum für Technik und Gestaltung Oldenburg

Abschluss: Allgemeine Hochschulzugangsberechtigung