

# **Systemische Charakterisierung des NO-Metabolismus in Abhängigkeit der eNOS Expression, dem systemischen Redox Status und der erythrozytären Funktion**

## **Inaugural-Dissertation**

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

vorgelegt von

**Frederik Barbarino**

aus Düsseldorf

Düsseldorf, Oktober 2019

aus der Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Direktor Prof. Dr. med Malte Kelm

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

Doktormutter: Prof. Dr. Dr. Miriam M. Cortese-Krott

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Holger Gohlke

Tag der mündlichen Prüfung: 11.12.2019

## Arbeitserklärung

Ich versichere, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht verwendet und die den benutzten Quellen wörtlich und inhaltlich entnommenen Stellen deutlich als solche gekennzeichnet habe.

Diese Dissertation wurde bisher weder im In- noch im Ausland als Prüfungsarbeit vorgelegt.

---

Ort und Datum

---

Unterschrift

## Publikationen

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

### Originalpublikationen:

1. T. R. Sutton, M. Minnion, **F. Barbarino**, G. Koster, B. O. Fernandez, A. F. Cumpstey, P. Wischmann, M. Madhani, M. P. Frenneaux, A. D. Postle, M. M. Cortese-Krott, M. Feelisch; *A robust and versatile mass spectrometry platform for comprehensive assessment of the thiol redox metabolome*. Redox Biology (2018)
2. R. Erkens, T. Suvorava, T. R. Sutton, B. O. Fernandez, M. Mikus-Lelinska, **F. Barbarino**, U. Flogel, M. Kelm, M. Feelisch, M. M. Cortese-Krott; *Nrf2 Deficiency unmasks the significance of nitric oxide synthase activity for cardioprotection*. Oxidative medicine and cellular Longevity (2018)
3. L. Diederich, T. Suvorava, R. Sansone, T. C. S. Keller, **F. Barbarino**, T. R. Sutton, C. M. Kramer, W. Lückstädt, B. E. Isakson, H. Gohlke, M. Feelisch, M. Kelm, M. M. Cortese-Krott; *On the effects of reactive oxygen species and nitric oxide on red blood cell deformability* Frontiers Physiology (2018)

## Abstract

**Background and hypothesis:** Nitric oxide (NO) produced by the enzyme endothelial NO synthase (eNOS) is well known to exert vasodilatory and cardioprotective effects. NO is known to be inactivated mainly by the reaction of oxyhemoglobin in the red blood cells (RBCs) leading to formation of nitrate and methemoglobin. In plasma and tissues NO can be converted into bioactive NO-metabolites including nitrite, nitrate, nitrosothiols/nitrosoamines (RXNO) and nitrosylhemoglobin (HbNO); each metabolite was shown to be potential sources of NO and to be converted back to NO by enzymatic and non enzymatic reactions. In the individual organs of the body NO-metabolism is subject to different influencing factors, including the cellular redox state affecting the oxidation of NO and therefore its bioavailability is regulated by enzymatic and non-enzymatic pathways.

**Aim & Goals:** Aim of this study is to investigate how systemic NO-metabolism is affected by changes in eNOS activity/expression, by the number of circulating RBCs, or by redox state. Changes in NO-metabolism are investigated (1) in gene targeted mice by gradual removal of eNOS from endothelium/RBCs/in all tissues, (2) by activation of eNOS via shear stress in an exercise model and (3) by removal of RBCs by inducing blood loss or phenylhydrazine (PHZ)-induced oxidative stress and hemolysis.

**Results:** The experiments have shown that a lower activity of eNOS in endothelial specific, RBC specific or global eNOS knock out (KO) mice leads to decrease of nitrite and nitrate concentrations, mainly in the plasma. Similar changes were found in PHZ-induced anemia where increased oxidative stress (demonstrated by decreased pool of glutathione (GSH)) corresponds to decreased NO bioavailability. Stimulation of eNOS activity by voluntary exercise or decreasing the number of circulating RBCs by bleeding affects the GSH pool in plasma in less extent but does not affect NO-bioavailability, as demonstrated by no significant changes in nitrite/nitrate levels in plasma. In addition, PHZ anemia shows that oxidative stress leads to a lower NO-bioavailability, to a decreased RBC deformability and to a shorter lifespan. In these mice, decreased levels of the second messenger cyclic guanosine monophosphate (cGMP) were found, pointing to an oxidative stress mediated loss of the NO-receptor soluble guanylate cyclase (sGC) activity in RBCs. Adenosine and

RXNO are increased in plasma, which are parameters indicating hypoxia and oxidative stress.

**Summary:** These data demonstrate that changes in NO metabolism are closely linked to eNOS expression/activity and global redox state. Changes in NO-metabolism are mainly found in plasma and result in lower circulating levels of nitrate and nitrite.

## Zusammenfassung

**Hintergrund und Hypothese:** Stickstoffmonoxid (NO) wird vom Enzym endotheliale NO-Synthase (eNOS) produziert und hat vasodilatatorische und kardioprotektive Wirkungen. Es ist bekannt, dass NO hauptsächlich durch die Reaktion von Oxyhämoglobin in den Erythrozyten inaktiviert wird, was zur Bildung von Nitrat und Methämoglobin führt. In Plasma und Gewebe kann NO in bioaktive NO-Metabolite umgewandelt werden, einschließlich Nitrit, Nitrat, Nitrosothiolen/Nitrosoaminen (RXNO) und Nitrosylhämoglobin (HbNO). Es wurde gezeigt, dass jeder Metabolit potentielle NO-Quellen darstellt und durch enzymatische und nicht-enzymatische Reaktionen wieder in NO umgewandelt werden kann. In den einzelnen Organen des Körpers unterliegt der NO-Metabolismus verschiedenen Einflussfaktoren, wie dem zellulären Redox Status, welcher die Oxidation von NO beeinflusst. Die Bioverfügbarkeit von NO ist durch enzymatische und nicht-enzymatische Wege reguliert.

**Zielsetzung:** Ziel dieser Studie ist es zu untersuchen, wie der systemische NO-Metabolismus durch Änderungen der eNOS-Aktivität/Expression, durch die Anzahl der zirkulierenden Erythrozyten oder durch den Redox Status beeinflusst wird. Änderungen des NO-Metabolismus werden untersucht (1) bei Knock out (KO) Mäusen durch schrittweise Entfernung der eNOS aus Endothel/Erythrozyten/global, (2) durch Stimulierung der eNOS durch Scherstress in einem Exercise-Modell und (3) durch Entfernung von Erythrozyten durch Blutverlust oder Phenylhydrazin (PHZ) induziertem oxidativem Stress und der damit verbundenen Hämolyse.

**Ergebnisse:** Die Experimente haben gezeigt, dass eine geringere Aktivität von eNOS im Endothel, Erythrozyten oder globalen eNOS KO Mäusen die Nitrit und Nitrat Konzentrationen verringert - hauptsächlich im Plasma. Ähnliche Veränderungen wurden bei der PHZ induzierten Anämie festgestellt, bei der ein erhöhter oxidativer Stress (erkennbar durch einen verringerten Pool von Glutathion (GSH)) mit einer verringerten NO-Bioverfügbarkeit einhergeht. Die Stimulierung der eNOS-Aktivität durch freiwilliges Training oder die Verringerung der Anzahl zirkulierender Erythrozyten durch Blutverlust beeinflusst den GSH-Pool im Plasma in geringerem Maße, jedoch nicht die NO-Bioverfügbarkeit, da keine signifikanten Änderungen der Nitrit und Nitrat Konzentrationen im Plasma

nachgewiesen wurden. Darüber hinaus zeigt die PHZ-Anämie, dass oxidativer Stress zu einer geringeren NO-Bioverfügbarkeit bei Erythrozyten, einer schlechteren Verformbarkeit und einer kürzeren Lebensdauer dieser führt. Bei diesen Mäusen wurde festgestellt, dass verringerte Konzentrationen des cyclischen Guanosinmonophosphats (cGMP) auf einen oxidativen Stress bedingten Verlust der Aktivität der als NO-Rezeptor dienenden löslichen Guanylatcyclase (sGC) in Erythrozyten hindeuten. Adenosin und RXNO sind im Plasma erhöht. Dies sind Parameter, die auf Hypoxie und oxidativen Stress hinweisen.

**Zusammenfassung:** Diese Daten zeigen, dass Änderungen des NO-Metabolismus eng mit dem Enzym eNOS und dem Redox Status verbunden sind. Veränderungen des NO-Metabolismus sind hauptsächlich im Plasma zu finden und führen zu niedrigeren Nitrat und Nitrit Konzentrationen.

# Inhaltsverzeichnis

Arbeitserklärung.....	III
1 Einleitung.....	1
1.1 Die Stickstoffmonoxidsynthase .....	1
1.2 Der NO-Metabolismus.....	2
1.3 Die Rolle der Erythrozyten im NO-Metabolismus:.....	3
1.4 Redox Status und ROS Bildung .....	5
1.5 Xanthinoxidoreduktase und Nucleotidphoshat Abbau.....	7
1.6 Ziele der Dissertation .....	9
2 Material und Methoden.....	11
2.1 Transnitrosierung zur Bestimmung von RXNO mittels CLD .....	13
2.2 Bestimmung der NOx-Metabolite mittels CLD und ENO .....	14
2.2.1 Probennahme und -vorbereitung von Gewebe und Vollblut .....	14
2.2.2 Chemilumineszenzdetektion – CLD.....	14
2.2.3 HPLC basierte Detektion - ENO .....	16
2.3 Bestimmung von Thiolen und Nucleotidphosphaten mittels UPLC- QToF.....	17
2.3.1 Aufbau der UPLC-QToF.....	17
2.3.2 Quantifizierung von Thiolen .....	21
2.3.3 Quantifizierung von Nucleotidphosphaten und Nucleosiden.....	24
2.4 SDS-Page.....	25
2.5 Proteinbestimmung.....	25
2.6 Messung der Verformbarkeit von Erythrozyten und Blutviskosität .....	25
2.7 Mausmodelle.....	25
2.8 Endothel spezifische KO Mäuse durch Behandlung mit Tamoxifen .....	27
2.9 Exercise Mäuse.....	27
2.10 Induzierung der Blutverlust Anämie und der Phenylhydrazin Anämie.....	27

2.11	Statistik.....	28
3	Ergebnisse .....	29
3.1	Validierung Thiol-Methode .....	29
3.2	Validierung Nucleotidphosphat-Methode .....	30
3.3	Nitrosierung von Amin- und Thiolgruppen .....	32
3.4	eNOS KO Mauslinien und Nrf2 KO Mäuse.....	36
3.5	EC eNOS KO Mäuse Exercise-Modell.....	42
3.6	Blutverlust Anämie .....	46
3.7	PHZ induzierte Anämie .....	50
3.8	Zusammenfassung Thiol- und NOx-Konzentrationen aller Experimente .....	57
4	Diskussion.....	64
4.1	Methodenetablierung zur Analyten Messung in biologischen Matrices.....	64
4.2	Nitrosothiole und Nitrosoamine sind stabile Produkte .....	66
4.3	Einfluss der fehlenden eNOS auf den NO-Metabolismus der KO-Mäusen.....	67
4.3.1	Besondere Rolle der Organe im NO-Metabolismus von globalen eNOS KO Mäusen.....	67
4.3.2	Fehlende eNOS im Endothel führt zu geringerer NO Verfügbarkeit in Erythrozyten .....	68
4.3.3	Geringere HbNO Konzentration in erythrozytären eNOS KO Mäusen .....	69
4.3.4	Geringere Redoxkapazität steigert eNOS Aktivität in Nrf2 KO Mäusen .....	69
4.3.5	Schlußfolgerungen zu den Experimenten der eNOS KO Mäusen .....	70
4.4	Geringere Redoxkapazität im Plasma bei Exercise Mäusen .....	70
4.5	Blutverlust Anämie .....	71
4.5.1	Vermehrter oxidativer Stress im Herzen.....	72
4.5.2	Niedrigere HbNO Konzentration in anämischen Mäusen.....	73
4.5.3	Vermehrter oxidativer Stress senkt Lebensspanne der Erythrozyten .....	74
4.6	Phenylhydrazin Anämie.....	74

4.6.1	Oxidativer Stress führt zum Verlust erythrozytärer Funktionen .....	75
4.6.2	Endothel Relaxationsfaktoren RXNO und Adenosin sind im Plasma erhöht .....	77
4.6.3	Interpretation der Wirkung der Adenosin Konzentration auf die Aorta .....	77
4.6.4	Vermehrter Schutz vor oxidativem Stress im Herzen .....	79
4.6.5	Milz filtert freies Hämoglobin aus dem Blutkreislauf .....	79
5	Schlussfolgerungen und Ausblick .....	81
6	Verzeichnisse .....	84
6.1	Tabellenverzeichnis .....	84
6.2	Abbildungsverzeichnis .....	85
6.3	Literaturverzeichnis .....	86

## Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintri-phosphat
BH <sub>4</sub>	Tetrahydrobiopterin
BSA	Bovins serum albumin
BSA-NO	Nitrosiertes Bovins serum albumin
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
cGMP	Cyclisches Guanosinmonophosphat
CLD	Chemilumineszenz Detektion
CTRL	Kontroll- und Vergleichsgruppe
Cys	Cystein
CysNO	S-nitroso-cystein
CySS	Cysteindisulfid
DAD	Diodenarraydetektor (UV/VIS Detektor)
dGTP	deoxyGuanosintri-phosphat
DTPA	Diethylentriaminpentaessigsäure (Chelator)
DTT	Dithiothreitol
EC eNOS KO neg/pos Tam	Endothelial cell eNOS KO mit der Kontrollgruppe Neg Tam
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäuren
EI	Elongation Index
EIC	Extracted Ion Chromatogram, zeigt ein einzelnes m/z-Verhältnis
eNOS	Endotheliale NO-Synthase
FAD	Flavinadenindinukelotid
FLD	Fluoreszenzdetektor
FMN	Flavinmononukleotid
GDP	Guanosindiphosphat
Globale eNOS KO	KO Maus mit fehlendem eNOS im gesamten Körper
GMP	Guanosinmonophosphat
GPX	Glutathionperoxidase
GR	Glutathion Reductase
GSH	Glutathion
GSNO	S-Nitroso-Glutathion
GSSG	Glutathiondisulfid
GTP	Guanosintri-phosphat
Hb	Hämoglobin
HbNO	Nitrosyliertes Hämoglobin
HCys	Homo-Cystein
HCySS	Homo-Cysteindisulfid
Hkt	Hämatokrit
i.p.	Intraperitoneale Injektion
LANUV	Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz
LOD	Limit of detection

LOQ	Limit of quantification
MCH	Mean corpuscular Hemoglobin
NEM	N-Ethylmaleimide
NO	Stickstoffmonoxid
NOx	NO-Metabolite: Nitrat, Nitrit, RXNO, HbNO
Nrf2 KO	KO Maus mit fehlendem Nuclear factor erythroid-derived 2 Transkriptionsfaktor (Nrf2)
PKG	Proteinkinase G
PBS	Phosphate buffered saline
PHZ	Phenylhydrazin
QToF	Quadrupol time of flight
RBC	Erythrozyten
RBC eNOS KO	KO Maus mit fehlendem eNOS Enzym in den Erythrozyten
RNNO	Nitrosoamin
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RP	Unpolare stationäre Phase der Säulenchromatographie
RSNO	Nitrosothiol
RT	Retentionszeit
RXNO	Summe aus Nitrosoamin und -thiol
sGC	lösliche Guanylatcyclase
SSA	5-Sulfo-salicylsäure dihydrat
TIC	Total Ion Chromatogram, zeigt alle m/z-Verhältnisse
UPLC-QToF	Ultrapressure liquid chromatography- Quadrupol time of flight
WT	Wild Typ Maus
XDH	Xanthindehydrogenase
XO	Xanthinoxidase
XOR	Xanthinoxidoreductase

# 1 Einleitung

Im Jahr 2015 wurden in Deutschland 38,5 % aller Todesfälle auf Herz- und Kreislauferkrankungen zurückgeführt.<sup>1</sup> Im Jahr 2016 blieb diese Todesursache vergleichsweise hoch mit einem Anteil von 37,2%.<sup>2</sup> Die weitere Erforschung kardiovaskulärer Zusammenhänge ist deswegen weiterhin ein wichtiges Ziel. Die Forschungsausgaben im Bereich der kardiovaskulären Forschung wurden im Jahr 2017 auf 253 Mio. € geschätzt.<sup>3</sup> Ein sehr beachtetes Feld dieser Forschung stellt der Stickstoffmonoxid (NO) Metabolismus und die damit verknüpfte Vasodilatation – die Erweiterung der Gefäße - dar. 1998 wurde an die drei Amerikaner R. F. Furchgott, L. J. Ignarro und F. Murad der Nobelpreis für Medizin und Physiologie<sup>4 5</sup> verliehen. Sie erforschten die Bedeutung von NO als Signalmolekül im kardiovaskulären System.

Bis heute ist vieles über die Entstehung und Wirkung von NO im Körper unbekannt. Es konnte gezeigt werden, dass NO unter wechselnden Bedingungen auf verschiedene Weisen gebildet werden kann. Das genauere Verständnis des NO-Metabolismus, der Zusammenhang zwischen dessen Metaboliten Nitrat, Nitrit, Nitrosothiolen und Nitrosoaminen (zusammen RXNO) und NO, sowie die Nutzung dieses Wissens für therapeutische Maßnahmen sind Gegenstand aktueller Forschung. Diese Dissertation soll einen Beitrag zum Verständnis der Änderungen im NO-Metabolismus unter verschiedenen Bedingungen leisten.

## 1.1 Die Stickstoffmonoxidsynthase

Das Enzym Stickstoffmonoxidsynthase kurz NOS ist eine NO-Synthase und existiert in drei Isoformen: endotheliale - eNOS, inducible - iNOS und neuronale - nNOS. Das Enzym nNOS wurde aus Neuronen isoliert und die iNOS aus Makrophagen. Letztere spielt eine Rolle in Entzündungsprozessen. Die eNOS konnte 1989 erstmals im Endothel nachgewiesen werden.<sup>6</sup> Das Enzym konnte mittlerweile auch in Erythrozyten nachgewiesen werden.<sup>7</sup> Zur NO Produktion dient der eNOS das Substrat L-Arginin, O<sub>2</sub>, Nicotinamadenindinukleotidphosphat (NADPH) und die Cofaktoren Tetrahydrobiopterin (BH<sub>4</sub>), Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD), Flavinmononukleotid (FMN), Häm und Calmodulin. Die Edukte sind L-Citrullin, NADP, H<sub>2</sub>O und NO.<sup>8</sup> Das Homodimer besteht aus einer Reductase Domäne und einer Oxygenase Domäne.<sup>9</sup> An der Hämgruppe wird der Sauerstoff

reduziert um L-Arginin zu L-Citrullin und NO zu oxidieren.<sup>10</sup> BH<sub>4</sub> hält das Enzym in seiner Dimerform stabil und so auch aktiv.<sup>11</sup> Die Bindung von Calmodulin ist abhängig von der intrazellulären Kalzium Konzentration. Schon bei geringen Konzentrationen bindet Calmodulin an die eNOS und fördert den Elektronentransport im Enzym.<sup>12</sup> Die Regulation der eNOS wird ferner über die Phosphorylierung und die Verfügbarkeit des Substrats gesteuert.<sup>13</sup> Ein weiterer Einflussfaktor stellt der Scherstress dar, welcher auf die Erythrozyten und die Gefäßwände im Blutkreislauf wirkt. Ein erhöhter Scherstress führt zu einer höheren eNOS Aktivität.<sup>14</sup>

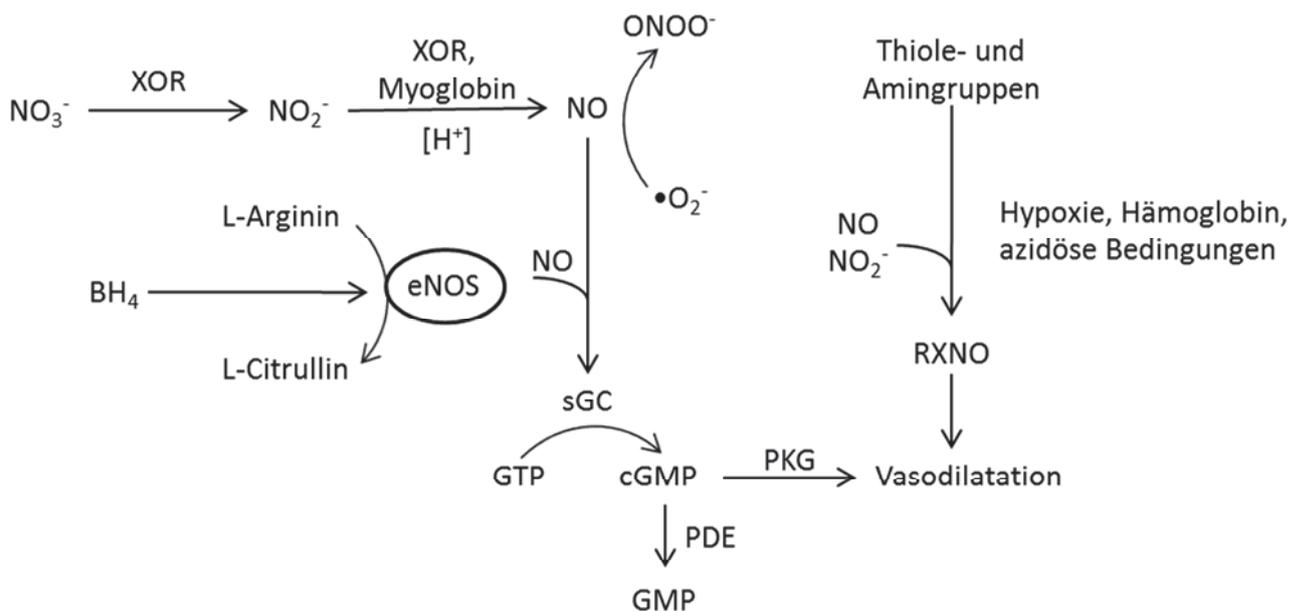
Liegt der Cofaktor BH<sub>4</sub> in einer geringen Konzentration oder oxidiert vor, führt dies zu einer entkoppelten eNOS. Die Elektronentransportkette im Enzym zum L-Arginin ist unterbrochen.<sup>15</sup> Unter diesen Umständen wird von der eNOS ROS produziert.<sup>16</sup>

## 1.2 Der NO-Metabolismus

Als NO<sub>x</sub>-Metabolite gelten Nitrat, Nitrit, RXNO und Nitrosylhämoglobin (HbNO). Die Metabolite können im Körper ineinander umgeformt werden. NO kann zu Nitrat und Nitrit oxidiert werden. Die Oxidierung von Thiolen und Aminen führt zu RXNO. Nitrit und Nitrat werden mit der Nahrung aufgenommen und können im Körper zu NO umgeformt werden. Sie stellen somit einen NO-Pool für die Vasodilatation dar. Nitrat kann im Mund durch Bakterien reduziert werden.<sup>17</sup> Myoglobin ist ein Protein mit einer Hämgruppe, welches in den Gefäßen und dem Herzen vorkommt und Nitrit zu NO reduziert.<sup>18</sup> Auch die Enzyme Xanthinoxidoreduktase (XOR) und endotheliale Stickstoffmonoxidsynthase (eNOS) nehmen am NO-Metabolismus teil. RXNO setzt sich aus Nitrosothiolen (RSNO) und Nitrosoaminen (RNNO) zusammen, bei denen NO an Thiolen und Aminen gebunden ist.<sup>19</sup> Nitrosothiole machen den größeren Anteil an RXNO aus. Eine Nitrosierung von Thiolen mit NO bzw. Nitrit kann unter folgenden Bedingungen erfolgen: Unter hypoxischen Bedingungen und Einflussnahme des Eisens im Hämoglobin,<sup>20</sup> unter sauren Bedingungen und unter Einfluss von reaktiven Sauerstoffspezies (reactive oxygen species - ROS).<sup>21 22</sup> Die Funktionen von RXNO sind vielfältig: Hemmung von Enzymaktivitäten,<sup>23</sup> Signalweitergabe<sup>24</sup> und vasodilatative Effekte.<sup>25</sup> Es wird in der Literatur diskutiert, inwieweit Nitrosospezies stabil genug sind, um für physiologische Effekte verantwortlich zu sein.<sup>26 27</sup> Diese Tatsache wird hier näher beleuchtet. Das NO kann zwischen den Thiolen und Aminen weitergegeben werden. Dieser Vorgang wird Transnitrosierung genannt und konnte in vivo nachgewiesen

werden.<sup>28</sup> HbNO wird im Zusammenhang mit dem Hämoglobin der Erythrozyten in Kapitel 1.3 näher erläutert.

Die vasodilatative Eigenschaft von NO wird über eine Signalkaskade ausgelöst: Das entstandene NO bindet an die Eisengruppe der löslichen Guanylatcyclase (soluble guanylate cyclase – sGC) und aktiviert dieses Enzym, welches aus Guanosintriphosphat (GTP) cyclisches Guanosinmonophosphat (cGMP) produziert.<sup>29 30</sup> Das Produkt cGMP wirkt durch Aktivierung der Proteinkinase G (PKG) vasodilatativ und wird durch die Phosphodiesterase (PDE) zu Guanosinmonophosphat (GMP) abgebaut. Oxidativer Stress führt zur Oxidierung des Eisens der sGC von  $Fe^{2+}$  zu  $Fe^{3+}$ . In diesem Redoxzustand kann die sGC kein NO mehr binden und ist inaktiv.<sup>31</sup> **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.** zeigt eine Übersicht über den NO-Metabolismus.



**Abbildung 1: Übersicht über den NO-Metabolismus**

Die Grafik liefert eine kurze Übersicht über den NO-Metabolismus wie er bisher bekannt ist. Der NO-Metabolismus in den Erythrozyten ist hier nicht aufgeführt. Nitrat und Nitrit können durch Enzyme zu NO reduziert werden. Weiterhin kann NO über die eNOS produziert werden. NO kann durch  $\bullet O_2^-$  zu Peroxynitrit reagieren. NO aktiviert die sGC und es wird aus GTP cGMP geformt, welches vasodilatativ wirkt. RXNO wird durch Hämoglobin oder unter hypoxischen und azidösen Bedingungen aus NO und Nitrit geformt.

### 1.3 Die Rolle der Erythrozyten im NO-Metabolismus:

Die Erythrozyten spielen eine zentrale Rolle im NO-Kreislauf und können unter hypoxischen Bedingungen selbst NO durch die Membran abgeben.<sup>32</sup> Sie dienen somit nicht nur als Transporter für Sauerstoff, sondern auch für NO. Zudem wird den Erythrozyten eine

Kontrollfunktion bei der NO Verfügbarkeit für das Endothel zugesprochen. Durch das Einfangen und Binden von NO aus dem Gefäßlumen kann der Gefäßtonus reguliert werden.<sup>33 34 35</sup> Beim Durchströmen der Blutgefäße müssen die Erythrozyten sehr elastisch sein und sind Scher Belastungen ausgesetzt. Dieser Scherstress nimmt vor allem bei erhöhtem Blutdruck z.B. durch Sport zu.<sup>36</sup> Es konnte gezeigt werden, dass NO die Deformierbarkeit der Erythrozyten in pro-oxidativen Bedingungen und so deren Funktion erhalten kann.<sup>37</sup> Dabei reagiert NO mit den Thiolen des Membranproteins Spektrin und kann diese vor einer möglichen Oxidation durch ROS schützen.<sup>38</sup>

Erythrozyten sind größtenteils mit Hämoglobin gefüllt. Das Protein ist eine Besonderheit im NO-Metabolismus, es kann in seinen unterschiedlichen Formen, welche durch Sauerstoff und Redoxreaktionen modifiziert werden können, verschiedene Reaktionen katalysieren. Es wird vermutet, dass Hämoglobin eine regulatorische Funktion für die Freisetzung von NO aus den Erythrozyten übernimmt.<sup>39</sup> Als Deoxyhämoglobin hat es Eigenschaften, welche einem Fänger von NO gleichkommen.<sup>40</sup> In dieser Reaktion wird nitrosyliertes Hämoglobin (HbNO) gebildet. Der HbNO Wert wird daher gerne als Marker für die Bioverfügbarkeit von NO in den Erythrozyten genommen. Deoxyhämoglobin kann bei Azidose und Hypoxie Nitrit zu NO reduzieren.<sup>41 42</sup> Oxyhämoglobin kann NO oxidieren und wird dabei selbst zu Methämoglobin umgeformt.<sup>43</sup> Methämoglobin kann genauso wie Deoxyhämoglobin mit NO reagieren. Diese Reaktion ist jedoch aufgrund des geringen Anteils von Methämoglobin, 2 % am Gesamt Hämoglobin Gehalt, selten und verläuft reversibel.<sup>44</sup> Der Einfluss auf den NO-Metabolismus und die Präsenz der erläuterten Reaktionen mit Hämoglobin sind stark vom jeweiligen Milieu in den Erythrozyten abhängig. Um das Eisen der Hämgruppe im reduzierten, sauerstoffbindenden Zustand  $Fe^{2+}$  zu halten existieren mehrere Enzyme.<sup>45</sup> Auch eine Nitrosierung von Thiol-Gruppen des Hämoglobins ist möglich, spielt jedoch angesichts einer geringeren Reaktionsgeschwindigkeit als mit dem Eisen der Häm-Gruppe eine untergeordnete Rolle.<sup>46</sup>

Neben den besonderen Eigenschaften des Hämoglobins nehmen auch enzymatische Reaktionen in den Erythrozyten am NO-Metabolismus teil. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl die Menge als auch die Enzymaktivität der eNOS in Erythrozyten mit der in Endothelzellen vergleichbar ist.<sup>47 48</sup> Ein Fehlen des Enzyms führte in chimären Mäusen, welche keine eNOS im Blut haben zu geringeren Nitrit Konzentrationen.<sup>7</sup> In der Literatur

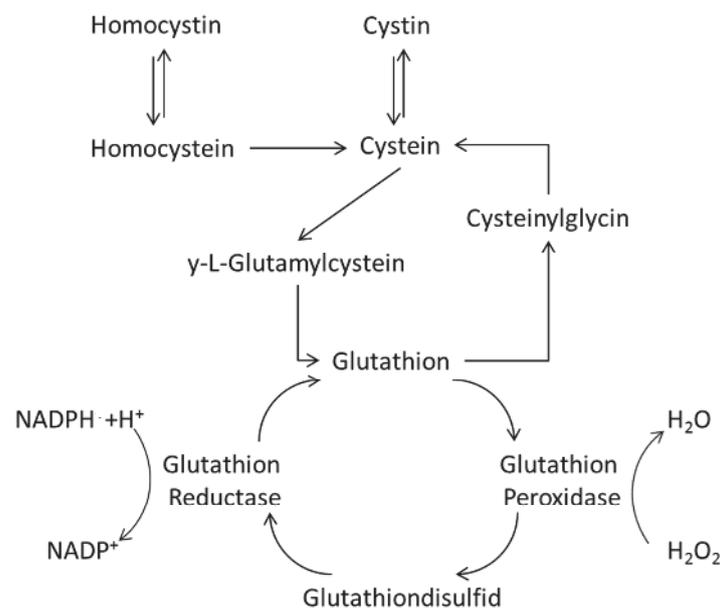
wird diskutiert, ob das Enzym XOR und Ascorbinsäure NO aus Nitrit formen können. Es ist jedoch nach wie vor umstritten, ob XOR in den Erythrozyten vorkommt.<sup>49</sup> Die Rolle der Ascorbinsäure für den NO-Metabolismus in den Erythrozyten ist unklar.

#### 1.4 Redox Status und ROS Bildung

Für die Zelle ist es wichtig den Redox Status in einem Gleichgewicht zu halten, da viele Prozesse davon abhängig sind. So sind z.B. Redoxäquivalente wie NADP oder FAD als Coenzyme bei der Phosphorylierung nötig. Redoxveränderungen im Mikromilieu von Enzymen z.B. die Oxidierung von Thiolgruppen gelten auch als Signalwege.<sup>50</sup> Enzyme und Antioxidantien fangen Radikale ein und verhindern ein ungewolltes Oxidieren von Nucleinsäuren, Fettsäuren, Thiolen und Metallkomplexen in Enzymen. Bei den reaktiven Spezies unterscheidet man zwischen reaktiven Sauerstoffspezies wie  $\bullet\text{O}_2^-$ ,  $\text{HO}\cdot$ ,  $\text{ROO}\cdot$ ,  $\text{RO}\cdot$  und  $\text{H}_2\text{O}_2$  und den reaktiven Stickstoffspezies zu denen  $\text{NO}\cdot$  und Peroxynitrit ( $\text{ONOO}^-$ ) gehören. Peroxynitrit entsteht bei der Reaktion von  $\text{NO}\cdot$  mit  $\bullet\text{O}_2^-$ .<sup>51</sup>  $\text{H}_2\text{O}_2$  und  $\bullet\text{O}_2^-$  werden überwiegend endogen in den Mitochondrien sowie durch die NADPH Oxidase an der Zellmembran produziert. Auch exogen zugeführte Substanzen wie Phenylhydrazin (PHZ) oder das Rauchen von Zigaretten können ROS produzieren. ROS kann zu Änderungen der Oxidationsstufe von Metallen in Enzymen, die Enzymaktivität senken oder zu einer kompletten Inhibierung führen. In den Erythrozyten führt oxidativer Stress zu einer geringeren Verformbarkeit.<sup>37</sup> Veränderungen im Redox Status der Zelle können letztendlich auch zur Zellapoptose führen. Eine Veränderung des Redox Status in der Zelle kann bei Erkrankungen wie Krebs<sup>52</sup>, Diabetes<sup>53</sup> und kardiovaskulären Krankheiten beobachtet werden. Glutathion (GSH) konnte ein kardioprotektiver Effekt gegenüber Ischämie und Reperfusionsschäden nachgewiesen werden.<sup>54</sup>

Zur Aufrechterhaltung des Redox Status kommen mehrere Antioxidantien und Enzyme zum Einsatz. Besonders Proteine und Peptide mit Thiolgruppen eignen sich aufgrund der Oxidierbarkeit der SH-Gruppe als Redoxsensor. Neben Thioredoxin, Ascorbinsäure und Polyphenolen ist vor allem das Tripeptid GSH in hohen Konzentrationen im Körper als Antioxidationsmittel wirksam. Bei der Umsetzung der Thiolgruppe mit ROS wird diese oxidiert und das korrespondierende Disulfid (GSSG) gebildet. Diese Reaktion wird vom Enzym Glutathion Peroxidase (GPx) katalysiert, zur Rückführung in den reduktiven Zustand wird Glutathion Reduktase (GR) benötigt. Für die Bildung von GSH werden Cystein (Cys) und

Homocystein als Precursor verwendet. Die Reaktionen sind schematisch in Abbildung 2 zu sehen. Weitere Enzyme, welche ROS abbauen, sind die Superoxiddismutase (SOD), welche  $\bullet\text{O}_2^-$  zu  $\text{H}_2\text{O}_2$  umwandelt und die Katalase, welche  $\text{H}_2\text{O}_2$  zu  $\text{H}_2\text{O}$  und  $\text{O}_2$  katalysiert. Wichtig für eine Antwort auf oxidativen Stress ist der Nuclear factor erythroid-derived 2 Transkriptionsfaktor (Nrf2). Nrf2 ist ein Regulator für die Expression mehrerer antioxidativ wirkender Enzyme, wie Glutathion GPx<sup>55</sup> aber auch verantwortlich für die Synthese von GSH und Thioredoxin.<sup>56</sup>



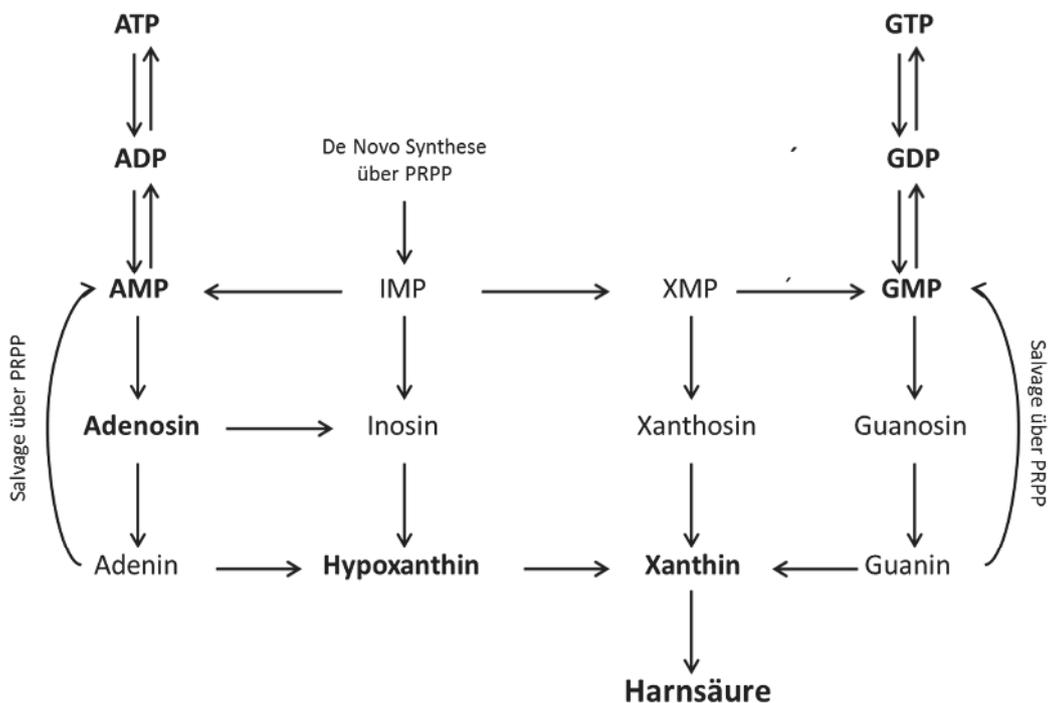
**Abbildung 2: GSH Synthese und Reaktionsweg zu Glutathiondisulfid**

Synthese von GSH aus den Thiolen Cystein, Homocystein und den Disulfiden. Abbau von  $\text{H}_2\text{O}_2$  durch GPx und damit verbundene Oxidierung von GSH. Es wird GSSG gebildet, welches durch GR wieder zu GSH reduziert werden kann.

Der Redox Status einer Zelle lässt sich durch Thioloxydationen ausdrücken. Oft wird der Redox Status durch das Verhältnis von oxidiertem zu reduziertem Anteil der Thiole ausgedrückt. Hierzu werden die Konzentrationen von GSSG zu GSH gemessen. Je höher der Anteil von oxidiertem GSSG, desto mehr liegt das Gleichgewicht im oxidativen Milieu. Eine weitere Möglichkeit ist die Messung von ROS oder der Ausdruck als Redoxpotential über die Nernstgleichung.<sup>57</sup> Der gesamte Redox Status lässt sich jedoch wie oben beschrieben nicht ausschließlich aus dem Verhältnis von GSH zu GSSG oder dem Redoxpotential bestimmen. Diese Ergebnisse geben lediglich eine Tendenz wieder.<sup>58</sup>

## 1.5 Xanthinoxidoreduktase und Nucleotidphosphat Abbau

Xanthinoxidoreduktase spielt vor allem im Purinabbau eine große Rolle. Das Homodimer besteht aus je einem Eisen-Schwefel Cluster mit einem FAD Molekül. Molybdän bildet das aktive Zentrum dieses Enzyms und ist an der Oxidationsreaktion der Purine maßgeblich beteiligt. Alle Nucleotidphosphate und Nucleoside werden zum Purin Hypoxanthin umgewandelt. Das Enzym katalysiert den Abbau von Hypoxanthin zu Xanthin und schließlich zur Harnsäure. Abbildung 3 zeigt die Abbauwege der Nucleotidphosphate. Das Enzym kommt aufgrund dieser Funktion des Purinabbaus überwiegend in Leber, Epithelzellen und Niere vor, allerdings auch in anderen Geweben wie der Aorta.<sup>59 60</sup> Der Eisen-Schwefel Cluster dient zum Elektronentransfer zwischen dem Elektronenakzeptor  $\text{NAD}^+$  bzw.  $\text{O}_2$  welcher an der Flavinseite<sup>61</sup> andockt und dem Elektronendonator Hypoxanthin/Xanthin welcher am aktiven Zentrum bindet.<sup>62 63</sup> Der Elektronenakzeptor wird zu  $\text{NADH}+\text{H}^+$  bzw.  $\text{O}_2^-$  reduziert. Hypoxanthin wird zu Xanthin und Xanthin zur Harnsäure oxidiert und schließlich über den Urin ausgeschieden.



**Abbildung 3: Abbauwege der Nucleotidphosphate**

Die Nucleotidphosphate werden zu ihren Nucleosiden abgebaut. Aus Adenosin und Adenin entsteht Hypoxanthin. Die Guanosinphosphate werden zu Xanthosin abgebaut. Xanthosin und Hypoxanthin werden zu Xanthin abgebaut und Xanthin schließlich zur Harnsäure. Der Abbau von Hypoxanthin und Xanthin ist XOR katalysiert. Adenin und Guanin können über den Recyclingweg

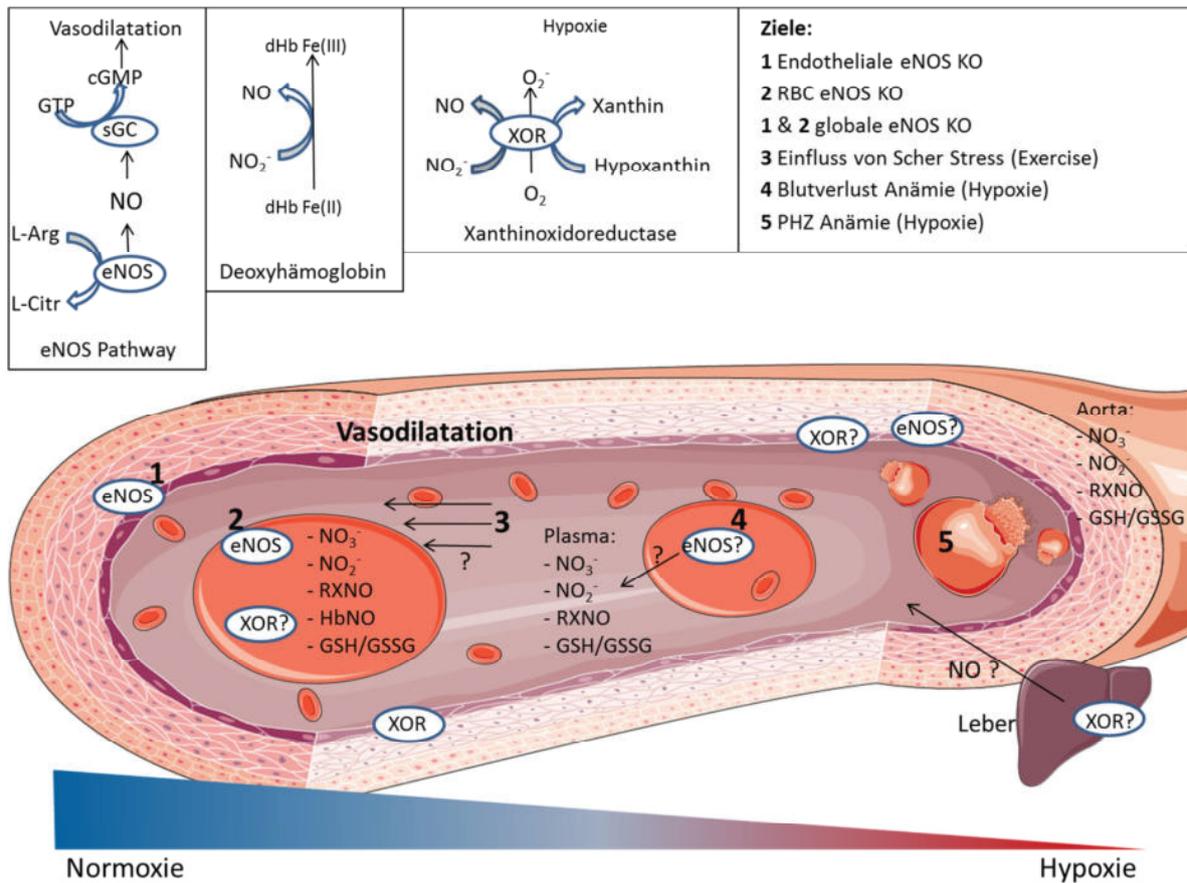
Phosphoribosylpyrophosphat (Salvage über PRPP) wieder als Nucleotidphosphate benutzt werden. Die Grafik ist Modifiziert worden.<sup>64</sup>

Durch proteolytische Modifikation<sup>65 66</sup> oder unter anaeroben Bedingungen<sup>67</sup> kann das Enzym zu Xanthinoxidase (XO) umgeformt werden. Diese Modifizierung des Enzyms ist auch mit einer reversible Oxidierung von Thiolgruppen des Enzyms zu Disulfiden verbunden.<sup>65</sup> XO fungiert als Hydroxylase und formt Xanthin in Harnsäure um. XO bevorzugt  $O_2$  als Elektronenakzeptor, weshalb mehr ROS in Form von  $O_2^-$  und  $H_2O_2$  entsteht.<sup>68</sup> XOR liegt jedoch überwiegend als Xanthindehydrogenase (XDH) im Körper vor.<sup>69</sup> Der Sauerstoffdruck ist ein wichtiger Regulator zur Enzymaktivität von XO<sup>49 70</sup> Es konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung des Enzyms als Antwort auf eine 4h andauernde Hypoxie in den pulmonaren Endothelzellen von Raten 50mal höher als unter normoxischen Bedingungen ist.<sup>71</sup> Unter hypoxischen Bedingungen kann XO Nitroverbindungen wie auch nicht organisches Nitrit und Nitrat zu NO katalysieren.<sup>72 73 74</sup> Dabei entstehen als Nebenprodukt auch  $O_2^-$  und  $H_2O_2$ . Im Falle der Bildung von NO wird ein Thiol zur Aufnahme benötigt und es entstehen Nitrosothiole, andernfalls kann diese Reaktion nicht stattfinden.<sup>72</sup> NO kann aber auch mit  $O_2^-$  Peroxinitrit reagieren.<sup>75</sup>

Gleichzeitig kann XO unter aeroben Bedingungen zum Abbau von Nitrosothiolen und der Freisetzung von NO dienen.<sup>76</sup> Dieser Abbau hängt jedoch vom Sauerstoffgehalt und der  $O_2^-$  Konzentration ab.<sup>77</sup>

## 1.6 Ziele der Dissertation

Der NO-Metabolismus in den einzelnen Organen unterliegt verschiedenen Einflussfaktoren und ist durch enzymatische und nicht enzymatische Wege reguliert. Abbildung 4 zeigt schematisch das Zusammenspiel der einzelnen Kompartimente im NO-Metabolismus und die stufenweisen Ziele der Dissertation.



**Abbildung 4: Schematische Darstellung der Ziele dieser Dissertation**

Die Grafik zeigt den NO-Metabolismus in den Kompartimenten Erythrozyten, Plasma und der Aorta. Untersuchte Mechanismen und Enzyme sind mit Fragezeichen markiert. Die Doktorarbeit beinhaltet die folgenden Fragestellungen und Ziele: Auswirkungen der Abwesenheit der endothelialen (1) und erythrozytären (2) eNOS, Einfluss von Scherstress durch Exercise (3), Änderungen unter hypoxischen Bedingungen einer Blutverlust Anämie und einer PHZ induzierten Anämie. Die ersten drei Ziele beziehen sich auf die Funktion des Enzyms eNOS und Scherstress im NO-Metabolismus unter normoxischen Bedingungen. Die letzten beiden Ziele fokussieren sich auf die Rolle der Erythrozyten unter hypoxischen Bedingungen und verändertem Redox Status.

Ziel der Doktorarbeit ist die Untersuchung von Änderungen im NO-Metabolismus und dem Redox Status unter schrittweiser Entfernung der eNOS in den Kompartimenten, unter Reduktion der Erythrozytenanzahl und der Hämolyse bzw. durch Änderung des Redox Status. In dieser Dissertation wird schwerpunktmäßig die Auswirkung auf die

Kompartimente Aorta, Plasma und Erythrozyten untersucht. Die generelle Fragestellung ist wie und wodurch der NO-Metabolismus in vivo kontrolliert ist. Das Hauptaugenmerk soll dabei auf das Zusammenspiel der Kompartimente Aorta, Plasma und Erythrozyten gelegt werden. Die einzelnen Ziele bauen aufeinander auf. Das erste Ziel dient der Untersuchung der Rolle des Enzyms eNOS. Anschließend wird in der Blutverlust Anämie die Rolle der Erythrozyten stark eingeschränkt. In der PHZ induzierten Anämie kommt zusätzlich ein starker Einflussfaktor durch die oxidierenden Bedingungen, welche durch die PHZ Behandlung eintreten, hinzu. Die Ziele gliedern sich in folgende Unterpunkte, welche sich später in den Kapiteln Ergebnisse und Diskussion widerspiegeln:

1. Die Auswirkung auf den NO-Metabolismus, der Endothelzell spezifischen (EC) und erythrozytären eNOS soll anhand von EC eNOS KO Mäusen und erythrozytären eNOS KO Mäusen festgestellt werden. Die Abwesenheit der eNOS im kompletten Organismus wird mit globalen eNOS KO Mäusen untersucht.
2. Es soll die Änderung des NO-Metabolismus, des Redox Status und der Nucleotidphosphate durch Exercise induzierten Scherstress im Gefäßsystem in EC eNOS KO Mäusen untersucht werden.
3. Der Einfluss erythrozytärer Dysfunktion und einer geringen Blutzellzahl auf den NO-Metabolismus und den Redox Status wird anhand einer Blutverlust Anämie aufgeklärt. Zusätzlich zur Blutverlust Anämie soll eine durch das Reduktionsmittel PHZ ausgelöste hämolytische Anämie auf Änderungen im NO-Metabolismus, Redox Status und Nucleotidphosphat Haushalt untersucht werden.

## 2 Material und Methoden

Im Folgenden sind die einzelnen Methoden und Geräte erläutert, welche bei dieser Dissertation verwendet wurden. Tabelle 1 zeigt alle für die Dissertation benutzten Chemikalien, Verbrauchsmaterialien, Puffer und Geräte.

**Tabelle 1: Verwendete Chemikalien, Verbrauchsmaterialien, Puffer und Geräte**

Chemikalie	Hersteller	Firmensitz
5-Sulfo-salicylsäure dihydrat (SSA)	Sigma Aldrich	St. Louis, USA
Acetonitril (ACN)	VWR	Radnor, USA
Adenin	Sigma Aldrich	St. Louis, USA
Adenosin	Sigma Aldrich	St. Louis, USA
Adenosindiphosphat	Sigma Aldrich	St. Louis, USA
Adenosinmonophosphat	Sigma Aldrich	St. Louis, USA
Adenosinmonophosphat <sup>15</sup> N	Sigma Aldrich	St. Louis, USA
Adenosintriphosphat	Sigma Aldrich	St. Louis, USA
Adenosintriphosphat <sup>13</sup> C <sup>15</sup> N	Sigma Aldrich	St. Louis, USA
Aldi Süd Trinkwasser Aqua Culinaris	Refresco	Erfstadt, Deutschland
Ameisensäure	Sigma Aldrich	St. Louis, USA
Bovine Serum Albumin (BSA)	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
Cyclisches Guanodinmonophosphat	Sigma Aldrich	St. Louis, USA
Coomassie Brilliant Blau	Sigma Aldrich	St. Louis, USA
Cyclisches Adenosinmonophosphat	Sigma Aldrich	St. Louis, USA
Cyclisches Adenosinmonophosphat <sup>13</sup> C <sub>5</sub>	Sigma Aldrich	St. Louis, USA
Cyclisches Xanthosinmonophosphat	Sigma Aldrich	St. Louis, USA
Deoxy Guanosintriphosphat	Sigma Aldrich	St. Louis, USA
Diethylentriaminpentaessigsäure (DTPA)	Sigma Aldrich	St. Louis, USA
Dimethylsulfoxid	Sigma Aldrich	St. Louis, USA
Dithioreithiol (DTT)	Sigma Aldrich	St. Louis, USA
Essigsäure (93 %)	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
Ethanol	VWR	Radnor, USA
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) dinatrium dihydrat	Sigma Aldrich	St. Louis, USA
Flushing solvent	Agilent	Santa Clara, USA
Flüssiger Stickstoff	Linde	Dublin, Irland
Glutathion <sup>13</sup> C <sub>2</sub> <sup>15</sup> N	Eurisotop	Saarbrücken, Deutschland
Glutathiondisulfid <sup>13</sup> C <sub>2</sub> <sup>15</sup> N	Eurisotop	Saarbrücken, Deutschland
Glutathionethylester	Sigma Aldrich	St. Louis, USA
Guanosindiphosphat	Sigma Aldrich	St. Louis, USA
Guanosinmonophosphat	Sigma Aldrich	St. Louis, USA
Guanosintriphosphat	Sigma Aldrich	St. Louis, USA
Harnsäure	Sigma Aldrich	St. Louis, USA
Helium 5.0	Linde	Dublin, Irland
Hypoxanthin	Sigma Aldrich	St. Louis, USA
Iod	Sigma Aldrich	St. Louis, USA
Isopropanol	VWR	Radnor, USA

<b>Chemikalie</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Firmensitz</b>
Kaliumhexacyanoferrat (III)	Sigma Aldrich	St. Louis, USA
Kaliumiodid	Sigma Aldrich	St. Louis, USA
LC/MS Kalibrations Standard	Agilent	Santa Clara, USA
L-Cystein	Sigma Aldrich	St. Louis, USA
L-Cystin	Sigma Aldrich	St. Louis, USA
L-Glutathion oxidiert (GSSG)	Sigma Aldrich	St. Louis, USA
L-Glutathion reduziert (GSH)	Sigma Aldrich	St. Louis, USA
L-Homocystein	Sigma Aldrich	St. Louis, USA
L-Homocystin	Sigma Aldrich	St. Louis, USA
Methanol	VWR	Radnor, USA
Natriumhydroxid	Sigma Aldrich	St. Louis, USA
Natriumnitrat	Sigma Aldrich	St. Louis, USA
Natriumnitrit	Sigma Aldrich	St. Louis, USA
N-Ethylmaleinimid (NEM)	Sigma Aldrich	St. Louis, USA
NuPage LDS Puffer	Life Technologies	Carlsbad, USA
Phenylhydrazin	Sigma Aldrich	St. Louis, USA
Salzsäure (25 %)	VWR	Radnor, USA
Salzsäure (35 %)	VWR	Radnor, USA
Spektrin	Sigma Aldrich	St. Louis, USA
Sulfanilamid	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
Tamoxifen	Sigma Aldrich	St. Louis, USA
Vittel Trinkwasser still	Nestle Waters	Vevey, Schweiz
Wasser (Millipore Ultrapure Water)	Merck Millipore	Billerica, USA
Xanthin	Sigma Aldrich	St. Louis, USA
Xanthosin	Sigma Aldrich	St. Louis, USA
<b>Puffer</b>		
Hanks balanced salt solution, Ca, Mg, NaHCO <sub>3</sub> , Glucose	Invitrogen	Carlsbad, USA
Phosphate-buffered saline (PBS)	Sigma Aldrich	St. Louis, USA
<b>Verbrauchsmaterialien</b>		
7 % Tris-Acetat Novex SDS Gel	ThermoFisher	Waltham, USA
96-well-Plates	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Cut off Säulen Nanosep 10 kDa Omega	Pall	Port Washington, USA
DC Protein Assay	Bio-Rad	Hercules, USA
Eppendorf 2 mL (braun und durchsichtig)	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Glas vials, amber mit Insert	Sigma Aldrich	St. Louis, USA
Greiner, 15 mL und 50 mL	Greiner Bio-one	Kremsmünster, Österreich
HiMark Pre-stained	Invitrogen	Carlsbad, USA
Metal caps mit Septum	Sigma Aldrich	St. Louis, USA
Pursuit 200Å PFP, 2.0 x 30 mm, 3 µm	Agilent	Santa Clara, USA
PVP Solution	RR Mechatronics	Hoorn, Niederlanden
XDB-C18, 4.6 mm, 1.8 µm, UHPLC guard column	Agilent	Santa Clara, USA
Zorbax Eclipse Plus C18 RRHD 2.1x50 mm 1.8 Micron	Agilent	Santa Clara, USA
Zorbax RRHD HILIC Plus 95Å, 2.1 x 100 mm, 1.8 µm	Agilent	Santa Clara, USA
<b>Geräte</b>		
1260 Infinity Fluoreszenzdetektor (FLD)	Agilent	Santa Clara, USA
1290 Infinity Autosampler	Agilent	Santa Clara, USA

Geräte		
1290 Infinity Diodenarraydetektor (DAD)	Agilent	Santa Clara, USA
1290 Infinity Säulenofen	Agilent	Santa Clara, USA
6550 iFunnel QToF	Agilent	Santa Clara, USA
Autosampler AS700 am ENO	EICOM	Dublin, Irland
Chemilumineszenz-Detektion (CLD)	ECOphysics	Hürth, Deutschland
Gewebe Homogenisator mit Glasmörser	Schuetz-biotec	Göttingen, Deutschland
Gewebe Homogenisator mit Plastimörser	Quiagen	Düsseldorf, Deutschland
Image Quant LAS400	GE Healthcare	Buckinghamshire, UK
Kühlbad	Behr	Düsseldorf, Deutschland
Lorrca	RR Mechatronics	Hoorn, Niederlanden
LS300 Viscometer	proRheo	Althengstett, Deutschland
NOx-Analyzer ENO-20	EICOM	Dublin, Irland
PEAK Stickstoffgenerator	Peak Scientific	Düren, Deutschland
pH Meter Lab870	Schott Industries	Mainz, Deutschland
Ultraschallbad	Welabo	Nettetal, Deutschland
UPLC 1290 Infinity binäre Pumpe	Agilent	Santa Clara, USA
UV/VIS Platereader, FLUOstar Omega	BMG labtech	Ortenberg, Deutschland
Vortex	Scientific Industries	New York, USA
Wärmebad	Julabo	Seelbach, Deutschland
Zentrifuge Mikro 200R (klein)	Hettich	Kirchlengern, Deutschland
Zentrifuge Rotina 380R (groß)	Hettich	Kirchlengern, Deutschland

## 2.1 Transnitrosierung zur Bestimmung von RXNO mittels CLD

Rinderserumalbumin (Bovin Serum Albumin - BSA) (1 mM) wurde mit Dithiolteithiol (DTT) (2 mM) reduziert und anschließend mit Diethylentriaminpentaessigsäure (DTPA) (0,1 mM) versetzt und 2 h bei 24 °C inkubiert. Zur Entfernung des DTT wurden 10 kDa Cut-off Säulen von *Nanosep* verwendet. Diese wurden mit 100 µL Phosphat gepufferte Salzlösung (Phosphat buffered saline - PBS) angefeuchtet und nach Zentrifugieren (14000 g, 5 min, RT) der BSA Lösung dreimal mit 100 µL PBS ausgewaschen. Nitrosiertes Cystein (CysNO) bzw. Nitrosiertes Glutathion) GSNO wurde durch Inkubation für 10 min von Nitrit mit Cys bzw. GSH (1:1) bei pH 1 mit HCl (1 mM) hergestellt. Anschließend wurde die Lösung mit NaOH bis zu einem pH-Wert von 7.6 versetzt um die Reaktion zu stoppen. Die Transnitrosierung erfolgte durch Mischen beider Lösungen im Verhältnis 1:1. Nach Inkubation für 30 min bei 24 °C wurde die Transnitrosierung durch Zugabe von N-Ethylmaleimide (NEM) (10 mM) gestoppt. Zur Trennung von BSA und Cys bzw. GSH wurden erneut 10 kDa Cut off Säulen verwendet. Die Auswertung erfolgte mittels Chemilumineszenzdetektion (CLD); das Verfahren wird in Kapitel 2.2.2 erläutert.

## 2.2 Bestimmung der NO<sub>x</sub>-Metabolite mittels CLD und ENO

Zur Bestimmung der NO<sub>x</sub>-Metabolite wurde jeweils dieselbe Probenvorbereitung genutzt. Alle benutzten *Eppendorf* Gefäße wurden vor Benutzung mit Millipor Wasser ausgespült um Nitrit und Nitrat Kontaminationen zu vermeiden.<sup>78</sup>

### 2.2.1 Probennahme und -vorbereitung von Gewebe und Vollblut

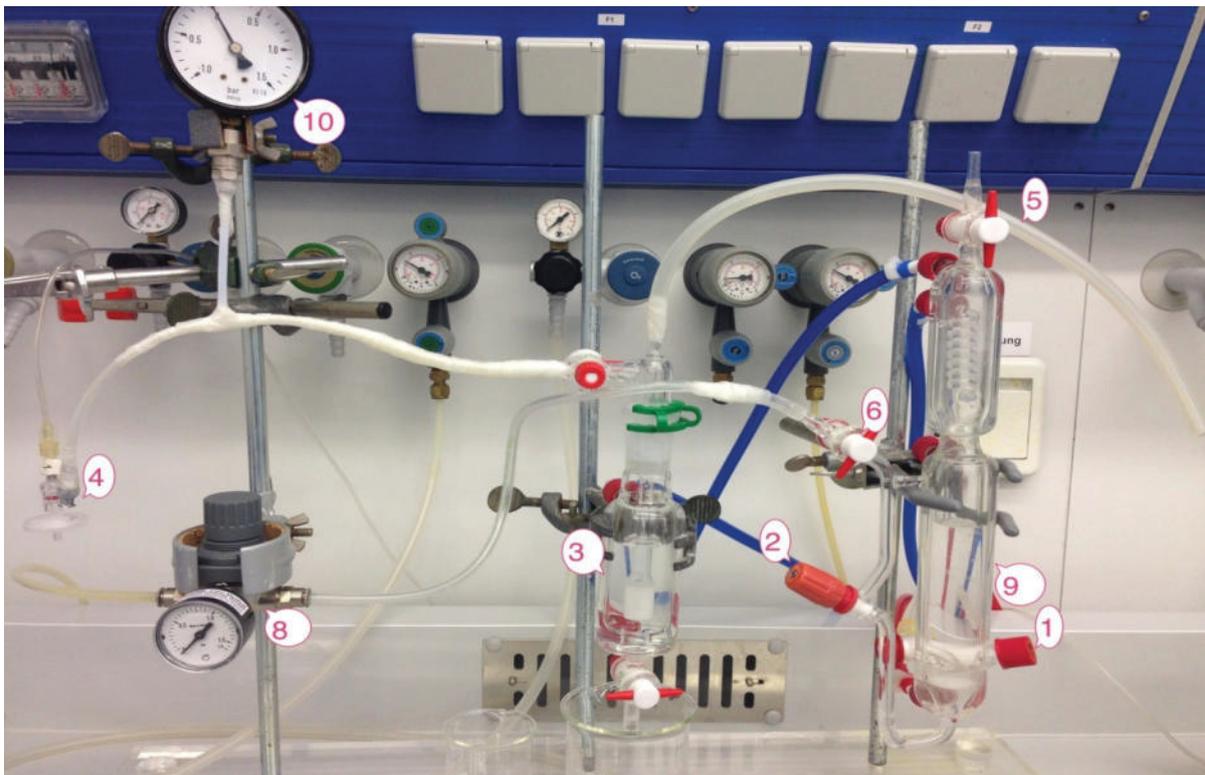
Mäuse wurden für die Organentnahme i.p. mit KIR Final 150 mg/kg Körpergewicht anästhetisiert. Das Blut wurde mit einer Spritze über das Herz entnommen. Die Organe wurden entnommen und bis auf die Aorta mit PBS Lösung durchgespült. Die Proben wurden in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80° C bis zur Messung gelagert. Die Organ- und Blutentnahmen wurden in Abhängigkeit vom Modell von Frau Beate Hutzler (Exercise Mäuse), Frau Francesca Leo, Frau Dr. Tatsiana Suvorava (Exercise Mäuse, globale/RBC/EC eNOS KO), Frau Stefanie Becher, Frau Kathrin Paul-Krahe, Frau Dr. med Patricia Wischmann (Blutverlust Anämie) und Frau Dr. Lenka Tomasova (PHZ Modell) durchgeführt.

Für die Probenvorbereitung wurde Gewebe zuvor mit einem Puffer aus NEM (100 mM) und Ethyldiamintetraessigsäure (EDTA) (20 mM) in PBS versetzt und mit einem Glasstab in einem Glasgefäß homogenisiert. Die Glasutensilien wurden mit Millipor gewaschen. Das Volumen des zugegebenen Puffers betrug das Dreifache vom Gewicht des Gewebes. Zur Messung von Nitrit, RXNO und HbNO mittels CLD mussten Plasma und Erythrozyten nicht weiter vorbehandelt werden. Für die Messung von Nitrit und Nitrat mit dem ENO wurden die Erythrozyten 1:1 (v/v) mit Millipor Wasser versetzt, um eine klare Lösung zu erhalten, da sonst das Hämoglobin die Messung stört. Alle Proben mussten für den ENO vor der Messung nochmals 1:1 (v/v) mit Methanol versetzt und 10 min bei 10000 g und 4° C zentrifugiert werden. Der Überstand wurde abgenommen und mit Hilfe des ENO gemessen.

### 2.2.2 Chemilumineszenzdetektion – CLD

Mithilfe der CLD wurden die Konzentrationen von Nitrit, sowie HbNO und an Thiolen und Aminen gebundenes NO gemessen. Abbildung 5 zeigt den schematischen Aufbau der Glasapparaturen zur Freisetzung von NO aus den Proben. Anschließend gelangte das freigesetzte NO zur Messung in die CLD (auf dem Bild nicht vorhanden). Helium durchfließt eine Reaktionskammer, welche mit einer Reaktionslösung gefüllt ist. Die einzelnen chemischen Reaktionen sind Tabelle 2 zu entnehmen. Zur Messung von Nitrit und RXNO bei 60 °C wurde eine reduktive Lösung aus Kaliumiodid (45 mM) und Iodid (10 mM) in 93%iger

Essigsäure verwendet. Die Messung von  $\text{HbNO}$  bei  $37^\circ\text{C}$  erfolgte mithilfe einer oxidativen Lösung bestehend aus Kaliumhexacyanoferrat ( $0,05\text{ mM}$ ) in  $0,9\%$   $\text{NaCl}$  (Reaktion 2). Zur Messung von  $\text{RXNO}$  wurde eine  $5\%$  Sulfanilamidlösung zugesetzt. Zur Messung von  $\text{RNNO}$  und damit zur Unterscheidung von  $\text{RSNO}$  und  $\text{RNNO}$  wurde eine  $0,2\%$ ige  $\text{HgCl}_2$  Lösung in  $0,9\%$   $\text{NaCl}$  zugesetzt. Die Probe wurde in die Reaktionskammer durch ein Septum eingespritzt. Das Helium treibt das in der Reaktionskammer entstehende  $\text{NO}$  aus und gelangt über eine Kühlbrücke in ein  $\text{NaOH}$  Bad, das andere Stickstoffoxide herausfiltert. Über einen Filter mit  $2\ \mu\text{m}$  Durchmesser erreicht das  $\text{NO}$  die CLD Apparatur.



**Abbildung 5: Schematischer Aufbau der Glasapparaturen vor der CLD**

Die Glasapparatur dient der Freisetzung von  $\text{NO}$  aus der Probe. Die Probe wurde in das Septum (1) eingebracht. In der Reaktionskammer (9) befand sich eine reduktive bzw. oxidative Lösung, welche von Helium durchspült wurde. Das freigesetzte  $\text{NO}$  wurde über ein  $\text{NaOH}$  Bad (3) und einen zusätzlichen Filter (4) zur CLD geleitet (5). Der Gasfluss und -druck wurde mithilfe von Ventilen (8, 6 und 2) und Barometern (8 und 10) kontrolliert.

In der CLD reagiert  $\text{NO}$  mit Ozon und es entsteht  $\text{NO}_2$ . Ein Teil des Reaktionsprodukts ist im elektronisch angeregten Zustand. Bei Relaxation in den Grundzustand werden Lichtquanten emittiert, welche gemessen werden. Um stabile Ergebnisse zu erzielen wurde der Gasfluss konstant gehalten. Mit Barometern wurde der Druck vor der Reaktionskammer ( $0,5\text{ bar}$ ) und vor der CLD ( $0\text{ bar}$ ) kontrolliert.<sup>79 80</sup> Für die Standards wurde Natriumnitrit in Millipor

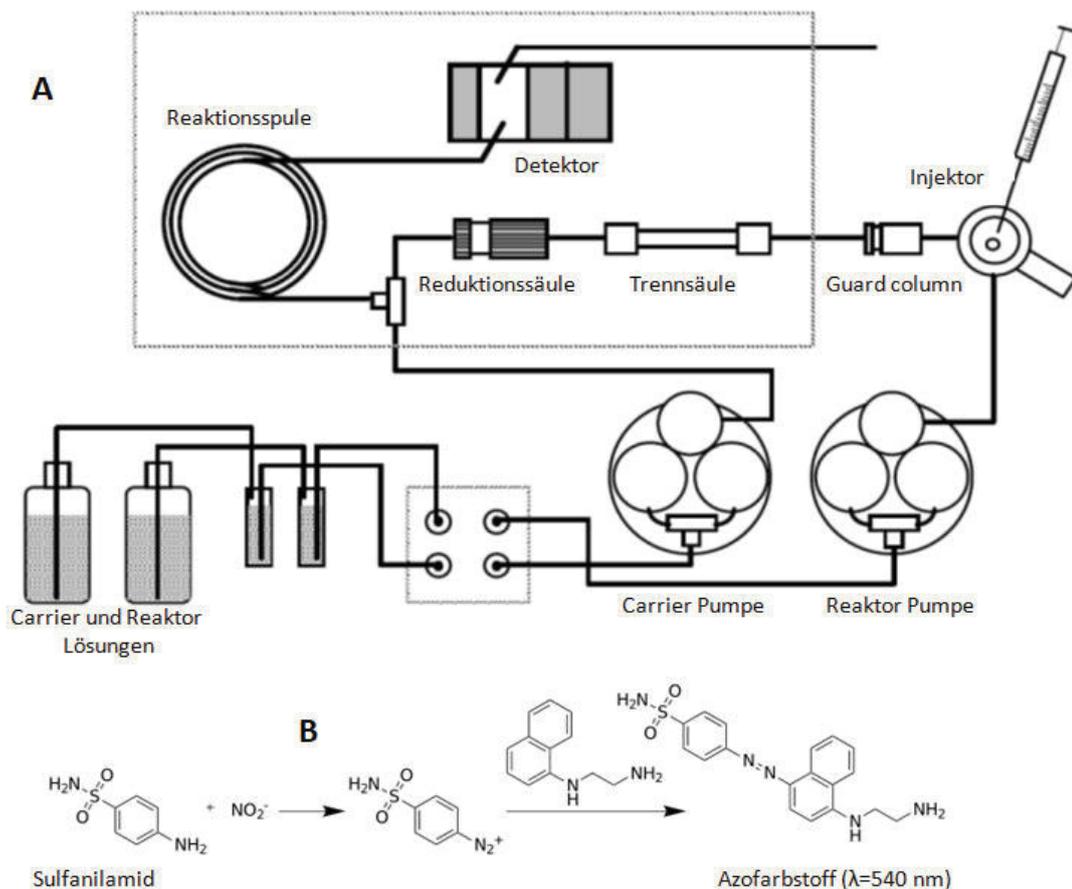
Wasser gelöst und der Konzentrationsbereich den jeweiligen Probenkonzentrationen angepasst. Die Kalibrationsgerade wurde für alle gemessenen NO-Metabolite benutzt.

**Tabelle 2: Reaktionen zur Messung von Nitrit und RXNO mit der CLD**

Reduktive Reaktion	$\text{NO}_2^- + 2 \text{H}^+ \rightarrow \text{NO}^+ + \text{H}_2\text{O}$ $\text{NO}^+ + \text{I}^- \rightarrow \text{ONI}$ $2 \text{ONI} \rightarrow 2 \text{NO} + \text{I}_2$
Oxidative Reaktion	$\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-} + \text{Häm-Fe}^{2+}\text{NO} \rightarrow \text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-} + \text{Häm-Fe}^{3+} + \text{NO}$
Reaktionen in CLD	$\text{NO} + \text{O}_3 \rightarrow \text{NO}_2^* + \text{O}_2$ $\text{NO}_2^* \rightarrow \text{NO}_2 + h\nu$

### 2.2.3 HPLC basierte Detektion - ENO

Nitrit und Nitrat in humanem und murinem Blut sowie in murinen Organen wurde mit dem ENO gemessen. Der ENO ist eine Hochdruckflüssigkeits Chromatographie (HPLC) mit zwei mobilen Phasen. Abbildung 6 zeigt den schematischen Aufbau.



**Abbildung 6: Schematische Darstellung des ENO und Reaktion von Nitrit mit Sulfanilamid**

Die Probe wird über die Carrier Lösung durch den ENO transportiert. Hämoglobin wird durch die Guard Column herausgefiltert. Nitrit und Nitrat werden in der Trennsäule voneinander getrennt und Nitrat in der Reduktionssäule anschließend zu Nitrit reduziert. Vor der Reaktionsspule werden die Carrier Lösung mit den Analyten und die Reaktionslösung gemischt. Nitrit reagiert mit dem

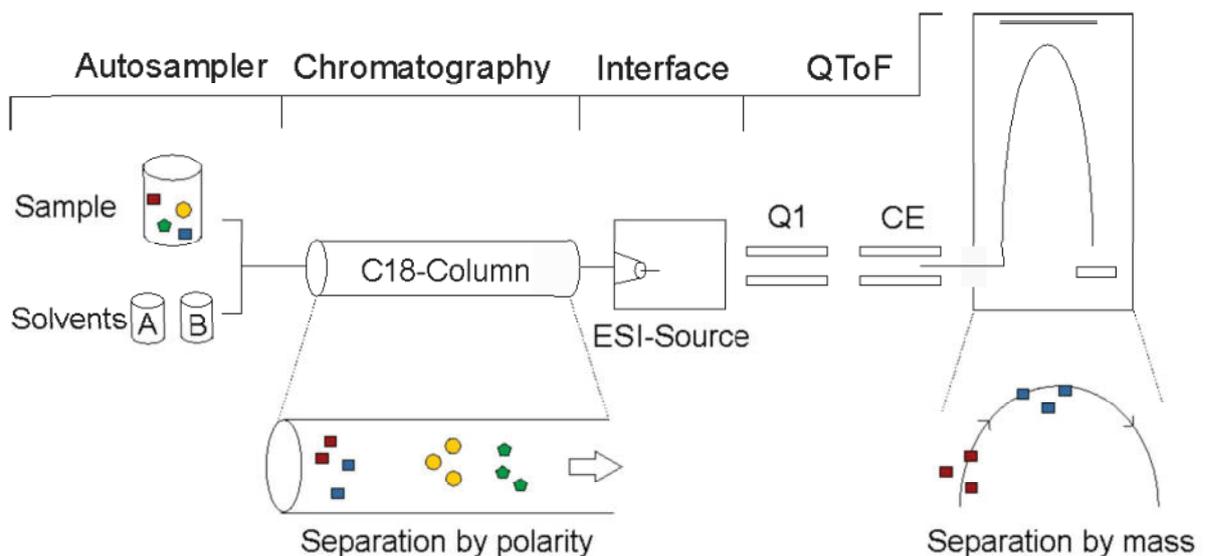
Sulfanilamid der Reaktionslösung zu einem Azofarbstoff (B), dieser wird bei 540 nm von einem Diodenarray Detektor (DAD) gemessen.

### 2.3 Bestimmung von Thiolen und Nucleotidphosphaten mittels UPLC- QToF

Zur Messung der Thiole und Nucleotidphosphate wurde ein ultrahochdruck flüssig chromatographisches System (UPLC), welches an einen Quadrupol time of flight (QToF) gekoppelt ist verwendet. Die angewendeten Methoden auf diesem Gerät sind in den Kapiteln 2.3.2 und 2.3.3 beschrieben. Das weiterführende Kapitel erläutert die Funktionsweise des Systems.

#### 2.3.1 Aufbau der UPLC-QToF

Bei der UPLC handelt es sich um ein System bestehend aus Autosampler, binärer Pumpe, Diodenarraydetektor (DAD) und Fluoreszenzdetektor (FLD), welches an ein QToF System gekoppelt ist. Abbildung 7 zeigt die schematische Funktionsweise des Geräts und den Probengang.



**Abbildung 7: Schematische Darstellung der UPLC-QToF und Messprinzip**

Mithilfe von zwei Eluenten A und B wird die Probe mit den Analyten über ein 6-Wege-Ventil in eine Trennsäule geführt. Die Trennung erfolgt über die Wechselwirkung zwischen der Polarität des Analyten und der stationären Phase (A). Die Analyten verlassen die Säule zu unterschiedlichen Zeiten, auch Retentionszeit genannt. Im Interface werden die Analyten ionisiert. Bei der Elektrospray Ionisation (ESI) werden die Analyten im Lösemittel ionisiert und verdampft. Die geladenen Moleküle stoßen sich schließlich voneinander ab und es kommt zur Coulomb Explosion (B). Die geladenen Analyten werden über die Ionenoptik fokussiert und gelangen über den Quadrupol (Q) und die Kollisionszelle (CE) in das Time of Flight Modul (ToF). Hier werden die Ionen über das Verhältnis von Masse zu Ladung  $m/z$  getrennt (C).

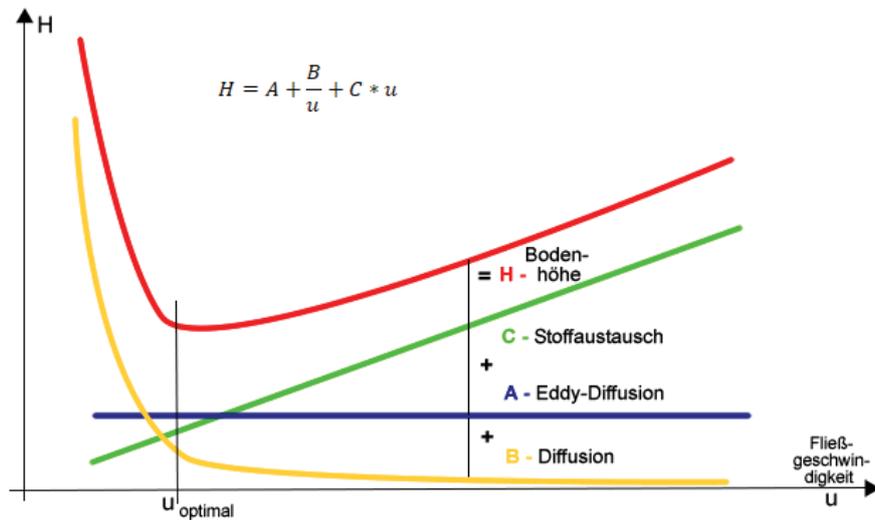
## Flüssigkeitschromatographie

Die Flüssigkeitschromatographie stellt eine beliebte Methode dar, um Stoffgemische aufzutrennen. Sie besteht aus einer Säule mit einer Innenauskleidung aus gelartigen Kohlenstoffketten – der stationären Phase. Die stationäre Phase besteht oft aus Partikeln, welche mit funktionellen Gruppen ausgestattet sind. Große Partikel können aufgrund einer höheren Stoffdiffusion in der Breite der Säule zu einer Bandenverbreiterung der Peaks führen. Kleinere Partikel bewirken jedoch einen größeren Widerstand gegenüber der mobilen Phase, sodass mit einem höheren Druck gearbeitet werden muss. Diese Art der Chromatographie wird ultra high pressure chromatography genannt. Die mobile Phase mit dem Analyten fließt mit einer zuvor definierten Geschwindigkeit durch die stationäre Phase. Die Zusammensetzung der mobilen Phase wird während der Analyse so geändert, dass sich ein Konzentrationsgradient bildet. Auf diese Weise werden die Bedingungen der mobilen Phase den verschiedenen Eigenschaften der Stoffe angepasst und es wird eine bessere Trennung erreicht. Diese Methode wird Gradientenelution genannt. Wird die Zusammensetzung der mobilen Phase während der Analyse nicht geändert, spricht man von einer isokratischen Methode.<sup>81</sup> Zur Auftrennung werden die unterschiedlichen Eigenschaften der Stoffe, aber vor allem die Affinität des Stoffes zur stationären und mobilen Phase ausgenutzt. Stoffe, welche eine hohe Affinität zur stationären Phase besitzen, verlassen die Säule später. Das Verlassen der Säule wird Eluieren genannt. Somit ist die Verteilung des Analyten zwischen mobiler und stationärer Phase eine entscheidende Größe der Chromatographie. Der zeitliche Verbleib einer Substanz in der Säule wird Retentionszeit genannt. Es werden grundsätzlich zwei Methoden der Trennung unterschieden: Die reversed phase (RP) mit einer unpolaren stationären und einer polaren mobilen Phase und die normal phase (NP) mit einer polaren stationären und einer unpolaren mobilen Phase.

Die Dimension der Säule ist für die Trennung von großer Bedeutung: Je dünner und dichter die Säule mit Kieselgelkugeln gepackt ist, desto geringer ist die Diffusion aufgrund der Säulenbreite (siehe Eddy-Diffusion). Zudem ist auch die Länge der Säule entscheidend. Bevorzugt werden kurze Säulen um die Diffusion des Stoffes in Längsrichtung (Longitudinaldiffusion) so gering wie möglich zu halten. Beide Eigenschaften der Säule haben einen erheblichen Einfluss auf die spätere Qualität der Peaks.<sup>82</sup> Die van-Deemter-Gleichung erläutert diese Zusammenhänge.

### Die van-Deemter-Gleichung

Die unten gezeigte Van-Deemter-Gleichung ist ein mathematisches Modell, welches herangezogen wird, um die Auswirkung von Stoffdiffusion, Stoffaustausch und Fließgeschwindigkeit auf die Effizienz der chromatographischen Trennung zu beschreiben. Abbildung 8 auf der nächsten Seite zeigt den Graphen der Gleichung.



**Abbildung 8: Van-Deemter-Gleichung, Auswirkung der Fließgeschwindigkeit auf die Trennleistung**

Die Van-Deemter-Gleichung beschreibt die Vorgänge der Analyten zwischen der stationären und mobilen Phase. Sie ist wichtig für die Beschreibung der Trennleistung der Chromatographie. Gezeigt wird die Abhängigkeit der Bodenhöhe  $H$ , des Stoffaustausch, der Eddy-Diffusion und Diffusion der Analyten von der Fließgeschwindigkeit  $u$ .<sup>83</sup>

Die Van-Deemter-Gleichung zeigt die Auswirkung von Veränderungen der Fließgeschwindigkeit  $u$ , auf die Variablen  $A$ ,  $B$ ,  $C$  und der Bodenhöhe  $H$ . Am Minimum der Funktion  $H(u)$  ist die Trennleistung der Säule am höchsten. Die Bodenhöhe  $H$  beschreibt die Länge eines Säulenabschnittes, in dem sich ein chemisches Gleichgewicht zwischen mobiler und stationärer Phase einstellt. Die Bodenhöhe kann auch als Gleichung in Abhängigkeit der Säulenlänge  $L$  und der Trennstufenzahl  $N$  dargestellt werden. Aufgrund der kleinen Teilchen der stationären Phase können die Teilchen der mobilen Phase keinen geradlinigen oder direkten Weg zurücklegen, um das Ende der Säule zu erreichen. Die Eddy-Diffusion  $A$  beschreibt die Streuung der Teilchen der mobilen Phase aufgrund der Umwege, die sie nehmen müssen. Je mehr Umwege die Moleküle nehmen, desto höher ist der Wert für die Eddy-Diffusion. Wird die Säule mit einer stationären Phase aus großen Teilchen gepackt, so ist ein kleiner Wert für die Eddy-Diffusion zu erwarten. Ist die Säule jedoch mit vielen kleinen Teilchen gepackt, so ergibt sich daraus eine hohe Eddy-Diffusion und es kommt zu

einer Verbreiterung des Peaks. Sie ist daher nahezu unabhängig von der Fließgeschwindigkeit. Die Longitudinaldiffusion  $B$  beschreibt die Verteilung der Moleküle aufgrund ihrer unterschiedlichen Diffusionseigenschaften. Bei einer geringen Fließgeschwindigkeit ist die Auswirkung einer Diffusion höher als bei einer hohen Strömungsgeschwindigkeit. Da eine hohe Diffusion eine starke Peakverbreiterung zur Folge hätte, wird die Fließgeschwindigkeit immer möglichst hoch gehalten. Der Stoffaustausch zwischen der mobilen und der stationären Phase ist der dritte Parameter mit Auswirkung auf die Effizienz einer chromatographischen Säule. Er beschreibt die Kinetik des Austausches des Analyten zwischen mobiler und stationärer Phase. Der Stoffaustausch sollte möglichst schnell erfolgen, um eine Verbreiterung des Peaks zu verhindern.<sup>83 81</sup>

### **Interface und Ionisationsquelle**

Das Interface verbindet Chromatographie und Massenspektroskopie miteinander und befindet sich zwischen der Trennsäule der Flüssigkeitschromatographie und dem Eingang zum Massenspektrometer. Während die Flüssigkeitschromatographie mit flüssigen Substanzen arbeitet, können in das Massenspektrometer nur Ionen gelangen, welche sich in der Gasphase befinden. Das Einbringen des Analyten in die Gasphase und das möglichst vollständige Abtrennen vom Lösungsmittel wird von der Ionisationsquelle übernommen.

### **ESI – Elektronenspray Ionisation**

Die ESI-Technik stellt eine schonende Methode der Ionisation dar. Die mobile Phase mit den Analyten wird durch ein inertes Gas, oft Stickstoff in ein Aerosol verwandelt. Das Aerosol gelangt in ein elektrisches Feld, welches sich zwischen der Einlasskapillare und einer Gegenelektrode am Eingang zur Quadrupol Time of flight (QToF) befindet. Die Analyten in den sich gebildeten Tropfen des Aerosols werden ionisiert, wobei die Ladung der Analyten durch die Ladungspolarität des Feldes bestimmt werden kann. Die Ladung der Analyten kann durch die Ladungspolarität des elektrischen Feldes bestimmt werden. Die Tropfen werden durch die hohen Temperaturen in der Kammer kleiner und die Ladungen im Tropfen rücken enger zusammen. Durch die Abstoßung von gleichen Ladungen kommt es zur Coulomb Explosion und die Ionen zerstäuben in der Kammer (Abbildung 7 B). Die Ionen werden zur Gegenelektrode gezogen und gelangen in die QToF.

### **Quadrupol-Time of Flight System**

Die QToF dient der Trennung der Analyten über das Verhältnis von Masse zu Ladung ( $m/z$ ). Mithilfe des Quadrupols und der Kollisionszelle können Fragmente der Moleküle eines einzelnen  $m/z$  Verhältnisses gemessen werden. Das QToF-System ermöglicht daher Ionen mit einer hohen Massenauflösung zu trennen.

Von der Elektronenspray Ionisationsquelle (ESI-Quelle) gelangen die Ionen über eine Transferkapillare in die Ionenoptik. Dort werden die Ionen fokussiert um einen Verlust der Ionen zu mindern. Die Ionen können im Quadrupol nach dem  $m/z$ -Verhältnis getrennt werden und anschließend in der Kollisionszelle fragmentiert werden. In der Kollisionszelle werden die Ionen mit einem inerten Gas beschossen und fragmentieren. Die Stärke der Fragmentierung kann gesteuert werden. Durch die Option der Fragmentierung kann die Selektivität gesteigert werden um Sicherheit zu gewinnen, dass es sich bei dem vorliegenden Molekül um die angenommene Verbindung handelt. Dieser Modus wird multiple reaction monitoring (MRM) genannt.

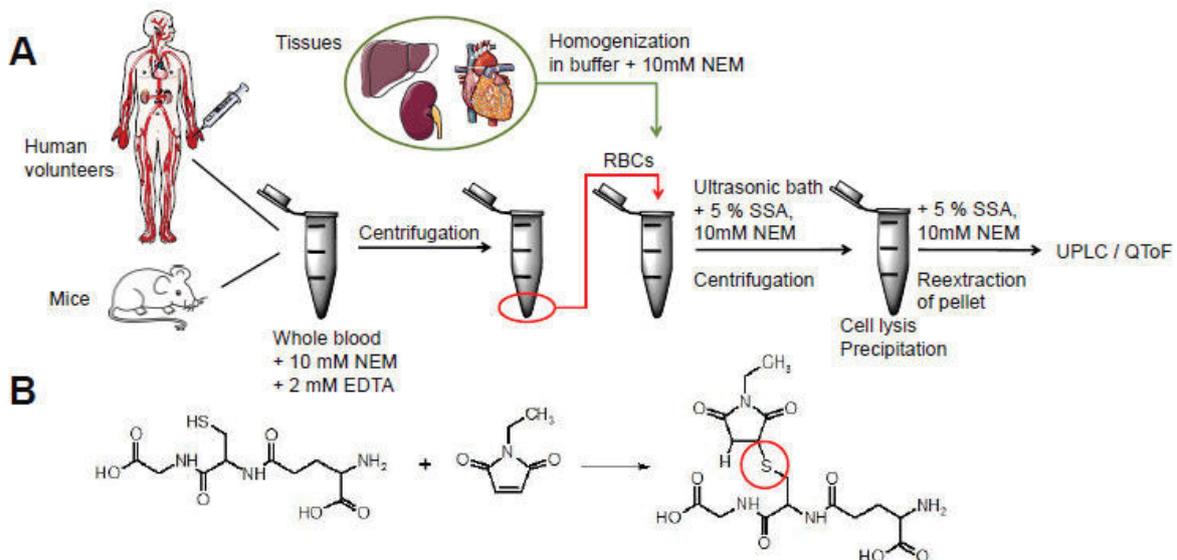
Das ToF-System bestimmt das  $m/z$ -Verhältnis durch die Messung der Flugzeit, die die Ionen im Flugrohr benötigen, um den Detektor zu erreichen (Abbildung 7 C). Je höher die Ladung und je kleiner die Masse des Ions, desto kürzer ist dessen Flugzeit. Die Ionen gelangen durch den Slicer in das Flugrohr. Der Slicer schickt die Ionen in Paketen los, die dann in einem elektrischen Feld beschleunigt werden. Am anderen Ende des Flugrohrs befindet sich ein Ionenspiegel, auch Reflektor genannt. Dieser ist ein elektrisches Feld, welches der Beschleunigungsspannung vom Anfang entgegen wirkt und die Ionen in einem Bogen wieder in die entgegengesetzte Richtung lenkt. Auf diese Weise wird die Flugstrecke verlängert, um eine möglichst hohe Massenauflösung zu erhalten. Die auftreffenden Ionen werden von einem Szintillationsdetektor registriert und in ein Signal umgewandelt. Das ToF-System kann im Vergleich zu anderen Massenspektrometern nur im Scan agieren. Einzelne Ionen können über den EIC aus dem TIC mathematisch extrahiert werden.

#### **2.3.2 Quantifizierung von Thiolen**

Die Methode zur Messung der Thiole umfasst die Quantifizierung von Cys, GSH und Homocystein, sowie den korrespondierenden Disulfiden. Die Messung kann für humanes und murines Vollblut sowie für murine Organe verwendet werden. Zur Korrektur von Verlusten in der Probenvorbereitung wurden zwei interne Standards verwendet.

## Probenvorbereitung und Messung

Um eine Oxidation der Thiole zu vermeiden wird die freie Thiolgruppe mit NEM irreversibel geblockt. NEM kann durch die Zellmembran in das Innere der Zellen gelangen. Abbildung 9 zeigt die schematische Darstellung der Probenvorbereitung und die Reaktion von NEM mit GSH.



**Abbildung 9: Probenvorbereitung von Vollblut und Gewebe zur Messung der Thiole**

Die Abnahme von Blut erfolgte in einem mit EDTA und NEM vorbehandelten Eppendorf Gefäß. Das Blut wurde durch Zentrifugation in Plasma und Erythrozyten getrennt. Organe wurden mit einem Puffer und NEM homogenisiert. Homogenisat bzw. Blutbestandteile wurden mit NEM und SSA lysiert. Das entstandene Pellet wurde erneut mit NEM und SSA ausgewaschen. (B) Reaktion von GSH und NEM zum Schutz der Thiolgruppe.

Die gefrorene Gewebeprobe wurde mit einem Puffer aus NEM (100 mM) und EDTA (20 mM) in PBS versetzt, sodass die Endkonzentration des Gewebes zum Puffer 40 mg/mL betrug. Die Probe wurde dreimal für 30 s homogenisiert und zwischendurch für mindestens 30 s auf Eis gekühlt. Um das Ergebnis auf den Proteingehalt zu beziehen wurden 5 µL des Homogenisats abgenommen. Das Homogenisat wurde mit einer 20 % Sulfosalicylsäure (SSA) Lösung mit NEM (10 mM) in Millipore Wasser versetzt, um die Proteine zu präzipitieren und die Zellen zu lysieren. Das zugegebene Volumen betrug ein Drittel des Volumens des zuvor zugegebenen Puffers. Die Isotopen Glutathiondisulfid  $^{13}\text{C}_2^{15}\text{N}$  und Glutathion  $^{13}\text{C}_2^{15}\text{N}$  (0,6 mM und 4 mM in Millipore Wasser) wurden als interner Standard hinzugegeben. Das zugegebene Volumen betrug 1/64 vom bereits zugegebenen Puffer. Anschließend wurde das Homogenisat 10 min lang bei 10000 g und 4° C zentrifugiert. Der Überstand wurde gesammelt und das Pellet erneut mit einer 5 % SSA Lösung mit NEM (10

mM) in Millipore Wasser, extrahiert. Das verwendete Volumen entsprach dem der 20 % SSA Lösung. Nach erneutem Zentrifugieren des Pellets mit 5% SSA für 10 min bei 10000 g und 4° C, wurden die beiden Überstände vereint und gemischt.

Zur Messung der Thiole im Vollblut wurde das Blut direkt nach Abnahme mit einer Anticoagulanzen aus 100 mM NEM und 20 mM EDTA in PBS im Verhältnis Blut/Anticoagulanzen 9:1 (v/v) versetzt. Zur Trennung der Bestandteile wurde das Vollblut 3 min lang bei 3000 g und 4° C zentrifugiert. Das Erythrozyten -Pellet wurde mit einer 5 % SSA Lösung mit 10 mM NEM in Millipore Wasser präzipitiert und lysiert. Die 5 % SSA Lösung wurde im Verhältnis 5:1 zum Erythrozyten Pellet und der interne Standard im Verhältnis 1:40 zur SSA Lösung hinzugegeben. Das Pellet wurde anschließend 10 min lang bei 10000 g und 4° C zentrifugiert, der Überstand gesammelt und das Pellet erneut mit demselben Volumen der 5 % SSA Lösung unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Die Überstände wurden vereint und gemixt.

Das Plasma wurde im Verhältnis 1:1 mit der 5 % SSA Lösung und 1:20 mit dem internen Standard versetzt. Die Probe wurde anschließend 10 min lang bei 10000 g und 4° C zentrifugiert. Der Überstand wurde gesammelt und das Pellet erneut mit 5 % SSA Lösung im selben Verhältnis extrahiert und zentrifugiert. Die Überstände wurden vereint und gemixt.

Die Quantifizierung wurde über eine externe Kalibration vorgenommen. Die Analyten GSH (10 mM), GSSG (1 mM), L-Cystin (1 mM), L-Cystein (1 mM) und H-Cystein (1 mM) und H-Cystin (0,1 mM) wurden in Millipore Wasser gelöst. Zum Lösen von L-Cystin und L-Homocystin wurde zusätzlich 1 % 37,5 %ige Salzsäure hinzugefügt. Der Standard wurde fünfmal im Verhältnis von 1: 10 für die Kalibrationsstandards verdünnt.

Zur Trennung der Thiole wurde eine C18-Säule benutzt. Die mobile Phase A bestand aus Millipore Wasser mit 0,1 % Ameisensäure und mobile Phase B aus Acetonitril. Die Gesamtdauer der Methode betrug 16 min. Für die ersten zwei Minuten wurde isokratisch gearbeitet mit einem Anteil von 99 % der mobilen Phase A (Fließrate 0,6 mL/min). Anschließend sank der Anteil innerhalb von 5 min auf 1 %. Dieser Anteil wurde für 5 min gehalten. Die letzten 4 min wurde isokratisch gearbeitet, um die Anfangsbedingungen wieder herzustellen. Die Analyten wurden im positiven Modus (ESI) unter den folgenden Bedingungen ionisiert: 330 °C, sheath gas flow: 11 L/min, capillary voltage: 2.5 kV, nozzle voltage: 1 kV und Fragmentor voltage: 30 V.

### 2.3.3 Quantifizierung von Nucleotidphosphaten und Nucleosiden

Die Methode umfasst die Quantifizierung von 16 Nucleotidphosphaten, Nucleosiden und Harnsäure. Die Analyten können sowohl in humanem und murinem Vollblut, als auch in murinen Organen gemessen werden. Zur Korrektur von Verlusten in der Probenvorbereitung wurden für die Nucleotidphosphate drei interne Standards (cAMP  $^{13}\text{C}_5$ , AMP  $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$  und ATP  $^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ , je 1 mM) verwendet. Proben mit Zellkernen enthalten neben ATP auch dGTP, eine chromatographische Trennung, sowie eine Trennung über das m/z-Verhältnis ist mit dieser Methode jedoch nicht möglich.

#### Probenvorbereitung und Messung

Die Probenvorbereitung erfolgte mit derselben Methode wie bei den Thiolen (Kapitel 2.3.2). Folgende Analyten wurden für die Stocklösung in Millipor Wasser gelöst: Adenin, Adenosin, cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP), cGMP, Harnsäure, Hypoxanthin, Xanthin, Xanthosin (je 1 mM), Adenosinmonophosphat (AMP), Adenosindiphosphat (ADP) Adenosintriphosphat (ATP), GMP, Guanosindiphosphat (GDP), GTP (je 10 mM). Für die Löslichkeit musste den Nucleosiden und cyclischen Nucleotidphosphaten 1 % Ameisensäure hinzugefügt werden. Die Stocklösung wurde für die Standards fünfmal im Verhältnis von 1:10 verdünnt.

Zur Trennung der Nucleotidphosphate wurde eine C18-Säule benutzt. Die mobilen Phasen A und B beinhalteten: Millipor Wasser mit 0,1 % Ameisensäure versetzt und für B 1/3 Acetonitril, 2/3 Millipor Wasser und 0,1 % Ameisensäure. Die Gesamtdauer der Methode betrug 21 min. Für die ersten drei Minuten wurde isokratisch mit einem Anteil von 99 % A bei einer Fließgeschwindigkeit von 0,08 mL/min gefahren. Anschließend sank der Anteil in 0,1 min auf 90 %. Dieser Anteil wurde bis 12 min auf 86 % und anschließend in 0,1 min auf 1 % gesenkt. Für fünf Minuten wurde isokratisch gefahren und danach wieder auf die Anfangsbedingungen zurückgefahren mit einem Anteil von 99 % A. Die Anfangsbedingungen wurden für weitere fünf Minuten gehalten. Die Analyten wurden im positiven Modus (ESI) unter den folgenden Bedingungen ionisiert: 250 °C, sheath gas flow: 11 L/min, capillary voltage: 2.5 kV, nozzle voltage: 1 kV and fragmentor voltage: 15 V.

## 2.4 SDS-Page

Es wurde ein 7 % Tris-Acetat *Novex* SDS Gel verwendet. 13  $\mu$ L der Proben wurden mit 2  $\mu$ L DTT (2 mM) bzw. Millipor Wasser und 5  $\mu$ L *NuPAGE* LDS Puffer versetzt. Das Gel lief bei 150 V für 55 min und wurde danach für 30 min mit einer Fixierlösung, bestehend aus 50 % Ethanol und 10 % Essigsäure behandelt. Die Färbungslösung enthielt 0,5 % Coomassie Brilliant Blau (w/v), 30 % Methanol und 10 % Essigsäure und wurde ebenfalls für 30 min auf das Gel gegeben. Zum mehrmaligen Waschen wurden 50 % Methanol mit 10 % Essigsäure verwendet. Zum Vergleich wurde der Marker HiMark Pre-stained benutzt.

## 2.5 Proteinbestimmung

Protein Konzentrationen wurden mit einem Kit gemessen, welches auf der Methode nach *Lowry* basiert. Proben und Kalibrationsgerade bestehend aus dem Protein Bovine Serum Albumin wurden im Konzentrationsbereich 0,2-2 mg/L im Duplikat bei 740 nm gemessen. Die Messung erfolgte durch einen UV/VIS Platereader.

## 2.6 Messung der Verformbarkeit von Erythrozyten und Blutviskosität

Zur Ermittlung der Scherstress induzierten Verformbarkeit der Erythrozyten wurde das Gerät Lorrca benutzt. 25  $\mu$ L des Erythrozyten Pellets wurden zu einer hoch viskosen PVP Lösung gegeben, welche zuvor auf 37 °C erwärmt wurde. Die Zellsuspension verhält sich wie eine Newton'sche Flüssigkeit. Der Elongation Index (EI) wurde mit der Laser Diffraktionsektazytometrie unter einem Druck Gradienten von 0,3-50 Pa gemessen und über eine Lineweaver-Burk Transformation berechnet. Die Viskosität wurde mit dem LS300 Viscometer gemessen. Dazu wurde 1 mL Vollblut bei 37 °C in das Gerät pipettiert und einem Scherstress Gradienten von 0,5-150 1/s ausgesetzt. Beide Versuche wurden von Frau Dr. Lenka Tomasova durchgeführt.

## 2.7 Mausmodelle

Für die Mausexperimente wurden männliche C57/BL6 WT Mäuse von *Janvier Labs* benutzt. Alle durchgeführten Mausversuche und die Tötung der Tiere wurden durch das Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz (*LANUV*) unter der Nummer O30/16 genehmigt. Die in dieser Dissertation durchgeführten Projekte mit dem dazugehörigen Aktenzeichen sind Tabelle 3 zu sehen.

**Tabelle 3: Mausprojekte und Aktenzeichen**

Die Tabelle enthält vom *LANUV* alle genehmigten Projekte mit zugehörigem Aktenzeichen. Es sind nur Projekte, welche in dieser Dissertation behandelt werden gelistet.

Projekt	Aktenzeichen
Die Rolle der erythrozytären NO Synthase in der Regulation des Gefäßtonus	84-02.04.2016.A377
Die Rolle funktionaler roter Blutkörperchen in der Regulation des Blutdrucks und in kardiovaskulären protektiven Effekten durch körperliche Aktivität	84-02.04.2016.A170
Die endotheliale Dysfunktion verhindert den via remote ischemic preconditioning vermittelten kardioprotektiven effekt	84-02.04.2014.A432
Einfluss des erythrozytären NO-cGMP-PKG Pathway auf kardiovaskuläres System	84-02.04.2013.A228
Der Einfluss von Sulfid auf den oxidativen Status und die NO Bioverfügbarkeit der Gefäßwand	84-02.04.2014.A284

Den Versuchsmäusen standen Futter und Wasser ad libitum zur Verfügung. Um eine gleichbleibende Nitrit- und Nitratzufuhr zu garantieren wurde Trinkwasser von den Herstellern *Aldi* und *Vittel* bezogen, sowie Leitungswasser aus dem Labor. Vorherige Untersuchungen haben gezeigt, dass die Nitrit- und Nitratgehalte in diesen Trinkwasserquellen konstant sind. Die untere Tabelle 4 gibt die gemessenen Konzentrationswerte von Nitrit und Nitrat in diesen Quellen an.

**Tabelle 4: Nitrit und Nitrat Konzentrationen der Trinkwasserquellen**

Gezeigt sind die Mittelwerte der gemessenen Konzentration mit SD der benutzten Trinkwasserquellen (n=5).

Trinkwasserquelle	Nitrit [ $\mu\text{M}$ ]	Nitrat [ $\mu\text{M}$ ]
Aldi Wasser	0,08 $\pm$ 0,023	1,25 $\pm$ 0,08
Vittel Wasser (Nitrat arm)	0,49 $\pm$ 0,007	0,76 $\pm$ 0,24
Leitungswasser	0,44 $\pm$ 0,013	198,9 $\pm$ 33,64

In dieser Dissertation wurden verschiedene Mausmodelle und KO Mäuse verwendet. Tabelle 5 gibt eine Übersicht und Beschreibung über alle benutzten Mausmodelle.

**Tabelle 5: Mausmodelle und Beschreibung**

Beschrieben sind alle verwendeten Mausmodelle dieser Dissertation.

Mausmodell	Charakteristik
Globale eNOS KO Mäuse	Den globalen eNOS KO Mäusen fehlt die eNOS in allen Geweben
Nrf2 KO Mäuse	Der Transkriptionsfaktor Nrf2 fehlt in allen Geweben, eNOS ist hochreguliert
Erythrozyten eNOS KO Mäuse	Den Mäusen fehlt die eNOS in den Erythrozyten
EC eNOS KO Mäuse	Die eNOS fehlt in den Endothelzellen dieser Mäuse
Exercise Modell	Durch Exercise wird Scherstress ausgelöst und die eNOS so hochreguliert
Blutverlust Anämie	Die Anzahl an Erythrozyten wird durch Blutabnahme gesenkt
PHZ induzierte Anämie	Oxidativer Stress wird durch PHZ Gabe verursacht; es handelt sich um eine hämolytische Anämie

## 2.8 Endothel spezifische KO Mäuse durch Behandlung mit Tamoxifen

Die EC eNOS KO Mäuse, welche keine eNOS im Endothel haben, wurden zur KO Induzierung fünf Tage lang in 24 h Abständen mit Tamoxifen behandelt, wobei 20 mg/mL Tamoxifen gelöst in Erdnussöl den Mäusen i.p. gespritzt wurde. Die final gespritzte Konzentration betrug 75 mg/kg Körpergewicht. Nach 21 Tagen fand die Organentnahme statt. Es wurden zudem globale eNOS KO Mäuse und Nrf2 KO Mäuse benutzt. Nrf2 KO Mäuse besitzen keinen Transkriptionsfaktor Nrf2, welcher überwiegend ein Regulatorprotein für die Transkription von Antioxidantien darstellt. Abbildung 10 zeigt die Behandlung der Mäuse. Die Behandlung der Mäuse mit Tamoxifen wurde von Dr. Tatsiana Suvorava, Frau Francesca Leo und Frau Beate Hutzler durchgeführt.

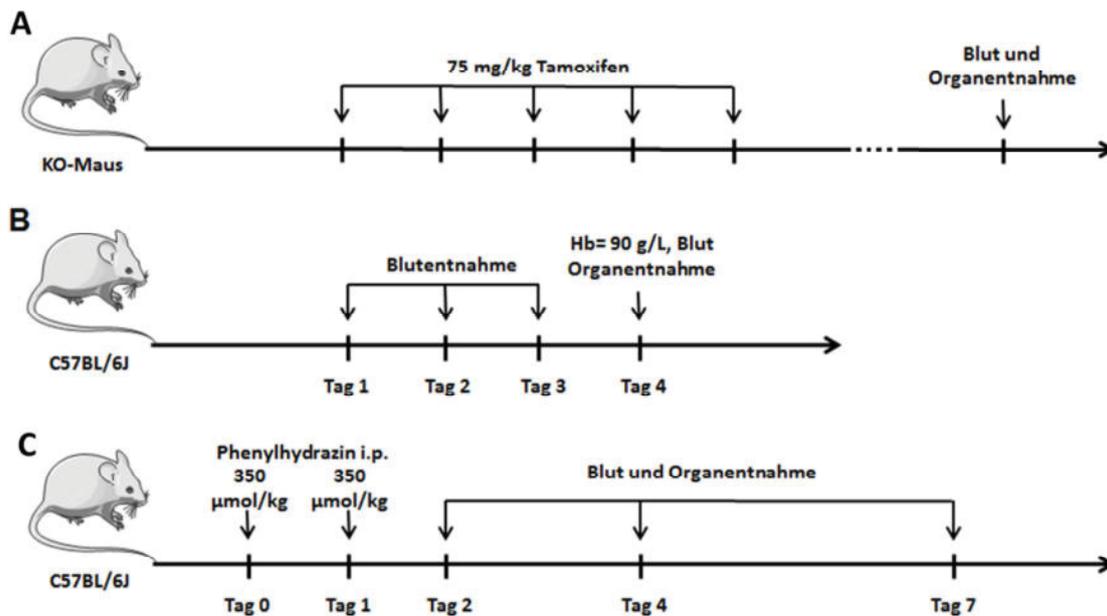
## 2.9 Exercise Mäuse

Für die Versuche wurden 7-8 Wochen alte EC eNOS KO Mäuse verwendet, welche mit Aldi Wasser behandelt wurden. Die Mäuse wurden in zwei Gruppen unterteilt und einzeln auf Käfige mit, bzw. ohne Laufräder aufgeteilt. Zuvor fand bei den Exercise Mäusen eine einwöchige Eingewöhnungsphase für die Laufräder statt. Die Exercise Mäuse konnten vier Wochen lang die Laufräder benutzen. Die Kontrollgruppe befand sich unter denselben Bedingungen und zur selben Zeit in einem Käfig ohne Laufrad (Sedentary). Blut- und Organentnahmen fanden nach vier Wochen statt. Diese Mausexperimente wurden von Frau Beate Hutzler durchgeführt.

## 2.10 Induzierung der Blutverlust Anämie und der Phenylhydrazin Anämie

WT Mäuse wurden in drei Gruppen geteilt: Tag 2, Tag 4 und Tag 7 um eine Langzeitauswirkung der PHZ Anämie zu untersuchen. Die Mäuse wurden an Tag 1 und 2 intraperitoneal (i.p.) mit PHZ (350  $\mu\text{mol/kg}$  Körpergewicht) gespritzt. Abhängig von der Gruppeneinteilung wurde der Maus an Tag 2, 4 oder 7 Blut und Organe entnommen. Abbildung 10 zeigt alle Behandlungen der Mäuse schematisch. Die Behandlung der Mäuse, sowie Organ- und Blutentnahmen wurden von Frau Dr. Lenka Tomasova durchgeführt. Für die Blutverlust Anämie wurden zwei Mausgruppen erstellt mit unterschiedlichem Trinkwasser. Die eine Gruppe erhielt Vittel Wasser und die andere Leitungswasser aus dem Labor. Vittel enthält durchschnittlich 0,76  $\mu\text{M}$  Nitrat und Leitungswasser 215  $\mu\text{M}$  Nitrat. Die Nitrit Konzentration liegt in beiden Wasser vergleichbar bei ca. 0,5  $\mu\text{M}$ . Die mit Leitungswasser behandelten Mäuse wurden auf dieser Art einer Behandlung mit einer

höheren Nitrat Konzentration unterzogen. Zur Indizierung der Anämie wurde den Mäusen an drei aufeinanderfolgenden Tagen eine bestimmte Menge Blut hinter dem Auge entnommen. Am vierten Tag konnte so ein Hb-Wert von 90 g/L erreicht werden. Die Behandlung der Mäuse, sowie Organ- und Blutentnahmen für die Blutverlust Anämie wurden von Frau Dr. med Patricia Wischmann und Frau Stefanie Becher durchgeführt.



**Abbildung 10: Schematische Behandlung der Mäuse**

A: Behandlung der KO Mäuse zur Induzierung des KO-Modells durch Gabe von Tamoxifen 75 mg/kg Körpergewicht. B: Zur Induzierung der Blutverlust Anämie wurde den Mäusen an drei Tagen Blut entnommen um letztlich einen Hb-Wert von 90 g/L zu erreichen. C: Behandlung zur Induzierung der Phenylhydrazin Anämie durch Gabe von PHZ 350 µmol/kg Körpergewicht an Tag eins und zwei.

## 2.11 Statistik

Konzentrationsberechnungen wurde mit dem Programm *Excel* von *Microsoft* berechnet. Alle statistischen Auswertungen und Darstellungen von Graphen wurden mithilfe der Software *GraphPad Prism 6.01* von *GraphPad Software Inc.* erstellt. Welche statistischen Auswertungen benutzt wurden, sowie die Anzahl verwendeter Proben ist im Einzelnen den jeweiligen Bild- und Tabellenerklärungen der Ergebnisse zu entnehmen. Ab einem P-Wert  $\leq 0,05$  wird eine Signifikanz angezeigt, dabei werden die P-Werte welche  $\leq 0,05$  mit einem \* versehen,  $\leq 0,01$  mit \*\*,  $\leq 0,001$  mit \*\*\* und  $\leq 0,0001$  mit \*\*\*\*. In den tabellarischen Darstellungen der Ergebnisse werden die Sterne durch Pfeile ersetzt, die Signifikanz Bedeutung bleibt gleich.

### 3 Ergebnisse

Zur Messung von Thiolen und Nucleotidphosphaten in biologischen Matrices wurden zwei separate Methoden an der UPLC-QToF entwickelt. In diesem Kapitel wird zunächst die Validierung dieser Methoden erläutert. Die anschließenden Messergebnisse sind meist in Tabellen dargestellt um eine kompaktere Darstellung zu erreichen. Es sind die Mittelwerte mit der Standardabweichung und der Anzahl der gemessenen Mäuse  $n$  angegeben sowie die P-Werte. Zur Veranschaulichung wurde neben den P-Werten die Angabe der Signifikanz mit Sternen und einem Pfeil zur Art der Konzentrationsänderung - höhere oder niedrigere Konzentration – angegeben. Die untere gibt eine Übersicht über die gemessenen Parameter in den unterschiedlichen Mausmodellen.

#### 3.1 Validierung Thiol-Methode

Die Analyten wurden über Extracted Ion chromatogram (EICs) quantifiziert. Die untere Tabelle 6 zeigt die detektierten Massen und Retentionszeiten der Analyten, sowie die Validierungsdaten zu den Standardabweichungen der Retentionszeiten und Flächen und die Bestimmungsgrenze (LOQ).

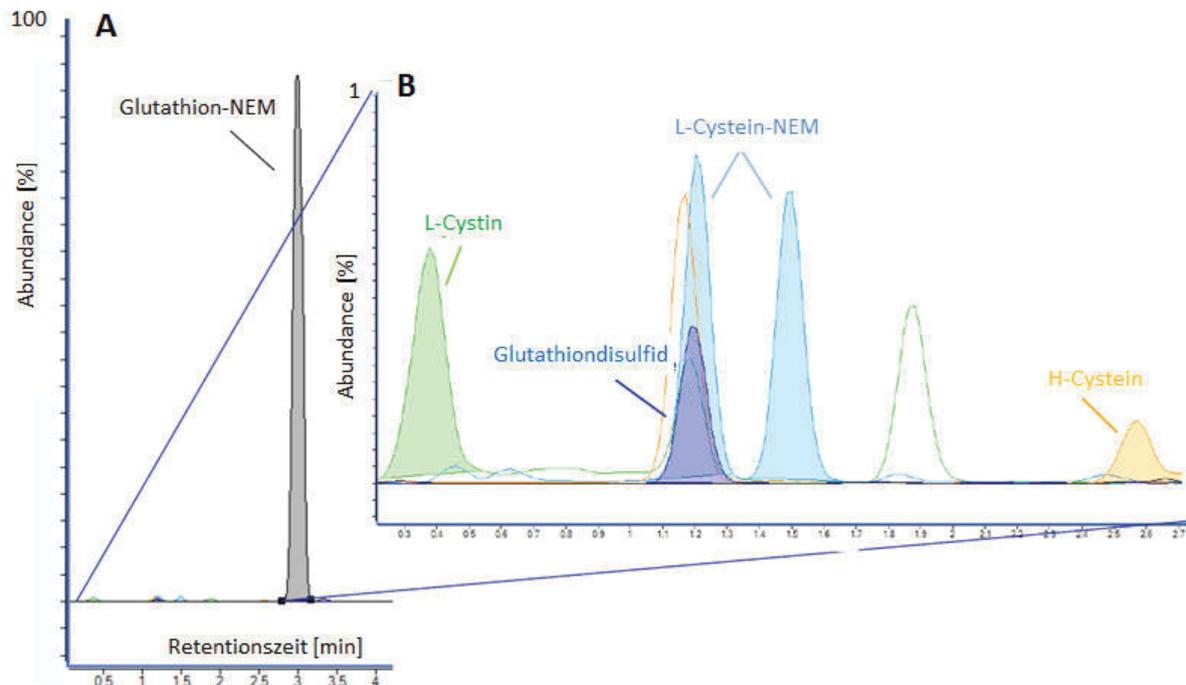
**Tabelle 6: Massen und Retentionszeiten der Thiole**

Die Tabelle zeigt die bei Messungen ermittelten  $m/z$ -Verhältnisse und Retentionszeiten der Analyten. Der LOQ wurde über das Signal/Rausch-Verhältnis eines Standards mit der kleinsten sichtbaren Konzentration nach der FDA Guideline berechnet.<sup>84</sup> Die Standardabweichungen der RT und Fläche wurden durch zehn Wiederholmessungen einer Mausleber gemessen.

Analyten	m/z (+)	RT [min]	LOQ [nmol/L]	Standardabweichung [%]	
				RT	Fläche
L-Cystein	247,0747	1,11 / 1,37	200	0,77	9,39
L-Cystin	241,0311	0,4	1800	0,77	-
h-Cystein	261,0825	2,4	40	0,79	18,69
h-Cystin	269,0624	0,6	2000	0,91	5,88
Glutathion	433,1387	3,1	330	0,31	5,07
Glutathiondisulfid	613,1592	1,1	250	1,74	11,42
IS Glutathion $^{13}\text{C}_2\text{ }^{15}\text{N}$	436,1387	3,1	-	-	-
IS Glutathiondisulfid $^{13}\text{C}_2\text{ }^{15}\text{N}$	616,1592	1,1	-	-	-

Tabelle 6 zeigt das Chromatogramm der übereinandergelegten EICs aller Analyten, die in einer Mausleber gemessen wurden. Für Cys wurden sowohl in den Proben als auch in den Standards zwei Peaks gefunden. Dasselbe Phänomen tritt auch bei GSH auf, allerdings sind diese Peaks kaum voneinander getrennt. Die Analyten sind gut voneinander getrennt

weisen keine Coelutionen und eine gute Peakqualität auf. L-Cystin zeigt eine geringe Retention auf der C18-Säule.



**Abbildung 11: Chromatographische Trennung der gemessenen Thiole einer Mausleber**

(A) Übereinandergelagerte EICs aller Analyten wobei GSH auf 100 % skaliert ist. (B) Vergrößerte EICs der übrigen Thiole. Alle EICs weisen eine ausreichende Trennung der Analyten auf und keine Überlagerungen von Molekülen mit demselben m/z-Verhältnissen. Bei den beiden Peaks von L-Cystein-NEM handelt es sich um Diastereoisomere.

### 3.2 Validierung Nucleotidphosphat-Methode

Für die Probenvorbereitung wurde die bereits bestehende Probenvorbereitung mit 5 % SSA mit der in der Literatur gängigen Phenol-Extraktion verglichen. Zum Vergleich wurden die nach den Probenvorbereitungen wiedergefundenen Konzentrationen der internen Standards AMP<sup>15</sup>N, cAMP<sup>13</sup>C<sub>5</sub> und ATP<sup>13</sup>C<sup>15</sup>N mit einem Standard bestehend aus denselben Isotopen verglichen. Die Konzentration der Stocklösung der internen Standards betrug je 1 mM. Die Wiederfindungsraten sind Tabelle 7: Vergleich der Wiederfindungsraten in Phenol- und SSA-Extraktion zu entnehmen.

Für die Phenol-Extraktion wurden 200 µL humanes Plasma mit 600 µL Phenol TE, 200 µL Chloroform und 200 µL Millipor Wasser, sowie 10 µL internem Standard gemischt und für 20 sek zur Zelllyse in ein Ultraschallbad gegeben. Nach erneutem Schütteln wurde die Probe für 10 min bei 10.000 g bei 4 °C zentrifugiert. 100 µL der obigen wässrigen Phase wurden abgenommen und mit der UPLC-QToF gemessen. Die SSA-Extraktion ist Kapitel

2.3.2 zu entnehmen. NEM kann für diese Messung weggelassen werden. Für Erythrozyten wurden bei SSA-Extraktion 10 µL interner Standard, für Plasma 4,5 µL und für Organe ein Volumenanteil von 1/64 des bereits zugegebenen Puffers verwendet.

**Tabelle 7: Vergleich der Wiederfindungsraten in Phenol- und SSA-Extraktion**

Die Wiederfindungsraten der Isotope AMP<sup>15</sup>N, cAMP<sup>13</sup>C<sub>5</sub> und ATP<sup>13</sup>C<sup>15</sup>N, welche in einer Standardaddition zu humanem Plasma hinzugegeben wurden, werden nach SSA- und Phenol-Extraktion mit einer Isotopen-Standardlösung derselben Konzentration verglichen.

Analyt	Wiederfindungsrate [%]	
	SSA-Extraktion	Phenol-Extraktion
cAMP <sup>13</sup> C <sub>5</sub>	104	25
AMP <sup>15</sup> N	98	136
ATP <sup>13</sup> C <sup>15</sup> N	109	89

Die Analyten wurden über EICs quantifiziert. Tabelle 8 zeigt die detektierten Massen und Retentionszeiten der Analyten sowie LOQ (berechnet anhand von Standards) und STABW der Fläche, die Werte wurden über eine Wiederholmessung eines Mauserzens berechnet.

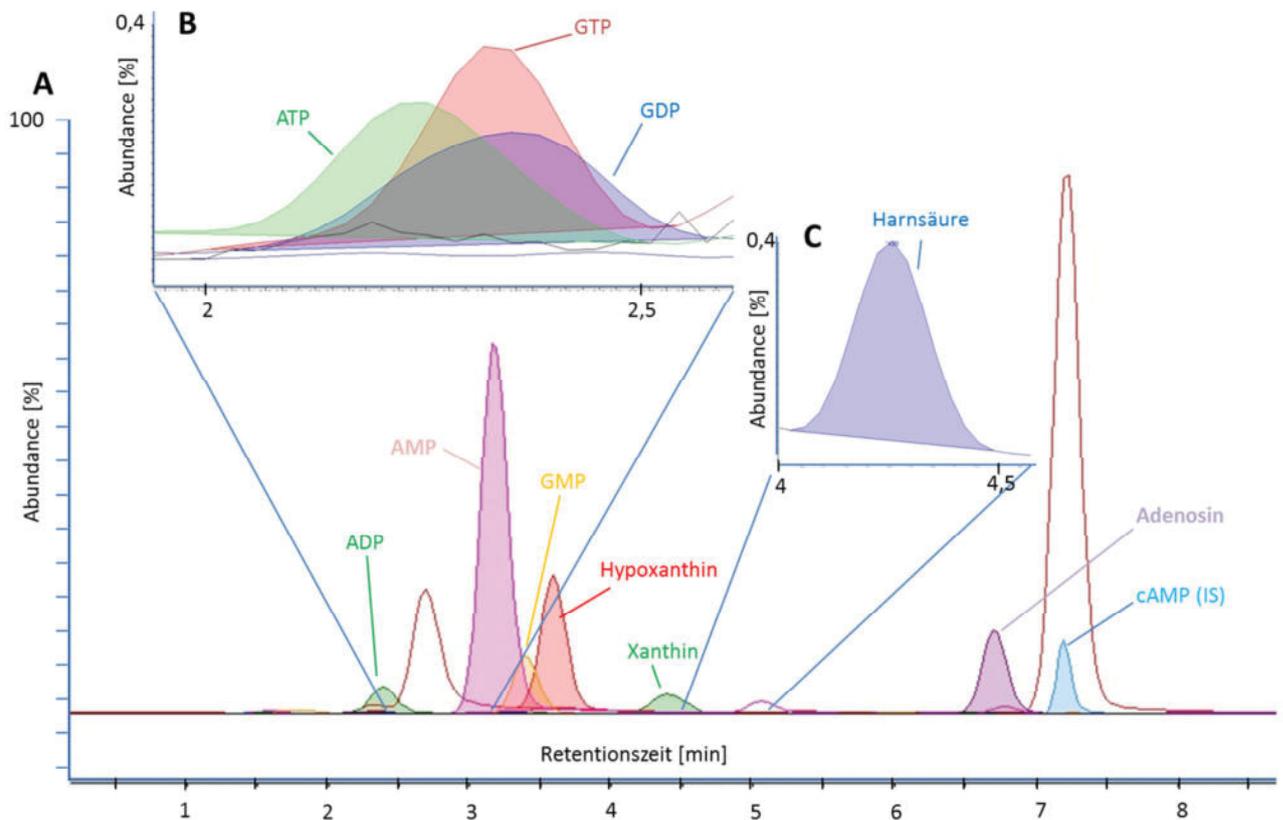
**Tabelle 8: Massen und Retentionszeiten der Nucleotidphosphate und Nucleoside**

Die Tabelle zeigt die bei Messungen ermittelten m/z-Verhältnisse und Retentionszeiten der Analyten. Der LOQ wurde über das Signal/Rausch-Verhältnis eines Standards mit der kleinsten sichtbaren Konzentration nach der FDA Guideline berechnet. Die Standardabweichungen der RT und Fläche wurden durch sechs Wiederholmessungen eines Mauserzens gemessen.

Analyten	m/z (+)	RT [min]	LOQ [µmol/L]	Standardabweichung [%]	
				RT	Fläche
Adenosin	268,1133	6,7	0,3	0,53	4,8
cAMP	330,0644	7,2	0,03	1,1	5,2
AMP	348,0776	3,2	2,5	1,6	10,1
ADP	428,0411	2,4	1,3	0,6	2,8
ATP	508,0032	2,2	1,2	1,2	20,6
cGMP	346,0635	7,2	0,07	1,1	5,2
GMP	364,0677	3,5	0,1	2	9,4
GDP	444,0321	2,4	0,08	0,9	13
GTP	523,9982	2,4	0,5	1,1	6,4
Harnsäure	169,0356	4,6	0,01	2	21,5
Hypoxanthin	137,0504	3,6	0,5	1,4	4,9
Xanthin	153,0407	4,4	0,5	1,8	6,1

Abbildung 12 zeigt das Chromatogramm der übereinandergelegten EICs aller Analyten, die in einem Mauserzen gemessen wurden. Die Analyten sind chromatographisch nicht komplett auftrennbar, jedoch über die QToF gut quantifizierbar. Es zeigen sich Stoffe auf derselben Massenspur, die jedoch über die Retentionszeiten gut von den gesuchten Analyten zu unterscheiden sind. Die Analyten cGMP und cAMP waren in den Mauserzen

nicht messbar und sind deshalb nicht im Chromatogramm vertreten. Dafür wurde der interne Standard cAMP hinzugegeben um die theoretische Retentionszeit der cyclischen Phosphate zu markieren.



**Abbildung 12: Chromatographische Trennung der gemessenen Nucleotidphosphate und Nucleoside eines Mauserzens**

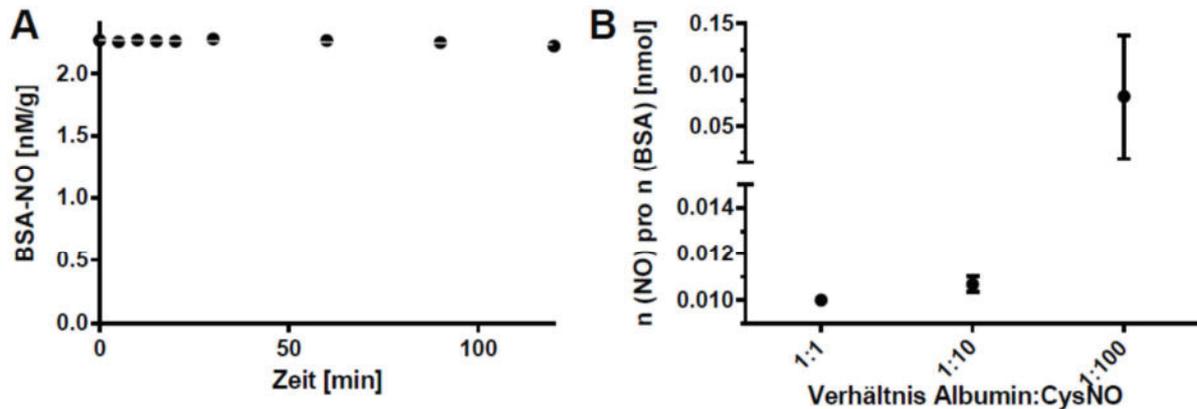
(A) Übereinandergelegte EICs aller Analyten skaliert auf den höchsten Peak bei 7.2 min. Peaks der Analyten sind farbig unterlegt. Farblich nicht markierte Peaks weisen Analyten auf derselben Massenspur aus. (B) Vergrößerte EICs der Triphosphate und GDP. (C) Vergrößertes EIC der Harnsäure. Alle Analyten zeigen keine Überlagerungen von Molekülen mit demselben  $m/z$ -Verhältnissen. Bei den Peaks von L-Cystein-NEM handelt es sich um Diastereoisomere.

### 3.3 Nitrosierung von Amin- und Thiolgruppen

Neben Nitrit, Nitrat und HbNO stellt RXNO einen weiteren NO-Metaboliten dar. Unter welchen Bedingungen RXNO gebildet wird und auch stabil ist, zeigen die hier aufgeführten Experimente und Ergebnisse. Auch die Rolle von RXNO als Transport von NO und Weitergabe von NO durch die sogenannte Transnitrosierung wird untersucht.

Die untere **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.** zeigt, dass RXNO, hier als nitrosiertes BSA (BSANO) nach Transnitrosierung mit CysNO, ein stabiles Produkt ist. Die Anfangskonzentration von 185 nM/g beträgt nach 2 h ca. 165 nM/g. Da die

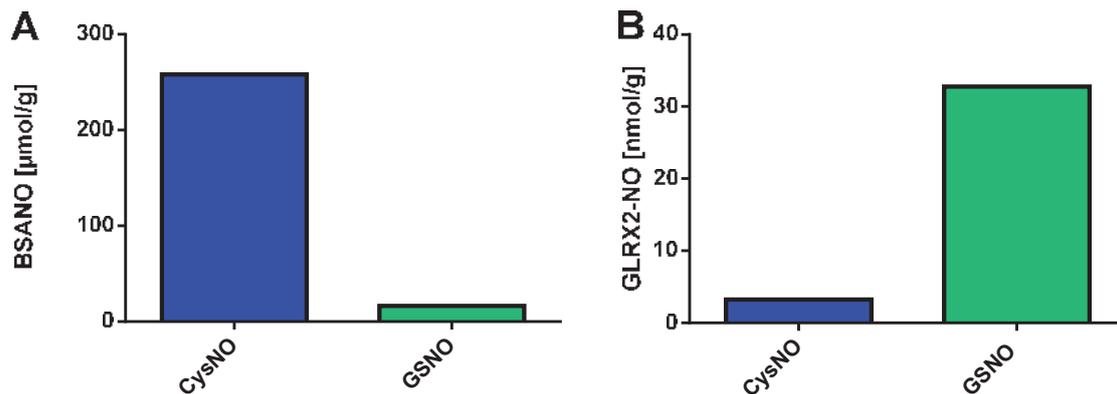
Konzentrationsänderung nur gering ist und nach 90 min minimal abnimmt wurde hier keine Zerfallsreaktion festgelegt. BSANO wurde während des Versuchs lichtgeschützt bei Raumtemperatur gehalten. In diesem Versuch können keine weiteren Moleküle außer BSANO beteiligt sein, freie Thiole wurden mit NEM geblockt. Die Transnitrosierungsrate von CysNO auf BSA ist gering. Es wird nur etwa eins von 100 NO-Molekülen von CysNO abgegeben und auf das Protein BSA transnitrosiert.



**Abbildung 13: RXNO ist ein stabiles Reaktionsprodukt mit geringer Transnitrosierungsrate**

Nicht reduziertes BSA (1 mM) wurde für beide Versuche 30 min mit CysNO bei RT inkubiert. (A) Logarithmische Darstellung des Konzentrationsverlaufes von BSANO. BSANO wurde für die Messungen von RXNO mit CLD im Zeitraum von 24 h lichtgeschützt auf RT gehalten. Das Ergebnis zeigt keinen Zerfall des nitrosierten Produkts. (n=2). (B) Bei einem BSA/CysNO-Verhältnis von 1:1 und 1:10 wird durch Transnitrosation nur eins von 100 BSA-Molekülen nitrosiert (Mean  $\pm$  SEM, n=3).

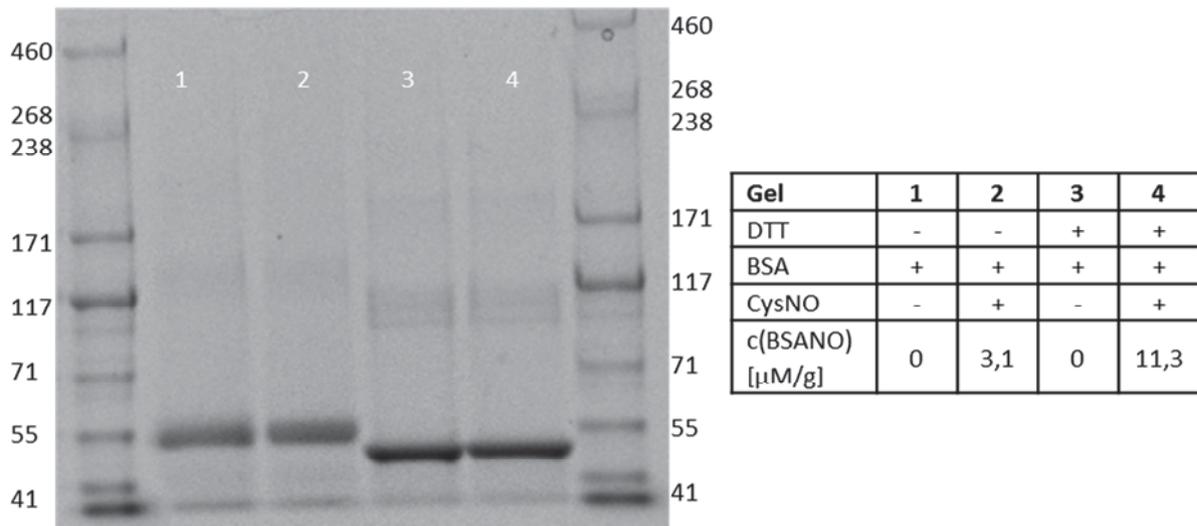
Um näher zu untersuchen, wovon die Transnitrosierungsrate abhängt, wurden unterschiedliche Transnitrosierungsreagenzien und 'Akzeptor' Proteine getestet. In Abbildung 14 wurden CysNO sowie GSNO als Transnitrosierungsreagenz und als NO-Molekül Akzeptor die Proteine BSA und das Monomer von Glutaredoxin 2 (GLRX2) gewählt. GLRX2 ist ein Protein der Glutaredoxine und interagiert im Organismus mit GSH. GSH lagert sich an eine Proteintasche des Dimers GLRX2 an. Sinkt die GSH Konzentration verlässt GSH die Tasche, das Dimer wird instabiler und zerfällt in das Monomer.<sup>85</sup> Es ist erkennbar, dass BSA wesentlich besser durch CysNO nitrosierbar ist. Das Monomer von GLRX2 hingegen ist wesentlich besser durch GSNO nitrosierbar. Die Effektivität der Transnitrosierung ist abhängig von dem Protein welches das NO-Molekül aufnimmt und der Transnitrosierungsreagenz.



**Abbildung 14: Effektivität der Transnitrosierung hängt von Protein und Nitrosierungsreagenz ab**

Die Proteine BSA (A) und murines GLRX2-Monomer (B) wurden jeweils mit denselben Konzentrationen an CysNO und GSNO inkubiert. CysNO ist für BSA eine effektivere Nitrosierungsreagenz als GSNO. Bei dem Monomer des GLRX2-Proteins der Maus ist GSNO effektiver. Die Proteinaufreinigung des murinen GLRX2-Proteins wurde von Anna Engelke durchgeführt (n=1).

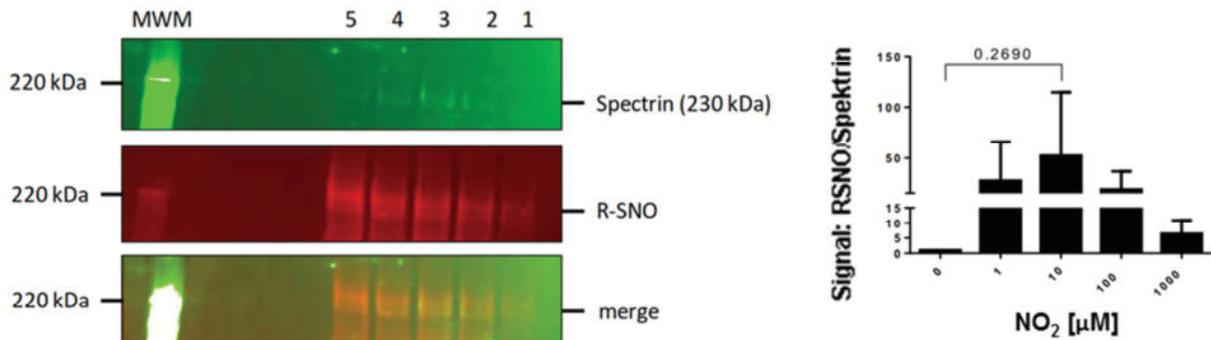
Im ersten Versuch wurde bereits die Stabilität von RXNO gezeigt. Um auszuschließen, dass RXNO zu einer Polymerisierung bei Proteinen oder der Ausbildung von Disulfidbindungen führt, wurde BSA mit DTT reduziert und anschließend mit CysNO transnitrosiert (Abbildung 15). Zur Kontrolle wurden dieselben Versuche auch ohne DTT, sowie CysNO Zugabe durchgeführt. Nach Entfernung von CysNO wurde das entstandene BSANO für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Es zeigen sich nach Auftrennung in allen Behandlungen 1-4 Banden bei 55 kDa, was dem Molekulgewicht von BSA entspricht. Bei Behandlung von BSA mit DTT zeigen sich leichte Banden bei 110 kDa, welche auf Dimere von BSA hinweisen, die über Disulfidbindungen zwischen den Monomeren entstehen. Dies ist jedoch unabhängig davon, ob eine Inkubation mit CysNO stattgefunden hat (Behandlung 4) oder nicht (Behandlung 3). Mithilfe der CLD konnte nachgewiesen werden, dass eine Transnitrosierung von BSA in beiden Fällen (Behandlungen 2 und 4) stattgefunden hat.



**Abbildung 15: Keine vermehrte Bildung von Dimeren nach Nitrosierung**

BSA wurde einmal mit und einmal ohne DTT, sowie mit und ohne CysNO behandelt. Versuch 1 und 2 wurden nicht mit DTT behandelt. Es zeigt sich kein Unterschied zwischen der Behandlung mit und ohne CysNO. Versuch 3 und 4 wurden mit DTT behandelt. Auch hier zeigt sich kein Unterschied. Beide Banden sind gleich stark bei etwa 50 kDa. Weitere Banden bei ca. 110 kDa weisen auf Dimere hin, auch hier gibt es keinen Unterschied in der Stärke. Die unterschiedlichen Laufabstände sind durch die Denaturierung von BSA nach Behandlung mit DTT erklärbar ( $n=3$ ). Die Konzentration an BSANO wurde mit der CLD gemessen.

Die vorherigen Versuche zeigen eine Nitrosierung und Transnitrosierung unter normoxischen Bedingungen. Um zu zeigen, dass eine Nitrosierung auch unter hypoxischen Bedingungen möglich ist, wurde die Nitrosierung mit unterschiedlichen Konzentrationen an Nitrit unter Sauerstoffausschluss durchgeführt. In Abbildung 16 ist ein Biotin Switch Assay zu sehen, bei dem das Membranprotein Spektrin nitrosiert wurde. Das obere Panel zeigt Spektrin als Negativ Kontrolle, welches nicht nitrosiert wurde. Das mittlere Panel zeigt nitrosiertes Spektrin an. Biotin lagert sich an die nitrosierten Thiolgruppen an und kann im UV-Spektrum detektiert werden. Eine Fluoreszenz des Spektrins nach der Nitrosierungsbehandlung ist im mittleren Panel deutlich erkennbar. Zudem zeigt sich, dass unterschiedliche Konzentrationen von  $1 \mu$ M bis  $1000 \mu$ M Nitrit eine unterschiedliche Nitrosierungseffektivität aufweisen. Eine zu hohe Konzentration an Nitrit wirkt hemmend auf die Nitrosierungsreaktion.



**Abbildung 16: Nitrosierung von Spektrin unter hypoxischen Bedingungen**

Spektrin (negativ Kontrolle oberes Panel) wurde unter hypoxischen Bedingungen mit unterschiedlichen Konzentrationen an Nitrit nitrosiert (mittleres Panel). Die linke Tasche enthält den Molekulargewichtsmarker (MWM). Die Konzentrationen sind in der rechten Grafik festgehalten und zeigen die Nitrosierungseffektivität als RSNO pro Spektrin in Abhängigkeit von der Nitrit Konzentration. Für die Auswertung wurde ein Biotin Switch Assay von *Biomol* verwendet. Die Versuche wurden von Herrn Dr. Lukas Vornholz durchgeführt (Friedman Test und Dunn's Multiple Comparison Test).

### 3.4 eNOS KO Mauslinien und Nrf2 KO Mäuse

Der NOx-Metabolismus wurde in globalen, EC und RBC eNOS KO und Nrf2 KO Mäusen gemessen. Zusätzlich wurden die Thiole in denselben Mäusen der globalen eNOS KO und Nrf2 KO Mauslinie im Vergleich zu einer WT Kontrolle gemessen. Die Konstellation der Ergebnisse in den Tabellen richtet sich danach welche Mausgruppen zum selben Zeitpunkt behandelt wurden.

Die NOx-Metaboliten der globalen eNOS KO und Nrf2 KO Mäuse werden untereinander und mit einer Kontrollgruppe in Tabelle 9 verglichen. In den Erythrozyten sinkt die Nitrat Konzentration in den globalen eNOS KO Mäusen auf 24 µM gegenüber der Kontrollgruppe 46 µM. Dieser Vergleich ist auch zu den Nrf2 KO Mäusen signifikant. Die RXNO Konzentration sinkt in den globalen eNOS KO Mäusen gegenüber den Nrf2 KO Mäusen. Die HbNO Konzentration sinkt in den globalen eNOS KO Mäusen auf 14 nM und steigt in den Nrf2 KO auf eine Konzentration von 117 nM. Die HbNO Konzentration in der Kontrollgruppe liegt mit 48 nM dazwischen. In den eNOS KO Mäusen sinken im Plasma alle NOx-Metaboliten signifikant gegenüber der Kontrollgruppe, während in den Nrf2 KO nur die RXNO Konzentration sinkt. Die Aorta ist nur in den globalen eNOS KO Mäusen von signifikanten Änderungen betroffen. Sowohl die Nitrit Konzentration sinkt um ein Drittel auf 43 µM als auch die RXNO Konzentration auf 855 nM. Im Herzen sinkt die Nitrit Konzentration in beiden KO Mäusen signifikant. Änderungen in der Leber machen sich nur

bei Betrachtung beider KO Mauslinien bemerkbar. So sinkt die Nitrat Konzentration 19  $\mu\text{M}$  in den globalen eNOS KO Mäusen gegenüber den Nrf2 KO Mäusen 35  $\mu\text{M}$ . Die RXNO Konzentration ist in den eNOS KO Mäusen höher. Nitrit und RXNO Konzentrationen steigen in der Lunge in den globalen eNOS KO Mäusen signifikant an. Die Lunge in den Nrf2 KO Mäusen weist keine Veränderungen auf.

**Tabelle 9: NOx-Metabolismus in globalen eNOS KO und Nrf2 KO Mäusen**

Konzentrationen von Nitrit, Nitrat, RXNO und HbNO in Blut und Organen von CTRL, globale NOS KO und Nrf2 KO (One-way ANOVA, Tukey's multiple Comparison Test,  $\uparrow$ = erhöht gegenüber Vergleichsgruppe,  $\downarrow$ = geringer gegenüber Vergleichsgruppe, n.s.= nicht signifikant) Die Proben wurden zusammen mit Frau Bernadette Fernandez an der Universität von Southampton gemessen.

Analyt/ Konz.	Mittelwert $\pm$ SD			P-Wert		
	CTRL (n= 5)	Globale NOS KO (n= 10)	Nrf2 KO (n= 11)	NOS vs CTRL	Nrf2 vs CTRL	NOS vs Nrf2
<b>Erythrozyten</b>						
Nitrit [ $\mu\text{M}$ ]	1,147 $\pm$ 0,170	1,014 $\pm$ 0,140	0,927 $\pm$ 0,130	n.s. 0,3773	n.s. 0,0933	n.s. 0,6393
Nitrat [ $\mu\text{M}$ ]	46,8 $\pm$ 12,3	24,6 $\pm$ 8,7	46,7 $\pm$ 13,1	$\downarrow^{**}$ 0,0065	n.s. 0,9999	$\downarrow^{***}$ 0,0009
RXNO [nM]	177 $\pm$ 46	129 $\pm$ 46	193 $\pm$ 63	n.s. 0,2597	n.s. 0,8569	$\downarrow^*$ 0,0344
HbNO [nM]	48 $\pm$ 15	14 $\pm$ 9	116 $\pm$ 54	n.s. 0,2432	$\uparrow^{**}$ 0,0066	$\uparrow^{****}$ < 0,0001
<b>Plasma</b>						
Nitrit [ $\mu\text{M}$ ]	0,938 $\pm$ 0,130	0,567 $\pm$ 0,091	0,806 $\pm$ 0,162	$\downarrow^{***}$ 0,0002	n.s. 0,1981	$\downarrow^{**}$ 0,0017
Nitrat [ $\mu\text{M}$ ]	27,3 $\pm$ 6,3	15,6 $\pm$ 7,2	30,4 $\pm$ 7,6	$\downarrow^*$ 0,0196	n.s. 0,7067	$\downarrow^{***}$ 0,0003
RXNO [nM]	21,2 $\pm$ 2,7	9,5 $\pm$ 5,4	13,4 $\pm$ 6,3	$\downarrow^{**}$ 0,0021	$\downarrow^*$ 0,0393	n.s. 0,2533
<b>Aorta</b>						
Nitrit [ $\mu\text{M}$ ]	146,1 $\pm$ 99,2	42,7 $\pm$ 12,7	87,4 $\pm$ 15,9	$\downarrow^*$ 0,0399	n.s. 0,2891	n.s. 0,4695
Nitrat [ $\mu\text{M}$ ]	2755 $\pm$ 1166	2924 $\pm$ 2503	6014 $\pm$ 4852	n.s. 0,9962	n.s. 0,2423	n.s. 0,1651
RXNO [nM]	2506 $\pm$ 836	855 $\pm$ 339	1597 $\pm$ 1154	$\downarrow^{**}$ 0,0054	n.s. 0,1473	n.s. 0,1442
<b>Herz</b>						
Nitrit [ $\mu\text{M}$ ]	1,67 $\pm$ 0,42	0,63 $\pm$ 0,18	0,78 $\pm$ 0,29	$\downarrow^{***}$ 0,0005	$\downarrow^{**}$ 0,0016	n.s. 0,7265
Nitrat [ $\mu\text{M}$ ]	57,3 $\pm$ 40,1	27,5 $\pm$ 8,2	31,2 $\pm$ 29,1	n.s. 0,3421	n.s. 0,3897	n.s. 0,9825
RXNO [nM]	144 $\pm$ 26	93,6 $\pm$ 19	123 $\pm$ 57	n.s. 0,088	n.s. 0,6253	n.s. 0,2505
<b>Leber</b>						
Nitrit [ $\mu\text{M}$ ]	0,297 $\pm$ 0,14	0,802 $\pm$ 0,50	0,669 $\pm$ 0,3	n.s. 0,0584	n.s. 0,185	n.s. 0,7073
Nitrat [ $\mu\text{M}$ ]	28,6 $\pm$ 9,3	18,9 $\pm$ 13,4	35,3 $\pm$ 9,7	n.s. 0,2769	n.s. 0,5228	$\downarrow^{**}$ 0,0078
RXNO [nM]	1040 $\pm$ 136	1114 $\pm$ 432	714 $\pm$ 278	n.s. 0,9129	n.s. 0,1854	$\uparrow^*$ 0,0291
<b>Lunge</b>						
Nitrit [ $\mu\text{M}$ ]	0,702 $\pm$ 0,051	2,073 $\pm$ 1,256	1,095 $\pm$ 0,299	$\uparrow^*$ 0,0139	n.s. 0,6491	$\uparrow^*$ 0,0286
Nitrat [ $\mu\text{M}$ ]	32,4 $\pm$ 3,5	50,8 $\pm$ 34,3	37,6 $\pm$ 8,7	n.s. 0,3725	n.s. 0,9174	n.s. 0,3954
RXNO [nM]	56,5 $\pm$ 21,1	111,4 $\pm$ 21,6	65,4 $\pm$ 24,0	$\uparrow^{***}$ 0,0005	n.s. 0,7479	$\uparrow^{***}$ 0,0003

Tabelle 10 charakterisiert die Veränderungen des NOx-Metabolismus in RBC eNOS KO Mäusen. Die Tabelle zeigt was das Fehlen der eNOS in den Erythrozyten für eine Auswirkung hat. In den Erythrozyten sinkt lediglich die HbNO Konzentration von 75 nM auf 45 nM in den KO Mäusen. Im Plasma sinken die Konzentrationen von Nitrit und Nitrat signifikant um ca. die Hälfte. Die Nitrit Konzentration steigt in der Aorta von 57 µM auf 118 µM. Herz und Lunge zeigen keine signifikanten Veränderungen. In der Leber steigt die RXNO Konzentration von 366 nM auf 1836 nM um das Fünffache an.

**Tabelle 10: NOx-Metabolismus in RBC eNOS KO Mäusen**

Konzentrationen von Nitrit, Nitrat, RXNO und HbNO in Blut und Organen von RBC eNOS KO im Vergleich zur Kontrolle (unpaired T-Test mit Welch Korrektur two tailed, ↑= erhöht gegenüber CTRL, ↓= geringer gegenüber CTRL, n.s.= nicht signifikant).

Analyt/ Konzentration	Mittelwert ± SD				P-Wert (vs WT)
	CTRL	n	RBC eNOS KO	n	
<b>Erythrozyten</b>					
Nitrit [µM]	0,938 ± 0,136	6	1,090 ± 0,352	5	n.s. 0,4063
Nitrat [µM]	68,4 ± 29,8	6	46,6 ± 15,6	7	n.s. 0,9727
RXNO [nM]	196,3 ± 123,3	7	125,3 ± 28,6	6	n.s. 0,1846
HbNO [nM]	74,7 ± 24,8	7	45,0 ± 13,3	6	↓* 0,022
<b>Plasma</b>					
Nitrit [µM]	1,516 ± 0,415	7	0,779 ± 0,067	6	↓** 0,0031
Nitrat [µM]	57,6 ± 9,2	7	25,4 ± 10,9	6	↓*** 0,0001
RXNO [nM]	72,0 ± 110,0	7	39,6 ± 22,6	6	n.s. 0,4953
<b>Aorta</b>					
Nitrit [µM]	57,57 ± 16,44	6	118,70 ± 42,34	6	↑* 0,0147
Nitrat [µM]	2961 ± 1184	6	2800 ± 1299	5	n.s. 0,8370
RXNO [µM]	2,749 ± 1,928	7	3,067 ± 1,737	6	n.s. 0,7604
<b>Herz</b>					
Nitrit [µM]	0,685 ± 0,150	7	0,916 ± 0,602	5	n.s. 0,4463
Nitrat [µM]	65,1 ± 19,1	7	86,8 ± 54,7	6	n.s. 0,0235
RXNO [nM]	54,0 ± 19,0	7	43,8 ± 10,4	6	n.s. 0,2692
<b>Leber</b>					
Nitrit [µM]	0,199 ± 0,063	7	0,163 ± 0,038	5	n.s. 0,2483
Nitrat [µM]	57,6 ± 17,7	7	50,7 ± 41,8	6	n.s. 0,6972
RXNO [nM]	366,4 ± 71,7	7	1836,1 ± 1541,8	6	↑* 0,0275
<b>Lunge</b>					
Nitrit [µM]	0,712 ± 0,241	7	0,498 ± 0,131	5	n.s. 0,0774
Nitrat [µM]	44,1 ± 13,2	7	40,1 ± 22,6	6	n.s. 0,7060
RXNO [nM]	62,9 ± 29,4	7	122,8 ± 106,3	6	n.s. 0,179

Der NOx-Metabolismus der EC eNOS KO Cre neg und Cre pos Mäuse wird in Tabelle 11 verglichen. Den KO Mäusen (Cre Pos) fehlt die eNOS in den Endothelzellen. In den Erythrozyten sinkt die RXNO Konzentration signifikant von 475 nM auf 225 nM, während sich die HbNO Konzentration nicht signifikant ändert. Nitrit und Nitrat sinken wie auch in den RBC eNOS KO Mäusen im Plasma. Der NOx-Metabolismus im Herzen und in der Aorta bleibt unverändert. Die Nitrat Konzentration in der Leber steigt von 38  $\mu$ M auf 71  $\mu$ M signifikant an und sinkt in der Lunge von 35  $\mu$ M auf 20  $\mu$ M.

**Tabelle 11: NOx-Metabolismus in EC eNOS KO Cre Neg/Pos Tam Mäusen**

Konzentrationen von Nitrit, Nitrat, RXNO und HbNO in Blut und Organen von EC eNOS KO Cre Pos Tam im Vergleich zur Kontrolle EC eNOS KO Cre Neg Tam (unpaired T-Test mit Welch Korrektur two tailed,  $\uparrow$ = erhöht gegenüber CTRL,  $\downarrow$ = geringer gegenüber CTRL, n.s.= nicht signifikant).

Analyt/ Konzentration	Mittelwert $\pm$ SD				P-Wert
	EC eNOS KO Cre Neg	n	EC eNOS KO Cre Pos	n	
<b>Erythrozyten</b>					
Nitrit [ $\mu$ M]	0,486 $\pm$ 0,162	5	0,432 $\pm$ 0,157	5	n.s. 0,6088
Nitrat [ $\mu$ M]	35,2 $\pm$ 14,2	4	17,6 $\pm$ 3,1	5	n.s. 0,088
RXNO [nM]	475 $\pm$ 158	5	225 $\pm$ 76	5	$\downarrow^*$ 0,0201
HbNO [nM]	62,9 $\pm$ 9,9	4	83,1 $\pm$ 39,1	5	n.s. 0,3209
<b>Plasma</b>					
Nitrit [ $\mu$ M]	0,806 $\pm$ 0,179	5	0,438 $\pm$ 0,097	5	$\downarrow^{**}$ 0,0065
Nitrat [ $\mu$ M]	41,3 $\pm$ 15,7	5	20,6 $\pm$ 4,2	5	$\downarrow^*$ 0,0219
RXNO [nM]	22,2 $\pm$ 4,5	4	16,3 $\pm$ 11,1	5	n.s. 0,3268
<b>Aorta</b>					
Nitrit [ $\mu$ M]	138,1 $\pm$ 62,1	5	141,4 $\pm$ 39,2	5	n.s. 0,9243
Nitrat [ $\mu$ M]	10191 $\pm$ 7765	5	5473 $\pm$ 4016	5	n.s. 0,2730
RXNO [nM]	2028 $\pm$ 1653	5	1870 $\pm$ 1002	5	n.s. 0,8344
<b>Herz</b>					
Nitrit [ $\mu$ M]	1,134 $\pm$ 0,305	5	1,272 $\pm$ 0,250	5	n.s. 0,3557
Nitrat [ $\mu$ M]	93,8 $\pm$ 26,5	5	78,4 $\pm$ 14,9	5	n.s. 0,2818
RXNO [nM]	81,9 $\pm$ 26,3	5	102,7 $\pm$ 37,2	5	n.s. 0,3406
<b>Leber</b>					
Nitrit [ $\mu$ M]	0,626 $\pm$ 0,340	5	0,826 $\pm$ 0,152	5	n.s. 0,2798
Nitrat [ $\mu$ M]	38,4 $\pm$ 22,3	5	71,0 $\pm$ 20,8	5	$\uparrow^*$ 0,0445
RXNO [nM]	1378 $\pm$ 749	5	1039 $\pm$ 283	5	n.s. 0,3857
<b>Lunge</b>					
Nitrit [ $\mu$ M]	0,657 $\pm$ 0,111	4	0,714 $\pm$ 0,105	5	n.s. 0,4668
Nitrat [ $\mu$ M]	35,6 $\pm$ 6,7	5	19,4 $\pm$ 5,5	5	$\downarrow^{**}$ 0,0035
RXNO [nM]	94,0 $\pm$ 19,9	4	79,4 $\pm$ 20,3	5	n.s. 0,3173

Tabelle 12 zeigt die Veränderung der Thiole und korrespondierenden Disulfide in eNOS KO und Nrf2 KO Mäusen. Die Lunge wurde in diesen Mäusen nicht untersucht. Die Erythrozyten dieser Mäuse unterliegen keinen signifikanten Veränderungen. Die eNOS KO Mäuse weisen eine signifikant höhere GSSG Konzentration von 844 nM gegenüber den Nrf2 KO Mäusen 399 nM auf. Aorta und Leber sind besonders von Veränderungen betroffen. In der Aorta sinkt die Cystein Konzentration bei beiden KO Mäusen. Gleichzeitig sinkt hier auch die GSH und GSSG Konzentration in den Nrf2 KO Mäusen. Das Verhältnis von oxidiertem zu reduziertem GSH in der Aorta ist in beiden KO Mäusen nicht signifikant beeinträchtigt. Die eNOS KO Mäuse zeigen gegenüber der Kontrolle eine erhöhte GSSG Konzentration (311 nM gegenüber 68 nM). Dies wirkt sich auch auf das Verhältnis von GSH zu GSSG signifikant aus, dass es in den eNOS KO Mäusen sinkt. Die Nrf2 KO Mäuse zeigen dieselbe Signifikanz im GSH/GSSG Verhältnis, jedoch bedingt durch eine niedrigere GSH Konzentration (4592 nmol/g) gegenüber der Kontrolle (8028 nmol/g). HCys sinkt in beiden KO Mäusen signifikant und Cystein steigt in den eNOS KO Mäusen. Beim direkten Vergleich von eNOS KO mit Nrf2 KO Mäusen zeigt sich der Unterschied beider KO Linien deutlicher. GSH, GSSG und Cystein Konzentration steigen in den eNOS KO Mäusen signifikant. Im Herzen zeigen sich signifikante Unterschiede nur zwischen den beiden KO Mäusen. Die GSH und Cystein Konzentration ist in den eNOS KO Mäusen höher als in den Nrf2 KO Mäusen.

**Tabelle 12: Thiol-Metabolismus in globalen eNOS KO und Nrf2 KO Mäusen**

Konzentrationen der Thiole und Disulfide in Blut und Organen von Kontrolle, globalen eNOS KO und Nrf2 KO (One-way ANOVA, Tukey's multiple Comparison Test, ↑= erhöht gegenüber Vergleichsgruppe, ↓= geringer gegenüber Vergleichsgruppe, n.s.= nicht signifikant) Die Proben wurden von Herrn Thomas Sutton an der Universität von Southampton gemessen.

Analyt/ Konz.	Mittelwert ± SD			P-Wert		
	CTRL (n= 5)	eNOS KO (n= 5)	Nrf2 KO (n= 5)	eNOS vs CTRL	Nrf2 vs CTRL	eNOS vs Nrf2
<b>Erythrozyten</b>						
GSH [µM]	3934 ± 523	3760 ± 587	3768 ± 303	n.s. 0,8409	n.s. 0,855	n.s. 0,9996
GSSG [nM]	1000 ± 100	900 ± 300	700 ± 100	n.s. 0,7365	n.s. 0,1909	n.s. 0,5258
GSH/GSSG	3766 ± 726	4419 ± 1720	4946 ± 841	n.s. 0,6667	n.s. 0,2919	n.s. 0,765
Cys [µM]	26,2 ± 10,6	39,8 ± 22,6	18,7 ± 2,9	n.s. 0,3340	n.s. 0,7038	n.s. 0,0958
Cystin [nM]	2489 ± 810	4589 ± 1685	2866 ± 1351	n.s. 0,0678	n.s. 0,8964	n.s. 0,1436
HCys [nM]	754 ± 317	923 ± 285	550 ± 104	n.s. 0,5599	n.s. 0,4393	n.s. 0,0914
<b>Plasma</b>						
GSH [µM]	26,5 ± 8,3	27,4 ± 9,1	16,2 ± 3,5	n.s. 0,9768	n.s. 0,1129	n.s. 0,0796
GSSG [nM]	600 ± 100	800 ± 300	400 ± 90	n.s. 0,5768	n.s. 0,1841	↑* 0,0324
GSH/GSSG	39,0 ± 10,2	35,8 ± 9,9	41,3 ± 7,4	n.s. 0,8533	n.s. 0,9232	n.s. 0,6372
Cys [µM]	11,9 ± 2,4	11,7 ± 4,2	8,2 ± 1,2	n.s. 0,9956	n.s. 0,1495	n.s. 0,1723
HCys [nM]	337 ± 159	247 ± 99	209 ± 36	n.s. 0,4312	n.s. 0,2	n.s. 0,8468
<b>Aorta</b>						
GSH [nmol/g]	216 ± 73	127 ± 32	105 ± 22	n.s. 0,05	↓* 0,0114	n.s. 0,7916
GSSG [nmol/g]	1,0 ± 0,2	0,3 ± 0,2	0,7 ± 0,4	↓* 0,0168	n.s. 0,2212	n.s. 0,2191
GSH/GSSG	224 ± 58	489 ± 309	186 ± 101	n.s. 0,1536	n.s. 0,9497	n.s. 0,0797
Cys [nmol/g]	54,1 ± 12,8	22,9 ± 9,2	18,2 ± 3,1	↓** 0,001	↓*** 0,0002	n.s. 0,7266
HCys [nmol/g]	2,32 ± 0,32	1,21 ± 0,42	3,22 ± 2,02	n.s. 0,4111	n.s. 0,5132	n.s. 0,0835
<b>Herz</b>						
GSH [nmol/g]	143 ± 52	183 ± 18	90 ± 12	n.s. 0,1735	n.s. 0,0628	↑** 0,0021
GSSG [nmol/g]	0,6 ± 0,4	0,7 ± 0,3	2,1 ± 2,6	n.s. 0,3281	n.s. 0,9911	n.s. 0,3881
GSH/GSSG	335 ± 217	202 ± 148	140 ± 55	n.s. 0,3963	n.s. 0,1599	n.s. 0,8074
Cys [nmol/g]	16,3 ± 6,9	20,2 ± 3,6	8,9 ± 1,8	n.s. 0,4244	n.s. 0,0669	↑** 0,0021
HCys [nmol/g]	0,63 ± 0,19	0,69 ± 0,27	0,42 ± 0,07	n.s. 0,8870	n.s. 0,2356	n.s. 0,1124
<b>Leber</b>						
GSH [nmol/g]	8028 ± 814	8548 ± 1083	4592 ± 2025	n.s. 0,831	↓** 0,0059	↑** 0,0021
GSSG [nmol/g]	68,6 ± 27,7	311 ± 73	150 ± 43	↑**** <0,0001	n.s. 0,0671	↑*** 0,001
GSH/GSSG	127 ± 31	28,9 ± 8,4	31,5 ± 15,1	↓**** <0,0001	↓**** <0,0001	n.s. 0,9788
Cys [nmol/g]	204 ± 16	286 ± 46	179 ± 52	↑* 0,0232	n.s. 0,6044	↑** 0,0041
HCys [nmol/g]	39,1 ± 7,4	21,7 ± 5,1	18,2 ± 6,6	↓** 0,0029	↓*** 0,0007	n.s. 0,6667

### 3.5 EC eNOS KO Mäuse Exercise-Modell

Bei dem Exercise-Modell der EC eNOS KO Mäuse wurde der Blick auf die Veränderungen im Endothel, dem Plasma und den Erythrozyten gelegt. Verglichen wurden die Vergleichsgruppen (EC eNOS KO neg) mit eNOS im Endothel mit den EC eNOS KO pos Mäusen. Die Gruppen unterteilen sich weiterhin in das Exercise und Sedentary Mäuse.

Tabelle 13 zeigt die Veränderungen des NO-Metabolismus in Exercise EC eNOS KO Mäusen. Die Nitrit Konzentration in den Erythrozyten der Sedentary Mäuse sinkt in den EC eNOS KO Mäusen. In den Exercise Mäusen ist keine Veränderung erkennbar. Im Plasma und der Aorta sind keine signifikanten Veränderungen des NO-Metabolismus zu erkennen.

Die Änderungen des Thiol-Metabolismus sind in Tabelle 14 zu sehen. In den Erythrozyten und dem Endothel zeigen sich keine signifikanten Unterschiede. Vergleicht man das Plasma der Mäuse mit eNOS im Endothel so zeigt sich, dass Exercise zu einer sinkenden GSH Konzentration führt. Die GSSG Konzentration und das Verhältnis von GSH zu GSSG bleiben unverändert. Der gleiche Effekt tritt ebenfalls bei Exercise Mäusen, welche keine eNOS im Endothel besitzen, auf. Die GSH Konzentration im Plasma sinkt in den Exercise EC eNOS KO Mäusen auf 0,05 nmol/mg im Vergleich zu den Exercise eNOS Mäusen (0,06 nmol/mg). Das Fehlen der eNOS im Endothel führt bei den Sedentary Mäusen zu einem Sinken der GSSG Konzentration von 0,25 pmol/mg auf 0,11 pmol/mg.

Die Konzentrationen der Nucleotidphosphate und Nucleoside in den Exercise eNOS KO Mäusen und den Kontrollgruppen sind in Tabelle 15 zu sehen.

**Tabelle 13: NOx-Metabolismus in Exercise EC eNOS KO Mäusen**

Konzentrationen von Nitrit und RXNO in Blut und Aorta der EC eNOS KO Mäusen und Kontrolle, Exercise und Sedentary. (One-way ANOVA, Tukey's multiple Comparison Test, ↑= erhöht gegenüber Vergleichsgruppe, ↓= geringer gegenüber Vergleichsgruppe, n.g.= nicht gemessen, n.s.= nicht signifikant).

Analyt/ Konz.	Mittelwert ± SD				P-Wert			
	EC eNOS KO neg Sedentary (n= 4)	Exercise (n= 7)	EC eNOS KO pos Sedentary (n= 6)	Exercise (n= 7)	Neg Sedentary / neg Exercise	Neg Sedentary / pos Sedentary	Neg Exercise / pos Exercise	Pos Sedentary / pos Exercise
<b>Erythrozyten</b>								
Nitrit [nmol/g]	0,4 ± 0,2	0,2 ± 0,2	0,1 ± 0,2	0,1 ± 0,1	n.s. 0,0905	↑* 0,034	n.s. 0,7236	n.s. 0,4364
Nitrat [nmol/g]	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	-	-	-	-
RXNO [pmol/g]	100 ± 140	80 ± 60	80 ± 70	20 ± 10	n.s. 0,6512	n.s. 0,7057	n.s. 0,0666	n.s. 0,0926
HbNO [pmol/g]	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	-	-	-	-
<b>Plasma</b>								
Nitrit [nM]	9,3 ± 2,4	11,9 ± 2,7	7,8 ± 2,0	9,2 ± 2,7	n.s. 0,1654	n.s. 0,3263	n.s. 0,2969	n.s. 0,114
Nitrat [µM]	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	-	-	-	-
RXNO [nM]	0,8 ± 0,2	1,5 ± 0,9	0,7 ± 0,1	0,9 ± 0,4	n.s. 0,1921	n.s. 0,3518	n.s. 0,2322	n.s. 0,1792
<b>Aorta</b>								
Nitrit [µM]	63,4 ± 22,9	69,1 ± 50,4	29,9 ± 3,2	49,4 ± 16,6	n.s. 0,8218	n.s. 0,6978	n.s. 0,3465	n.s. 0,6255
Nitrat [µM]	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	-	-	-	-
RXNO [nM]	1161 ± 640	912 ± 393	1010 ± 666	403 ± 236	n.s. 0,4473	n.s. 0,7111	n.s. 0,3663	n.s. 0,4261

Tabelle 14: Thiol-Metabolismus in Exercise EC eNOS KO Mäusen

Konzentrationen von Thiolen und Disulfiden in Blut und Aorta der EC eNOS KO Mäusen und Kontrolle, Exercise und Sedentary. (One-way ANOVA, Tukey's multiple Comparison Test, ↑= erhöht gegenüber Vergleichsgruppe, ↓= geringer gegenüber Vergleichsgruppe, n.g.= nicht gemessen, n.s.= nicht signifikant).

Analyt/ Konz.	Mittelwert ± SD				P-Wert			
	EC eNOS KO neg		EC eNOS KO pos		Neg Sedentary / neg Exercise	Neg Sedentary / pos Sedentary	Neg Exercise / pos Exercise	Pos Sedentary / pos Exercise
	Sedentary (n= 4)	Exercise (n= 7)	Sedentary (n= 6)	Exercise (n= 7)				
<b>Erythrozyten</b>								
Total GSH [nmol/mg]	0,37 ± 0,10	0,30 ± 0,07	0,38 ± 0,28	0,44 ± 0,48	n.s. 0,2736	n.s. 0,9143	n.s. 0,5063	n.s. 0,8175
GSH [nmol/mg]	0,36 ± 0,09	0,29 ± 0,07	0,37 ± 0,28	0,43 ± 0,48	n.s. 0,2761	n.s. 0,8182	n.s. 0,93	n.s. 0,5169
GSSG [nmol/mg]	0,003 ± 0,002	0,005 ± 0,004	0,005 ± 0,002	0,004 ± 0,002	n.s. 0,3726	n.s. 0,2628	n.s. 0,6488	n.s. 0,896
GSH/GSSG	178 ± 164	128 ± 153	82 ± 47	81 ± 66	n.s. 0,6977	n.s. 0,2047	n.s. 0,561	n.s. 0,9754
Cys [nmol/mg]	0,04 ± 0,02	0,03 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,03 ± 0,01	n.s. 0,3686	n.s. 0,9126	n.s. 0,4213	n.s. 0,7749
<b>Plasma</b>								
Total GSH [nmol/mg]	0,09 ± 0,02	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,05 ± 0,01	↓↑** 0,0077	n.s. 0,1471	↓* 0,0225	n.s. 0,487
GSH [nmol/mg]	0,09 ± 0,02	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,05 ± 0,01	↓↑** 0,0079	n.s. 0,1223	↓* 0,0242	n.s. 0,4456
GSSG [pmol/mg]	0,2 ± 0,1	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,2 ± 0,1	n.s. 0,0622	↓* 0,0391	n.s. 0,3438	n.s. 0,1603
GSH/GSSG	432 ± 182	476 ± 92	564 ± 164	427 ± 190	n.s. 0,6034	n.s. 0,2461	n.s. 0,5564	n.s. 0,1737
Cys [nmol/mg]	0,008 ± 0,001	0,006 ± 0,001	0,007 ± 0,001	0,007 ± 0,001	n.s. 0,0798	n.s. 0,4182	n.s. 0,2445	n.s. 0,9879
<b>Aorta</b>								
Total GSH [nmol/mg]	0,56 ± 0,62	0,33 ± 0,11	0,77 ± 0,92	0,47 ± 0,20	n.s. 0,3448	n.s. 0,699	n.s. 0,1301	n.s. 0,4184
GSH [nmol/mg]	0,56 ± 0,62	0,33 ± 0,1	0,77 ± 0,92	0,47 ± 0,20	n.s. 0,2803	n.s. 0,6972	n.s. 0,128	n.s. 0,4151
GSSG [pmol/mg]	1,2 ± 0,6	1,6 ± 1,3	1,4 ± 1,8	2,5 ± 2,3	n.s. 0,546	n.s. 0,8197	n.s. 0,443	n.s. 0,3871
GSH/GSSG	222 ± 40	321 ± 221	522 ± 328	299 ± 217	n.s. 0,4032	n.s. 0,1078	n.s. 0,8506	n.s. 0,1587
Cys [nmol/mg]	0,02 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,03 ± 0,04	0,01 ± 0,01	n.s. 0,5737	n.s. 0,5966	n.s. 0,8034	n.s. 0,2942

**Tabelle 15: Nucleotidphosphate und Nucleoside in Exercise EC eNOS KO Mäusen**

Konzentrationen der Nucleotidphosphate und Nucleoside in Blut und Aorta der EC eNOS KO Mäusen und Kontrolle, Exercise und Sedentary. (One-way ANOVA, Tukey's multiple Comparison Test, ↑= erhöht gegenüber Vergleichsgruppe, ↓= geringer gegenüber Vergleichsgruppe, n.s.= nicht signifikant).

Analyt/ Konz.	Mittelwert ± SD				P-Wert					
	EC eNOS KO neg		EC eNOS KO pos		Neg Sedentary / neg Exercise	Neg Sedentary / pos Sedentary	Neg Exercise / pos Exercise	Pos Sedentary / pos Exercise		
	Sedentary (n= 4)	Exercise (n= 7)	Sedentary (n= 6)	Exercise (n= 7)						
<b>Erythrozyten</b>										
Hypoxanthin [µmol/lmg]	3,3 ± 1,0	7,8 ± 5,0	4,9 ± 1,6	4,8 ± 2,2	n.s. 0,1791	n.s. 0,8954	n.s. 0,3729	n.s. 0,9999		
cGMP [µmol/lmg]	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	-	-	-	-		
AMP [µmol/lmg]	0,36 ± 0,19	0,29 ± 0,13	0,18 ± 0,06	0,24 ± 0,05	n.s. 0,7497	n.s. 0,1066	n.s. 0,8939	n.s. 0,8001		
ADP [µmol/lmg]	23 ± 3	32 ± 9	35 ± 14	29 ± 10	n.s. 0,5747	n.s. 0,3238	n.s. 0,9518	n.s. 0,7167		
GDP [µmol/lmg]	0,05 ± 0,02	0,05 ± 0,01	0,05 ± 0,03	0,07 ± 0,02	n.s. 0,9973	n.s. 0,907	n.s. 0,5663	n.s. 0,8819		
ATP [µmol/lmg]	0,08 ± 0,05	0,10 ± 0,01	0,10 ± 0,03	0,1 ± 0,02	n.s. 0,8214	n.s. 0,5918	n.s. 0,9965	n.s. 0,9958		
GTP [µmol/lmg]	0,11 ± 0,06	0,09 ± 0,02	0,09 ± 0,02	0,11 ± 0,02	n.s. 0,9572	n.s. 0,9328	n.s. 0,9026	n.s. 0,8664		
<b>Plasma</b>										
Hypoxanthin [µmol/lmg]	0,015 ± 0,006	0,015 ± 0,005	0,014 ± 0,001	0,015 ± 0,006	n.s. 0,9999	n.s. 0,9931	n.s. 0,9992	n.s. 0,9988		
Xanthin [µmol/lmg]	0,08 ± 0,05	0,04 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,04 ± 0,01	n.s. 0,1661	n.s. 0,4176	n.s. 0,9999	n.s. 0,9764		
Adenosin [µmol/lmg]	0,01 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,01 ± 0,01	0,017 ± 0,01	n.s. 0,7620	n.s. 0,9996	n.s. 0,9692	n.s. 0,4856		
cGMP [µmol/lmg]	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	-	-	-	-		
AMP [µmol/lmg]	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	-	-	-	-		
ADP [µmol/lmg]	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	-	-	-	-		
<b>Aorta</b>										
Hypoxanthin [µmol/lmg]	11,73 ± 9,07	21,67 ± 21,95	30,99 ± 32,52	14,7 ± 10,4	n.s. 0,8473	n.s. 0,4419	n.s. 0,9228	n.s. 0,5117		
Xanthin [µmol/lmg]	4,37 ± 3,48	5,72 ± 3,84	16,32 ± 16,46	6,42 ± 4,88	n.s. 0,9936	n.s. 0,1461	n.s. 0,9988	n.s. 0,2136		
Adenosin [µmol/lmg]	5,23 ± 3,90	5,71 ± 3,34	16,07 ± 22,49	6,08 ± 4,13	n.s. 0,9999	n.s. 0,4205	n.s. 0,9999	n.s. 0,4181		
cGMP [µmol/lmg]	200 ± 100	200 ± 100	1100 ± 1300	383 ± 289	n.s. 0,9999	n.s. 0,1636	n.s. 0,9745	n.s. 0,2443		
AMP [µmol/lmg]	0,40 ± 0,27	0,54 ± 0,29	1,28 ± 1,30	0,59 ± 0,48	n.s. 0,9874	n.s. 0,2189	n.s. 0,9994	n.s. 0,3395		
GMP [µmol/lmg]	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	-	-	-	-		

### 3.6 Blutverlust Anämie

Es wurden die NO<sub>x</sub>-Metabolite und Thiole in Mäusen mit Blutverlust Anämie gemessen. Desweiteren wurde der Einfluss eines erhöhten Nitrat Gehaltes im Trinkwasser auf den NO<sub>x</sub>-Metabolismus der Mäuse verglichen. Einer Gruppe wurde Leitungswasser – mit erhöhtem Nitrat Gehalt – verabreicht und einer Vittel Wasser. Um die Veränderung der Blutviskosität in den Anämie Mäusen zu berücksichtigen, wurde die NO<sub>x</sub> Konzentration im Blut durch die Proteinmenge dividiert. Tabelle 16 zeigt die Effekte von Nitrat reichem und Nitrat armen Trinkwasser in Kombination mit der Blutverlust Anämie. Die RXNO Konzentration ist in den Erythrozyten der Anämie Mäuse, welche Trinkwasser erhielten mit 315 pmol/g signifikant höher als bei Anämie Mäusen mit geringerem Nitrat Gehalt im Wasser (59 pmol/g). Der NO<sub>x</sub>-Metabolismus in Plasma und Aorta zeigt keine Unterschiede zwischen Anämie und Kontrolle, sowie bei Gabe der unterschiedlichen Trinkwässer. Im Herzen zeigt sich die Nitrit Konzentration bei Blutverlust Anämie geringer bei höherem Nitrat Gehalt im Trinkwasser. Auch die RXNO Konzentrationen ändern sich. Bei Gabe von Vittel als Trinkwasser steigt die Konzentration unter anämischen Bedingungen. Wird eine höhere Nitrat Dosis gegeben, zeigt sich der gegenteilige Effekt; die RXNO Konzentration sinkt in den Anämie Mäusen. In der Leber bewirkt die Gabe von zusätzlichem Nitrat, dass die Nitrit Konzentration in den Kontroll Mäusen von 4 µM auf 0,2 µM sinkt. Die Nitrat Konzentration steigt unter Nutzung von Vittel in den anämischen Mäusen auf 52 µM an.

**Tabelle 16: NOx-Metabolismus in Blutverlust Anämie bei unterschiedlichem Trinkwasser**

Konzentrationen von Nitrit, Nitrat, RXNO und HbNO in Blut und Organen der Blutverlust Anämie Mäuse und Kontrolle mit Verabreichung von Vittel und Leitungswasser (Tap Water). (Two-way ANOVA, Tukey's multiple Comparison Test, ↑= erhöht gegenüber CTRL, ↓= geringer gegenüber CTRL, n.s.= nicht signifikant).

Analyt/ Konz.	Mittelwert ± SD				P-Wert			
	Vittel		Tap Water		Vittel: CTRL/ Anämie	Tap Water: CTRL/ Anämie	CTRL: Vittel/Tap Water	Anämie: Vittel/Tap Water
	CTRL (n= 10)	Anämie (n= 11)	CTRL (n= 8)	Anämie (n= 11)				
<b>Erythrozyten</b>								
Nitrit [nmol/g]	0,3 ± 0,2	0,4 ± 0,2	0,4 ± 0,2	0,6 ± 0,2	n.s. 0,9146	n.s. 0,4793	n.s. 0,6559	n.s. 0,2091
Nitrat [nmol/g]	73,4 ± 72,4	18,4 ± 2,4	32,3 ± 11,7	36,1 ± 36,3	n.s. 0,1256	n.s. 0,9986	n.s. 0,2971	n.s. 0,9013
RXNO [pmol/g]	74,8 ± 46,8	59,5 ± 46,4	174,2 ± 184,6	315,5 ± 213,8	n.s. 0,9977	n.s. 0,1799	n.s. 0,5536	↓* 0,0273
HbNO [pmol/g]	120 ± 130	< LOD	10 ± 0	10 ± 10	↓* 0,0352	n.s. 0,9999	n.s. 0,064	n.s. 0,9983
<b>Plasma</b>								
Nitrit [µM]	0,6 ± 0,3	0,5 ± 0,2	0,6 ± 0,2	0,5 ± 0,2	n.s. 0,7429	n.s. 0,7646	n.s. 0,9999	n.s. 0,9982
Nitrat [µM]	26,8 ± 21,3	17,7 ± 12,3	21,9 ± 15,9	12,4 ± 6,7	n.s. 0,4646	n.s. 0,6825	n.s. 0,9145	n.s. 0,8941
RXNO [nM]	8,6 ± 5,9	9,6 ± 8,2	7,7 ± 2,4	9,5 ± 4,1	n.s. 0,9713	n.s. 0,9236	n.s. 0,9851	n.s. 0,9999
<b>Aorta</b>								
Nitrit [µM]	7,1 ± 14,8	4,1 ± 2,4	6,2 ± 1,2	22,0 ± 21,4	n.s. 0,9751	n.s. 0,1176	n.s. 0,999	n.s. 0,992
Nitrat [µM]	248 ± 258	190 ± 89	69 ± 70	24 ± 19	n.s. 0,8830	n.s. 0,9374	n.s. 0,0965	n.s. 0,2097
RXNO [nM]	36,3 ± 30,5	34,7 ± 13,3	41,4 ± 20,7	58,5 ± 23,7	n.s. 0,9992	n.s. 0,5090	n.s. 0,9736	n.s. 0,2543
<b>Herz</b>								
Nitrit [µM]	2,0 ± 1,2	1,3 ± 0,8	0,9 ± 0,7	0,8 ± 0,4	n.s. 0,3885	n.s. 0,9936	↑* 0,0273	n.s. 0,523
Nitrat [µM]	99 ± 141	99 ± 136	30 ± 23	82 ± 126	n.s. 0,9999	n.s. 0,8582	n.s. 0,7208	n.s. 0,9938
RXNO [nM]	64,3 ± 14,9	115,8 ± 41,5	56,3 ± 29	65,2 ± 31,9	↑** 0,0075	n.s. 0,904	n.s. 0,9361	↓** 0,0058
<b>Leber</b>								
Nitrit [µM]	3,9 ± 3,1	1,8 ± 1,7	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,1	n.s. 0,1273	n.s. 0,9999	↑** 0,0024	n.s. 0,2815
Nitrat [µM]	7,8 ± 5,2	52,1 ± 36,5	28,8 ± 21,2	34,7 ± 31,6	↑* 0,0464	n.s. 0,9682	n.s. 0,4165	n.s. 0,6772
RXNO [nM]	113,0 ± 69,1	178,7 ± 107,9	187,1 ± 96	90,6 ± 65,9	n.s. 0,4129	n.s. 0,1516	n.s. 0,3543	n.s. 0,1764

Die Thiol und Disulfid Konzentrationen verändern sich in den untersuchten Kompartimenten unter den anämischen Bedingungen bei Nutzung von Vittel als Trinkwasser. Die Ergebnisse sind in Tabelle 17 zu sehen. Sowohl die GSSG Konzentration (2,5 pmol/mg), als auch die GSH Konzentration (13 nmol/mg) in den Erythrozyten steigt in der Anämie (4,5 pmol/mg und 30 nmol/mg) an. Das Verhältnis von GSH/GSSG bleibt jedoch unverändert. Das Plasma in den untersuchten Mäusen zeigt keine signifikanten Veränderungen. In der Aorta zeigen sich dieselben Veränderungen wie in den Erythrozyten; GSH und GSSG steigen signifikant an, bleiben aber im selben Verhältnis zueinander. Im Herzen steigen die GSH Konzentration von 0,21 nmol/mg auf 0,3 nmol/mg und von Cystein von 33 pmol/mg auf 51 pmol/mg leicht an. In der Leber steigt die GSH Konzentration an, das Verhältnis von GSH/GSSG verändert sich jedoch nicht. Die Lunge zeigt die signifikantesten Veränderungen. Die GSH und GSSG Konzentrationen steigen an, haben jedoch keinen signifikanten Einfluss auf deren Verhältnis zueinander. Die Cystein Konzentration steigt von 1,7 nmol/mg auf 3,0 nmol/mg um das doppelte an. Die Konzentrationen von HCys und HCystin steigen um fast das Fünffache auf 13 pmol/mg bzw. 465 pmol/mg an.

**Tabelle 17: Thiol-Metabolismus in Mäusen mit Blutverlust Anämie**

Konzentrationen der Thiole und Disulfide in Blut und Organen der Blutverlust Anämie mit Vittel als Trinkwasser (unpaired t-Test, ↑= erhöht gegenüber Vergleichsgruppe, ↓= geringer gegenüber Vergleichsgruppe, n.s.= nicht signifikant).

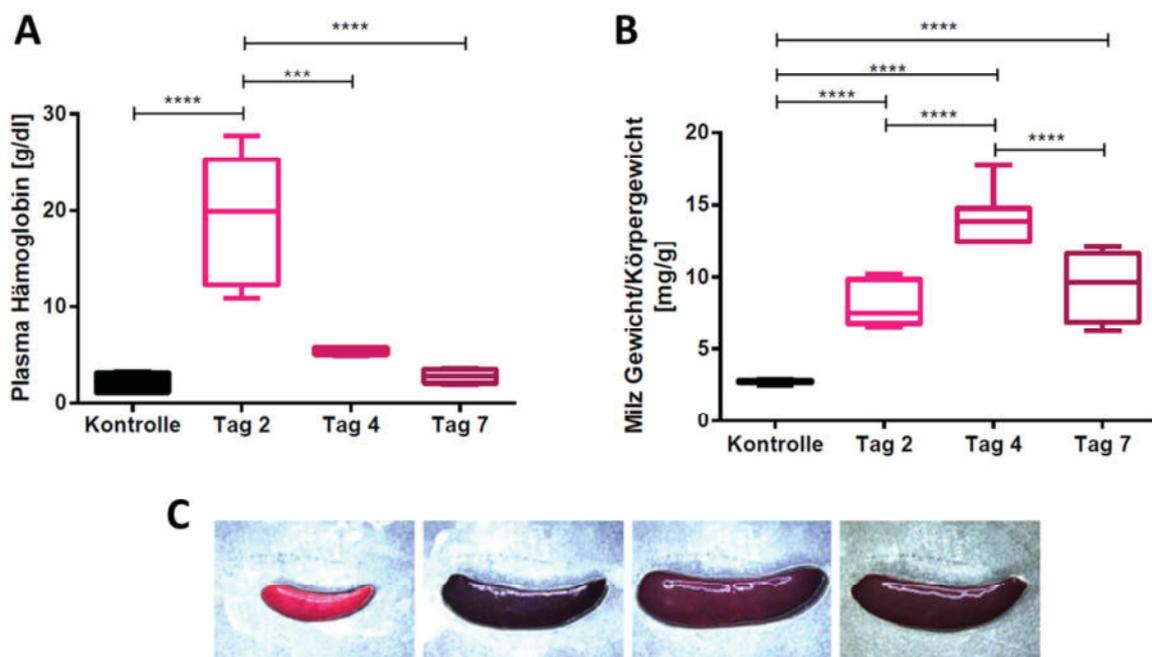
Analyt/ Konzentration	Mittelwert ± SD				P-Wert
	CTRL	n	Anämie	n	
<b>Erythrozyten</b>					
Total GSH [nmol/mg]	13,06 ± 5,13	7	30,68 ± 11,01	7	↑ ** 0,0029
GSH [nmol/mg]	13,05 ± 5,13	7	30,67 ± 11,02	7	↑ ** 0,0029
GSSG [nmol/mg]	0,002 ± 0,001	7	0,004 ± 0,001	7	↑ * 0,0422
GSH/GSSG	5597 ± 1333	7	7115 ± 2258	7	n.s. 0,1516
Cys [nmol/mg]	0,079 ± 0,046	7	0,097 ± 0,057	7	n.s. 0,5404
Cystin [nmol/mg]	< LOD	7	< LOD	7	-
HCys [nmol/mg]	0,002 ± 0,001	7	0,003 ± 0,001	7	n.s. 0,3117
HCystin [nmol/mg]	< LOD	7	< LOD	7	-
<b>Plasma</b>					
Total GSH [nmol/mg]	0,39 ± 0,12	7	0,33 ± 0,11	7	n.s. 0,3707
GSH [nmol/mg]	0,38 ± 0,12	7	0,32 ± 0,11	7	n.s. 0,3639
GSSG [nmol/mg]	0,001 ± 0,000	7	0,002 ± 0,000	7	n.s. 0,3208
GSH/GSSG	223 ± 81	7	172 ± 56	7	n.s. 0,1919
Cys [nmol/mg]	0,180 ± 0,049	7	0,177 ± 0,070	7	n.s. 0,9278
Cystin [nmol/mg]	< LOD	7	< LOD	7	-

Analyt/ Konzentration	Mittelwert $\pm$ SD				P-Wert
	CTRL	n	Anämie	n	
HCys [nmol/mg]	0,012 $\pm$ 0,004	7	0,017 $\pm$ 0,008	7	n.s. 0,1278
HCystin [nmol/mg]	< LOD	7	< LOD	7	-
<b>Aorta</b>					
Total GSH [nmol/mg]	0,12 $\pm$ 0,07	6	0,35 $\pm$ 0,15	6	$\uparrow$ ** 0,0071
GSH [nmol/mg]	0,12 $\pm$ 0,07	6	0,33 $\pm$ 0,15	6	$\uparrow$ ** 0,0085
GSSG [nmol/mg]	0,002 $\pm$ 0,002	6	0,006 $\pm$ 0,002	6	$\uparrow$ * 0,0425
GSH/GSSG	44 $\pm$ 23	6	47 $\pm$ 27	6	n.s. 0,825
Cys [nmol/mg]	1,248 $\pm$ 0,773	6	1,872 $\pm$ 1,147	6	n.s. 0,2953
Cystin [nmol/mg]	< LOD	6	< LOD	6	-
HCys [nmol/mg]	0,033 $\pm$ 0,018	6	< LOD	6	-
HCystin [nmol/mg]	< LOD	6	< LOD	6	-
<b>Herz</b>					
Total GSH [nmol/mg]	0,21 $\pm$ 0,07	7	0,30 $\pm$ 0,09	7	$\uparrow$ * 0,0474
GSH [nmol/mg]	0,21 $\pm$ 0,07	7	0,30 $\pm$ 0,08	7	$\uparrow$ * 0,0482
GSSG [nmol/mg]	0,001 $\pm$ 0,001	7	0,001 $\pm$ 0,000	7	n.s. 0,116
GSH/GSSG	687 $\pm$ 512	7	464 $\pm$ 320	7	n.s. 0,3479
Cys [nmol/mg]	0,033 $\pm$ 0,007	7	0,051 $\pm$ 0,006	7	$\uparrow$ *** 0,0004
Cystin [nmol/mg]	< LOD	7	< LOD	7	-
HCys [nmol/mg]	0,005 $\pm$ 0,003	7	0,005 $\pm$ 0,003	7	n.s. 0,9304
HCystin [nmol/mg]	0,019 $\pm$ 0,012	7	0,023 $\pm$ 0,010	7	n.s. 0,5778
<b>Leber</b>					
Total GSH [nmol/mg]	0,60 $\pm$ 0,31	7	1,71 $\pm$ 0,79	7	$\uparrow$ ** 0,0049
GSH [nmol/mg]	0,48 $\pm$ 0,22	7	1,64 $\pm$ 0,72	7	$\uparrow$ ** 0,0016
GSSG [nmol/mg]	0,083 $\pm$ 0,034	7	0,082 $\pm$ 0,037	7	n.s. 0,9676
GSH/GSSG	8 $\pm$ 2	7	33 $\pm$ 20	7	n.s. 0,0522
Cys [nmol/mg]	0,012 $\pm$ 0,006	7	0,013 $\pm$ 0,005	7	n.s. 0,9806
Cystin [nmol/mg]	1,153 $\pm$ 0,380	7	1,320 $\pm$ 0,370	7	n.s. 0,4205
HCys [nmol/mg]	< LOD	7	< LOD	7	-
HCystin [nmol/mg]	< LOD	7	< LOD	7	-
<b>Lunge</b>					
Total GSH [nmol/mg]	0,87 $\pm$ 0,18	7	1,37 $\pm$ 0,40	7	$\uparrow$ * 0,011
GSH [nmol/mg]	0,84 $\pm$ 0,20	7	1,35 $\pm$ 0,38	7	$\uparrow$ ** 0,0083
GSSG [nmol/mg]	0,011 $\pm$ 0,003	7	0,022 $\pm$ 0,061	7	$\uparrow$ ** 0,0035
GSH/GSSG	67 $\pm$ 27	7	63 $\pm$ 15	7	n.s. 0,7621
Cys [nmol/mg]	1,717 $\pm$ 0,674	7	3,013 $\pm$ 1,283	7	$\uparrow$ * 0,0356
Cystin [nmol/mg]	< LOD	7	< LOD	7	-
HCys [nmol/mg]	0,003 $\pm$ 0,001	7	0,014 $\pm$ 0,003	7	$\uparrow$ **** <0,0001
HCystin [nmol/mg]	0,194 $\pm$ 0,070	7	0,465 $\pm$ 0,27	7	$\uparrow$ * 0,0243

### 3.7 PHZ induzierte Anämie

In den Mäusen mit der PHZ induzierten Anämie wurden die NO<sub>x</sub>-Metaboliten, Nucleotidphosphate und Nucleoside sowie die Thiole an den Tagen 2 und 4 gemessen. Zum Vergleich wurden die Metabolite auch in Kontrollmäusen ohne induzierte Anämie und PHZ Zugabe gemessen. Um die Veränderung der Blutviskosität in den Anämie Mäusen zu berücksichtigen wurde die NO<sub>x</sub> Konzentration im Blut durch die Proteinmenge dividiert.

In Abbildung 17 sind die Auswirkungen der Anämie auf die Konzentration des freien Hämoglobins im Plasma und auf die Milz zu sehen. Die Konzentration des freien Hämoglobins steigt in den anämischen Mäusen und ist am zweiten Tag am höchsten. Danach nähert sie sich wieder dem Vergleichswert der Kontrolle an. Die Milz zeigt sich stark vergrößert in Anämie. Dies ist auch an Fotos der entnommenen Milz aus den Mäusen zu sehen. Die Milz wird bis Tag 4 immer größer und schrumpft dann wieder, bis sie an Tag 7 dieselbe Größe wie an Tag 2 aufweist.



**Abbildung 17: Freies Hämoglobin im Plasma und Vergrößerung der Milz**

Unter anämischen Bedingungen zeigt sich eine Erhöhung der Hämoglobin Konzentration im Plasma (A), welche sich an Tag 7 wieder den Anfangsbedingungen annähert. Die Milz ist an Tag 2, 4 und 7 stark vergrößert (B). Bilder von herausgenommenen Milzen (C) von links nach rechts: Kontrolle, Tag 2, 4 und 7. Die Messungen wurden von Frau Dr. Lenka Tomasova durchgeführt (One-way ANOVA, Tukey's multiple Comparison Test, n=7-9).

Die Ergebnisse sind in Tabelle 18 aufgeführt. Die größten Veränderungen sind in den Erythrozyten, dem Plasma und der Leber zu entnehmen. In den Erythrozyten sinken die Nitrit Konzentration an Tag zwei (9 pmol/g) und die RXNO Konzentration an Tag 2 (9 pmol/g) und vier (53 pmol/g) gegenüber der Kontrolle (Nitrit 277 pmol/g und RXNO 336 pmol/g) signifikant. Nitrat wurde nicht gemessen. Die HbNO Konzentration sinkt in den PHZ Mäusen und ist zwischen der Kontrolle und Tag 4 signifikant. Im Plasma sinkt die Nitrit Konzentration ebenfalls an Tag 2 (217 nmol/g) und Tag 4 (242 nmol/g) gegenüber der Kontrolle (440 nmol/g). Die Nitrat Konzentration sinkt nur an Tag 4 (330 nM) signifikant gegenüber der Kontrolle (24 µM), eine sinkende Tendenz ist jedoch schon an Tag 2 erkennbar (8 µM). RXNO hingegen steigt im Vergleich zur Kontrolle (3 nM) signifikant an beiden Entnahme-Tagen (Tag 2: 19 nM und Tag 4: 26 nM) an. In der Aorta gibt es bis auf den Anstieg der Nitrit Konzentration an Tag 4 (24 µM) keine signifikanten Veränderungen. Im Herzen sinkt die Nitrit Konzentration am selben Tag (1 µM) gegenüber den unbehandelten Mäusen (5 µM). Die anderen Ergebnisse im Herzen unterschieden sich nicht signifikant. In der Leber sinkt die RXNO Konzentration signifikant. Auch die Nitrit und RXNO Konzentrationen an Tag 4 sinken so stark, dass sie unter die Bestimmungsgrenze fallen. Gegenüber der Kontrolle sind diese Veränderungen signifikant. In der Lunge wurde die Nitrat Konzentration nicht gemessen. Die Konzentrationsunterschiede in Bezug auf Nitrit und RXNO sind nur zwischen Tag 2 und Tag 4 signifikant. Nitrit (Tag 2: 10 µM, Tag 4: 7 µM) sinkt und RXNO (Tag 2: 196 nM, Tag 4: 411 nM) steigt an.

**Tabelle 18: NOx-Metabolismus in PHZ induzierter Anämie Mäusen**

Konzentrationen von Nitrit, Nitrat, RXNO und HbNO in Blut und Organen der PHZ induzierten Anämie Mäuse an den Tagen 2, 4 und Vehikel (One-way ANOVA, Tukey's multiple Comparison Test, ↑= erhöht gegenüber Vehikel, ↓= geringer gegenüber Vehikel, n.g.= nicht gemessen, n.s.= nicht signifikant, LOQ CLD: 0,1 nM, LOQ ENO: 1 µM).

Analyt/ Konz.	Mittelwert ± SD			P-Wert		
	Vehikel (n= 6-13)	Tag 2 (n= 7-9)	Tag 4 (n= 7-9)	Vehikel vs Tag 2	Vehikel vs Tag 4	Tag 2 vs Tag 4
<b>Erythrozyten</b>						
Nitrit [nmol/g]	0,277 ± 0,270	0,009 ± 0,001	0,132 ± 0,161	↓* 0,027	n.s. 0,2616	n.s. 0,4135
RXNO [nmol/g]	0,336 ± 0,276	0,009 ± 0,002	0,053 ± 0,091	↓** 0,0019	↓** 0,0051	n.s. 0,8533
HbNO [pmol/g]	350 ± 170	180 ± 160	70 ± 80	n.s. 0,0774	↓** 0,0034	n.s. 0,3131
<b>Plasma</b>						
Nitrit [nM]	440,0 ± 197,8	217,8 ± 143,8	242,8 ± 109,8	↓* 0,011	↓* 0,021	n.s. 0,9361
Nitrat [µM]	24,0 ± 20,5	8,6 ± 8,6	0,3 ± 0,1	n.s. 0,0678	↓** 0,0037	n.s. 0,4709
RXNO [nM]	3,6 ± 2,9	19,2 ± 4,5	25,9 ± 10,1	↑*** 0,0003	↑**** 0,0001	n.s. 0,1281

Analyt/ Konz.	Mittelwert $\pm$ SD			P-Wert		
	Vehikel (n= 6-13)	Tag 2 (n= 7-9)	Tag 4 (n= 7-9)	Vehikel vs Tag 2	Vehikel vs Tag 4	Tag 2 vs Tag 4
<b>Aorta</b>						
Nitrit [ $\mu$ M]	7,49 $\pm$ 4,18	18,97 $\pm$ 14,39	24,41 $\pm$ 7,84	n.s. 0,0911	$\uparrow^*$ 0,01	n.s. 0,5299
Nitrat [ $\mu$ M]	241,7 $\pm$ 232,3	145,9 $\pm$ 211,0	31,3 $\pm$ 56,5	n.s. 0,5879	n.s. 0,1124	n.s. 0,4718
RXNO [nM]	215,6 $\pm$ 99,8	132,5 $\pm$ 61,4	114,2 $\pm$ 75,3	n.s. 0,1215	n.s. 0,05	n.s. 0,8928
<b>Herz</b>						
Nitrit [ $\mu$ M]	5,58 $\pm$ 5,03	2,61 $\pm$ 1,61	1,19 $\pm$ 0,26	n.s. 0,1891	$\downarrow^*$ 0,037	n.s. 0,667
Nitrat [ $\mu$ M]	12,7 $\pm$ 9,3	68,6 $\pm$ 94,3	n.g.	n.s.	n.s.	-
RXNO [nM]	108,2 $\pm$ 40,4	141,3 $\pm$ 166,5	86,1 $\pm$ 38,5	n.s. 0,8159	n.s. 0,9129	n.s. 0,5748
<b>Leber</b>						
Nitrit [nM]	74,8 $\pm$ 90,7	33,6 $\pm$ 43,8	< LOQ	n.s. 0,3804	$\downarrow^*$ 0,049	n.s. 0,4994
Nitrat [ $\mu$ M]	16,8 $\pm$ 22,6	40,6 $\pm$ 47,7	< LOQ	n.s. 0,3064	n.s. 0,5708	n.s. 0,0588
RXNO [nM]	56,7 $\pm$ 37,9	< LOQ	< LOQ	$\downarrow^{***}$ 0,0001	$\downarrow^{***}$ 0,0001	1
<b>Lunge</b>						
Nitrit [ $\mu$ M]	8,45 $\pm$ 1,77	10,31 $\pm$ 1,95	7,29 $\pm$ 1,59	n.s. 0,115	n.s. 0,4166	$\downarrow^{**}$ 0,007
Nitrat	n.g.	n.g.	n.g.	-	-	-
RXNO [nM]	236,4 $\pm$ 12,8	196,5 $\pm$ 87,1	411,0 $\pm$ 170,1	n.s. 0,8464	n.s. 0,0592	$\uparrow^*$ 0,014

Die durch PHZ ausgelöste Anämie in Mäusen beeinflusst vor allem das Blut und die Leber. In den Erythrozyten sinkt das Verhältnis von GSH zu GSSG, da die GSSG Konzentration an Tag 2 (8 pmol/mg) und Tag 4 (5 pmol/mg) zunimmt. Die GSH Konzentration sinkt im Plasma an beiden Abnahmetagen. An Tag 4 sinkt die GSH Konzentration stärker und deshalb auch das GSH/GSSG Verhältnis. In der Aorta steigt die totale GSH Konzentration an beiden Entnahmetagen an, wobei sie an Tag 2 wesentlich deutlicher ansteigt. Dies hat auch Einfluss auf das Verhältnis von GSH zu GSSG, welches sich an Tag 2 signifikant zur Seite von GSH verlagert. GSH steigt an Tag 2 um mehr als das Doppelte von 67 pmol/mg auf 160 pmol/mg an. GSSG steigt nur an Tag 4 an. Des Weiteren steigt die Cystein Konzentration an Tag 2 um das Doppelte und an Tag zwei um das Dreifache. Im Herzen steigen die GSH Konzentrationen. Die Konzentrationen für HCystein, HCystin und GSSG liegen im Herzen unter dem Detektionslimit und konnten daher nicht gemessen werden. Die GSSG Konzentration in der Leber steigt stark in den PHZ behandelten Mäusen. An Tag 2 liegt die Konzentration bei 341 pmol/mg und ist damit 100fach höher als in der Kontrollgruppe. Der Vergleich zwischen Kontrollgruppe und Tag 4 fällt noch höher aus, da die Konzentration um das 230fache auf 688 pmol/mg steigt. Diese Konzentrationsänderungen haben obwohl sich die GSH Konzentrationen nicht signifikant ändern eine Auswirkung auf den gesamt GSH Haushalt der ebenfalls an beiden Tagen

ansteigt. Die Cystein Konzentration steigt in den PHZ behandelten Mäusen. Auch die HCystein Konzentration steigt, jedoch nur an Tag 2 (3 pmol/mg). An Tag 4 gibt es keine signifikanten Unterschiede in der HCystein Konzentration in der Leber der hämolytischen Anämie Mäuse.

**Tabelle 19: Thiol Konzentrationen in den PHZ induzierten Anämie Mäusen**

Konzentrationen der Thiole und Disulfide in Blut und Organen der PHZ induzierten Anämie Mäuse an den Tagen 2, 4 und Vehikel (One-way ANOVA, Tukey's multiple Comparison Test, ↑= erhöht gegenüber Vehikel, ↓= geringer gegenüber Vehikel, n.g.= nicht gemessen, n.s.= nicht signifikant).

Analyt/ Konz.	Mittelwert ± SD			P-Wert		
	Vehikel (n= 8)	Tag 2 (n= 8)	Tag 4 (n= 8)	Vehikel vs Tag 2	Vehikel vs Tag 4	Tag 2 vs Tag 4
<b>Erythrozyten</b>						
Total GSH [nmol/mg]	3,31 ± 1,24	2,95 ± 1,68	4,40 ± 2,38	n.s. 0,932	n.s. 0,4806	n.s. 0,337
GSH [nmol/mg]	3,30 ± 1,26	2,51 ± 1,60	4,07 ± 1,91	n.s. 0,604	n.s. 0,605	n.s. 0,154
GSSG [pmol/mg]	1,2 ± 0,4	7,8 ± 2,5	5,5 ± 2,5	↑*** 0,0001	↑** 0,0034	n.s. 0,159
GSH/GSSG	2869 ± 1507	279 ± 47	643 ± 342	↓*** 0,0002	↓*** 0,0004	n.s. 0,167
Cystein [pmol/mg]	2,2 ± 0,7	2,4 ± 1,4	2,0 ± 0,3	n.s. 0,912	n.s. 0,959	n.s. 0,775
Cystin [nmol/mg]	< LOD	< LOD	< LOD	-	-	-
HCystein [pmol/mg]	0,35 ± 0,16	0,24 ± 0,13	0,25 ± 0,18	n.s. 0,317	n.s. 0,392	n.s. 0,988
HCystin [nmol/mg]	< LOD	< LOD	< LOD	-	-	-
<b>Plasma</b>						
Total GSH [nmol/mg]	0,13 ± 0,05	0,07 ± 0,02	0,03 ± 0,02	↓** 0,0034	↓**** <0,0001	n.s. 0,116
GSH [nmol/mg]	0,13 ± 0,05	0,07 ± 0,02	0,03 ± 0,02	↓** 0,0033	↓**** <0,0001	n.s. 0,116
GSSG [pmol/mg]	0,8 ± 0,4	0,4 ± 0,1	0,6 ± 0,6	n.s. 0,324	n.s. 0,696	n.s. 0,763
GSH/GSSG	168 ± 93	128 ± 49	77 ± 62	n.s. 0,509	↓* 0,0457	n.s. 0,339
Cystein [pmol/mg]	10,4 ± 0,8	8,7 ± 2,0	6,5 ± 3,3	n.s. 0,429	n.s. 0,021	n.s. 0,219
Cystin [nmol/mg]	< LOD	< LOD	< LOD	-	-	-
HCystein [pmol/mg]	1,0 ± 0,3	1,2 ± 0,7	0,7 ± 0,3	n.s. 0,731	n.s. 0,419	n.s. 0,126
HCystin [nmol/mg]	0,014 ± 0,004	0,013 ± 0,01	0,013 ± 0,004	n.s. 0,511	n.s. 0,973	n.s. 0,392
<b>Aorta</b>						
Total GSH [nmol/mg]	0,07 ± 0,03	0,16 ± 0,04	0,12 ± 0,04	↑*** 0,0003	↑* 0,0381	n.s. 0,1365
GSH [nmol/mg]	0,07 ± 0,03	0,16 ± 0,04	0,11 ± 0,05	↑*** 0,0005	n.s. 0,1344	n.s. 0,0508
GSSG [pmol/mg]	0,6 ± 0,3	0,7 ± 0,2	1,4 ± 0,7	n.s. 0,935	↑* 0,0131	↑* 0,0421
GSH/GSSG	91 ± 42	226 ± 157	94 ± 47	↑* 0,0473	n.s. 0,9973	n.s. 0,0544
Cystein [pmol/mg]	1,2 ± 0,3	2,9 ± 0,9	3,7 ± 0,8	↑*** 0,0006	↑**** <0,0001	n.s. 0,2031
Cystin [nmol/mg]	0,02 ± 0,02	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,01	n.s. 0,8111	n.s. 0,9783	n.s. 0,6781
HCystein [pmol/mg]	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,8	n.s. 0,9076	n.s. 0,2576	n.s. 0,4636
HCystin [nmol/mg]	< LOD	< LOD	< LOD	-	-	-
<b>Herz</b>						
Total GSH [nmol/mg]	0,07 ± 0,00	0,08 ± 0,00	0,07 ± 0,01	↑*** 0,0005	↑* 0,0151	n.s. 0,3264
GSH [nmol/mg]	0,07 ± 0,00	0,08 ± 0,00	0,07 ± 0,01	↑*** 0,0005	↑* 0,0169	n.s. 0,2951

Analyt/ Konz.	Mittelwert $\pm$ SD			P-Wert		
	Vehikel (n= 8)	Tag 2 (n= 8)	Tag 4 (n= 8)	Vehikel vs Tag 2	Vehikel vs Tag 4	Tag 2 vs Tag 4
GSSG [pmol/mg]	< LOD	< LOD	< LOD	-	-	-
GSH/GSSG	2441 $\pm$ 881	1441 $\pm$ 499	1076 $\pm$ 586	$\downarrow^*$ 0,0268	$\downarrow^{**}$ 0,002	n.s. 0,5667
Cystein [pmol/mg]	0,3 $\pm$ 0,0	0,3 $\pm$ 0,0	0,3 $\pm$ 0,0	n.s. 0,8717	n.s. 0,8776	n.s. 0,5916
Cystin [pmol/mg]	13,2 $\pm$ 0,5	13,1 $\pm$ 0,6	12,5 $\pm$ 0,3	n.s. 0,6981	n.s. 0,3875	n.s. 0,0956
HCystein [pmol/mg]	< LOD	< LOD	< LOD	-	-	-
HCystin [nmol/mg]	< LOD	< LOD	< LOD	-	-	-
<b>Leber</b>						
Total GSH [nmol/mg]	1,44 $\pm$ 0,19	2,63 $\pm$ 0,82	3,29 $\pm$ 1,20	$\uparrow^*$ 0,042	$\uparrow^{***}$ 0,0016	n.s. 0,307
GSH [nmol/mg]	1,43 $\pm$ 0,19	1,94 $\pm$ 0,69	1,91 $\pm$ 0,77	n.s. 0,274	n.s. 0,318	n.s. 0,994
GSSG [pmol/mg]	3,1 $\pm$ 0,6	341,8 $\pm$ 113,5	688,1 $\pm$ 253,4	$\uparrow^{**}$ 0,002	$\uparrow^{****}$ <0,0001	$\uparrow^{**}$ 0,0012
GSH/GSSG	455 $\pm$ 75	5 $\pm$ 1	2 $\pm$ 0	$\downarrow^{****}$ <0,0001	$\downarrow^{****}$ <0,0001	n.s. 0,988
Cystein [pmol/mg]	5,8 $\pm$ 1,7	17,5 $\pm$ 6,6	24,9 $\pm$ 9,9	$\uparrow^*$ 0,013	$\uparrow^{***}$ 0,0001	n.s. 0,117
Cystin [nmol/mg]	0,07 $\pm$ 0,04	0,07 $\pm$ 0,04	0,08 $\pm$ 0,03	n.s. 0,929	n.s. 0,993	n.s. 0,884
HCystein [pmol/mg]	1,6 $\pm$ 0,9	2,9 $\pm$ 1,2	2,1 $\pm$ 0,7	$\uparrow^*$ 0,046	n.s. 0,619	n.s. 0,245
HCystin [nmol/mg]	< LOD	< LOD	< LOD	-	-	-

Tabelle 20 zeigt die Veränderungen der Nucleotidphosphate und Nucleoside in den Organen der PHZ induzierten Mäuse an Tag 2, Tag 4 und Kontrolle. Die cGMP Konzentration in den Erythrozyten ist an Tag 2 nicht messbar und steigt erst wieder an Tag 4 an, ist dennoch signifikant niedriger als in der Kontrolle. Die ATP Konzentration sinkt an Tag 2 und ist im Vergleich zu Tag 4 signifikant höher. Die GTP Konzentration ist an Tag 4 (27 pmol/mg) höher als an Tag 2 und in der Kontrolle. Im Plasma steigt die Konzentration an Hypoxanthin an Tag 4 im Vergleich zu Tag 2 und Kontrolle. Die Adenosin Konzentration ist um das Fünffache (2,5 nmol/mg) als in der Kontrolle (0,6 nmol/mg). Gleichzeitig sinkt die cGMP Konzentration an Tag 4. GMP ist nur in den PHZ induzierten Mäusen messbar, nicht in der Kontrolle. Die Metabolite der XOR Hypoxanthin und Xanthin steigen in der Aorta an Tag 2 beide signifikant an. Letzterer ist auch an Tag 4 gegenüber der Kontrolle erhöht. Die Guanosinphosphate GMP und GTP sinken an Tag 2 gegenüber der Kontrolle, GTP sinkt auch an Tag 4. Zwischen Tag 2 und Tag 4 steigt die GTP Konzentration jedoch wieder. Hypoxanthin steigt in der Aorta an Tag 2 auf das Doppelte (16,4 nmol/mg) an und fällt im Vergleich von Tag 2 zu Tag 4 wieder signifikant auf (3,98 nmol/mg). Diese Abnahme ist noch unter der Konzentration der Kontrollgruppe, jedoch im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht signifikant. Xanthin steigt an beiden Tagen an. Die Triphosphate sinken generell. GTP sinkt an beiden Tagen und ATP sinkt an Tag 4 im Vergleich zu Tag 2. Die GMP Konzentration sinkt an Tag 2. Die Konzentrationen von Hypoxanthin und Xanthin zeigen im Herzen keine

Veränderung. Es zeigt sich aber vor allem ein deutliches Sinken der Adenosin Konzentration von 43 pmol/mg auf 26 pmol/mg an Tag 2 auf schließlich 17 pmol/mg an Tag 4. Wie auch in der Aorta sinken die Triphosphat Konzentrationen an beiden Tagen. Die ADP Konzentration sinkt auch an beiden Tagen. In der Leber steigt Hypoxanthin (7 nmol/mg) an Tag 2 und an Tag 4 (14 nmol/mg) gegenüber der Kontrolle (2 nmol/mg). Xanthin steigt nur an Tag 4 signifikant auf 11 nmol/mg im Vergleich zur Kontrolle 2 nmol/mg. Das Nucleosid Adenosin sinkt an Tag 2 und Tag 4. AMP sinkt an Tag 2 und ADP steigt von Tag 2 zu Tag 4 signifikant an.

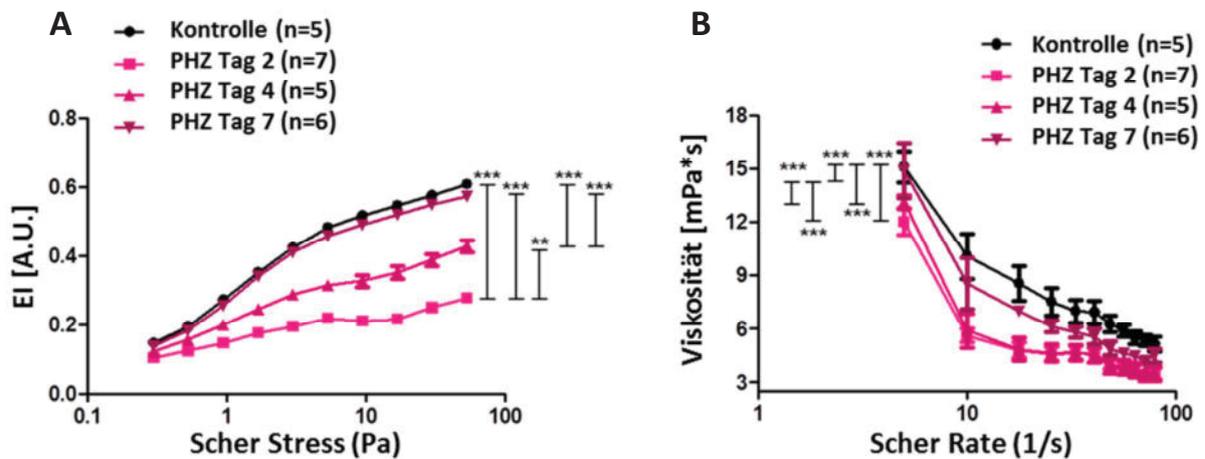
**Tabelle 20: Nucleotidphosphate und Nucleoside in PHZ induzierten Anämie Mäusen**

Konzentrationen der Nucleotidphosphate und Nucleoside in Blut und Organen der PHZ induzierten Anämie Mäuse an den Tagen 2, 4 und Vehikel (One-way ANOVA, Tukey's multiple Comparison Test, ↑= erhöht gegenüber Vehikel, ↓= geringer gegenüber Vehikel, n.s.= nicht signifikant).

Analyt/ Konz.	Mittelwert ± SD			P-Wert		
	Vehikel (n= 8)	Tag 2 (n= 8)	Tag 4 (n= 8)	Vehikel vs Tag 2	Vehikel vs Tag 4	Tag 2 vs Tag 4
<b>Erythrozyten</b>						
Hypoxanthin [nmol/mg]	0,023 ± 0,010	0,012 ± 0,005	0,034 ± 0,021	n.s. 0,448	n.s. 0,42	n.s. 0,061
Xanthin [pmol/mg]	3,1 ± 0,9	6,5 ± 3,2	7,6 ± 4,1	n.s. 0,197	n.s. 0,084	n.s. 0,818
Harnsäure [nmol/mg]	0,03 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,03 ± 0,01	n.s. 0,633	n.s. 0,785	n.s. 0,942
Adenosin [nmol/mg]	0,13 ± 0,06	0,11 ± 0,05	0,32 ± 0,23	n.s. 0,963	n.s. 0,254	n.s. 0,064
cAMP [nmol/mg]	< LOD	< LOD	< LOD	-	-	-
cGMP [pmol/mg]	0,06 ± 0,35	< LOD	0,02 ± 0,01	↓**** < 0,0001	↓** 0,0073	n.s. 0,219
AMP [pmol/mg]	0,9 ± 0,2	1,0 ± 0,5	1,2 ± 0,9	n.s. 0,865	n.s. 0,603	n.s. 0,882
GMP [nmol/mg]	1,02 ± 0,42	3,30 ± 2,03	2,25 ± 1,71	n.s. 0,124	n.s. 0,38	n.s. 0,351
ADP [nmol/mg]	0,28 ± 0,11	0,13 ± 0,04	0,25 ± 0,17	n.s. 0,054	n.s. 0,903	n.s. 0,294
GDP [nmol/mg]	0,21 ± 0,14	0,26 ± 0,18	0,32 ± 0,23	n.s. 0,847	n.s. 0,494	n.s. 0,811
ATP [nmol/mg]	1,95 ± 0,78	0,41 ± 0,46	2,48 ± 1,6	↓* 0,036	n.s. 0,621	↑** 0,004
GTP [pmol/mg]	15,2 ± 5,0	4,3 ± 2,6	27,3 ± 13,8	n.s. 0,074	↑* 0,042	↑*** 0,0003
<b>Plasma</b>						
Hypoxanthin [pmol/mg]	0,7 ± 0,3	0,6 ± 0,1	2,8 ± 2,6	n.s. 0,999	↑* 0,034	↑* 0,04
Xanthin [pmol/mg]	21,7 ± 21,5	10,3 ± 3,0	17,5 ± 11,2	n.s. 0,304	n.s. 0,832	n.s. 0,611
Harnsäure [nmol/mg]	0,31 ± 0,12	0,40 ± 0,15	0,42 ± 0,24	n.s. 0,589	n.s. 0,441	n.s. 0,976
Adenosin [nmol/mg]	0,60 ± 0,15	1,54 ± 0,72	2,57 ± 1,63	n.s. 0,253	↑** 0,005	n.s. 0,177
cAMP [fmol/mg]	<LOD	<LOD	<LOD	-	-	-
cGMP [pmol/mg]	0,2 ± 0,2	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0,0	n.s. 0,157	↓* 0,041	n.s. 0,768
AMP [pmol/mg]	0,3 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,2 ± 0,1	n.s. 1	n.s. 0,287	n.s. 0,264
GMP [nmol/mg]	< LOD	0,25 ± 0,05	0,22 ± 0,09	↑**** < 0,0001	↑**** < 0,0001	n.s. 0,574
ADP [pmol/mg]	4,9 ± 4,2	3,5 ± 1,2	3,6 ± 2,1	n.s. 0,612	n.s. 0,639	n.s. 0,997
GDP [nmol/mg]	< LOD	< LOD	< LOD	-	-	-

Analyt/ Konz.	Mittelwert $\pm$ SD			P-Wert		
	Vehikel (n= 8)	Tag 2 (n= 8)	Tag 4 (n= 8)	Vehikel vs Tag 2	Vehikel vs Tag 4	Tag 2 vs Tag 4
<b>Aorta</b>						
Hypoxanthin [nmol/mg]	7,7 $\pm$ 6,6	16,4 $\pm$ 5,4	4,0 $\pm$ 1,7	$\uparrow^*$ 0,010	n.s. 0,402	$\downarrow^{***}$ 0,0009
Xanthin [nmol/mg]	0,44 $\pm$ 0,25	1,16 $\pm$ 0,42	1,69 $\pm$ 0,88	$\uparrow^*$ 0,0369	$\uparrow^{**}$ 0,0011	n.s. 0,194
Harnsäure [nmol/mg]	< LOD	< LOD	< LOD	-	-	-
Adenosin [nmol/mg]	8,4 $\pm$ 1,8	9,3 $\pm$ 3,8	6,2 $\pm$ 2,6	n.s. 0,855	n.s. 0,417	n.s. 0,163
cAMP [nmol/mg]	< LOD	< LOD	< LOD	-	-	-
cGMP [nmol/mg]	< LOD	< LOD	< LOD	-	-	-
AMP [nmol/mg]	38,76 $\pm$ 19,29	21,73 $\pm$ 9,70	17,15 $\pm$ 8,83	n.s. 0,767	n.s. 0,0622	n.s. 0,855
GMP [nmol/mg]	0,07 $\pm$ 0,04	0,03 $\pm$ 0,01	0,02 $\pm$ 0,01	$\downarrow^*$ 0,026	n.s. 0,06	n.s. 0,996
ADP [nmol/mg]	1,17 $\pm$ 1,08	2,15 $\pm$ 1,88	2,58 $\pm$ 1,48	n.s. 0,401	n.s. 0,183	n.s. 0,839
GDP [nmol/mg]	< LOD	< LOD	< LOD	-	-	-
ATP [nmol/mg]	4,62 $\pm$ 1,83	5,86 $\pm$ 2,28	3,20 $\pm$ 1,35	n.s. 0,434	n.s. 0,398	$\downarrow^*$ 0,047
GTP [nmol/mg]	0,13 $\pm$ 0,03	0,06 $\pm$ 0,01	0,09 $\pm$ 0,02	$\downarrow^{***}$ 0,0002	$\downarrow^*$ 0,0397	$\uparrow^*$ 0,046
<b>Herz</b>						
Hypoxanthin [nmol/mg]	0,091 $\pm$ 0,007	0,074 $\pm$ 0,028	0,074 $\pm$ 0,029	n.s. 0,377	n.s. 0,3491	n.s. 0,9982
Xanthin [pmol/mg]	21,1 $\pm$ 1,5	25 $\pm$ 3,9	21,1 $\pm$ 3,5	n.s. 0,0643	n.s. 0,9998	n.s. 0,0777
Harnsäure [nmol/mg]	0,05 $\pm$ 0,01	0,07 $\pm$ 0,03	0,04 $\pm$ 0,02	n.s. 0,15	n.s. 0,7676	$\downarrow^*$ 0,0385
Adenosin [nmol/mg]	0,04 $\pm$ 0,01	0,03 $\pm$ 0,01	0,02 $\pm$ 0,01	$\downarrow^{**}$ 0,0053	$\downarrow^{****}$ < 0,0001	n.s. 0,1732
cAMP [nmol/mg]	< LOD	< LOD	< LOD	-	-	-
cGMP [fmol/mg]	< LOD	< LOD	< LOD	-	-	-
AMP [pmol/mg]	72 $\pm$ 7	72 $\pm$ 30	74 $\pm$ 18	n.s. 0,9987	n.s. 0,9748	n.s. 0,9836
GMP [nmol/mg]	0,015 $\pm$ 0,003	0,013 $\pm$ 0,006	0,016 $\pm$ 0,004	n.s. 0,8202	n.s. 0,8651	n.s. 0,5143
ADP [nmol/mg]	0,083 $\pm$ 0,010	0,065 $\pm$ 0,012	0,053 $\pm$ 0,008	$\downarrow^{**}$ 0,0041	$\downarrow^{****}$ < 0,0001	0,0547
GDP [nmol/mg]	0,013 $\pm$ 0,006	0,016 $\pm$ 0,008	0,009 $\pm$ 0,001	n.s. 0,5819	n.s. 0,5041	n.s. 0,1059
ATP [nmol/mg]	2,75 $\pm$ 0,59	1,89 $\pm$ 0,83	1,76 $\pm$ 0,34	$\downarrow^*$ 0,0406	$\downarrow^*$ 0,0179	n.s. 0,918
GTP [pmol/mg]	4,9 $\pm$ 2,6	1,9 $\pm$ 0,9	1,7 $\pm$ 0,8	$\downarrow^{**}$ 0,0071	$\downarrow^{**}$ 0,0036	n.s. 0,9510
<b>Leber</b>						
Hypoxanthin [nmol/mg]	1,92 $\pm$ 1,16	7,62 $\pm$ 3,39	14,1 $\pm$ 5,13	$\uparrow^*$ 0,0193	$\uparrow^{****}$ < 0,0001	$\uparrow^{**}$ 0,0028
Xanthin [nmol/mg]	1,84 $\pm$ 1,18	5,24 $\pm$ 2,23	11,27 $\pm$ 7,03	n.s. 0,2697	$\uparrow^{***}$ 0,0007	$\uparrow^*$ 0,027
Harnsäure [nmol/mg]	0,01 $\pm$ 0,005	0,03 $\pm$ 0,02	0,02 $\pm$ 0,01	n.s. 0,0925	n.s. 0,261	n.s. 0,811
Adenosin [nmol/mg]	36,66 $\pm$ 15,51	13,13 $\pm$ 5,79	15,67 $\pm$ 5,31	$\downarrow^{***}$ 0,0005	$\downarrow^{**}$ 0,0021	n.s. 0,882
cAMP [nmol/mg]	< LOD	< LOD	< LOD	-	-	-
cGMP [fmol/mg]	< LOD	< LOD	< LOD	-	-	-
AMP [nmol/mg]	684 $\pm$ 464	268 $\pm$ 149	397 $\pm$ 282	$\downarrow^*$ 0,049	n.s. 0,233	n.s. 0,731
GMP [nmol/mg]	0,837 $\pm$ 0,141	0,514 $\pm$ 0,277	0,765 $\pm$ 0,681	n.s. 0,687	n.s. 0,982	n.s. 0,593
ADP [nmol/mg]	7,2 $\pm$ 1,5	8,8 $\pm$ 3,3	3,9 $\pm$ 2,0	n.s. 0,478	n.s. 0,074	$\downarrow^{**}$ 0,003
GDP [nmol/mg]	0,028 $\pm$ 0,041	0,028 $\pm$ 0,015	0,017 $\pm$ 0,010	n.s. 1	n.s. 0,712	n.s. 0,706
ATP [nmol/mg]	0,52 $\pm$ 0,50	0,18 $\pm$ 0,08	0,12 $\pm$ 0,09	n.s. 0,105	n.s. 0,059	n.s. 0,929
GTP [nmol/mg]	< LOD	< LOD	< LOD	-	-	-

Zusätzlich zu den Metaboliten wurde die Verformbarkeit der Erythrozyten gemessen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 18 zu sehen. Die Verformbarkeit der Erythrozyten ist als EI angegeben. Die Erythrozyten der PHZ Mäuse zeigen bei steigendem Scherstress eine schlechtere Verformbarkeit als die Kontrollgruppe. Die Verformbarkeit der Erythrozyten ist an Tag 2 am schlechtesten und kehrt an Tag 4 und Tag 7 wieder langsam auf das Niveau der Kontrollmäuse zurück. Die Viskosität des Vollbluts sinkt in den PHZ induzierten Mäusen. An Tag 2 und 4 sind kaum Unterschiede in der Viskosität erkennbar. An Tag 7 ist eine Rückkehr zu den Ausgangsbedingungen erkennbar.



**Abbildung 18: Schlechtere Verformbarkeit der Erythrozyten und Viskosität des Bluts der PHZ Mäuse**

(A) Zur Messung des EI der Erythrozyten wurde Erythrozyten Pellet der Mäuse gemessen. Die Erythrozyten der PHZ Mäuse zeigen bei steigendem Scherstress eine schlechtere Verformbarkeit. (B) Die Viskosität des Vollbluts ist ebenso niedriger in den PHZ Mäusen (One-way ANOVA, Tukey's multiple Comparison Test).

### 3.8 Zusammenfassung Thiol- und NOx-Konzentrationen aller Experimente

Die unteren Tabellen dienen der Zusammenfassung der gemessenen Metabolite in den einzelnen Mauslinien. Die Tabellen enthalten nur die Signifikanzen. Das Signifikanz Niveau ist mit der Anzahl der Pfeile angegeben, die Tendenz gegenüber dem Vergleich mit der Richtung des Pfeils. Es zeigen sich einige Gemeinsamkeiten im NOx-Metabolismus aller Mäuse. Fehlt in den Erythrozyten eNOS, oder liegt eine defizitäre Funktion dieser wie in den Blutverlust oder PHZ Mäusen vor, sinkt die HbNO Konzentration. In allen eNOS KO Mauslinien und in den PHZ Mäusen sinken die Nitrit und Nitrat Konzentrationen im Plasma signifikant. Einzig in den Nrf2 KO Mäusen bleiben diese Konzentrationen von



Mauslinie		Analyt	RBC	Plasma	Aorta	Herz	Leber	Lunge	
Blutverlust Anämie	Vittel: CTRL vs Anämie	Nitrit	=	=	=	=	=	n.g.	
		Nitrat	=	=	=	=	↑	n.g.	
		RXNO	=	=	=	↑↑	=	n.g.	
		HbNO	↓	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	
	Tap Water: CTRL vs Anämie	Nitrit	=	=	=	=	=	=	n.g.
		Nitrat	=	=	=	=	=	=	n.g.
		RXNO	=	=	=	=	=	=	n.g.
		HbNO	=	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.
	CTRL: Vittel vs Tap Water	Nitrit	=	=	=	=	↑	↑↑	n.g.
		Nitrat	=	=	=	=	=	=	n.g.
		RXNO	=	=	=	=	=	=	n.g.
		HbNO	=	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.
	Anämie: Vittel vs Tap Water	Nitrit	=	=	=	=	=	=	n.g.
		Nitrat	=	=	=	=	=	=	n.g.
		RXNO	↓	=	=	=	↓↓	=	n.g.
		HbNO	=	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.
PHZ Anämie	Vehikel vs PHZ Tag 2	Nitrit	↓	↓	=	=	=	=	
		Nitrat	n.g.	=	=	=	=	n.g.	
		RXNO	↓↓	↑↑↑	=	=	↓↓↓	=	
		HbNO	=	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	
	Vehikel vs PHZ Tag 4	Nitrit	=	↓	↑	↓	↓	=	
		Nitrat	n.g.	↓↓	=	=	=	n.g.	
		RXNO	↓↓	↑↑↑↑	=	=	↓↓↓	=	
		HbNO	↓↓	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	
	PHZ Tag 2 vs PHZ Tag 4	Nitrit	=	=	=	=	=	↓↓	
		Nitrat	n.g.	=	=	n.g.	=	n.g.	
		RXNO	=	=	=	=	=	↑	
		HbNO	=	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	

Tabelle 22 zeigt alle gemessenen Thiol-Metabolite zusammengefasst. In den RBC und EC eNOS KO Mäusen wurden keine Thiole gemessen.

**Tabelle 22: Zusammenfassung Tendenzen der gemessenen Thiol-Metabolite aller Mäuse**

Überblick über alle Tendenzen der gemessenen Thiol-Metabolite in allen untersuchten Mausexperimenten (↑= erhöht bzw. ↓= geringer gegenüber Vergleichsgruppe, Anzahl Pfeile sind gleich P-Signifikanz, = keine signifikante Änderung, n.g. = nicht gemessen).

Mauslinie		Analyt	RBC	Plasma	Aorta	Herz	Leber
KO Mauslinien	Globale eNOS vs CTRL	GSH	=	=	= 0.05	=	=
		GSSG	=	=	=	=	↑↑↑↑
		GSH/GSSG	=	=	=	=	↓↓↓↓
		Cys	=	=	↓↓	=	↑
		Cystin	=	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.
		HCys	=	=	=	=	↓↓
	Nrf2 vs CTRL	GSH	=	=	↓	=	↓↓
		GSSG	=	=	↓	=	=
		GSH/GSSG	=	=	=	=	↓↓↓↓
		Cys	=	=	↓↓↓	=	=
		Cystin	=	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.
		HCys	=	=	=	=	↓↓↓
	Globale eNOS vs Nrf2	GSH	=	=	=	↑↑	↑↑
		GSSG	↑	=	=	=	↑↑↑
		GSH/GSSG	=	=	=	=	=
		Cys	=	=	=	↑↑	↑↑
		Cystin	=	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.
		HCys	=	=	=	=	=
Sport	EC eNOS neg. Sedentary vs EC eNOS neg. Exercise	Total GSH	=	↓↓	=	n.g.	n.g.
		GSH	=	↓↓	=	n.g.	n.g.
		GSSG	=	=	=	n.g.	n.g.
		GSH/GSSG	=	=	=	n.g.	n.g.
		Cystein	=	=	=	n.g.	n.g.
		Cystin	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.
		HCystein	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.
		HCystin	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.
	EC eNOS neg. Sedentary vs EC eNOS pos. Sedentary	Total GSH	=	=	=	n.g.	n.g.
		GSH	=	=	=	n.g.	n.g.
		GSSG	=	↓	=	n.g.	n.g.
		GSH/GSSG	=	=	=	n.g.	n.g.
		Cystein	=	=	=	n.g.	n.g.
		Cystin	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.
		HCystein	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.
		HCystin	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.
	EC eNOS neg. Exercise vs EC eNOS pos. Exercise	Total GSH	=	↓	=	n.g.	n.g.
		GSH	=	↓	=	n.g.	n.g.
		GSSG	=	=	=	n.g.	n.g.
		GSH/GSSG	=	=	=	n.g.	n.g.
		Cystein	=	=	=	n.g.	n.g.
		Cystin	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.
		HCystein	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.
		HCystin	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.

Mauslinie		Analyt	RBC	Plasma	Aorta	Herz	Leber
Sport	EC eNOS pos. Sedentary vs EC eNOS pos. Exercise	Total GSH	=	=	=	n.g.	n.g.
		GSH	=	=	=	n.g.	n.g.
		GSSG	=	=	=	n.g.	n.g.
		GSH/GSSG	=	=	=	n.g.	n.g.
		Cystein	=	=	=	n.g.	n.g.
		Cystin	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.
		HCystein	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.
HCystin	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.		
Blutverlust Anämie	CTRL vs Blutverlust Anämie	Total GSH	↑↑	=	↑↑	↑	↑↑
		GSH	↑↑	=	↑↑	↑	↑↑
		GSSG	↑	=	↑	=	=
		GSH/GSSG	=	=	=	=	=
		Cystein	=	=	=	↑↑↑	=
		Cystin	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	=
		HCystein	=	=	n.g.	=	n.g.
HCystin	n.g.	n.g.	n.g.	=	n.g.		
PHZ Anämie	Vehikel vs PHZ Tag 2	Total GSH	=	↓↓	↑↑↑	↑↑↑	↑
		GSH	=	↓↓	↑↑↑	↑↑↑	=
		GSSG	↑↑↑	=	=	n.g.	↑↑
		GSH/GSSG	↓↓↓	=	↑	↓	↓↓↓↓
		Cystein	=	=	↑↑↑	=	↑
		Cystin	n.g.	=	=	=	=
		HCystein	=	=	=	n.g.	↑
	HCystin	n.g.	=	n.g.	n.g.	n.g.	
	Vehikel vs PHZ Tag 4	Total GSH	=	↓↓↓↓	↑	↑	↑↑
		GSH	=	↓↓↓↓	=	↑	=
		GSSG	↑↑	=	↑	n.g.	↑↑↑↑
		GSH/GSSG	↓↓↓	↓	=	↓↓	↓↓↓↓
		Cystein	=	=	↑↑↑↑	=	↑↑↑
		Cystin	n.g.	=	=	=	=
		HCystein	=	=	=	n.g.	=
	HCystin	n.g.	=	n.g.	n.g.	n.g.	
	PHZ Tag 2 vs PHZ Tag 4	Total GSH	=	=	=	=	=
		GSH	=	=	=	=	=
		GSSG	=	=	↑	n.g.	↑↑
		GSH/GSSG	=	=	=	=	=
		Cystein	=	=	=	=	=
Cystin		n.g.	=	=	=	=	
HCystein		=	=	=	n.g.	=	
HCystin	n.g.	=	n.g.	n.g.	n.g.		

Tabelle 23 zeigt alle gemessenen Nucleotidphosphate und Nucleoside zusammengefasst. In den RBC, EC und globalen eNOS KO Mäusen sowie den Nrf2 KO Mäusen wurden diese Metabolite nicht gemessen.

**Tabelle 23: Zusammenfassung Tendenzen der gemessenen Nucleotidphosphate**

Überblick über alle Tendenzen der gemessenen Nucleotidphosphate und Nucleoside in allen untersuchten Mausexperimenten ( $\uparrow$ = erhöht gegenüber Vergleichsgruppe,  $\downarrow$ = geringer gegenüber Vergleichsgruppe, Anzahl Pfeile sind gleich P-Signifikanz, = keine signifikante Änderung, n.g. = nicht gemessen).

Mauslinie		Analyt	RBC	Plasma	Aorta	Herz	Leber
Sport	EC eNOS neg. Sedentary vs EC eNOS neg. Exercise	Hypoxanthin	=	=	=	n.g.	n.g.
		cAMP	=	=	=	n.g.	n.g.
		cGMP	n.g.	n.g.	=	n.g.	n.g.
		AMP	=	n.g.	=	n.g.	n.g.
		GMP	=	=	n.g.	n.g.	n.g.
		ADP	=	n.g.	=	n.g.	n.g.
		GDP	=	=	=	n.g.	n.g.
		ATP	=	=	=	n.g.	n.g.
	GTP	=	=	=	n.g.	n.g.	
	EC eNOS neg. Sedentary vs EC eNOS pos. Sedentary	Hypoxanthin	=	=	=	n.g.	n.g.
		cAMP	=	=	=	n.g.	n.g.
		cGMP	n.g.	n.g.	=	n.g.	n.g.
		AMP	=	n.g.	=	n.g.	n.g.
		GMP	=	=	n.g.	n.g.	n.g.
		ADP	=	n.g.	=	n.g.	n.g.
		GDP	=	=	=	n.g.	n.g.
		ATP	=	=	=	n.g.	n.g.
	GTP	=	=	=	n.g.	n.g.	
	EC eNOS neg. Exercise vs EC eNOS pos. Exercise	Hypoxanthin	=	=	=	n.g.	n.g.
		cAMP	=	=	=	n.g.	n.g.
		cGMP	n.g.	n.g.	=	n.g.	n.g.
		AMP	=	n.g.	=	n.g.	n.g.
		GMP	=	=	n.g.	n.g.	n.g.
		ADP	=	n.g.	=	n.g.	n.g.
		GDP	=	=	=	n.g.	n.g.
		ATP	=	=	=	n.g.	n.g.
	GTP	=	=	=	n.g.	n.g.	
	EC eNOS pos. Sedentary vs EC eNOS pos. Exercise	Hypoxanthin	=	=	=	n.g.	n.g.
		cAMP	=	=	=	n.g.	n.g.
		cGMP	n.g.	n.g.	=	n.g.	n.g.
		AMP	=	n.g.	=	n.g.	n.g.
		GMP	=	=	n.g.	n.g.	n.g.
ADP		=	n.g.	=	n.g.	n.g.	
GDP		=	=	=	n.g.	n.g.	
ATP		=	=	=	n.g.	n.g.	
GTP	=	=	=	n.g.	n.g.		

Mauslinie		Analyt	RBC	Plasma	Aorta	Herz	Leber
PHZ Anämie	Vehikel vs PHZ Tag 2	Hypoxanthin	=	=	↑	=	↑
		Xanthin	=	=	↑	=	=
		Harnsäure	=	=	n.g.	=	=
		Adenosin	=	=	=	↓↓	↓↓↓
		cAMP	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.
		cGMP	↓↓↓↓	=	n.g.	n.g.	n.g.
		AMP	=	=	=	=	↓
		GMP	=	↑↑↑↑	↓	=	=
		ADP	=	=	=	↓↓	=
		GDP	=	n.g.	n.g.	=	=
		ATP	↓	n.g.	=	↓	=
		GTP	=	n.g.	↓↓↓	↓↓	n.g.
	Vehikel vs PHZ Tag 4	Hypoxanthin	=	↑	=	=	↑↑↑↑
		Xanthin	=	=	↑↑	=	↑↑↑
		Harnsäure	=	=	n.g.	=	=
		Adenosin	=	↑↑	=	↓↓↓↓	↓↓
		cAMP	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.
		cGMP	↓↓	↓	n.g.	n.g.	n.g.
		AMP	=	=	=	=	=
		GMP	=	↑↑↑↑	=	=	=
		ADP	=	=	=	↓↓↓↓	=
		GDP	=	n.g.	n.g.	=	=
		ATP	=	n.g.	=	↓	=
		GTP	↑	n.g.	↓	↓↓	n.g.
	PHZ Tag 2 vs PHZ Tag 4	Hypoxanthin	=	↑	↓↓↓	=	↑↑
		Xanthin	=	=	=	=	↑
		Harnsäure	=	=	n.g.	↓	=
		Adenosin	=	=	=	=	=
		cAMP	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.
		cGMP	=	=	n.g.	n.g.	n.g.
		AMP	=	=	=	=	=
		GMP	=	=	=	=	=
		ADP	=	=	=	=	↓↓
GDP		=	n.g.	n.g.	=	=	
ATP		↑↑	n.g.	↓	=	=	
GTP		↑↑↑	n.g.	↑	=	n.g.	

## 4 Diskussion

Ziel der Doktorarbeit ist die Untersuchung von Änderungen im NO-Metabolismus und dem Redox Status unter schrittweiser Entfernung der eNOS in den Kompartimenten, unter Reduktion der Erythrozytenanzahl und der Hämolyse bzw. durch Änderung des Redox Status. Ein Schwerpunkt sollte dabei auf das Zusammenspiel von Erythrozyten, Plasma und Endothel gelegt werden. Als erstes wurden KO Mäuse untersucht, in denen das Enzym eNOS in den Erythrozyten, dem Endothel bzw. in allen Geweben fehlt. Zusätzlich wurde der Einfluss beim Fehlen des Transkriptionsfaktors Nrf2 auf den NO-Metabolismus betrachtet. Im nächsten Schritt wurden die Gefäße Scherstress durch Lauftraining ausgesetzt. Zuletzt sollte in zwei unterschiedlichen Anämie Typen geklärt werden, inwieweit sich der Verlust von Erythrozyten auf den NO-Metabolismus und den Redox Status auswirkt. Dazu wurden eine Blutverlust Anämie und eine hämolytische Anämie durch PHZ induziert. Beide Anämien führten zu einem geringeren Hb-Wert und hypoxischen Bedingungen. Das Reduktionsmittel PHZ führt durch den oxidativen Abbau von Hämoglobin zu zusätzlichen oxidativen Stress in den Erythrozyten. Die Ergebnisse der einzelnen Ziele werden in diesem Kapitel in Hinblick auf die einzelnen Kompartimente diskutiert.

### 4.1 Methodenetablierung zur Analyten Messung in biologischen Matrices

Zur Messung von Thiolen, Disulfiden, Nucleotidphosphaten und Nucleosiden wurden zwei Methoden an der UPLC-QToF inklusive Probenvorbereitung entwickelt. Dies ermöglichte die simultane Messung mehrerer Analyten. Die Bestimmung von Metaboliten gestaltet sich in biologischen Matrices als besonders schwierig. Verluste an Analyten während der Probenvorbereitung können durch die Nutzung der internen Standards kompensiert werden. Durch die Probenentnahme und -vorbereitung kommt es zur Veränderung des Gleichgewichtszustands in dem sich die Metaboliten zuvor befanden. Für beide Methoden konnte dieselbe Probenvorbereitung benutzt werden. Durch Abtrennung der Proteine werden Ionensuppression und Probleme mit der Matrix verhindert. Die Proteine wurden durch Säurezugabe präzipitiert und das Pellet erneut mit SSA ausgewaschen wurde.

Die Behandlung mit Säure<sup>86</sup> und der Kontakt der Probe mit Umgebungssauerstoff<sup>87</sup> führen bei den Thiolen zu einer Oxidierung und zur Bildung der korrespondierenden Disulfide.<sup>88</sup> Um die Konzentrationen nicht zu verfälschen, werden die Thiole schon bei

Probenentnahme mit NEM im Überschuss derivatisiert. NEM kann durch die Zellmembranen diffundieren und blockt die Thiole schnell und irreversibel.<sup>45 89</sup> Auch das Enzym Glutathionreduktase wird von NEM geblockt und inaktiv.<sup>88</sup> Die Bildung von Stereoisomeren der Thiole mit NEM erklären die Doppelpeaks bei Cystein.<sup>90 91</sup> In der Literatur werden unterschiedliche Probenvorbereitungen und Messmethoden erläutert, welche Einfluss auf die gemessenen Konzentrationen haben.<sup>92 93</sup> Die hier gemessenen Thiolkonzentrationen decken sich mit den Konzentrationsangaben in der Literatur.<sup>93</sup> Die Methode wurde neben der Validierung in Düsseldorf auch über eine Cross Validierung mit einer zweiten Methode verglichen, welche an der Universität von Southampton, medizinische Fakultät Arbeitsgruppe Prof. Dr. Martin Feelisch entwickelt wurde. Die Ergebnisse sind in Sutton et al. Redox Biology 2018 festgehalten.<sup>94</sup> Der Vergleich zeigte, dass die Nutzung unterschiedlicher Probenvorbereitungsmethoden zu abweichenden Ergebnissen führt. Die hier beschriebene Methode hat den Vorteil, dass die Matrix größtenteils durch Zugabe von Säure abgetrennt wird.

Die Nucleotidphosphat Methode umfasst die Analyse von zwölf Analyten. Die Wiederfindungsraten der bei einer Standardaddition gemessenen Isotope von AMP, cAMP und ATP in Plasma liegen zwischen 98 % und 109 %. Die Extraktion der Analyten mit SSA zeigt im Vergleich zur Phenol Extraktion wesentlich bessere Wiederfindungsraten, was ausschlaggebend für die Nutzung von SSA in der Probenvorbereitung war (vergl. Tabelle 7). Die Reproduzierbarkeit der Messung liegt über 80 %, einzig für Harnsäure (21,5 %) und ATP (20,6 %) ist die Standardabweichung der Reproduzierbarkeit höher. Die Messung erfolgte in Mauserzen und damit in einer biologischen Matrix, was die höheren Abweichungen erklärt. Eine Beeinflussung der Nucleotidphosphat Konzentrationen bei der Probenbehandlung mit Säure konnte nicht festgestellt werden. Die Nucleotidphosphate bedürfen keiner Derivatisierung, agieren jedoch mit aktiven Metalloberflächen in der UPLC und zeigen im Chromatogramm ein Tailing der Peaks.<sup>95</sup> Dieses Problem konnte durch mehrfaches Spülen der UPLC mit Phosphatpuffer behoben werden. Die schlechte Auftrennbarkeit der Nucleotidphosphate und Nucleoside auf einer C18-Säule gestaltete sich zwar aufgrund der unterschiedlichen Polarität von stationärer Phase und Analyten als schwierig, ist aber dennoch reproduzierbar (vergl. Tabelle 8) und für eine Quantifizierung geeignet. Zuvor wurden als Säulen eine HILIC und einer Pursuit PFP – beide von Agilent - benutzt. Erste wies ein Tailing aller Peaks unabhängig von den Metalloberflächen in der

Chromatographie auf. Die Pursuit PFP zeigte eine sehr schlechte Trennung der Analyten untereinander. ATP und dGTP weisen eine gleiche Retentionszeit und gleiches m/z-Verhältnis auf. In Proben mit Zellkernen, welche dGTP enthalten, sind sie daher nicht separat quantifizierbar. Allerdings sind die Konzentrationen von dGTP um die Potenz  $10^3$  geringer als die ATP Konzentrationen.<sup>96 97</sup> Somit kann die dGTP Konzentration gegenüber der ATP Konzentration vernachlässigt werden.

## 4.2 Nitrosothiole und Nitrosoamine sind stabile Produkte

Transnitrosierungen sind Reaktionen zweiter Ordnung.<sup>98 99</sup> In der Literatur wird oft diskutiert ob RXNO – auch aufgrund seiner nachgesagten Instabilität - kardiovaskuläre Funktionen einnimmt.<sup>100</sup> Die Ergebnisse zeigen jedoch, dass RXNO ein stabiles Produkt aus einer Amin- oder Thiolgruppe mit NO darstellt und kein instabiles Zwischenprodukt.<sup>101</sup> Das Produkt zerfällt nur langsam und ist in der Lage NO an andere Amin- oder Thiolgruppen weiterzugeben. In unseren Experimenten mit BSA konnte nach Nitrosierung der Thiolgruppen keine Bildung von Disulfiden festgestellt werden.<sup>26</sup> Die Transnitrosierungsreaktionen weisen auf eine weitere Möglichkeit hin, wie NO im Körper transportiert werden kann. Eine große Rolle dürften hier eher kleinere Thiole wie GSH und Cystein spielen, da eine Nitrosierung dieser aus sterischen Gründen einfacher ist. Proteine zeigen eine unterschiedliche Affinität zur Transnitrosierung durch GSNO oder CysNO. In unseren Experimenten zeigt GRX2 eine bessere Nitrosierbarkeit durch GSNO als durch CysNO. GLRX2 ist ein Redoxsensor und besitzt eine natürliche Affinität GSH zu binden und so in seiner stabileren und inaktiven Dimerform zu verbleiben.<sup>85</sup> Die Transnitrosierungsrate in unseren Versuchen weist mit einem NO-Molekül auf 100 BSA-Molekülen bei einem stöchiometrischen Verhältnis 1:1 jedoch nur eine sehr geringe Effektivität auf. Die Effektivität änderte sich nur leicht nach Erhöhung des Verhältnisses um den Faktor zehn zu Gunsten von CysNO.

Letztlich stellt RXNO vor allem durch seine Stabilität einen weiteren NO-Pool für den Körper dar und weist unterschiedliche Konzentrationen in unseren in vivo Modellen je nach physiologischen Bedingungen auf. Es ist bekannt, dass RXNO auch vasodilatativ wirken kann.<sup>102 103</sup> Das Enzym XOR kann RXNO auch wieder zu NO umwandeln.<sup>76</sup> In Kapitel 4.6.2 wird die Bedeutung von RXNO für den gesamten NOx-Metabolismus näher erläutert.

### 4.3 Einfluss der fehlenden eNOS auf den NO-Metabolismus der KO-Mäusen

In der Doktorarbeit wurde der NO-Metabolismus in verschiedenen eNOS KO Linien und Nrf2 KO Mäusen untersucht. Aufeinander aufbauend sollen hier die Ergebnisse der Erythrozyten, endothelialen und globalen eNOS KO Mäuse und anschließend der Zusammenhang mit dem Nrf2 Faktor erläutert werden. Die Diskussion folgt dem Prinzip, dass zuerst die Auswirkung eines globalen Fehlens des Enzyms eNOS erklärt wird. Anschließend wird auf die Auswirkung des fehlenden Enzyms im Endothel und den Erythrozyten eingegangen.

#### 4.3.1 Besondere Rolle der Organe im NO-Metabolismus von globalen eNOS KO Mäusen

Die globalen eNOS KO Mäuse zeigen keine geringere HbNO Konzentration, was angesichts des fehlenden Enzyms in den Erythrozyten und dem Sinken der HbNO Konzentration in den Erythrozyten eNOS KO Mäusen zu erwarten wäre. Dies suggeriert, dass eine weitere NO Quelle in den Erythrozyten oder dem Gefäß aktiv wird und den HbNO-Pool wieder auffüllt. Hier könnten die Enzyme XOR oder Carbonanhydrase eine Rolle spielen. Die NO Produktion durch Carbonanhydrase spielt sich jedoch eher bei niedrigerem pH ab.<sup>104</sup> Auffällig ist zudem die stark gesunkene Nitrat Konzentration, welche drei Schlussfolgerungen zulässt: Erstens kann eine geringere Bildung von Nitrat in den Erythrozyten vorliegen, zweitens eine höhere Umsetzung von Nitrat oder drittens eine geringere Migration von Nitrat in die Erythrozyten. Eine schnelle Umsetzung von Nitrit mit HbNO zu Nitrat ist möglich.<sup>105</sup> Im Vergleich zu den erythrozytären eNOS, die diese Änderung der Nitrat Konzentration nicht aufweisen, liegt allerdings keine Änderung der Bedingung vor. Aus diesem Grund ist auch eine Änderung in der Bildung von Nitrat eher unwahrscheinlich. Auch eine Umsetzung von Nitrat zu beispielsweise Nitrit oder NO z.B. durch das Enzym XOR in den Erythrozyten ist eher unwahrscheinlich, da dies unter eher sauren Bedingungen stattfindet.<sup>49</sup> Letztendlich kann auch eine geringere Migration von Nitrat in die Erythrozyten nicht ausgeschlossen werden. Es ist jedoch wahrscheinlich, dass Nitrat auch in anderen Organen oder im Plasma durch Enzyme wie XOR zu NO verstoffwechselt wird. Eine Umsetzung von Nitrat in der Leber konnten Peleli et al. in globalen eNOS Mäusen nachweisen.<sup>106</sup> Sie konnten eine höhere Aktivität von XOR und eine XOR abhängige NO Produktion in der Leber nachweisen. Eine erhöhte XOR Aktivität in der Leber kann mit einer höheren ROS Produktion einhergehen, wenn bei der Umsetzung O<sub>2</sub> statt NAD<sup>+</sup> benutzt wird.<sup>107</sup> Der Thiol Metabolismus der globalen eNOS KO Mäuse zeigt ein stark verändertes GSH zu GSSG Verhältnis zu Gunsten

der oxidierten Form, was eine erhöhte ROS Konzentrationen nachweist. Einzig die Leber weist diese signifikante Änderung im Redox Status auf. Dies kann als ein weiterer Hinweis auf die Aktivität von XOR hindeuten und wird auch in der Veröffentlichung von Peleli et al gezeigt. Es ist bekannt, dass auch andere Metalloenzyme mit einem Molybdän bzw. Eisen Zentrum wie Cytochromoxidase C,<sup>108</sup> Cytooglobin,<sup>109</sup> Sulfitoxidase<sup>110</sup> und Aldehydoxidase<sup>111</sup> die Eigenschaft besitzen, Nitrit bzw. Nitrat zu NO zu reduzieren. Die Reduktionseigenschaften dieser Enzyme für die NO Produktion sind jedoch nur unter hypoxischen Bedingungen bekannt oder weitest gehend unbekannt.<sup>112 113</sup> Die Rolle des Enzyms XOR wird im späteren Teil der Diskussion in Kapitel 4.6 näher beleuchtet. Zudem zeigen Peleli et al., dass in diesen Mäusen mehr Nitrat zu Nitrit reduziert wird.<sup>106</sup> Letzteres könnte auch die sinkenden Nitrat und Nitrit Konzentrationen in Plasma, Aorta und Herz der globalen eNOS KO Mäuse erklären. Die Metabolite dienen den reduzierenden Metalloenzymen als Edukte für die Bildung von NO. Eine Reduzierung von Nitrit zu NO findet vor allem in den Geweben und nicht im Blut statt.<sup>74</sup> Die Leber zeigt keine veränderten Konzentrationen der NO-Metabolite. Die sinkenden Konzentrationen von RXNO im Endothel und Plasma sprechen für einen Verbrauch der Nitrosospezies. RXNO kann in beiden Kompartimenten als Vasodilator agieren.<sup>103</sup>

#### **4.3.2 Fehlende eNOS im Endothel führt zu geringerer NO Verfügbarkeit in Erythrozyten**

In den EC eNOS KO Mäusen sinkt in den Erythrozyten die RXNO Konzentration, die HbNO Konzentration bleibt jedoch unverändert. Dies zeigt, dass vom Hämoglobin dieselbe Menge an NO eingefangen wird und die NO Bioverfügbarkeit in den Erythrozyten nur geringfügig sinkt, was anhand der RXNO Konzentration zu erkennen ist. Die endothelialen eNOS KO Mäuse zeigen wie die erythrozytären eNOS KO Mäuse auch geringere Nitrit und Nitrat Konzentrationen im Plasma. Diese Beobachtungen, welche sowohl für erythrozytäre als auch für endotheliale eNOS KO Mäuse gelten, bestätigen Ergebnisse aus früheren Untersuchungen von Patienten mit endothelialer Dysfunktion.<sup>48</sup> In diesen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass ein Teilverlust der eNOS Funktion im Endothel korreliert mit einer geringeren Aktivität des Enzyms in den Erythrozyten. Es zeigt sich jedoch ein Unterschied in der Verteilung der NO Metaboliten in den restlichen Organen. Während in den erythrozytären eNOS KO Mäusen ein Anstieg der Nitrit Konzentration in der Aorta erkennbar war, zeigen sich nun ein Anstieg der Nitrat Konzentration in der Leber und

geringere Konzentrationen in der Lunge. Ein deutlicheres Bild dieser Umverteilung aller NO Metabolite wird in den globalen eNOS KO Mäusen deutlicher.

#### **4.3.3 Geringere HbNO Konzentration in erythrozytären eNOS KO Mäusen**

Die Abwesenheit der erythrozytären eNOS hat eine geringere HbNO Konzentration in den Erythrozyten zur Folge. Dies ist jedoch nur in den erythrozytären eNOS KO Mäusen ersichtlich. Hämoglobin gilt allgemein als ein Fänger von NO. Eine geringere HbNO Konzentration ist also ein Anzeichen für eine geringere NO-Bioverfügbarkeit,<sup>114</sup> was angesichts des Fehlens der erythrozytären eNOS erklärbar wäre. Balligand et al. konnten allerdings zeigen, dass eine Inhibierung der erythrozytären eNOS nur einen geringen Einfluss auf die HbNO Konzentration hat.<sup>115</sup> Eine weitere Erklärung sind die gesunkenen NOx-Metabolite im Gefäßlumen. Für eine geringere NOx Verfügbarkeit im Plasma sprechen auch die gesunkenen Konzentrationen von Nitrit und Nitrat. Die geringere HbNO Konzentration ist also nicht alleine durch das Fehlen der eNOS in den Erythrozyten erklärbar. Die steigende Nitrit Konzentration in der Aorta könnte für eine Umsetzung von Nitrit zu NO im Endothel sprechen.

#### **4.3.4 Geringere Redoxkapazität steigert eNOS Aktivität in Nrf2 KO Mäusen**

Nrf2 ist bekannt dafür, eine Schlüsselrolle in der Antwort auf oxidativen Stress in Zellen zu spielen und hat damit einen starken Einfluss auf den Redox Status der Zellen.<sup>116</sup> Die Nrf2 KO Mäuse sind ein gutes Modell für die Untersuchung der Zusammenhänge zwischen dem Redox Status und dem NO-Metabolismus. NO kann den Faktor Nrf2 im Endothel aktivieren und so regulierenden Einfluss auf die GSH Konzentration nehmen.<sup>117</sup> Nrf2 KO Mäuse zeigen eine stark erhöhte HbNO Konzentration in den Erythrozyten, was für eine erhöhte NO Bioverfügbarkeit spricht. Es konnte zudem gezeigt werden, dass sowohl die erythrozytäre als auch die endotheliale eNOS im Herzen von Nrf2 KO Mäusen mehr exprimiert wird als in WT Mäusen.<sup>118</sup> Die aktivere Rolle der eNOS in Nrf2 KO Mäusen wirkt dabei kardioprotektiv.<sup>119</sup> Im Vergleich zu den globalen eNOS KO Mäusen steigt die GSSG Konzentration in den Erythrozyten. Dies könnte ein negativer Effekt der Überexprimierung und Hochregulierung der eNOS sein.<sup>120</sup> Der Redox Status in den Nrf2 KO Mäusen bleibt dennoch weitgehend unbeeinflusst und im Gleichgewicht. Der geringere Pool an GSH wird nur in der Aorta und der Leber deutlich. Gleichzeitig mit dem sinkenden GSH Pool in der Aorta sinkt jedoch auch die GSSG Konzentration, wodurch das Verhältnis wieder im

Gleichgewicht ist. Dies ist nur durch eine geringere ROS Produktion, bzw. einen geringeren oxidativen Stress zu erklären, welches sich auf die niedrigere GSSG Konzentration auswirkt. Einzig in der Leber kippt das Gleichgewicht des Redox Status auf die Seite der oxidierten Thiole. Dies korreliert mit dem gesunkenen GSH Pool, die ROS Produktion scheint unter basalen Bedingungen unverändert zu bleiben.

#### **4.3.5 Schlußfolgerungen zu den Experimenten der eNOS KO Mäusen**

Die Ergebnisse zeigen, dass eine fehlende eNOS in den Erythrozyten und/oder dem Endothel zu einer Beeinträchtigung des gesamten NO-Metabolismus führt. Nitrit und Nitrat können als weitere NO Quelle dienen, wenn das Enzym eNOS nicht aktiv ist. Zur Umsetzung dieser Metabolite zu NO dienen Metalloenzyme wie XOR,<sup>106</sup> welche vor allem in den Organen vorliegen. Um diese These zu verifizieren, sind jedoch weitere Versuche notwendig. Dass der NO-Metabolismus eng mit dem Redox Status verknüpft ist, zeigen die Nrf2 KO Mäuse. In der weiteren Diskussion ist diese Verknüpfung auch in den Anämie Mäusen gut ersichtlich.

#### **4.4 Geringere Redoxkapazität im Plasma bei Exercise Mäusen**

Die Blutabnahmen zur Untersuchung der Auswirkung sportlicher Aktivität auf Kontroll Mäuse und EC eNOS KO Mäuse fanden nicht unmittelbar nach dem Exercise Protokoll statt. Die Ergebnisse zeigen daher eher die langfristigen Auswirkungen von Exercise auf das vaskuläre System.

Die Nitrit Konzentration in den hier untersuchten Erythrozyten sinkt in den EC eNOS KO Mäusen gegenüber den WT Mäusen, solange diese sportlich nicht aktiv sind. Bei Exercise besteht jedoch kein Unterschied mehr zwischen diesen Gruppen. In menschlichen Studien konnte unmittelbar nach Exercise eine höhere Aktivität der eNOS und höhere NO-Levels (gemessen durch Diamino Fluoreszenz) in Form von NO in Erythrozyten festgestellt werden.<sup>121 122</sup> Bei Exercise steigt die Fließgeschwindigkeit des Bluts und es herrscht ein erhöhter Scherstress,<sup>123</sup> was zu einer erhöhten eNOS Aktivität in den Erythrozyten führt.<sup>124</sup> Nach Exercise sinkt die Aktivität der eNOS wieder.<sup>125</sup> Eine erhöhte NO-Bioverfügbarkeit durch RXNO oder Nitrit konnte in diesen Versuchen nicht festgestellt werden, NO und HbNO wurden jedoch nicht gemessen. Eine fehlende NO-Bioverfügbarkeit könnte allerdings auch durch den späten Zeitpunkt der Blutabnahme erklärt werden, an dem die eNOS womöglich wieder runterreguliert war.

Scherstress beeinflusst den Redox Status durch Stimulierung des Nrf2-Transkriptionsfaktors.<sup>126</sup> Eine Probandenstudie konnte einen direkten Zusammenhang zwischen der ROS Produktion in Erythrozyten und der Laufleistung bei einem Ausdauertraining herstellen.<sup>127</sup> Der Redox Status der Erythrozyten blieb dabei jedoch unverändert. Die hier vorliegenden Ergebnisse bestätigen diese Studie. Der Redox Status in Exercise Mäusen ändert sich nur im Plasma. Mäuse, welche eine eNOS im Endothel besitzen weisen geringere GSH Konzentrationen nach Exercise auf, als die Sedentary Mäuse. Dieser Unterschied taucht jedoch nicht in den Sedentary WT Mäusen auf, was den unmittelbaren Bezug zum Sport beweist. Die gesunkene GSH Konzentration zeigt sich ebenso beim Vergleich zwischen den Exercise EC eNOS KO Mäusen und den Exercise WT Mäusen. Die Signifikanz ist jedoch geringer und zeigt, dass die eNOS im Endothel zu einem moderateren Sinken der GSH Konzentration führt. In beiden Vergleichsgruppen gibt es keine signifikante Veränderung der GSSG Konzentration.

Es lässt sich festhalten, dass Exercise zu einer geringeren Redoxkapazität im Plasma führt. Das Fehlen der eNOS im Endothel scheint diesem Effekt positiv entgegen zu wirken.

#### **4.5 Blutverlust Anämie**

In den vorangegangenen Experimenten wurde die Auswirkung einer fehlenden eNOS u.a. in den Erythrozyten untersucht. Dass Erythrozyten einen wichtigen Bestandteil des NO-Metabolismus darstellen, wurde bereits in der Einleitung ausführlich erwähnt und zeigt auch die vorangestellte Diskussion. Sie stellen nicht nur aufgrund des Hämoglobins einen Fänger von NO dar, sondern sind an der Produktion und Umwandlung von NO selbst beteiligt. Erythrozyten haben eine wichtige regulatorische Funktion im NO-Metabolismus und dem Redox Status.<sup>128</sup> Anämie definiert einen Zustand, bei dem die Anzahl an Erythrozyten im Blut und damit auch die Sauerstoffbindungskapazität niedriger als in physiologischen Verhältnissen ist.<sup>129</sup> Die Untersuchung der Blutverlust Anämie zielt auf die Fragestellung ab, was mit dem globalen NO-Metabolismus und dem globalen Redox Status passiert, wenn weniger Erythrozyten im Blutkreislauf vorhanden sind. Bei der hier vorgestellten Anämie handelt es sich um eine akute Anämie mit einem Hb-Wert von 90 g/L. Die Normwerte nach WHO Richtlinien liegen für Männer bei 130 g/L und für Frauen bei 120 g/L, der Hb-Wert in den Mäusen, angelehnt an den menschlichen Hb-Wert würde einer moderaten Anämie entsprechen.<sup>129</sup>

Um den „NO-Speicher“ aufzufüllen wurde einer Kohorte Wasser mit hohem Nitrat Gehalt verabreicht. Die kurz- und langfristige Gabe von Nitrit oder Nitrat hat Änderungen der Hämodynamik zur Folge und einen positiven Einfluss auf kardiovaskuläre Erkrankungen. Nitrit bzw. Nitrat reduziert den Blutdruck,<sup>130</sup> wirkt unterstützend auf die Vasodilatation<sup>131 132</sup> – z.B. durch Stimulierung der cGMP Produktion,<sup>133</sup> inhibiert die Thrombozytenaktivität<sup>134</sup> und wirkt schützend bei Ischämie/Reperfusionsschäden.<sup>135</sup> Bei der hier untersuchten Blutverlust Anämie wurde zusätzlich die Auswirkung von der natürlichen Konzentration von 215 µM Nitrat im Trinkwasser der Mäuse auf den NO-Metabolismus untersucht. Das Trinkwasser der Vergleichsgruppe erhielt 0,76 µM Nitrat.

Es ist zu beachten, dass es sich bei den Ergebnissen der eNOS und Nrf2 KO Mäusen um Konzentrationen handelt, die in einem Gleichgewichtszustand des Organismus gemessen wurden. Die Ergebnisse der Blutverlust und PHZ induzierten Anämie Mäuse hingegen zeigen einen akuten Zustand.

#### **4.5.1 Vermehrter oxidativer Stress im Herzen**

Lässt man die Auswirkung der Nitrat Gabe zunächst einmal außer Acht und vergleicht nur die Auswirkungen der Blutverlust Anämie auf den NO-Metabolismus bei Gabe einer geringeren Nitrat Konzentration (Vittel), so ergibt sich folgendes Bild: Die Konzentration von nitrosierten Aminen und Thiolen steigt im Herzen stark an. Bei Anämie unterliegt das Herz aufgrund eines erhöhten Herzschlages besonders hohem Stress<sup>136</sup> und es kann zu einer Verschlimmerung von Herzfehlern führen.<sup>137</sup> Untersuchungen haben gezeigt, dass NO als RXNO kardioprotektiv wirken kann.<sup>138</sup> Es ist also nahe liegend, dass dies eine Antwort auf das gewachsene Risiko für die Herzfunktion und die höher ROS Konzentration ist. Im Herzen steigt die GSSG Konzentration durch den höheren oxidativen Stress. Während gleichzeitig aber auch die GSH Konzentration steigt, was zum Ausgleich des Verhältnisses von oxidiertem zu reduziertem GSH führt. Der vermehrte oxidative Stress könnte durch die erhöhte Herzrate erklärt werden. Damit das Herz unter diesen Bedingungen arbeiten kann, muss vermehrt Energie bereitgestellt werden. Diese wird durch Mitochondrien in Form von ATP zur Verfügung gestellt, wobei gleichzeitig ROS entsteht.<sup>139</sup> Auch die NADPH Oxidase produziert unter diesen Bedingungen vermehrt ROS.<sup>140</sup> Interessanterweise ist die RXNO Konzentration in den mit Nitrat behandelten Mäusen geringer gegenüber den Mäusen mit Nitrat armen Wasser. Zusätzlich zeigt der Vergleich zwischen anämischen und nicht

anämischen Mäusen mit nitratreichem Leitungswasser als Trinkwasser keinen Unterschied in der RXNO Konzentration. Dies beweist, dass RXNO im Herzen nur unter anämischen Bedingungen ohne zusätzliche Nitrat Gabe erhöht ist. Was mit dem zusätzlichen Nitrat unter nicht anämischen Bedingungen passiert, sieht man gut im Vergleich der Kontrollgruppen beider Trinkwässer. Das Nitrat verteilt sich als Nitrit in Leber und Herz, was darauf schliessen lässt, dass Nitrat reduziert wird, um dem Körper als Nitrit vorzuliegen.

#### 4.5.2 Niedrigere HbNO Konzentration in anämischen Mäusen

Die zweite große Veränderung im NO-Metabolismus stellen die Erythrozyten der mit Nitrat armem Wasser behandelten Mäuse dar. Die Konzentrationen wurden mithilfe der Proteinmenge berechnet. Auf diese Weise können die Konzentrationen der Metaboliten in den Erythrozyten unter anämischen und physiologischen Bedingungen verglichen werden. Die HbNO Konzentration sinkt in den Erythrozyten der mit Nitrat armen Wasser behandelten Mäuse. Durch die niedrigere Viskosität des Bluts entsteht weniger Gefäßwiderstand und Scherstress auf die Erythrozyten. Hinzu kommt eine höhere Aktivität von Endothel-abgeleiteten Relaxationsfaktoren die den Gefäßwiderstand zusätzlich senken.<sup>141</sup> Scherstress gilt als Trigger für die Aktivität der eNOS in den Gefäßen.<sup>122</sup> Insofern wäre es erklärbar, dass eine geringere HbNO Konzentration gemessen wurde da die eNOS Aktivität niedriger sein sollte. In der Literatur gibt es Studien, wo eine höhere eNOS Aktivität und Expression in anämischen Mäusen gemessen wurde. In Mäusen mit einer durch Eisenmangel ausgelösten Anämie, konnte eine erhöhte Expression der eNOS in Erythrozyten verbunden mit einer erhöhten NO Produktion nachgewiesen werden.<sup>142</sup> Ferner konnte festgestellt werden, dass mit der erhöhten eNOS Aktivität eine höhere cGMP Konzentration und Vasodilatation einhergeht. Die HbNO Konzentration lag hier unter dem LOD. Die Diskrepanz zwischen der erhöhten NO Produktion und der geringeren HbNO Konzentration erklärt sich durch den veränderten Hämoglobingehalt in einem einzelnen Erythrozyten, dem sogenannten Mean corpuscular Hämoglobin Wert (MCH). Ein Wert unter 27 pg Hämoglobin gilt als hypochrome Anämie<sup>143</sup> Studien zu einer Eisenmangel Anämie wiesen Werte von 22,7 pg und zu einer Thalassemia Anämie 20,4 pg auf.<sup>144</sup> Insgesamt zeigt sich also, dass unter anämischen Verhältnissen weniger Hämoglobin zur Bindung von NO vorliegt, was wiederum eine geringere HbNO Konzentration bedingt.

### 4.5.3 Vermehrter oxidativer Stress senkt Lebensspanne der Erythrozyten

Die GSH Konzentration steigt in allen Organen und in der Leber steigt die Konzentration an Cystein. Der zur Verfügung stehende Gesamt GSH Pool steigt somit an. Die GSSG Konzentration steigt in den Erythrozyten der mit Nitrat armen Wasser behandelten Mäuse. Genau wie im Herzen sieht man eine Adaption an den oxidativen Stress durch höhere GSH Konzentrationen, sodass das Redoxgleichgewicht erhalten bleibt. Dennoch zeigt sich, dass in diversen Anämien häufiger die oxidierte Form Methämoglobin vorliegt.<sup>145 146</sup> Die Aktivität der GPx sinkt auf 26 %, <sup>147</sup> welche wichtig für die Katalysierung der GSH abhängigen Reduktion von Peroxiden und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ist. Der erhöhte oxidative Stress führt zu einer erhöhten Oxidierung von Lipiden<sup>148</sup> und zur Membrandeformabilität der Erythrozyten.<sup>149</sup> Man geht davon aus, dass durch die Veränderung der Membranstabilität und Verformbarkeit die Erythrozyten in der Milz aussortiert werden. Dies zeigen auch die vergrößerte Milz und schlechtere Verformbarkeit der mit PHZ behandelten Mäuse (siehe Abbildung 18). Zudem kommt es zu einer Exposition von Phosphatidylserin auf der äußeren Membran, dies gilt als Zeichen für Makrophagen, die Erythrozyten aus dem Blutkreislauf zu nehmen.<sup>150</sup> Die Lebensspanne von Erythrozyten unter anämischen Bedingungen ist geringer als unter normalen Bedingungen.<sup>150 151</sup>

Die Nitrat Gabe zeigt in den Erythrozyten der anämischen Mäuse nur eine gesunkene RXNO Konzentration. In vorangegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass Nitrosierungen die Verformbarkeit von Erythrozyten erhalten können.<sup>37</sup> Für die Erythrozyten zeigt sich keine Verbesserung des NO-Metabolismus oder protektiver Effekt durch die Nitrat Gabe. Mausexperimente konnten sogar zeigen, dass Nitrat die Erythropoese hemmt.<sup>152</sup> Generell lässt sich anhand der gezeigten Ergebnisse keine Verbesserung des NO-Metabolismus in den Mäusen mit Blutverlust Anämie erkennen wenn das Trinkwasser einen erhöhten Nitrat Gehalt aufweist.

## 4.6 Phenylhydrazin Anämie

PHZ ist ein Reduktionsmittel und wurde lange aufgrund seiner hämolytischen Eigenschaft zur Behandlung von Polycythaemia vera benutzt.<sup>153</sup> Der genaue Einfluss von PHZ ist unbekannt, jedoch konnte gezeigt werden, dass der Benzenring des PHZs Methämoglobin aus Oxyhämoglobin in den Erythrozyten bildet.<sup>154</sup> Substituenten am Benzenring beeinflussen die Effektivität der Reaktion und die Ausprägung der Hämolyse.<sup>155</sup> Die

Hämochrome bilden Heinz Bodies,<sup>156</sup> welche sich an der Erythrozyten Membran anlagern.<sup>157</sup> Sie führen auch zu einer geringeren Verformbarkeit der betroffenen Erythrozyten.<sup>154 158</sup> Betroffene Erythrozyten werden aussortiert und in der Niere abgebaut, was zu einer stark vergrößerten Niere führt.<sup>159</sup> Auch die hier erzielten Ergebnisse zeigen eine Splenomegalie. Die Niere der Versuchstiere ist an Tag 4 fast dreimal so schwer wie bei der Kontrollgruppe, ehe sie wieder auf ein normales Niveau zurückgeht. Zudem wird durch die Gabe von PHZ ROS produziert und so der Redox Status der Zellen beeinflusst.<sup>157 160 161</sup> Durch die Hämolyse bedingt steigt die Konzentration an Hämoglobin im Plasma.

#### **4.6.1 Oxidativer Stress führt zum Verlust erythrozytärer Funktionen**

Die Erythrozyten sind vom Phenylhydrazin besonders betroffen. Die GSSG Konzentration steigt stark an und es wird nicht signifikant mehr GSH gebildet, was zu einem oxidativeren Milieu führt. Diesem oxidativen Stress ausgesetzt, platzen viele Erythrozyten, was zu einem erhöhten Hämoglobingehalt im Plasma führt. An Tag 4 senkt sich der freie Hämoglobingehalt wieder und auch die GSSG Konzentration in den Erythrozyten sinkt. Dies deutet an, dass es ab Tag 2 zu einer Adaption der Erythrozyten an den erhöhten oxidativen Stress kommt. Eine Verbesserung der Splenomegalie ist allerdings erst ab Tag 4 erkennbar, was zeigt, dass trotz beginnender Adaption der Erythrozyten viele weiterhin aussortiert werden. Die niedrige Viskosität des Vollbluts der PHZ Mäuse erklärt sich durch die niedrigere Anzahl an Erythrozyten im Vollblut. Die Entwicklung der Viskosität geht einher mit der Splenomegalie, bei der auch erst ab dem vierten Tag eine Adaption erkennbar ist. Es werden weniger Erythrozyten aus dem Blutkreislauf entfernt.

Die Erythrozyten Membran der PHZ Mäuse verliert durch den oxidativen Stress die Möglichkeit der Verformbarkeit. Dies ist anhand des sinkenden EI bei erhöhtem Scherstress der Erythrozyten zu erkennen. Die Wiedererlangung der Eigenschaft zur Verformung geht einher mit dem Sinken des oxidativen Stresses in den Erythrozyten. An Tag 2 ist die GSSG Konzentration am höchsten und sinkt bereits an Tag 4, an dem auch die Verformbarkeit der Erythrozyten wieder zunimmt. Einen direkten Zusammenhang zwischen oxidativem Stress und der Verformbarkeit der Erythrozyten ex vivo konnten bereits vorher Diederich et. al.<sup>37</sup> aufzeigen. Es ist bekannt, dass auch in Krankheiten mit höheren ROS Konzentrationen oder veränderter NO Produktion, wie endotheler Dysfunktion, Hypertonie oder Diabetes es zu einer Beeinträchtigung der Erythrozyten Verformbarkeit kommt.<sup>162 163</sup> Unter oxidativem

Stress kommt es vermehrt zu einer Bildung von Disulfiden und einer Anbindung von GSH an die Thiolgruppen der Proteine.<sup>164</sup> Diese Modifikationen führen bei dem Membranprotein Spektrin zu einem Verlust der flexiblen Struktur.<sup>165</sup> Die Membran der Erythrozyten büßt dadurch einen Teil ihrer Verformbarkeit ein. NO kann dabei protektiv wirken und die Thiole durch Nitrosierung schützen.<sup>166 167</sup> Diese Modifikation muss allerdings vor der Oxidierung stattfinden. Da der NO-Metabolismus in den Erythrozyten stark beeinträchtigt ist (erkennbar anhand der geringeren HbNO Konzentration), kann die Verformbarkeit der Erythrozyten nicht aufrechterhalten werden. Die Verformbarkeit ist für die Erythrozyten wichtig, um auch durch die kleinsten Kapillaren zu gelangen, welche oft kleiner sind als der Durchmesser der Erythrozyten.

Der oxidative Stress wirkt sich auf den NO-Metabolismus aus. Metalloenzyme, welche am NO-Metabolismus beteiligt sind, verlieren in ihrem oxidierten Zustand ihre Funktion. So konnte in Untersuchungen gezeigt werden, dass das Eisenatom der sGC durch Oxidation inaktiv wird und NO die sGC nicht mehr aktivieren kann.<sup>168 169</sup> Das Enzym eNOS und der cGMP/sGC Signalweg sind nicht aktiv. An Tag 2 konnte kein cGMP in den Erythrozyten gemessen werden. Erst an Tag 4 konnte eine cGMP Konzentration gemessen werden, welche allerdings deutlich geringer als die in der Kontrollgruppe ist. Dies zeigt, dass an Tag 4 eine Adaption der Erythrozyten an die PHZ Anämie beginnt. Diese Ergebnisse stimmen mit anderen Versuchen überein, die unter hypoxischen Bedingungen zeigten, dass sowohl die eNOS inaktiv ist, als auch die Inhibierung von XOR keinen Einfluss auf die NO Bildung hat.<sup>170</sup> Alle NO-Metabolite bis auf HbNO sinken in den Erythrozyten an den Tagen 2 und 4. Der niedrigere Sauerstoffgehalt in den Erythrozyten - wie er typisch für Anämien ist - führt zu hypoxischen Bedingungen.<sup>171</sup> Unter diesen Bedingungen ist eine Reduktion des Nitrits zu NO durch Deoxyhämoglobin<sup>42</sup> oder eine Nitrosierung unter Einflussnahme des Hämoglobins,<sup>20</sup> bzw des oxidativen Milieus möglich.<sup>21</sup> Dies könnte zu einer NO Produktion in den Erythrozyten führen, die stark gesunkene HbNO Konzentration an beiden Tagen spricht allerdings für eine geringere NO Produktion in den Erythrozyten.

Die ATP und GTP Konzentrationen in den Erythrozyten sinken an Tag 2 der Anämie und steigen an Tag 4 an. Das Sinken von ATP konnte auch in einer anderen PHZ induzierten Anämie gezeigt werden.<sup>172</sup> Die Triphosphate modulieren das Gleichgewicht der Erythrozyten zwischen der R- und T-Struktur.<sup>173</sup> ATP und GTP stabilisieren die T-Struktur

und senken so die Affinität vom Hämoglobin zu Sauerstoff, was zu einer geringeren Sauerstoffsättigung führt.<sup>174</sup> Die anschließend erhöhten Konzentrationen von GTP an Tag 4 verlagern das Gleichgewicht des Hämoglobins zur Seite der R-Struktur und erhöhen wieder die Affinität.

#### **4.6.2 Endothel Relaxationsfaktoren RXNO und Adenosin sind im Plasma erhöht**

Die erhöhte Konzentration an freiem Hämoglobin im Plasma hat zur Folge, dass das freie NO eingefangen und gebunden wird. Dieses NO fehlt für die Vasodilatation. In Patienten mit Sichelzell Anämie führt dies zu einer geringeren Fluss-abhängigen Vasodilatation.<sup>175 176</sup> Das freie Hämoglobin erhöht das Risiko von Atherosklerose und wirkt entzündend auf das Endothel.<sup>177</sup> Die cGMP Konzentration sinkt, da weniger in der Vaskulation produziert und in das Plasma abgegeben wird. Dennoch finden sich erhöhte Konzentrationen der endothel-abgeleiteten Relaxationsfaktoren RXNO und Adenosin im Plasma.<sup>178</sup> Adenosin gilt als Hypoxie Sensor im Plasma.<sup>179 180</sup> Die vasodilatativen Eigenschaften von Adenosin und die damit verbundenen Rezeptoren im Endothel werden in Kapitel 4.6.3 näher beschrieben. Die erhöhte RXNO Konzentration im Plasma kann durch Ausschüttung aus den Organen und Weiterleitung des NO durch Transnitrosierung oder durch Produktion im Plasma selbst erklärt werden. Das Enzym XOR kann im Plasma NO in Form von RXNO produzieren.<sup>181</sup> Dabei kann Nitrit oder Nitrat zu NO reduziert werden und in Form von RXNO im Plasma vorliegen. Die Nitrit Konzentration sinkt im Plasma der anämischen Mäuse, was auf einen Verbrauch hin deutet. Es ist bekannt, dass XOR von Organen in die Zirkulation abgegeben werden kann, vermehrt unter hypoxischen Bedingungen<sup>182 183</sup> RXNO hat den Vorteil nicht wie das Molekül NO vom freien Hämoglobin eingefangen zu werden. So sollte RXNO unter den hämolytischen Bedingungen eine längere Halbwertszeit haben. Der GSH Pool sinkt im Plasma der Anämie Mäuse an beiden Tagen. Die GSSG Konzentration bleibt konstant. Die GSH Konzentration sinkt also nicht aufgrund von oxidativem Stress, sondern wahrscheinlich weil GSH den reduktiven GSH Pool in den Organen auffüllt. Verteilung und Transport von GSH zwischen Organen konnte bereits in mehreren Studien festgestellt werden.<sup>184 185</sup>

#### **4.6.3 Interpretation der Wirkung der Adenosin Konzentration auf die Aorta**

Adenosin und RXNO aus dem Plasma können am Endothel vasodilatativ wirken. Adenosin führt zu einer NO abhängigen Vasodilatation durch Binden an die Adenosin Rezeptoren A<sub>2B</sub> und A<sub>2A</sub> des Endothels.<sup>186 187</sup> Ray et al. konnten zudem zeigen, dass es unter hypoxischen

Bedingungen durch Bindung des Adenosins an den A<sub>1</sub> Rezeptor zu einer vermehrten Prostaglandin Synthese kommt.<sup>188</sup> Diese Adenosin Rezeptoren aktivieren letztendlich die Adenylatcyclase und es wird vermehrt cAMP produziert. Das cAMP führt zu einer Aktivierung der Proteinkinase A<sup>189</sup> und das wiederum zur Phosphorylierung der endothelen eNOS.<sup>190 191</sup> Eine erhöhte cAMP Konzentration konnte in der Aorta nicht gemessen werden, da die Konzentrationen sowohl in der Kontrollgruppe, als auch in den Anämiegruppen unter dem Detektionslimit (LOD) liegen. Ferner kann Adenosin den A<sub>2B</sub> Rezeptor aktivieren und so die Angiogenese unterstützt.<sup>192</sup>

Die erhöhten Konzentrationen von Hypoxanthin und Xanthin in den anämischen Mäusen weisen auf einen vermehrten Verbrauch von Nucleotidphosphaten hin und eine höhere Aktivität von XDH, bzw XOR. Das Verhältnis von Hypoxanthin zu Xanthin bestärkt die Vermutung einer vermehrten Aktivität des Enzyms bei der Reduktion von Hypoxanthin zu Xanthin. So verlagert sich das Verhältnis im Verlauf der Anämie Richtung Xanthin. In der Kontrolle liegt das Verhältnis Hypoxanthin zu Xanthin bei 1:0,06, an Tag 2 bei 1:0,07 und an Tag 4 bei 1:0,42. In welcher Form das Enzym aktiv ist, kann anhand der Ergebnisse nicht interpretiert werden. XOR ist in der Gefäßwand der Aorta lokalisiert.<sup>49</sup> Es ist zudem bekannt, dass unter hypoxischen Bedingungen XOR aktiver ist und vermehrt exprimiert wird, was zur NO Produktion führt.<sup>71 193</sup> Kelley et al konnten zeigen, dass auch das Adenosin über die Adenosin Rezeptoren des Endothels zu einer höheren XOR Aktivität führt.<sup>183</sup> Die erhöhte Adenosin Konzentration im Plasma würde so die XOR abhängige NO Produktion im Endothel unterstützen. Als Nebenprodukt entsteht bei der NO Synthese durch XOR ROS, was die erhöhte GSSG Konzentration erklären würde. Gleichzeitig steigt die GSH Konzentration und die Konzentration an Cystein, einem Precursor von GSH. Die GSH de-novo Synthese ist erhöht. Eine weitere Funktion der XOR ist der Abbau von RXNO zu NO.<sup>77 76</sup> Auf diese Weise kann das RXNO aus dem Plasma genutzt und zu NO umgeformt werden, um für die Vasodilatation genutzt zu werden.

Hypoxie führt zu einer erhöhten Zellpermeabilität, was einen vermehrten Austausch mit dem Plasma und den glatten Muskelzellen ermöglicht.<sup>194</sup> Dies könnte den starken Verbrauch an GTP in den Endothelzellen erklären, die an Rho-GTPasen für Veränderungen der Zellpermeabilität sorgen. Die Funktionen der Rho-GTPasen sind allerdings vielfältig.<sup>195</sup>

#### 4.6.4 Vermehrter Schutz vor oxidativem Stress im Herzen

Der GSH Pool im Herzen steigt stark an und führt zu einer Änderung des Redox Status, zu einem eher reduktiven Milieu. Dies dient der Kardioprotektion vor oxidativem Stress. Die erhöhten Konzentrationen des freien Hämoglobins im Plasma führen zu mehr ROS und zur Schädigung von Cardiomyozyten.<sup>196</sup> Golan et al konnten zeigen, dass Tri- und Diphosphate massgeblich an der Kardioprotektion unter hypoxischen Bedingungen beteiligt sind, indem sie den ROS Spiegel senken.<sup>197</sup> Dies ist eine mögliche Erklärung der gesunkenen ATP, GTP und ADP Konzentrationen im Herzen. Es erklärt auch die gesunkene Herzrate, welche in den PHZ Mäusen anhand von Analysen unserer AG festgestellt wurde.

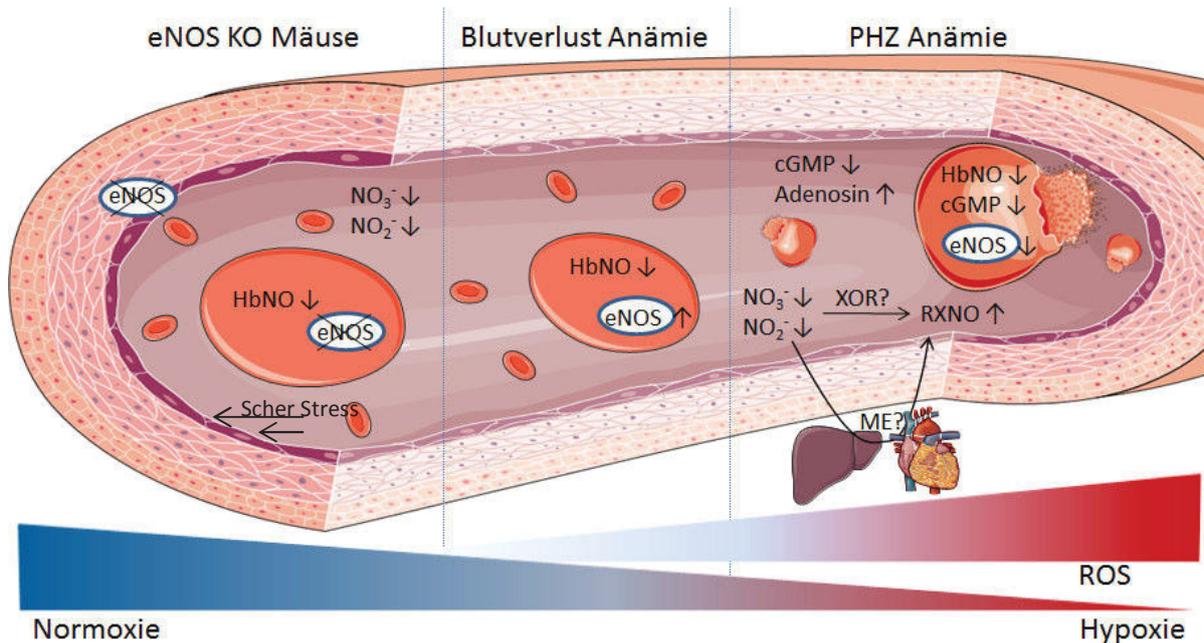
#### 4.6.5 Milz filtert freies Hämoglobin aus dem Blutkreislauf

Die Leber hat die Aufgabe toxische Substanzen im Organismus unschädlich zu machen. In Mäusen, welche mit PHZ behandelt wurden konnten erhöhte Konzentrationen des Eisentransporters DMT1 nachgewiesen werden.<sup>198</sup> Das freie Hämoglobin wirkt toxisch und wird von der Milz aus dem Blutkreislauf entfernt. Die Konzentration an RXNO sinkt in der anämischen Leber an den Tagen 2 und 4 unter den LOD. Eine Erklärung dafür zu finden ist schwer, da es wenige Literaturquellen zum Thema RXNO in der Leber gibt. Es spricht allgemein für einen Verbrauch, eine fehlende Produktion oder Ausschüttung von RXNO in das Plasma. Letzteres wäre eine zusätzliche Erklärung für die hohe RXNO Konzentration im Plasma. In der Leber können die Enzyme XOR,<sup>107</sup> Cytochromoxidase C,<sup>108</sup> Cytoglobin,<sup>109</sup> Sulfitoxidase<sup>110</sup> und Aldehydoxidase<sup>111</sup> NO in der Form RXNO produzieren. Die starke Senkung des Redox Status, welcher von einer höheren GSSG Konzentration ausgelöst wird, könnte jedoch zu einer niedrigeren Aktivität der genannten Enzyme führen. Das eher oxidative Milieu in der Leber könnte die Metalloenzyme oxidieren, welche dann die Funktion zur NO Produktion verlieren. Für eine fehlende Aktivität dieser Enzyme sprechen auch die größtenteils unveränderten Konzentrationen der Edukte Nitrit und Nitrat. Um diese Frage zu klären sind weitere Versuche notwendig, die im Ausblick näher erläutert werden.

Die Leber schüttet zur Regulation des Blutflusses und als Hypoxie Sensor Adenosin aus, was die geringere Konzentration in der Leber erklärt.<sup>199 200</sup> Generell kommt es zu einem hohen Abbau der Nucleotidphosphate, was die höheren Konzentrationen von Hypoxanthin und

Xanthin zeigen. Gleichzeitig bleiben die Konzentrationen der Nucleotidphosphate nahe zu unverändert, was für eine de novo Synthese der Nucleotidphosphate spricht.

## 5 Schlussfolgerungen und Ausblick



**Abbildung 19: Übersicht zu den gemessenen Veränderungen im Plasma und den Erythrozyten**

Gezeigt sind die Veränderungen der NO-Metabolite und Nucleotidphosphate im Plasma und den Erythrozyten. Die Ergebnisse sind nach Studien aufgeteilt: eNOS KO Mäuse, Blutverlust Anämie und PHZ Anämie. Die Konzentrationsabnahme von Nitrit und Nitrat im Plasma bedarf weiterer Untersuchungen um zu zeigen, ob Metalloenzyme (ME) für die Reduktion zu RXNO verantwortlich sein können.

Zusammenfassend lassen sich einige Grundaussagen zu den durchgeführten Experimenten treffen. Abbildung 19 erläutert die Verschiebung des NO-Metabolismus, welcher in den Experimenten festgestellt werden konnte. In den Versuchen hat sich gezeigt, dass bei einer geringeren Aktivität der eNOS die Nitrit und Nitrat Konzentrationen im Plasma sinken. Dies zeigt sich in den eNOS KO Mäusen und der PHZ Anämie.

1. **RXNO:** Nitrosothiole und Nitrosoamine stellen stabile Verbindungen dar, welche aufgrund ihrer längeren Halbwertszeiten eine vasodilatative Wirkung am Endothel erzielen können. Vor allem in der PHZ Anämie kann die erhöhte Konzentration von RXNO im Plasma eine wichtige Rolle in der Vasodilatation spielen. Die Wichtigkeit der Transnitrosierung als Transportsystem für NO scheint aufgrund der geringen Übertragungsrate des NO für den Organismus aber eher eine untergeordnete Rolle zu spielen.

2. **eNOS:** Das Enzym eNOS spielt eine zentrale Rolle im NO-Metabolismus. Das Fehlen des Enzyms in einem dieser Kompartimente führt zu einer Änderung des NO-Metabolismus im anderen Kompartiment, was für eine regulatorische Verbindung zwischen beiden Enzymen spricht. Desweiteren kann vermutet werden, dass die fehlende NO Produktion der eNOS verantwortlich für eine Umverteilung von Nitrit und Nitrat ist, wie es in den eNOS KO Mäusen und beiden Anämie Typen zu sehen ist. Die Aktivität der eNOS ist mit dem Redox Status verknüpft. Ein niedriger GSH Pool (Nrf2 KO Mäuse) oder leichter oxidativer Stress (Blutverlust Anämie) führen zu einer aktiveren Rolle des Enzyms, starker oxidativer Stress und erythrozytäre Dysfunktion (PHZ induzierte Anämie) zu einer geringeren.
3. **Oxidativer Stress:** Sowohl die Blutverlust Anämie als auch die PHZ induzierte Anämie zeigen beide höheren oxidativen Stress, die Schädigungen des kardiovaskulären Systems mit sich bringen. Moderater oxidativer Stress wie in der Blutverlust Anämie führt laut Literatur zu einer höheren eNOS Expression in den Erythrozyten. Durch Scherstress verursachter oxidativer Stress wird durch eine geringere Redoxkapazität hervorgerufen. Bei zuviel oxidativem Stress wie in der PHZ induzierten Anämie sinkt die NO-Bioverfügbarkeit in den Erythrozyten und es kommt zu einem Verlust der erythrozytären Funktionen mit einer schlechten Verformbarkeit.
4. **Anämie und Hypoxie:** Die hämolytische Anämie führt zu erhöhtem oxidativen Stress in den Erythrozyten, was deren Lebensspanne senkt. Liegt eine erythrozytäre Dysfunktion vor, sinkt die NO Produktion der Erythrozyten und der cGMP/sGC Signalweg kommt zum Stillstand. Endothel-abgeleitete Relaxationsfaktoren wie Adenosin und RXNO spielen eine übergeordnetere Rolle und kommen im Plasma in erhöhter Konzentration vor. Für die Produktion von RXNO können Metalloenzyme wie XOR verantwortlich sein.

In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass die eNOS für das kardiovaskuläre System von bedeutender Wichtigkeit ist. Bei Patienten mit Hypertonie,<sup>201</sup> endothelialer Dysfunktion<sup>202</sup> (wie auch in den hier beschriebenen eNOS KO Mäusen) oder bei Rauchern<sup>203</sup> konnte eine erhöhte ROS und geringere NO Produktion durch die Entkopplung des Enzyms nachgewiesen werden. Ein wichtiger Faktor bei der Entkopplung des Enzyms ist der Cofaktor BH<sub>4</sub>, welcher die Struktur der eNOS stabilisiert und die Aktivität maßgeblich

beeinflusst.<sup>204</sup> Dieser Cofaktor liegt in den beschriebenen Krankheitsbildern in geringeren Mengen oder als oxidierte Form  $BH_2$  vor.<sup>205</sup> Ein therapeutischer Einsatz des Cofaktors um eine funktionierende eNOS zu erhalten wird in der Literatur diskutiert.<sup>206</sup> Eine weitere Möglichkeit die Aktivität dieses Enzyms zu steigern konnte in Kindern mit einer Sichelzellanämie aufgezeigt werden. Bei dieser Krankheit wird weniger NO in den Erythrozyten produziert, da diese einer Dysfunktion unterliegen. Durch Gabe von Citrullin und Arginin kann die NO Produktion gesteigert werden.<sup>207</sup> Auch die Gabe von Nitrit und Nitrat als Therapie Ansatz für cardiovaskuläre Krankheiten wird oft diskutiert.<sup>208</sup>

Zukünftige Studien könnten sich mit der Bildung von RXNO durch Metalloenzyme im Plasma und in den Organen widmen. Vor allem dem Enzym XOR wird häufig eine Rolle zur NO Synthese unter hypoxischen Bedingungen zugesagt. Das Enzym soll bei globalen eNOS KO Mäusen aktiver sein.<sup>106</sup> Der Körper verfügt über weitere Metalloenzyme um diese NO-Metabolite zu NO zu reduzieren. Es ist jedoch wenig darüber bekannt wann und unter welchen Bedingungen diese Enzyme aktiv Nitrit und Nitrat zu NO reduzieren. Selbst die Rolle von XOR ist in der Literatur sehr umstritten, obwohl dies sicherlich das am besten erforschte Metalloenzym zur Synthese von NO ist. Um die Erkenntnisse in diesem Gebiet weiter zu untersuchen, könnte die Verteilung von Nitrit und Nitrat im Körper mit  $^{15}N$ -Nitrit und  $^{15}N$ -Nitrat im Trinkwasser der Mäuse verifiziert und sogar quantifiziert werden. Werden die Metabolite zu NO reduziert, entsteht  $^{15}N$ -NO, bzw  $RX^{15}N$ -NO.  $RX^{15}N$ -NO kann zu  $^{15}N$ -NO reduziert werden und mit 4-Amino-5-Methylamino-2,7,-Difluorofluorescein Diacetat (DAF-FM) derivatisiert werden. Der entstandene Komplex könnte massenspektrometrisch quantifiziert werden. Auf diese Weise wäre ersichtlich, ob das im Trinkwasser zugesetzte Nitrit und Nitrat zu NO bzw RXNO reduziert wird und dem Körper z.B. im Plasma wieder zur Verfügung steht. Eine Umsetzung von Nitrit und Nitrat würde auch die vielen therapeutischen Ansätze erklären in denen eine Gabe von Nitrit und Nitrat u. a. einen positiven Einfluss auf die cardiovaskuläre Funktion hat.<sup>209 210 211</sup>

## 6 Verzeichnisse

### 6.1 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien, Verbrauchsmaterialien, Puffer und Geräte .....	11
Tabelle 2: Reaktionen zur Messung von Nitrit und RXNO mit der CLD.....	16
Tabelle 3: Mausprojekte und Aktenzeichen.....	26
Tabelle 4: Nitrit und Nitrat Konzentrationen der Trinkwasserquellen .....	26
Tabelle 5: Mausmodelle und Beschreibung.....	26
Tabelle 6: Massen und Retentionszeiten der Thiole.....	29
Tabelle 7: Vergleich der Wiederfindungsraten in Phenol- und SSA-Extraktion.....	31
Tabelle 8: Massen und Retentionszeiten der Nucleotidphosphate und Nucleoside.....	31
Tabelle 9: NOx-Metabolismus in globalen eNOS KO und Nrf2 KO Mäusen.....	37
Tabelle 10: NOx-Metabolismus in RBC eNOS KO Mäusen .....	38
Tabelle 11: NOx-Metabolismus in EC eNOS KO Cre Neg/Pos Tam Mäusen .....	39
Tabelle 12: Thiol-Metabolismus in globalen eNOS KO und Nrf2 KO Mäusen.....	41
Tabelle 13: NOx-Metabolismus in Exercise EC eNOS KO Mäusen .....	43
Tabelle 14: Thiol-Metabolismus in Exercise EC eNOS KO Mäusen .....	44
Tabelle 15: Nucleotidphosphate und Nucleoside in Exercise EC eNOS KO Mäusen .....	45
Tabelle 16: NOx-Metabolismus in Blutverlust Anämie bei unterschiedlichem Trinkwasser. 47	
Tabelle 17: Thiol-Metabolismus in Mäusen mit Blutverlust Anämie.....	48
Tabelle 18: NOx-Metabolismus in PHZ induzierter Anämie Mäusen.....	51
Tabelle 19: Thiol Konzentrationen in den PHZ induzierten Anämie Mäusen .....	53
Tabelle 20: Nucleotidphosphate und Nucleoside in PHZ induzierten Anämie Mäusen .....	55
Tabelle 21: Zusammenfassung Tendenzen der gemessenen NOx-Metabolite aller Mäuse .	58
Tabelle 22: Zusammenfassung Tendenzen der gemessenen Thiol-Metabolite aller Mäuse	60
Tabelle 23: Zusammenfassung Tendenzen der gemessenen Nucleotidphosphate.....	62

## 6.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Übersicht über den NO-Metabolismus.....	<b>Fehler! Textmarke nicht definiert.</b>
Abbildung 2: GSH Synthese und Reaktionsweg zu Glutathiondisulfid.....	6
Abbildung 3: Abbauwege der Nucleotidphosphate .....	7
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Ziele dieser Dissertation .....	9
Abbildung 5: Schematischer Aufbau der Glasapparaturen vor der CLD.....	15
Abbildung 6: Schematische Darstellung des ENO und Reaktion von Nitrit mit Sulfanilamid	16
Abbildung 7: Schematische Darstellung der UPLC-QToF und Messprinzip .....	17
Abbildung 8: Van-Deemter-Gleichung, Auswirkung der Fließgeschwindigkeit auf die Trennleistung.....	19
Abbildung 9: Probenvorbereitung von Vollblut und Gewebe zur Messung der Thiole.....	22
Abbildung 10: Schematische Behandlung der Mäuse.....	28
Abbildung 11: Chromatographische Trennung der gemessenen Thiole einer Mausleber....	30
Abbildung 12: Chromatographische Trennung der gemessenen Nucleotidphosphate und Nucleoside eines Mausherzens .....	32
Abbildung 13: RXNO ist ein stabiles Reaktionsprodukt mit geringer Transnitrosierungsrate .....	<b>Fehler! Textmarke nicht definiert.</b>
Abbildung 14: Effektivität der Transnitrosierung hängt von Protein und Nitrosierungsreagenz ab .....	34
Abbildung 15: Keine vermehrte Bildung von Dimeren nach Nitrosierung .....	35
Abbildung 16: Nitrosierung von Spektrin unter hypoxischen Bedingungen.....	36
Abbildung 17: Freies Hämoglobin im Plasma und Vergrößerung der Milz.....	50
Abbildung 18: Schlechtere Verformbarkeit der Erythrozyten und Viskosität des Bluts der PHZ Mäuse.....	57
Abbildung 19: Übersicht zu den gemessenen Veränderungen im Plasma und den Erythrozyten .....	81

### 6.3 Literaturverzeichnis

1. Statistisches Bundesamt (Destatis). 'Gesundheit: Todesursachen in Deutschland 2015' Fachserie, 1–44 (2017)
2. Statistisches Bundesamt (Destatis). 'Todesursachen 2016' Available at: <https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Todesursachen/todesfaelle-2016.html>.
3. Heusch G., Eschenhagen T., & Dimmeler S. 'Cardiovascular Research in Germany' *Circ. Res.* 121, 492–495 (2017)
4. So Relle R. 'Nobel prize awarded to scientists for nitric oxide discoveries' *Cardiovasc. News* 98, 2365–2366 (1998)
5. Institutet Nobelförsamlingen Karolinska. 'Press Release Nobelprize for medicine and physiology' (1998) Available at: <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1998/press-release/>.
6. Palmer M. R. J., & Moncada S. 'A Novel Citrulline-forming Enzyme implicated in the formation of nitric oxide by vascular endothelial cells' *Biochem. Biophys. Commun.* 30, 3943–3946 (1989)
7. Wood K. C., Cortese-Krott M. M., Kovacic J. C., Noguchi A., Liu V. B., Wang X., Raghavachari N., Boehm M., Kato G. J., Kelm M., & Gladwin M. T. 'Circulating Blood eNOS Contributes to the Regulation of Systemic Blood Pressure and Nitrite Homeostasis' 33, 1–25 (2014)
8. Förstermann U., & Sessa W. C. 'Nitric oxide synthases: Regulation and function' *Eur. Heart J.* 33, 829–837 (2012)
9. Crane B. R., Wu C., Getzoff E. D., Stuehr D. J., & Tainer J. A. 'Structure of Nitric Oxide Synthase Oxygenase Dimer with Pterin and Substrate' *Science (80- )*. 2121, 2121–2126 (2009)
10. Chen P., Tsai A., Berka V., & Wu K. K. 'Evidence for Bidomain Structure and Successful Reconstitution of Catalytic Activity' *Biochemistry* 271, 14631–14635 (1996)
11. Werner E. R., Gorren A. C. F., Heller R., Werner-felmayer G., & Mayer B. 'Tetrahydrobiopterin and Nitric Oxide': *Soc. Exp. Biol. Med.* 1291–1302 (2003)
12. Mumford R. A., Swiderek K. M., & Lee T. D. 'Calmodulin is a Subunit of Nitric Oxide Synthase from Macrophages' *Exp. Med.* 176, (1992)
13. Chen M., Yi B., Zhu N., Wei X., Zhang G., Huang S., & Sun J. 'Pim1 kinase promotes angiogenesis through phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase at Ser-633' *Cardiovasc. Res.* 141–150 (2016) doi:10.1093/cvr/cvv250
14. Bean T., Reese V., Richardson R. S., & Cai J. 'Endothelial cell autophagy maintains shear-stress-induced nitric oxide generation via glycolysis-dependent purinergic signaling to eNOS' *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 37, 1646–1656 (2018)
15. Landmesser U., Dikalov S., Price S. R., Mccann L., Fukai T., Holland S. M., Mitch W. E., & Harrison D. G. 'Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension' *J. Clin. Invest.* 111, 1201–1209 (2003)
16. Luo S., Lei H., Qin H., & Xia Y. 'Molecular Mechanisms of Endothelial NO Synthase Uncoupling' *Curr. Pharm. Des.* 3548–3553 (2014)
17. Hyde E. R., Andrade F., Vaksman Z., Parthasarathy K., Jiang H., Parthasarathy D. K., Torregrossa A. C., Tribble G., Kaplan H. B., Petrosino J. F., & Bryan N. S. 'Metagenomic analysis of nitrate-reducing bacteria in the oral cavity: Implications for nitric oxide homeostasis' *PLoS One* 9, (2014)
18. Wu L. Bin, Yuan H., Gao S. Q., You Y., Nie C. M., Wen G. B., Lin Y. W., & Tan X. 'Regulating the nitrite reductase activity of myoglobin by redesigning the heme

- active center' *Nitric Oxide - Biol. Chem.* 57, 21–29 (2016)
19. Feelisch M., Rassaf T., Mnaimeh S., Singh N., Bryan N. S., Jourdain D., & Kelm M. 'Concomitant S-, N-, and heme-nitros(yl)ation in biological tissues and fluids: implications for the fate of NO in vivo' *FASEB J.* 16, 1775–1785 (2002)
  20. Palmerini C. A., Saccardi C., Arienti G., & Palombari R. 'Formation of Nitrosothiols from Gaseous Nitric Oxide at pH 7.4' 16, 135–139 (2002)
  21. Espey M. G., Thomas D. D., Miranda K. M., & Wink D. A. 'Focusing of nitric oxide mediated nitrosation and oxidative nitrosylation as a consequence of reaction with superoxide' *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 11127–11132 (2002)
  22. Belcastro E., Wu W., Fries-Raeth I., Corti A., Pompella A., Leroy P., Lartaud I., & Gaucher C. 'Oxidative stress enhances and modulates protein S-nitrosation in smooth muscle cells exposed to S-nitrosoglutathione' *Nitric Oxide - Biol. Chem.* 69, 10–21 (2017)
  23. Bruegger J. J., Smith B. C., Wynia-Smith S. L., & Marletta M. A. 'Comparative and integrative metabolomics reveal that S-nitrosation inhibits physiologically relevant metabolic enzymes' *J. Biol. Chem.* 293, 6282–6296 (2018)
  24. Hamada S. 'Einfluss der Anzahl kardiovaskulärer Risikofaktoren auf die RXNO-Konzentration im menschlichen Plasma: Biochemische Marker des NO-Stoffwechsels und endotheliale Dysfunktion' *Dissertation* (2006)
  25. Cabello C. M., Bair W. B., Lamore S. D., Ley S., Alexandra S., Azimian S., & Wondrak G. T. 'Hypoxic vasodilation by red blood cells: Evidence for an S-Nitrosothiol based signal' *Circ. Res.* 46, 220–231 (2010)
  26. Wolhuter K., Whitwell H. J., Switzer C. H., Burgoyne J. R., Timms J. F., & Eaton P. 'Evidence against Stable Protein S-Nitrosylation as a Widespread Mechanism of Post-translational Regulation' *Mol. Cell* 69, 438–450 (2018)
  27. Bryan N. S., Rassaf T., Maloney R. E., Rodriguez C. M., Saijo F., Rodriguez J. R., & Feelisch M. 'Cellular targets and mechanisms of nitros(yl)ation: an insight into their nature and kinetics in vivo.' *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 4308–4313 (2004)
  28. Scharfstein J. S., Keaney J. F., Smivka A., Welch G. N., Vita J. A., & Stamler J. S. 'In vivo transfer of nitric oxide between a plasma protein-bound reservoir and low molecular weight thiols' *J. Clin. Invest.* 94, (1994)
  29. Denninger J. W., & Marletta M. A. 'Guanylate cyclase and the \*NO/cGMP signaling pathway' *Biochim. Biophys. Acta* 1411, 334–350 (1999)
  30. Condorelli P., & George S. C. 'In Vivo Control of Soluble Guanylate Cyclase Activation by Nitric Oxide: A Kinetic Analysis' *Biophys. J.* 80, 2110–2119 (2001)
  31. Bradley G. F., Xiaohui H., Brailey J., Berry R., Walker F., & Montfort W. R. 'Oxidation and Loss of Heme in Soluble Guanylyl Cyclase from *Manduca sexta*' *Biochemistry* 50, 5813–5815 (2012)
  32. Deonikar P., Abu-Soud H. M., & Kavdia M. 'Computational analysis of nitric oxide biotransport to red blood cell in the presence of free hemoglobin and NO donor' *Microvasc. Res.* 95, 15–25 (2014)
  33. Jia L., Bonaventura C., Bonaventura J., & Stamler J. S. 'S-nitrosohaemoglobin: a dynamic activity of blood involved in vascular control' *Nature* 610, 221–226 (1994)
  34. Rifkind J. M., Nagababu E., Cao Z., Barbiro-Michaely E., & Mayevsky A. 'Nitrite-induced improved blood circulation associated with an increase in a pool of RBC-NO with NO bioactivity' *Adv. Exp. Med. Biol.* 645, 27–34 (2009)
  35. Vaughn M. W., Huang K. T., Kuo L., & Liao J. C. 'Erythrocyte consumption of nitric oxide: Competition experiment and model analysis' *Nitric Oxide - Biol. Chem.* 5, 18–

- 31 (2001)
36. Tanaka H., Shimizu S., Ohmori F., Muraoka Y., Kumagai M., Yoshizawa M., & Kagaya A. 'Increase in blood flow and shear stress to nonworking limbs during incremental exercise' *Med. Sci. Sports Exerc.* 38, 81–85 (2006)
  37. Diederich L., Suvorava T., Sansone R., Keller T. C. S., Barbarino F., Sutton T. R., Kramer C. M., Lückstädt W., Isakson B. E., Gohlke H., Feelisch M., Kelm M., & Cortese-Krott M. M. 'On the effects of reactive oxygen species and nitric oxide on red blood cell deformability' *Front. Physiol.* 9, 1–14 (2018)
  38. Grau M., Pauly S., Ali J., Walpurgis K., Thevis M., Bloch W., & Suhr F. 'RBC-NOS-Dependent S-Nitrosylation of Cytoskeletal Proteins Improves RBC Deformability' *PLoS One* 8, 1–10 (2013)
  39. Ignarro L. J. 'Biological actions and properties of endothelium-derived nitric oxide formed and released from artery and vein.' *Circ. Res.* 65, 1–21 (1989)
  40. Liu X., Miller M. J. S., Joshi M. S., Sadowska-Krowicka H., Clark D. A., & Lancaster J. R. 'Diffusion-limited reaction of nitric oxide with erythrocytes vs free hemoglobin' *Faseb J.* 12, A82–A82 (1998)
  41. Huang K. T., Keszler A., Patel N., Patell R. P., Gladwin M. T., Kim-Shapiro D. B., & Hogg N. 'The reaction between nitrite and deoxyhemoglobin: Reassessment of reaction kinetics and stoichiometry' *J. Biol. Chem.* 280, 31126–31131 (2005)
  42. Cosby K., Partovi K. S., Crawford J. H., Patel R. P., Reiter C. D., Martyr S., Yang B. K., Waclawiw M. A., Zalos G., Xu X., Huang K. T., Shields H., Kim-Shapiro D. B., Schechter A. N., Cannon R. O., & Gladwin M. T. 'Nitrite reduction to nitric oxide by deoxyhemoglobin vasodilates the human circulation' *Nat. Med.* 9, 1498–1505 (2003)
  43. Doyle M. P., & Hoekstra J. W. 'Oxidation of nitrogen oxides by bound dioxygen in hemoproteins' *J. Inorg. Biochem.* 14, 351–358 (1981)
  44. Gardiner R., Traylor T. G., Sharma V. S., & Mizukami H. 'Reaction of Nitric Oxide with Heme Proteins and Model Compounds of Hemoglobin' *Biochemistry* 26, 3837–3843 (1987)
  45. Kuhn V., Diederich L., Keller T. C. S., 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.* 26, 718–742 (2017)
  46. Spencer N. Y., Patel N. K., Keszler A., & Hogg N. 'Oxidation and nitrosylation of oxyhemoglobin by S-nitrosoglutathione via nitroxyl anion' *Free Radic. Biol. Med.* 35, 1515–1526 (2003)
  47. Kleinbongard P., Schulz R., Rassaf T., Lauer T., Dejam A., Jax T., Kumara I., Gharini P., Kabanova S., Özüyaman B., Schnürch H. G., Gödecke A., Weber A. A., Robenek M., Robenek H., Bloch W., Rösen P., & Kelm M. 'Red blood cells express a functional endothelial nitric oxide synthase' *Blood* 107, 2943–2951 (2006)
  48. Horn P., Thasian-Sivarajah S., Krenz T., Krisp C., Heiss C., Hogg N., Sansone R., Rodriguez-Mateos A., Kroncke K.-D., Kelm M., Cortese-Krott M. M., Kuhnle G. G. C., Wolters D., & Feelisch M. 'Human red blood cells at work: identification and visualization of erythrocytic eNOS activity in health and disease' *Blood* 120, 4229–4237 (2012)
  49. Webb A. J., Milsom A. B., Rathod K. S., Chu W. L., Lovell M. J., Lecomte F. M. J., Perrett D., Raimondo C., Khoshbin E., Ahmed Z., Uppal R., Benjamin N., & Hobbs A. J. 'Mechanisms underlying erythrocyte and endothelial nitrite reduction to NO in hypoxia: Role for Xanthine Oxidoreductase and eNOS' *Circ. Res.* 103, 957–964 (2010)

50. Short J. D., Downs K., Tavakoli S., & Asmis R. 'Protein Thiol Redox Signaling in Monocytes and Macrophages' *Antioxid. Redox Signal.* 25, 816–835 (2016)
51. Kirsch M., & De Groot H. 'Formation of peroxynitrite from reaction of nitroxyl anion with molecular oxygen' *J. Biol. Chem.* 277, 13379–13388 (2002)
52. Szatrowski T. P., & Nathan C. F. 'Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells.' *Cancer Res.* 51, 794–798 (1991)
53. Anderson E. J., Kypson A. P., Rodriguez E., Curtis A., Lehr E. J., & Neuffer P. D. 'NIH Public Access' 54, 1891–1898 (2010)
54. Ceconi C., Curello S., Cargnoni A., Ferrari R., Albertini A., & Visioli O. 'The role of glutathione status in the protection against ischaemic and reperfusion damage: Effects of N-acetyl cysteine' *J. Mol. Cell. Cardiol.* 20, 5–13 (1988)
55. Thimmulappa R. K., Mai K. H., Srisuma S., Kensler T. W., Yamamoto M., & Biswal S. 'Identification of Nrf2-regulated genes induced by the chemopreventive agent sulforaphane by oligonucleotide microarray.' *Cancer Res.* 62, 5196–203 (2002)
56. Chanas S. A., Jiang Q., Mc Mahon M., Mc Walter G. K., Mc Lellan L. I., Elcombe C. R., Henderson C. J., Wolf C. R., Moffat G. J., Itoh K., Yamamoto M., & Hayes J. D. 'Loss of the Nrf2 transcription factor causes a marked reduction in constitutive and inducible expression of the glutathione S-transferase Gsta1, Gsta2, Gstm1, Gstm2, Gstm3 and Gstm4 genes in the livers of male and female mice' *Biochem. J.* 365, 405–416 (2002)
57. Schwarzländer M., Dick T. P., Meyer A. J., & Morgan B. 'Dissecting Redox Biology Using Fluorescent Protein Sensors' *Antioxid. Redox Signal.* 24, 680–712 (2015)
58. Flohé L. 'The fairytale of the GSSG/GSH redox potential' *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1830, 3139–3142 (2013)
59. Batelli M. 'Xanthine oxidase type D in the intestine and other organs of the rat' *Biochem. J.* 51, 747–749 (1972)
60. Parks D., & Granger D. 'Xanthine oxidase: biochemistry, distribution and physiology' *Acta Physiol.* (1986)
61. Hille R., & Massey V. 'Studies on the oxidative half-reaction of xanthine oxidase.' *J. Biol. Chem.* 256, 9090–9095 (1981)
62. Eger B. T., Enroth C., Nishino T., Okamoto K., & Pai E. F. 'Crystal structures of bovine milk xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase: Structure-based mechanism of conversion' *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 10723–10728 (2002)
63. Xia M., Dempski R., & Hille R. 'The reductive half-reaction of xanthine oxidase. Reaction with aldehyde substrates and identification of the catalytically labile oxygen' *J. Biol. Chem.* 274, 3323–3330 (1999)
64. Pospisilova, Vit, Lorkova, Klanova, Zivny, Klener, & Petrak. 'Resistance to TRAIL in mantle cell lymphoma cells is associated with the decreased expression of purine metabolism enzymes' *Int. J. Mol. Med.* 31, (2013)
65. Amaya Y., Yamazaki K., Sato M., Noda K., Nishino T., & Nishino T. 'Proteolytic conversion of xanthine dehydrogenase from the NAD-dependent type to the O<sub>2</sub>-dependent type. Amino acid sequence of rat liver xanthine dehydrogenase and identification of the cleavage sites of the enzyme protein during irreversible conversion by' *J. Biol. Chem.* 265, 14170–14175 (1990)
66. Nishino T., & Nishino T. 'The conversion from the dehydrogenase type to the oxidase type of rat liver xanthine dehydrogenase by modification of cysteine residues with fluorodinitrobenzene' *J. Biol. Chem.* 272, 29859–29864 (1997)
67. E D. C. 'Properties of xanthine oxidase from human liver' *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 191, 164–166 (1969)

68. Hille R., & Nishino T. 'Xantine oxidase and xanthine dehydrogenase' *FASEB* 995–1003 (1995)
69. Waud R. 'The Mechanism of Conversion of Rat Liver Xanthine Dehydrogenase from an NAD<sup>+</sup>-Dependent Form ( Type D ) to an O<sub>2</sub>-Dependent Form' *Compet. Interes. None Declar.* (1976)
70. Repine J. E., Willingham I. R., Guidot D. M., Leff J. A., Hanley M. E., Terada L. S., & Piermattei D. 'Hypoxia injures endothelial cells by increasing endogenous xanthine oxidase activity.' *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89, 3362–3366 (2006)
71. Kayyali U. S., Donaldson C., Huang H., Abdelnour R., & Hassoun P. M. 'Phosphorylation of Xanthine Dehydrogenase/Oxidase in Hypoxia' *J. Biol. Chem.* 276, 14359–14365 (2001)
72. Li H., Cui H., Liu X., & Zweier J. L. 'Xanthine oxidase catalyzes anaerobic transformation of organic nitrates to nitric oxide and nitrosothiols: Characterization of this mechanism and the link between organic nitrate and guanylyl cyclase activation' *J. Biol. Chem.* 280, 16594–16600 (2005)
73. Millar T. M., Stevens C. R., Benjamin N., Eisenthal R., Harrison R., & Blake D. R. 'Xanthine oxidoreductase catalyses the reduction of nitrates and nitrite to nitric oxide under hypoxic conditions' *FEBS Lett.* 427, 225–228 (1998)
74. Li H., Cui H., Kundu T. K., Alzawahra W., & Zweier J. L. 'Nitric oxide production from nitrite occurs primarily in tissues not in the blood: Critical role of xanthine oxidase and aldehyde oxidase' *J. Biol. Chem.* 283, 17855–17863 (2008)
75. Martin H. M., Moore K. P., Bosmans E., Davies S., Burroughs A. K., Dhillon A. P., Tosh D., & Harrison R. 'Xanthine oxidoreductase is present in bile ducts of normal and cirrhotic liver' *Free Radic. Biol. Med.* 37, 1214–1223 (2004)
76. Aleryani S., Milo E., Rose Y., & Kostka P. 'Superoxide-mediated decomposition of biological S-nitrosothiols' *J. Biol. Chem.* 273, 6041–6045 (1998)
77. Trujillo M., Alvarez N., Peluffo G., Freeman B. A., & Radi R. 'Xanthine Oxidase-mediated Decomposition of S-Nitrosothiols \*' *J. Biol. Chem.* 273, 7828–7834 (1998)
78. Almeida L. E. F., Kamimura S., Nettleton M. Y., Souza C. M. De, Walek E., Wang L., & Quezado Z. M. N. 'Free Radical Biology and Medicine Blood collection vials and clinically used intravenous fluids contain significant amounts of nitrite' *Free Radic. Biol. Med.* 108, 533–541 (2017)
79. Marley R., Feelisch M., Holt S., & Moore K. 'A chemiluminescence-based assay for S-nitrosoalbumin and other plasma S-nitrosothiols' *Free Radic. Res.* 32, 1–9 (2000)
80. Feelisch M. 'Nitroxyl gets to the heart of the matter.' *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 4978–80 (2003)
81. Meyer V. R. *Praxis der Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie* (Wiley-VCH, 2009)
82. Steiner F. *Applications of narrow-bore columns in HPLC* (Hewlett-Packard Co., 1991)
83. Chemgapedia. 'Grundlagen der Chromatographie' Available at: [http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/3/anc/croma/chromatographie\\_grundlagen.vlu/Page/vsc/de/ch/3/anc/croma/basics/saulen\\_chr/deemter/van\\_deemterm57ht0500.vscml.html](http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/3/anc/croma/chromatographie_grundlagen.vlu/Page/vsc/de/ch/3/anc/croma/basics/saulen_chr/deemter/van_deemterm57ht0500.vscml.html). (Accessed: 22nd December 2018)
84. Federal drug Association. 'Guidance for Industry' 1996 Available at: <https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidances/ucm073384.pdf>. (Accessed: 19th January 2019)
85. Berndt C., Hudemann C., Hanschmann E.-M., Axelsson R., Holmgren A., & Lillig C. H. 'How Does Iron–Sulfur Cluster Coordination Regulate the Activity of Human Glutaredoxin 2?' *Antioxid. Redox Signal.* 9, 151–157 (2007)

86. Nagy P., Pálinkás Z., Nagy A., Budai B., Tóth I., & Vasas A. 'Biochimica et Biophysica Acta Chemical aspects of hydrogen sulfide measurements in physiological samples' *BBA - Gen. Subj.* 1840, 876–891 (2014)
87. Reed D. J., Babson J. R., Beatty P. W., Brodie A. E., Ellis W. W., & Potter A. W. 'High-Performance Levels Liquid Chromatography Analysis of Nanomole of Glutathione , Glutathione' *Anal. Biochem.* 62, 55–62 (1980)
88. Rossi R., Milzani A., Dalle-donne I., Giustarini D., Lusini L., Colombo R., & Simplicio P. Di. 'Blood Glutathione Disulfide: In Vivo Factor or in Vitro Artifact?' *Clin. Chem.* 48, 742–753 (2002)
89. Giustarini D., Dalle-Donne I., Milzani A., Fanti P., & Rossi R. 'Analysis of GSH and GSSG after derivatization with N-ethylmaleimide' *Nat. Protoc.* 8, 1660–1669 (2013)
90. Kuninori T., & Nishiyama J. 'Some properties of diastereomers formed in the reactions of N-ethylmaleimide with biological thiols' *Agric. Biol. Chem.* 49, 2453–2454 (1985)
91. Mitamura K. 'Derivatization of thiol-containing compounds' *J. Chromatogr. B Biom* 4347, (1994)
92. Raftos J. E., Whillier S., & Kuchel P. W. 'Glutathione synthesis and turnover in the human erythrocyte: Alignment of a model based on detailed enzyme kinetics with experimental data' *J. Biol. Chem.* 285, 23557–23567 (2010)
93. Monostori P., Wittmann G., Karg E., & Túri S. 'Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples: An in-depth review' *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 877, 3331–3346 (2009)
94. Sutton T. R., Minnion M., Barbarino F., Koster G., Fernandez B. O., Cumpstey A. F., Wischmann P., Madhani M., Frenneaux M. P., Postle A. D., Cortese-Krott M. M., & Feelisch M. 'A robust and versatile mass spectrometry platform for comprehensive assessment of the thiol redox metabolome' *Redox Biol.* 16, 359–380 (2018)
95. Wakamatsu A., Morimoto K., Shimizu M., & Kudoh S. 'A severe peak tailing of phosphate compounds caused by interaction with stainless steel used for liquid chromatography and electrospray mass spectrometry' *J. Sep. Sci.* 28, 1823–1830 (2005)
96. Morris G. W., Iams T. A., Slepchenko K. G., & McKee E. E. 'Origin of pyrimidine deoxyribonucleotide pools in perfused rat heart: implications for 3'-azido-3'-deoxythymidine-dependent cardiotoxicity' *Biochem. J.* 422, 513–520 (2009)
97. López L. C., Hirano M., Tanabe L. M., Bonilla E., Dorado B., Dauer W. T., Akman H. O., Vilà M. R., García-Cazorla Á., & Tanji K. 'Thymidine kinase 2 (H126N) knockin mice show the essential role of balanced deoxynucleotide pools for mitochondrial DNA maintenance' *Hum. Mol. Genet.* 17, 2433–2440 (2008)
98. Perissinotti L. L., Turjanski A. G., Estrin D. A., & Doctorovich F. 'Transnitrosation of nitrosothiols: Characterization of an elusive intermediate' *J. Am. Chem. Soc.* 127, 486–487 (2005)
99. Li J., Wang G. P., & Schlegel H. B. 'A computational exploration of some transnitrosation and thiolation reactions involving CH<sub>3</sub>SNO, CH<sub>3</sub>ONO and CH<sub>3</sub>NHNO' *Org. Biomol. Chem.* 4, 1352–1364 (2006)
100. Ehman E. C., Johnson G. B., Villanueva-meyer J. E., Cha S., Leynes A. P., Eric P., Larson Z., & Hope T. A. 'Regulation of cardiovascular cellular processes by S-nitrosylation' *Biochim Biophys Acta* 46, 1247–1262 (2012)
101. Komiyama T., & Fujimori K. 'Kinetic studies of the reaction of S-nitroso-L-cysteine with L-cysteine' *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 7, 175–180 (1997)

102. Keane J. F., Simon D. I., Stamler J. S., Jaraki O., Scharfstein J., Vita J. A., & Loscalzo J. 'NO forms an adduct with serum albumin that has endothelium-derived relaxing factor-like properties' *J. Clin. Invest.* 91, 1582–1589 (1993)
103. Liu T., & et al. 'Local and Systemic Vasodilatory Effects of Low Molecular Weight S-nitrosothiols' *Free Radic Biol Med* 215–223 (2017)
104. Aamand R., Dalsgaard T., Jensen F. B., Simonsen U., Roepstorff A., & Fago A. 'Generation of nitric oxide from nitrite by carbonic anhydrase: a possible link between metabolic activity and vasodilation.' *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 297, H2068-74 (2009)
105. Keszler A., Piknova B., Schechter A. N., & Hogg N. 'The reaction between nitrite and oxyhemoglobin: A mechanistic study' *J. Biol. Chem.* 283, 9615–9622 (2008)
106. Peleli M., Zollbrecht C., Montenegro M. F., Hezel M., Zhong J., Persson E. G., Holmdahl R., Weitzberg E., Lundberg J. O., & Carlström M. 'Enhanced XOR activity in eNOS-deficient mice: Effects on the nitrate-nitrite-NO pathway and ROS homeostasis' *Free Radic. Biol. Med.* 99, 472–484 (2016)
107. Cantu-Medellin N., & Kelley E. E. 'Xanthine oxidoreductase-catalyzed reduction of nitrite to nitric oxide: Insights regarding where, when and how' *Nitric Oxide - Biol. Chem.* 34, 19–26 (2013)
108. Loullis A., Noor M. R., Soulimane T., & Pinakoulaki E. 'The structure of a ferrous heme-nitro species in the binuclear heme a<sub>3</sub>/CuBcenter of ba<sub>3</sub>-cytochrome c oxidase as determined by resonance Raman spectroscopy' *Chem. Commun.* 51, 286–289 (2015)
109. Li H., Hemann C., Abdelghany T. M., El-Mahdy M. A., & Zweier J. L. 'Characterization of the mechanism and magnitude of cytoglobin-mediated nitrite reduction and nitric oxide generation under anaerobic conditions' *J. Biol. Chem.* 287, 36623–36633 (2012)
110. Wang J., Krizowski S., Fischer-Schrader K., Nix D., Tejero J., Sparacino-Watkins C., Wang L., Ragireddy V., Frizzell S., Kelley E. E., Zhang Y., Basu P., Hille R., Schwarz G., & Gladwin M. T. 'Sulfite Oxidase Catalyzes Single-Electron Transfer at Molybdenum Domain to Reduce Nitrite to Nitric Oxide' *Antioxid. Redox Signal.* 23, 283–294 (2014)
111. Li H., Kundu T. K., & Zweier J. L. 'Characterization of the magnitude and mechanism of aldehyde oxidase-mediated nitric oxide production from nitrite' *J. Biol. Chem.* 284, 33850–33858 (2009)
112. Jayaraman T., Tejero J., Chen B. B., Blood A. B., Frizzell S., Shapiro C., Tiso M., Hood B. L., Wang X., Zhao X., Conrads T. P., Mallampalli R. K., & Gladwin M. T. 'Binding and phosphorylation of neuroglobin during hypoxia modulate six-to-five heme pocket coordination and rate of nitrite reduction to nitric oxide' *J. Biol. Chem.* 286, 42679–42689 (2011)
113. Castello P. R., David P. S., McClure T., Crook Z., & Poyton R. O. 'Mitochondrial cytochrome oxidase produces nitric oxide under hypoxic conditions: Implications for oxygen sensing and hypoxic signaling in eukaryotes' *Cell Metab.* 3, 277–287 (2006)
114. Kirima K., Tsuchiya K., Sei H., Hasegawa T., Shikishima M., Motobayashi Y., Morita K., Yoshizumi M., & Tamaki T. 'Evaluation of systemic blood NO dynamics by EPR spectroscopy: HbNO as an endogenous index of NO' *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* 285, H589–H596 (2015)
115. Zotti F. D., Lobysheva I. I., & Balligand J. L. 'Nitrosyl-hemoglobin formation in rodent and human venous erythrocytes reflects NO formation from the vasculature in vivo' *PLoS One* 13, 1–20 (2018)

116. Cortese-Krott M. M., Koning A., Kuhnle G. G. C., Nagy P., Bianco C. L., Pasch A., Wink D. A., Fukuto J. M., Jackson A. A., van Goor H., Olson K. R., & Feelisch M. 'The Reactive Species Interactome: Evolutionary Emergence, Biological Significance, and Opportunities for Redox Metabolomics and Personalized Medicine' *Antioxid. Redox Signal.* 27, 684–712 (2017)
117. Cortese-Krott M. M., Suschek C. V., Wetzel W., Kröncke K.-D., & Kolb-Bachofen V. 'Nitric oxide-mediated protection of endothelial cells from hydrogen peroxide is mediated by intracellular zinc and glutathione' *Am. J. Physiol. Physiol.* 296, C811–C820 (2009)
118. 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.* 89, 906–917 (2015)
119. Erkens R., Suvorava T., Sutton T. R., Fernandez B. O., Mikus-Lelinska M., Barbarino F., Flögel U., Kelm M., Feelisch M., & Cortese-Krott M. M. 'Nrf2 Deficiency Unmasks the Significance of Nitric Oxide Synthase Activity for Cardioprotection' *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2018, 1–15 (2018)
120. Ozaki M., Kawashima S., Yamashita T., Hirase T., Namiki M., Inoue N., Hirata K., Yasui H., Sakurai H., Yoshida Y., Masada M., & Yokoyama M. 'Overexpression of endothelial nitric oxide synthase accelerates atherosclerotic lesion formation in apoE-deficient mice' *J. Clin. Invest.* 110, 331–340 (2002)
121. Suhr F., Brenig J., Müller R., Behrens H., Bloch W., & Grau M. 'Moderate Exercise Promotes Human RBC-NOS Activity, NO Production and Deformability through Akt Kinase Pathway' *PLoS One* 7, 1–11 (2012)
122. Ulker P., Yaras N., Yalcin O., Celik-Ozenci C., Johnson P. C., Meiselman H. J., & Baskurt O. K. 'Shear stress activation of nitric oxide synthase and increased nitric oxide levels in human red blood cells' *Nitric Oxide - Biol. Chem.* 24, 184–191 (2011)
123. Kameneva M. V., Undar A., Antaki J. F., Watach M. J., Calhoon J. H., & Borovetz H. S. 'Decrease in red blood cell deformability caused by hypothermia, hemodilution, and mechanical stress: factors related to cardiopulmonary bypass' *ASAIO J* (1999)
124. Fischer U. M., Schindler R., Brixius K., Mehlhorn U., & Bloch W. 'Extracorporeal Circulation Activates Endothelial Nitric Oxide Synthase in Erythrocytes' *Ann. Thorac. Surg.* 84, 2000–2003 (2007)
125. Suhr F., Porten S., Hertrich T., Brixius K., Schmidt A., Platen P., & Bloch W. 'Intensive exercise induces changes of endothelial nitric oxide synthase pattern in human erythrocytes' *Nitric Oxide - Biol. Chem.* 20, 95–103 (2009)
126. Hosoya T., Maruyama A., Kang M. Il, Kawatani Y., Shibata T., Uchida K., Itoh K., & Yamamoto M. 'Differential responses of the Nrf2-Keap1 system to laminar and oscillatory shear stresses in endothelial cells' *J. Biol. Chem.* 280, 27244–27250 (2005)
127. Vezzoli A., Dellanoce C., Mrakic-Spota S., Montorsi M., Moretti S., Tonini A., Pratali L., & Accinni R. 'Oxidative Stress Assessment in Response to Ultraendurance Exercise: Thiols Redox Status and ROS Production according to Duration of a Competitive Race' *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2016, (2016)
128. Kuhn V., Diederich L., Keller T. C. S., 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.* 26, 718–742 (2017)

129. World Health Organization. 'Haemoglobin concentrations for the diagnosis of anaemia and assessment of severity' *Micronutr. Indic.* (2011) doi:2011
130. Larsen F. J., Ekblom B., Sahlin K., Lundberg J. O., & Weitzberg E. 'Effects of Dietary Nitrate on Blood Pressure in Healthy Volunteers' *N. Engl. J. Med.* 355, 2792–2793 (2006)
131. Jansson E. Å., Huang L., Malkey R., Govoni M., Nihlén C., Olsson A., Stensdotter M., Petersson J., Holm L., Weitzberg E., & Lundberg J. O. 'A mammalian functional nitrate reductase that regulates nitrite and nitric oxide homeostasis' *Nat. Chem. Biol.* 4, 411–417 (2008)
132. Cosby K., Partovi K. S., Crawford J. H., Patel R. P., Reiter C. D., Martyr S., Yang B. K., Waclawiw M. A., Zalos G., Xu X., Huang K. T., Shields H., Kim-Shapiro D. B., Schechter A. N., Cannon R. O., & Gladwin M. T. 'Nitrite reduction to nitric oxide by deoxyhemoglobin vasodilates the human circulation' *Nat. Med.* 9, 1498–1505 (2003)
133. Bryan N. S., Fernandez B. O., Bauer S. M., Garcia-Saura M. F., Milsom A. B., Rassaf T., Maloney R. E., Bharti A., Rodriguez J., & Feelisch M. 'Nitrite is a Signaling Molecule and Regulator of Gene Expression in Mammalian Tissues' *Nat. Chem. Biol.* 1, 290–297 (2005)
134. Webb A. J., Patel N., Loukogeorgakis S., Okorie M., Aboud Z., Misra S., Rashid R., Miall P., Deanfield J., Benjamin N., Hobbs A. J., & Ahluwalia A. 'Acute blood pressure lowering, vasoprotective and anti-platelet properties of dietary nitrate via bioconversion to nitrite' *Hypertension* 51, 784–790 (2010)
135. Webb A., Bond R., McLean P., Uppal R., Benjamin N., & Ahluwalia A. 'Reduction of nitrite to nitric oxide during ischemia protects against myocardial ischemia reperfusion damage' *PNAS* 2–7 (2003)
136. Anand I., McMurray J. J. V., Whitmore J., Warren M., Pham A., McCamish M. A., & Burton P. B. J. 'Anemia and its relationship to clinical outcome in heart failure' *Circulation* 110, 149–154 (2004)
137. Maggioni A. P., Opasich C., Anand I., Barlera S., Carbonieri E., Gonzini L., Tavazzi L., Latini R., & Cohn J. 'Anemia in patients with heart failure: Prevalence and prognostic role in a controlled trial and in clinical practice' *J. Card. Fail.* 11, 91–98 (2005)
138. Elrod J. W., Calvert J. W., Gundewar S., Bryan N. S., & Lefer D. J. 'Nitric oxide promotes distant organ protection: Evidence for an endocrine role of nitric oxide' *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 11430–11435 (2008)
139. Zorov D. B., Juhaszova M., & Sollott S. J. 'Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release' *Physiol. Rev.* 94, 909–950 (2014)
140. Altenhöfer S., Kleikers P. W. M., Radermacher K. A., Scheurer P., Hermans J. J. R., Schiffers P., Ho H., Wingler K., & Schmidt H. H. H. W. 'The NOX toolbox: Validating the role of NADPH oxidases in physiology and disease' *Cell. Mol. Life Sci.* 69, 2327–2343 (2012)
141. Anand I. S., Chandrashekar Y., Wander G. S., & Chawla L. S. 'Endothelium-derived relaxing factor is important in mediating the high output state in chronic severe anemia' *J. Am. Coll. Cardiol.* 25, 1402–1407 (1995)
142. Ni Z., Morcos S., & Vaziri N. D. 'Up-regulation of renal and vascular nitric oxide synthase in iron- deficiency anemia' *Kidney Int.* 52, 195–201 (1997)
143. Stoltzfus R. J., & Dreyfuss M. L. *Guidelines for the use of iron supplements to prevent and treat iron deficiency anemia. The International Nutritional Anemia Consultative Group (INACG/WHO/UNICEF), Washington, DC.* (1998)
144. Matos J. F., Dusse L. M. S., Borges K. B. G., de Castro R. L. V., Coura-Vital W., &

- Carvalho M. das G. 'A new index to discriminate between iron deficiency anemia and thalassemia trait' *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* 38, 214–219 (2016)
145. Rifkind J. M. 'Iron-Deficiency Anemia Enhances Red Blood Cell Oxidative Stress Enika' *Free Radic Res* 42, 824–829 (2008)
  146. Cabello C. M., Bair W. B., Lamore S. D., Ley S., Alexandra S., Azimian S., & Wondrak G. T. 'Heme Degradation and Oxidative Stress in Murine Models for Hemoglobinopathies: Thalassemia, Sickle Cell Disease and Hemoglobin C Disease' *Blood Cells Mol Dis* 46, 220–231 (2010)
  147. Rodvien R., Gillum A., & Weintraub L. R. 'Decreased Glutathione Peroxidase Activity Secondary to Severe Iron Deficiency: A Possible Mechanism Responsible for the Shortened Life Span of the Iron-deficient Red Cell' *Blood* 43, 281–289 (1974)
  148. Moshynska O., Tretiak N., Anoshina M., & Yagovdick M. 'Hemoglobin-induced lipid peroxidation in anemia' *Lik Sprav.* (2001)
  149. Yip R., Mohandas N., Clark R., Jain S., & Dallman P. 'Red Cell Membrane Stiffness in Iron Deficiency' *Blood* 62, 99–106 (1983)
  150. Kempe D. S., Lang P. A., Duranton C., Akel A., Lang K. S., Huber S. M., Wieder T., & Lang F. 'Enhanced programmed cell death of iron-deficient erythrocytes' *FASEB J.* 20, 368–370 (2005)
  151. Layrisse M., & Diez-Ewald M. 'Mechanisms of hemolysis in Iron Deficiency Anemia. Further Studies' *Blood* 32, 884–895 (2015)
  152. Ashmore T., Fernandez B. O., Evans C. E., Huang Y., Branco-Price C., Griffin J. L., Johnson R. S., Feelisch M., & Murray A. J. 'Suppression of erythropoiesis by dietary nitrate' *FASEB* (2015)
  153. Giffin, & Allen. 'The Control and complete remission of Polycythemia vera following the prolonged administration of Phenylhydrazin hydrochlorid' *Am. J. Med. Sci.* (1933)
  154. Rifkind R., & Danon D. 'Heinz Body Anemia An Ultrastructural Study I Heinz Body Formation' *Blood* 6, (1965)
  155. Itano H. A., Hirota K., & Vedvick T. S. 'Ligands and oxidants in ferrihemochrome formation and oxidative hemolysis' *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74, 2556–2560 (2006)
  156. Peisach, Blumberg, & Rachmilewitz. 'The Demonstration of Ferrihemochrome intermediates in Heinz Body formation following the reduction of oxyhemoglobin a by acetylphenylhydrazin' *Biochem. Biophys.* 393, 404–418 (1975)
  157. Morrow J. D., McMillan D. C., Powell C. L., Jollow D. J., & Bowman Z. S. 'Lipids versus Proteins as Major Targets of Pro-Oxidant, Direct-Acting Hemolytic Agents' *Toxicol. Sci.* 88, 274–283 (2005)
  158. Rifkind R., & Danon D. 'Heinz Body Anemia An Ultrastructural Study II Heinz Body Formation' *Blood* 4, (1965)
  159. Vannucchi A. M., Paoletti F., Linari S., Cellai C., Caporale R., Ferrini R., Sanchez M., Migliaccio G., Migliaccio A. R., & Ferrini P. R. 'Identification and characterization of a bipotent (erythroid and megakaryocytic) cell precursor from the spleen of phenylhydrazine-treated mice' *Hematology* 95, 2559–2568 (2009)
  160. Hill H. A. O., & Thornalley P. J. 'Free radical production during phenylhydrazine-induced hemolysis' *Can. J. Chem.* 60, 1528–1531 (2006)
  161. Misra H. P., & Fridovich I. 'The Oxidation of Phenylhydrazine: Superoxide and Mechanism' *Biochemistry* 15, 681–687 (1976)
  162. Radosinska J., & Vrbjar N. 'The role of red blood cell deformability and Na,K-ATPase function in selected risk factors of cardiovascular diseases in humans: focus on hypertension, diabetes mellitus and hypercholesterolemia.' *Physiol. Res.* 65 Suppl 1,

- S43-54 (2016)
163. Lee S., Park H., Kim K., Sohn Y., Jang S., & Park Y. 'Refractive index tomograms and dynamic membrane fluctuations of red blood cells from patients with diabetes mellitus' *Sci. Rep.* 7, 1–11 (2017)
  164. Lii C. K., & Hung C. N. 'Protein thiol modifications of human red blood cells treated with t-butyl hydroperoxide' *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1336, 147–156 (1997)
  165. Fischer T. M., Haest C. W. M., Stöhr M., Kamp D., & Deuticke B. 'Selective alteration of erythrocyte deformability by SH-reagents. Evidence for an involvement of spectrin in membrane shear elasticity' *BBA - Biomembr.* 510, 270–282 (1978)
  166. Gorbunov N. V., Yalowich J. C., Gaddam A., Thampatty P., Ritov V. B., Kisin E. R., Elsayed N. M., & Kagan V. E. 'Nitric oxide prevents oxidative damage produced by tert-butyl hydroperoxide in erythroleukemia cells via nitrosylation of heme and non-heme iron. Electron paramagnetic resonance evidence' *J. Biol. Chem.* 272, 12328–12341 (1997)
  167. Korbut R., & Gryglewski R. J. 'Nitric oxide from polymorphonuclear leukocytes modulates red blood cell deformability in vitro' *Eur. J. Pharmacol.* 234, 17–22 (1993)
  168. Roy B., Mo E., Vernon J., & Garthwaite J. 'Probing the presence of the ligand-binding haem in cellular nitric oxide receptors' *Br. J. Pharmacol.* 153, 1495–1504 (2008)
  169. Hoffmann L. S., Stasch J.-P., Schmidt P. M., Schmidt H. H. H. W., Keim Y., & Hoffmann C. 'Fluorescence Dequenching Makes Haem-Free Soluble Guanylate Cyclase Detectable in Living Cells' *PLoS One* 6, (2011)
  170. Fens M. H., Larkin S. K., Oronsky B., Sciacini J., Morris C. R., & Kuypers F. A. 'The capacity of red blood cells to reduce nitrite determines nitric oxide generation under hypoxic conditions' *PLoS One* 9, (2014)
  171. Jacob E., Drexel M., Schwerte T., & Pelster B. 'Influence of hypoxia and of hypoxemia on the development of cardiac activity in zebrafish larvae' *Am. J. Physiol. Integr. Comp. Physiol.* 283, R911–R917 (2015)
  172. Stocchi V., Magnani M., Cucchiari L., Fornaini G., & Rossi L. 'Effect of phenylhydrazine on red blood cell metabolism' *Cell Biochem. Funct.* 6, 175–182 (2005)
  173. Mihailescu M.-R., & Russu I. M. 'A signature of the T → R transition in human hemoglobin' *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 3773–3777 (2002)
  174. Jensen F. B., Kolind R. A. H., Jensen N. S., Montesanti G., & Wang T. 'Interspecific variation and plasticity in hemoglobin nitrite reductase activity and its correlation with oxygen affinity in vertebrates' *Comp. Biochem. Physiol. -Part A Mol. Integr. Physiol.* 206, 47–53 (2017)
  175. Gladwin M. T., Schechter A. N., Ognibene F. P., Coles W. A., Reiter C. D., Schenke W. H., Csako G., Waclawiw M. A., Panza J. A., & Cannon R. O. 'Divergent nitric oxide bioavailability in men and women with sickle cell disease' *Circulation* 107, 271–278 (2003)
  176. Eberhardt R. T., McMahon L., Duffy S. J., Steinberg M. H., Perrine S. P., Loscalzo J., Coffman J. D., & Vita J. A. 'Sickle cell anemia is associated with reduced nitric oxide bioactivity in peripheral conduit and resistance vessels' *Am. J. Hematol.* 74, 104–111 (2003)
  177. Nagy E. 'Red Cells, Hemoglobin, Heme, Iron and Atherogenesis' *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 377, 364–377 (2009)
  178. Dahboul F., Leroy P., Maguin Gate K., Boudier A., Gaucher C., Liminana P., Lartaud I., Pompella A., & Perrin-Sarrado C. 'Endothelial  $\gamma$ -Glutamyltransferase Contributes to

- the Vasorelaxant Effect of S-Nitrosoglutathione in Rat Aorta' *PLoS One* 7, (2012)
179. Edmunds N. J., Moncada S., & Marshall J. M. 'Does nitric oxide allow endothelial cells to sense hypoxia and mediate hypoxic vasodilatation? In vivo and vitro studies' *J. Physiol.* 546, 521–527 (2003)
  180. Saito H., Nishimura M., Shinano H., Makita H., Tsujino I., Shibuya E., Sato F., Miyamoto K., & Kawakami Y. 'Plasma concentration of adenosine during normoxia and moderate hypoxia in humans' *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 159, 1014–1018 (1999)
  181. Kramkowski K., Leszczynska A., Przyborowski K., Kaminski T., Rykaczewska U., Sitek B., Zakrzewska A., Proniewski B., Smolenski R. T., Chabielska E., Buczek W., & Chlopicki S. 'Role of xanthine oxidoreductase in the anti-thrombotic effects of nitrite in rats in vivo' *Platelets* 27, 245–253 (2016)
  182. Radi R., Rubbo H., Bush K., & Freeman B. A. 'Xanthine oxidase binding to glycosaminoglycans: Kinetics and superoxide dismutase interactions of immobilized xanthine oxidase-heparin complexes' *Arch. Biochem. Biophys.* 339, 125–135 (1997)
  183. Kelley E. E., Hock T., Khoo N. K. H., Richardson G. R., Johnson K. K., Powell P. C., Giles G. I., Agarwal A., Lancaster J. R., & Tarpey M. M. 'Moderate hypoxia induces xanthine oxidoreductase activity in arterial endothelial cells' *Free Radic. Biol. Med.* 40, 952–959 (2006)
  184. Hagen T., & Jones D. 'Transepithelial transport of glutathione in vascularly perfused small intestine of rat' *Am. J. Physiol. Liver Physiol.* 252, G607–G613 (2017)
  185. Lawrence L., & Jones D. 'Transport of glutathione by renal basal-lateral membrane vesicles' *Biochem. Biophys. Commun.* 112, (1983)
  186. Rose-Meyer R. B., & Hope W. 'Evidence that A2 purinoceptors are involved in endothelium-dependent relaxation of the rat thoracic aorta' *Br. J. Pharmacol.* 100, 576–580 (1990)
  187. Prentice D. J., & Hourani S. M. O. 'Characterisation of adenosine receptors mediating relaxation in hamster isolated aorta' *Naunyn. Schmiedebergs. Arch. Pharmacol.* 362, 427–434 (2000)
  188. Ray C. J., Abbas A. R., Coney A. M., & Marshall J. M. 'Interactions of adenosine, prostaglandins and nitric oxide in hypoxia-induced vasodilatation: In vivo and in vitro studies' *J. Physiol.* 544, 195–209 (2002)
  189. Londos C., Cooper D. M., & Wolff J. 'Subclasses of external adenosine receptors.' *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77, 2551–2554 (2006)
  190. Ray C. J., & Marshall J. M. 'The cellular mechanisms by which adenosine evokes release of nitric oxide from rat aortic endothelium' *J. Physiol.* 570, 85–96 (2006)
  191. Wen J., Grenz A., Zhang Y., Dai Y., Kellems, E. R., Michael R. Blackburn H. K. E., & Xia Y. 'A2B adenosine receptor contributes to penile erection via PI3K/AKT signaling cascade-mediated eNOS activation' *Faseb J.* 8, 2823–2830 (2011)
  192. Feoktistov I., Goldstein A. E., Ryzhov S., Zeng D., Belardinelli L., Voyno-Yasenetskaya T., & Biaggioni I. 'Differential expression of adenosine receptors in human endothelial cells: Role of A 2B receptors in angiogenic factor regulation' *Circ. Res.* 90, 531–538 (2002)
  193. Terada L. S., Piermattei D., Shibao G. N., McManaman J. L., & Wright R. M. 'Hypoxia regulates xanthine dehydrogenase activity at pre- and posttranslational levels' *Arch. Biochem. Biophys.* 348, 163–168 (1997)
  194. Wojciak-Stothard B., Tsang L. Y. F., & Haworth S. G. 'Rac and Rho play opposing roles in the regulation of hypoxia/reoxygenation-induced permeability changes in

- pulmonary artery endothelial cells' *Am. J. Physiol. Cell. Mol. Physiol.* 288, L749–L760 (2005)
195. Van Buul J. D., Geerts D., & Huveneers S. 'Rho GTPases and GEFs: Controlling switches in endothelial cell adhesion' *Cell Adhes. Migr.* 8, 108–124 (2014)
196. Ingoglia G., Sag C. M., Rex N., De Franceschi L., Vinchi F., Cimino J., Petrillo S., Wagner S., Kreitmeier K., Silengo L., Altruda F., Maier L. S., Hirsch E., Ghigo A., & Tolosano E. 'Data demonstrating the anti-oxidant role of hemopexin in the heart' *Data Br.* 13, 69–76 (2017)
197. Leipziger J., Isak A., Shainberg A., Issan Y., Golan O., & Robaye B. 'Extracellular nucleotide derivatives protect cardiomyocytes against hypoxic stress' *Biochem. Pharmacol.* 81, 1219–1227 (2011)
198. Latunde-Dada G. O., Vulpe C. D., Anderson G. J., Simpson R. J., & McKie A. T. 'Tissue-specific changes in iron metabolism genes in mice following phenylhydrazine-induced haemolysis' *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1690, 169–176 (2004)
199. Lauth W. W., Legare D. J., & d'Almeida M. S. 'Adenosine as putative regulator of hepatic arterial flow (the buffer response)' *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* 248, H331–H338 (2017)
200. Lauth W. W., & Greenway C. V. 'Conceptual review of the hepatic vascular bed' *Hepatology* 7, 952–963 (1987)
201. Porkert M., Sher S., Reddy U., Cheema F., Niessner C., Kolm P., Jones D. P., Hooper C., Taylor W. R., Harrison D., & Quyyumi A. A. 'Tetrahydrobiopterin: a novel antihypertensive therapy' *J. Hum. Hypertens.* 22, 401–407 (2008)
202. Ketonen J., & Mervaala E. 'Effects of dietary sodium on reactive oxygen species formation and endothelial dysfunction in low-density lipoprotein receptor-deficient mice on high-fat diet' *Heart Vessels* 23, 420–429 (2008)
203. Abdelghany T. M., Ismail R. S., Mansoor F. A., Zweier J. R., Lowe F., & Zweier J. L. 'Nitric Oxide Cigarette smoke constituents cause endothelial nitric oxide synthase dysfunction and uncoupling due to depletion of tetrahydrobiopterin with degradation of GTP cyclohydrolase' *Nitric Oxide* 76, 113–121 (2018)
204. Wever R. M. F., Dam T. Van, Rijn H. J. M. Van, Groot F. De, & Rabelink T. J. 'Tetrahydrobiopterin Regulates Superoxide and Nitric Oxide Generation by Recombinant Endothelial Nitric Oxide Synthase' 344, 340–344 (1997)
205. Moens A. L., & Kass D. A. 'Tetrahydrobiopterin and cardiovascular disease' *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 26, 2439–2444 (2006)
206. Bedja D., Cormaci G., Ketner E. A., Gabrielson K., Halushka M. K., Mitchell J. B., Biswal S., Channon K. M., Wolin M. S., Nicholas J., Paolocci N., Champion H. C., & David A. 'Reversal of cardiac hypertrophy and fibrosis from pressure overload by tetrahydrobiopterin: efficacy of recoupling nitric oxide synthase as a therapeutic strategy' *Circulation* 117, 2626–2636 (2008)
207. Marealle A. I., Siervo M., Wassel S., Bluck L., Prentice A. M., Minzi O., Sasi P., Kamuhabwa A., Soka D., Makani J., & Cox S. E. 'A pilot study of a non-invasive oral nitrate stable isotopic method suggests that arginine and citrulline supplementation increases whole-body NO production in Tanzanian children with sickle cell disease' *Nitric Oxide - Biol. Chem.* 74, 19–22 (2018)
208. Lundberg J. O., Weitzberg E., & Gladwin M. T. 'The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics' *Nat. Rev. Drug Discov.* 7, 156–167 (2008)
209. Münzel T., Daiber A., & Gori T. 'Nitrate therapy: New aspects concerning molecular action and tolerance' *Circulation* 123, 2132–2144 (2011)

210. Daiber A., & Münzel T. 'Organic Nitrate Therapy, Nitrate Tolerance, and Nitrate-Induced Endothelial Dysfunction: Emphasis on Redox Biology and Oxidative Stress' *Antioxid. Redox Signal.* 23, 899–942 (2015)
211. Lundberg J. O., & Gladwin M. T. 'Nitrate and nitrite in biology, nutrition and therapeutics' *Nat. Chem. Biol.* 5, 865–869 (2014)

## Danksagung

Mein erster Dank gilt meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Dr. Miriam Cortese-Krott, welche diese Dissertation drei Jahre lang betreut und ermöglicht hat. Sie half mir bei der Einarbeitung in die neue Materie und stand mir mit gutem Rat zur Seite. Für sein Engagement als Zweitgutachter möchte ich Herrn Prof. Dr. Holger Gohlke danken.

Für die Einarbeitung in die CLD und den ENO, sowie zwei schöne Wochen in Southampton möchte ich Herrn Prof. Dr. Feelisch und seinem Team danken.

Einen weiteren Dank möchte ich meinen Kolleginnen und Kollegen für ihre Unterstützung und Hilfsbereitschaft aussprechen. Diese Doktorarbeit ist u.a. durch gemeinsame Projekte mit Frau Hutzler, und Frau Dr. Tomasova entstanden.

Zuletzt möchte ich mich auch bei meinen Eltern Hans Jürgen und Gabriele, meiner Schwester Verena, sowie meiner Freundin Sema für die uneingeschränkte und vielseitige Unterstützung bedanken. Ihr seid die besten Coach Therapeuten die es gibt. Danke für den Antrieb den ihr mir gegeben habt.