

Aus der Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. Malte Kelm

**Einfluss einer NO-abhängigen Stimulation auf die NO-Bioverfügbarkeit im
Plasma und auf erythrozytäre Funktionen und Signalkaskaden *in vivo* und *in vitro***

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Claudio Parco

2020

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

gez.:

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

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

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Ulrich Germing

Zusammenfassung

Hintergrund: Die endotheliale Dysfunktion gilt als wichtiger Einflussfaktor kardiovaskulärer Erkrankungen. Diese wird mit einer herabgesetzten NO-Bioverfügbarkeit in Verbindung gebracht. Obwohl bereits nachgewiesen werden konnte, dass Erythrozyten eine NO-Synthase besitzen und zum NO-Pool im Gefäß beitragen, ist die Relevanz einer erythrozytären NO-Signalkaskade noch weitgehend unbekannt. Das Vasodilatator-stimulierte Phosphoprotein (VASP) als Teil der Kaskade ist bislang in Erythrozyten noch nicht nachgewiesen worden.

Ziele der Arbeit: Die Hypothese dieser Arbeit ist, dass in Erythrozyten Zielstrukturen des NO Signaltransduktionsweges existieren und eine Aktivierung dieser Signalkaskade NO abhängig möglich ist. Als Ziel der Arbeit dient zunächst der *in vitro* Nachweis von VASP in Erythrozyten sowie dessen Phosphorylierungsstatus an Ser239 nach Stimulation der Signalkaskade. Die weitere Charakterisierung erfolgt in einem *in vivo* Modell durch die sublinguale Gabe von Glyceroltrinitrat bei jungen gesunden Probanden. Abschließend erfolgt eine vergleichende Untersuchung der NO-Bioverfügbarkeit bei Patienten mit und ohne koronare Herzkrankheit.

Methoden: Der Nachweis des Vasodilatator-stimulierten Phosphoproteins sowie dessen cGMP abhängiger Phosphorylierung an Ser239 erfolgt mittels Western Blot. Für die Untersuchung junger gesunder Probanden wird nach sublingualer Gabe von Glyceroltrinitrat die Messung der GTN-vermittelten Vasodilatation mittels Ultraschall der A. brachialis durchgeführt. Weiter erfolgt die Bestimmung der Nitrit- und Nitratspiegel in Blutplasma sowie Erythrozyten mit Hochleistungsflüssigkeitschromatographie und Chemilumineszenzdetektion. Als Indikator der erythrozytären Funktion dient die Verformbarkeitsmessung durch Ektazytometrie. Abschließend werden die Nitrit- und Nitratspiegel bei Patienten mit und ohne koronare Herzkrankheit als Maß für die NO-Bioverfügbarkeit untersucht.

Ergebnisse: VASP lässt sich sowohl im *in vivo* als auch im *in vitro* Modell nachweisen. Durch die Aktivierung der Signalkaskade mit dem Stimulator der löslichen Guanylatcyclase BAY41-2272 und dem NO Donor DEANO kommt es zu einer vermehrten Phosphorylierung an Ser239. Eine *in vivo* Stimulation mit Glyceroltrinitrat bewirkt keine vermehrte Phosphorylierung des Vasodilatator-stimulierten Phosphoproteins, jedoch eine Erhöhung des NO-Metabolits Nitrit. Nitrit- und Nitratspiegel unterscheiden sich zwischen Patienten mit und ohne KHK nicht.

Zusammenfassung: VASP lässt sich in Erythrozyten nachweisen und wird cGMP-abhängig an Ser239 phosphoryliert. Die Frage nach der Relevanz der erythrozytären NO-Signalkaskade beim Krankheitsbild KHK ließ sich nicht eindeutig beurteilen, sodass hier weitere Forschung nötig ist.

Abstract

Background: Endothelial Dysfunction plays an important role in the pathogenesis of cardiovascular diseases. Endothelial dysfunction is linked to a reduced NO bioavailability. Although a NO-synthase has been discovered in red blood cells and it was shown that it contributes to the circulating NO-pool, the relevance of a NO-pathway in red blood cells is still unclear. The vasodilator-stimulating phosphoprotein (VASP) as a part of the NO-pathway has not been discovered in red blood cells yet.

Aims: The underlying hypothesis of this work is that red blood cells carry targets of the NO pathway and that a nitric oxide dependent activation of the signal transduction pathway is possible. To investigate the underlying hypothesis and characterize the nitric oxide pathway in red blood cells, detection of VASP and its phosphorylation status on Ser239 is done in an *in vitro* model. Further characterization of the pathway is done in an *in vivo* model using sublingual administration of glycerol trinitrate in young healthy adults. Investigation of the pathway under pathological conditions is done by measurement of nitrite and nitrate levels in patients with and without coronary artery disease.

Methods: Detection of VASP and its cGMP dependent phosphorylation at Ser239 is done with Western Blot. After sublingual administration of glycerol trinitrate in young healthy adults, GTN-dependent vasodilation is measured using ultrasound of the A. brachialis. Furthermore nitrite and nitrate levels in plasma and red blood cells are measured with high performance liquid chromatography and chemiluminescence detection. Red blood cell deformability as an indicator of red blood cell function is assessed with ektacytometry. Investigation of the pathway under pathological conditions is done by measurement of nitrite and nitrate levels in patients with and without coronary artery disease.

Results: Detection of VASP is possible in both *in vitro* and *in vivo* model. Activation of the NO pathway with the stimulator of the soluble guanylate cyclase BAY41-2272 and the NO donor DEANO leads to an increase of VASP phosphorylation at Ser239. Stimulation of the NO pathway through sublingual administration of glycerol trinitrate *in vivo* does not lead to an increased phosphorylation but to higher blood nitrite levels. Nitrite and nitrate levels do not differ in patients with and without coronary artery disease.

Conclusion: Here we first showed that red blood cells carry target proteins of the nitric oxide pathway and that the activation of this pathway is possible in a NO-dependent mechanism by the detection of VASP in red blood cells and its phosphorylation at Ser239 in a cGMP dependent manner. The relevance of these findings in the context of pathogenesis of cardiovascular diseases however still remains unclear and requires further investigation.

Abkürzungsverzeichnis

ACS	Acute Coronary Syndrome, Akutes Koronarsyndrom	IRAG	<i>IP3-Rezeptor assoziierten cGMP-Kinase Substrat</i>
ADP	<i>Adenosindiphosphat</i>	ISDN	<i>Isosorbiddinitrat</i>
ANF	<i>atrialer natriuretischer Faktor</i>	ISMN	<i>Isosorbidmononitrat</i>
ATP	<i>Adenosintriphosphat</i>		
		KHK	<i>Koronare Herzkrankheit</i>
BH4	<i>Tetrahydrobiopterin</i>		
BSA	<i>Bovines Serumalbumin</i>	LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i>
CAD	<i>Coronary Artery Disease, Koronare Herzkrankheit</i>	mALDH	<i>mitochondriale Aldehyddehydrogenase</i>
cAMP	<i>cyclisches Adenosinmonophosphat, Adenosin-3',5'-Monophosphat</i>	MLCP	<i>Myosin-Leichte-Ketten-Phosphatase</i>
cGMP	<i>cyclisches Guanosinmonophosphat, Guanosin-3',5'-Monophosphat</i>	MOPS	<i>3-(N-Morpholino)propansulfonsäure</i>
CLD	<i>Chemilumineszenzdetektion</i>		
CNB	<i>cyclic nucleotide binding domains</i>	NADPH	<i>Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat</i>
		nNOS	<i>neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase</i>
DEANO	<i>2-(N,N-Diethylamino)-Diazenolat-2-Oxide</i>	NO	<i>Stickstoffmonoxid, Stickstoffmonoxid</i>
EDRF	<i>Endothelium Derived Relaxing Factor</i>	PDE	<i>Phosphodiesterase</i>
eNOS	<i>endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase</i>	PETN	<i>Pentaerythritoltetranitrat</i>
		PKG	<i>cGMP-abhängige Proteinkinase</i>
FADH	<i>Flavin-Adenin-Dinukleotid</i>	PPi	<i>Pyrophosphat</i>
FMD	<i>Flow-mediated Vasodilation</i>	PVDF	<i>Polyvinylidenfluorid</i>
FMN	<i>Flavinmononucleotid</i>	PVP	<i>Polyvinylpyrrolidone</i>
GMP	<i>Guanosinmonophosphat</i>	RIPA	<i>Radioimmunoprecipitation Assay Buffer</i>
GTN	<i>Glyceroltrinitrat</i>	rIPC	<i>Remote Ischemic Preconditioning</i>
GTP	<i>Guanosintriphosphat</i>		
		SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>	Ser	<i>Serin</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>	sGC	<i>lösliche Guanylatcyclase</i>
iNOS	<i>induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase</i>	TBS-T	<i>Tris-Buffered Saline with Tween20</i>
IP ₃	<i>Inositol-1,4,5-trisphosphat</i>		
		VASP	<i>Vasodilatator-stimuliertes Phosphoprotein, Vasodilatator-stimuliertes Phosphoprotein</i>

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis.....	IV
Tabellenverzeichnis	VI
1 EINLEITUNG	1
1.1 Die Entdeckung von Stickstoffmonoxid als Mediator im kardiovaskulären System.....	1
1.2 NO Synthasen	1
1.3 Der eNOS-sGC-PKG-Signaltransduktionsweg	4
1.3.1 Die Stimulation der löslichen Guanylatcyclase (sGC)	5
1.3.2 Die Stimulation der cGMP-abhängigen Proteinkinase (Proteinkinase G, PKG).....	7
1.3.3 Phosphodiesterasen im eNOS-sGC-PKG-Signaltransduktionsweg	9
1.3.4 Die Rolle des eNOS-sGC-PKG-Signaltransduktionswegs und Stickstoffmonoxids für das kardiovaskuläre System.....	10
1.3.5 Medikamente mit direkter Wirkung auf den NO Signaltransduktionsweg	14
1.4 Die Rolle des eNOS-PKG-sGC-Signaltransduktionswegs in Erythrozyten (RBC)	18
1.4.1 Die erythrozytäre NO Produktion.....	18
1.4.2 Erythrozyten und Faktoren ihrer Verformbarkeit.....	19
1.5 Ziele der Arbeit.....	21
2 MATERIAL UND METHODEN.....	23
2.1 Material.....	23
2.2 Untersuchung NO Signalkaskade bei Stimulation von Erythrozyten <i>in vitro</i>	25
2.2.1 Probandenauswahl und Einwilligung	25
2.2.2 Aufreinigung des Erythrozyten- <i>Pellets</i>	25
2.2.3 Stimulation der Erythrozyten.....	27
2.2.4 Proteinbestimmung des Lysats	29
2.2.5 SDS-PAGE und Western Blot der Lysate	30
2.2.5.1 Vorbereitung der Proben	30
2.2.5.2 SDS-PAGE.....	30
2.2.5.3 Western Blot.....	31
2.2.5.4 Proteindetektion	31
2.3 Studie zur Untersuchung des Einflusses von Glyceroltrinitrat auf die Nitrit- / Nitrat Spiegel im Plasma und in Erythrozyten – „GTN Studie“	33
2.3.1 Probandenauswahl und Einwilligung	33
2.3.2 Studienablauf.....	33
2.3.3 Messung des Diameters der A. brachialis („Nitro-vermittelte Vasodilatation“)	34
2.3.4 Blutentnahme und Verarbeitung im Labor.....	35
2.3.5 Messung der erythrozytären Verformbarkeit mittels Laser-assisted Optical Rotational Cell Analyzer (LORCA).....	36
2.3.6 Messung der Nitrit- und Nitratkonzentration im Blutplasma	37

2.4	Untersuchung der NO Bioverfügbarkeit bei Patienten mit kardiovaskulärer Erkrankung im Rahmen der Studie „Regulation und Signalling der RBC-eNOS in Patienten mit stabiler und instabiler koronarer Herzerkrankung“.....	38
2.4.1	Probandenauswahl und Einwilligung	38
2.4.2	Studiendesign	40
2.4.3	Herstellung einer Konservierungslösung für die Messung von Nitrit in Erythrozyten	41
2.4.4	Probenentnahme	41
2.4.5	Probenaufbereitung für die Messung der Nitritspiegel im Plasma und in Erythrozyten	42
2.4.6	Messung der Nitritspiegel im Blutplasma und in Erythrozyten mittels Chemilumineszenzdetektion (CLD).....	43
2.4.6.1	Vorbereitung der Reaktionslösungen.....	43
2.4.6.2	Erstellung der Standardreihe	44
2.4.6.3	Messung der Proben.....	44
2.5	Statistische Auswertung.....	45
3	ERGEBNISSE	46
3.1	Untersuchung des NO-Signalweges <i>in vitro</i>	46
3.1.1	Phosphorylierungsstatus des Vasodilatator-stimulierten Phosphoproteins (VASP)	46
3.2	Untersuchung des NO-Signalweges <i>in vivo</i>	47
3.2.1	Baseline Charakteristika	47
3.2.2	Hämodynamik	48
3.2.3	GTN vermittelte Vasodilatation	49
3.2.4	NOx im Plasma.....	50
3.2.5	Untersuchung der erythrozytären Verformbarkeit mittels Laser-assisted Optical Rotational Cell Analyzer (LORCA).....	52
3.2.6	Phosphorylierungsstatus des Vasodilatator-stimulierten Phosphoproteins (VASP)	53
3.3	Vergleich der NO Bioverfügbarkeit bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit	54
3.3.1	Probandencharakteristika.....	54
3.3.2	Ermittlung der Nitritspiegel im Blutplasma bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung	55
3.3.3	Ermittlung der Nitritspiegel in Erythrozyten bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung	56
4	DISKUSSION.....	58
4.1	Zusammenfassung der Ergebnisse und Wiederholung der Hypothese	58
4.1.1	<i>In vitro</i> Stimulation humaner Erythrozyten.....	58
4.1.2	<i>In vivo</i> Stimulation junger gesunder Probanden.....	58
4.1.3	Vergleichende Untersuchungen zur NO Bioverfügbarkeit bei Patienten mit KHK und gesunden Probanden	59
4.2	<i>In vitro</i> Stimulation des Signaltransduktionswegs.....	60
4.2.1	Pharmakologische Modulation des NO-Signaltransduktionsweges.....	60

4.2.2	Effekt der <i>in vitro</i> Stimulation auf den Phosphorylierungsstatus von VASP an Ser239	61
4.3	GTN-vermittelte <i>in vivo</i> Stimulation des Signaltransduktionswegs	64
4.3.1	Hämodynamik und GTN-vermittelte Vasodilatation	64
4.3.2	Einfluss von GTN auf die Nitrit- und Nitratplasmaspiegel	66
4.3.2.1	Metabolismus von Stickstoffmonoxid	66
4.3.2.2	Einfluss von GTN auf die Nitrit- und Nitratplasmaspiegel	67
4.3.3	Einfluss von GTN auf die Verformbarkeit der Erythrozyten	69
4.3.4	Einfluss von GTN auf den Phosphorylierungsstatus des Vasodilatator-stimulierten Phosphoproteins (VASP)	70
4.3.4.1	Das Vasodilatator-stimulierte Phosphoprotein	70
4.3.4.2	Phosphorylierungsstatus des Vasodilatator-stimulierten Phosphoproteins nach sublingualer GTN Applikation	71
4.4	Vergleichende Untersuchungen der Nitritspiegel bei gesunden Probanden mit KHK Patienten	73
5	AUSBLICK	76
	Literaturverzeichnis	77
	Danksagung	90

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Darstellung der Stickstoffmonoxidbildung durch NO Synthasen	3
Abb. 2:	Vereinfachte Darstellung der wesentlichen Zwischenschritte des eNOS-sGC-PKG-Signaltransduktionsweges	5
Abb. 3:	Graphische Zusammenfassung der Fragestellung	22
Abb. 4:	Die Probenverarbeitung im Überblick	27
Abb. 5:	Protokoll der Stimulation <i>in vitro</i>	29
Abb. 6:	Der Studienablauf im Überblick	34
Abb. 7:	Die verschiedenen Verarbeitungsschritte des Studienprotokolls im Überblick.....	36
Abb. 8:	Rekrutierungsdiagramm der Studie „Regulation und Signalling der RBC-eNOS in Patienten mit stabiler und instabiler koronarer Herzerkrankung“	40
Abb. 9:	Die Probenaufbereitung nach Blutentnahme	42
Abb. 10:	VASP lässt sich im <i>in vitro</i> Versuch in Erythrozyten nachweisen.....	46
Abb. 11:	<i>In vitro</i> Stimulation von Erythrozyten mittels DEANO und BAY 41-2272 führt zu einer vermehrten Phosphorylierung an Ser239	47
Abb. 12:	Sublingual verabreichtes GTN führt zu einem signifikanten Abfall des systolischen Blutdrucks	49
Abb. 13:	Sublingual verabreichtes GTN führt zu einem signifikanten Abfall des diastolischen Blutdrucks	49
Abb. 14:	Sublingual verabreichtes GTN führt nicht zu einer Veränderung der Herzfrequenz.....	49
Abb. 15:	Sublingual verabreichtes GTN führt zu einer messbaren Vasodilatation der A. brachialis	50
Abb. 16:	Sublingual verabreichtes GTN führt zu einer messbaren Erhöhung des Nitritspiegels im Blutplasma.....	51
Abb. 17:	Sublingual verabreichtes GTN führt nicht zu einer Erhöhung der Nitratkonzentration im Blutplasma.....	51
Abb. 18:	Die sublinguale Gabe von GTN führt nicht zu einer Änderung der Verformbarkeit von Erythrozyten.....	52
Abb. 19:	Auch die Betrachtung der erythrozytären Verformbarkeit relativ zum Ausgangswert ergibt keine signifikanten Unterschiede.....	53

Abb. 20:	Das Protein VASP ist im <i>in vivo</i> Versuch nach entsprechender Aufreinigung in Erythrozyten nachweisbar	53
Abb. 21:	GTN führt <i>in vivo</i> nicht zu einer vermehrten Phosphorylierung an Ser239	54
Abb. 22:	Nitritspiegel im Blutplasma unterscheiden sich zwischen den Kollektiven „KHK“ und „gesund“ nicht.....	56
Abb. 23:	Nitritspiegel in Erythrozyten unterscheiden sich zwischen den Kollektiven „KHK“ und „gesund“ nicht.....	57
Abb. 24:	Graphische Zusammenfassung der Ergebnisse.....	60
Abb. 25:	Der intraerythrozytäre NO Signaltransduktionsweg.....	64
Abb. 26:	Der Metabolismus von NO im Plasma und in Erythrozyten	67

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Charakteristika der verschiedenen PKG Familien und Isoformen	8
Tabelle 2: Geräte	23
Tabelle 3: Verbrauchsmaterial	24
Tabelle 4: Chemikalien	25
Tabelle 5: Antikörper	25
Tabelle 6: Arterieller Blutdruck, Herzfrequenz und Durchmesser der A. brachialis zum Ausgangszeitpunkt	48
Tabelle 7: Probandencharakteristika	55

1 Einleitung

1.1 Die Entdeckung von Stickstoffmonoxid als Mediator im kardiovaskulären System

Die ursprüngliche Entdeckung, dass das Endothel einen Botenstoff produziert, welcher zu einer Vasodilatation führt, geht auf eine Entdeckung von Furchgott im Jahr 1980 zurück (Furchgott and Zawadzki 1980). In entsprechender Arbeit konnte gezeigt werden, dass für eine Gefäßantwort im Sinne einer Vasorelaxation durch muskarinerge Agonisten das Endothel verantwortlich ist. Die chemische Identifikation des verantwortlichen Mediators gelang zum damaligen Zeitpunkt noch nicht, sodass der Stoff in verschiedenen Publikationen als „Endothelium Derived Relaxing Factor“ (EDRF) bezeichnet wurde. Ende der 1980er Jahre wurde der sogenannte EDRF dann erstmals von Furchgott und Ignarro jeweils unabhängig voneinander als NO identifiziert (Ignarro, Buga et al. 1987). In einer entsprechenden Publikation von Ignarro konnte nachgewiesen werden, dass EDRF und NO gleiche chemische Eigenschaften aufweisen und die NO Freisetzung auf die gleiche Weise reguliert wird wie die Freisetzung des EDRF (Ignarro, Buga et al. 1987).

Die wissenschaftliche Relevanz der Identifikation von Stickstoffmonoxid als Mediator in Säugetierzellen zeigt sich auch dadurch, dass Murad, Furchgott und Ignarro im Jahr 1998 für ihre Forschung zu diesem Thema mit dem Nobelpreis für Medizin und Physiologie ausgezeichnet wurden.

Fast drei Jahrzehnte nach der erstmaligen Beschreibung von NO als EDRF wurden viele Details über die Regulation und den Ablauf der NO Synthese in den verschiedenen Geweben entdeckt, die wesentlichen Grundzüge sollen in diesem Kapitel beschrieben werden, da sie für das Verständnis der endogenen NO Synthese von großer Bedeutung sind.

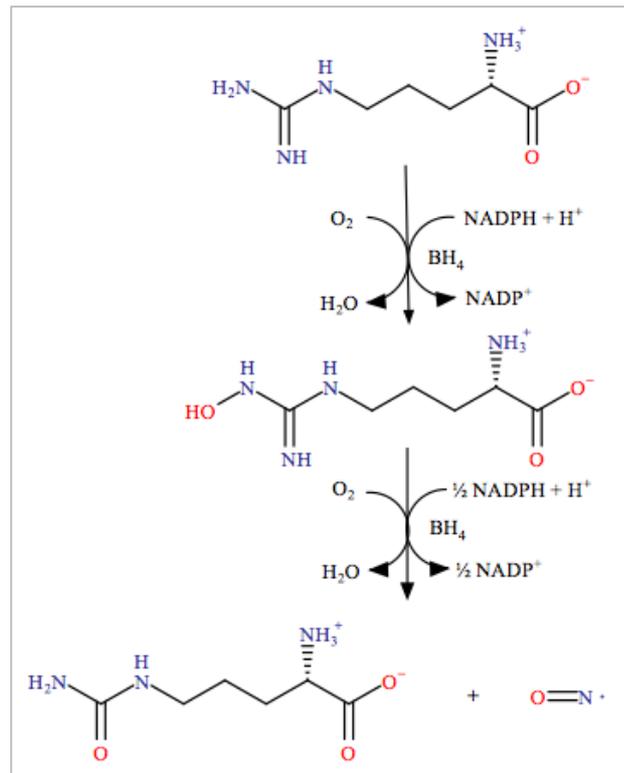
1.2 NO Synthesen

Für die Reaktion, bei welcher aus der Aminosäure L-Arginin die Produkte Stickstoffmonoxid und L-Citrullin gebildet werden, sind im menschlichen Körper verschiedene NO Synthesen verantwortlich. Man unterscheidet im Wesentlichen drei

Isoformen, welche in verschiedenen Geweben exprimiert werden und unterschiedliche Eigenschaften aufweisen. Während die Isoformen I (nNOS) und III (eNOS) konstitutiv exprimiert werden, ist die induzierbare NO Synthase Typ II (iNOS) vor allem in Makrophagen zu finden (Übersichtsarbeiten hierzu bei (Knowles and Moncada 1994, Alderton, Cooper et al. 2001)). Aufgrund der Relevanz für diese Arbeit sollen hier insbesondere die konstitutiven Synthesen vorgestellt werden.

Die endotheliale NO Synthase besteht, wie auch die anderen Isoformen, aus zwei Proteindomänen mit einer unterschiedlichen Aktivität. Die Oxygenase-Domäne findet sich am N-terminalen Ende mit Bindungsstellen für Häm, Tetrahydrobiopterin und L-Arginin, am C-terminalen Ende liegt die Oxygenase-Domäne mit Bindungsstellen für NADPH, FADH und FMN (Alderton, Cooper et al. 2001). Beide Domänen sind über ein Calmodulin-Bindungsmotiv miteinander verbunden (Alderton, Cooper et al. 2001), in ihrer aktiven Form liegen die NO Synthasen als Homodimer vor. Die Dimerisierung ist notwendig, damit Tetrahydrobiopterin und das Substrat L-Arginin gebunden werden können. Unter bestimmten pathologischen Bedingungen, bei denen ein Mangel an Tetrahydrobiopterin vorliegt, kann es dazu kommen, dass die einzelnen Monomere im Zuge einer sogenannten NOS Entkopplung mit ihrer Oxygenase-Domäne O_2^- produzieren. Ein Vorgang, der mit der Entstehung beziehungsweise dem Fortschreiten arterieller Hypertonie und Atherosklerose in Verbindung gebracht wird (Ozaki, Kawashima et al. 2002).

Durch die NO Synthasen wird Stickstoffmonoxid in zwei Schritten aus der Aminosäure L-Arginin freigesetzt. Für den ersten Schritt werden die Kofaktoren NADPH und Tetrahydrobiopterin sowie molekularer Sauerstoff benötigt. Das Produkt dieser Reaktion ist N-Hydroxyarginin, welches im nächsten Schritt ebenfalls mit NADPH und molekularem Sauerstoff zu L-Citrullin und NO reagiert. Für die Übertragung der Elektronen wird das Hämeisen benötigt (Alderton, Cooper et al. 2001). Abbildung eins veranschaulicht vereinfacht die wesentlichen Reaktionsschritte der Stickstoffmonoxidbildung durch NO Synthasen.



BH₄: Tetrahydrobiopterin, NADP⁺/NADPH: Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat

Abb. 1: Darstellung der Stickstoffmonoxidbildung durch NO Synthasen

Unter Ruhebedingungen lässt sich eine basale NO Produktion durch die endotheliale NO Synthase beobachten (Kelm, Feelisch et al. 1988), deren Relevanz sich unter anderem dadurch zeigt, dass eine Inhibition der eNOS einen Anstieg des systemischen Blutdrucks bewirkt (Rees, Palmer et al. 1989).

Bis heute ist eine Vielzahl von Stimuli bekannt, die zu einer Steigerung oder Senkung der endothelialen NO Produktion führen. Bereits früh wurde bekannt, dass das Endothel den damals noch nicht identifizierten EDRF als Antwort auf Acetylcholin freisetzt (Furchgott and Zawadzki 1980).

Prinzipiell kann die Regulation der eNOS auf zwei Arten erfolgen, zum einen Calcium-abhängig (Marletta 1994) und zum anderen Calcium- bzw. Calmodulin-unabhängig (Igarashi, Thatte et al. 1999).

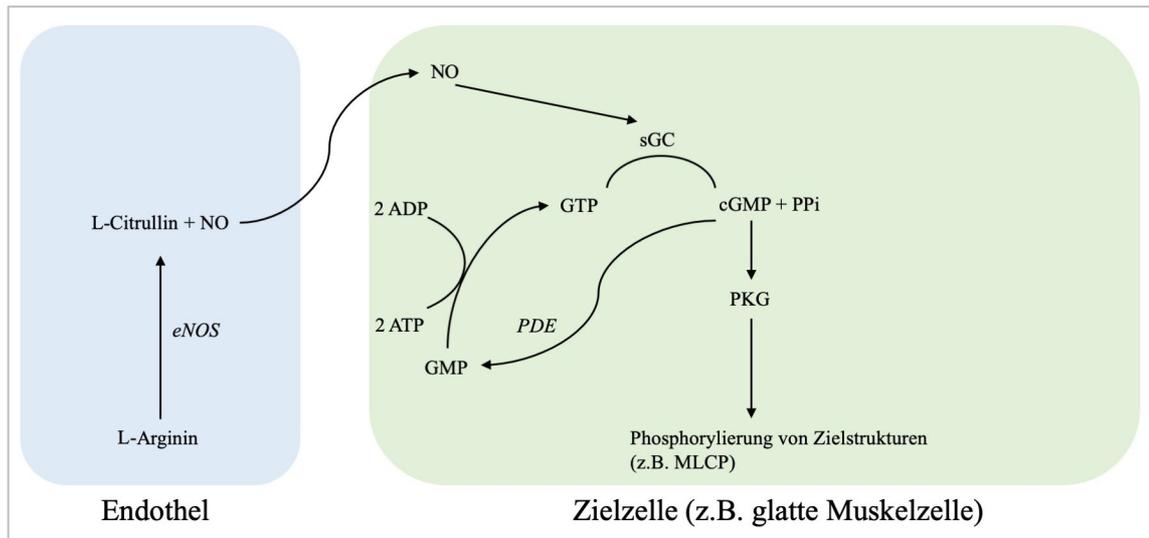
Kommt es zu einem Einstrom von Calcium in die Zelle, bindet dieses Calcium an Calmodulin und der Calcium-Calmodulin-Komplex bindet und aktiviert die endotheliale NO Synthase (Bauer and Sotnikova 2010).

Wichtig für die Regulation des Gefäßsystems ist die schubspannungsabhängige NO Freisetzung (Rubanyi, Romero et al. 1986), durch die der Gefäßtonus schnell auf eine erhöhte Schubspannung angepasst werden kann. Heute sind mehrere Faktoren bekannt, die an der Regulation der schubspannungsabhängigen eNOS Aktivierung beteiligt sind. Der Calciumeinstrom in die Zelle ist einer dieser Faktoren (Sriram, Laughlin et al. 2016). Die endotheliale NO Synthase besitzt zudem zahlreiche Phosphorylierungsstellen, die der Regulation des Enzyms dienen. So kann beispielsweise die CaM-abhängige Kinase II die eNOS an Ser1179 phosphorylieren (Kolluru, Siamwala et al. 2010). Daneben sind noch zahlreiche weitere Kinasen bekannt, welche die endotheliale NO Synthase phosphorylieren können.

1.3 Der eNOS-sGC-PKG-Signaltransduktionsweg

Wie zuvor (siehe 1.1) beschrieben, konnte bereits vor der Identifikation von Stickstoffmonoxid als Mediator gezeigt werden, dass das Endothel wesentlich verantwortlich für die Acetylcholin-abhängige Vasodilatation ist, indem es einen Stoff produziert, der auf die glatte Gefäßmuskulatur wirkt (Furchgott and Zawadzki 1980). Im Laufe der Zeit konnte der Signalweg, welcher sich hinter der Endothel-abhängigen Vasodilatation verbirgt, entschlüsselt werden. In diesem Abschnitt sollen zunächst die Schritte erläutert werden, welche für die Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur verantwortlich sind.

Die endotheliale NO Synthase produziert das Molekül Stickstoffmonoxid, wie bereits beschrieben, in zwei Schritten aus der Aminosäure L-Arginin. Das freigesetzte NO kann aufgrund seiner lipophilen Eigenschaften relativ gut die Zellmembran passieren und so in die umliegenden Gewebe diffundieren. NO diffundiert sowohl luminal als auch abluminal aus der Endothelzelle in das Blut beziehungsweise in die Gefäßmuskulaturzellen. Abbildung zwei gibt einen vereinfachten Überblick über die wesentlichen Zwischenschritte des Signaltransduktionsweges, welche in den folgenden Abschnitten ausführlicher beschrieben werden.



NO: Stickstoffmonoxid, eNOS: endotheliale NO Synthase, sGC: lösliche Guanylatcyclase, GTP: Guanosintriphosphat, cGMP: Guanosin-3',5'-Monophosphat, PPi: Pyrophosphat, PKG: cGMP-abhängige Proteinkinase, MLCP: Myosin-Leichte-Ketten-Phosphatase, PDE: Phosphodiesterase, GMP: Guanosinmonophosphat, ATP: Adenosintriphosphat, ADP: Adenosindiphosphat

Abb. 2: Vereinfachte Darstellung der wesentlichen Zwischenschritte des eNOS-sGC-PKG-Signaltransduktionsweges

1.3.1 Die Stimulation der löslichen Guanylatcyclase (sGC)

Das NO, welches die Zellmembran der Gefäßmuskelzelle passiert, führt letztlich über eine Stimulation der löslichen Guanylatzyklase (sGC) zu einer Erhöhung des Guanosin-3',5'-Monophosphats (cGMP) (Arnold, Mittal et al. 1977, Diamond and Chu 1983, Rapoport, Draznin et al. 1983, Denninger and Marletta 1999), welches wiederum mit einigen weiteren Zielstrukturen reagieren kann. Für die Bildung des cyclischen Guanosinmonophosphats (cGMP) benötigen Guanylatcyclasen Guanosintriphosphat, das unter Pyrophosphatabspaltung zum Produkt konvertiert wird.

Neben den löslichen Guanylatcyclasen, welche als „NO-Rezeptor“ gesehen werden, da sie die einzig bekannte exklusive Zielstruktur von Stickstoffmonoxid sind, gibt es im menschlichen Körper membranständige oder auch partikuläre Guanylatcyclasen, die zum Beispiel durch den atrialen natriuretischen Faktor (ANF) aktiviert werden können (Winquist, Faison et al. 1984). Diese zweite Entität der Guanylatzyklasen sei hier aber nur am Rande erwähnt, da sie für das Verständnis des eNOS-sGC-PKG-Signaltransduktionswegs keine wesentliche Rolle spielen, dennoch aber für der Regulation des systemischen Blutdrucks essenziell sind.

Die Funktionen der löslichen Guanylatcyclase sind allerdings nicht nur auf die Änderung und Anpassung des Gefäßtonus limitiert. So konnte gezeigt werden, dass die

Thrombozytenaggregation (Furlong, Henderson et al. 1987, Bhardwaj, Page et al. 1988) und –aktivierung wesentlich durch eine NO-abhängige cGMP Erhöhung beeinflusst werden kann. Ebenso spielt die NO-abhängige cGMP Erhöhung auch außerhalb des kardiovaskulären Systems eine wichtige Rolle, beispielsweise bei der Langzeitpotenzierung und –depression im zentralen Nervensystem (Bohme, Bon et al. 1991, Haley, Wilcox et al. 1992, Bon and Garthwaite 2003).

Bei der sGC handelt es sich um ein heterodimeres Enzym, bestehend aus einer α - und einer β_1 -Untereinheiten (Denninger and Marletta 1999, Poulos 2006). Die meisten Untersuchungen zur Regulation der sGC wurden an der $\alpha_1\beta_1$ sGC durchgeführt. Die $\alpha_2\beta_1$ und die $\alpha_1\beta_1$ besitzen ähnliche Eigenschaften, unterscheiden sich jedoch in ihrer Lokalisation, da die α_2 Untereinheit eine Membranassoziation ermöglicht (Russwurm, Wittau et al. 2001). Für die katalytische Aktivität der sGC sind beide Untereinheiten nötig (Harteneck, Koesling et al. 1990, Poulos 2006), wohingegen die N-terminale Region der β -Untereinheit über das Histidin-105 mit dem Häm assoziiert ist, dessen Bindung mit NO zu einer Aktivierung der Guanylatzyklase führt (Ignarro, Degnan et al. 1982, Ohlstein, Wood et al. 1982).

In der Vergangenheit gaben verschiedene Untersuchungen Hinweise darauf, dass die Aktivierung der sGC durch zwei NO-abhängige Schritte erfolgt, zudem sind neben NO für eine vollständige Aktivierung der sGC auch die Produkte Magnesium, Pyrophosphat und cGMP nötig, da es ohne diese zur Bildung eines nicht-aktivierten Enzymkomplexes kommt (Russwurm and Koesling 2004).

Im ersten Schritt der Aktivierung bindet NO an die distale Seite des Hämeisens, sodass ein hexakoordinierter Komplex entsteht und die proximale Bindung des Hämeisens an Histidin gelockert wird. Im zweiten Schritt kommt es durch ein weiteres NO vermittelt zur Lösung der Histidin-Hämeisen-Bindung. Dadurch entsteht ein pentakoordinierter Dinitrosyl-Häm-Komplex, aus welchem wiederum ein NO abgespalten wird (Russwurm and Koesling 2004). Dieser zweite Schritt führt zur eigentlichen Aktivierung der sGC durch eine Konformationsänderung des Enzyms (Russwurm and Koesling 2004). Zusammenfassend ist die Aktivität der sGC also nicht nur vom eigentlichen Aktivator NO, sondern auch von der Anwesenheit der gebildeten Produkte abhängig und erfolgt in zwei Schritten.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Aktivität der sGC nicht nur durch NO, sondern auch durch den Eisen-freien Hämvorläufer Protoporphyrin IX (Ignarro, Wood et al. 1982) NO-unabhängig gesteigert werden kann sowie durch einige synthetische Stoffe wie beispielsweise YC-1 (Ko, Wu et al. 1994). YC-1 stellt den ersten bekannten NO-unabhängigen Stimulator der sGC dar und ist verwandt mit den später synthetisierten Stoffen BAY 41-2272 (Becker, Alonso-Alija et al. 2001) und BAY 41-8534 (Stasch, Alonso-Alija et al. 2002, Stasch, Dembowsky et al. 2002).

1.3.2 Die Stimulation der cGMP-abhängigen Proteinkinase (Proteinkinase G, PKG)

Eine der Zielstrukturen des durch die lösliche Guanylatcyclase gebildeten cGMP ist die cGMP-abhängige Proteinkinase (auch Proteinkinase G bzw. PKG oder cGK). Es handelt sich dabei um Serin-/Threoninkinasen. Man unterscheidet heute zwei unterschiedliche Familien der cGMP-abhängigen Proteinkinasen: PKG-I und PKG-II, welche in verschiedenen Geweben exprimiert werden und durch unterschiedliche Gene kodiert werden (*prkg1* und *prkg2*) (Francis, Busch et al. 2010).

Aufgrund der Relevanz für das kardiovaskuläre System soll hier vor allem auf die Familie der Typ I Proteinkinasen eingegangen werden.

Bei den cGMP-abhängigen Proteinkinasen lassen sich drei Domänen abgrenzen: Die N-terminale Domäne, die regulatorische Domäne und die katalytische Domäne. Es handelt sich strukturell um Homodimere, deren Dimerisierung über ein Leucin-Zipper-Motiv in der N-terminalen Domäne vermittelt ist (Hofmann, Ammendola et al. 2000). Die Dimerisierung ist jedoch keine Voraussetzung für die katalytische Aktivität des Enzyms (Pfeifer, Ruth et al. 1999). Während die regulatorische Domäne die Bindungsstellen für zwei cGMP Moleküle beinhaltet, eine Bindungsstelle mit hoher Affinität für cGMP (CNB-A) und eine mit niedriger Affinität (CNB-B) (Kim, Lorenz et al. 2016), vermittelt die katalytische Domäne Bindung mit MgATP und Peptiden (Hofmann, Ammendola et al. 2000).

Bei der PKG-I werden wiederum zwei verschiedene Isoformen unterschieden, die durch alternatives Spleißen entstehen und als PKG-I α und PKG-I β bezeichnet werden. Beide Isoformen unterscheiden sich in ca. 100 N-terminalen Aminosäuren. Sie werden in den verschiedenen Zellen koexprimiert, jedoch in einem unterschiedlichen Verhältnis. Nebeneinander kommen beide Isoformen vor allem in den Zellen der glatten Muskulatur

vor (Geiselhoringer, Gaisa et al. 2004). Die PKG-I α ist in einem höheren Maß zum Beispiel in der Lunge vorhanden, wohingegen die zweite Isoform (PKG-I β) vor allem beispielsweise in Thrombozyten enthalten ist (Geiselhoringer, Gaisa et al. 2004). Tabelle eins stellt die wesentlichen Lokalisationen der PKG Familien und Isoformen gegenüber.

	PKG-Iα	PKG-Iβ	PKG-II
Gewebe	Glatte Muskulatur, Lunge, Herz, Cerebellum, Gliazellen	Glatte Muskulatur, Thrombozyten, Neurone des Hippocampus, Neurone des Bulbus olfactorius	Nebennierenrinde, Niere, Darmmukosa, Chondrozyten, Lunge
Subzelluläre Lokalisation	Zytosol	Zytosol	membranassoziiert
Größe		ca. 75 kDa / Monomer (Feil, Lohmann et al. 2003)	ca. 80 kDa / Monomer (Feil, Lohmann et al. 2003)

Tabelle 1: Charakteristika der verschiedenen PKG Familien und Isoformen

Übersichtsarbeit hierzu siehe bei (Hofmann 2005)

Neben dem unterschiedlichen Vorkommen in verschiedenen Geweben unterscheiden sich die PKG-I Isoformen in ihrer Affinität für cGMP, welche bei der PKG-I β ca. 10-fach höher ist (Francis, Busch et al. 2010).

Die PKG-I kann in zwei funktionellen Formen vorliegen: Bei der inaktivierten Form bildet eine autoinhibitorische Sequenz der regulatorischen Domäne einen Komplex mit der katalytischen Domäne. Im Zuge der Aktivierung kommt es durch eine cGMP Bindung und Autophosphorylierung der autoinhibitorischen Sequenz zu einer Auflösung des Komplexes und die katalytische Domäne wird freigegeben (Wall, Francis et al. 2003, Kim, Lorenz et al. 2016).

Zahlreiche Untersuchungen charakterisierten die Zielstrukturen der PKG. So werden durch die PKG-I Strukturen phosphoryliert, welche eine Rolle bei der Regulation der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration spielen, zum Beispiel Ca²⁺-abhängige Kaliumkanäle (Fukao, Mason et al. 1999), den IP₃-Rezeptor (Komalavilas and Lincoln 1994) und L-Typ Ca²⁺-Kanäle (Yang, Liu et al. 2007). Eine weitere bekannte Zielstruktur der PKG-I ist das Vasodilatator-stimulierte Phosphoprotein (VASP), welches in großen Mengen in Thrombozyten vorkommt und dort eine wichtige Rolle bei der Thrombozytenaktivierung

spielt (Butt, Abel et al. 1994). Bei der Regulation des Tonus der glatten Gefäßmuskulatur nimmt die PKG-I insofern eine wichtige Funktion ein, als dass sie die Myosin-leichte-Ketten-Phosphatase (MLCP) phosphoryliert (Nakamura, Ichikawa et al. 1999) und so zu einer Aktivitätssteigerung dieser und somit letztendlich zu einer Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur führt. Ebenso fungiert das Protein IRAG als Substrat, welches nach der Phosphorylierung durch die PKG-I über eine Assoziation mit dem IP₃-Rezeptor konsekutiv einen verminderten Ca²⁺-Ausstrom aus dem sarkoplasmatischen Retikulum bewirkt (Schlossmann, Ammendola et al. 2000, Ammendola, Geiselhoring et al. 2001). Neben den genannten Substraten phosphoryliert und aktiviert die PKG-I auch die Phosphodiesterase 5 (PDE5) und ist so auch an einem negativen Feedbackmechanismus beteiligt (Thomas, Francis et al. 1990).

1.3.3 Phosphodiesterasen im eNOS-sGC-PKG-Signaltransduktionsweg

Phosphodiesterasen spielen im eNOS-sGC-PKG-Signalweg wie auch in anderen Signalwegen eine wichtige Rolle, da sie durch Hydrolyse die 3',5'-cyclischen Nukleotide cGMP und cAMP zu den Nukleosid-5'-monophosphaten GMP und AMP abbauen und so wesentlich an der Regulation der Signalwege beteiligt sind. Man unterscheidet elf verschiedene PDE-Familien. Diese unterscheiden sich im Vorkommen in verschiedenen Geweben, in ihrer Regulation und in der Substratspezifität, wobei man zwischen PDEs unterscheidet, welche cAMP-spezifisch, cGMP-spezifisch oder gemischt spezifisch sind. Die elf PDE-Familien ähneln sich im Aufbau ihrer katalytischen Domänen, unterscheiden sich aber deutlich in der Struktur der N-terminalen Regionen, welche unterschiedliche regulatorische Domänen beinhalten (Rybalkin, Yan et al. 2003).

Aufgrund der Relevanz für den eNOS-sGC-PKG-Signaltransduktionsweg soll hier nur auf die cGMP-spezifischen Phosphodiesterasen eingegangen werden und im Speziellen vor allem auf die PDE5, welche eine besondere Stellung innerhalb des Signalweges einnimmt.

Bei der PDE5 handelt es sich um eine cGMP-hydrolysierende Phosphodiesterase, welche als Homodimer vorliegt und unter anderem in glatten Muskelzellen (Rybalkin, Yan et al. 2003) und Thrombozyten (Haslam, Dickinson et al. 1999) nachgewiesen werden konnte. Des Weiteren kommt die PDE5 in hohem Maß im Corpus cavernosum vor und spielt dort eine wichtige Rolle bei der Erektion, welche dadurch deutlich wird, dass PDE5-

Inhibitoren wie Sildenafil zu einer cGMP Akkumulation im Corpus cavernosum führen (Ballard, Gingell et al. 1998) und erfolgreich bei der Therapie der erektilen Dysfunktion eingesetzt werden (Boolell, Allen et al. 1996). Man unterscheidet drei verschiedene Spleißvarianten der PDE5, welche sich nur in der N-terminalen Region unterscheiden und als PDE5A1, PDE5A2 und PDE5A3 bezeichnet werden. In der N-terminalen Region besitzt die PDE5 zwei regulatorische Domänen, die als GAF-A und GAF-B bezeichnet werden (Rybalkin, Yan et al. 2003). Für GAF-A konnte *in vitro* eine hohe Spezifität für cGMP nachgewiesen werden, ebenso ist die cGMP Bindung an GAF-A essenziell für eine Aktivierung der PDE5 (Rybalkin, Rybalkina et al. 2003). Zusätzlich zu den beiden GAF Domänen besitzt die PDE5 mindestens eine Phosphorylierungsstelle an Ser92 für deren Phosphorylierung durch die Proteinkinase A und G die Bindung von cGMP an die regulatorischen Domänen erfordert (Turko, Francis et al. 1998). Durch eine Phosphorylierung wird die katalytische Aktivität der PDE 5 *in vitro* gesteigert, ebenso kommt es zu einer Erhöhung der Bindungsaffinität für cGMP (Corbin, Turko et al. 2000, Francis, Bessay et al. 2002).

Aufgrund dieser Mechanismen ist die PDE5 innerhalb des Signalwegs an einer negativen Feedbackinhibition beteiligt und ist möglicherweise ein Faktor, der zur Ausbildung der als Nitratoleranz bezeichneten NO-abhängigen Desensitisierung führt, welche man bei der pharmakologischen Therapie mit Nitraten beobachtet.

1.3.4 Die Rolle des eNOS-sGC-PKG-Signaltransduktionswegs und Stickstoffmonoxids für das kardiovaskuläre System

Nach der Identifizierung von NO als vasorelaxierendem Mediator im Gefäßsystem wurde intensiv untersucht, welche Rolle der Signaltransduktionsmechanismus für das kardiovaskuläre System spielt. Dieses Kapitel soll die Kenntnisse über die physiologische Rolle des Signalwegs im menschlichen Organismus skizzieren.

Bereits in den 1980er Jahren wurde durch verschiedene Arbeiten gezeigt, dass das Endothel Stickstoffmonoxid als sogenannten „Endothelium Derived Relaxing Factor“ (EDRF) ausschüttet (Furchgott and Zawadzki 1980). *In vitro* konnte gezeigt werden, dass das Endothel schon unter basalen Bedingungen NO produziert (Kelm, Feelisch et al. 1988). Die Synthese kann aber als Antwort auf eine erhöhte Schubspannung gesteigert werden (Buga, Gold et al. 1991), sodass es konsekutiv zu einer Vasorelaxation kommt. Dieses Phänomen ist ein wichtiger Faktor bei der Regulation des arteriellen Blutdrucks

beziehungsweise der Nachlast des Herzens und kann beispielsweise *in vivo* gut bei der Messung der flussvermittelten Vasodilatation (FMD) mittels Ultraschall beobachtet werden. Dieses Modell wird in experimentellen Studien häufig als Marker für die Endothelfunktion genutzt. Neben dieser schubspannungsabhängigen NO Produktion, welche außerordentlich wichtig für die Regulation des systemischen Blutdrucks ist, sind viele Mediatoren bekannt (zum Beispiel Acetylcholin), die zu einer erhöhten NO Produktion führen.

Neben der Blutdruckregulation durch die vermehrte NO Produktion als Antwort auf Flussänderungen und verschiedene Mediatoren spielt der eNOS-sGC-PKG-Signaltransduktionsweg auch am Myokard direkt eine wichtige Rolle. Schon vor langer Zeit fand man heraus, dass die eNOS im Koronarendothel durch parakrine Effekte Einfluss auf das Myokard hat. So konnte bereits 1995 durch Paulus et al. gezeigt werden, dass die endotheliale NO Synthase Einfluss auf die linksventrikuläre Funktion hat (Paulus, Vantrimpont et al. 1995). In genannter Untersuchung fanden die Autoren heraus, dass die intrakoronare Injektion von Substanz P zu einer verstärkten diastolischen Compliance führt. Später gewann man die Erkenntnis, dass dieser Effekt auf der Phosphorylierung des Troponin I durch die Proteinkinase G und der daraus resultierenden verminderten Ca^{2+} -Sensitivität beruht (Layland, Li et al. 2002). Ebenso werden beta-adrenerg vermittelte positiv inotrope Effekte durch NO abgeschwächt und muskarinerge Effekte werden verstärkt (Zhang and Casadei 2012). Das produzierte NO trägt so wahrscheinlich auch zur schnellen Anpassung der kardialen Inotropie, dem sogenannten Frank-Starling Mechanismus, bei (Pinsky, Patton et al. 1997, Prendergast, Sagach et al. 1997). Der Einfluss dieser in experimentellen Modellen nachgewiesenen Effekte auf die tatsächliche kardiale Funktion *in vivo* ist jedoch noch wenig verstanden und ist Gegenstand kontroverser Diskussion.

Zahlreiche Untersuchungen beschäftigten sich ebenfalls mit der Fragestellung, inwiefern der Signaltransduktionsweg beziehungsweise Veränderungen innerhalb des Signalweges eine Rolle bei der Entstehung von kardiovaskulären Erkrankungen spielen. Da kardiovaskuläre Erkrankungen in Deutschland sowie auch in anderen Industrienationen die Haupttodesursache noch vor den bösartigen Tumorerkrankungen sind, ist diese Fragestellung von besonderer Relevanz für die Therapie und Prävention der Herz-Kreislauf-Erkrankungen und für die Herz-Kreislauf-Forschung im Allgemeinen.

Der Zustand, dem eine verminderte Aktivität des Signalwegs zugrunde liegt und der in Verbindung mit der Entstehung einiger kardiovaskulärer Erkrankungen steht, bezeichnet man als endotheliale Dysfunktion.

Viele der heute bekannten Erkenntnisse über die Rolle des eNOS Signalwegs bei der Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen hat man aus tierexperimentellen Untersuchungen gewonnen, da diese Untersuchungen an Organismen erlauben, denen beispielsweise das Enzym fehlt oder die eine Überexpression des Enzyms zeigen. So wurde in einigen Untersuchungen gezeigt, dass eine eNOS Überexpression im tierexperimentellen Modell die Folgen von Myokardinfarkten mildern kann (Jones, Greer et al. 2003, Janssens, Pokreisz et al. 2004). Bei entsprechenden Mäusen zeigte sich eine verbesserte linksventrikuläre Funktion und eine verminderte kompensatorische Hypertrophie nach Myokardinfarkten (Janssens, Pokreisz et al. 2004).

Die Entstehung der Arteriosklerose, die eine wesentliche Rolle bei der Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen spielt, wird heutzutage mit der sogenannten „Response-to-injury“ Hypothese erklärt. Hiernach kommt es durch verschiedene Faktoren zu einer Intimaläsion und folglich zu einer subintimalen Anlagerung von LDL. Diese LDL werden dann durch Makrophagen phagozytiert, wodurch die Makrophagen zu sogenannten Schaumzellen werden. Der Begriff Schaumzellen entstand hierbei durch das mikroskopische Bild der Lipidtröpfchen, die sich im Zytoplasma der Makrophagen ablagern. Durch die Nekrose dieser Schaumzellen kommt es zu einer entzündlichen Reaktion mit Interleukin-vermittelter Einwanderung und Proliferation von Myofibroblasten, welche eine sogenannte atheromatöse Kappe bilden. Je nach Dicke dieser Kappe kann es zur Ruptur kommen, wodurch sich ein Thrombus an der Läsion bildet, der das Gefäßlumen verlegen kann. Dieser wichtige pathogenetische Mechanismus ist an der Entstehung zum Beispiel von Myokardinfarkten beteiligt.

Bei der Formation dieser atherosklerotischen Plaques spielt NO offenbar eine wichtige Rolle. So konnte in einem Mausmodell mit eNOS Überexpression nachgewiesen werden, dass entsprechende Mäusestämme weniger Arteriosklerose, geringere Blutdrücke und Plasmacholesterinwerte aufwiesen (van Haperen, de Waard et al. 2002). Man geht heute davon aus, dass die konstitutiven NO Synthasen einen protektiven Effekt auf die Entstehung der Atheroskleroseplaques haben und die induzierbare Form durch die Oxidation von LDL eher einen negativen Effekt hat. Auch hier hat man wesentliche Kenntnisse aus Tierversuchsmodellen gewonnen, bei denen gezeigt werden konnte, dass

eine genetische iNOS-Defizienz dazu führt, dass das Ausmaß der diätetisch induzierten Atherosklerose gemindert wird (Miyoshi, Li et al. 2006).

Kausal bringt man mit der Entstehung vieler Herz-Kreislauf-Erkrankungen immer wieder das Phänomen der so genannten eNOS Entkopplung in Verbindung (s.o.), bei der es zu einer verminderten NO und vermehrten Produktion von Superoxidanionen kommt (Zhang and Casadei 2012). Eine geringe Bioverfügbarkeit des Kofaktors Tetrahydrobiopterin, die zu einer Entkopplung der NO Synthase führt, wird ebenfalls mit dem Fortschreiten der Atherosklerose in Verbindung gebracht (Stroes, Kastelein et al. 1997).

Neben der Atherosklerose stellt die arterielle Hypertonie einen weiteren wichtigen Risikofaktor im kardiovaskulären System dar. Auch hier spielt die Endothelfunktion eine wichtige Rolle bei der Entstehung. Neben den tierexperimentellen Modellen zeigte sich bei Untersuchungen am Menschen, dass Patienten mit einem Hypertonus ein vermindertes Ansprechen auf endothel-abhängige Vasodilatoren (z. B. Acetylcholin), jedoch ein normales Ansprechen auf direkte NO-Donatoren aufweisen (Lee, Bae et al. 2016). Dies ist ein Hinweis darauf, dass bei der Pathogenese vor allem die NO Synthasen ein entscheidender Faktor sind.

Vergleichende Untersuchungen an Mäusestämmen, welche keine der drei NO Synthase Familien exprimieren, gaben Hinweise darauf, dass bei der Entstehung der arteriellen Hypertonie vor allem die Funktion eNOS von entscheidender Relevanz zu sein scheint, da das Ausmaß des Hypertonus in den untersuchten „triple null“ Mäusen ähnlich hoch wie in eNOS Knockout Mäusen war (Tsutsui, Tanimoto et al. 2015).

Ein weiteres wichtiges Krankheitsbild des kardiovaskulären Systems stellt die Herzinsuffizienz dar, ein Zustand, bei dem die kardiale Funktion so weit eingeschränkt ist, dass der Blutkreislauf nicht mehr unbeeinträchtigt aufrechterhalten werden kann. Je nachdem, ob eine Rechtsherz- oder Linksherzinsuffizienz vorliegt, äußert sich dieses Krankheitsbild in verschiedenen Symptomen, wie zum Beispiel Ödemen im Bereich der Beine oder der Lungen. Im Verlauf der Erkrankung kann es immer wieder zu einer akuten Verschlechterung der Situation kommen, die man als kardiale Dekompensation bezeichnet. Dies ist ein häufiger Grund für eine Krankenhauseinweisung bei bestehender Herzinsuffizienz. Die kardiale Dekompensation stellt unter Umständen eine lebensgefährliche Komplikation dar, da es im Zuge dessen zur Ausbildung eines Lungenödems mit der Folge einer respiratorischen Insuffizienz kommen kann. Patienten

mit Herzinsuffizienz haben abhängig vom Stadium der Erkrankung eine zum Teil deutlich schlechtere Lebenserwartung, die durch medikamentöse Therapie allerdings gebessert werden kann. Kenntnisse über die molekularen Mechanismen, die zur Entstehung oder Verschlechterung einer Herzinsuffizienz führen, können also helfen, die medikamentöse Therapie und damit die Lebenserwartung dieser Patienten zu verbessern. In der Tat gibt es Hinweise darauf, dass ein Ungleichgewicht im NO System ebenfalls einen Faktor bei der Entstehung der Herzinsuffizienz darstellt. Der Einfluss der NO Bioverfügbarkeit auf die Entstehung der Herzinsuffizienz zeigt sich dadurch, dass in den oben bezeichneten „triple null“ Mäusen gezeigt werden konnte, dass diese eine linksventrikuläre Hypertrophie und diastolische Dysfunktion entwickeln (Shibata, Yatera et al. 2010).

Zusammenfassend gibt es starke Hinweise darauf, dass Veränderungen des NO Signaltransduktionsweges eine wichtige Rolle bei der Pathophysiologie verschiedener kardiovaskulärer Erkrankungen spielt. Es herrscht heute ein breiter Konsens darüber, dass die Entdeckung von NO als Mediator im kardiovaskulären System wesentlich zu den Erkenntnissen, die wir über kardiovaskulärer Regulationsmechanismen und die kardiovaskuläre Funktion haben, beigetragen hat.

1.3.5 Medikamente mit direkter Wirkung auf den NO Signaltransduktionsweg

Wie oben beschrieben, spielt die NO Bioverfügbarkeit sowohl unter physiologischen als auch unter pathologischen Bedingungen eine wichtige Rolle im kardiovaskulären System. Aufgrund dessen wurden im Laufe der Zeit zahlreiche Pharmaka entwickelt, welche eine direkte Wirkung auf den NO Signaltransduktionsweg haben und daher bei verschiedenen kardiovaskulären Erkrankungen aber auch bei anderen Indikationen eingesetzt werden. Da sich diese Arbeit vorwiegend mit Glyceroltrinitrat und dessen Wirkung beschäftigt, sollen in diesem Abschnitt vor allem die Gruppe der organischen Nitrate und die PDE5-Inhibitoren vorgestellt werden.

Organische Nitrate wurden bereits lange vor der eigentlichen Entdeckung Stickstoffmonoxids als Mediator als Arzneistoffe eingesetzt. Bereits Mitte des 19. Jahrhunderts wurde Glyceroltrinitrat (GTN, Nitroglycerin) erstmals von Ascanio Sobrero synthetisiert (Franca-Silva, Balarini et al. 2014). Die Verwendung von GTN bei Angina Pectoris geht auf das Jahr 1879 zurück, in dem William Murrel erstmals die positiven

Effekte von GTN beschrieb (Franca-Silva, Balarini et al. 2014). Auch heute ist die Relevanz organischer Nitrate bei der Therapie der Angina Pectoris unbestritten, da sie nach wie vor in der Therapie von Angina Pectoris Anfällen regelhaft benutzt werden (Gayet, Paganelli et al. 2011).

Die physiologische Wirkung des Nitroglycerins beruht darauf, dass es vor allem in den peripheren Venen eine Dilatation bewirkt und so das sogenannte „venöse Pooling“ fördert. Dies führt in der Konsequenz zu einer verminderten Vorlast der Ventrikel und somit zu einem geringeren Sauerstoffverbrauch (Munzel, Daiber et al. 2011, Tarkin and Kaski 2016). Des Weiteren sind große und mittelgroße Koronargefäße sehr sensibel für GTN, wohingegen Arteriolen und kleinere Koronargefäße nur zu einem geringeren Grad auf GTN ansprechen. Somit wird insgesamt ebenfalls eine bessere Koronardurchblutung bewirkt (Munzel, Daiber et al. 2011).

Im Laufe der Zeit wurden neben GTN zahlreiche andere organische Nitrate synthetisiert. Man unterscheidet die Tri-/Tetranitrate Glyceroltrinitrat (GTN) und Pentaerythritoltetranitrat (PETN) von den Mono-/ beziehungsweise Dinitraten Isosorbiddinitrat (ISDN) und Isosorbidmononitrat (ISMN) (Franca-Silva, Balarini et al. 2014). Die verschiedenen Pharmaka besitzen abhängig von ihrer Darreichungsform unterschiedliche Wirkdauern und Wirkeintrittszeiten (Munzel and Gori 2013).

Bis heute sind die genauen Mechanismen der Wirkweise organischer Nitrate nicht vollständig geklärt, die mitochondriale Aldehyddehydrogenase 2 (mALDH) wurde jedoch als ein wichtiges Enzym für die Bioaktivierung einiger organischer Nitrate identifiziert (Miller and Wadsworth 2009). Untersuchungen zeigten für die organischen Nitrate GTN und Pentaerythryltetranitrat (PETN) eine verringerte Aktivierung der cGMP Kaskade und eine Minderung der vasodilatatorischen Effekte nach Inkubation mit mALDH2-Inhibitoren (Daiber, Oelze et al. 2004, Zhang, Chen et al. 2004). Bei den Mono- und Dinitraten Isosorbidmononitrat (ISMN) und Isosorbiddinitrat (ISDN) war dieser Effekt nicht zu beobachten (Daiber, Oelze et al. 2004). Heute geht man davon aus, dass GTN und PETN mALDH2-abhängig in den Mitochondrien aktiviert werden, wohingegen die Aktivierung von ISDN und ISMN Cytochrom-p450-abhängig im endoplasmatischen Retikulum erfolgt (Munzel and Gori 2013).

Lange Zeit nahm man zudem an, dass organische Nitrate wie GTN ihre Wirkung vor allem über die Freisetzung von Stickstoffmonoxid entfalten, dennoch gibt es heute Hinweise darauf, dass zumindest GTN auch NO-unabhängig wirkt (Kleschyov, Oelze et

al. 2003, Nunez, Victor et al. 2005). In entsprechender Arbeit von Munzel et al. konnte jedoch nachgewiesen werden, dass GTN dennoch eine direkte Wirkung auf den Signaltransduktionsweg hat, da es eine vermehrte Phosphorylierung des PKG-Effektors VASP bewirkt (Kleschyov, Oelze et al. 2003).

Das Enzym mALDH spielt ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Entstehung der sogenannten Nitrattoleranz (Sydow, Daiber et al. 2004). Unter dieser versteht man ein Phänomen, welches bei der Langzeittherapie mit fast allen organischen Nitraten auftritt und dazu führt, dass diese nicht mehr in vollem Umfang wirken (Munzel, Daiber et al. 2005). Dieser Effekt ist reversibel, wenn ein Nitrat-freies Intervall eingehalten wird (Munzel, Daiber et al. 2005). PETN ist hierbei eine Ausnahme, da es unter den in der Pharmakotherapie verwendeten Nitraten das einzige ist, welches keine Nitrattoleranz induziert (Mullenheim, Muller et al. 2001) und damit zu einer „toleranzfreien“ Vasodilatation im menschlichen Körper führt (Gori, Al-Hesayen et al. 2003).

Experimentelle Arbeiten zeigten, dass PETN und GTN zu einer veränderten Genexpression im Myokard führen, dabei bewirkte GTN sogar eine vermehrte Expression kardiotoxischer Gene, wohingegen PETN die Expression kardioprotektiver Gene förderte (Pautz, Rauschkolb et al. 2009).

Neben der Nitrattoleranz besitzen organische Nitrate weitere Nebenwirkungen. So wurde bereits früh beschrieben, dass GTN Kopfschmerzen induzieren kann (Franca-Silva, Balarini et al. 2014).

Neben den positiven Effekten organischer Nitrate bei der Kupierung akuter Angina Pectoris Anfälle, spielen diese auch im Rahmen einer Langzeittherapie eine Rolle bei der Anfallsprophylaxe. Hierbei kommen vor allem retardierte Formen der Pharmaka zum Einsatz, wenn die Patienten trotz einer Therapie mit Acetylsalicylsäure, Statinen und Betablockern oder Calciumkanalblockern symptomatisch sind (Munzel and Gori 2013). Hierbei gilt es jedoch zu beachten, dass Nitrate vor allem in der Langzeittherapie eine endotheliale Dysfunktion verursachen können, eine Ausnahme bildet auch hier PETN, bei dem sich dieser Effekt nicht zeigte (Munzel and Gori 2013).

In Studien gab es des Weiteren Hinweise darauf, dass organische Nitrate auch positive Effekte auf die Mortalität bei einer Herzinsuffizienz haben (Munzel, Daiber et al. 2013). Zusammenfassend liegen die Indikationen für den Einsatz organischer Nitrate vor allem in der Therapie der Angina Pectoris, jedoch eröffnen intensive Untersuchungen auch

weitere Felder, auf denen diese altbekannten Pharmaka auch in der Zukunft noch eine große Rolle in der kardiovaskulären Therapie spielen können.

Neben den Nitraten soll hier als weitere Wirkstoffgruppe mit direkter Wirkung auf den NO Signalweg auf die Klasse der Phosphodiesterase-Inhibitoren, genauer vor allem auf die PDE5-Inhibitoren, eingegangen werden. Während unselektive PDE-Inhibitoren bereits seit vielen Jahrzehnten bekannt waren, wurde der erste selektive PDE5-Inhibitor Zaprinast in den 1980er Jahren entwickelt, jedoch noch mit geringem Erfolg (Elhwuegi 2016). Die Forschung an PDE5-Inhibitoren mündete letztlich in der Entdeckung des Wirkstoffs Sildenafil, welcher im Jahr 1998 durch die Firma Pfizer unter dem Handelsnamen Viagra® auf den Markt gebracht wurde. Ursprünglich war die Absicht, PDE5-Inhibitoren vor allem zur Therapie der Angina Pectoris einzusetzen (Elhwuegi 2016), es zeigten sich im Laufe der Zeit jedoch auch andere Effekte, die man sich klinisch zunutze machte (s.u.).

Da es sich bei der PDE5 um eine cGMP-spezifische Phosphodiesterase handelt (s.o.), führt der Einsatz dieser PDE5-Inhibitoren zu einer Akkumulation des durch die Guanylatcyclase gebildeten cGMP in der Zelle. Je nach Gewebe hat dies unterschiedliche physiologische Effekte.

Am Corpus cavernosum des Penis bewirkt die Aktivierung der NO Signalkaskade und die damit verbundene Erhöhung des Produktes cGMP eine Erschlaffung der glatten Muskulatur des Corpus cavernosum, wodurch der arterielle Blutfluss gesteigert wird (Rajfer, Aronson et al. 1992). In Folge dieser Blutansammlung steigt der Druck im Schwellkörper aufgrund der relativ festen Tunica albuginea, die den Schwellkörper umgibt. Dies führt zu einer Kompression der venösen Blutgefäße und konsekutiv zu einer Erektion des Penis (Corbin 2004). Durch die Inhibition der PDE5 und der damit verbundenen cGMP Akkumulation wird die Erektion folglich länger aufrechterhalten. Vor diesem Hintergrund erklärt sich das heute weit verbreitete Indikationsspektrum der PDE5-Inhibitoren bei der Therapie der erektilen Dysfunktion.

Eine weitere Indikation der PDE5-Inhibitoren stellt die pulmonal-arterielle Hypertonie dar (Hoepfer, McLaughlin et al. 2016). Bei der pulmonal-arteriellen Hypertonie handelt es sich um eine kardiovaskuläre Erkrankung mit relativ schlechter Prognose, die durch die Entwicklung medikamentöser Therapien jedoch verbessert werden konnte (Gomberg-Maitland, Dufton et al. 2011, Benza, Miller et al. 2012). Im Zuge einer multifaktoriellen Pathogenese kommt es zum Anstieg des pulmonal-arteriellen Blutdrucks mit

konsekutiver Rechtsherzinsuffizienz und damit verbundener Letalität (Anwar, Ruffenach et al. 2016). Auch bei der Therapie dieser Erkrankung spielen Medikamente, welche auf den NO Signalweg wirken eine esentielle Rolle. So kommen PDE5-Inhibitoren neben anderen Medikamenten, wie beispielsweise Stimulatoren der löslichen Guanylatcyclase zum Einsatz und können über die vermittelte cGMP Akkumulation eine Erschlaffung der pulmonal-arteriellen Gefäße bewirken, sowie den pulmonal-arteriellen Blutdruck senken (Galie, Ghofrani et al. 2005). Ebenso haben PDE5-Inhibitoren einen positiven Effekt auf das sogenannte vaskuläre Remodelling, welches im Rahmen der multifaktoriellen Pathogenese der pulmonal-arteriellen Hypertonie eine Rolle spielt (Montani, Chaumais et al. 2009).

Zusammenfassend ist die Signifikanz des NO Signalwegs heute für den Bereich der Pharmakotherapie von Herz-Kreislauf-Erkrankungen unverkennbar.

1.4 Die Rolle des eNOS-PKG-sGC-Signaltransduktionswegs in Erythrozyten (RBC)

1.4.1 Die erythrozytäre NO Produktion

Da endothelial gebildetes NO auch in Erythrozyten diffundieren kann, stellt sich die Frage, welche Reaktionen intraerythrozytär mit dem endothelial gebildeten NO ablaufen. Lange Zeit galten Erythrozyten als eine Art Sackgasse für das gebildete NO, da dieses mit Oxyhämoglobin zu Nitrat und Methämoglobin reagiert (Dejam, Hunter et al. 2005). Unter hypoxischen Bedingungen kann Nitrit jedoch mit Desoxyhämoglobin unter Bildung von NO und Methämoglobin reagieren (Dejam, Hunter et al. 2005). Dies stellt eine mögliche Erklärung für einen Beitrag der Erythrozyten zur hypoxischen Vasodilatation dar (Dejam, Hunter et al. 2005). NO selbst kann mit desoxygeniertem Hämoglobin unter der Bildung von Eisen (II)-Nitrosylhämoglobin an das Hämeisen binden (Gross and Lane 1999).

Neben der schlichten Aufnahme des endothelial gebildeten NOs wurde außerdem bekannt, dass Erythrozyten eine NO Synthase exprimieren, welche in der Lage ist, NO zu produzieren (Kleinbongard, Schulz et al. 2006). Bereits zuvor zeigten Untersuchungen beispielsweise, dass Patienten mit Anämie eine schlechtere Prognose bei Herzinfarkten und Herzinsuffizienz haben (Nikolsky, Aymong et al. 2004). Die Entdeckung einer funktionsfähigen NO Synthase in Erythrozyten wurde im Verlauf weiter bestätigt und

charakterisiert. So ließ sich nachweisen, dass Erythrozyten eine konstitutive NOS Form exprimieren, die der endothelialen NO Synthase (NOSIII) entspricht (Cortese-Krott, Rodriguez-Mateos et al. 2012).

Wie auch im Endothel, ist die Funktion der erythrozytären NO Synthase abhängig vom Substrat L-Arginin. Weiter lässt sich die erythrozytäre NO Produktion analog zur endothelialen NO Produktion durch eine Erhöhung der Schubspannung steigern (Ulker, Meiselman et al. 2010).

Im Rahmen der Charakterisierung der erythrozytären NO Synthase wurde außerdem ein Zusammenhang zwischen der Expression der NO Synthase in Erythrozyten und dem Krankheitsbild der koronaren Herzerkrankung untersucht. Hier zeigte sich, dass Patienten mit koronarer Herzerkrankung eine verminderte Expression und eine verminderte Aktivität der NOSIII in Erythrozyten aufwiesen (Cortese-Krott, Rodriguez-Mateos et al. 2012).

Neuere Untersuchungen zeigten beispielsweise auch, dass sich die erythrozytäre NO Synthase durch sogenanntes „Remote Ischemic Preconditioning“ (rIPC) stimulieren lässt (Grau, Kollikowski et al. 2016). Beim rIPC erreicht man durch repetitive abwechselnde Sequenzen von kurzer Extremitätenischämie mit anschließender Reperfusion bessere Outcomes nach Myokardinfarkten (Botker, Kharbanda et al. 2010). Des Weiteren gaben Untersuchungen Hinweise darauf, dass der NO Signalweg einen Einfluss auf die Erythropoese hat (Ikuta, Sellak et al. 2016).

1.4.2 Erythrozyten und Faktoren ihrer Verformbarkeit

Erythrozyten werden im menschlichen Körper vor allem im Knochenmark über verschiedene Vorstufen produziert. Im Laufe dieser Reifung stoßen die roten Blutkörperchen ihren Zellkern sowie ihre Zellorganellen aus, sodass der reife Erythrozyt zu einem Großteil seiner Masse aus Hämoglobin besteht.

Angesichts des kleinen Durchmessers der terminalen Strombahn müssen Erythrozyten gut verformbar sein, um ihrer physiologischen Funktion des Sauerstofftransports in die Gewebe nachkommen zu können. Charakteristisch für Erythrozyten ist das Zytoskelett, welches den Erythrozyten ihre typische Form gibt und verantwortlich für die Stabilität und Verformbarkeit der roten Blutzellen ist. Das Zytoskelett der Erythrozyten besteht unter anderem aus α - und β -Spectrin, Actin, Protein 4.1R, Adducin, Demantin,

Tropomyosin und Tropomodulin (Mohandas and Gallagher 2008). Die Spectrine bilden Heterodimere und formen ein Netzwerk, welches über verschiedene Proteine in der Doppellipidschicht der Zellmembran verankert ist. So zum Beispiel Ankyrin, welches eine Verbindung der Spectrin-Filamente mit dem Protein „Band 3“ (Anionentauscher) und RhAG realisiert. Die Proteine Duffy, XK, Glycophorin C und Rh sind über das Protein 4.1R mit dem Zytoskelett verbunden (Mohandas and Gallagher 2008).

Da Spectrin sehr dehn- und kontrahierbar ist, stellt es einen relevanten Faktor für die Verformbarkeit der Erythrozyten dar (Lee, Wong et al. 1999). Die erythrozytäre Verformbarkeit ist eine wichtige Determinante für die physiologische Rolle der Erythrozyten und ist entscheidend für die Aufrechterhaltung der Mikrozirkulation (Kuwai and Hayashi 2006), sie nimmt mit dem Alter der Erythrozyten ab (Sutera, Gardner et al. 1985).

Physiologisch werden im Rahmen der sogenannten Blutmauserung in der roten Pulpa der Milz veraltete Erythrozyten mit verminderter Verformbarkeit gefiltert und durch Zellen des Immunsystems phagozytiert. Realisiert wird dies dadurch, dass die Erythrozyten in der Milz durch das retikuläre Bindegewebe und die Spalträume zwischen den Endothelzellen der Milzsinus hindurchtreten müssen, um in das Blutgefäßsystem zu gelangen. Da dies eine starke Verformbarkeit der Erythrozyten voraussetzt, gelingt dies den gealterten Erythrozyten nicht.

Auch für die erythrozytäre Verformbarkeit spielt Stickstoffmonoxid eine wichtige Rolle, so konnte beispielsweise der positive Effekt von Stickstoffmonoxid auf die erythrozytäre Verformbarkeit nachgewiesen werden (Bor-Kucukatay, Wenby et al. 2003).

Die intrazelluläre Calciumkonzentration ist außerdem ein wichtiger Faktor für die Verformbarkeit der Erythrozyten. Hierbei zeigten Untersuchungen, dass eine niedrige intrazelluläre Calciumkonzentration die Verformbarkeit der Erythrozyten positiv beeinflusst und dass NO Donatoren über eine Stimulation der Ca^{2+} -ATPase zu einer Erniedrigung der Calciumkonzentration führen (Kuwai and Hayashi 2006).

Bestimmte metabolische Zustände sind mit einer verringerten Verformbarkeit der Erythrozyten assoziiert. So wurde der Zusammenhang beispielsweise für die Hypercholesterinämie gezeigt, wobei auch hier die verminderte Verformbarkeit durch die Gabe von NO Donatoren verbessert werden konnte (Kuwai and Hayashi 2006). Ebenso wurde eine Verschlechterung der erythrozytären Verformbarkeit bei Hyperglykämie

nachgewiesen (Babu and Singh 2004). In der oben beschriebenen Untersuchung über den Einfluss des „Remote Ischemic Preconditioning“ (rIPC) konnte ebenfalls gezeigt werden, dass sich durch das Verfahren die Verformbarkeit der Erythrozyten durch Stimulation der NO Synthase verbessert (Grau, Kollikowski et al. 2016).

1.5 Ziele der Arbeit

Seit der Entdeckung des Stickstoffmonoxids als Mediator im kardiovaskulären System Anfang der 1980er Jahre sind immer mehr Funktionen dieses Botenstoffs bekannt geworden, sodass heute ein breiter Konsens darüber herrscht, dass die Erkenntnisse über den Signalweg von großer Relevanz sind. Ebenso wurden bereits zahlreiche Pharmaka entwickelt, die sich die Kenntnisse über die biochemischen Prozesse dieses Signalwegs zunutze machen.

Seit dem Nachweis einer funktionellen NO-Synthase in Erythrozyten ist bis heute wenig über mögliche Zielstrukturen des erythrozytär gebildeten NO bekannt. So wurde bislang kein funktioneller NO Signaltransduktionsweg in Erythrozyten nachgewiesen.

Hinweise darauf, dass ein erythrozytärer NO Signalweg beziehungsweise Erythrozyten-assoziiertes NO zu physiologischen Regulationsmechanismen beitragen oder eine Rolle bei verschiedenen kardiovaskulären Pathologien spielen, eröffnen neue Perspektiven. Verständnis über einen erythrozytären NO Signalweg in gesunden sowie kranken Organismen könnte beispielsweise in der Zukunft eine Rolle bei der Entwicklung von neuen Arzneimitteln spielen und dazu beitragen, die Prognose kardiovaskulärer Erkrankungen zu verbessern.

Die Hypothese dieser Arbeit ist, dass in Erythrozyten Zielstrukturen eines NO-Signaltransduktionsweges existieren und eine Aktivierung dieser Signalkaskade durch Stickstoffmonoxid möglich ist.

Als Ziel dient hierbei zunächst der *in vitro* Nachweis des Vasodilatator-stimulierten Phosphoproteins als Zielstruktur der cGMP-abhängigen Proteinkinase. Die Aktivierung der Signalkaskade soll *in vitro* durch die Phosphorylierung des Vasodilatator-stimulierten Phosphoproteins an Ser239 nachgewiesen werden.

Die weitere Charakterisierung erfolgt durch Übertragung auf ein *in vivo* Modell bei jungen gesunden Probanden, bei dem die Auswirkung einer NO-abhängigen Stimulation auf die erythrozytäre Funktion gemessen anhand der erythrozytären Verformbarkeit

untersucht wird. Als Maß für die NO-Bioverfügbarkeit dient die Bestimmung der Nitritspiegel in Erythrozyten.

Zur Untersuchung der klinischen Relevanz erfolgt im Anschluss eine Untersuchung der NO-Bioverfügbarkeit bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit.

Abbildung drei soll einen Überblick über die dieser Arbeit zugrunde liegenden Fragestellungen geben.

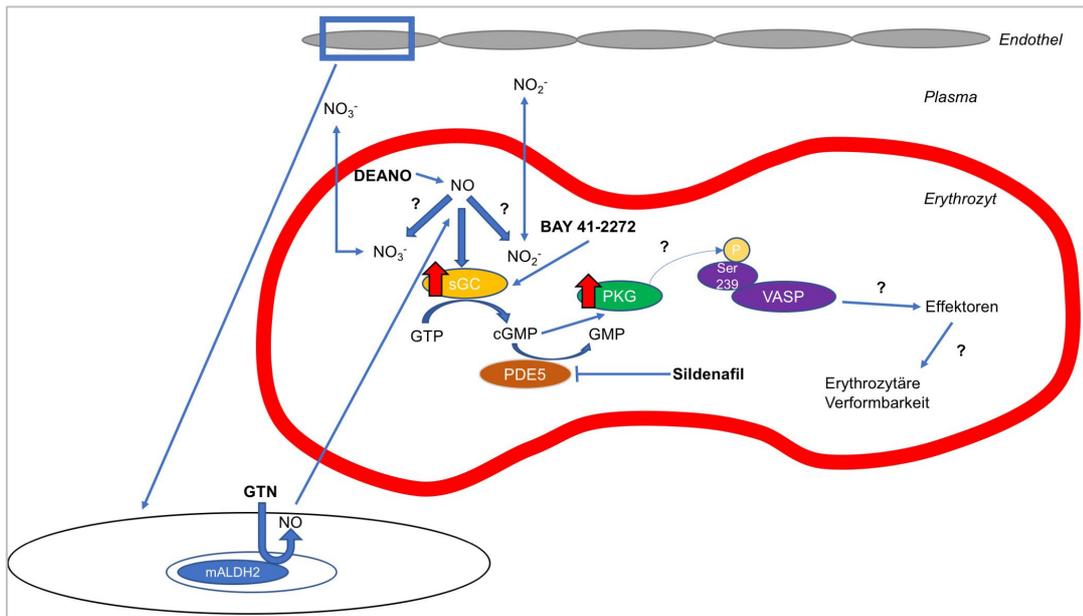


Abb. 3: Graphische Zusammenfassung der Fragestellung

2 Material und Methoden

2.1 Material

CLD 88e	Eco Physics GmbH	Hürth, DE
CP225-D-OCE	Sartorius	Göttingen, DE
ENO-20	Eicom	Kyoto, JP
Fluostar Omega	BMG Labtech GmbH	Ortenberg, DE
Imagequant LAS4000	GE Healthcare	Buckinghamshire, UK
Inkubationshaube TH 15	Edmund Bühler	Tübingen, DE
LORRCA laser assisted optical rotational cell analyzer	RR Mechatronics	Zwaag, NL
Mikroliterspritze	Hamilton	Bonaduz, CH
Milli-Q	Merck	Darmstadt, DE
pH Meter Lab 870	Schott	Mainz, DE
Pipetten	Eppendorf	Hamburg, DE
PowerPac 200	BioRad	California, USA
RCT Basic	IKA Labortechnik	Staufen, DE
Test Tube Dry Block Heater	Stuart Scientific	Staffordshire, UK
Voluson E	GE Healthcare GmbH	Solingen, DE
X Cell Sure Lock	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
X Cell2 Blot Module	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Zentrifuge Mikro 200R	Hettich	Tuttlingen, DE
Zentrifuge Rotina 38R	Hettich	Tuttlingen, DE

Tabelle 2: Geräte

96 Well Mikrotiterplatte	Greiner Bio-One GmbH	Frickenhausen, DE
Combi Stopper	B. Braun Melsungen	Melsungen
Luer Lock Spritze 20 ml	B. Braun Melsungen	Melsungen, DE
MICRO-TOUCH Nitra-Tex Handschuhe	Ansell	Richmond, AU
Mikroreagiergefäße 2 ml	Eppendorf	Hamburg, DE
NuPage 10% Bis-Tris Gel	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Parafilm "M"	Pechiney Plastic Packaging	Washington, USA
Pipettenspitzen 10 µl	STARLAB International GmbH	Hamburg, DE
Pipettenspitzen 100 µl	STARLAB International GmbH	Hamburg, DE
Pipettenspitzen 1000 µl	STARLAB International GmbH	Hamburg, DE
Polypropylenröhrchen 15 ml	Greiner Bio-One GmbH	Frickenhausen, DE
Polypropylenröhrchen 50 ml	Greiner Bio-One GmbH	Frickenhausen, DE
PVDF Membran (Hybond P)	GE Healthcare	Solingen, DE

Vacutainer Citrat Röhrchen	Becton Dickinson	New Jersey, USA
Vacutainer EDTA Röhrchen	Becton Dickinson	New Jersey, USA
Vacutainer Safety-Lok 21 G	Becton Dickinson	New Jersey, USA
Vasofix Safety 20G	B. Braun Melsungen	Melsungen

Tabelle 3: Verbrauchsmaterial

8-CPT-cGMP	Sigma Aldrich	St. Louis, USA
Albumin Fraktion V	Carl Roth	Karlsruhe, DE
Antioxidans	Life Technologies (Thermo Fisher Scientific)	Waltham, USA
BAY 41-2272	Bayer	Wuppertal, DE
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma Aldrich	St. Louis, USA
Carrier Powder	Eicom	Kyoto, JP
Diethylamine NONOate (DEANO)	Sigma Aldrich	St. Louis, USA
Diethylentriaminpentaessigsäure	Sigma Aldrich	St. Louis, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Aldrich	St. Louis, USA
Essigsäure	Carl Roth	Karlsruhe, DE
Hank's Buffered Salt Solution (HBSS)	Life Technologies (Thermo Fisher Scientific)	Waltham, USA
Heparin 25.000 IE / 5 ml	Rotexmedica GmbH	Trittau, DE
Jod	Sigma Aldrich	St. Louis, USA
Kaliumhexacyanoferrat	Sigma Aldrich	St. Louis, USA
Kaliumiodid	Sigma Aldrich	St. Louis, USA
LDS 4x	Life Technologies (Thermo Fisher Scientific)	Waltham, USA
Magic Mark XP Protein Standard	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Methanol	Merck	New York, USA
MOPS Laufpuffer	Life Technologies (Thermo Fisher Scientific)	Waltham, USA
N-Ethylmaleinimid	Sigma Aldrich	St. Louis, USA
NaOH	Merck	New York, USA
Natriumnitrat	Merck	New York, USA
Natriumnitrit	Merck	New York, USA
Nitrolingual	G. Pohl-Boskamp GmbH & Co. KG	Hohenlockstedt, DE
Phosphataseinhibitor A	Biotool	Houston, USA
Phosphataseinhibitor B	Biotool	Houston, USA
Phosphate Buffered Saline (PBS)	Life Technologies (Thermo Fisher Scientific)	Waltham, USA
Polyvinylpyrrolidone Lösung (PVP)	RR Mechatronics	Zwaag, NL
Proteaseinhibitor	Biotool	Houston, USA
Reactor A Powder	Eicom	Kyoto, JP

Reactor B Powder	Eicom	Kyoto, JP
Restore Western Blot Stripping Buffer	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
RIPA Puffer	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Sample Reducing Agent (10x)	Life Technologies (Thermo Fisher Scientific)	Waltham, USA
Sildenafilcitrat	Sigma Aldrich	St. Louis, USA
SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Transferpuffer	Life Technologies (Thermo Fisher Scientific)	Waltham, USA
Tween 20	Sigma Aldrich	St. Louis, USA

Tabelle 4: Chemikalien

Anti VASP Primärantikörper	Cat. No. 3112	Cell Signaling Technology	Danvers, USA
Anti Phospho-VASP (Ser239) Primärantikörper	Cat. No. 3114	Cell Signaling Technology	Danvers, USA
Goat Anti-Rabbit Sekundärantikörper	Cat. No. 31340	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA

Tabelle 5: Antikörper

2.2 Untersuchung NO Signalkaskade bei Stimulation von Erythrozyten *in vitro*

2.2.1 Probandenauswahl und Einwilligung

Im Rahmen der Untersuchung wurden junge, volljährige und gesunde Probanden gewonnen und über die Maßnahmen und die Verwendung ihrer Blutproben aufgeklärt. Nach der Einwilligung durch die Probanden wurde mit der Blutentnahme (s.u.) begonnen. Vorab wurde bei der zuständigen Ethikkommission ein Antrag (Studennummer 3875) gestellt, gegen welchen keine ethischen oder rechtlichen Bedenken bestanden.

2.2.2 Aufreinigung des Erythrozyten-Pellets

Nach der Einwilligung der Probanden wurde ihnen mittels eines 21 G Blutentnahmesets vier Lithium-Heparinatröhrchen entnommen, die im Anschluss zur Durchmischung des Antikoagulanz mehrfach über Kopf gedreht wurden. Bereits entnommene Röhrchen wurden nach der Durchmischung zügig auf Eis gelagert.

Das heparinisierte Blut wurde dann in eine 20 ml Spritze überführt, deren Kolben entfernt wurde und deren Spitze mittels eines Combi-Stoppers verschlossen wurde. Diese so gefüllte Spritze wurde im Anschluss zur Zentrifugation mit der Spitze nach unten in geöffnetes 50 ml Polypropylenröhrchen gestellt. Die obere Öffnung dieser Spritze wurde anschließend durch ein Stück Verschlussfolie versiegelt. Nach der Zentrifugation bei 800 g, 10 min und 4 °C wurde das abzentrifugierte Erythrozyten-*Pellet* vorsichtig aus der Spitze der Spritze durch Abschrauben des Combi-Stoppers in das Polypropylenröhrchen abgetropft. Vor dem Erreichen der „Buffy-Coat“ Phase wurde die Spritze verschlossen und das Plasma sowie der „Buffy-Coat“ verworfen.

Das Erythrozyten-*Pellet* wurde nun bis zur 50 ml Markierung mit HBSS + Ca²⁺/Mg²⁺ aufgefüllt und erneut bei 300 g, 10 min und 4 °C zentrifugiert. Im Anschluss wurde der Überstand abgesaugt und verworfen. Dieser Waschschrift wurde insgesamt dreimal durchgeführt, um das *Pellet* von anderen, hier unerwünschten, Zellen zu befreien.

Diese Methode der Aufreinigung entstammte aus einem laborinternen Protokoll und wurde zuvor hinsichtlich der Reinheit der gewonnenen Erythrozytenproben evaluiert.

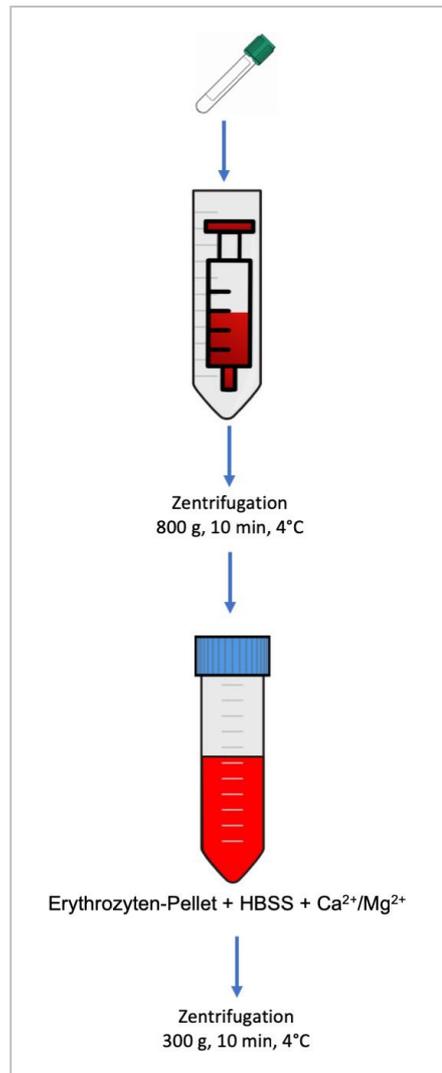


Abb. 4: Die Probenverarbeitung im Überblick

2.2.3 Stimulation der Erythrozyten

Während der oben bezeichneten Zentrifugationsschritte wurden pro Proband vier 50 ml Polypropylenröhrchen vorbereitet, beschriftet und mit 30 ml HBSS + Ca²⁺/Mg²⁺ aufgefüllt.

Die Röhrchen wurden nach dem folgenden Schema beschriftet:

1. CTRL (+ Sildenafil)
2. DEANO (+ Sildenafil)
3. BAY 41-2272 + DEANO (+ Sildenafil)
4. cGMP (+ Sildenafil)

Ebenso wurden die benötigten Chemikalien abgewogen und gelöst (jeweils für zwei Probanden):

1. 10 mg 8-CPT-cGMP in 400 ml H₂O_{dd}
2. DEANO Einwaage: 6,5 mg in 630 µl NaOH 0,01 M
3. BAY 41-2272 Einwaage: 3,6 mg in 100 µl Dimethylsulfoxid (DMSO)
4. Sildenafil: 200 mg in 6 ml H₂O_{dd}

In jedes der beschrifteten PP-Röhrchen wurde im Anschluss an die Aufreinigung 500 µl des *Pellets* sowie 600 µl der Sildenafil-Lösung gegeben. Die Lösung wurde anschließend gut durchmischt und 10 min bei 37 °C auf einem Rollbrett in einem Inkubator inkubiert.

Nach der Vorinkubation mit dem PDE 5 Inhibitor Sildenafil wurden die Stimulanzen nach dem folgenden Schema pipettiert:

1. Kontrolle (keine Zugabe von Stimulanzen)
2. 120 µl der DEANO Lösung
3. 120 µl der DEANO Lösung und 3 µl der BAY 41-2272 Lösung
4. 50 µl 8-CPT-cGMP Lösung

Die Röhrchen wurden im Anschluss 15 min bei 37 °C unter andauernder Durchmischung mit den verschiedenen Stimulanzen inkubiert.

Nach der Inkubation erfolgte die Abzentrifugation des Erythrozyten-*Pellets* bei 800 g, 10 min und 4 °C.

Währenddessen wurden 5 ml des Lysepuffers (RIPA) mit 100 µl Proteaseinhibitor und jeweils 100 µl Phosphataseinhibitor A und B vermischt.

Nach Absaugen und Verwerfen des Überstandes wurden 300 µl des stimulierten *Pellets* mit jeweils 300 µl des Lysepuffergemischs in einem Mikroreaktionsgefäß versetzt und mittels eines Vortexschüttlers gut vermischt. Das so entstandene Lysat wurde dann bei 14000 g, 15 min und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde daraufhin in ein neues Mikroreaktionsgefäß überführt und zur Proteinbestimmung weiterverarbeitet. Die entsprechenden Verarbeitungsschritte werden schematisch in Abbildung fünf dargestellt.

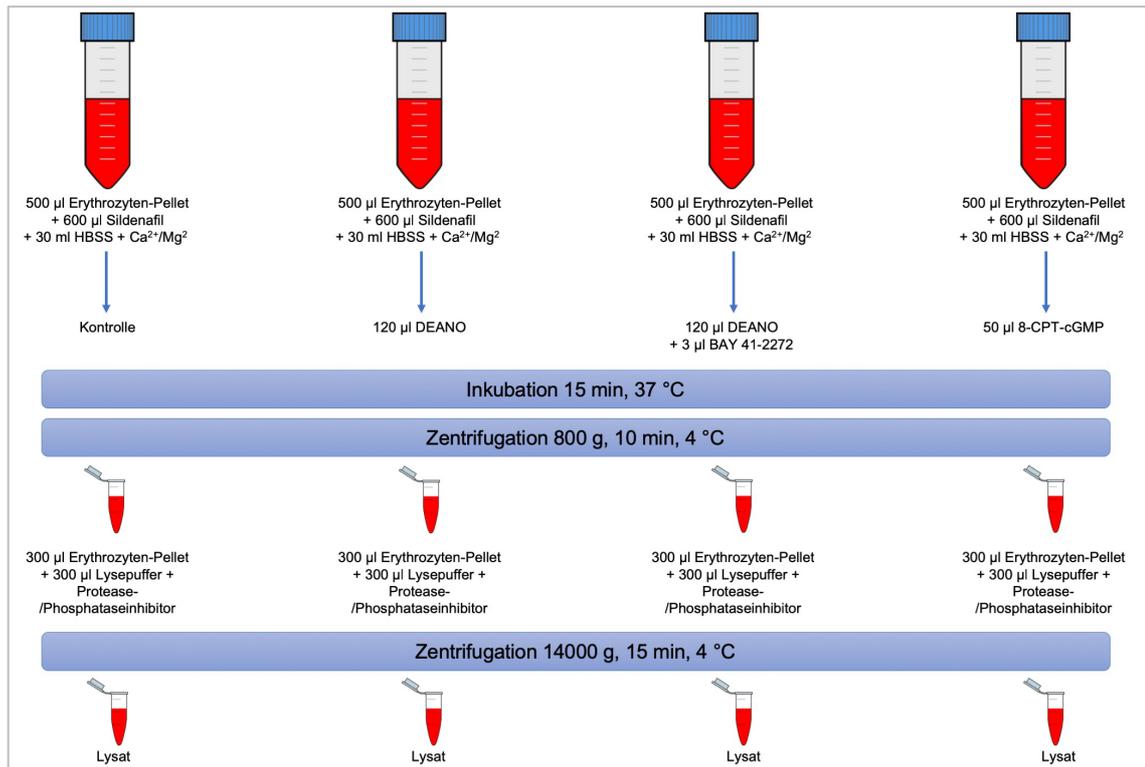


Abb. 5: Protokoll der Stimulation *in vitro*

2.2.4 Proteinbestimmung des Lysats

Nachdem die Stimulation und die Lyse der Erythrozyten durchgeführt wurde, wurde ein Teil des Lysats zunächst 1:4 mit dem Lysepuffer verdünnt. Von dieser 1:4 Verdünnung wurde nochmals eine 1:50 Verdünnung mit Lysepuffer angefertigt, die für die Proteinbestimmung verwendet wurde. Diese Verdünnung war erfahrungsgemäß nötig, damit die Proben innerhalb der Breite der Standardreihe lagen.

Zunächst wurde eine 10 prozentige Albuminlösung hergestellt, die dann verdünnt wurde, um eine Stocklösung mit einer Proteinkonzentration von 2 mg/ml zu erhalten. Mit dieser Stocklösung wurde im Anschluss eine Standardreihe angefertigt, wobei hier darauf geachtet wurde, dass die Verdünnung der Standardreihe im gleichen Medium anzufertigen war, wie bei der Verdünnung der Proben, welche zu bestimmen waren.

Die Standardreihe enthielt die folgenden Konzentrationen:

1	0,0 mg/ml	4	0,8 mg/ml	7	1,4 mg/ml
2	0,2 mg/ml	5	1,0 mg/ml	8	1,5 mg/ml
3	0,4 mg/ml	6	1,2 mg/ml	9	2,0 mg/ml

Für die Proteinbestimmung wurde das Bio-Rad *DC*TM Protein Assay verwendet, welches aus drei Reagenzien besteht: Reagent A, Reagent S und Reagent B. Zunächst werden 1000 µl des Reagent A mit 20 µl des Reagent S vermischt. Diese Mischung wurde als Arbeitslösung A bezeichnet. Dann pipettierte man jeweils 5 µl der Standards in Doppelbestimmung in jeweils einen Well einer 96-Well Platte. Gleiches geschah mit den Proben. Daraufhin wurden 25 µl der Arbeitslösung A in jedes Well gegeben sowie 200 µl des Reagent B. Die Platte wurde im Anschluss 15 min in Dunkelheit inkubiert, anschließend wurde die Extinktion der Proben bei 720 nm mit Hilfe des FLUOstar Omega (Fa. BMG Labtech) gemessen. So konnte anhand der Standardkonzentrationen die Konzentrationen der Proben bestimmt werden.

2.2.5 SDS-PAGE und Western Blot der Lysate

2.2.5.1 Vorbereitung der Proben

Zunächst wurde mittels einer Proteinbestimmung die Konzentration der einzelnen Aliquots berechnet. Im Anschluss wurde aus der Konzentration des Lysats die Menge der Probe berechnet, die eingesetzt werden musste, um 500 µg Probe pro Geltasche zu erhalten. Der Probe wurde dann jeweils 6,25 µl LDS (4x) sowie 2,5 µl Sample Reducing Agent (10x) zugesetzt und mit der Menge H₂O_{dd} aufgefüllt, die nötig war, um eine Gesamtmenge von 25 µl pro Geltasche zu erhalten. Nach Protokoll wurde das Aliquot dann 10 Minuten bei 70 °C inkubiert, bevor die Proben in die Geltaschen des Polyacrylamidgels gegeben wurden.

2.2.5.2 SDS-PAGE

Zu Beginn wurde die Elektrophoresekammer montiert und eine Gelkassette in die Kammer eingespannt. Es wurde aufgrund des zu erwartenden Molekulargewichts des Vasodilatator-stimulierten Phosphoproteins von 46 kDa ein 10 % Bis-Tris Gel verwendet. Durch den Zusammenbau der Elektrophoresekammer entstehen zwei Kompartimente, ein inneres und ein äußeres.

Im Anschluss wurde 1 l eines konzentrierten MOPS Laufpuffers angesetzt. Von dieser Lösung wurden 200 ml mit Antioxidans versetzt, welche in das innere Kompartiment gefüllt wurden. Mit den restlichen 800 ml wurde das äußere Kompartiment befüllt.

Zur Vermeidung von Luftblasen mussten nun die Geltaschen mit Laufpuffer gespült werden, um sie danach mittels einer Hamilton-Spritze mit jeweils 25 µl Probe zu füllen. In die äußerste Geltasche wurden 2 µl eines Markers für das Molekulargewicht gegeben (Fa. ThermoFisher MagicMark XP Protein Standard). Nach der Befüllung der Taschen wurde eine Spannung von 150 V für 80 min angelegt und die Proteine so ihrer Größe nach aufgetrennt.

2.2.5.3 Western Blot

Nach der Auftrennung der Proteine durch die Gelelektrophorese wurden die Proteine vom Gel auf eine PVDF (Polyvinylidenfluorid) Membran transferiert.

Dafür musste die PVDF Membran aktiviert werden, indem sie kurz in Methanol eingelegt wurde, um die Hydrophobie der Membran zu mindern und einen Kontakt der Membran mit dem Transferpuffer zu ermöglichen. Anschließend wurde die Gelkassette aufgebrochen und auf die Membran gelegt. Beidseitig wurde zudem ein mit Transferpuffer getränktes Filterpapier auf die Membran bzw. das Gel gelegt. Dies wurde nun so in einen handelsüblichen Tank-Blotter eingespannt, sodass sich das Polyacrylamidgel anodenseitig befand und der Tank mit Transferpuffer aufgefüllt. Nach dem vollständigen Aufbau des Tank-Blotters wurde eine Spannung von 30 V für eine Stunde angelegt.

Zur Verifizierung der Probenladung und zur Fixierung der Proteine wurde die Membran nach dem Transfer mittels einer Ponceau S Lösung 10 min eingefärbt, welche im Anschluss mittels H_2O_{dd} wieder ausgewaschen wurde, um die Membran dann zu blocken. Hierzu wurden 2,5 g BSA in 50 ml TBS-T (0,1 % Tween-20) gelöst, sodass eine 5 prozentige BSA Lösung entstand, mit der die Membran in einer Glasküvette getränkt wurde und 2 Stunden bei Raumtemperatur geblockt wurde.

2.2.5.4 Proteindetektion

Die Proteindetektion erfolgte in zwei Schritten. Zuerst wurde der Phosphorylierungsstatus des Proteins VASP an der Ser239 Phosphorylierungsstelle detektiert, im Anschluss wurde der Antikörper mittels eines Stripping-Puffers entfernt und das Protein VASP mit einem weiteren Antikörper detektiert, um die Probenladung entsprechend vergleichen zu können.

Zunächst wurden 10 µl des Phospho-VASP Antikörpers (Fa. CellSignaling, Cat. No. 3114) in 10 ml des Blocking-Puffers gelöst. Der Antikörper wurde daraufhin sofort wieder der -20 °C Lagerung zugeführt. So erhielt man eine vom Hersteller empfohlene 1:1000 Verdünnung des Antikörpers. Die Antikörper-Puffer-Lösung wurde auf die blockierte Membran gegeben, welche zuvor dreimal für 10 min mit TBS-T gewaschen wurde. Im Anschluss wurde die Membran bei 4 °C über Nacht mit dem Primäantikörper inkubiert.

Am Folgetag wurde die Membran erneut dreimal für 10 min mit TBS-T gewaschen, währenddessen wurde der Sekundäantikörper (Goat Anti-Rabbit, Fa. ThermoFisher Scientific, Cat. No. 31340) im Verhältnis 1:5000 im Blocking-Puffer gelöst. Dann erfolgte die Inkubation für 1 Stunde bei Raumtemperatur. Der oben genannte Waschschrift wurde nach der Inkubation wiederholt.

Zur Detektion der Proteinmenge bzw. Menge des phosphorylierten Proteins mittels Chemolumineszenz wurde Luminol auf die Membran gegeben, welches von der Meerrettich-Peroxidase, die an den Sekundäantikörper gekoppelt ist, umgesetzt werden kann. Im Anschluss wurde die Membran in 10 Sekundenschritten aufsteigend bis zu einer Dauer von 180 Sekunden belichtet.

Nach der Detektion des Phosphorylierungsstatus an Ser239 wurde die Membran mit einem Stripping-Puffer für 15 min bei 37 °C inkubiert. Der Erfolg des Strippings wurde kontrolliert, indem die Membran nach der Prozedur nochmals mit Luminol behandelt und belichtet wurde. Wenn sich zu diesem Zeitpunkt noch Antikörper auf der Membran befand, wurde das Stripping entsprechend wiederholt. Konnte so kein Antikörper mehr nachgewiesen werden, wurde die Membran erneut mit der Blocking-Lösung für 2 Stunden bei Raumtemperatur blockiert und so auf die Inkubation mit dem VASP Antikörper (Fa. CellSignaling, Cat. No. 3112) vorbereitet.

Die Schritte zum Nachweis des Proteins VASP unterschieden sich nicht von dem Nachweis des Phosphorylierungsstatus des Proteins, sodass hier bezüglich der Antikörperkonzentrationen und Inkubationszeiten auf die oben genannten Informationen verwiesen wird.

2.3 Studie zur Untersuchung des Einflusses von Glyceroltrinitrat auf die Nitrit- / Nitratspiegel im Plasma und in Erythrozyten – „GTN Studie“

2.3.1 Probandenauswahl und Einwilligung

Die Probanden wurden im Rahmen der Studie „Der Einfluss von Nitroglyzerin auf das erythrozytäre Signalling und die Erythrozytenfunktion“ gewonnen. Im Rahmen der Aufklärung gaben alle Probanden ihr schriftliches Einverständnis zur Studienteilnahme gemäß den Richtlinien der Deklaration von Helsinki. Angeworben wurden junge, volljährige, gesunde Probanden. Als Ausschlusskriterien wurden Schwangerschaft, Überempfindlichkeit gegen GTN und Neigung zur Hypotension definiert. Die Abbruchkriterien waren ein Auftreten der Ausschlusskriterien, sowie Widerruf der Einwilligung des Probanden oder Non-Compliance. Vorab wurde bei der zuständigen Ethikkommission ein Antrag gestellt (Studiennummer 4742R), gegen welchen keine ethischen oder rechtlichen Bedenken bestanden.

2.3.2 Studienablauf

Nach der Anlage einer 20 G Venenverweilkanüle, die der vereinfachten und schnelleren Gewinnung der Blutproben diene, sowie 15-minütigem Ausruhen in Rückenlage, wurden die basalen Parameter erhoben. Diese bestanden aus der Messung des Diameters der A. brachialis und einer Blutentnahme zur Gewinnung von Proben für die spätere Verarbeitung und Analyse im Labor. Ebenso wurde der arterielle Blutdruck erfasst.

Im Anschluss wurde den Probanden 0,8 mg Glyceroltrinitrat, entsprechend zwei Hüben Nitrolingual akut Spray sublingual verabreicht und die oben genannte Parameter wurden erneut nach 1, 3, 5, 7, 10 und 15 min erhoben. Der Untersuchungsablauf wird in Abbildung sechs dargestellt.

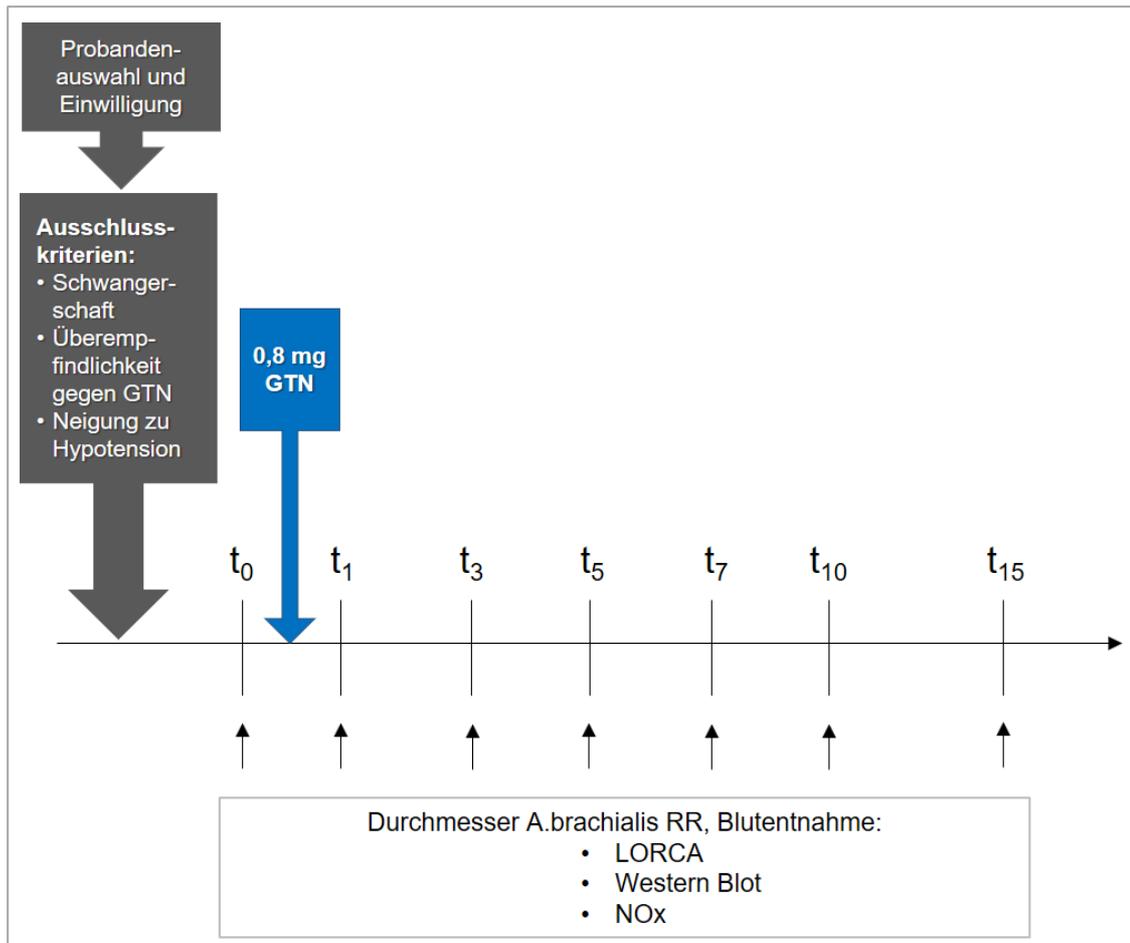


Abb. 6: Der Studienablauf im Überblick

2.3.3 Messung des Diameters der A. brachialis („Nitro-vermittelte Vasodilatation“)

Zur Erfassung des Durchmessers der A. brachialis wurde ein handelsübliches Ultraschallgerät (Fa. GE) mit einem Linearschallkopf verwendet. Nach dem Auffinden der Arterie wurde die entsprechende Stelle mittels eines Filzstiftes auf der Haut markiert, um zu gewährleisten, dass die Messung zu den verschiedenen Zeitpunkten an der gleichen Stelle erfolgt. Die entsprechenden Videosequenzen des Ultraschallgeräts wurden auf einer externen Festplatte zur weiteren Auswertung an einem PC gespeichert. Dort wurde die Videosequenz mittels der Software „Brachial Analyzer“ der Fa. Medical Imaging Applications LLC auf eine entsprechende Vasodilatation hin untersucht. Hierzu wird die Software zunächst kalibriert, indem man anhand einer Skala das Maß 1 cm einstellt. Im Anschluss ist die Software in der Lage, die entsprechenden Gefäßinnenwände im Ultraschall automatisiert zu erkennen und den entsprechenden Durchmesser zu erfassen.

2.3.4 Blutentnahme und Verarbeitung im Labor

Die hier gezeigte Abbildung sieben soll die verschiedenen Verarbeitungsschritte zur besseren Übersicht darstellen, sie entstammt dem Studienprotokoll.

Nach der Anlage einer 20 G Venenverweilkanüle wurden mit einer Spritze zunächst 1,5 ml Vollblut, im Anschluss wurde zudem ein Citratröhrchen und ein EDTA Röhrchen entnommen. Diese Proben wurden an eine weitere Person übergeben, welche die Verarbeitung der Proben im Labor gewährleistete. Das mit der Spritze entnommene Vollblut wurde zeitnah in ein heparinisiertes (2 µl Heparin auf 2 ml Vollblut) Mikroreaktionsgefäß gegeben, welches dann mehrmals über Kopf gedreht wurde, um eine ausreichende Durchmischung zu gewährleisten. Nachdem 10 µl Vollblut für eine weitere FACS Analyse abpipettiert wurden, wurde der Rest des Aliquots 10 min bei 800 g und 4 °C zentrifugiert. Das so gewonnene Plasma wurde in zwei weitere Aliquots aufgeteilt und mittels flüssigen Stickstoffs schockgefroren.

Das Erythrozyten-*Pellet* wurde zur weiteren Aufreinigung mit 1 ml PBS/Sildenafil aufgefüllt und bei 300 g, 4 °C, 10 min zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde insgesamt zweimal durchgeführt, bevor auch das aufgereinigte *Pellet* in flüssigem Stickstoff gefroren wurde.

Das ebenso gewonnene Citratröhrchen wurde zur Gewinnung eines plättchenreichen Plasmas bei 150 g 10 min bei 4 °C zentrifugiert, im Anschluss wurde das Plasma aus dem Überstand in flüssigen Stickstoff überführt.

Mit den so gewonnenen Erythrozyten wurde die Verformbarkeit mittels Laser-assisted Optical Rotational Cell Analyzer (LORCA) gemessen.

Das EDTA Blut wurde bei 800 g 10 min bei 4 °C zentrifugiert, im Anschluss wurde das Plasma aus dem Überstand vom Erythrozyten-*Pellet* getrennt und beide Aliquots in flüssigen Stickstoff überführt.

Nachdem alle Blutentnahmen des Tages durchgeführt wurden, wurden die in Stickstoff gelagerten Proben in einen Karton überführt und bis zu ihrer weiteren Analyse in einem -80 °C Eisfach gelagert.

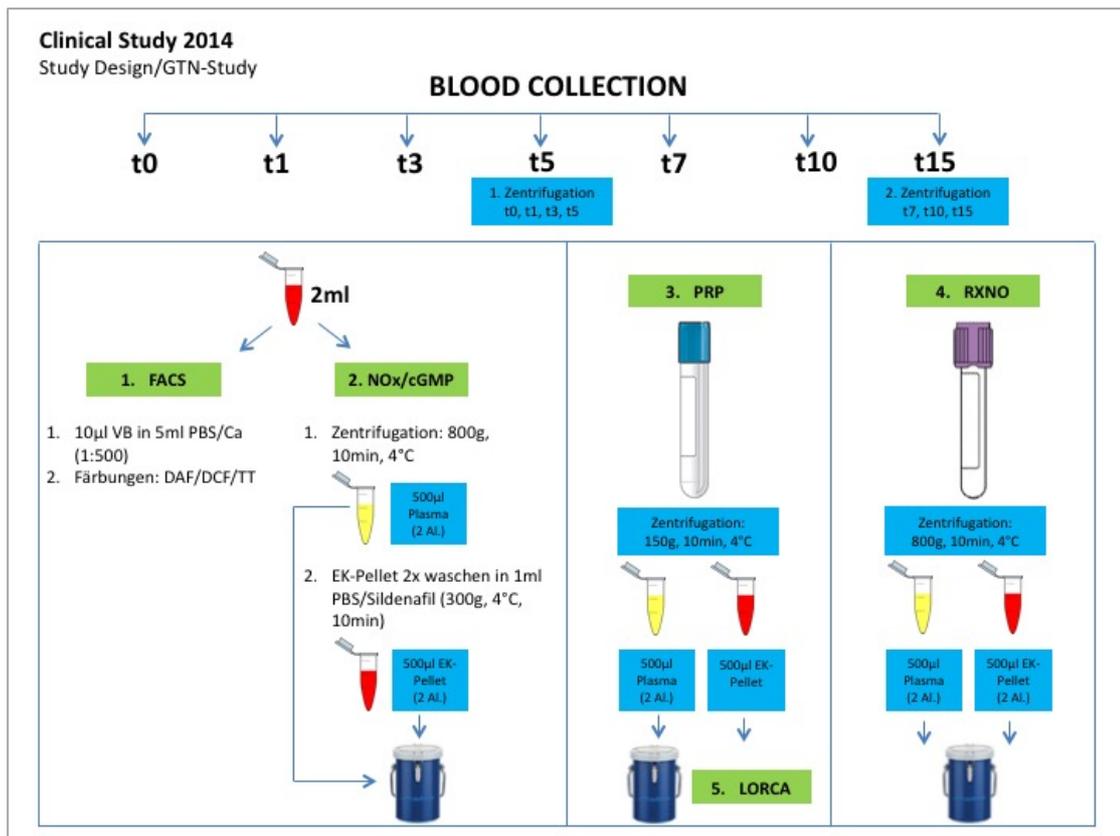


Abb. 7: Die verschiedenen Verarbeitungsschritte des Studienprotokolls im Überblick

2.3.5 Messung der erythrozytären Verformbarkeit mittels Laser-assisted Optical Rotational Cell Analyzer (LORCA)

Die Messung der erythrozytären Verformbarkeit mittels des LORCA beruht auf dem Prinzip der Ektacytometrie. Zunächst wird die später verwendete Polyvinylpyrrolidone (PVP) Lösung auf eine einheitliche Temperatur mittels eines Wasserbades gebracht. Die Temperatur wurde für unsere Experimente bei 37 °C gewählt, da der Hersteller der Lösung für diese Temperatur einen Viskositätswert angibt, welcher im Anschluss in den Geräteeinstellungen hinterlegt werden muss.

Nach Erwärmen der Lösung und Entnahme des Blutes wurden 20 µl Vollblut, welches zuvor mit Citrat, EDTA oder Heparin antikoagulierte wurde in 5 ml der isoosmolaren PVP Lösung gelöst, diese Suspension wurde im Anschluss mit einer Pipette in einen Spalt zwischen einem feststehenden inneren Zylinder („bob“) und einem sich drehenden äußeren Zylinder („cup“) pipettiert. Durch die Rotation wird die Suspension einer Schubspannung ausgesetzt, die im Laufe der Messung durch das Gerät automatisiert gesteigert wird. Die anzuwendende Schubspannung lässt sich in den Geräteeinstellungen zwischen 0,1-100 Pa variieren. Wir entschieden uns für eine Bandbreite von anfänglich

0,1 Pa bis zu 10 Pa, da dies am ehesten den physiologischerweise im Gefäß vorhandenen Schubspannungen entspricht.

Zur Bestimmung der Verformbarkeit wird ein Laserstrahl durch die Suspension auf einen kleinen Bildschirm projiziert, von welchem eine Kamera auf diese Weise die entstehenden Änderungen des Diffraktionsmusters erfassen kann. Der Computer berechnet im Anschluss die am besten passende Ellipse (sog. „curve fit“), aus der dann die horizontale („B“) und vertikale („A“) Achse bestimmt wird. Der Elongationsindex wird durch das Programm mittels der Formel $EI = \frac{A-B}{A+B}$ automatisiert berechnet und anhand einer Verformbarkeitskurve dargestellt, bei welcher der EI (y-Achse) gegen τ (Pa, x-Achse) aufgetragen wird.

Nach Beendigung der Messung erstellt die Software des Gerätes eine Excel-Tabelle, aus derer man die verschiedenen Elongationsindices kopieren kann. Zusätzlich zur Verformbarkeit der Erythrozyten ist es möglich, die Aggregation und die Stabilität der Erythrozyten mit Hilfe des LORCA zu bestimmen. Diese Option sei jedoch nur beiläufig erwähnt, da diese Messungen nicht Bestandteil dieser Arbeit sind.

2.3.6 Messung der Nitrit- und Nitratkonzentration im Blutplasma

Die Messung der Nitrit- und Nitratkonzentrationen im Blutplasma erfolgte mit einem Hochleistungsflüssigkeitschromatographen (HPLC) der Fa. EICOM (ENO-20).

Hierzu wurden die eingefrorenen Proben zunächst auf Eis überführt und in das Labor transportiert.

Nach dem Auftauen der Proben wurden diese 1:1 mit eiskaltem Methanol gefällt und im Anschluss bei 14000 g, 15 min bei 4 °C zentrifugiert. Der so gewonnene Überstand wurde in ein neues Mikroreaktionsgefäß überführt und in einen Autoinjektor gestellt, der zuvor auf 4 °C gekühlt wurde. Dieser Autoinjektor ist mit dem Flusssystem des HPLC verbunden, sodass die Proben automatisiert angesaugt und durch das System geleitet werden. Durch das Flusssystem fließt kontinuierlich eine sogenannte Carrierlösung, in welche die zu messende Probe aufgenommen wird und zunächst eine Vorsäule passiert. In dieser Vorsäule werden Proteine, die nach Fällung und Zentrifugation evtl. noch in der Probe vorhanden sind, herausgefiltert.

Nach der Vorsäule passiert die Probe die Trennsäule, in der NO_2^- und NO_3^- aufgrund ihrer Größe aufgetrennt werden, sodass im weiteren Verlauf zunächst das NO_2^- , gefolgt von NO_3^- eine Reduktionssäule passiert. In dieser Komponente des Geräts wird NO_3^- in einer Reaktion mit Cadmium und reduziertem Kupfer zu NO_2^- reduziert. NO_2^- hingegen passiert die Reduktionssäule ohne Reaktion.

Nach der Reduktion reagiert NO_2^- mit einer Reaktionslösung, dem Griess-Reagenz, die in einem Reaktionsschlauchsystem hinzugegeben wird. Bei dieser Reaktion entsteht eine Diazoverbindung, deren Extinktion bei 540 nm gemessen werden kann und in ein Spannungssignal umgewandelt wird, welches durch die Software dargestellt wird.

Zur Bestimmung der Konzentrationen in den Proben, wird eine standardisierte Lösung mit einer äquimolaren Menge Nitrit und Nitrat (10 nM) angefertigt, deren, durch das Gerät bestimmte, *Area Under Curve (AUC)* als Standard definiert wird. Mit Hilfe der Formel $c(\text{Probe}) = \frac{AUC(\text{Probe})}{AUC(\text{Standard})} \times 10 \text{ nM}$ kann so die Konzentration der Probe bestimmt werden.

2.4 Untersuchung der NO Bioverfügbarkeit bei Patienten mit kardiovaskulärer Erkrankung im Rahmen der Studie „Regulation und Signalling der RBC-eNOS in Patienten mit stabiler und instabiler koronarer Herzerkrankung“

2.4.1 Probandenauswahl und Einwilligung

Die untersuchten Probanden wurden im Rahmen der Studie „Regulation und Signalling der RBC-eNOS in Patienten mit stabiler und instabiler koronarer Herzerkrankung“ gewonnen, für die ebenfalls vorab ein Antrag bei der zuständigen Ethikkommission gestellt wurde (Studennummer 4460), gegen den keine ethischen und rechtlichen Bedenken bestanden. Gewonnen wurden männliche und weibliche Probanden zwischen 40-70 Jahren aus dem Patientenkollektiv der Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie des Universitätsklinikums Düsseldorf. Nach der Anamnese und Aufklärung über die Untersuchung gaben alle Probanden ihre schriftliche Einwilligung gemäß den Richtlinien der Deklaration von Helsinki. Anschließend teilte man die Probanden einer der drei Gruppen „stable CAD“, „ACS“ und „healthy“ zu. Die Gruppe „ACS“ umfasste hierbei Patienten mit einer instabilen Angina Pectoris (AP) und Patienten mit einem low-risk NSTEMI, welche sich im Verlauf einer elektiven Intervention unterzogen. Als

instabile AP wurde in Anlehnung an die Definition der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie ein Zustand definiert, bei dem kein erhöhtes Troponin T im Blut der Probanden nachweisbar war und keine signifikanten ST-Hebungen im EKG sichtbar, jedoch eine entsprechende Symptomatik bzw. eine angiographisch gesicherte signifikante Koronarstenose bestand. Als NSTEMI wurde ein Zustand definiert, bei dem das Troponin T der Patienten im Blut erhöht war und ebenfalls keine signifikanten ST-Hebungen im EKG zu erkennen waren, jedoch eine entsprechende Symptomatik zu eruieren war.

In die Gruppe „stable CAD“ wurden Probanden eingeteilt, welche eine angiographisch gesicherte koronare Herzerkrankung aufwiesen und kein akutes Koronarsyndrom in den letzten drei Monaten vorlag.

Die Gruppe „healthy“ bestand aus Probanden, bei denen klinisch oder angiographisch kein Hinweis auf eine manifeste Arteriosklerose bestand.

Die Patienten wurden in die Studie eingeschlossen, sofern keine der folgenden Ausschlusskriterien vorlagen:

- Akute Entzündung (CRP > 1 mg/dl, Erhöhung der Leukozyten > 11.000/ μ l)
- Maligne Erkrankungen
- Schwangerschaft
- Einnahme medikamentöser NO-Donatoren
- Patienten mit STEMI oder high-risk NSTEMI, bei denen eine sofortige Intervention nötig ist
- Diabetes mellitus (HbA1c < 6,5 %)
- Niereninsuffizienz (normwertiges Creatinin)
- Hochgradige Klappenerkrankungen
- Hochgradige Einschränkung der linksventrikulären Pumpfunktion

Als Abbruchkriterien dienten neben dem Auftreten der o.g. Ausschlusskriterien ein Entzug der Einwilligungskriterien und eine Non-Compliance der Patienten.

Den Probanden wurde im Anschluss eine Probandennummer zugewiesen und diese so anonymisiert. Abbildung acht soll einen Überblick über die Gruppenzuordnung geben.

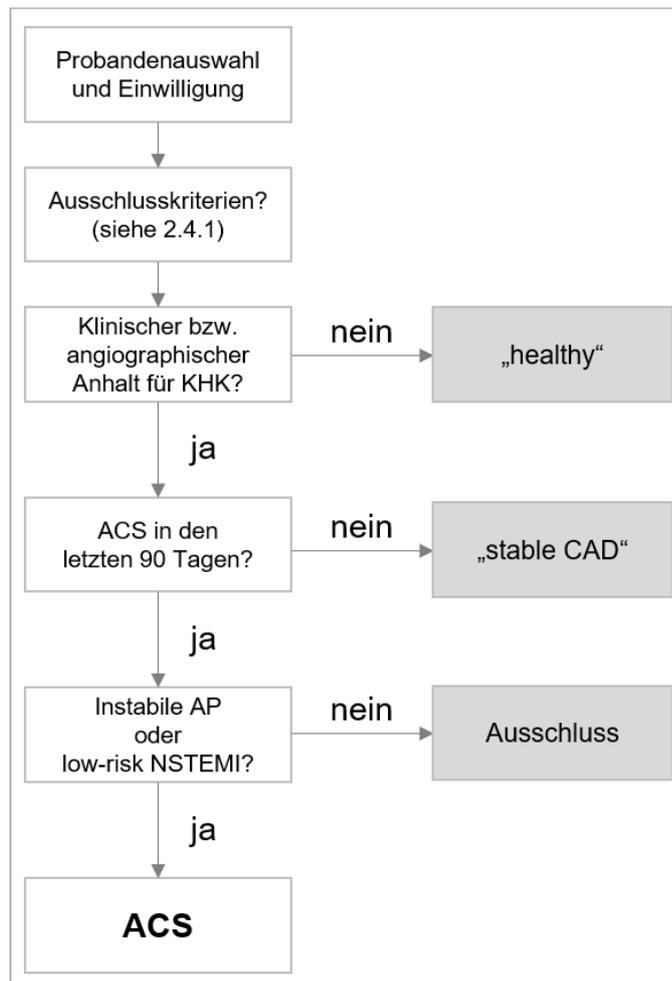


Abb. 8: Rekrutierungsdiagramm der Studie „Regulation und Signalling der RBC-eNOS in Patienten mit stabiler und instabiler koronarer Herzkrankung“

2.4.2 Studiendesign

Bei der Studie handelte es sich um eine monozentrische, kontrollierte Querschnittstudie, bei der der eNOS Signaltransduktionsweg in gesunden Patienten mit Patienten verglichen werden sollte, die unter einer koronaren Herzkrankheit leiden. Zusätzlich zum Querschnittsvergleich der drei Gruppen zum Zeitpunkt 0 sollte in einer Subgruppenanalyse der Gruppe „ACS“ zusätzlich der Verlauf vor und nach einer Katheterintervention beurteilt werden. Hierzu wurden Blutproben zusätzlich zum Zeitpunkt 0 nach 1, 3 und 90 Tagen entnommen und aufbereitet.

2.4.3 Herstellung einer Konservierungslösung für die Messung von Nitrit in Erythrozyten

Um Reaktionen des Nitrits mit dem intraerythrozytär vorhandenen Oxyhämoglobin und damit die Bildung von Nitrat und Methämoglobin zu verhindern, wurden die Erythrozyten-*Pellets* unmittelbar nach ihrer Gewinnung mit einer Konservierungslösung versetzt. In der Lösung befindet sich Ferricyanid, welches das vorhandene Oxyhämoglobin in Methämoglobin überführt. Des Weiteren dient N-Ethylmaleinimid der Alkylierung von Thiolen, sodass keine Nitrosothiole gebildet werden können. Die Reagenzien trugen also dazu bei, das in der Probe vorhandene Nitrit zu stabilisieren und die Erythrozyten zu lysieren.

Für die Herstellung der eingesetzten Lösung wurden 250 μl Ferricyanidlösung (800 mM) mit 2000 μl N-Ethylmaleinimidlösung (200 mM) und 200 μl Diethylentriaminpentaessigsäure (10 mM) gemischt und das Gemisch anschließend mit 17350 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ aufgefüllt.

Die so hergestellte Lösung wurde bis zu sieben Tage lang benutzt und darüber hinaus verworfen.

2.4.4 Probenentnahme

Nach Einholung der schriftlichen Einverständniserklärung der Probanden legten diese sich flach auf den Rücken und es wurde mit der Vorbereitung der Entnahme begonnen. Zunächst wurde der arterielle Blutdruck mittels einer handelsüblichen Blutdruckmanschette erfasst und protokolliert. Im Anschluss startete die Blutentnahme mittels eines handelsüblichen Entnahmebestecks. Hierbei wurden zur Analyse im Zentrallabor jeweils ein Serum- und ein EDTA-Entnahmeröhrchen abgenommen und an das Zentrallabor der Universitätsklinik Düsseldorf geschickt.

Für die Analysen, die Bestandteil dieser Arbeit sind, wurden mittels einer Spritze 5 ml Vollblut entnommen und diese unmittelbar in ein Polypropylenröhrchen überführt, in welches zuvor 5 μl Heparin zur Antikoagulation gegeben wurden. Dieses Gemisch wurde im Anschluss mehrmals vorsichtig geschwenkt, um eine gute Durchmischung zu gewährleisten. Im direkten Anschluss wurde das Polypropylenröhrchen bei 800 g und 4 °C 10 min zentrifugiert, um die einzelnen Phasen danach zu aliquotieren. Hierbei wurden drei bis vier Aliquots Plasma zu je 500 μl pipettiert und sofort in flüssigen Stickstoff

gelegt. Anschließend wurde der Rest des Plasmas sowie der *Buffy Coat* verworfen und zwei Aliquots 100 μl Erythrozyten-*Pellet* mit 666 μl einer Konservierungslösung (s.o.) versetzt, sowie drei bis vier Aliquots reines Erythrozyten-*Pellet* zu je 500 μl pipettiert und in flüssigen Stickstoff gelegt.

Die Proben wurden im Anschluss bis zur weiteren Analyse bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Abbildung neun zeigt eine Übersicht der Verarbeitung und Aliquotierung der entnommenen Blutproben. Für die spätere Bestimmung der Nitritkontamination in der benutzten Konservierungslösung wurde am Tag der Probenentnahme jeweils ein Aliquot mit reiner Konservierungslösung eingefroren.

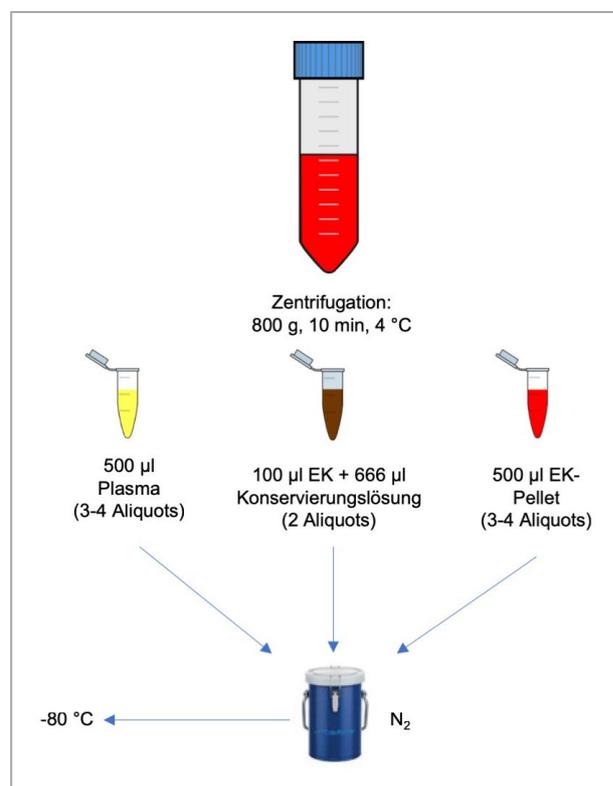


Abb. 9: Die Probenaufbereitung nach Blutentnahme

2.4.5 Probenaufbereitung für die Messung der Nitritspiegel im Plasma und in Erythrozyten

Die Plasmaproben, in denen das Plasmanitrit bestimmt werden sollten, wurden lichtgeschützt auf Eis aufgetaut und direkt mittels Chemilumineszenzdetektion gemessen (siehe unten). Für die Bestimmung der Nitritwerte in Erythrozyten wurden jene *Pellets* lichtgeschützt auf Eis aufgetaut, welche zuvor zusammen mit der Konservierungslösung eingefroren wurden sowie die Aliquots, welche die Konservierungslösung des jeweiligen

Tages enthielten. Im Anschluss wurden die Proben 1:1 mit Methanol gefällt und 15 min bei 14000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Mikroreagiergefäß pipettiert und mittels Chemilumineszenzdetektion gemessen.

2.4.6 Messung der Nitritspiegel im Blutplasma und in Erythrozyten mittels Chemilumineszenzdetektion (CLD)

Die Chemilumineszenzdetektion stellt eine äußerst sensitive und spezifische Methode zur Detektion von Stickstoffmonoxid und dessen Metaboliten dar (Piknova and Schechter 2011). Das Messprinzip beruht auf der Erfassung von Lichtquanten, welche bei der Reaktion von NO mit Ozon entstehen. Die Intensität der so entstandenen Lichtquanten ist direkt proportional zur Menge des in der Probe enthaltenen Stickstoffmonoxids. Für diese Arbeit wurden die Messungen mittels des CLD 88e Analysators der Firma Eco Physics durchgeführt. Das Messsystem besteht aus einem Reaktionsgefäß, das von 60 °C heißem Wasser umströmt wird und in ein Kühlgefäß übergeht, welches wiederum von 4 °C kaltem Wasser umströmt wird. Von unten durchströmt ein Trägergas (in diesem Fall Helium, möglich ist aber auch jedes andere Edelgas) die Reaktionslösung im Reaktionsgefäß, strömt dann weiter über das erste Kühlgefäß in eine NaOH-Falle. In dieser befindet sich eine auf 4 °C gekühlte 1 M NaOH Lösung. Dann gelangt das Gasgemisch in einen Schlauch, der das Trägergas zusammen mit dem im Reaktionsgefäß entstandenen NO zur Reaktionskammer des eigentlichen Analysators leitet. In den beiden gekühlten Kammern werden Säuren, höhere Stickoxide und Proteine aus dem Gasgemisch abgefangen.

Vor dem Beginn der eigentlichen Messung wurde das System eingeschaltet und bis zur Stabilisierung der Baseline gewartet.

2.4.6.1 Vorbereitung der Reaktionslösungen

Für die Messung der Nitritkonzentrationen im Plasma und in Erythrozyten wurde eine entsprechende Reduktionslösung vorbereitet, in welche die Proben später zur Messung injiziert wurden. Diese Reduktionslösung bestand aus folgenden Komponenten:

- 0,81 g Kaliumiodid (45 mM)
- 0,285 g Jod (10 mM)
- 7,5 ml H₂O_{dd}

- 100 ml Essigsäure (1 M)

Das Kaliumiodid und Iod wurden mittels eines Ultraschallbades (15 min) im Wasser gelöst, im Anschluss wurde die Essigsäure hinzugegeben. Von dieser Lösung wurden 40 ml in das Reaktionsgefäß des CLD gegeben.

2.4.6.2 Erstellung der Standardreihe

Um Referenzwerte für die spätere Auswertung zu erhalten, musste eine Nitritstandardreihe in dem Medium pipettiert werden, in dem die zu messenden Proben gelöst waren. Für die Messung der Nitritspiegel im Plasma wurde diese Standardreihe in PBS angefertigt, für die Messung der Spiegel in Erythrozyten wurde die oben beschriebene Konservierungslösung als Basis für die Standardreihe verwendet. Zunächst wurde Nitrit in dem jeweiligen Medium so gelöst, dass eine 1 M Lösung entstand. Diese wurde im Anschluss im korrespondierenden Medium so verdünnt, dass man eine Reihe mit den Konzentrationen 0, 50, 100, 150, 200 nM erhielt.

2.4.6.3 Messung der Proben

Für die Messung der Proben wurden 10 µl dieser mittels einer Glasspritze in das Reaktionsgefäß des Systems injiziert. Jede der Proben wurde insgesamt dreimal gemessen und der ermittelte Mittelwert für die Auswertung herangezogen.

In der Reduktionslösung wird nun das vorhandene Nitrit zunächst zu einem Nitrosoniumion reduziert, welches anschließend mit dem vorhandenen Iodid zu NO reagiert.

Das so gebildete NO durchströmt zusammen mit Helium das erste Kühlgefäß, im Anschluss die NaOH-Falle und gelangt dann über ein Schlauchsystem in die Reaktionskammer des Analysators. Hier reagiert das vorhandene NO mit Ozon unter der Entstehung von Lichtquanten, welche durch den Analysator in ein elektrisches Signal umgewandelt werden. Dieses Signal wird dann an einen PC weitergeleitet, der die Ergebnisse mittels des Programms eDAQ PowerChrom in Form von Kurven darstellt. In dem Programm wird anschließend die Area Under Curve (AUC) bestimmt und auf den eingemessenen Standard bezogen (siehe Abschnitt 2.1.6). Die Standardreihe wurde vor allen Messungen des Tages eingemessen und eine Kurve aus den Werten erstellt. Ab

einem Bestimmtheitsmaß von $r = 0,98$ wurden die Werte für die Messung der Proben akzeptiert.

2.5 Statistische Auswertung

Die Sammlung der gewonnenen Daten erfolgte zunächst in Microsoft Excel 2011 für Mac. Für die statistische Auswertung dienten die Programme Graphpad Prism 6 und SPSS Statistics 22. Aufgrund der Größe der Stichproben wurden, falls nicht anders gekennzeichnet, non-parametrische Testverfahren verwendet (Mann-Whitney-U Test, sowie Friedman-Test). Als Posthoc-Test diente der Dunn-Test. Ergebnisse wurden als statistisch signifikant bewertet, wenn der p-Wert kleiner oder gleich 0,05 war.

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchung des NO-Signalweges *in vitro*

3.1.1 Phosphorylierungsstatus des Vasodilatator-stimulierten Phosphoproteins (VASP)

Ziel der Untersuchung war zunächst im Sinne eines „*Proof of Concept*“ das Protein VASP in Erythrozyten nachzuweisen um im Anschluss zu untersuchen, ob eine Stimulation von aufgereinigten Erythrozyten *in vitro* mittels NO und Stimulatoren der löslichen Guanylatcyclase zu einer vermehrten Phosphorylierung des Proteins VASP durch die vermehrte Aktivierung des NO-Signalweges führt. Wie in Abbildung zehn zu erkennen, ließ sich das Protein VASP nach entsprechender Aufreinigung des *Pellets* und Auftrennung im Western Blot deutlich anfärben. Der Nachweis des Proteins VASP diente gleichzeitig zur Interpretation des Phosphorylierungsstatus im Sinne einer Ladekontrolle. Abbildung elf verdeutlicht, dass eine entsprechende Stimulation mittels DEANO zu einer leicht vermehrten Phosphorylierung an Ser239 führte, verstärkt wird der Effekt, wenn die Erythrozyten zusätzlich zur DEANO Stimulation mit dem sGC Aktivator BAY 41-2272 behandelt wurden. Als Positivkontrolle dient in diesem Fall die Stimulation der Erythrozyten mittels 8-CPT-cGMP, einem cGMP Derivat, welches die Zellmembran sehr gut penetrieren kann und intrazellulär zu einer Aktivierung der cGMP-abhängigen Proteinkinase führt.

Zusammenfassend ließ sich das Protein VASP in Erythrozyten nach der Aufreinigung nachweisen. Eine Behandlung mittels DEANO führte zu einem Anstieg der Phosphorylierung, ebenso wie die simultane Behandlung des *Pellets* mit DEANO und BAY 41-2272.



Untersuchung bei n = 6 Probanden, dargestellt ist die Western Blot Membran nach der Anfärbung mittels eines Merrettich Peroxidase Substrats bei einer Belichtungszeit von 140 Sekunden, CTRL = Erythrozyten, welche ausschließlich mit Sildenafil behandelt wurden, cGMP: Erythrozyten, welche mit 8-pCPT-cGMP stimuliert wurden (Positivkontrolle)

Abb. 10: VASP lässt sich im *in vitro* Versuch in Erythrozyten nachweisen



Untersuchung bei $n = 6$ Probanden, dargestellt ist die Western Blot Membran nach der Anfärbung mittels eines Merrettich Peroxidase Substrats bei einer Belichtungszeit von 140 Sekunden, CTRL = Erythrozyten, welche ausschließlich mit Sildenafil behandelt wurden, cGMP: Erythrozyten, welche mit 8-pCPT-cGMP stimuliert wurden (Positivkontrolle)

Abb. 11: *In vitro* Stimulation von Erythrozyten mittels DEANO und BAY 41-2272 führt zu einer vermehrten Phosphorylierung an Ser239

3.2 Untersuchung des NO-Signalweges *in vivo*

Nach Einholung des schriftlichen Einverständnisses wurden bei einer Anzahl von $n = 6$ Probanden zunächst die Parameter Blutdruck, Herzfrequenz und Gefäßdiameter zum Ausgangszeitpunkt erhoben. Im Anschluss wurde den Probanden sublingual 0,8 mg Nitroglyzerin (GTN) verabreicht. Die hier dargestellten Untersuchungen und Parameter wurden zum Zeitpunkt nach 1, 3, 5, 7, 10 und 15 min durchgeführt beziehungsweise erhoben. Aufgrund einer abnahmebedingten Hämolyse mussten die asservierten Proben eines Probanden von der weiteren Analyse ausgeschlossen werden.

3.2.1 Baseline Charakteristika

Am Zeitpunkt 0 wurden zunächst die Gefäßdiameter der A. brachialis ohne GTN Einfluss sowie der Blutdruck und die Herzfrequenz erhoben. Wie Tabelle sechs zu entnehmen lag der durchschnittliche arterielle Blutdruck der Probanden bei $\approx 124/71$ mmHg und somit im physiologischen Normbereich. Die Herzfrequenz zum Ausgangszeitpunkt lag im Mittel bei $\approx 60 \pm 12$ Schläge pro Minute, der Gefäßdurchmesser der A. brachialis lag bei den Probanden zum Zeitpunkt 0 bei $\approx 4,34$ mm.

Baseline Charakteristika

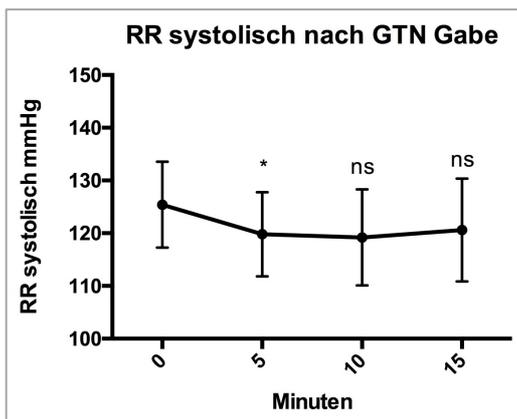
	N	Mittelwert	Standardabweichung
RR systolisch in mmHg	6	124,17	7,89
RR diastolisch in mmHg	6	70,67	3,78
Herzfrequenz in Schläge/min	6	59,83	12,38
Gefäßdiameter in mm	6	4,35	0,49

Tabelle 6: Arterieller Blutdruck, Herzfrequenz und Durchmesser der A. brachialis zum Ausgangszeitpunkt

3.2.2 Hämodynamik

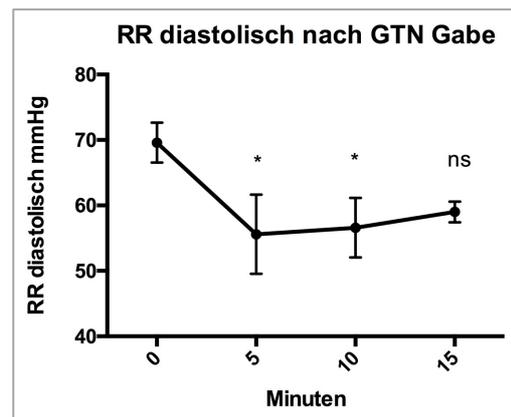
Zum Zeitpunkt 0 sowie 5, 10 und 15 min nach GTN Gabe wurde der Blutdruck sowie die Herzfrequenz der Probanden erfasst, die Abbildungen 12, 13 und 14 stellen den systolischen und diastolischen Blutdruck sowie die Herzfrequenz über die verschiedenen Zeitpunkte dar.

Der systolische Blutdruck der Probanden fiel 5 min nach der Gabe von GTN signifikant ab auf einen durchschnittlichen Wert von 119,8 mmHg, nach 10 min kehrten die Werte wieder auf ein Niveau zurück, welches sich nicht signifikant vom Ausgangswert (124,17 mmHg) unterschied. Beim diastolischen Blutdruck ließ sich zum zweiten Messzeitpunkt nach 5 min ebenso ein signifikanter Abfall auf einen Mittelwert von 55,6 mmHg feststellen. 10 min nach GTN Gabe war der diastolische Blutdruck weiterhin signifikant niedriger als der Ausgangswert. Nach 15 min normalisierten sich die diastolischen Blutdrücke wieder. Der diastolische Blutdruck fiel in den Untersuchungen nach 5 Minuten im Mittel um etwa 20 % ab, wohingegen der systolische Blutdruck nur um etwa 4 % abfiel. Die erfassten Werte für die Herzfrequenz änderten sich über den gesamten Messzeitraum nicht signifikant zum Ausgangswert von 59,83 Schlägen pro Minute. Zusammenfassend führte die sublinguale Gabe von GTN zu einem signifikanten Abfall des systolischen und diastolischen Blutdrucks, wobei der Effekt auf den diastolischen Blutdruck größer und längerfristiger war.



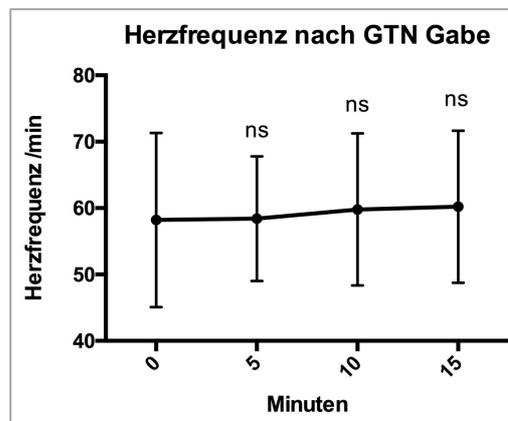
Untersuchung bei n=5 Probanden, * = $p < 0,05$,
Testverfahren: Friedman-Test, Posthoc Test:
Dunn-Test

Abb. 12: Sublingual verabreichtes GTN führt zu einem signifikanten Abfall des systolischen Blutdrucks



Untersuchung bei n=5 Probanden, * = $p < 0,05$,
Testverfahren: Friedman-Test, Posthoc Test:
Dunn-Test

Abb. 13: Sublingual verabreichtes GTN führt zu einem signifikanten Abfall des diastolischen Blutdrucks



Untersuchung bei n=5 Probanden, * = $p < 0,05$,
Testverfahren: Friedman-Test, Posthoc Test: Dunn-Test

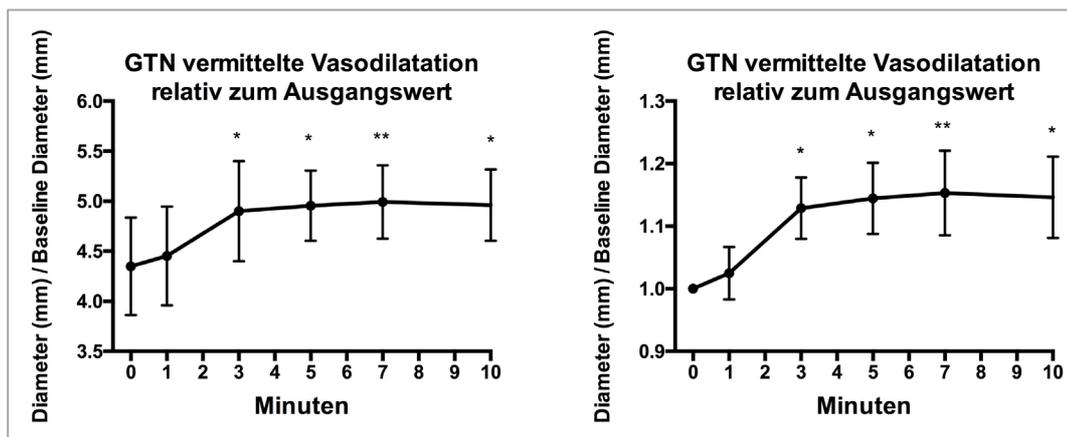
Abb. 14: Sublingual verabreichtes GTN führt nicht zu einer Veränderung der Herzfrequenz

3.2.3 GTN vermittelte Vasodilatation

Ziel war der Nachweis eines gefäßrelaxierenden Effektes des sublingual verabreichten GTN *in vivo*. Abbildung 15 verdeutlicht, dass zum ersten Messzeitpunkt nach 1 min noch kein vasodilatatorischer Effekt nachweisbar war. 3 min nach der Gabe von GTN kam es zu einer signifikanten Vasodilatation des Gefäßes, der durchschnittliche Durchmesser der A. brachialis zum Zeitpunkt 0 betrug 4,35 mm und stieg bis zum Maximum in Minute 7

auf durchschnittlich 4,99 mm an. Betrachtet man die relativen Veränderungen zum Ausgangszeitpunkt, zeigte sich eine Zunahme des Durchmessers um maximal 15,3 % (Minute 7). Im gemessenen Zeitraum ließ sich keine Rückkehr zum Ausgangsniveau beobachten, insofern hielt die GTN vermittelte Vasodilatation mindestens 10 min an.

Das sublingual verabreichte GTN führte zu einer deutlichen Veränderung des Gefäßdurchmessers im Sinne einer Vasodilatation. Die Veränderung trat mit einer Latenz von etwa 3 min auf und erreichte ihr Maximum nach 7 min.

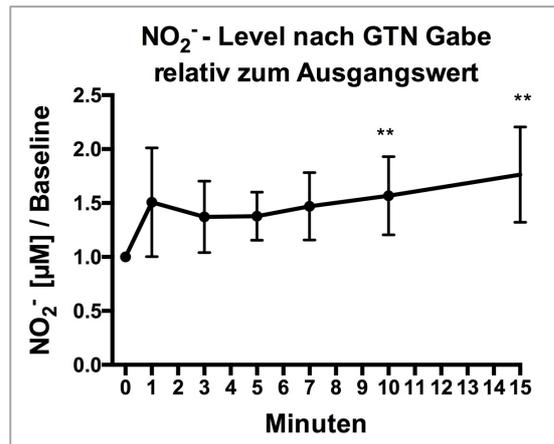


Untersuchung bei n=6 Probanden, links: Absolute Veränderung des Gefäßdurchmessers, rechts: Veränderungen relativ zum Ausgangswert, * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, Testverfahren: Friedman-Test, Posthoc Test: Dunn-Test

Abb. 15: Sublingual verabreichtes GTN führt zu einer messbaren Vasodilatation der A. brachialis

3.2.4 NO_x im Plasma

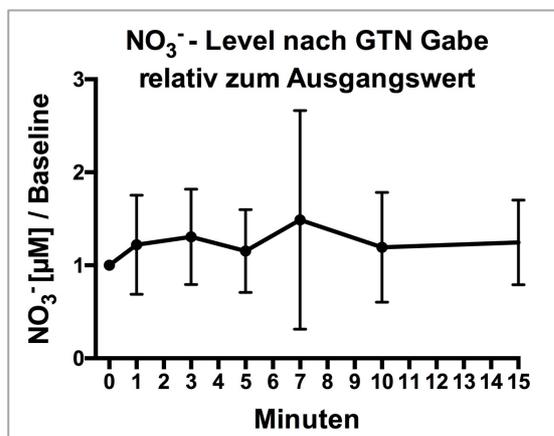
Ausgangspunkt für die Untersuchung war die Hypothese, dass sich sublingual verabreichtes Nitroglycerin auf die Stickstoffmonoxidmetabolite Nitrat und Nitrit im Sinne einer Erhöhung auswirkt. Aus diesem Grund wurden die Proben gemäß Protokoll verarbeitet und die Nitrit- und Nitratspiegel mittels EICOM ENO-20 gemessen. Aufgrund einer abnahmebedingten Hämolyse mussten die Proben eines Probanden verworfen werden, sodass sich die dargestellten Werte auf eine Gruppe von $n = 5$ beziehen. Betrachtet man die Nitritspiegel im Plasma, so zeigte sich bereits eine Minute nach der Administration von GTN eine leichte Anstiegstendenz, die nach 9 min ein statistisch signifikantes Niveau erreichte und sich zum Zeitpunkt 15 min noch weiter steigerte (siehe Abbildung 16). Eine Rückkehr auf das Ausgangsniveau wurde im erfassten Zeitraum von 15 min nicht beobachtet. Somit bewirkte GTN einen Anstieg der NO₂⁻ Spiegel im Plasma, die mit einer Latenz von etwa 9 min auftrat.



Die maximal beobachtete Steigerung zum Ausgangswert betrug 76,3 % zum Zeitpunkt 15 min. Untersuchung bei n = 5 Probanden, abgebildet sind die relativen Veränderungen zum Ausgangswert, Testverfahren: Friedman-Test, Posthoc Test: Dunn-Test, * = p < 0,05, gemessen mittels EICOM ENO-20

Abb. 16: Sublingual verabreichtes GTN führt zu einer messbaren Erhöhung des Nitritspiegels im Blutplasma

Des Weiteren wurden die Nitratspiegel im Blutplasma mit der gleichen Methode erfasst. Wie in Abbildung 17 zu erkennen, zeigte sich im Gegensatz zu den gemessenen Nitritspiegeln hier jedoch kein statistisch signifikanter Anstieg der NO₃⁻ Level im Blutplasma zu den verschiedenen Zeitpunkten.



Untersuchung bei n = 5 Probanden, abgebildet sind die relativen Veränderungen zum Ausgangswert, Testverfahren: Friedman-Test, Posthoc Test: Dunn Test. Keine signifikanten Unterschiede, gemessen mittels EICOM ENO-20

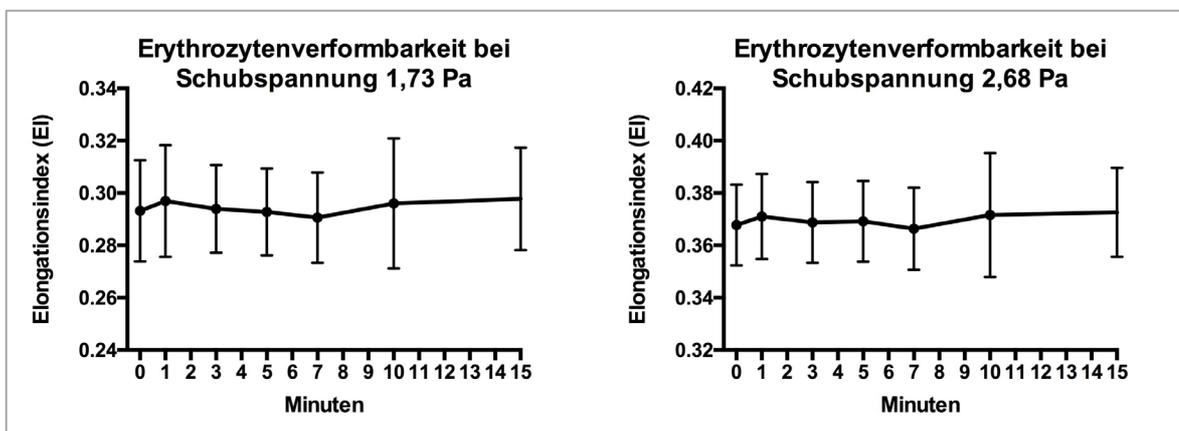
Abb. 17: Sublingual verabreichtes GTN führt nicht zu einer Erhöhung der Nitratkonzentration im Blutplasma

3.2.5 Untersuchung der erythrozytären Verformbarkeit mittels Laser-assisted Optical Rotational Cell Analyzer (LORCA)

Ziel der Untersuchung der Erythrozytenverformbarkeit war die Fragestellung, ob GTN in die Erythrozyten aufgenommen wird und mittels der Aktivierung der NO Signalkaskade zu Veränderungen in der Verformbarkeit der Erythrozyten führt. Hierzu wurde der Elongationsindex der Erythrozyten mit einem laserbasierten Testverfahren (LORCA) untersucht. Auffällig in den Untersuchungen war eine relativ breite Standardabweichung innerhalb der einzelnen Messzeitpunkte.

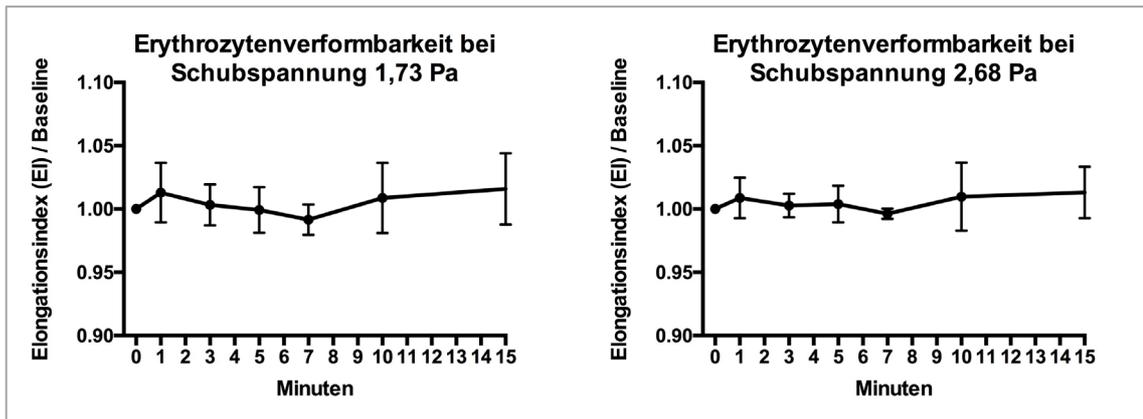
Dargestellt sind hier die Indices bei den physiologisch relevanten Schubspannungen 1,73 und 2,68 Pa. Wie Abbildung 18 zu entnehmen, veränderte sich die Verformbarkeit der Erythrozyten über den erfassten Zeitraum von 15 min bei beiden Schubspannungen nicht signifikant. Ebenso ergab die Untersuchung der relativen Veränderungen keine signifikanten Unterschiede (siehe Abbildung 19).

Somit führte die sublinguale Gabe von GTN nicht zu einer relevanten Veränderung der erythrozytären Elongationsindices bei den physiologischen Schubspannungen 1,73 und 2,68 Pa.



Untersuchung bei n = 5 Probanden, Mittelwert + SEM, keine signifikanten Veränderungen, Testverfahren: Friedman-Test, Posthoc Test: Dunn-Test, Messung mittels RR Mechatronics LORCA

Abb. 18: Die sublinguale Gabe von GTN führt nicht zu einer Änderung der Verformbarkeit von Erythrozyten

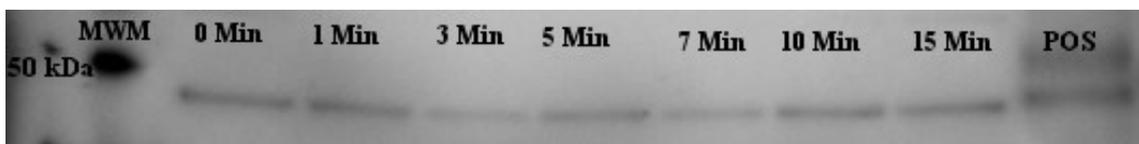


Untersuchung bei n = 5 Probanden, Mittelwert + SEM, keine signifikanten Veränderungen, Testverfahren: Friedman-Test, Posthoc Test: Dunn-Test, Messung mittels RR Mechatronics LORCA

Abb. 19: Auch die Betrachtung der erythrozytären Verformbarkeit relativ zum Ausgangswert ergibt keine signifikanten Unterschiede

3.2.6 Phosphorylierungsstatus des Vasodilatator-stimulierten Phosphoproteins (VASP)

Um einen Zusammenhang zwischen der extraerythrozytären Aktivierung der Proteinkinase G und einer eventuellen Veränderung der Erythrozytenfunktion zu untersuchen, wurde das intraerythrozytär vorhandene Protein VASP und dessen Phosphorylierungsstatus an der Ser239 Phosphorylierungsstelle untersucht. Wie in dem in Abbildung 20 gezeigten Western Blot zu erkennen, ließ sich das Protein VASP in allen Proben nach entsprechender Aufreinigung des Erythrozyten-*Pellets* nachweisen. Der Nachweis einer Phosphorylierung des Vasodilatator-stimulierten Phosphoproteins an Ser239 gelang hingegen nicht (siehe Abbildung 21). Zusammenfassend bewirkte die sublinguale Gabe von GTN also keine vermehrte Phosphorylierung des Vasodilatator-aktivierten Phosphoproteins am Ser239, das Protein VASP war in Erythrozyten jedoch nach entsprechender Aufreinigung nachweisbar.



Untersuchung bei n = 5 Probanden, dargestellt ist die Western Blot Membran nach der Anfärbung mittels eines Merrettich Peroxidase Substrats bei einer Belichtungszeit von 90 Sekunden, POS = SNP stimulierte Plättchen, MWM = Molekulargewichtsmarkierung (Molecular Weight Marker)

Abb. 20: Das Protein VASP ist im *in vivo* Versuch nach entsprechender Aufreinigung in Erythrozyten nachweisbar



Untersuchung bei n = 5 Probanden, dargestellt ist die Western Blot Membran nach der Anfärbung mittels eines Merrettich Peroxidase Substrats bei einer Belichtungszeit von 140 Sekunden, Zuordnung der Proben analog zu Abb. 20

Abb. 21: GTN führt *in vivo* nicht zu einer vermehrten Phosphorylierung an Ser239

3.3 Vergleich der NO Bioverfügbarkeit bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit

Für den Vergleich der NO Bioverfügbarkeit unter pathologischen Bedingungen wurden sowohl Patienten mit koronarer Herzkrankheit (Gruppe „KHK“) als auch gesunde Patienten (Gruppe „gesund“) rekrutiert. Ziel der Untersuchung war es, die Nitritwerte als Marker für die Stickstoffmonoxid Bioverfügbarkeit im Plasma und in Erythrozyten zu vergleichen. Unter der Annahme, dass Patienten mit koronarer Herzkrankheit eine endotheliale Dysfunktion aufweisen, war die Hypothese dieser Untersuchung, dass diese Patienten geringere Nitritwerte im Plasma und in Erythrozyten aufweisen. Hierzu wurden die Blutproben nach der Aufklärung und schriftlichen Einverständniserklärung der Probanden gewonnen und asserviert sowie mittels Chemilumineszenzdetektion die Nitritwerte der Proben detektiert.

3.3.1 Probandencharakteristika

Im Gegensatz zum eigentlichen Studiendesign wurden in dieser Arbeit die basalen Zeitpunkte der Probanden der Gruppe „ACS“ der Gruppe „stable CAD“ zugerechnet. Somit ergaben sich zwei Probandenkollektive, zum einen gesunde Patienten und zum anderen Patienten mit manifester koronarer Herzkrankheit.

Bezüglich ihrer körperlichen Konstitution wiesen beide Gruppen eine entsprechende Homogenität auf. So zeigten sich beim mittleren Alter der beiden Kollektive keine signifikanten Unterschiede. Ebenso glichen sich beide Gruppen bzgl. ihres mittleren Körpergewichts und ihrer Blutdrücke. Unterschiede zeigten sich vor allem bezüglich des Gesamtcholesterins sowie auch bei der differenzierten Betrachtung der LDL, wobei hier in der Kontrollgruppe höhere Werte messbar waren. Die Nierenfunktion der Probanden zeigte ebenfalls eine Homogenität in beiden Gruppen. In Tabelle sieben sind die

wesentlichen Charakteristika beider Gruppen gegenübergestellt und die Unterschiede, wo vorhanden, dargestellt.

	„KHK“ (inkl. ACS basal) n = 25	„gesund“ n = 21	
	Mittelwert ± Standardabweichung	Mittelwert ± Standardabweichung	
Alter in Jahren	57,12 ± 10,67	53,48 ± 6,67	n. s.
Körpergewicht (kg)	86,04 ± 12,68	88,14 ± 9,22	n. s.
Blutdruck systolisch (mmHg)	134,67 ± 12,30	128,81 ± 12,12	n. s.
Blutdruck diastolisch (mmHg)	79,63 ± 33,10	76,05 ± 9,74	n. s.
Herzfrequenz (Schläge pro Minute)	63,28 ± 9,49	68,81 ± 7,69	n. s.
Gesamtcholesterin (mg/dl)	171,08 ± 33,10	213,52 ± 45,43	p = 0.001
LDL Cholesterin (mg/dl)	106,77 ± 27,89	150,14 ± 42,60	p < 0.0001
Creatinin (mg/dl)	1,00 ± 0,17	1,00 ± 0,12	n. s.
HbA1c (%)	5,52 ± 0,40	5,39 ± 0,33	n. s.
Raucherjahre (<i>packyears</i>)	29,20 ± 27,53	15,54 ± 21,63	p = 0.033

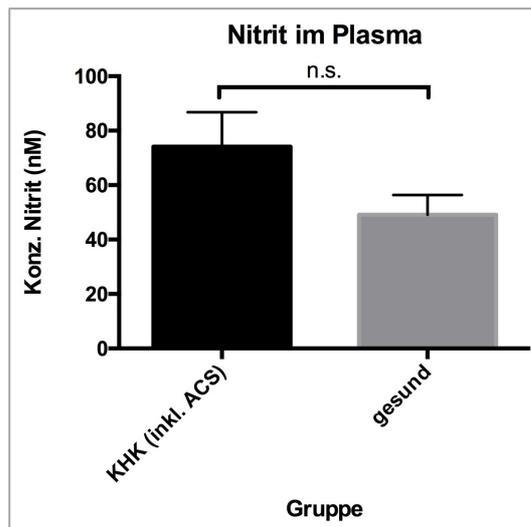
Testverfahren: Mann-Whitney-U-Test, statistische Signifikanz wurde bei $p < 0,05$ angenommen

Tabelle 7: Probandencharakteristika

3.3.2 Ermittlung der Nitritspiegel im Blutplasma bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung

Der Untersuchung lag die Hypothese zugrunde, dass Patienten mit einer koronaren Herzerkrankung im Schnitt niedrigere Nitritwerte aufweisen als gesunde Patienten. Das Nitrit dient hier, wie auch in den Untersuchungen zur GTN Stimulation bei gesunden Patienten, als Marker der NO Bioverfügbarkeit und somit auch als Prädiktor der Endothelfunktion (Kleinbongard, Dejam et al. 2003). Da Patienten mit koronarer Herzerkrankung eine endotheliale Dysfunktion aufweisen, sprächen niedrigere Nitritspiegel für eine verminderte Aktivierung des NO Signaltransduktionswegs.

Wie Abbildung 22 zu entnehmen, zeigten Probanden mit koronarer Herzerkrankung im Schnitt tendenziell sogar höhere Nitritspiegel (im Mittel 74,1 nM +/- 56,76) als gesunde Probanden (49,09 nM +/- 32,52). Die Unterschiede waren jedoch nicht signifikant ($p = 0.1073$). Zusammenfassend unterschieden sich die Nitritspiegel im Blutplasma zwischen Probanden mit koronarer Herzkrankheit und gesunden Probanden in den Untersuchungen mittels Chemilumineszenzdetektion nicht.



Messung mittels CLD 88e (Fa. Eco Physics), n (KHK) = 20, n (gesund) = 20, Testverfahren: Mann-Whitney-U-Test, zweiseitig getestet, $p = .1073$, dargestellt ist der Mittelwert + SEM

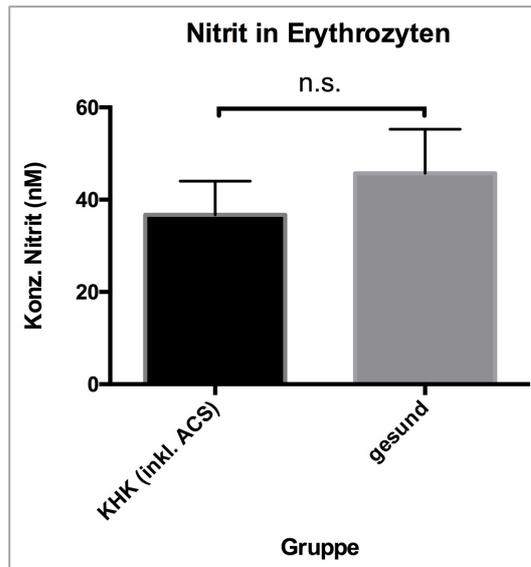
Abb. 22: Nitritspiegel im Blutplasma unterscheiden sich zwischen den Kollektiven „KHK“ und „gesund“ nicht

3.3.3 Ermittlung der Nitritspiegel in Erythrozyten bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung

Analog zu den Untersuchungen der Nitritspiegel im Blutplasma lag auch dieser Untersuchung die Hypothese zugrunde, dass die Nitritspiegel bei Probanden mit koronarer Herzkrankheit niedriger als bei gesunden Probanden sind, da das im Endothel gebildete NO die Membran der Erythrozyten diffundieren kann und in den Erythrozyten durch das Oxyhämoglobin zu Nitrit oxidiert wird. Ebenso vermuteten wir eine verringerte Aktivität der erythrozytären NO Synthase, die ebenfalls in erniedrigten Nitritspiegeln resultieren würde.

Abbildung 23 zeigt die erhobenen Messwerte. Dabei fällt auf, dass im Gegensatz zu den im Plasma gemessenen Nitritspiegeln bei der Erfassung des erythrozytären Nitrits die Tendenz zu erkennen ist, dass gesunde Probanden höhere Spiegel aufwiesen. So zeigten die gesunden Probanden im Mittel Nitritwerte von 45,74 nM. Die Nitritspiegel in den Erythrozyten der KHK Probanden lagen mit 36,70 nM darunter.

Auch hier erreichten die Messwerte allerdings kein signifikantes Niveau, sodass zusammenfassend festzustellen ist, dass sich in diesen Untersuchungen die Nitritspiegel in Erythrozyten bei Probanden mit koronarer Herzkrankheit und gesunden Probanden nicht signifikant unterscheiden.



Messung mittels CLD 88e (Fa. Eco Physics), n (KHK) = 24, n (gesund) = 17, Testverfahren: Mann-Whitney-U-Test, zweiseitig getestet, $p = .1287$, dargestellt ist der Mittelwert + SEM

Abb. 23: Nitritspiegel in Erythrozyten unterscheiden sich zwischen den Kollektiven „KHK“ und „gesund“ nicht

4 Diskussion

4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse und Wiederholung der Hypothese

4.1.1 *In vitro* Stimulation humaner Erythrozyten

Ziel der Untersuchung war der Nachweis eines funktionierenden eNOS-PKG-sGC-Signaltransduktionswegs in Erythrozyten, dementsprechend war die Hypothese, dass eine *in vitro* Stimulation der Erythrozyten mittels eines NO Donators zu einer vermehrten Phosphorylierung der PKG Zielstruktur VASP führt. Unsere Erwartung war zudem, dass sich der Effekt verstärkt, wenn die Proben zusätzlich zur Behandlung mit DEANO mit dem sGC Aktivator BAY 41-2272 behandelt werden.

Die Ergebnisse bestätigten die Hypothese in der Form, dass sich das Protein VASP in Erythrozyten nachweisen ließ. Eine Stimulation mit DEANO bewirkte eine vermehrte Phosphorylierung an Ser239, die durch BAY 41-2272 noch weiter gesteigert werden konnte.

4.1.2 *In vivo* Stimulation junger gesunder Probanden

Ziel der Untersuchung war die Verifikation der Hypothese, dass eine *in vivo* Stimulation mit dem organischen Nitrat GTN eine erhöhte NO Bioverfügbarkeit im Blutplasma und in Erythrozyten bewirkt und sich konsekutiv der Phosphorylierungsstatus des Proteins VASP verändert, sodass dies Auswirkungen auf die erythrozytäre Funktion in Form einer Verbesserung der erythrozytären Verformbarkeit hat.

Für die Untersuchung wurden junge und gesunde Probanden gewonnen, welche keinerlei Medikation zu sich nahmen. Unsere erhobenen Baseline Charakteristika zeigten keine Auffälligkeiten hinsichtlich des Blutdrucks (Mittelwert $RR_{\text{sys}}/RR_{\text{dia}} = 124,17 / 70,67$ mmHg) und der Herzfrequenz.

In den Untersuchungen ließ sich zunächst zeigen, dass die sublinguale Gabe von GTN die Blutdrücke der Probanden erniedrigt. Hierbei wirkte sich das verabreichte GTN vor allem auf die diastolischen Blutdrücke aus (ca. 20 % Blutdruckreduktion zum Zeitpunkt 5 min). Ebenfalls zeigte sich eine deutliche Dilatation der A. brachialis. Die für unsere Hypothese eigentlich interessanten Befunde lieferten die Analysen der Nitrit- und

Nitrat Spiegel sowie der Phosphorylierung des Proteins VASP. Hier zeigte sich ein signifikanter Anstieg der gemessenen Plasmanitrit Spiegel 9 min nach der Gabe des Pharmakons, wohingegen die Nitrat Spiegel im Blutplasma unverändert blieben. In den Untersuchungen zum Nachweis einer vermehrten Phosphorylierung des VASP zeigte sich zwar, dass wir das Protein VASP in Erythrozyten nachweisen konnten, der Nachweis einer vermehrten Phosphorylierung an Ser239 gelang jedoch nicht. Die erythrozytäre Verformbarkeit änderte sich in den Untersuchungen ebenfalls nicht signifikant über die erhobenen Zeiträume.

4.1.3 Vergleichende Untersuchungen zur NO Bioverfügbarkeit bei Patienten mit KHK und gesunden Probanden

Um die klinische Relevanz des NO Signalwegs weiter zu untersuchen, diente der Vergleich von Patienten mit koronarer Herzerkrankung und gesunden Patienten mit der Fragestellung, ob Patienten mit koronarer Herzerkrankung durchschnittlich eine geringere endotheliale und erythrozytäre NO Bioverfügbarkeit aufweisen.

Bezüglich ihrer Baseline Charakteristika unterschieden sich die Probanden nur im Hinblick auf ihre Cholesterinwerte und ihrem Raucherstatus (gemessen in Packungsjahren). Hinsichtlich ihres Alters, ihres Körpergewichts und Blutdrucks waren beide Gruppen ähnlich, sodass hier eine gute Vergleichbarkeit beider Gruppen sichergestellt werden konnte.

Der Vergleich der Nitrit Spiegel beider Gruppen mittels HPLC lieferte keine signifikanten Unterschiede in beiden Gruppen, zwar zeichnete sich eine leichte Tendenz ab, dass das KHK Kollektiv in Erythrozyten geringere Nitrit Spiegel aufwies und im Blutplasma höhere, diese Ergebnisse erreichten jedoch kein statistisch signifikantes Niveau. Abbildung 24 soll die wesentlichen Ergebnisse schematisch darstellen.

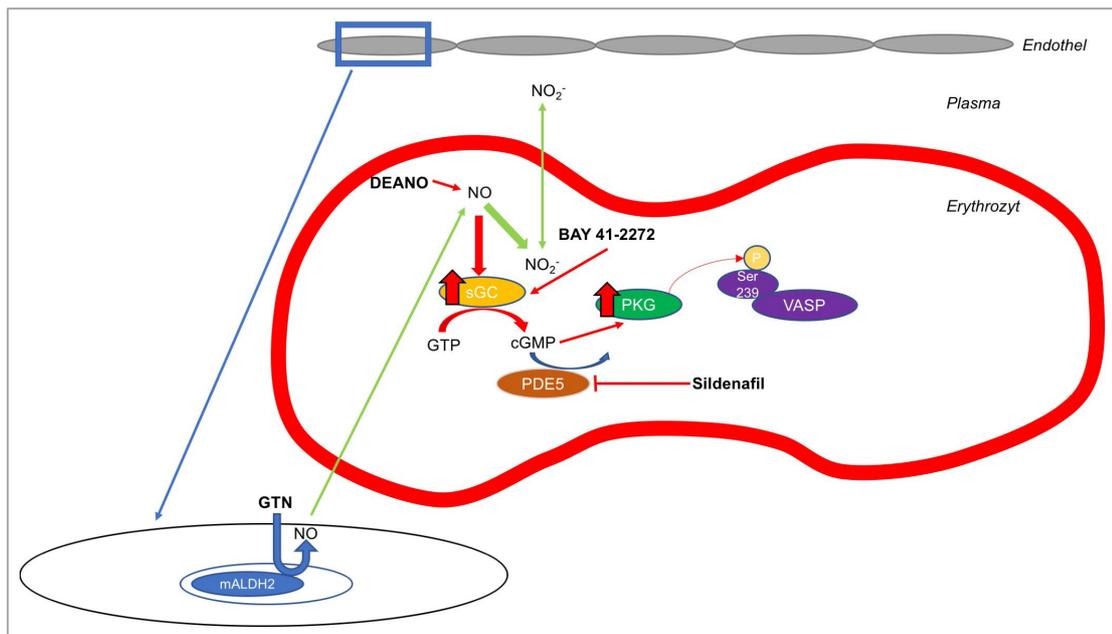


Abb. 24: Graphische Zusammenfassung der Ergebnisse

4.2 *In vitro* Stimulation des Signaltransduktionswegs

4.2.1 Pharmakologische Modulation des NO-Signaltransduktionsweges

Für die zugrundeliegenden Untersuchungen wurden mehrere Stimulanzen verwendet, die einen Einfluss auf den NO Signaltransduktionsweg haben.

Als Positivkontrolle diente in den Untersuchungen das cGMP Analogon 8-Para-Chlorophenylthio-cGMP (8-pCPT-cGMP). 8-pCPT-cGMP ist im Vergleich zu anderen Analoga wie beispielsweise 8-Br-cGMP besser membrangängig und wird schlechter durch die Phosphodiesterasen abgebaut (Butt, Nolte et al. 1992). Es gilt als guter Aktivator der cGMP-abhängigen Proteinkinase, so zeigten Stimulationsversuche in Blutplättchen, dass 8-pCPT-cGMP eine deutliche VASP Phosphorylierung an Ser239 bewirkt (Nygaard, Herfindal et al. 2014).

Für die NO-abhängige Stimulation des Signalwegs wurde der NO Donor Diethylamin NONOate (DEANO) verwendet. Aus DEANO wird NO nicht-enzymatisch bei neutralem pH freigesetzt, die Freisetzung erfolgt dabei relativ schnell. In entsprechenden Untersuchungen zur Freisetzungsrates von NO zeigte sich, dass die NO Freisetzung durch DEANO innerhalb weniger Minuten erfolgt (Ramamurthi and Lewis 1997). In anderen Untersuchungen wurde die NO Freisetzung durch DEANO mit einer Halbwertszeit von 2,1 min bei 37 °C und pH 7,4 angegeben (Maragos, Morley et al. 1991). Bei

entsprechenden *in vivo* Versuchen an Mäusen ließ sich nachweisen, dass DEANO durch die Reaktion des freigesetzten NO mit Desoxyhämoglobin zur Bildung von Nitrosylhämoglobin führt (Jaszewski, Fann et al. 2003).

Die lösliche Guanylatcyclase kann in zwei Formen vorliegen, einer reduzierten und einer oxidierten Form, wobei die letztere Form nicht auf endogenes NO oder NO-freisetzende Stoffe anspricht (Evgenov, Pacher et al. 2006). Aufgrund dieser Tatsache unterscheidet man zwischen Aktivatoren und Stimulatoren der löslichen Guanylatcyclase. Aktivatoren sind dadurch gekennzeichnet, dass sie die inaktive Form der sGC aktivieren, wohingegen Stimulatoren die Sensitivität der aktiven Form für NO erhöhen (Evgenov, Pacher et al. 2006).

Bei BAY 41-2272 handelt es sich chemisch um ein Pyrazolopyridin, welches die sGC stimuliert und durch Stasch et al. beschrieben wurde (Stasch, Becker et al. 2001). Biochemisch betrachtet ist BAY 41-2272 ein Derivat der bereits seit längerem bekannten Substanz YC-1 (Straub, Stasch et al. 2001), jedoch ist BAY 41-2272 um ein vielfaches potenter (Stasch, Becker et al. 2001). In höheren Dosen hat BAY 41-2272 neben seinem stimulatorischen Effekt auf die sGC zudem einen inhibitorischen Effekt auf die Phosphodiesterase 5 (Mullershausen, Russwurm et al. 2004). *In vivo* zeigte sich für diesen Stimulator zudem ein positiver Effekt auf pulmonale Hypertension und eine verbesserte pulmonale Vasodilatation als Antwort auf inhaliertes NO (Evgenov, Ichinose et al. 2004). Der Mechanismus, mit dem BAY 41-2272 die lösliche Guanylatcyclase stimuliert, ist unabhängig von Stickstoffmonoxid aber abhängig von Häm (Stasch, Becker et al. 2001). In Kombination mit NO Donatoren kann die Aktivierung der löslichen Guanylatcyclase durch BAY 41-2272 bis zu 200-fach gesteigert werden (Evgenov, Pacher et al. 2006).

4.2.2 Effekt der *in vitro* Stimulation auf den Phosphorylierungsstatus von VASP an Ser239

Unserer Hypothese liegt zugrunde, dass der intraerythrozytäre NO Signaltransduktionsweg über das Protein VASP einen Einfluss auf die erythrozytäre Funktion in Form der Beeinflussung der Verformbarkeit der Erythrozyten hat. Während in Thrombozyten der Einfluss der Signalkaskade auf die Thrombozytenaktivierung gut erforscht ist, da man dort herausfand, dass das Protein VASP ein wesentlicher Effektor der NO Signalkaskade ist (Kobsar, Simonis et al. 2014), ist der NO Signalweg in

Erythrozyten noch wenig erforscht. Bisher gab es keinen Nachweis über Funktionsfähigkeit eines intraerythrozytären NO Signalwegs und die Funktion des Proteins VASP in Erythrozyten. Jedoch stellt uns der Nachweis einer funktionsfähigen erythrozytären NO Synthase (Cortese-Krott, Rodriguez-Mateos et al. 2012) vor neue Fragen und Herausforderungen.

Für den Nachweis der Phosphorylierung wählten wir analog zu den *in vivo* Studien die Methode Western Blot aufgrund ihrer Spezifität. Das Protokoll der Aufreinigung entsprach dem evaluierten Prozess unserer Arbeitsgruppe. Anders als in den *in vivo* Studien nutzten wir zur direkten Stimulation der Erythrozyten *in vitro* den direkten NO Donor DEANO. Aufgrund der vorliegenden Daten anderer Untersuchungen bezüglich der Freisetzungsrates von Stickstoffmonoxid durch DEANO (Maragos, Morley et al. 1991), wählten wir die Inkubationszeiten so, dass ein maximaler Effekt auf die lösliche Guanylatcyclase zu erwarten war. Der Vorteil, den DEANO bietet, ist die Unabhängigkeit von mitochondrialen Enzymen, wobei dieser Faktor eine eventuelle Erklärung dafür liefert, dass bei der *in vivo* Stimulation mit Glyceroltrinitrat kein Effekt auf die VASP Phosphorylierung und die Verformbarkeit der Erythrozyten zu beobachten war.

Um den Effekt auf die lösliche Guanylatcyclase zu maximieren, wurde eine Probe jeweils zusätzlich mit dem sGC Stimulator BAY 41-2272 inkubiert, der wie oben beschrieben in entsprechenden Versuchen in der Kombination mit NO Donatoren eine bis zu 200-fache Aktivierung der Guanylatcyclase bewirkte (Evgenov, Pacher et al. 2006). Analog zu den *in vivo* Studien sei auch hier die Limitation der Methode Western Blot hinsichtlich einer Quantifizierung des Signals genannt, die uns zu einer gewissen Vorsicht mit Blick auf quantitative Aussagen führte.

Der Nachweis, dass eine *in vitro* Stimulation der löslichen Guanylatcyclase in Erythrozyten zu einer vermehrten VASP Phosphorylierung an Ser239 führte, bestätigte unsere Hypothese, dass der erythrozytäre NO Signaltransduktionsweg einen Einfluss auf die erythrozytäre Funktion haben kann und dass es in Erythrozyten einen funktionsfähigen NO Signalweg gibt, welcher über die Stimulation der löslichen Guanylatcyclase aktiviert werden kann.

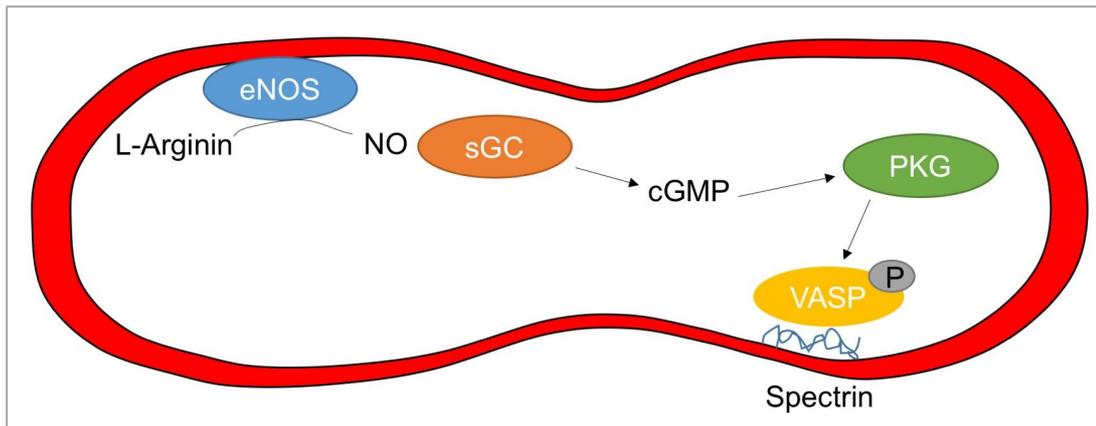
Mit dem Nachweis der Phosphorylierung des Effektors stellen sich neue Fragen hinsichtlich der Beeinflussung der erythrozytären Funktion. Bisher zeigten die Untersuchungen nur einen Effekt auf die *in vitro* Stimulation der Erythrozyten, die Frage

nach der tatsächlichen Relevanz für das kardiovaskuläre System und die Rolle des Signalwegs *in vivo* bleibt also noch offen. Jedoch konnten wir zeigen, dass der Signaltransduktionsweg in Erythrozyten vorhanden ist und diese Signalkaskade zumindest in der Theorie einen Einfluss auf die erythrozytäre Funktion haben kann. Angesichts der Bedeutung der erythrozytären Verformbarkeit zum Beispiel auf die Mikrozirkulation des Blutgefäßsystems (Chien 1987) eröffnet eine bessere Kenntnis über die biochemischen Prozesse des NO Signaltransduktionswegs in Erythrozyten auch neue Möglichkeiten beispielsweise hinsichtlich einer pharmakotherapeutischen Beeinflussung des intraerythrozytären Signalwegs.

Nichtsdestotrotz ist weitere Forschungsarbeit von Nöten, um der Relevanz für die Physiologie und Pathologie des Herz-Kreislauf-Systems weiter auf den Grund zu gehen und zum Beispiel zu erarbeiten, inwieweit das Protein VASP mit den Strukturen des erythrozytären Zytoskeletts so interagieren kann, dass aus der Phosphorylierung des Proteins auch tatsächlich eine Veränderung der erythrozytären Funktion resultiert.

Ein großes Problem stellte lange Zeit die Auffassung dar, dass Erythrozyten eine Art Falle für NO darstellen, da NO mit Oxyhämoglobin zu Nitrat und Methämoglobin reagiert. Insofern wäre der Einfluss einer NO Bildung durch die erythrozytäre NO Synthase auf andere Effektoren des Signalwegs begrenzt. Jedoch gibt es auch Möglichkeiten einer erythrozytären NO Freisetzung. Dies kann sowohl beispielsweise durch die Reaktion von Nitrit mit Desoxyhämoglobin direkt geschehen (Cosby, Partovi et al. 2003) als auch vermittelt durch Xanthin-Oxidoreduktasen beziehungsweise durch NO Synthasen selbst (Webb, Milsom et al. 2008).

Zusammenfassend stehen wir noch am Anfang der Erkenntnis über die Funktion des intraerythrozytären NO Signaltransduktionsweg. Unsere Untersuchungen zeigten, dass das in Erythrozyten nachweisbare Protein VASP im Zuge einer NO-abhängigen Stimulation der löslichen Guanylatcyclase durch die cGMP-abhängige Proteinkinase an Ser239 phosphoryliert wird. Die klinische Relevanz dieser Ergebnisse und der Einfluss von VASP auf die erythrozytäre Funktion, zum Beispiel über eine Interaktion mit Spectrin, sind jedoch noch weitgehend unklar und bedürfen weiterer Arbeit. Abbildung 25 zeigt den hypothetischen Signaltransduktionsmechanismus in Erythrozyten im Überblick.



In anderen Untersuchungen konnte eine funktionsfähige eNOS in Erythrozyten nachgewiesen werden (Cortese-Krott, Rodriguez-Mateos et al. 2012). Die Stimulation der sGC in Erythrozyten bewirkte eine vermehrte Phosphorylierung an Ser239 des Proteins VASP. Möglicherweise bewirkt VASP über eine Interaktion mit Spectrin eine Veränderung der erythrozytären Verformbarkeit.

Abb. 25: Der intraerythrozytäre NO Signaltransduktionsweg

4.3 GTN-vermittelte *in vivo* Stimulation des Signaltransduktionswegs

4.3.1 Hämodynamik und GTN-vermittelte Vasodilatation

Glyceroltrinitrat bewirkte in den Untersuchungen eine geringere Senkung des systolischen Blutdrucks als des diastolischen Blutdrucks. Wie auch andere organische Nitrate bewirkt GTN vor allem eine Vorlastsenkung des Herzens aufgrund der Dilatation venöser Gefäße und damit der Förderung des venösen Poolings (Munzel and Gori 2013). Des Weiteren besitzen Nitrate allerdings auch über die Aktivierung des NO-Signaltransduktionsweges einen Einfluss auf die glatte Gefäßmuskulatur arterieller Gefäße. In einer Metaanalyse von Gray et al., in der mehrere randomisiert-kontrollierte Studien verglichen wurden, wurde der blutdrucksenkende Effekt Glyceroltrinitrats bestätigt (Gray, Sprigg et al. 2006). Hier zeigte sich sowohl eine Auswirkung auf den systolischen als auch auf den diastolischen Blutdruck. Die in den Studien beobachtete Erhöhung der Herzfrequenz wurde in unseren Untersuchungen nicht beobachtet. Zu beachten ist hierbei jedoch, dass in den entsprechenden Untersuchungen durchweg eine andere Dosis (5 mg) und Applikationsform (transdermal) gewählt wurde. In einer älteren Untersuchung (Armstrong, Armstrong et al. 1979) wurden die pharmakokinetischen Eigenschaften von GTN untersucht. Hierbei wurde jungen, gesunden Probanden eine 0,6 mg Dosis sublingual verabreicht und im Anschluss die im Blut auftretenden GTN Dosen sowie die Blutdrücke und die Herzfrequenz bestimmt. In den genannten Untersuchungen zeigte sich ebenfalls ein Einfluss auf den systolischen Blutdruck, der sein Maximum nach

5 min erreichte, dies deckt sich mit unseren Untersuchungen. Im Gegensatz zu unseren Untersuchungen wurden jedoch keine signifikanten Unterschiede bezogen auf die diastolischen Blutdrücke gefunden und die von den Autoren beobachtete Erhöhung der Herzfrequenz deckte sich ebenfalls nicht mit unseren Erhebungen. Interessant für das Verständnis unserer Ergebnisse sind jedoch die pharmakokinetischen Untersuchungen, aus denen hervorgeht, dass GTN sehr schnell nach der oralen Applikation im Blut auftaucht (in entsprechenden Untersuchungen nach 30 s) und das Maximum der GTN Konzentration nach 2 min erreicht wird. Dies impliziert eine gewisse Latenzzeit, bis die physiologischen Effekte in vollem Ausmaß eintreten. In unseren Untersuchungen normalisierte sich der systolische Blutdruck bereits nach 10 min, der diastolische Blutdruck nach 15 min, diese Beobachtungen lassen sich ebenfalls durch die pharmakokinetischen Untersuchungen herleiten, bei denen die Autoren eine Halbierung der Spitzendosis nach 7,5 min beobachteten und das GTN nach 20 min kaum noch detekierbar war (Armstrong, Armstrong et al. 1979).

Um ferner die Wirkung des sublingual verabreichten GTN auf die arteriellen Gefäße zu bestätigen, erhoben wir ebenfalls die Durchmesseränderung der A. brachialis, die GTN-vermittelte Vasodilatation. Die Methode der Sonographie bietet den Vorteil, dass sie nicht invasiv ist, nachteilig wirkt sich jedoch die Abhängigkeit der Ergebnisse vom Können des Untersuchers aus. Wir minimierten diese Effekte dadurch, dass entsprechende Stellen markiert wurden, um sicherzustellen, dass man bei der Messung zu den verschiedenen Zeitpunkten den gleichen Gefäßausschnitt beurteilt. Die Messung der Armarterie eignete sich insofern gut, da diese leicht zugänglich beziehungsweise auffindbar und mittels Sonographie einfach sowie reproduzierbar darzustellen ist. Der Einfluss GTNs auf die peripher arteriellen Gefäße wurde bereits beschrieben (Akamatsu, Sato et al. 2010), dieser zeigte sich auch in den eigenen Untersuchungen. Wir beobachteten Diameteränderungen analog zu den vorbeschriebenen Einflüssen des Glyceroltrinitrats (Akamatsu, Sato et al. 2010), die ihr Maximum 7 min nach der Gabe des Nitrats erreichten. In unseren Untersuchungen bewirkte GTN eine maximale Vasodilatation der A. brachialis von durchschnittlich etwa 15,3 % nach 7 min.

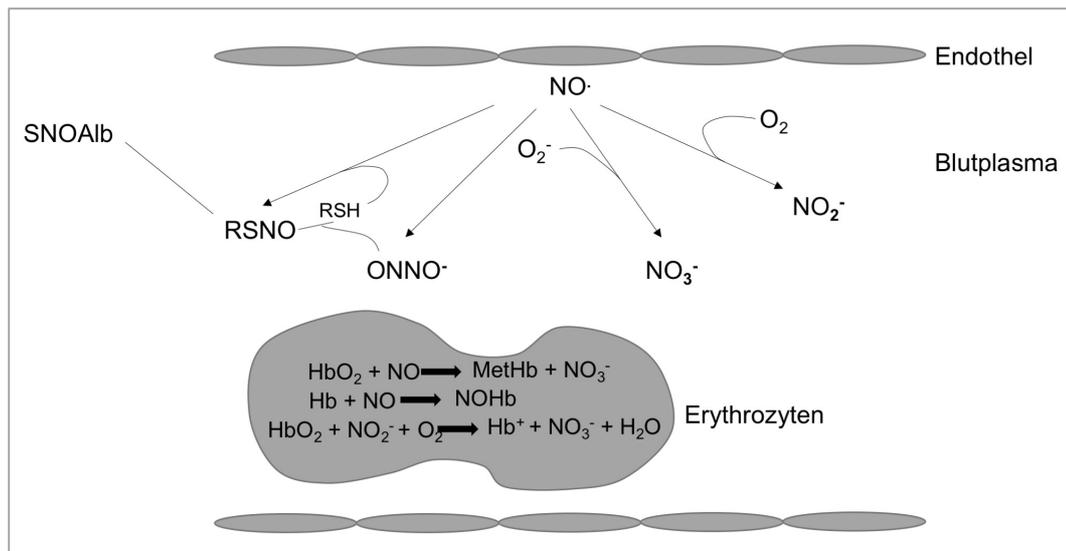
4.3.2 Einfluss von GTN auf die Nitrit- und Nitratplasmaspiegel

4.3.2.1 Metabolismus von Stickstoffmonoxid

Da Stickstoffmonoxid selbst sehr kurzlebig ist und damit schwierig direkt zu messen, wählten wir für den Nachweis des Einflusses von GTN auf die NO Bioverfügbarkeit Nitrit als nachzuweisendes Molekül. Nitrit gilt als einer der Biomarker für die Funktion der endothelialen NO Synthase (Kleinbongard, Dejam et al. 2003) und damit für die Bioverfügbarkeit von Stickstoffmonoxid. Im Blutplasma stellt Nitrit neben den S-Nitrosothiolen eine wichtige Speicherform des endothelial gebildeten NO dar. Die S-Nitrosothiole entstehen durch die Reaktion von NO mit Sulhydrylgruppen verschiedener Proteine wie z. B. Albumin (Stamler, Jaraki et al. 1992), wohingegen Nitrit durch die Reaktion mit molekularem Sauerstoff entsteht.

Neben den genannten Reaktionen kann Stickstoffmonoxid mit Superoxidanionen reagieren, sodass ein Peroxinitritanion entsteht, welches dann wiederum zu Nitrat wird (Lauer, Kleinbongard et al. 2002).

Diffundiert das endothelial gebildete NO in die Erythrozyten, trifft es dort auf große Mengen Hämoglobin. Hierbei kann durch die Reaktion mit Oxyhämoglobin Methämoglobin und Nitrit entstehen oder durch die Reaktion mit Desoxyhämoglobin Nitrosylhämoglobin bzw. S-Nitrosohämoglobin, bzw. bei der Reaktion von Nitrit mit Hämoglobin Nitrat (Lauer, Kleinbongard et al. 2002). Abbildung 26 zeigt die einzelnen Reaktionen von NO im Überblick.



SNOAlb: S-Nitrosoalbumin; RSH: Sulfhydrylgruppe; NOHb: Nitrosylhämoglobin; MetHb: Methämoglobin; HbO₂: Oxyhämoglobin

Abb. 26: Der Metabolismus von NO im Plasma und in Erythrozyten
(modifiziert nach Lauer et al. (Lauer, Kleinbongard et al. 2002))

4.3.2.2 Einfluss von GTN auf die Nitrit- und Nitratplasmaspiegel

Bis heute ist nicht abschließend geklärt, auf welche Weise GTN wirkt. Lange Zeit nahm man an, dass die Wirkung Glyceroltrinitrats auf der Freisetzung von NO beruht. Jedoch gibt es auch Untersuchungen, die Hinweise darauf geben, dass die Wirkung von GTN NO-unabhängig ist und damit den bis dahin geltenden breiten Konsens in Frage stellen (Kleschyov, Oelze et al. 2003). Die wesentlichen Kritikpunkte der Untersuchungen bestehen darin, dass der Nachweis von NO in Folge einer GTN Applikation auf sehr hohen Dosen GTN beruht, die therapeutisch so nicht eingesetzt werden (Kleschyov, Oelze et al. 2003, Nunez, Victor et al. 2005).

In den eigenen Untersuchungen zeigte sich in Folge der GTN Applikation eine Erhöhung der Plasmanitritkonzentration, welche die ursprüngliche Annahme unterstützen, dass GTN eine Freisetzung von Stickstoffmonoxid bewirkt. Diese Nitritspiegelerhöhung trat in unseren Untersuchungen auch bei klinisch angewendeten GTN Dosen auf, jedoch mit einer Latenz von 9 min nach Applikation, die Nitritwerte steigerten sich zudem weiter zum Zeitpunkt 15 min. Eine weitere mögliche Erklärung für die Erhöhung der Plasmaspiegel liegt darin, dass das gemessene Nitrit nicht durch die Reaktion von NO z. B. mit molekularem Sauerstoff entstanden ist, sondern auf anderen Reaktionsmechanismen beruht.

Untersuchungen am purifizierten Enzym mALDH zeigten, dass dieses mitochondriale Enzym die Freisetzung eines Stickstoffmonoxidradikals aus GTN katalysieren kann und so die lösliche Guanylatcyclase aktiviert wird (Beretta, Gruber et al. 2008). In der Tat wird heute der mALDH eine wesentliche Rolle für die Wirkung von GTN zugerechnet (Chen, Zhang et al. 2002). Die Rolle der mALDH-2 wurde dadurch weiter gestützt, dass Probanden mit einem mALDH-2 Glu504Lys Polymorphismus und daraus resultierender fehlender mALDH-2 Aktivität schlechter auf GTN ansprachen (Li, Zhang et al. 2006). Dies führt zu der heute verbreiteten Ansicht, dass GTN in die Endothelzellen aufgenommen und mitochondrial aktiviert wird. Bezüglich der enzymatischen Reaktion gibt es verschiedene Ansätze. Zum einen wurde postuliert, dass durch die mALDH-2 die Reaktion von GTN zu 1,2-Glyceroldinitrat und Nitrit katalysiert wird und NO danach durch die Reduktion von Nitrit entsteht oder durch eine Interaktion der beiden Metabolite (Tarkin and Kaski 2016). Eine andere Möglichkeit, die postuliert wurde, ist, dass NO direkt aus GTN gebildet werden kann (Mayer and Beretta 2008). Obwohl man heute davon ausgeht, dass der Großteil des intravaskulären Stickstoffmonoxids durch die Reaktion mit Hämoglobin zu Nitrat oxidiert wird (Kleinbongard, Dejam et al. 2003), zeigten sich in den eigenen Untersuchungen keine signifikanten Unterschiede der Nitratplasmaspiegel nach GTN Applikation. Zu beachten ist hierbei, dass Nitrat als Biomarker nicht gänzlich unproblematisch ist, da der Nitratspiegel im Plasma ebenso durch zahlreiche Faktoren beeinflusst wird, die nicht mit der NO Bioverfügbarkeit zusammenhängen. So hängt die Plasmanitratkonzentration zum Beispiel wesentlich von der Ernährung ab, ebenso wie von der Aufnahme nitroser Gase über die Atemluft und der Nierenfunktion (Kelm 1999).

Diese Faktoren lassen Zweifel an der Aussagekraft der Plasmanitratspiegel in Bezug auf die Deutung hinsichtlich der NO Bioverfügbarkeit zu. Zwar wurde bei der Auswahl der Probanden darauf geachtet, dass keine Vorerkrankungen und damit keine Einschränkung der Nierenfunktion vorlagen und die Probanden nitratreiche Nahrung vor der Untersuchung meiden beziehungsweise am Untersuchungstag nüchtern waren, jedoch ließ sich die exogene Nitrataufnahme nicht vollständig kontrollieren, sodass hier Limitationen hinsichtlich der Untersuchungen bestehen.

Zusammenfassend lassen sich die Ergebnisse mit der vorgestellten Meinung vereinbaren, dass GTN NO-abhängig wirkt. Welcher der vorgestellten Reaktionsmechanismen bei der Aktivierung von GTN der tatsächlich entscheidende ist, ließ sich durch eine Analyse der

Nitritplasmaspiegel nicht abschließend beurteilen, da sowohl die Möglichkeit besteht, dass das detektierte Nitrit direkt aus der Aktivierungsreaktion von GTN stammt als auch durch die Oxidation von NO oder aber, ob eine Kombination beider Reaktionsmechanismen zu einer Erhöhung der Nitritplasmaspiegel führte. Bezüglich der Plasmanitrat Spiegel gibt es neben den oben bezeichneten Limitationen zudem Zweifel daran, dass der Nachweis von Nitrat sensitiv genug ist, um auch geringfügige Änderung der NOS Aktivität nachzuweisen (Lauer, Preik et al. 2001). Somit lässt sich festhalten, dass sich mit der Messung von Nitrit bessere Aussagen bezüglich der NO Bioverfügbarkeit treffen lassen als mit der Messung von Nitrat.

4.3.3 Einfluss von GTN auf die Verformbarkeit der Erythrozyten

Um den Einfluss der sublingualen GTN Applikation auf die erythrozytäre Funktion zu untersuchen, diente die Analyse der erythrozytären Verformbarkeit. Die Methode der Ektacytometrie erlaubt es im Gegensatz zur direkten Mikroskopie, die Verformbarkeit vieler Blutzellen auf einmal zu beurteilen. Es handelt sich hierbei um ein weitgehend automatisiertes Verfahren, bei dem der Einfluss des Untersuchers gering ist. Somit handelt es sich um eine relativ zuverlässige Methode zur Beurteilung der erythrozytären Verformbarkeit.

Untersuchungen gaben Hinweise darauf, dass die erythrozytäre Verformbarkeit vom NO Spiegel in den Erythrozyten abhängt (Bor-Kucukatay, Wenby et al. 2003). Dies leitete uns zu der Hypothese, dass GTN die erythrozytäre Verformbarkeit positiv beeinflusst, die in unseren Untersuchungen nicht bestätigt werden konnte. In entsprechender Arbeit von Bor-Kucukatay wurden Erythrozyten *in vitro* direkt mit dem NO Donor DEA NONOate inkubiert und die Verformbarkeit im Anschluss gemessen. Somit ist die Vergleichbarkeit mit einer entsprechenden *in vivo* Stimulation mittels GTN eher gering. Berücksichtigt man die zuvor beschriebenen Hypothesen, dass GTN mitochondrial aktiviert werden muss (Tarkin and Kaski 2016), liefert dies eine mögliche Erklärung für die vorliegenden Ergebnisse. Erythrozyten verlieren im Laufe ihrer Reifung auch die Mitochondrien, sodass in den Erythrozyten selbst keine Aktivierung von GTN stattfinden kann. Somit wäre die einzige Möglichkeit des Einflusses von GTN auf die erythrozytäre Funktion jene, dass endothelial gebildetes NO in die Erythrozyten diffundiert und dort zu einer Beeinflussung der Verformbarkeit führt. Angesichts der zuvor beschriebenen Reaktionsmechanismen, denen zugrunde liegt, dass der Großteil des in die Erythrozyten

aufgenommenen Stickstoffmonoxids durch die Reaktion mit Oxyhämoglobin zu Nitrat oxidiert wird, scheint ein Einfluss auf die erythrozytäre Funktion unwahrscheinlich. Eine mögliche Limitation ist die geringe Fallzahl in den eigenen Untersuchungen. Sollte ein geringer Einfluss bestehen, müsste dies vermutlich durch hohe Fallzahlen verifiziert werden.

Zusammenfassend implizieren die vorliegenden Ergebnisse, dass ein Einfluss des endothelial gebildeten NO auf die erythrozytäre Verformbarkeit nicht in einem signifikanten Ausmaß besteht. Dies deckt sich mit den Untersuchungen zum Phosphorylierungsstatus des Proteins VASP (siehe unten).

4.3.4 Einfluss von GTN auf den Phosphorylierungsstatus des Vasodilatator-stimulierten Phosphoproteins (VASP)

4.3.4.1 Das Vasodilatator-stimulierte Phosphoprotein

Das Vasodilatator-stimulierte Phosphoprotein (VASP) gehört neben den beiden Proteinen Mena und EVL (Ena-VASP-Like) zur ENA/VASP Familie (Krause, Dent et al. 2003). Alle drei Proteine teilen einen ähnlichen Aufbau bestehend aus drei Domänen: N-terminal befindet sich die sogenannte Ena/VASP Homology 1 (EVH1) Domäne, gefolgt von einer prolinreichen Region und der C-terminalen EVH2 Domäne (Kwiatkowski, Gertler et al. 2003).

Bis heute sind zahlreiche Funktionen bekannt, an denen das Protein VASP beteiligt ist, ursprünglich wurde das Protein in Thrombozyten charakterisiert (Reinhard, Halbrugge et al. 1992). Grundsätzlich beeinflusst das Protein die Formation von Aktinfilamenten über die in der EVH2 Domäne enthaltenen Bindungsstellen für Aktin (Bachmann, Fischer et al. 1999, Huttelmaier, Harbeck et al. 1999, Reinhard, Jarchau et al. 2001), so kann es die Aktivierung von Thrombozyten beeinflussen (Aszodi, Pfeifer et al. 1999, Kobsar, Simonis et al. 2014). Dieser Mechanismus, welcher über eine PKG abhängige Phosphorylierung reguliert wird, ist ein wichtiger Faktor, warum es NO bzw. cGMP abhängig zu einer Reduktion der Thrombozytenaktivierung kommen kann (Kobsar, Simonis et al. 2014).

Das Protein VASP besitzt mehrere Phosphorylierungsstellen, welche als Zielstrukturen der PKG und PKA dienen. So finden sich drei Phosphorylierungsstellen an Ser239,

Ser157 und Thr278, welche um die prolinreiche Region herum lokalisiert sind (Butt, Abel et al. 1994).

Zu den weiteren Funktionen der Proteine der ENA/VASP Familie zählen beispielsweise die Beeinflussung der Zelladhäsion von Epithelien (Vasioukhin, Bauer et al. 2000) und T-Zell Aktivierung (Krause, Sechi et al. 2000), ebenso spielen sie eine wichtige Rolle für die intrazelluläre Motilität des Bakteriums *Listeria monocytogenes* (Laurent, Loisel et al. 1999).

Über die Funktion des Proteins VASP in Erythrozyten ist noch wenig bekannt, Untersuchungen zeigten beispielsweise, dass das Ena-VASP-like Protein mit Spectrin interagieren kann (Bournier, Kroviarski et al. 2006).

4.3.4.2 Phosphorylierungsstatus des Vasodilatator-stimulierten Phosphoproteins nach sublingualer GTN Applikation

In unseren Untersuchungen wurde durchweg der Phosphorylierungsstatus des Proteins VASP an Ser239 nachgewiesen. Ser239 stellt jene Phosphorylierungsstelle des Proteins dar, die durch die cGMP-abhängige Proteinkinase präferiert phosphoryliert wird (Schwarz, Geiger et al. 1999, Chen, Daum et al. 2004). Der Nachweis einer Phosphorylierung an Ser239 erlaubt somit spezifische Aussagen in Bezug auf die Aktivität des eNOS-sGC-PKG-Signaltransduktionsweges, genauer über die Aktivität der PKG.

Die Methode zur Aufreinigung von Erythrozyten wurde in unserem Labor zuvor etabliert und mittels Durchflusszytometrie verifiziert, dass in den Proben nach Aufreinigung keine Thrombozyten mehr nachweisbar sind. Dieser Schritt der Evaluation des Aufreinigungsprozesses war insofern notwendig, als dass Thrombozyten sehr große Mengen des Proteins VASP enthalten und somit bei der Analyse mittels Western Blot zu einem falsch positiven Ergebnis führen würden, da wir davon ausgingen, dass sich das Protein VASP in Erythrozyten und Thrombozyten nicht unterscheidet beziehungsweise mit dem gleichen Antikörper detektierbar ist.

Wir wählten die Methode des Western Blottings zum Nachweis, da sie sehr spezifisch den Nachweis der gesuchten Proteine ermöglicht und uns sowohl erlaubte das Protein an sich anzufärben als auch den Phosphorylierungsstatus des Proteins nachzuweisen. Die gewählten Antikörperkonzentrationen wurden über einen Etablierungsprozess

entsprechend festgelegt, da sie ein gutes Mittelmaß darstellten, sodass die Proteine zwar deutlich anfärbbar waren, es jedoch nicht zu unspezifischen Bindungen kam. Der Nachteil, den der Nachweis mittels Western Blot mit sich bringt, ist allerdings die fehlende Möglichkeit einer objektiven Quantifizierung des Signals. So sind die Methoden zur Quantifizierung der Proteinmengen in der Regel semiquantitativ und die Beurteilung somit schwierig. In Anbetracht dessen waren wir bezüglich quantitativer Aussagen vorsichtig und versuchten zunächst das Protein VASP zu detektieren, um die Methode zu verifizieren. Der Nachweis des Proteins gelang in den entsprechenden Untersuchungen, jedoch zeigte sich keine Phosphorylierung an Ser239.

Wir zogen daraus die Schlüsse, dass das Protein VASP in Erythrozyten vorhanden ist, eine Stimulation mit GTN jedoch nicht zu einer vermehrten Phosphorylierung des Proteins führt.

Wir vermuteten, dass das Protein VASP ein potentieller Vermittler eines Einflusses des NO Signalwegs auf die erythrozytäre Funktion sein kann. Diese Hypothese stützte sich im Wesentlichen auf die Untersuchungen zur Funktion des Proteins VASP in Thrombozyten, wo es der Vermittler des Einflusses durch den NO Signalweg auf die Thrombozytenaktivierung ist (Kobsar, Simonis et al. 2014). Die Ergebnisse ließen sich mit den Untersuchungen zur Beeinflussung der Verformbarkeit der Erythrozyten vereinbaren, da auch hier keine Änderung beobachtet wurde.

Als mögliche Erklärung für den fehlenden Effekt des Glyceroltrinitrats auf die erythrozytäre Funktion dient auch hier analog zu den Untersuchungen zur Verformbarkeit, dass GTN mitochondrial aktiviert werden muss und deshalb in der Theorie nur einen indirekten Einfluss auf den erythrozytären Signalweg haben kann (siehe oben). Wir wählten GTN als *in vivo* Stimulans vor allem aufgrund seiner herausragenden klinischen Bedeutung und seiner Zulassung als Arzneimittel und entschieden uns in den *in vitro* Untersuchungen für einen anderen NO Donor (DEANO). DEANO bietet im Gegensatz zu den meisten in der Pharmakotherapie üblichen organischen Nitraten, welche eine entsprechende Aktivierung in Zellorganellen durchlaufen müssen (Daiber, Oelze et al. 2004, Zhang, Chen et al. 2004, Munzel and Gori 2013), den Vorteil, ein reiner NO Donor zu sein. Eine Ausnahme bildet in dem Fall Molsidomin, da es sich hierbei um einen direkten NO Donor handelt, der zudem auch für den Einsatz am Menschen zugelassen ist (Barbato, Herman et al. 2015). Somit würde sich Molsidomin im Blick auf den Wirkmechanismus besser für die Untersuchungen eignen.

Der Nachteil an Molsidomin ist jedoch in diesem Fall die Pharmakokinetik, da die maximale Wirkung bei Molsidomin erst nach etwa 30-60 min eintritt (Ostrowski and Resag 1985). Aus diesem Grund wird Molsidomin klinisch nicht für die akute Anfallskupierung bei Angina Pectoris eingesetzt, gleiches gilt für die Nitrate ISDN, ISMN und PETN, welche ebenfalls einen deutlich verzögerten Wirkungseintritt besitzen (Munzel and Gori 2013). Daher bot sich GTN aufgrund seiner günstigen pharmakokinetischen Eigenschaften und seiner einfachen Applikationsmöglichkeit für die Versuche an.

4.4 Vergleichende Untersuchungen der Nitritspiegel bei gesunden Probanden mit KHK Patienten

Den vergleichenden Untersuchungen der Nitritspiegel lag die Hypothese zugrunde, dass Patienten mit manifester KHK aufgrund einer erniedrigten NO Bioverfügbarkeit geringere Nitritspiegel im Plasma und in Erythrozyten aufweisen.

Nitrit gilt als Biomarker für die Funktion der konstitutiven NO Synthasen (Kleinbongard, Dejam et al. 2003) und somit als Indikator der Endothelfunktion (Kleinbongard, Dejam et al. 2006) und trägt zu wichtigen Funktionen im kardiovaskulären System bei. So konnte beispielsweise herausgefunden werden, dass zirkulierendes Nitrit zur Kardioprotektion durch Remote Ischemic Preconditioning beiträgt (Rassaf, Totzeck et al. 2014). Zudem wurde beispielsweise in anderen Untersuchungen festgestellt, dass die Gefäßfunktion in Form der flussvermittelten Vasodilatation mit den Nitritspiegeln im Plasma korreliert (Totzeck, Hendgen-Cotta et al. 2012).

Die Messung der Nitritspiegel mittels Chemilumineszenzdetektion stellt eine sehr sensitive Methode zur Erfassung der NO Metabolite Nitrit und Nitrat dar (Piknova and Schechter 2011) welche sich sowohl für den Nachweis von Nitrit im Plasma als auch in Erythrozyten eignet. In den Untersuchungen der Nitritplasmaspiegel nach GTN Stimulation nutzten wir eine andere Nachweismethode (HPLC). Diese Methode erlaubte uns nach unseren Protokollen jedoch keine Erfassung der erythrozytären Nitritspiegel, da sie zum Nachweis der NO Metabolite Nitrit und Nitrat die Griess-Reaktion nutzt, welche sich aufgrund des vorhandenen Hämoglobins und der Konservierungslösung in unseren Erythrozytenproben nicht zum Nachweis eignet.

Für die Untersuchungen wurden Probanden der gleichen Altersgruppe gewählt, um eine gute Vergleichbarkeit hinsichtlich ihrer NO Verfügbarkeit zu gewährleisten. Eine vergleichende Analyse der beiden Subgruppen zeigte, dass sich beide Gruppen in der Tat nicht signifikant in Alter, Gewicht, Blutdruck, Nierenfunktion und HbA1c unterschieden (siehe Tabelle sieben). Unterschiede ergaben sich jedoch bei den erhobenen Werten für das Gesamtcholesterin und die differenzierte Betrachtung der LDL sowie dem Raucherstatus der Probanden. Die Werte für die Raucherjahre korrelierten gut mit dem Gesundheitsstatus der Probanden, da hier das KHK Kollektiv höhere Werte aufwies. Bei der Betrachtung der Cholesterinwerte ermittelten wir jedoch in der Kontrollgruppe höhere Werte. Dies entspricht zunächst nicht den Erwartungen, da erhöhte LDL Werte als ein Risikofaktor für die Entstehung einer koronaren Herzkrankheit gelten. Jedoch sei hierbei zu beachten, dass im KHK Kollektiv nahezu alle Patienten mit Ausnahme einer Person Statine einnahmen, wohingegen in der Kontrollgruppe lediglich eine Person eine Therapie mit Statinen erhielt.

Bei der Untersuchung der Nitritspiegel im Blutplasma zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in beiden Kollektiven. Eine mögliche Erklärung wäre der Einfluss der eingenommenen Medikation auf die Nitritspiegel im Blutplasma. Entsprechende Untersuchungen gaben Hinweise darauf, dass beispielsweise Simvastatin die NO_x Spiegel im Blutplasma von Patienten mit Hypercholesterinämie erhöhen kann (Nakashima, Toyokawa et al. 1996). Neben seinem Einfluss auf die Plasma NO_x Spiegel verbessert Simvastatin außerdem die Endothelfunktion (O'Driscoll, Green et al. 1997). Simvastatin ist nicht der einzige Wirkstoff, für den Auswirkungen auf die NO_x Spiegel beschrieben sind. So gaben Untersuchungen Hinweise darauf, dass beispielsweise der ACE Hemmer Enalapril Einfluss auf die NO_x Spiegel im Blutplasma hypertensiver Patienten hat (Napoli, Sica et al. 2004), ebenso verbessert der ADP-Rezeptorantagonist Clopidogrel die NO Bioverfügbarkeit (Heitzer, Rudolph et al. 2006).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Nitritplasmaspiegel, welche als Indikator für die Endothelfunktion gelten, in KHK Patienten und gesunden Probanden nicht signifikant unterschiedlich waren. Diese Beobachtungen decken sich mit einer Untersuchung von Lauer et al., in denen Nitritspiegel von jungen und alten Probanden vor und nach sportlicher Anstrengung in Form einer Ergometrie verglichen wurden (Lauer, Heiss et al. 2008). Auch hier wurden basal keine Unterschiede in den Nitritspiegeln der beiden Kollektive festgestellt (Lauer, Heiss et al. 2008).

Als weiterer möglicher Indikator waren für uns die erythrozytären Nitritspiegel von großem Interesse. Frühere Untersuchungen von Dejam et al. gaben bereits Hinweise darauf, dass Erythrozyten große Mengen des intravaskulären Nitrits speichern beziehungsweise transportieren (Dejam, Hunter et al. 2005). Bei unseren Untersuchungen ging es vor allem um die Fragestellung, ob der erythrozytäre NO Signaltransduktionsweg bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung vermindert aktiviert ist beziehungsweise die Funktion der erythrozytären NO Synthase bei Patienten mit KHK eingeschränkt ist. Analog zu den Untersuchungen der Nitritplasmaspiegel zeigten sich auch in Erythrozyten keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Nitritspiegel. Zwar zeichnete sich die leichte Tendenz ab, dass Patienten mit KHK leicht geringere Mengen Nitrit in Erythrozyten aufwiesen, diese Unterschiede erreichten jedoch kein statistisch signifikantes Niveau.

Unserer Hypothese lag zugrunde, dass Cortese-Krott et al. im Zuge ihrer Untersuchungen zur erythrozytären NO Synthase herausfanden, dass die Aktivität der erythrozytären NO Synthase bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung vermindert ist (Cortese-Krott, Rodriguez-Mateos et al. 2012).

In verschiedenen Untersuchungen konnte bereits die zentrale Rolle der erythrozytären NO Freisetzung durch die Bioaktivierung von Nitrit unter hypoxischen Bedingungen nachgewiesen werden (Nagababu, Ramasamy et al. 2003). Eine neuere Arbeit von Wajih et al. bestätigte zudem, dass die Bioaktivierung von Nitrit nicht nur vom Sauerstoffgehalt abhängt, sondern auch von der Verfügbarkeit von Nährstoffen wie beispielsweise Glucose (Wajih, Liu et al. 2016). Des Weiteren zeigte eine Arbeit von Srihirun et al. aus dem Jahr 2012, dass die Bioaktivierung von Nitrit zu NO in Erythrozyten wichtig für die nitritvermittelte Hemmung der Thrombozytenaggregation ist (Srihirun, Sriwantana et al. 2012).

Verminderte Nitritspiegel in Erythrozyten würden demnach die Bioaktivierung von Nitrit zu NO vermindern und könnten eine wichtige Rolle unter pathologischen Bedingungen spielen. Nitrit könnte als HNO_2 beispielsweise vermittelt durch den Anionentauscher (AE-1) in Erythrozyten diffundieren (Srihirun, Sriwantana et al. 2012). Eventuell trägt auch die erythrozytäre NO Synthase zu diesen Effekten bei. Im Gegensatz zu den Vorgängen im Blutplasma, ist bis heute jedoch wenig über die Aussagekraft von Nitrit in Erythrozyten in Bezug auf die Aktivität der erythrozytären NO Synthase bekannt, sodass auch hier weitere Forschung nötig ist.

5 Ausblick

Erkrankungen des kardiovaskulären Systems sind heute die Haupttodesursache in Deutschland. Über die Relevanz des eNOS-sGC-PKG-Signaltransduktionsweges unter physiologischen und pathologischen Bedingungen herrscht gegenwärtig ein breiter wissenschaftlicher Konsens.

Wenig ist jedoch bekannt über die Rolle, die der Signalweg in Erythrozyten spielt. Zwar haben wir erstmals gezeigt, dass in Erythrozyten aktivierbare Zielstrukturen eines NO Signaltransduktionsweges vorhanden sind, offen bleibt allerdings die Frage, ob diese Zielstrukturen beispielsweise einen Einfluss auf erythrozytäre Funktionen haben oder ob Erythrozyten selbst aktiv am NO Metabolismus teilhaben. Letzteres eröffnet die Perspektive, dass neben dem Transport von Sauerstoff möglicherweise auch noch weitere erythrokrine Funktionen existieren, die bis heute noch vollkommen unbekannt sind.

Begleiterkrankungen, wie beispielsweise eine Anämie, verschlechtern die Prognose von Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen. Die Pathomechanismen, die hinter solchen klinischen Beobachtungen stecken, sind heute Gegenstand intensiver Forschung und noch nicht vollends verstanden. Ein besseres Verständnis der biochemischen Vorgänge in Erythrozyten kann insgesamt auch dazu beitragen, klinische Beobachtungen biochemisch aufzuschlüsseln und somit im Endeffekt die Prognose von Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen zum Beispiel durch Therapieentscheidungen zu verbessern.

Zusammenfassend ist im Hinblick auf die Rolle von Erythrozyten im gesunden und kranken Organismus noch weitere Forschung nötig.

Literaturverzeichnis

- Akamatsu, D., A. Sato, H. Goto, T. Watanabe, M. Hashimoto, T. Shimizu, H. Sugawara, H. Sato, Y. Nakano, T. Miura, T. Zukeran, F. Serizawa, Y. Hamada, K. Tsuchida, I. Tsuji and S. Satomi (2010). "Nitroglycerin-mediated vasodilatation of the brachial artery may predict long-term cardiovascular events irrespective of the presence of atherosclerotic disease." J Atheroscler Thromb **17**(12): 1266-1274.
- Alderton, W. K., C. E. Cooper and R. G. Knowles (2001). "Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition." Biochem J **357**(Pt 3): 593-615.
- Ammendola, A., A. Geiselhoring, F. Hofmann and J. Schlossmann (2001). "Molecular determinants of the interaction between the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-associated cGMP kinase substrate (IRAG) and cGMP kinase I β ." J Biol Chem **276**(26): 24153-24159.
- Anwar, A., G. Ruffenach, A. Mahajan, M. Eghbali and S. Umar (2016). "Novel biomarkers for pulmonary arterial hypertension." Respir Res **17**(1): 88.
- Armstrong, P. W., J. A. Armstrong and G. S. Marks (1979). "Blood levels after sublingual nitroglycerin." Circulation **59**(3): 585-588.
- Arnold, W. P., C. K. Mittal, S. Katsuki and F. Murad (1977). "Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations." Proc Natl Acad Sci U S A **74**(8): 3203-3207.
- Aszodi, A., A. Pfeifer, M. Ahmad, M. Glauner, X. H. Zhou, L. Ny, K. E. Andersson, B. Kehrel, S. Offermanns and R. Fassler (1999). "The vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) is involved in cGMP- and cAMP-mediated inhibition of agonist-induced platelet aggregation, but is dispensable for smooth muscle function." EMBO J **18**(1): 37-48.
- Babu, N. and M. Singh (2004). "Influence of hyperglycemia on aggregation, deformability and shape parameters of erythrocytes." Clin Hemorheol Microcirc **31**(4): 273-280.
- Bachmann, C., L. Fischer, U. Walter and M. Reinhard (1999). "The EVH2 domain of the vasodilator-stimulated phosphoprotein mediates tetramerization, F-actin binding, and actin bundle formation." J Biol Chem **274**(33): 23549-23557.
- Ballard, S. A., C. J. Gingell, K. Tang, L. A. Turner, M. E. Price and A. M. Naylor (1998). "Effects of sildenafil on the relaxation of human corpus cavernosum tissue in vitro and on the activities of cyclic nucleotide phosphodiesterase isozymes." J Urol **159**(6): 2164-2171.
- Barbato, E., A. Herman, E. Benit, L. Janssens, J. Lalmand, E. Hoffer, P. Chenu, A. Guedes, L. Missault, B. Pirenne, F. Cardinal, S. Vercauteren and W. Wijns (2015). "Long-term effect of molsidomine, a direct nitric oxide donor, as an add-on treatment, on endothelial dysfunction in patients with stable angina pectoris undergoing percutaneous coronary intervention: results of the MEDCOR trial." Atherosclerosis **240**(2): 351-354.

- Bauer, V. and R. Sotnikova (2010). "Nitric oxide--the endothelium-derived relaxing factor and its role in endothelial functions." Gen Physiol Biophys **29**(4): 319-340.
- Becker, E. M., C. Alonso-Alija, H. Apeler, R. Gerzer, T. Minuth, U. Pleiss, P. Schmidt, M. Schramm, H. Schroder, W. Schroeder, W. Steinke, A. Straub and J. P. Stasch (2001). "NO-independent regulatory site of direct sGC stimulators like YC-1 and BAY 41-2272." BMC Pharmacol **1**: 13.
- Benza, R. L., D. P. Miller, R. J. Barst, D. B. Badesch, A. E. Frost and M. D. McGoon (2012). "An evaluation of long-term survival from time of diagnosis in pulmonary arterial hypertension from the REVEAL Registry." Chest **142**(2): 448-456.
- Beretta, M., K. Gruber, A. Kollau, M. Russwurm, D. Koesling, W. Goessler, W. M. Keung, K. Schmidt and B. Mayer (2008). "Bioactivation of nitroglycerin by purified mitochondrial and cytosolic aldehyde dehydrogenases." J Biol Chem **283**(26): 17873-17880.
- Bhardwaj, R., C. P. Page, G. R. May and P. K. Moore (1988). "Endothelium-derived relaxing factor inhibits platelet aggregation in human whole blood in vitro and in the rat in vivo." Eur J Pharmacol **157**(1): 83-91.
- Bohme, G. A., C. Bon, J. M. Stutzmann, A. Doble and J. C. Blanchard (1991). "Possible involvement of nitric oxide in long-term potentiation." Eur J Pharmacol **199**(3): 379-381.
- Bon, C. L. and J. Garthwaite (2003). "On the role of nitric oxide in hippocampal long-term potentiation." J Neurosci **23**(5): 1941-1948.
- Boolell, M., M. J. Allen, S. A. Ballard, S. Gepi-Attee, G. J. Muirhead, A. M. Naylor, I. H. Osterloh and C. Gingell (1996). "Sildenafil: an orally active type 5 cyclic GMP-specific phosphodiesterase inhibitor for the treatment of penile erectile dysfunction." Int J Impot Res **8**(2): 47-52.
- Bor-Kucukatay, M., R. B. Wenby, H. J. Meiselman and O. K. Baskurt (2003). "Effects of nitric oxide on red blood cell deformability." Am J Physiol Heart Circ Physiol **284**(5): H1577-1584.
- Botker, H. E., R. Kharbanda, M. R. Schmidt, M. Bottcher, A. K. Kalsoft, C. J. Terkelsen, K. Munk, N. H. Andersen, T. M. Hansen, S. Trautner, J. F. Lassen, E. H. Christiansen, L. R. Krusell, S. D. Kristensen, L. Thuesen, S. S. Nielsen, M. Rehling, H. T. Sorensen, A. N. Redington and T. T. Nielsen (2010). "Remote ischaemic conditioning before hospital admission, as a complement to angioplasty, and effect on myocardial salvage in patients with acute myocardial infarction: a randomised trial." Lancet **375**(9716): 727-734.
- Bournier, O., Y. Kroviarski, B. Rotter, G. Nicolas, M. C. Lecomte and D. Dhermy (2006). "Spectrin interacts with EVL (Enabled/vasodilator-stimulated phosphoprotein-like protein), a protein involved in actin polymerization." Biol Cell **98**(5): 279-293.
- Buga, G. M., M. E. Gold, J. M. Fukuto and L. J. Ignarro (1991). "Shear stress-induced release of nitric oxide from endothelial cells grown on beads." Hypertension **17**(2): 187-193.

- Butt, E., K. Abel, M. Krieger, D. Palm, V. Hoppe, J. Hoppe and U. Walter (1994). "cAMP- and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation sites of the focal adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) in vitro and in intact human platelets." J Biol Chem **269**(20): 14509-14517.
- Butt, E., C. Nolte, S. Schulz, J. Beltman, J. A. Beavo, B. Jastorff and U. Walter (1992). "Analysis of the functional role of cGMP-dependent protein kinase in intact human platelets using a specific activator 8-para-chlorophenylthio-cGMP." Biochem Pharmacol **43**(12): 2591-2600.
- Chen, L., G. Daum, K. Chitale, S. A. Coats, D. F. Bowen-Pope, M. Eigenthaler, N. R. Thumati, U. Walter and A. W. Clowes (2004). "Vasodilator-stimulated phosphoprotein regulates proliferation and growth inhibition by nitric oxide in vascular smooth muscle cells." Arterioscler Thromb Vasc Biol **24**(8): 1403-1408.
- Chen, Z., J. Zhang and J. S. Stamler (2002). "Identification of the enzymatic mechanism of nitroglycerin bioactivation." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(12): 8306-8311.
- Chien, S. (1987). "Red cell deformability and its relevance to blood flow." Annu Rev Physiol **49**: 177-192.
- Corbin, J. D. (2004). "Mechanisms of action of PDE5 inhibition in erectile dysfunction." Int J Impot Res **16 Suppl 1**: S4-7.
- Corbin, J. D., I. V. Turko, A. Beasley and S. H. Francis (2000). "Phosphorylation of phosphodiesterase-5 by cyclic nucleotide-dependent protein kinase alters its catalytic and allosteric cGMP-binding activities." Eur J Biochem **267**(9): 2760-2767.
- Cortese-Krott, M. M., A. Rodriguez-Mateos, R. Sansone, G. G. Kuhnle, S. Thasian-Sivarajah, T. Krenz, P. Horn, C. Krisp, D. Wolters, C. Heiss, K. D. Kroncke, N. Hogg, M. Feelisch and M. Kelm (2012). "Human red blood cells at work: identification and visualization of erythrocytic eNOS activity in health and disease." Blood **120**(20): 4229-4237.
- Cosby, K., K. S. Partovi, J. H. Crawford, R. P. Patel, C. D. Reiter, S. Martyr, B. K. Yang, M. A. Waclawiw, G. Zalos, X. Xu, K. T. Huang, H. Shields, D. B. Kim-Shapiro, A. N. Schechter, R. O. Cannon, 3rd and M. T. Gladwin (2003). "Nitrite reduction to nitric oxide by deoxyhemoglobin vasodilates the human circulation." Nat Med **9**(12): 1498-1505.
- Daiber, A., M. Oelze, M. Coldewey, M. Bachschmid, P. Wenzel, K. Sydow, M. Wendt, A. L. Kleschyov, D. Stalleicken, V. Ullrich, A. Mulsch and T. Munzel (2004). "Oxidative stress and mitochondrial aldehyde dehydrogenase activity: a comparison of pentaerythritol tetranitrate with other organic nitrates." Mol Pharmacol **66**(6): 1372-1382.
- Dejam, A., C. J. Hunter, M. M. Pelletier, L. L. Hsu, R. F. Machado, S. Shiva, G. G. Power, M. Kelm, M. T. Gladwin and A. N. Schechter (2005). "Erythrocytes are the major intravascular storage sites of nitrite in human blood." Blood **106**(2): 734-739.
- Denninger, J. W. and M. A. Marletta (1999). "Guanylate cyclase and the .NO/cGMP signaling pathway." Biochim Biophys Acta **1411**(2-3): 334-350.

- Diamond, J. and E. B. Chu (1983). "Possible role for cyclic GMP in endothelium-dependent relaxation of rabbit aorta by acetylcholine. Comparison with nitroglycerin." Res Commun Chem Pathol Pharmacol **41**(3): 369-381.
- Elhwuegi, A. S. (2016). "The Wonders of Phosphodiesterase-5 Inhibitors: A Majestic History." Ann Med Health Sci Res **6**(3): 139-145.
- Evgenov, O. V., F. Ichinose, N. V. Evgenov, M. J. Gnoth, G. E. Falkowski, Y. Chang, K. D. Bloch and W. M. Zapol (2004). "Soluble guanylate cyclase activator reverses acute pulmonary hypertension and augments the pulmonary vasodilator response to inhaled nitric oxide in awake lambs." Circulation **110**(15): 2253-2259.
- Evgenov, O. V., P. Pacher, P. M. Schmidt, G. Hasko, H. H. Schmidt and J. P. Stasch (2006). "NO-independent stimulators and activators of soluble guanylate cyclase: discovery and therapeutic potential." Nat Rev Drug Discov **5**(9): 755-768.
- Feil, R., S. M. Lohmann, H. de Jonge, U. Walter and F. Hofmann (2003). "Cyclic GMP-dependent protein kinases and the cardiovascular system: insights from genetically modified mice." Circ Res **93**(10): 907-916.
- Franca-Silva, M. S., C. M. Balarini, J. C. Cruz, B. A. Khan, P. H. Rampelotto and V. A. Braga (2014). "Organic nitrates: past, present and future." Molecules **19**(9): 15314-15323.
- Francis, S. H., E. P. Bessay, J. Kotera, K. A. Grimes, L. Liu, W. J. Thompson and J. D. Corbin (2002). "Phosphorylation of isolated human phosphodiesterase-5 regulatory domain induces an apparent conformational change and increases cGMP binding affinity." J Biol Chem **277**(49): 47581-47587.
- Francis, S. H., J. L. Busch, J. D. Corbin and D. Sibley (2010). "cGMP-dependent protein kinases and cGMP phosphodiesterases in nitric oxide and cGMP action." Pharmacol Rev **62**(3): 525-563.
- Fukao, M., H. S. Mason, F. C. Britton, J. L. Kenyon, B. Horowitz and K. D. Keef (1999). "Cyclic GMP-dependent protein kinase activates cloned BKCa channels expressed in mammalian cells by direct phosphorylation at serine 1072." J Biol Chem **274**(16): 10927-10935.
- Furchgott, R. F. and J. V. Zawadzki (1980). "The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine." Nature **288**(5789): 373-376.
- Furlong, B., A. H. Henderson, M. J. Lewis and J. A. Smith (1987). "Endothelium-derived relaxing factor inhibits in vitro platelet aggregation." Br J Pharmacol **90**(4): 687-692.
- Galie, N., H. A. Ghofrani, A. Torbicki, R. J. Barst, L. J. Rubin, D. Badesch, T. Fleming, T. Parpia, G. Burgess, A. Branzi, F. Grimminger, M. Kurzyna, G. Simonneau and G. Sildenafil Use in Pulmonary Arterial Hypertension Study (2005). "Sildenafil citrate therapy for pulmonary arterial hypertension." N Engl J Med **353**(20): 2148-2157.
- Gayet, J. L., F. Paganelli and A. Cohen-Solal (2011). "Update on the medical treatment of stable angina." Arch Cardiovasc Dis **104**(10): 536-544.

- Geiselhoringer, A., M. Gaisa, F. Hofmann and J. Schlossmann (2004). "Distribution of IRAG and cGKI-isoforms in murine tissues." FEBS Lett **575**(1-3): 19-22.
- Gomberg-Maitland, M., C. Dufton, R. J. Oudiz and R. L. Benza (2011). "Compelling evidence of long-term outcomes in pulmonary arterial hypertension? A clinical perspective." J Am Coll Cardiol **57**(9): 1053-1061.
- Gori, T., A. Al-Hesayen, C. Jolliffe and J. D. Parker (2003). "Comparison of the effects of pentaerythritol tetranitrate and nitroglycerin on endothelium-dependent vasorelaxation in male volunteers." Am J Cardiol **91**(11): 1392-1394.
- Grau, M., A. Kollikowski and W. Bloch (2016). "Remote ischemia preconditioning increases red blood cell deformability through red blood cell-nitric oxide synthase activation." Clin Hemorheol Microcirc.
- Gray, L. J., N. Sprigg, P. A. Rashid, M. R. Willmot and P. M. Bath (2006). "Effect of nitric oxide donors on blood pressure and pulse pressure in acute and subacute stroke." J Stroke Cerebrovasc Dis **15**(6): 245-249.
- Gross, S. S. and P. Lane (1999). "Physiological reactions of nitric oxide and hemoglobin: a radical rethink." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(18): 9967-9969.
- Haley, J. E., G. L. Wilcox and P. F. Chapman (1992). "The role of nitric oxide in hippocampal long-term potentiation." Neuron **8**(2): 211-216.
- Harteneck, C., D. Koesling, A. Soling, G. Schultz and E. Bohme (1990). "Expression of soluble guanylyl cyclase. Catalytic activity requires two enzyme subunits." FEBS Lett **272**(1-2): 221-223.
- Haslam, R. J., N. T. Dickinson and E. K. Jang (1999). "Cyclic nucleotides and phosphodiesterases in platelets." Thromb Haemost **82**(2): 412-423.
- Heitzer, T., V. Rudolph, E. Schwedhelm, M. Karstens, K. Sydow, M. Ortak, P. Tschentscher, T. Meinertz, R. Boger and S. Baldus (2006). "Clopidogrel improves systemic endothelial nitric oxide bioavailability in patients with coronary artery disease: evidence for antioxidant and antiinflammatory effects." Arterioscler Thromb Vasc Biol **26**(7): 1648-1652.
- Hoeper, M. M., V. V. McLaughlin, A. M. Dalaan, T. Satoh and N. Galie (2016). "Treatment of pulmonary hypertension." Lancet Respir Med **4**(4): 323-336.
- Hofmann, F. (2005). "The biology of cyclic GMP-dependent protein kinases." J Biol Chem **280**(1): 1-4.
- Hofmann, F., A. Ammendola and J. Schlossmann (2000). "Rising behind NO: cGMP-dependent protein kinases." J Cell Sci **113** (Pt 10): 1671-1676.
- Huttelmaier, S., B. Harbeck, O. Steffens, T. Messerschmidt, S. Illenberger and B. M. Jockusch (1999). "Characterization of the actin binding properties of the vasodilator-stimulated phosphoprotein VASP." FEBS Lett **451**(1): 68-74.
- Igarashi, J., H. S. Thattai, P. Prabhakar, D. E. Golan and T. Michel (1999). "Calcium-independent activation of endothelial nitric oxide synthase by ceramide." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(22): 12583-12588.
- Ignarro, L. J., G. M. Buga, K. S. Wood, R. E. Byrns and G. Chaudhuri (1987). "Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(24): 9265-9269.

- Ignarro, L. J., J. N. Degnan, W. H. Baricos, P. J. Kadowitz and M. S. Wolin (1982). "Activation of purified guanylate cyclase by nitric oxide requires heme. Comparison of heme-deficient, heme-reconstituted and heme-containing forms of soluble enzyme from bovine lung." *Biochim Biophys Acta* **718**(1): 49-59.
- Ignarro, L. J., K. S. Wood and M. S. Wolin (1982). "Activation of purified soluble guanylate cyclase by protoporphyrin IX." *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**(9): 2870-2873.
- Ikuta, T., H. Sellak, N. Odo, A. D. Adekile and K. M. Gaensler (2016). "Nitric Oxide-cGMP Signaling Stimulates Erythropoiesis through Multiple Lineage-Specific Transcription Factors: Clinical Implications and a Novel Target for Erythropoiesis." *PLoS One* **11**(1): e0144561.
- Janssens, S., P. Pokreisz, L. Schoonjans, M. Pellens, P. Vermeersch, M. Tjwa, P. Jans, M. Scherrer-Crosbie, M. H. Picard, Z. Szelid, H. Gillijns, F. Van de Werf, D. Collen and K. D. Bloch (2004). "Cardiomyocyte-specific overexpression of nitric oxide synthase 3 improves left ventricular performance and reduces compensatory hypertrophy after myocardial infarction." *Circ Res* **94**(9): 1256-1262.
- Jaszewski, A. R., Y. C. Fann, Y. R. Chen, K. Sato, J. Corbett and R. P. Mason (2003). "EPR spectroscopy studies on the structural transition of nitrosyl hemoglobin in the arterial-venous cycle of DEANO-treated rats as it relates to the proposed nitrosyl hemoglobin/nitrosothiol hemoglobin exchange." *Free Radic Biol Med* **35**(4): 444-451.
- Jones, S. P., J. J. Greer, R. van Haperen, D. J. Duncker, R. de Crom and D. J. Lefer (2003). "Endothelial nitric oxide synthase overexpression attenuates congestive heart failure in mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(8): 4891-4896.
- Kelm, M. (1999). "Nitric oxide metabolism and breakdown." *Biochim Biophys Acta* **1411**(2-3): 273-289.
- Kelm, M., M. Feelisch, R. Spahr, H. M. Piper, E. Noack and J. Schrader (1988). "Quantitative and kinetic characterization of nitric oxide and EDRF released from cultured endothelial cells." *Biochem Biophys Res Commun* **154**(1): 236-244.
- Kim, J. J., R. Lorenz, S. T. Arold, A. S. Reger, B. Sankaran, D. E. Casteel, F. W. Herberg and C. Kim (2016). "Crystal Structure of PKG I:cGMP Complex Reveals a cGMP-Mediated Dimeric Interface that Facilitates cGMP-Induced Activation." *Structure* **24**(5): 710-720.
- Kleinbongard, P., A. Dejam, T. Lauer, T. Jax, S. Kerber, P. Gharini, J. Balzer, R. B. Zotz, R. E. Scharf, R. Willers, A. N. Schechter, M. Feelisch and M. Kelm (2006). "Plasma nitrite concentrations reflect the degree of endothelial dysfunction in humans." *Free Radical Biology and Medicine* **40**: 295-302.
- Kleinbongard, P., A. Dejam, T. Lauer, T. Rassaf, A. Schindler, O. Picker, T. Scheeren, A. Godecke, J. Schrader, R. Schulz, G. Heusch, G. A. Schaub, N. S. Bryan, M. Feelisch and M. Kelm (2003). "Plasma nitrite reflects constitutive nitric oxide synthase activity in mammals." *Free Radic Biol Med* **35**(7): 790-796.
- Kleinbongard, P., R. Schulz, T. Rassaf, T. Lauer, A. Dejam, T. Jax, I. Kumara, P. Gharini, S. Kabanova, B. Ozuyaman, H. G. Schnurch, A. Godecke, A. A.

- Weber, M. Robenek, H. Robenek, W. Bloch, P. Rosen and M. Kelm (2006). "Red blood cells express a functional endothelial nitric oxide synthase." Blood **107**(7): 2943-2951.
- Kleschyov, A. L., M. Oelze, A. Daiber, Y. Huang, H. Mollnau, E. Schulz, K. Sydow, B. Fichtlscherer, A. Mulsch and T. Munzel (2003). "Does nitric oxide mediate the vasodilator activity of nitroglycerin?" Circ Res **93**(9): e104-112.
- Knowles, R. G. and S. Moncada (1994). "Nitric oxide synthases in mammals." Biochem J **298** (Pt 2): 249-258.
- Ko, F. N., C. C. Wu, S. C. Kuo, F. Y. Lee and C. M. Teng (1994). "YC-1, a novel activator of platelet guanylate cyclase." Blood **84**(12): 4226-4233.
- Kobsar, A., S. Simonis, E. Klinker, A. Koessler, S. Kuhn, M. Boeck and J. Koessler (2014). "Specific inhibitory effects of the NO donor MAHMA/NONOate on human platelets." Eur J Pharmacol **735**: 169-176.
- Kolluru, G. K., J. H. Siamwala and S. Chatterjee (2010). "eNOS phosphorylation in health and disease." Biochimie **92**(9): 1186-1198.
- Komalavilas, P. and T. M. Lincoln (1994). "Phosphorylation of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor by cyclic GMP-dependent protein kinase." J Biol Chem **269**(12): 8701-8707.
- Krause, M., E. W. Dent, J. E. Bear, J. J. Loureiro and F. B. Gertler (2003). "Ena/VASP proteins: regulators of the actin cytoskeleton and cell migration." Annu Rev Cell Dev Biol **19**: 541-564.
- Krause, M., A. S. Sechi, M. Konradt, D. Monner, F. B. Gertler and J. Wehland (2000). "Fyn-binding protein (Fyb)/SLP-76-associated protein (SLAP), Ena/vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) proteins and the Arp2/3 complex link T cell receptor (TCR) signaling to the actin cytoskeleton." J Cell Biol **149**(1): 181-194.
- Kuwai, T. and J. Hayashi (2006). "Nitric oxide pathway activation and impaired red blood cell deformability with hypercholesterolemia." J Atheroscler Thromb **13**(6): 286-294.
- Kwiatkowski, A. V., F. B. Gertler and J. J. Loureiro (2003). "Function and regulation of Ena/VASP proteins." Trends Cell Biol **13**(7): 386-392.
- Lauer, T., C. Heiss, J. Balzer, E. Kehmeier, S. Mangold, T. Leyendecker, J. Rottler, C. Meyer, M. W. Merx, M. Kelm and T. Rassaf (2008). "Age-dependent endothelial dysfunction is associated with failure to increase plasma nitrite in response to exercise." Basic Res Cardiol **103**(3): 291-297.
- Lauer, T., P. Kleinbongard and M. Kelm (2002). "Indexes of NO bioavailability in human blood." News Physiol Sci **17**: 251-255.
- Lauer, T., M. Preik, T. Rassaf, B. E. Strauer, A. Deussen, M. Feelisch and M. Kelm (2001). "Plasma nitrite rather than nitrate reflects regional endothelial nitric oxide synthase activity but lacks intrinsic vasodilator action." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(22): 12814-12819.
- Laurent, V., T. P. Loisel, B. Harbeck, A. Wehman, L. Grobe, B. M. Jockusch, J. Wehland, F. B. Gertler and M. F. Carlier (1999). "Role of proteins of the Ena/VASP family in actin-based motility of *Listeria monocytogenes*." J Cell Biol **144**(6): 1245-1258.

- Layland, J., J. M. Li and A. M. Shah (2002). "Role of cyclic GMP-dependent protein kinase in the contractile response to exogenous nitric oxide in rat cardiac myocytes." *J Physiol* **540**(Pt 2): 457-467.
- Lee, J., E. H. Bae, S. K. Ma and S. W. Kim (2016). "Altered Nitric Oxide System in Cardiovascular and Renal Diseases." *Chonnam Med J* **52**(2): 81-90.
- Lee, J. C., D. T. Wong and D. E. Discher (1999). "Direct measures of large, anisotropic strains in deformation of the erythrocyte cytoskeleton." *Biophys J* **77**(2): 853-864.
- Li, Y., D. Zhang, W. Jin, C. Shao, P. Yan, C. Xu, H. Sheng, Y. Liu, J. Yu, Y. Xie, Y. Zhao, D. Lu, D. W. Nebert, D. C. Harrison, W. Huang and L. Jin (2006). "Mitochondrial aldehyde dehydrogenase-2 (ALDH2) Glu504Lys polymorphism contributes to the variation in efficacy of sublingual nitroglycerin." *J Clin Invest* **116**(2): 506-511.
- Maragos, C. M., D. Morley, D. A. Wink, T. M. Dunams, J. E. Saavedra, A. Hoffman, A. A. Bove, L. Isaac, J. A. Hrabie and L. K. Keefer (1991). "Complexes of .NO with nucleophiles as agents for the controlled biological release of nitric oxide. Vasorelaxant effects." *J Med Chem* **34**(11): 3242-3247.
- Marletta, M. A. (1994). "Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis." *Cell* **78**(6): 927-930.
- Mayer, B. and M. Beretta (2008). "The enigma of nitroglycerin bioactivation and nitrate tolerance: news, views and troubles." *Br J Pharmacol* **155**(2): 170-184.
- Miller, M. R. and R. M. Wadsworth (2009). "Understanding organic nitrates--a vein hope?" *Br J Pharmacol* **157**(4): 565-567.
- Miyoshi, T., Y. Li, D. M. Shih, X. Wang, V. E. Laubach, A. H. Matsumoto, G. A. Helm, A. J. Lusis and W. Shi (2006). "Deficiency of inducible NO synthase reduces advanced but not early atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice." *Life Sci* **79**(6): 525-531.
- Mohandas, N. and P. G. Gallagher (2008). "Red cell membrane: past, present, and future." *Blood* **112**(10): 3939-3948.
- Montani, D., M. C. Chaumais, L. Savale, D. Natali, L. C. Price, X. Jais, M. Humbert, G. Simonneau and O. Sitbon (2009). "Phosphodiesterase type 5 inhibitors in pulmonary arterial hypertension." *Adv Ther* **26**(9): 813-825.
- Mullenheim, J., S. Muller, U. Laber, V. Thamer, W. Meyer, E. Bassenge, B. Fink and G. Kojda (2001). "The effect of high-dose pentaerythritol tetranitrate on the development of nitrate tolerance in rabbits." *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **364**(3): 269-275.
- Mullershausen, F., M. Russwurm, A. Friebe and D. Koesling (2004). "Inhibition of phosphodiesterase type 5 by the activator of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase BAY 41-2272." *Circulation* **109**(14): 1711-1713.
- Munzel, T., A. Daiber and T. Gori (2011). "Nitrate therapy: new aspects concerning molecular action and tolerance." *Circulation* **123**(19): 2132-2144.
- Munzel, T., A. Daiber and T. Gori (2013). "More answers to the still unresolved question of nitrate tolerance." *Eur Heart J* **34**(34): 2666-2673.

- Munzel, T., A. Daiber and A. Mulsch (2005). "Explaining the phenomenon of nitrate tolerance." Circ Res **97**(7): 618-628.
- Munzel, T. and T. Gori (2013). "Nitrate therapy and nitrate tolerance in patients with coronary artery disease." Curr Opin Pharmacol **13**(2): 251-259.
- Nagababu, E., S. Ramasamy, D. R. Abernethy and J. M. Rifkind (2003). "Active nitric oxide produced in the red cell under hypoxic conditions by deoxyhemoglobin-mediated nitrite reduction." J Biol Chem **278**(47): 46349-46356.
- Nakamura, M., K. Ichikawa, M. Ito, B. Yamamori, T. Okinaka, N. Isaka, Y. Yoshida, S. Fujita and T. Nakano (1999). "Effects of the phosphorylation of myosin phosphatase by cyclic GMP-dependent protein kinase." Cell Signal **11**(9): 671-676.
- Nakashima, Y., Y. Toyokawa, S. Tanaka, K. Yamashita, A. Yashiro, H. Tasaki and A. Kuroiwa (1996). "Simvastatin increases plasma NO₂- and NO₃- levels in patients with hypercholesterolemia." Atherosclerosis **127**(1): 43-47.
- Napoli, C., V. Sica, F. de Nigris, O. Pignalosa, M. Condorelli, L. J. Ignarro and A. Liguori (2004). "Sulfhydryl angiotensin-converting enzyme inhibition induces sustained reduction of systemic oxidative stress and improves the nitric oxide pathway in patients with essential hypertension." Am Heart J **148**(1): e5.
- Nikolsky, E., E. D. Aymong, A. Halkin, C. L. Grines, D. A. Cox, E. Garcia, R. Mehran, J. E. Tcheng, J. J. Griffin, G. Guagliumi, T. Stuckey, M. Turco, D. A. Cohen, M. Negoita, A. J. Lansky and G. W. Stone (2004). "Impact of anemia in patients with acute myocardial infarction undergoing primary percutaneous coronary intervention: analysis from the Controlled Abciximab and Device Investigation to Lower Late Angioplasty Complications (CADILLAC) Trial." J Am Coll Cardiol **44**(3): 547-553.
- Nunez, C., V. M. Victor, R. Tur, A. Alvarez-Barrientos, S. Moncada, J. V. Esplugues and P. D'Ocon (2005). "Discrepancies between nitroglycerin and NO-releasing drugs on mitochondrial oxygen consumption, vasoactivity, and the release of NO." Circ Res **97**(10): 1063-1069.
- Nygaard, G., L. Herfindal, R. Kopperud, A. M. Aragay, H. Holmsen, S. O. Doskeland, R. Kleppe and F. Selheim (2014). "Time-dependent inhibitory effects of cGMP-analogues on thrombin-induced platelet-derived microparticles formation, platelet aggregation, and P-selectin expression." Biochem Biophys Res Commun **449**(3): 357-363.
- O'Driscoll, G., D. Green and R. R. Taylor (1997). "Simvastatin, an HMG-coenzyme A reductase inhibitor, improves endothelial function within 1 month." Circulation **95**(5): 1126-1131.
- Ohlstein, E. H., K. S. Wood and L. J. Ignarro (1982). "Purification and properties of heme-deficient hepatic soluble guanylate cyclase: effects of heme and other factors on enzyme activation by NO, NO-heme, and protoporphyrin IX." Arch Biochem Biophys **218**(1): 187-198.
- Ostrowski, J. and K. Resag (1985). "Pharmacokinetics of molsidomine in humans." Am Heart J **109**(3 Pt 2): 641-643.
- Ozaki, M., S. Kawashima, T. Yamashita, T. Hirase, M. Namiki, N. Inoue, K. Hirata, H. Yasui, H. Sakurai, Y. Yoshida, M. Masada and M. Yokoyama (2002).

- "Overexpression of endothelial nitric oxide synthase accelerates atherosclerotic lesion formation in apoE-deficient mice." J Clin Invest **110**(3): 331-340.
- Paulus, W. J., P. J. Vantrimpont and A. M. Shah (1995). "Paracrine coronary endothelial control of left ventricular function in humans." Circulation **92**(8): 2119-2126.
- Pautz, A., P. Rauschkolb, N. Schmidt, J. Art, M. Oelze, P. Wenzel, U. Forstermann, A. Daiber and H. Kleinert (2009). "Effects of nitroglycerin or pentaerithrityl tetranitrate treatment on the gene expression in rat hearts: evidence for cardiotoxic and cardioprotective effects." Physiol Genomics **38**(2): 176-185.
- Pfeifer, A., P. Ruth, W. Dostmann, M. Sausbier, P. Klatt and F. Hofmann (1999). "Structure and function of cGMP-dependent protein kinases." Rev Physiol Biochem Pharmacol **135**: 105-149.
- Piknova, B. and A. N. Schechter (2011). "Measurement of nitrite in blood samples using the ferricyanide-based hemoglobin oxidation assay." Methods Mol Biol **704**: 39-56.
- Pinsky, D. J., S. Patton, S. Mesaros, V. Brovkovich, E. Kubaszewski, S. Grunfeld and T. Malinski (1997). "Mechanical transduction of nitric oxide synthesis in the beating heart." Circ Res **81**(3): 372-379.
- Poulos, T. L. (2006). "Soluble guanylate cyclase." Curr Opin Struct Biol **16**(6): 736-743.
- Prendergast, B. D., V. F. Sagach and A. M. Shah (1997). "Basal release of nitric oxide augments the Frank-Starling response in the isolated heart." Circulation **96**(4): 1320-1329.
- Rajfer, J., W. J. Aronson, P. A. Bush, F. J. Dorey and L. J. Ignarro (1992). "Nitric oxide as a mediator of relaxation of the corpus cavernosum in response to nonadrenergic, noncholinergic neurotransmission." N Engl J Med **326**(2): 90-94.
- Ramamurthi, A. and R. S. Lewis (1997). "Measurement and modeling of nitric oxide release rates for nitric oxide donors." Chem Res Toxicol **10**(4): 408-413.
- Rapoport, R. M., M. B. Draznin and F. Murad (1983). "Endothelium-dependent relaxation in rat aorta may be mediated through cyclic GMP-dependent protein phosphorylation." Nature **306**(5939): 174-176.
- Rassaf, T., M. Totzeck, U. B. Hendgen-Cotta, S. Shiva, G. Heusch and M. Kelm (2014). "Circulating Nitrite Contributes to Cardioprotection by Remote Ischemic Preconditioning." Circulation Research: CIRCRESAHA.114.303822.
- Rees, D. D., R. M. Palmer and S. Moncada (1989). "Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(9): 3375-3378.
- Reinhard, M., M. Halbrugge, U. Scheer, C. Wiegand, B. M. Jockusch and U. Walter (1992). "The 46/50 kDa phosphoprotein VASP purified from human platelets is a novel protein associated with actin filaments and focal contacts." EMBO J **11**(6): 2063-2070.
- Reinhard, M., T. Jarchau and U. Walter (2001). "Actin-based motility: stop and go with Ena/VASP proteins." Trends Biochem Sci **26**(4): 243-249.

- Rubanyi, G. M., J. C. Romero and P. M. Vanhoutte (1986). "Flow-induced release of endothelium-derived relaxing factor." *Am J Physiol* **250**(6 Pt 2): H1145-1149.
- Russwurm, M. and D. Koesling (2004). "NO activation of guanylyl cyclase." *The EMBO Journal* **23**: 4443-4450.
- Russwurm, M., N. Wittau and D. Koesling (2001). "Guanylyl cyclase/PSD-95 interaction: targeting of the nitric oxide-sensitive alpha2beta1 guanylyl cyclase to synaptic membranes." *J Biol Chem* **276**(48): 44647-44652.
- Rybalkin, S. D., I. G. Rybalkina, M. Shimizu-Albergine, X. B. Tang and J. A. Beavo (2003). "PDE5 is converted to an activated state upon cGMP binding to the GAF A domain." *EMBO J* **22**(3): 469-478.
- Rybalkin, S. D., C. Yan, K. E. Bornfeldt and J. A. Beavo (2003). "Cyclic GMP phosphodiesterases and regulation of smooth muscle function." *Circ Res* **93**(4): 280-291.
- Schlossmann, J., A. Ammendola, K. Ashman, X. Zong, A. Huber, G. Neubauer, G. X. Wang, H. D. Allescher, M. Korth, M. Wilm, F. Hofmann and P. Ruth (2000). "Regulation of intracellular calcium by a signalling complex of IRAG, IP3 receptor and cGMP kinase Ibeta." *Nature* **404**(6774): 197-201.
- Schwarz, U. R., J. Geiger, U. Walter and M. Eigenthaler (1999). "Flow cytometry analysis of intracellular VASP phosphorylation for the assessment of activating and inhibitory signal transduction pathways in human platelets--definition and detection of ticlopidine/clopidogrel effects." *Thromb Haemost* **82**(3): 1145-1152.
- Shibata, K., Y. Yatera, Y. Furuno, K. Sabanai, N. Morisada, S. Nakata, T. Morishita, F. Yamazaki, A. Tanimoto, Y. Sasaguri, H. Tasaki, Y. Nakashima, H. Shimokawa, N. Yanagihara, Y. Otsuji and M. Tsutsui (2010). "Spontaneous development of left ventricular hypertrophy and diastolic dysfunction in mice lacking all nitric oxide synthases." *Circ J* **74**(12): 2681-2692.
- Srihirun, S., T. Sriwantana, S. Unchern, D. Kittikool, E. Noulsri, K. Pattanapanyasat, S. Fucharoen, B. Piknova, A. N. Schechter and N. Sibmooh (2012). "Platelet inhibition by nitrite is dependent on erythrocytes and deoxygenation." *PLoS One* **7**(1): e30380.
- Sriram, K., J. G. Laughlin, P. Rangamani and D. M. Tartakovsky (2016). "Shear-Induced Nitric Oxide Production by Endothelial Cells." *Biophys J* **111**(1): 208-221.
- Stamler, J. S., O. Jaraki, J. Osborne, D. I. Simon, J. Keaney, J. Vita, D. Singel, C. R. Valeri and J. Loscalzo (1992). "Nitric oxide circulates in mammalian plasma primarily as an S-nitroso adduct of serum albumin." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(16): 7674-7677.
- Stasch, J. P., C. Alonso-Alija, H. Apeler, K. Dembowski, A. Feuerer, T. Minuth, E. Perzborn, M. Schramm and A. Straub (2002). "Pharmacological actions of a novel NO-independent guanylyl cyclase stimulator, BAY 41-8543: in vitro studies." *Br J Pharmacol* **135**(2): 333-343.
- Stasch, J. P., E. M. Becker, C. Alonso-Alija, H. Apeler, K. Dembowski, A. Feuerer, R. Gerzer, T. Minuth, E. Perzborn, U. Pleiss, H. Schroder, W. Schroeder, E. Stahl,

- W. Steinke, A. Straub and M. Schramm (2001). "NO-independent regulatory site on soluble guanylate cyclase." *Nature* **410**(6825): 212-215.
- Stasch, J. P., K. Dembowsky, E. Perzborn, E. Stahl and M. Schramm (2002). "Cardiovascular actions of a novel NO-independent guanylyl cyclase stimulator, BAY 41-8543: in vivo studies." *Br J Pharmacol* **135**(2): 344-355.
- Straub, A., J. P. Stasch, C. Alonso-Alija, J. Benet-Buchholz, B. Ducke, A. Feurer and C. Furstner (2001). "NO-independent stimulators of soluble guanylate cyclase." *Bioorg Med Chem Lett* **11**(6): 781-784.
- Stroes, E., J. Kastelein, F. Cosentino, W. Erkelens, R. Wever, H. Koomans, T. Luscher and T. Rabelink (1997). "Tetrahydrobiopterin restores endothelial function in hypercholesterolemia." *J Clin Invest* **99**(1): 41-46.
- Sutera, S. P., R. A. Gardner, C. W. Boylan, G. L. Carroll, K. C. Chang, J. S. Marvel, C. Kilo, B. Gonen and J. R. Williamson (1985). "Age-related changes in deformability of human erythrocytes." *Blood* **65**(2): 275-282.
- Sydow, K., A. Daiber, M. Oelze, Z. Chen, M. August, M. Wendt, V. Ullrich, A. Mulsch, E. Schulz, J. F. Keaney, Jr., J. S. Stamler and T. Munzel (2004). "Central role of mitochondrial aldehyde dehydrogenase and reactive oxygen species in nitroglycerin tolerance and cross-tolerance." *J Clin Invest* **113**(3): 482-489.
- Tarkin, J. M. and J. C. Kaski (2016). "Vasodilator Therapy: Nitrates and Nicorandil." *Cardiovasc Drugs Ther.*
- Thomas, M. K., S. H. Francis and J. D. Corbin (1990). "Substrate- and kinase-directed regulation of phosphorylation of a cGMP-binding phosphodiesterase by cGMP." *J Biol Chem* **265**(25): 14971-14978.
- Totzeck, M., U. B. Hendgen-Cotta, C. Rammos, L. M. Frommke, C. Knackstedt, H. G. Predel, M. Kelm and T. Rassaf (2012). "Higher endogenous nitrite levels are associated with superior exercise capacity in highly trained athletes." *Nitric Oxide* **27**(2): 75-81.
- Tsutsui, M., A. Tanimoto, M. Tamura, H. Mukae, N. Yanagihara, H. Shimokawa and Y. Otsuji (2015). "Significance of nitric oxide synthases: Lessons from triple nitric oxide synthases null mice." *J Pharmacol Sci* **127**(1): 42-52.
- Turko, I. V., S. H. Francis and J. D. Corbin (1998). "Binding of cGMP to both allosteric sites of cGMP-binding cGMP-specific phosphodiesterase (PDE5) is required for its phosphorylation." *Biochem J* **329** (Pt 3): 505-510.
- Ulker, P., H. J. Meiselman and O. K. Baskurt (2010). "Nitric oxide generation in red blood cells induced by mechanical stress." *Clin Hemorheol Microcirc* **45**(2-4): 169-175.
- van Haperen, R., M. de Waard, E. van Deel, B. Mees, M. Kutryk, T. van Aken, J. Hamming, F. Grosveld, D. J. Duncker and R. de Crom (2002). "Reduction of blood pressure, plasma cholesterol, and atherosclerosis by elevated endothelial nitric oxide." *J Biol Chem* **277**(50): 48803-48807.
- Vasioukhin, V., C. Bauer, M. Yin and E. Fuchs (2000). "Directed actin polymerization is the driving force for epithelial cell-cell adhesion." *Cell* **100**(2): 209-219.

- Wajih, N., X. Liu, P. Shetty, S. Basu, H. Wu, N. Hogg, R. P. Patel, C. M. Furdui and D. B. Kim-Shapiro (2016). "The role of red blood cell S-nitrosation in nitrite bioactivation and its modulation by leucine and glucose." Redox Biol **8**: 415-421.
- Wall, M. E., S. H. Francis, J. D. Corbin, K. Grimes, R. Richie-Jannetta, J. Kotera, B. A. Macdonald, R. R. Gibson and J. Trewhella (2003). "Mechanisms associated with cGMP binding and activation of cGMP-dependent protein kinase." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(5): 2380-2385.
- Webb, A. J., A. B. Milsom, K. S. Rathod, W. L. Chu, S. Qureshi, M. J. Lovell, F. M. Lecomte, D. Perrett, C. Raimondo, E. Khoshbin, Z. Ahmed, R. Uppal, N. Benjamin, A. J. Hobbs and A. Ahluwalia (2008). "Mechanisms underlying erythrocyte and endothelial nitrite reduction to nitric oxide in hypoxia: role for xanthine oxidoreductase and endothelial nitric oxide synthase." Circ Res **103**(9): 957-964.
- Winqvist, R. J., E. P. Faison, S. A. Waldman, K. Schwartz, F. Murad and R. M. Rapoport (1984). "Atrial natriuretic factor elicits an endothelium-independent relaxation and activates particulate guanylate cyclase in vascular smooth muscle." Proc Natl Acad Sci U S A **81**(23): 7661-7664.
- Yang, L., G. Liu, S. I. Zakharov, A. M. Bellinger, M. Mongillo and S. O. Marx (2007). "Protein kinase G phosphorylates Cav1.2 alpha1c and beta2 subunits." Circ Res **101**(5): 465-474.
- Zhang, J., Z. Chen, F. R. Cobb and J. S. Stamler (2004). "Role of mitochondrial aldehyde dehydrogenase in nitroglycerin-induced vasodilation of coronary and systemic vessels: an intact canine model." Circulation **110**(6): 750-755.
- Zhang, Y. H. and B. Casadei (2012). "Sub-cellular targeting of constitutive NOS in health and disease." J Mol Cell Cardiol **52**(2): 341-350.

Danksagung

Rückblickend betrachtet war die Zeit der Anfertigung dieser Arbeit und der Durchführung der Experimente eine sehr lehrreiche und interessante, manchmal aber auch anstrengende Zeit. Ohne die Unterstützung einiger Personen wäre dies nicht möglich gewesen, daher möchte ich mich bedanken.

Zunächst gilt der Dank meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Malte Kelm für die Möglichkeit in der Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie diese Dissertation anfertigen zu können.

Weiter möchte ich Frau Prof. Miriam M. Cortese-Krott danken, die mich in den letzten Jahren von meinen ersten Gehversuchen im Labor bis zum Abschluss der Dissertation begleitet und supervidiert hat. Sie lehrte mich, wie man wissenschaftlich arbeitet und wissenschaftliche Ergebnisse diskutiert, zudem zeigte sie mir die labortechnischen Methoden. Die Zeit war geprägt von vielen fruchtbaren Diskussionen, die neue Ideen und Fragestellungen eröffneten.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. Georg Wolff für die Rekrutierung der Patienten im Rahmen der klinischen Studien und die enge Begleitung meiner Versuche.

Nicht zuletzt danke ich dem Team des kardiologischen Labores für die angenehme Zeit und die guten Diskussionen. Insbesondere möchte ich hier Frau Sivatharsini Thasian-Sivarajah erwähnen, die mich bei der praktischen Umsetzung der Experimente unterstützte und mir die Durchführung neuer Methoden demonstrierte. Gleiches gilt für Frau Dr. rer. nat. Christina Panknin und Herrn Dr. rer. nat. Christian Kramer, die zudem Ideen zur Verbesserung von Experimenten einbrachten und mir mit Rat und Tat zur Seite standen. Ferner danke ich Frau Annette Rauf, Herrn Jonathan Schmidt und Frau Thirumakal Manokaran für die Hilfe und Mitarbeit bei der Asservierung von Proben im Rahmen der klinischen Studie.

Zuletzt danke ich meiner Familie und hier insbesondere meiner lieben Frau für die Geduld und die Unterstützung, ohne sie wäre diese Arbeit ebenfalls nicht möglich gewesen.