

Aus der Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. Malte Kelm

Kardiovaskuläre Charakterisierung transgener Mauslinien mit
gewebespezifischer eNOS- und Arg-1-Expression

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

vorgelegt von

Julia Hocks

2023

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

Gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachterin: Prof. Dr. Dr. Miriam Cortese-Krott

Zweitgutachter: PD Dr. Dr. Andre Heinen

Teile der vorliegenden Dissertation wurden veröffentlicht:

Als Posterbeitrag:

Cardiovascular characterization of mice with tissue specific NOS3 deficiency, J Hocks, L Diederich, S Becher, M Kelm, M M Cortese-Krott, T Suvorava, 2018, CAVAD Symposium

Zusammenfassung

Hintergrund: Stickstoffmonoxid (NO), das von den drei NO-Synthasen (NOS) produziert wird, spielt eine wichtige Rolle im kardiovaskulären System. Es ist unter anderem wichtig für die Regulation von Blutfluss und Gefäßtonus und wirkt als Vasodilatator. Für die Fluss-vermittelte Vasodilatation (FMD) ist insbesondere die konstitutionell exprimierte eNOS von großer Bedeutung. In vorherigen Arbeiten unserer Gruppe konnte gezeigt werden, dass Erythrozyten eine funktionelle eNOS besitzen. Sowohl eNOS als auch die beiden Isoformen der Arginase setzen L-Arginin als Substrat um. Um die gewebespezifischen Funktionen der eNOS und der Arg-1 näher zu untersuchen, wurden transgene Mäuse erzeugt.

Hypothese: Die Hypothese dieser Arbeit ist, dass die erythrozytäre und endotheliale eNOS und Arg-1 zur Regulation vaskulärer und kardialer Funktionen beitragen und die Erholung nach myokardialer Ischämie/Reperfusion (I/R) beeinflussen.

Methoden: Um die Hypothese zu überprüfen wurden mithilfe des Cre-Lox-P-Systems transgene Mäuse mit gewebsspezifischem eNOS- und Arg-1-KO und -KI erzeugt. Die kardiale Funktion der Mäuse wurde mittels Echokardiographie und die vaskuläre Funktion durch Messung der FMD mittels hochauflösenden Ultraschalls gemessen. Zudem wurden die Mäuse einer I/R unterzogen und die kardiale Funktion anschließend mittels Echokardiographie untersucht.

Ergebnisse: In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die endotheliale eNOS entscheidend für die durch FMD gemessene endotheliale Funktion ist, da durch den KI der endothelialen eNOS die FMD wiederhergestellt werden konnte. Zudem zeigte sich, dass die FMD nicht von der erythrozytären eNOS beeinflusst wird. Die basale kardiale Funktion wurde durch den KO der erythrozytären eNOS nicht beeinflusst. Durch den KO der erythrozytären Arg-1 konnte weder in Bezug auf die FMD noch auf die basale kardiale Funktion Veränderungen festgestellt werden. Auch der endotheliale Arg-1-KO führte nicht zu einer Veränderung der FMD. Nach myokardialer Ischämie und Reperfusion (I/R) konnte bei der erythrozytären eNOS-KO-Linie eine signifikant schlechtere Ejektionsfraktion (EF) sowie eine Abnahme des Herzzeitvolumens im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt werden. Bei der erythrozytären Arg-1-KO-Gruppe konnte nach I/R keine signifikante Veränderung der kardialen Funktion gemessen werden.

Zusammenfassung und Schlussfolgerung: Die Ergebnisse zeigen, dass die endotheliale eNOS essenziell an der endothelialen Funktion, die durch FMD gemessen wurde, beteiligt ist, während die erythrozytäre eNOS diese nicht beeinflusst. Arg-1 spielt weder im Endothel noch in den Erythrozyten eine Rolle bei der Entstehung der FMD, obwohl Arg-1 und eNOS das gleiche Substrat nutzen. Die erythrozytäre eNOS trägt zur Kardioprotektion nach I/R bei.

Abstract

Background: Nitric oxide (NO), being produced by the three NO synthases (NOS), plays an important role in the cardiovascular system. Among others it is important for the regulation of bloodflow and vascular tone and plays an important role as a vasodilator. For flow-mediated-vasodilation (FMD) the constitutively expressed endothelial NOS (eNOS) is especially important. Older experiments from our lab proofed that not only endothelial cells but also erythrocytes express a functional NOS. The NOS and both isoforms of the enzyme arginase use the aminoacid L-arginine as substrate.

Hypothesis: Erythrocyte and endothelial eNOS and Arginase-1 (Arg-1) contribute to the regulation of vascular and cardiac function and influence the recovery after myocardial ischemia/reperfusion (I/R).

Methods: To test this hypothesis transgenic mice with erythrocyte and endothelial specific eNOS-knock-outs (KOs) and -knock-ins (KIs) and Arg-1-KOs were generated using Cre-Lox-P-technology. Cardiac function was assessed using echocardiography and vascular function was measured through FMD via high-resolution-ultrasound. Some mice underwent I/R and cardiac function was measured afterwards via echocardiography.

Results: In this thesis the crucial role of endothelial eNOS for endothelial function measured by FMD could be shown. Further it could be shown that erythrocyte eNOS does not influence FMD. Basal cardiac function was not changed by the KO of erythrocyte eNOS.

KO of erythrocyte Arg-1 neither changed vascular nor basal cardiac function. The KO of endothelial Arg-1 did not change FMD. Erythrocyte eNOS KO mice did show a significant reduction of ejection fraction and in cardiac output after I/R in comparison to the control group. The erythrocyte Arg-1-KO did not lead to measurable changes in cardiac function after I/R injury.

Summary and Conclusion: The results show that endothelial eNOS is essential for endothelial function, which was measured by FMD, while erythrocyte eNOS does not influence FMD. Arg-1 does not play a role in the regulation of FMD even though Arg-1 and eNOS use the same substrate. Erythrocyte eNOS contributes to cardioprotection after I/R.

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----|
| Zusammenfassung | IV |
| Abstract..... | V |
| Inhaltsverzeichnis | VI |
| Abbildungsverzeichnis..... | IX |
| Tabellenverzeichnis..... | XI |
| Abkürzungsverzeichnis | XII |
| 1. Einleitung..... | 1 |
| 1.1 Epidemiologie kardiovaskulärer Erkrankungen..... | 1 |
| 1.2 NO-Synthasen | 1 |
| 1.2.1 Isoformen | 1 |
| 1.2.1.1 nNOS..... | 2 |
| 1.2.1.2 iNOS | 2 |
| 1.2.1.3 eNOS..... | 2 |
| 1.2.2 Physiologische Funktion von eNOS und NO..... | 3 |
| 1.2.3 Physiologische Endothelfunktion | 4 |
| 1.2.4 Endotheliale Dysfunktion | 6 |
| 1.2.5 Auswirkung von Modulatoren der NO-Bioverfügbarkeit auf kardiovaskuläre Funktionen..... | 8 |
| 1.2.6 Transgene Mauslinien mit veränderter eNOS-Expression..... | 9 |
| 1.2.6.1 Vaskuläre/ endotheliale Funktion globaler eNOS-KO-Linien | 9 |
| 1.2.6.2 Kardiale Funktion globaler eNOS-KO-Mäuse unter Ruhebedingungen | 9 |
| 1.2.7 Auswirkung myokardialer Ischämie/Reperfusion auf die kardiale Funktion von eNOS-KO-Mäusen | 10 |
| 1.2.8 Transgene Mäuse mit eNOS-Überexpression | 11 |
| 1.2.9 Erythrozytäre eNOS | 12 |
| 1.3 Arginase | 14 |
| 1.3.1 Einfluss von Arginase auf die vaskuläre Funktion..... | 15 |
| 1.3.2 Einfluss der Arginase auf die kardiale Funktion | 15 |

| | |
|---|----|
| 1.4 Ziel der Arbeit..... | 17 |
| 2. Materialien und Methoden..... | 19 |
| 2.1 Materialien | 19 |
| 2.1.1 Transgene Mauslinien..... | 19 |
| 2.1.1.1 Erythrozytäre eNOS-KO-Mäuse | 20 |
| 2.1.1.2 Endotheliale eNOS-KI-Mäuse | 20 |
| 2.1.1.3 Erythrozytäre Arg-1-KO-Mäuse | 21 |
| 2.1.1.4 Endotheliale Arg-1-KO-Mäuse | 21 |
| 2.1.1.5 Überblick über die transgenen Mauslinien..... | 22 |
| 2.2 Methoden | 23 |
| 2.2.1 Echokardiographie | 23 |
| 2.2.2 Fluss-vermittelte-Vasodilatation..... | 29 |
| 2.2.3 Ischämie/Reperfusion | 32 |
| 2.2.3.1 Durchführung..... | 32 |
| 2.2.4 Auswertung und Statistik | 33 |
| 2.2.4.1 Auswertung der echokardiographischen Bilder | 33 |
| 2.2.4.2 Auswertung der Fluss-vermittelten-Vasodilatation | 35 |
| 2.3 Statistische Auswertung | 36 |
| 3. Ergebnisse..... | 37 |
| 3.1 Einfluss von eNOS auf die endotheliale und kardiale Funktion..... | 37 |
| 3.1.1 Fluss-vermittelte-Vasodilatation..... | 37 |
| 3.1.1.1 Wiedergewinn der endothelialen Funktion durch funktionale endotheliale eNOS | 37 |
| 3.1.1.2 Kein Einfluss der erythrozytären eNOS auf die FMD | 40 |
| 3.1.2 Echokardiographie/Kardiale Funktion..... | 42 |
| 3.1.2.1 Kein Einfluss der erythrozytären eNOS auf die basale kardiale Funktion | 42 |
| 3.2 Rolle von Arg-1 in Endothelzellen und Erythrozyten | 44 |
| 3.2.1 Vaskuläre Funktion | 44 |
| 3.2.1.1 Kein positiver Effekt des endothelialen Arg-1-KOs auf die endotheliale Funktion | 44 |

| | |
|---|----|
| 3.2.1.2 Kein Unterschied in der Endothelfunktion nach KO der erythrozytären Arg-1 | 46 |
| 3.2.2 Einfluss von Arg-1 auf die kardiale Funktion | 48 |
| 3.2.2.1 Erythrozytäre Arg-1-KOs..... | 48 |
| 3.3 Kardiale Funktion nach Ischämie/Reperfusion | 50 |
| 3.3.1 Negative Auswirkung des KO der erythrozytären eNOS auf die kardiale Funktion nach I/R | 50 |
| 3.3.2 Kein Effekt des KO der erythrozytären Arg-1 auf die kardiale Funktion nach I/R .. | 52 |
| 3.4 Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse | 55 |
| 4. Diskussion | 56 |
| 4.1 Wesentliche Rolle der endothelialen eNOS für die Endothelfunktion | 57 |
| 4.2 Protektiver Effekt der erythrozytären eNOS nach I/R | 60 |
| 4.3 Kein Effekt der erythrozytären und endothelialen Arg-1 auf die vaskuläre Funktion | 62 |
| 4.4 Effekt der erythrozytären Arg-1 auf die kardiale Funktion | 65 |
| 5. Schlussfolgerung und Ausblick | 67 |
| Literaturverzeichnis | 69 |
| Danksagung und Anmerkungen..... | I |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abbildung 1: Funktion und Lokalisation von eNOS und Arg-1 | 18 |
| Abbildung 2: Kreuzungsschema der erythrozytären eNOS-KO-Linie | 20 |
| Abbildung 3: Kreuzungsschema der endothelialen eNOS-KI-Linie..... | 20 |
| Abbildung 4: Kreuzungsschema der erythrozytären Arg-1-KO Linie | 21 |
| Abbildung 5: Kreuzungsschema der endothelialen Arg-1-KO Linie..... | 21 |
| Abbildung 6: Schematische Darstellung der Echokardiographie und FMD | 23 |
| Abbildung 7: Gasmischer für die Mischung und Dosierung von Isofluran und Sauerstoff..... | 24 |
| Abbildung 8: Lage der Maus und Position des Schallkopfs während des PSLA-Modus..... | 25 |
| Abbildung 9: Schematische Darstellung der Schnittebene im PSLA-Modus..... | 25 |
| Abbildung 10: PSLA-Modus (B-Bild)..... | 26 |
| Abbildung 11: PSLA-Modus (M-Modus) | 26 |
| Abbildung 12: Position des Schallkopfes während Darstellung des SAX-Modus..... | 27 |
| Abbildung 13: SAX-Modus (B-Bild)..... | 27 |
| Abbildung 14: SAX-Modus (M-Modus) | 28 |
| Abbildung 15: Aufbau während der Darstellung des Flusses über der Mitralklappe | 28 |
| Abbildung 16: Darstellung des Flusses über der Mitralklappe | 29 |
| Abbildung 17: Position der Maus und des Schallkopfes während FMD | 30 |
| Abbildung 18: FMD in der <i>Arteria iliaca</i> | 31 |
| Abbildung 19: Auswertung des M-Modus des PSLA-Modus zur Ausmessung der Dicke des Interventrikularseptums und der Hinterwand des linken Ventrikels | 34 |
| Abbildung 20: Auswertung des Flusses über der Mitralklappe | 35 |
| Abbildung 21: Kein Unterschied zwischen der LoxP-INV-eNOS-Gruppe und der EC-eNOS-KI-Gruppe vor Induktion des KIs | 38 |
| Abbildung 22: Kein signifikanter Unterschied im maximalen Gefäßdurchmesser zwischen der LoxP-INV-eNOS-Gruppe und der EC-eNOS-KI-Gruppe vor Tamoxifen..... | 38 |
| Abbildung 23: FMD in der EC-eNOS-KI-Gruppe | 39 |
| Abbildung 24: Signifikant gesteigerte FMD in der EC-eNOS-KI-Gruppe | 39 |
| Abbildung 25: FMD der RBC-eNOS-KO | 40 |
| Abbildung 26: Keine Unterschiede in der maximalen FMD der RBC-eNOS-KO | 41 |
| Abbildung 27: LV Parameter der RBC-eNOS-KO | 42 |
| Abbildung 28: FMD der EC-Arg-1-KOs..... | 44 |
| Abbildung 29: Max. FMD der EC-Arg-1-KOs..... | 45 |
| Abbildung 30: FMD der RBC-Arg-1-KO | 46 |
| Abbildung 31: Maximale FMD der RBC-Arg-1-KOs | 47 |
| Abbildung 32: LV-Funktion der RBC-Arg-1-KO | 48 |
| Abbildung 33: LV-Funktion der RBC-eNOS-KO nach I/R | 51 |

Abbildung 34: LV-Funktion der RBC-Arg-1-KO nach I/R..... 53
Abbildung 35: Rolle und Lokalisation von eNOS und Arg-1 im kardiovaskulären System..... 56

Tabellenverzeichnis

| | |
|--|----|
| Tabelle 1: Statistik der kardialen Parameter der RBC-eNOS-KO-Gruppe..... | 43 |
| Tabelle 2: Statistik der kardialen Parameter der RBC-Arg-1-KO. | 49 |
| Tabelle 3: Statistik der kardialen Parameter der RBC-eNOS-KO nach I/R. | 52 |
| Tabelle 4: Statistik der kardialen Parameter der RBC-Arg-1-KO. | 54 |
| Tabelle 5: Übersicht der wesentlichen Unterschiede der einzelnen Gruppen. | 55 |

Abkürzungsverzeichnis

| | | | |
|------------------------|---|----------------------|---|
| ANP | atriales natriuretisches Peptid | KHK | koronare Herzkrankheit |
| Arg-1 | Arginase-1 | KI | <i>knock-in</i> |
| Arg-2 | Arginase-2 | KO | <i>knock-out</i> |
| BH4 | Tetrahydrobiopterin | L-NAME | N ^ω -nitro-L-arginin-methylester |
| Ca²⁺ | ionisiertes Calcium | L-NMMA | N ^G -monomethyl-L-arginin |
| cAMP | zyklisches Adenosinmonophosphat | mg | Milligramm |
| cGMP | zyklisches Guanosinmonophosphat | MHz | Megahertz |
| EC | <i>endothelial cell</i> | I/R | myokardiale Ischämie/Reperfusion |
| EDV | enddiastolisches Volumen | NO | Stickstoffmonoxid |
| EDRF | <i>endothelium derived relaxing factor</i> | NOS | Stickstoffmonoxidsynthase |
| ESV | endsystolisches Volumen | nNOS | neuronale Stickstoffmonoxidsynthase |
| eNOS | endotheliale Stickstoffmonoxidsynthase | Nor-NOHA | N ^ω -Hydroxy-Nor-L-Arginin |
| Fe²⁺ | ionisiertes Eisen | Nrf-2 | <i>nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2</i> |
| FMD | flussvermittelte Vasodilatation | O₂ | Sauerstoff |
| GTP | Guanosintriphosphat | pAVK | periphere arterielle Verschlusskrankheit |
| hsp-90 | <i>heat shock protein 90</i> | PKG | Proteinkinase G |
| HZV | Herzzeitvolumen | PI3K | Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat |
| IL-6 | Interleukin 6 | RBC | Red blood cell |
| iNOS | induzierbare Stickstoffmonoxidsynthase | ROS | reaktive Sauerstoffspezies |
| IP3 | Inositoltriphosphat | RXNO | Summe der NO Spezies |
| IRAG | <i>Inositol-1,4,5-triphosphat receptor associated cGMP kinase substrate</i> | SERCA | <i>sarco/endoplasmatic reticulum Ca²⁺ ATPase</i> |
| K⁺ | ionisiertes Kalium | sGC | lösliche Guanylatzyklase |
| | | SNP | Natriumnitroprussid |

| | |
|--------------------------------|-------------------------------|
| SV | Schlagvolumen |
| TAM | Tamoxifen |
| TNF-α | Tumornekrosefaktor α |
| TPR | totaler peripherer Widerstand |
| WT | Wildtyp |
| XOR | Xanthin-Oxidoreduktase |

1. Einleitung

1.1 Epidemiologie kardiovaskulärer Erkrankungen

Die zunehmende Inzidenz kardiovaskulärer Erkrankungen stellt in unserer heutigen Gesellschaft ein großes medizinisches Problem dar. Trotz neuer Forschungen zu den Ursachen kardiovaskulärer Erkrankungen bleiben diese eine bedeutende Ursache für Morbidität und Mortalität. 2010 gab es circa 17 Millionen Todesfälle aufgrund kardiovaskulärer Erkrankungen. 2013 waren 13% der Todesfälle der Koronaren Herzkrankheit (KHK) zuzuschreiben. Durch eine Stabilisierung der Inzidenz und Senkung der Mortalität nach Myokardinfarkt kommt es zu einer Steigerung der Prävalenz der KHK [1]. Die Bedeutung der Hypertonie wird angesichts des demographischen Wandels weiter zunehmen. Die weitaus meisten Patienten mit Bluthochdruck sterben an den kardiovaskulären Folgen dieser Erkrankung, beispielsweise Herzinfarkt, Herzinsuffizienz oder Schlaganfall [2-4].

1.2 NO-Synthasen

1.2.1 Isoformen

Stickstoffmonoxid, das von den drei verschiedenen Isoformen der Stickstoffmonoxidsynthase (NOS) hergestellt wird, spielt eine bedeutende Rolle in der Regulation des kardiovaskulären Systems. Allen Formen gemeinsam ist L-Arginin als Substrat sowie Sauerstoff (O_2) und Nikotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH) als Co-Substrate und Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD), Flavinmononukleotid (FMN) und Tetrahydrobiopterin (BH_4) als Co-Faktoren. Zudem sind alle NOS-Isoformen Homodimere und enthalten Hämgruppen und Flavoproteine [5, 6]. Alle Isoformen besitzen eine n-terminale Oxidase- und eine c-terminale Reduktase-Domäne. Zudem ist allen Formen gemein, dass die Oxygenase-Domäne dimerisiert und von zwei separaten Reduktase-Domänen vorliegt [5].

1.2.1.1 nNOS

Die neuronale NOS (nNOS) ist konstitutiv aktiv und ihre Aktivität wird durch Calcium-Ionen (Ca^{2+}) und Calmodulin reguliert. Sie kommt an verschiedenen Orten, zum Beispiel in Neuronen, sympathischen Ganglien, Nebennieren und Epithelzellen vor [6]. Zu ihren physiologischen Funktionen zählen die Modulation des Lernens und des Gedächtnisses. Es gibt Hinweise, dass eine Minderfunktion von nNOS zu Amnesie und Reduktion der Gedächtnisleistung führen kann. Zudem scheint nNOS auch eine Rolle in der zentralen Regulation des Blutdrucks zu spielen und wichtig für den Gefäßtonus zu sein. Eine abnorme Funktion von nNOS ist mit neurodegenerativen Erkrankungen wie Schlaganfall, Alzheimer Demenz, Multipler Sklerose und Parkinson assoziiert. Neben NO produziert nNOS auch Wasserstoffperoxid, dass eine Relaxation der Gefäße bewirkt. [6, 7]

1.2.1.2 iNOS

Die induzierbare NOS (iNOS) ist nicht konstitutiv aktiv, Ca^{2+} -unabhängig und kann durch bakterielle Lipopolysaccharide oder Zytokine aktiviert werden [8, 9]. Sie wurde zuerst in Makrophagen beschrieben [6], lässt sich aber in fast allen Geweben nachweisen. Nach Aktivierung ist sie konstitutiv aktiv und kann große Mengen NO produzieren [9]. In diesen Mengen wirkt NO zytotoxisch. Auch gesunde Zellen können durch NO geschädigt werden [6]. Pathophysiologisch spielt durch iNOS produziertes NO v.a. im septischen Schock eine Rolle, wo es zu einer Vasodilatation der Arteriolen, Hypotension sowie Beeinträchtigung der Mikrozirkulation führt. [6] Die Rolle der iNOS im kardiovaskulären System ist insofern fraglich, als dass ihr sowohl schädliche als auch protektive Funktionen zugeschrieben werden [9].

1.2.1.3 eNOS

Die endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) katalysiert die Bildung von Stickstoffmonoxid (NO) und L-Citrullin aus der Aminosäure L-Arginin. Hierzu werden die Co-Faktoren Ca^{2+} , Calmodulin, BH_4 , O_2 und NADP benötigt [10, 11]. Bei eNOS handelt es sich um ein Homodimer. Dabei besitzt jedes Monomer eine amino-terminale Oxygenase-Domäne und eine carboxy-terminale Reduktase-Domäne [5]. Die Oxygenase-Domäne bindet L-Arginin, BH_4 und Häm, während die Reduktase-Domäne FAD, FMN und NADPH bindet. Bei

Aktivierung dienen die Flavine in der Reduktase-Domäne dazu Elektronen von NADPH zu Hämeisen in der Oxygenase-Domäne des anderen Monomers zu transferieren, sodass es zur Synthese von NO kommen kann [12]. eNOS wird nicht nur in den Endothelzellen exprimiert, sondern auch in Kardiomyozyten, in Gehirn-, Plazenta- und Nierenzellen [6, 13]. Ähnlich wie bei nNOS sind auch bei eNOS Ca^{2+} und Calmodulin wichtig für die Regulation des Enzyms. eNOS setzt NO pulsatil frei, wobei die Freisetzung bei Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels gesteigert wird.

1.2.2 Physiologische Funktion von eNOS und NO

1988 konnten Palmer et al. zuerst nachweisen, dass vaskuläre Endothelzellen L-Arginin zu NO umsetzen [14]. Vorher schrieb man die NO-vermittelten Effekte dem „*Endothelium Derived Relaxing Factor*“ (EDRF) zu, bis man entdeckte, dass es sich bei diesem um NO handelt [15, 16].

Die eNOS bzw. ihr Produkt NO spielt bei der Regulation des Blutdrucks, des Blutflusses und des Gefäßtonus eine wichtige Rolle [8, 17]. Weitere Funktionen von NO sind eine Hemmung 1) der Leukozytenadhäsion und Plättchenaggregation [18, 19], 2) Infiltration von Neutrophilen 3) sowie die Proliferation und Migration glatter Muskelzellen [8, 19, 20]. Zudem wirkt NO als Vasodilatator [17, 19] in der glatten Gefäßmuskulatur. Diese Funktion kann durch die Mediatoren Acetylcholin, Bradykinin und Thrombin beeinflusst werden [21]. Darüber hinaus ist NO auch wichtig für die Reorganisation geschädigter Gefäße [20]. NO beeinflusst den myokardialen Metabolismus unter Ruhebedingungen. Unter ischämischen Bedingungen scheint es jedoch keinen Effekt auf diesen zu haben [22].

Neben Effekten im kardiovaskulären System besitzt NO noch andere Eigenschaften wie die Kontrolle neuronaler Funktionen [7], Regulation der Gentranskription und der posttranslationalen Modifizierungen [6]. Durch Reaktion von NO mit Superoxidanionen kann es zu einer Bildung von Peroxynitrit und damit zu einer Inaktivierung von NO kommen [23]. Peroxynitrit kann oxidative Schäden, Nitration und S-Nitrosylierung unter anderem an Proteinen, Lipiden und der DNA verursachen [6, 24]. NO spielt eine Rolle in der Immunabwehr und trägt gleichzeitig auch zur Gewebeschädigung bei Entzündungen bei [9].

NO ist im Vergleich zu anderen Signalmolekülen stabiler und weniger reaktionsfreudig mit z.B. Thiolen, Cystein und Glutathion. Diese Eigenschaft kombiniert mit der Ladungsfreiheit des Moleküls, ermöglicht es die Zellmembran zu passieren und an seinen Wirkungsort auf der (sub)luminalen Seite des Gefäßendothels zu gelangen [25]. NO hat eine hohe Affinität zu Fe^{2+} -

Häm-Gruppen und reagiert mit löslicher Guanylatzyklase (sGC) [12, 26], wodurch Guanosintriphosphat (GTP) in zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) umgewandelt wird und so eine Signalkaskade aktiviert wird, die zur Vasodilatation führt. cGMP aktiviert Proteinkinase G (PKG), was verschiedene Mechanismen in Gang setzen kann. Zum einen kann es zu einer Aktivierung von Phospholamban und einer SERCA-abhängigen Senkung der Ca^{2+} -Konzentration kommen. Zudem ist eine Phosphorylierung von IRAG und Senkung der Inositoltriphosphat- (IP3) und Ca^{2+} -Konzentrationen möglich. Es kann zu einer Aktivitätsänderung von Kalium-Kanälen, die zu einer Hyperpolarisierung der Zellmembran führt, kommen. Dies hat ebenfalls eine Senkung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration zur Folge. All diese Mechanismen, die zu Senkung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration führen, bewirken eine Phosphorylierung der Myosinleichtketten-Kinase, die wiederum eine Dephosphorylierung der Myosinleichtketten bewirkt, was letztendlich zur Relaxation der Gefäßmuskelzellen und somit zu einer Vasodilatation führt [25].

NO kann in Erythrozyten, im Plasma und im Gewebe in bioaktive Metabolite umgewandelt werden, die zur heterozellulären Kommunikation beitragen. Durch Schubspannung induzierte Deformation von Erythrozyten führt zur ATP-Freisetzung. Dieses bindet vermutlich an Purinrezeptoren auf Endothelzellen und aktiviert so die eNOS Produktion [25].

1.2.3 Physiologische Endothelfunktion

Das Endothel, das die innere Schicht der Gefäße bildet, ist essenziell für die Regulation wichtiger Funktionen, zum Beispiel des Gefäßtonus und des regionalen Blutflusses. Gefäßtonus und Blutfluss werden durch die Produktion verschiedener Vasodilatoren, wie NO und Prostacyclin und Vasokonstriktoren, wie Endothelin, Thromboxan, Angiotensin-2 und Superoxid beeinflusst. Das Endothel bildet die genannten Faktoren und ist somit entscheidend für vaskuläre Funktionen [27]. Im Endothel werden Oberflächenmoleküle exprimiert, die die Interaktion mit Monozyten und Leukozyten beeinflussen, was wiederum die Rekrutierung inflammatorischer Zellen und arteriosklerotischer Plaques beeinflusst [28]. Auch die Modulation der Gefäßmuskelzellproliferation als Reaktion auf Verletzungen, gehört zu den Funktionen des Endothels [28]. Bei ischämischen Verletzungen wird es schon vor Einsetzen von Zellschäden beeinträchtigt [29].

Um die physiologischen Funktionen des Endothels aufrecht zu halten, wird sowohl basale als auch stimulierte eNOS-Aktivität benötigt. Deshalb kann diese an verschiedenen Stellen reguliert werden, zum Beispiel durch Transkription, Substratverfügbarkeit, Interaktion mit Co-

Faktoren, Protein-Protein-Interaktion, Interaktion mit *Heat-Shock-Protein-90* (hsp-90) und Caveolin sowie durch posttranslationale Modifikation [28].

Darüber hinaus kann die eNOS-Aktivität durch Dimerisierung und subzelluläre Lokalisation zu Caveolae moduliert werden [30]. Bei den Caveolae handelt es sich um Invaginationen der Zellmembran, die vor allem durch Caveolin-1 stabilisiert werden. Sie spielen eine Rolle in der Regulation der Zellmembran und Signaltransduktion. Caveolin-1 interagiert direkt mit eNOS, indem es diese bindet. Bei Wirkung von Schubspannung mit Formation von Ca^{2+} /Calmodulin-Komplexen, die an eNOS binden, kommt es zur Dissoziation von eNOS und Caveolin-1 und dadurch zu einer Aktivierung der eNOS [25]. Sinkt die Ca^{2+} -Konzentration wieder auf normale Level, kommt es zu einer Reassoziierung von eNOS an Caveolin. Dieser Effekt kann durch posttranslationale Palmitoylierung von eNOS verstärkt werden [31]. Zellen mit defekter Palmitoylierung setzen signifikant weniger NO frei als normale Zellen [32].

Es gibt noch zahlreiche andere Faktoren, die die Aktivität der eNOS steigern können, zum Beispiel Östrogen, Insulin und Acetylcholin. Bei der posttranslationalen Modifikation spielen vor allem Phosphorylierung an Serin- und Threonin-Resten wie T497, S617, S635, S1177 eine Rolle, wobei vor allem letztere von Bedeutung ist. Die Phosphorylierung an S1177 ist ein entscheidender Regulationsmechanismus der eNOS-Aktivität beim Menschen und kann z.B. durch Östrogen und Statine gesteigert und durch Diabetes, arterielle Hypertonie, metabolisches Syndrom, Fettleibigkeit, IL-6, TNF- α oder Resistin herabgesetzt werden. [28] Der Akt/PKB-Signalweg führt durch Phosphorylierung an S1177 zu einer Ca^{2+} -unabhängigen Aktivierung von eNOS [33]. Dimmeler et al. konnten zeigen, dass dieser Mechanismus vor allem bei der schubspannungsabhängigen Aktivierung der eNOS eine entscheidende Rolle spielt [33, 34]. Durch Hemmung dieses Signalweges wurde die Phosphorylierung und damit die Aktivierung von eNOS vollständig inhibiert [33].

Kleinbongard et. al. konnten zeigen, dass durch eNOS-Inhibition mittels L-Name vor allem der Plasmanitritspiegel sank. Dieser korreliert also stark mit der eNOS-Aktivität und kann als Biomarker für die Bestimmung dieser herangezogen werden [35].

1.2.4 Endotheliale Dysfunktion

Wenn das Endothel seine physiologischen und protektiven Funktionen nicht aufrechterhalten kann, kommt es zur endothelialen Dysfunktion. Dabei handelt es sich um die gemeinsame Endstrecke verschiedener kardiovaskulärer Risikofaktoren wie Hypertonie, Fettleibigkeit, Diabetes, Dyslipidämie und Arteriosklerose. Bei diesen Erkrankungen ist die NO-Bioverfügbarkeit herabgesetzt. Um die endotheliale Dysfunktion zu erfassen, gibt es mehrere Möglichkeiten. Zur Ermittlung der Endothelfunktion kann die Reaktion des Endothels auf Acetylcholin in-vivo oder in-vitro oder durch Messung der Fluss-vermittelten-Vasodilatation (FMD) gemessen werden. Bei beiden Methoden kommt es durch NO-Freisetzung zur Vasodilatation. [28] Bei der klinischen oder experimentellen Durchführung der FMD wird die NO-Freisetzung durch Rückerlangen des Blutflusses nach vorheriger Ischämie hervorgerufen [36]. Nach Beendigung der Ischämie kommt es zu einer reaktiven Hyperämie, durch die eine erhöhte Schubspannung entsteht [37]. Als Reaktion auf diese Schubspannung öffnen sich mechanosensitive Calciumkanäle an der Oberfläche der Endothelzellen. Durch den Calciumeinstrom kommt es zur Aktivierung von eNOS und dadurch zur NO-Produktion und schließlich zur Vasodilatation [38]. Mithilfe der FMD kann man auch Aussagen bezüglich der Wahrscheinlichkeit zukünftiger kardiovaskulärer Ereignisse treffen [28, 39]. Viele kardiovaskuläre Risikofaktoren beeinflussen die FMD [36]. Sie kann beim Menschen durch Gabe von NOS-Inhibitoren aufgehoben werden [40]. Zudem führen die NOS-Inhibitoren zu einer Steigerung des Gefäßtonus und Senkung des Blutflusses [41].

Für die verminderte NO-Bioverfügbarkeit bei endothelialer Dysfunktion gibt es verschiedene Ursachen. Zu diesen gehören verminderte eNOS-Expression, L-Arginin-Mangel, Inhibition von NOS durch asymmetrisches Dimethylarginin, eNOS-Entkoppelung und BH₄-Mangel, mechanische Defekte des Endothels, metabolische Intoxikation mit freien Fettsäuren und inflammatorischen Zytokinen wie IL-6 oder TNF- α , Erhöhung des intrazellulären PI3-Akt Signalweges durch Hyperglykämie und Verbrauch von NO durch Superoxidanionen [28].

Unter bestimmten Bedingungen kann es zur eNOS-Entkoppelung kommen. Dabei produziert eNOS nicht mehr NO, sondern reaktive Sauerstoffspezies (ROS) [6, 12, 18, 42]. Es gibt verschiedene Hypothesen, warum es zur Entkoppelung von eNOS kommt. Unter anderem könnte sie durch vermehrter BH₄-Oxidierung zustande kommen [43]. BH₄ dient als sterischer Stabilisator des eNOS-Dimers und ist direkt am Elektronentransport von NADPH zu L-Arginin beteiligt [44]. Bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 konnte eine wichtige Rolle von BH₄ nachgewiesen werden. Durch BH₄-Supplementierung wurde eine Verbesserung der endothelvermittelten Vasodilatation erzielt, die durch NOS-Inhibition wieder verschwand [45].

In-vitro konnte die Superoxidproduktion durch Zugabe von BH₄ unterbunden werden [42]. Eine andere Ursache der eNOS-Entkoppelung ist der Mangel von L-Arginin [6, 18, 43]. Auch die NADPH-Oxidase könnte eine Rolle bei der Entstehung von eNOS-Entkoppelung spielen, da sie ROS produziert und dadurch die BH₄-Oxidation steigern könnte [43, 46]. eNOS-Entkoppelung, die unter anderem bei Hypertension beobachtet wird, könnte zur Progression derselben beitragen und zudem die Entstehung von Arteriosklerose fördern [46].

Alle bekannten kardialen Risikofaktoren führen zu verminderter NO-Bioverfügbarkeit durch verminderte NO-Produktion und vermehrte NO-Inaktivierung durch Superoxidanionen. Die Ursache hierfür ist oxidativer Stress und nicht eine verminderte eNOS-Expression, da diese in solchen Situationen gesteigert wird [43].

Es wurde ein Zusammenhang zwischen einer Abnahme des NO-Spiegels im Körper und Arteriosklerose und Bluthochdruck festgestellt [47]. Die Summe der NO-Spezies (RXNO) kann als unabhängiger Prädiktor für endotheliale Dysfunktion herangezogen werden, der mit dem Ausmaß der Minderung der FMD bei endothelialer Dysfunktion korreliert [48]. Eine Abnahme der NO-Konzentration kann beispielsweise durch eine verminderte Aktivität der eNOS verursacht werden. Dieser pathophysiologische Zusammenhang konnte auch im Tierexperiment belegt werden. Wildtypmäuse [35] und Kaninchen [49], bei denen eine NOS-Inhibition durchgeführt wurde, zeigten einen erhöhten Blutdruck. Zudem stieg die vaskuläre *Resistance* abhängig von der Dosis des NOS-Inhibitors an [35]. Der Zusammenhang zwischen einer verminderten NO-Bioverfügbarkeit und Arteriosklerose ist klinisch relevant, da Arteriosklerose die Hauptursache für chronische vaskuläre Erkrankungen wie koronare Herzkrankheit (KHK), zerebrovaskuläre Erkrankungen und periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK) ist [48]. In Studien konnte festgestellt werden, dass einige in der Klinik angewandte Medikamente einen positiven Effekt auf die NO-Bioverfügbarkeit haben. Zu diesen Medikamenten zählen Statine, ACE-Hemmer und Angiotensin-1-Rezeptorblocker [43].

Zusammengefasst lässt sich also sagen, dass NO essenziell für die Aufrechterhaltung einer normalen endothelialen Funktion ist. Ist die NO-Bioverfügbarkeit herabgesetzt, führt dies zum klinischen Bild der endothelialen Dysfunktion.

1.2.5 Auswirkung von Modulatoren der NO-Bioverfügbarkeit auf kardiovaskuläre Funktionen

Durch Infusion von L-Arginin konnte der mittlere Blutdruck bei Patienten mit essenzieller und sekundärer Hypertonie gesenkt werden. Gleichzeitig wurde ein Anstieg der Herzfrequenz, des HZV sowie eine Abnahme des totalen peripheren Widerstands (TPR) beobachtet [50]. L-Arginin Infusion bei jungen, gesunden Probanden steigerte den Blutfluss und senkte den TPR ohne den Blutdruck zu verändern [51]. Die durch Acetylcholin vermittelte Dilatation von Gefäßen konnte durch L-Arginin gesteigert werden [51]. Die Beobachtung, dass sich die Substitution von L-Arginin positiv auf die NO-Bioverfügbarkeit auswirkt, obwohl die Plasmaspiegel ausreichen, wird als L-Arginin-Paradox bezeichnet [44]. Bei jungen, gesunden Probanden wirkte sich die Gabe von NO-Donoren positiv auf die linksventrikuläre Funktion [52] aus, während durch Gabe von NOS-Inhibitoren ein signifikant erhöhter Blutdruck und eine vollständig erloschene FMD gemessen wurden [52]. In einer anderen Studie konnte eine L-Arginin-Infusion den Blutfluss in den Koronararterien, von Patienten mit Hypercholesterinämie, normalisieren [53]. Die L-Arginin-Gabe nach Myokardinfarkt führte nicht zu Verbesserungen der Ejektionsfraktion oder vaskulären Steifheit und es konnte sogar ein Zusammenhang mit einer erhöhten Mortalität festgestellt werden [54].

NOS-Inhibitoren verstärken mit I/R assoziierte Arrhythmien im Langendorff-Modell. Dies konnte durch Gabe von L-Arginin verhindert werden, sodass eine antiarrhythmische Wirkung von NO zu vermuten ist [55]. NO-Donoren, NO-haltige Infusionslösungen bzw. L-Arginin konnten in verschiedenen Tierexperimenten positive Effekte vermitteln. Sie erhöhten den koronaren Blutfluss [55] und konnten protektive Effekte bei I/R erzeugen [8, 29, 56-58]. Bei Tieren mit Hypercholesterinämie konnte die vaskuläre Reaktivität durch L-Arginin-Gabe normalisiert werden [59]. Eine selektive Inhibition der iNOS kann die Infarktgröße reduzieren [8]. In anderen in-vivo und in-vitro Studien konnte hingegen ein protektiver Effekt durch NOS-Inhibition nachgewiesen werden [60, 61]. Bei Nrf2-KO Mäusen konnte durch NOS-Inhibition eine Vergrößerung des myokardialen Schadens und eine verschlechterte systolische Funktion nachgewiesen werden. Bei Nrf-2 handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor, der die Expression antioxidativer und zytoprotektiver Enzyme kontrolliert [62].

Im Herzen wird eNOS vor allem in Gefäßen und im Endokard, aber auch in Kardiomyozyten exprimiert [60].

1.2.6 Transgene Mauslinien mit veränderter eNOS-Expression

1.2.6.1 Vaskuläre/ endotheliale Funktion globaler eNOS-KO-Linien

Ende der 1990-er Jahre entwickelten verschiedene Arbeitsgruppen Mausmodelle mit einem globalen KO des eNOS-Enzyms. All diesen Modellen gemein war, dass die Tiere einen erhöhten Blutdruck hatten [17, 21, 63, 64]. Die Mäuse zeigten keine NO-Aktivität als Antwort auf Acetylcholin und andere endothelabhängige Vasodilatoren [17, 28]. Pathophysiologisch ist dies von Bedeutung, da es klinisch den morphologischen Veränderungen bei endothelialer Dysfunktion vorausgeht. Die Tiere zeigen zudem eine gesteigerte neointimale Proliferation nach vaskulärer Verletzung durch eine Blutdruckmanschette [28].

eNOS-KO-Tiere zeigen eine gesteigerte Thrombozytenaggregation, Leukozyten-Endothel-Adhäsion, Gefäßmuskelproliferation sowie eine vermehrte Neigung zu Thrombosen, Schlaganfällen und Arteriosklerose [28]. Auch konnten Veränderungen in mitochondrialen Funktionen, Biogenese und Insulin-Resistenz nachgewiesen werden [28].

1.2.6.2 Kardiale Funktion globaler eNOS-KO-Mäuse unter Ruhebedingungen

Es sind verschiedene eNOS-KO-Linien erzeugt worden, die alle ähnliche Charakteristika zeigten. Unter anderem zeigten sie einen erhöhten Blutdruck [17, 21, 63, 64] bei verringerter Herzfrequenz [8, 63, 65], sowie eine Verdickung der linksventrikulären posterioren Wand und der linksventrikulären Masse gemessen durch Echokardiographie [8]. Andere Gruppen sahen jedoch keine Hypertrophie [21, 63]. Unter Normalbedingungen konnten die Tiere die Veränderungen gut kompensieren, sodass kardiale Parameter wie Herzzeitvolumen (HZV), Ejektionsfraktion (EF) und *fractional shortening* (FS) unverändert blieben [8]. Im Langendorff-Modell zeigten sich keine Unterschiede im basalen koronaren Fluss und maximalen hyperämischen Fluss im Vergleich zu Wildtypen. Akute NOS-Inhibition mit N^ω-nitro-L-argininmethylester (L-NAME) bei Wildtypen, führte jedoch zu einem reduzierten basalen koronaren Fluss und reaktiver Hyperämie [21]. Die basale kardiale Kontraktilität und Relaxation der eNOS-KO-Mäuse ist nicht verändert. Eine akute Inhibition der NOS bei Wildtypen führt jedoch zu einer verminderten Relaxation. Die linksventrikulären cGMP-Level werden durch den

eNOS-KO nicht verändert. Dafür konnte eine vermehrte Expression des atrialen natriuretischen Peptids (ANP) festgestellt werden. ANP ist ebenfalls ein Stimulator von cGMP. Dementsprechend scheint die basale Kontraktilität durch diesen Kompensationsmechanismus aufrecht erhalten zu werden [66].

Diese Daten zeigen, dass eNOS eine große Rolle in der Regulation kardialer Funktionen und des Gefäßtonus und somit auch des Blutdrucks spielt. Mäuse, die seit der Geburt an das Fehlen des Enzyms gewöhnt sind, sind in der Lage den Verlust partiell zu kompensieren, während eine Inhibition bei Wildtypen zu drastischeren Veränderungen führt.

1.2.7 Auswirkung myokardialer Ischämie/Reperfusion auf die kardiale Funktion von eNOS-KO-Mäusen

Es konnte ein Einfluss von eNOS auf die Infarktgröße nach einer myokardialen Ischämie/Reperfusion (I/R) festgestellt werden. In einigen Studien konnte beobachtet werden, dass eNOS-KO-Linien im Vergleich zum Wildtypen größere Infarkte entwickeln [64]. In einer anderen Studie mit zwei verschiedenen eNOS-KO-Linien wurden widersprüchliche Ergebnisse gewonnen. Eine Linie zeigte nach I/R eine signifikant reduzierte Infarktgröße im Vergleich zum Wildtyp, während diese bei der anderen Linie größer als in der Kontrollgruppe war [67]. eNOS-KO-Tiere zeigten ein verstärktes kardiales Remodeling nach I/R sowie eine vermehrte linksventrikuläre Dysfunktion im Vergleich mit Wildtyp-Mäusen [68]. Andere Studien zeigten jedoch keine Unterschiede von eNOS-KO-Mäusen und Wildtyp-Mäusen hinsichtlich des Remodelings und der kardialen Funktion sechs Monate nach I/R [69].

Bei eNOS-KO-Mäusen ist keine ischämische Präkonditionierung (rIPC) möglich [70]. Diese bezeichnet die Beobachtung, dass eine vorangehende I/R, auch in herzfernen Gebieten, sich positiv auf spätere myokardiale Infarkte auswirkt [25]. Durch Entnahme des Blutes von Probanden, die an einem solchen rIPC-Manöver teilnahmen, konnte eine Verkleinerung des Infarktes im Langendorff-Modell erreicht werden. Diese wurde vermutlich durch eine erhöhte Nitritkonzentration vermittelt [70].

Im Mausmodell chronischer Druckbelastung durch operative Aortenkonstriktion entwickelten eNOS-KO-Mäuse eine stärker ausgeprägte Hypertrophie und linksventrikuläre Dysfunktion als Wildtypen, die nach dem gleichen Protokoll operiert wurden [71]. Zudem zeigten diese Tiere eine erhöhte Mortalität. Bei der Interpretation dieser Beobachtungen sollte mit bedacht werden, dass NO im ischämischen Myokard auch unabhängig von NOS gebildet werden kann [72].

1.2.8 Transgene Mäuse mit eNOS-Überexpression

Verschiedene Gruppen haben transgene Mäuse erzeugt, die an verschiedenen Stellen des Organismus eine eNOS-Überexpression zeigen [73-76]. Mäuse mit gesteigerter vaskulärer eNOS-Expression zeigen einen signifikant verringerten Blutdruck und zugleich eine Steigerung der NO-Freisetzung und der cGMP-Level. Die Relaxation als Reaktion auf Acetylcholin- oder Natriumnitroprussid-(SNP)Gabe war jedoch signifikant vermindert. Bei SNP handelt es sich um einen NO-Donor [74]. Letzteres könnte durch einen Gewöhnungseffekt an die hohen NO-Level, wie er klinisch bei organischen Nitraten beobachtet werden kann, zustande kommen. Als Reaktion auf die Ligatur der Arteria carotis communis konnten eine verminderte neointimale Proliferation und Leukozytenadhäsion beobachtet werden [76]. In einer anderen Studie zeigten Mäuse mit vaskulärer eNOS-Überexpression und Apo-E-KO als Reaktion auf eine sechswöchige westliche Diät einen niedrigeren Blutdruck, verminderte Cholesterin-Level und weniger stark ausgeprägte arteriosklerotische Läsionen als Mäuse mit Apo-E-KO ohne eNOS-Überexpression. Demnach scheint eine erhöhte eNOS-Konzentration protektiv gegen die Entwicklung von Arteriosklerose zu sein [77]. Ozaki et al. zeigten dazu gegensätzliche Ergebnisse. Sie erzeugte ebenfalls eine Mauslinie mit eNOS-Überexpression und Apo-E-KO. Diese Mäuse zeigten nach einer Diät mit hohem Fettanteil größere arteriosklerotische Läsionen als Apo-Mäuse, die dem gleichen Protokoll unterzogen wurden [78]. Jedoch muss beachtet werden, dass es sich bei den beobachteten Mäusen um unterschiedliche Linien handelt, die durch verschiedene genetische Veränderungen erzeugt wurden. Zudem wurden die Linien anderen Diäten unterzogen. Außerdem scheint die Linie von Ozaki auch mehr dysfunktionale, entkoppelte eNOS zu exprimieren [79]. Suvorava et al. erzeugten ebenfalls eine transgene Linie mit vaskulärer eNOS-Überexpression, die auch einen niedrigeren Blutdruck zeigte als die Kontrollgruppe [79]. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich eine vaskuläre eNOS-Überexpression positiv auf das Gefäßsystem auswirkt.

Transgene Mäuse mit kardialer eNOS-Überexpression bilden geringere Infarktgrößen aus als Wildtyp-Mäuse [73]. Eine kardiale eNOS-Überexpression führte zu einer verbesserten linksventrikulären Funktion und einer verminderten Hypertrophie bei Herzinsuffizienz [73]. Die Tiere zeigten zwar sehr hohe Level an NO und seinen Metaboliten, jedoch ist dies in diesem Fall protektiv im Gegensatz zu einer Überexpression an iNOS, die schädlich ist [73]. Auch andere Mäuse mit kardialer eNOS-Überexpression zeigten eine verbesserte linksventrikuläre Funktion und verminderte Hypertrophie nach I/R als Wildtypmäuse [75].

1.2.9 Erythrozytäre eNOS

eNOS ist neben Endothelzellen (ECs) auch in anderen Zelltypen, z.B. den Erythrozyten [80-83], zu finden. Diese sind ebenfalls an der eNOS-abhängigen, physiologischen Funktion beteiligt, die der Aufrechterhaltung kardiovaskulärer Funktionen dient. Lange Zeit wurden Erythrozyten auf Grund ihres Hämoglobin-Gehaltes vorwiegend als NO-Inaktivatoren angesehen [84]. Tatsächlich können sie NO jedoch vorübergehend binden und transportieren [82, 85]. Bereits 1996 wurde von Yang et al. ein durch den L-Arginin-NO-Signalweg vermittelter protektiver Effekt auf I/R postuliert. Seine Gruppe konnte beobachten, dass die Reperfusion isolierter Herzen mit Blut statt mit einer Pufferlösung zu einem protektiven Effekt führte. Dieser wurde durch L-NAME verhindert und konnte durch L-Arginin-Perfusion reproduziert werden [86]. Im gleichen Jahr konnte nachgewiesen werden, dass in Erythrozyten iNOS und eNOS sowie Calmodulin vorliegen [87].

Vor allem unter hypoxischen Bedingungen konnte gezeigt werden, dass Erythrozyten NO zur hypoxischen Vasodilatation zur Verfügung stellen können [85]. Gleichzeitig konnte auch beobachtet werden, dass die Nitritreduktion unter hypoxischen Bedingungen stark gesteigert ist [88]. Es wurden verschiedene enzymatische und nicht enzymatische Signalwege entdeckt, in denen Nitrit zu NO reduziert wird. Wieviel diese Signalwege tatsächlich zum NO-Pool beitragen, ist abhängig von verschiedenen Faktoren wie dem pH-Wert, dem Sauerstoffpartialdruck und dem Redox-Status [88]. Der Mechanismus, der hinter der hypoxischen Vasodilatation steht, ist nach wie vor unklar. Es wurde diskutiert, ob ein bioaktiver Metabolit, der für die NO-Produktion in Erythrozyten unter hypoxischen Bedingungen verantwortlich ist, S-Nitrosohämoglobin sein könnte. Doch mittlerweile wird diese Option für eher unwahrscheinlich gehalten. Auch Nitrit wird in Erwägung gezogen, jedoch gibt es bis jetzt noch keine Klärung dieser Frage [25]. Die Umwandlung von Nitrit zu NO in Gefäßen und Erythrozyten unter hypoxischen und azidotischen Bedingungen konnte durch Zugabe von Xanthin gesteigert und durch den Xanthinoxidoreduktase- (XOR) Inhibitor Allopurinol vermindert werden [83]. Zudem konnte die NO-Produktion der Erythrozyten durch die Zugabe von L-NAME, L-MMA oder L-Arginin vermindert werden. Ein Nachweis von XOR und eNOS auf der erythrozytären Membran war möglich. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass unter hypoxischen Bedingungen mit physiologischem pH-Wert, die Nitritreduktion vor allem durch eNOS und unter azidotischen Bedingungen durch XOR erfolgt [83].

In vorherigen Arbeiten unserer Gruppe konnte gezeigt werden, dass Erythrozyten eine funktionale NOS besitzen [89], die unter normoxischen Bedingungen aktiv ist [82]. Ex-vivo konnte in humanem Blut eine NOS-Aktivität nachgewiesen werden [80, 82]. Auch in den

Erythrozyten von Wildtyp-Mäusen gelang der Nachweis einer funktionellen NOS. Bei eNOS-KO-Mäusen war dies nicht möglich [89]. Es konnte eine relevante Rolle der erythrozytären eNOS im ex-vivo I/R Modell unter Arginase-Inhibition nachgewiesen werden [81]. Die Rolle der erythrozytären eNOS in chimären Mäusen wurde näher untersucht. Diese Mäuse exprimierten eNOS nur außerhalb von Blutzellen. Sie zeigten keine Veränderungen in der endothelabhängigen und -unabhängigen vaskulären Funktion, jedoch konnte eine Vergrößerung des Infarktes im I/R-Modell und eine Verschlechterung der linksventrikulären Funktion 24 Stunden nach I/R nachgewiesen werden [90]. Die Verwendung chimärer Mäuse bringt jedoch einige Nachteile mit sich: 1) Eine Differenzierung der Rolle verschiedener Blutzellsubpopulationen ist mit dem verwendeten Modell nicht möglich, da das Enzym eNOS auch in Thrombo- und Leukozyten fehlt. 2) Durch die Knochenmarktransplantation entsteht eine Entzündung, welche potenziell über NFκB die Expression der iNOS beeinflusst. 3) Zudem sind auch nach Knochenmarktransplantation weiterhin 5-10% der Knochenmarkzellen des ursprünglichen Empfängers vorhanden und somit ist in dieser Zellpopulation die erythrozytäre NOS weiterhin aktiv. In anderen Versuchen konnte gezeigt werden, dass die erythrozytäre eNOS zur Blutdruckregulation und zum zirkulierenden Nitrit-Pool beiträgt [89]. Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass humane und murine Erythrozyten eine aktive sGC besitzen. Expression und Aktivität der sGC sowie die Antwort auf NO-Stimulation sind bei Patienten mit stabiler KHK und endothelialer Dysfunktion erhalten [91]. Behandlung mit Erythropoietin führte in murinen Erythrozyten zu einer zeit- und dosisabhängigen Steigerung der NO-Produktion durch Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges und Phosphorylierung an S1177 der erythrozytären eNOS [92]. In humanen Erythrozyten konnten nach moderatem Ausdauertraining sehr ähnliche Effekte beobachtet werden [93].

Es wurde diskutiert, dass NO zur Verformbarkeit der Erythrozyten beiträgt. Eine gute Verformbarkeit ist wichtig für die Erythrozyten, da sie im Gefäßsystem durch Kapillaren hindurchpassen müssen, die einen geringeren Durchmesser haben als die Erythrozyten selbst. Zudem spielt die Verformbarkeit der Erythrozyten auch eine Rolle während I/R. Ob eNOS tatsächlich zur Verformbarkeit beiträgt, ist aber nach wie vor unklar und wird kontrovers diskutiert [94]. Diederich et al. konnten zeigen, dass NO unter Bedingungen, in denen oxidativer Stress herrscht die Verformbarkeit der Erythrozyten erhalten kann. Unter basalen Bedingungen spielt NO jedoch keine Rolle für die Deformabilität der Erythrozyten [95]. Nach wie vor existiert die Frage, wie es möglich ist, dass NO im Erythrozyten nicht mit Hämoglobin reagiert. Auch hierzu gibt es verschiedene Theorien. Eine Option ist eine Bildung verschiedener Kompartimente durch Bildung von Proteinkomplexen. Vor kurzer Zeit wurde entdeckt, dass Deoxyhämoglobin einen Komplex mit Bande 3 der Erythrozytenmembran bilden kann. Zudem wird diskutiert, ob Proteine in den Erythrozyten existieren, die NO schützen, indem sie Hämoglobin lokal zu Methämoglobin umwandeln [25, 96].

1.3 Arginase

Die Aktivität der eNOS ist von der Anwesenheit des Substrats L-Arginin abhängig. Diese wird stark von der Aktivität des Enzyms Arginase-1 (Arg-1) beeinflusst, das den L-Arginin-Abbau katalysiert und in Endothelzellen und Erythrozyten exprimiert wird [81]. Es konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte Arginase-Aktivität in Endothelzellen mit einer Verminderung der NO-Synthese einhergeht [97]. Die Affinität von NOS zu L-Arginin ist wesentlich höher als die von Arginase. Da Arginase das gemeinsame Substrat aber wesentlich schneller umsetzt, zeigen beide Enzyme unter Normbedingungen ähnlich hohe Umsetzungsraten [98].

Unter normalen Umständen kann der Bedarf an L-Arginin durch Synthese aus L-Citrullin gedeckt werden. Bei Entzündungen, Resorptionsstörungen im Dünndarm oder bei Frühgeborenen reicht die Syntheseleistung des Körpers jedoch nicht aus und L-Arginin muss zusätzlich über die Nahrung aufgenommen werden, weshalb man L-Arginin auch als bedingt-essentielle Aminosäure bezeichnet [99, 100]. Es gibt zwei Isoformen der Arginase, die beide L-Arginin zu L-Ornithin und Harnstoff hydrolysieren [100, 101]. Arg-1 kommt im Zytosol vor während Arginase-2 (Arg-2) mitochondrial vorliegt [100, 102]. Arg-1 wird vor allem in Hepatozyten, aber auch in anderen Zelltypen wie glatten Muskelzellen, Endothelzellen und Kardiomyozyten exprimiert und macht den Großteil der Arginase-Aktivität im Körper aus. Arg-2 wird vor allem in Niere und Prostata, aber auch im Herzen und den Gefäßen exprimiert und nur in sehr geringen Mengen in der Leber [98, 103, 104]. Die Aktivität der Arginase wird besonders durch reaktive Sauerstoffspezies, proinflammatorische Zytokine [105], Hypoxie [81, 106], Lipopolysaccharide, oxidiertes LDL, Glukose, Thrombin und Angiotensin-2 gesteigert [106]. Dies spielt insbesondere bei der koronaren Herzkrankheit (KHK), Arteriosklerose und I/R [105] eine Rolle [101, 107]. Es konnte eine negative Korrelation zwischen der Arginase-Konzentration im Serum nach Myokardinfarkt und der linksventrikulären Ejektionsfraktion festgestellt werden [108].

Globale Arg-1-KO-Mäuse sterben 10-14 Tage nach Geburt an Hyperammonämie. Sie zeigen Ammoniakspiegel, die bis zu 10-fach höher sind als beim Wildtypen. Zudem konnten bis zu vierfach erhöhte L-Arginin-Level und hepatische Anomalien festgestellt werden [109]. Auch die Mäuse einer induzierbaren Arg-1-KO-Linie starben spätestens 26 Tage nach Induktion des KOs. Zudem ging der KO mit einem Gewichtsverlust von bis zu 40% des Ausgangsgewichts einher. Die Mäuse waren nach einiger Zeit lethargisch und hatten Schwierigkeiten zu stehen [110].

1.3.1 Einfluss von Arginase auf die vaskuläre Funktion

In mehreren Tiermodellen der Hypertension konnte eine Hochregulation von Arginase in Endothelzellen von Koronarien [111], Arteriolen [112] beziehungsweise der Aorta [113] nachgewiesen werden. Auch bei isolierten Arterien alter Ratten konnte eine erhöhte Arginase-Expression und -Aktivität nachgewiesen werden. Die NO-Aktivität und cGMP-Level waren hingegen erniedrigt [114]. Bei Mäusen war die endothelvermittelte Vasodilatation nach I/R vermindert und die Arginase-Expression erhöht [105]. In diesen Studien konnte eine Verbesserung der Dilatation durch L-Arginin beziehungsweise Arginase-Inhibitoren erreicht werden [105, 111, 112].

Im Tierversuch konnte bei Ratten mit Diabetes Mellitus Typ 2 eine verminderte koronare Flussgeschwindigkeit nachgewiesen werden, die sich nach Blockade von Arginase mittels Nor-NOHA wieder normalisierte. Dieser Effekt verschwand nach NOS-Inhibition wieder [107]. Ex-vivo konnte ein Effekt des Alters auf die endotheliale Funktion festgestellt werden, der durch Arginase-Inhibition rückgängig gemacht werden konnte [114]. Bei Isolation von Koronararterien aus Schweineherzen, die einer I/R-Operation ausgesetzt wurden, konnte eine endotheliale Dysfunktion nachgewiesen werden, die durch L-Arginin Gabe beziehungsweise Arginase-Inhibition normalisiert werden konnte [115]. Humane aortale Endothelzellen setzten nach Arginase-Inhibition ca. 20% mehr NO frei als zuvor [116].

Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 und KHK leiden unter endothelialer Dysfunktion [104, 117, 118]. Bei Patienten mit isoliertem Diabetes mellitus Typ 2, sowie mit KHK und Diabetes mellitus Typ 2, konnte durch Arginase-Inhibition mittels Nor-NOHA eine Verbesserung der endothelialen Funktion erreicht werden [104, 117]. Bei den gesunden Probanden wiederum zeigten sich keine Veränderung der endothelialen Funktion durch Arginase-Inhibition [104, 117]. Zudem lässt ein verändertes Verhältnis der Produkte von NOS und Arginase auf eine Hochregulation der Arginase bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 schließen [117]. Durch Arginase-Inhibition konnte bei Patienten mit KHK ein protektiver Effekt auf die endotheliale Funktion nach 20-minütiger Ischämie und anschließender Reperfusion erzeugt werden [119].

1.3.2 Einfluss der Arginase auf die kardiale Funktion

Im Tierversuch konnte bei Ratten eine Verkleinerung der Infarktgröße um ca. 40% durch Inhibition der Arginase mit N^ω-Hydroxy-Nor-L-Arginin (Nor-NOHA) erzielt werden. Dieser

Effekt konnte nicht beobachtet werden, wenn gleichzeitig eine NOS-Inhibition stattfand, was darauf hindeutet, dass es durch die Arginase-Inhibition zu einer vermehrten NOS-Aktivität kommt. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Arg-1-Expression im ischämischen Myokard erhöht ist. Ein Nachweis der Expression von Arg-2 war jedoch weder im ischämischen noch im nicht-ischämischen Myokard möglich [115, 120]. Auch in anderen Versuchen konnte eine Reduktion der Infarktgröße durch Arginase-Inhibition beobachtet werden. Dieser Effekt konnte durch L-NMMA inhibiert werden [121]. In einer anderen Studie gelang in Herz-Lysaten der Nachweis von Arg-1 und Arg-2, in Kardiomyozyten wurde jedoch nur Arg-2 nachgewiesen [102]. In einer Studie mit I/R bei Schweinen zeigte sich bei der Gruppe, die eine intrakoronare Nor-NOHA Infusion erhielt, eine signifikant kleinere Infarktgröße als bei der Kontrollgruppe mit Kochsalzinfusion. Dieser Effekt zeigte sich nicht, wenn die gleiche Menge Nor-NOHA systemisch infundiert wurde oder Nor-NOHA und L-NMMA gemeinsam intrakoronar infundiert wurden. Zudem konnte im ischämischen Myokard eine gesteigerte Arginase-Aktivität nachgewiesen werden, ohne dass sich die Konzentration der beiden Isoformen änderte. Der Mechanismus dieser gesteigerten Aktivität ist unklar [103]. In einer anderen Studie wurde pharmakologisch eine Kardiomyopathie erzeugt. Erhielten die Tiere zugleich Nor-NOHA, so konnte der linksventrikuläre endsystolische Durchmesser verbessert und die Ejektionsfraktion wiederhergestellt werden [116]. In Versuchen an Katzen konnte gezeigt werden, dass eine Inhibition von Arginase in den Kardiomyozyten die Kontraktilität dieser vermindert. Zugleich konnte eine Steigerung der cGMP-Produktion beobachtet werden, was auf eine gesteigerte NOS-Aktivität hindeutet [122]. In anderen Versuchen führte die Inhibition der Arginase zu einer Steigerung der kardialen Kontraktilität [102]. Zudem zeigte sich, dass bei Tieren mit einer linksventrikulären Hypertrophie die Arginase-Expression vermindert war [122]. Während der I/R ist der Anstieg der Arginase-Expression die schnellste und stärkste Adaptation [123].

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass Arginase in einigen pathologischen Situationen wie z.B. bei Diabetes mellitus Typ 2 vermehrt aktiv ist. Durch eine Inhibition der Arginase lassen sich häufig positive Effekte erzielen.

1.4 Ziel der Arbeit

Die genauen Funktionen der gewebspezifischen Isoformen der eNOS und Arg-1 sind nach wie vor unbekannt.

Beide Enzyme nutzen L-Arginin als Substrat. Deshalb wird vermutet, dass beide in Konkurrenz um dieses Substrat stehen. Es gibt Hinweise darauf, dass unter bestimmten pathologischen Bedingungen die Arginase-Aktivität erhöht ist. Dies scheint zur Entwicklung endothelialer Dysfunktion beizutragen und die Aktivität der eNOS einzuschränken. In unserer Arbeitsgruppe wurde mittels Transplantation von Knochenmark einer eNOS-KO-Maus in eine Wildtyp-Maus eine Mauslinie erzeugt, in der sich keine eNOS in den Blutzellen befindet. Wenn man diese Mauslinie einer I/R aussetzte, zeigte sich eine signifikante Vergrößerung des geschädigten Myokardareals. Bei dieser Mauslinie konnte ebenfalls ein signifikanter Einfluss der erythrozytären eNOS auf den mittleren arteriellen Blutdruck nachgewiesen werden [124]. Durch das mittels Knochenmarktransplantation erzeugte Modell, ergeben sich jedoch Einschränkungen, die die eindeutige Interpretation der Ergebnisse verhindern (s.o.).

Ziel der Arbeit ist es, die physiologische Funktion der endothelialen und erythrozytären eNOS und Arg-1 zu untersuchen. Die Hypothese dabei ist, dass die erythrozytäre eNOS und Arg-1 eine Rolle in der Regulation vaskulärer und kardialer Funktionen spielen. Als Kontrollen dienen endotheliale eNOS-KI Mäuse. Da es in zahlreichen Arbeiten Hinweise darauf gibt, dass sich beide Enzyme gegenseitig beeinflussen und um ihr gemeinsames Substrat L-Arginin konkurrieren, soll untersucht werden, wie sich gewebespezifische Knock-Outs und Knock-Ins im Tiermodell auswirken. Hierzu wurden mithilfe des LoxP-Cre-Systems verschiedene transgene knock-out und knock-in Modelle erzeugt, bei denen die oben genannten Einschränkungen entfallen. Diese wurden mittels Echokardiographie und Ultraschall untersucht. Um die Funktion der Enzyme sowohl unter physiologischen als auch unter pathologischen Bedingungen beurteilen zu können, wurden die Tieren unter Normbedingungen und 24 Stunden nach I/R untersucht.

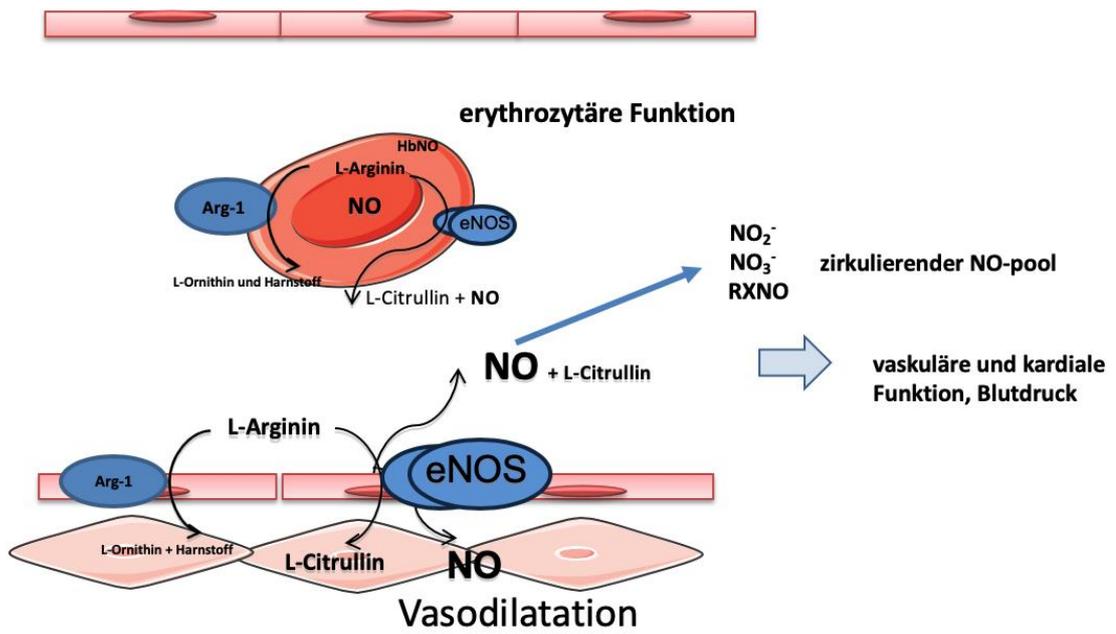


Abbildung 1: Funktion und Lokalisation von eNOS und Arg-1.

Modifiziert nach [125]

2. Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Transgene Mauslinien

Es wurden verschiedene transgene Mauslinien mit gewebsspezifischem eNOS- und Arginase-KO oder -KI erzeugt. Bei den endothelspezifischen Linien handelt es sich um induzierbare Modelle. Um die Expression des KOs bzw. KIs bei diesen Tieren zu induzieren, ist eine Behandlung mit Tamoxifen nötig. Hierzu wurde Tamoxifen (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) in Öl gelöst bis eine Konzentration von 20 mg/ml erreicht wurde. Die Lösung wurde intraperitoneal in einer Konzentration von 33 mg/kg Körpergewicht pro Tag an fünf aufeinanderfolgenden Tagen verabreicht. Die Versuche wurden 21 Tage nach den Injektionen durchgeführt. Durch die Behandlung mit Tamoxifen kann der ERT-2-Rezeptor, der bei den entsprechenden Linien als Fusionsprotein mit der Cre-Rekombinase vorliegt, dimerisieren und in den Zellkern translozieren. Bei der Cre-Rekombinase handelt es sich um ein Enzym, das die Lox-P-Sequenz erkennen kann. Um die Exzision eines Gens zu erreichen, wird das entsprechende Gen von zwei Lox-P-Sequenzen umgeben. Diese müssen hierfür in die gleiche Richtung ausgerichtet sein. Anschließend wird die DNA an den Enden wieder zusammengefügt. Dieses System ermöglicht, bei Auswahl eines geeigneten Promotors, eine gewebsspezifische Modifikation der DNA. Durch die Fusion der Cre-Rekombinase mit einem Östrogen-Rezeptor (ERT-2) kann eine Induktion der genetischen Veränderung durch Tamoxifen-Gabe erreicht werden. Auch die Erzeugung eines KIs ist möglich. Hierzu muss ein transgener Organismus geschaffen werden, bei dem die Zielsequenz invertiert vorliegt. Wird nun die Cre-Rekombinase durch Tamoxifen-Gabe aktiviert, kann das Gen invertiert statt exzidiert werden, sofern die umgebenden Lox-P-Sequenzen in entgegengesetzte Richtungen zeigen. Bei den induzierbaren Linien handelt es sich um die endotheliale-eNOS-KO-Linie und die endotheliale-eNOS-KI-Linie. Die Erzeugung der im folgenden genannten Linien erfolgte durch Prof. Dr. Cortese-Krott und ihre AG. [126-128]

2.1.1.1 Erythrozytäre eNOS-KO-Mäuse

Diese Linie wurde erzeugt, indem ein Lox-P-eNOS-Stamm mit einem Hbb-Cre-Stamm gekreuzt wurde (s. Abb. 2). Dadurch entstehen Nachkommen, die von Geburt an keine eNOS in den Erythrozyten exprimieren. [128]

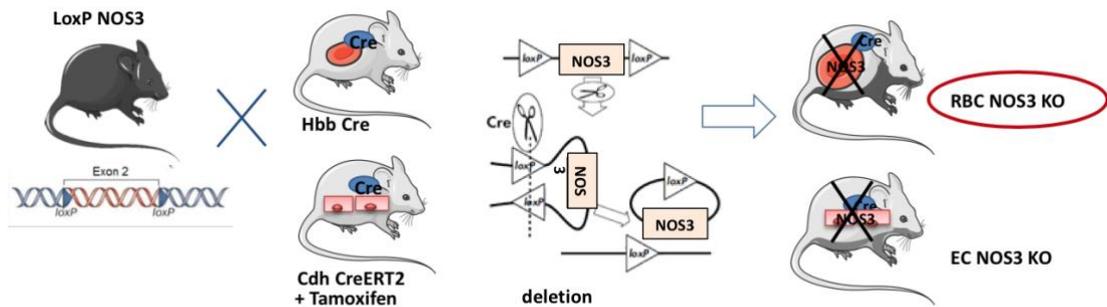


Abbildung 2: Kreuzungsschema der erythrozytären eNOS-KO-Linie.

2.1.1.2 Endotheliale eNOS-KI-Mäuse

Mäuse mit einem induzierbaren eNOS-KI wurden erzeugt, indem die Linie mit dem invertierten eNOS-Gen mit einer Cdh-CreERT2 Linie gekreuzt wurde (s. Abb. 3). Um den KI in den Tieren zu induzieren, wurden diese an fünf aufeinanderfolgenden Tagen mit 33mg/kg/d Tamoxifen i.p. behandelt. [128]

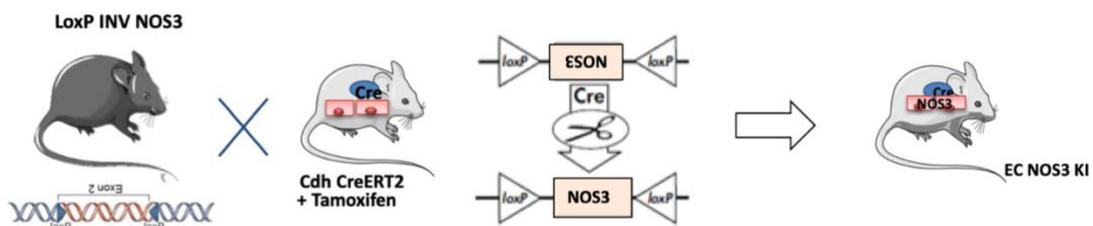


Abbildung 3: Kreuzungsschema der endothelialen eNOS-KI-Linie

2.1.1.3 Erythrozytäre Arg-1-KO-Mäuse

Um erythrozytäre Arg-1-KO-Mäuse zu erzeugen, wurde eine Lox-P-Arg-1 Linie mit einer Hbb-Cre-Linie verpaart (s. Abb.4). Die resultierenden Nachkommen exprimieren von Geburt an keine Arginase in den Erythrozyten.

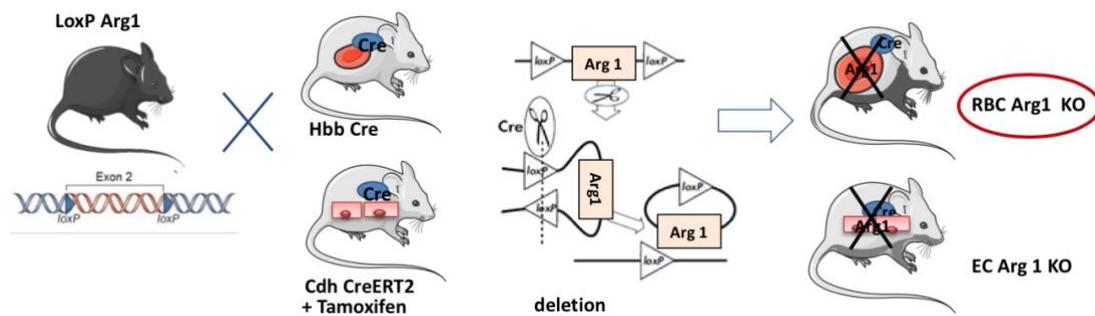


Abbildung 4: Kreuzungsschema der erythrozytären Arg-1-KO Linie.

2.1.1.4 Endotheliale Arg-1-KO-Mäuse

Durch Kreuzung einer Lox-P-Arg-1-Linie mit einer Cdh-CreERT2 Linie wurden Mäuse erzeugt, die nach 5-tägiger Tamoxifenbehandlung (33mg/kg KG i.p.) keine Arg-1 in den Endothelzellen exprimieren (s. Abb. 5). [127]

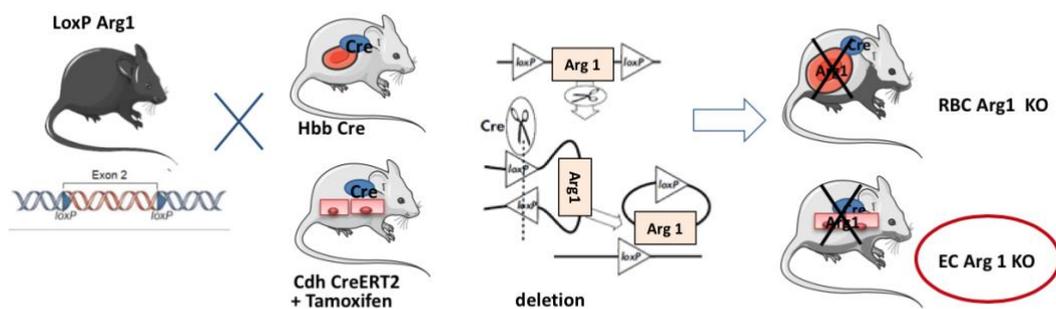


Abbildung 5: Kreuzungsschema der endothelialen Arg-1-KO Linie.

2.1.1.5 Überblick über die transgenen Mauslinien

Tabelle 1: Übersicht über die transgenen Mauslinien.

| Nomenklatur | Genotyp | Phänotyp |
|---------------|-----------------------------------|------------------|
| RBC-eNOS-KO | LoxP-eNOS x Hbb-Cre | RBC-eNOS-KO |
| LoxP-eNOS | LoxP-eNOS | WT |
| EC-eNOS-KI | LoxP-INV-eNOS x Cdh CreERT2 + TAM | EC-eNOS-KI |
| LoxP-INV-eNOS | LoxP-INV-eNOS | Globaler eNOS-KO |
| EC-Arg-1-KO | LoxP-Arg-1 x Cdh CreERT2 + TAM | EC-Arg-1-KO |
| EC-Arg-1-WT | LoxP-Arg-1 | WT |
| RBC-Arg-1-KO | LoxP-Arg-1 x Hbb Cre | RBC-Arg-1-KO |
| LoxP-Arg-1 | LoxP-Arg-1 | WT |

2.2 Methoden

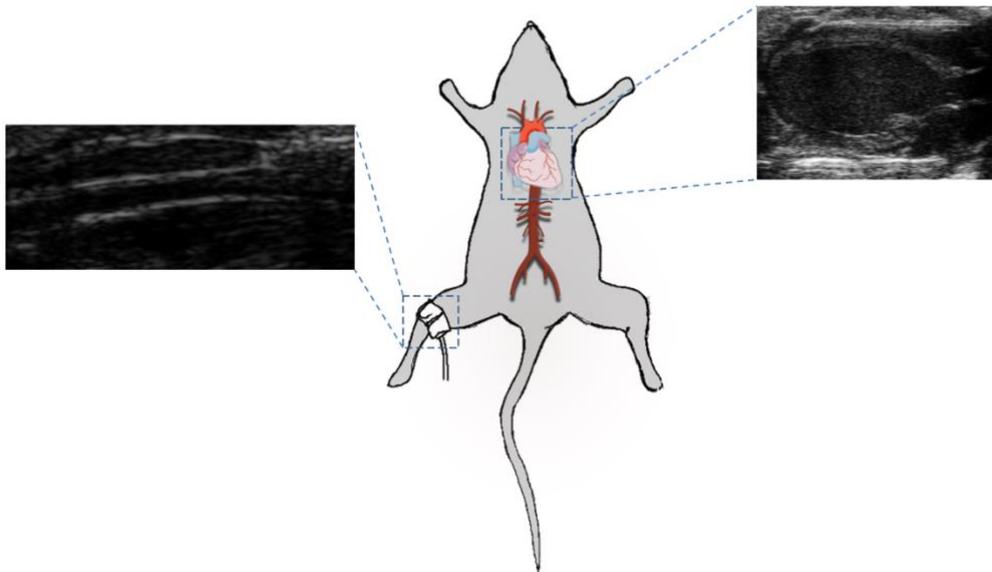


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Echokardiographie und FMD.

Alle Tierversuche mit transgenen Mäusen wurde durch das Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz NRW (LANUV) genehmigt (Aktenzeichen: 84-02.04.2016.A170; 84-02.04.2013.A228). Die Tiere hatten jederzeit Zugang zu Wasser und Futter und wurden in der Tierversuchseinrichtung der Universität Düsseldorf gehalten.

2.2.1 Echokardiographie

Bei der Echokardiographie handelt es sich um eine nicht invasive Untersuchungsmethode, die mithilfe eines 18-38 MHz Schallkopfes durchgeführt wird (Vevo2100, VisualSonics Inc., Toronto, Ontario, Kanada). Da die Mäuse die Untersuchung im wachen Zustand nicht tolerieren würde, werden diese mit Isofluran sediert. Zur Einleitung der Anästhesie werden sie in eine Induktionskammer gesetzt. Hier wird das zu untersuchende Tier mit einem Gemisch aus O₂ und 3% Isofluran narkotisiert (Abb.7).



Abbildung 7: Gasmischer für die Mischung und Dosierung von Isofluran und Sauerstoff.

Ist die Narkose tief genug, wird die Maus in Rückenlage auf dem Untersuchungstisch gelagert und die Anästhesie über eine Nasenmaske weitergeführt. In der Regel kann die Konzentration des Sedativums im Gasmischung nun auf 1,5 – 2 % reduziert werden. Die Maus wird mit allen vier Pfoten auf dem Tisch fixiert. An den Fixierungspunkten befinden sich Elektroden über die permanent ein Elektrokardiogramm (EKG) sowie die Atem- und Herzfrequenz abgeleitet werden. Zudem wird die Maus mit einer Rolle, die sich auf der linken Seite des Körpers befindet, fixiert, um mehr Stabilität bei der Untersuchung zu gewährleisten. Die Herzfrequenz wird während der Untersuchung möglichst konstant zwischen 400 bis 450 pro Minute gehalten, um vergleichbare Bedingungen zu schaffen. Die Atemfrequenz sollte zwischen 60-80 pro Minute liegen.

Die Körpertemperatur wird kontinuierlich durch ein anal eingeführtes Thermometer gemessen und durch die Heizfunktion des Untersuchungstisches bei 37°C gehalten. Vor Beginn der Untersuchung wird das Fell der Maus mithilfe einer Enthaarungscreme entfernt (Nair; Carter-Horner, Mississauga, Ontario). Wenn diese, nach der Enthhaarung, wieder entfernt wurde, kann das gewärmte Ultraschallgel aufgetragen werden (Aquasonic 100, Parker Laboratories, Fairfield, New Jersey, USA).

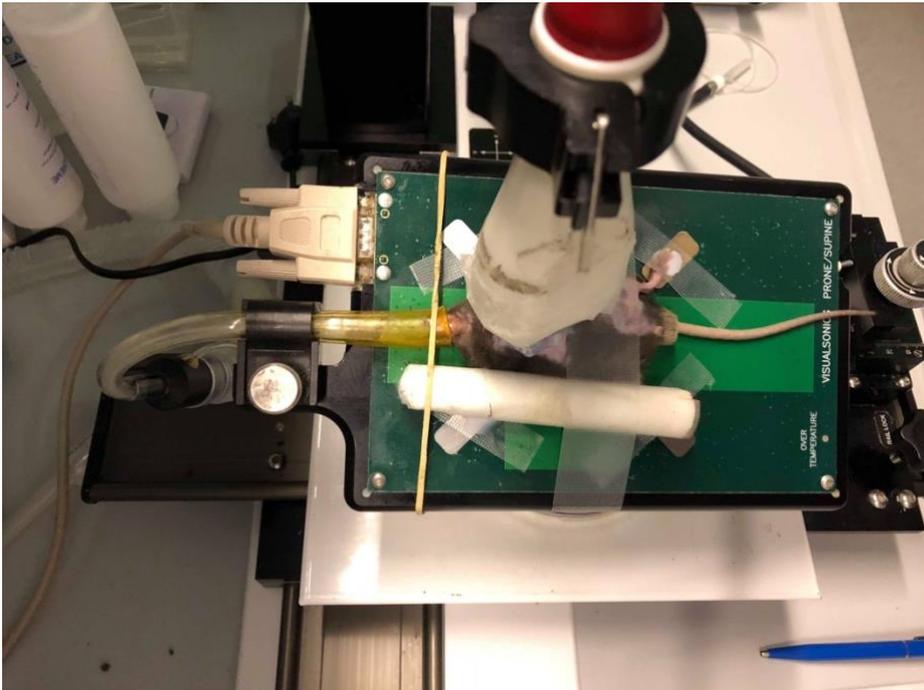


Abbildung 8: Lage der Maus und Position des Schallkopfs während des PSLA-Modus.

Der erste Modus, der eingestellt wird, ist die parasternale lange Achse (PSLA-Modus, parasternal long axis view). In dieser Ebene wird der linke Ventrikel analysiert. Um eine gute Bildeinstellung zu erreichen, wird der Untersuchungstisch um ca. 45° nach links gekippt und der Schallkopf in der Längsachse mit einer leichten Drehung des Oberteils nach links ausgerichtet. Hierbei ist es wichtig, dass sowohl die Herzspitze als auch der linksventrikuläre Ausflusstrakt dargestellt werden und sich diese auf dem Bild in einer Linie befinden (s. Abb. 8,9).

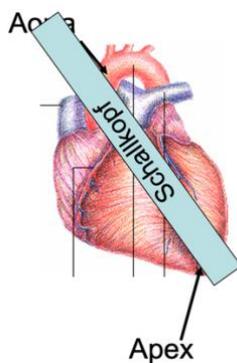


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Schnittebene im PSLA-Modus.

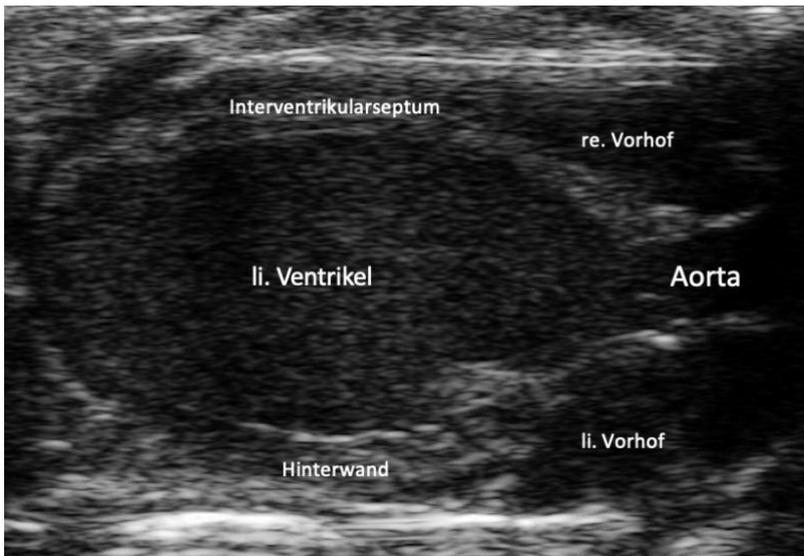


Abbildung 10: PSLA-Modus (B-Bild).

Ist eine geeignete Position gefunden, wird mithilfe des Ultraschallgeräts eine kurze Videosequenz aufgezeichnet, die anschließend analysiert werden kann. Neben der B-Bild Aufnahme wird auch eine M-Modus Sequenz aufgezeichnet, die es erlaubt, die Dicke des intraventrikulären Septums und der Hinterwand des linken Ventrikels darzustellen (s. Abb. 10, 11).

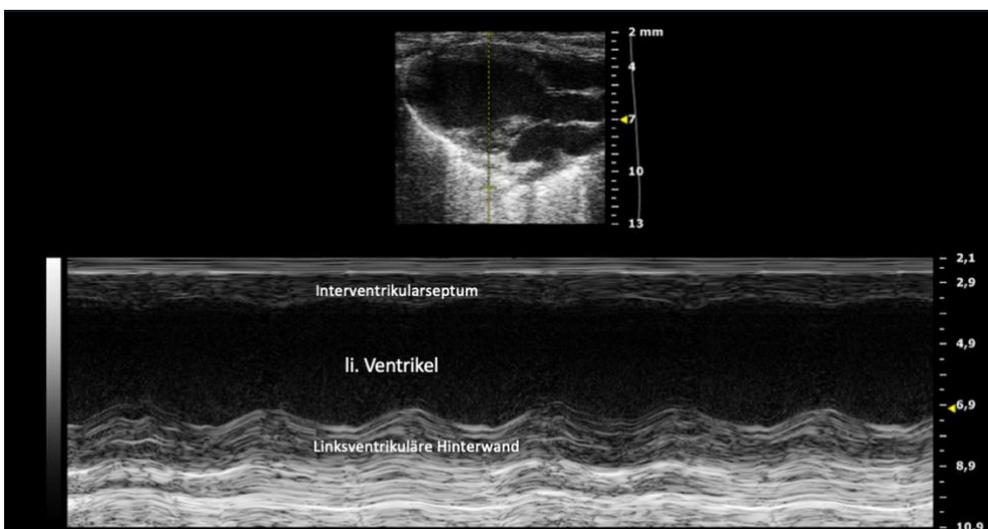


Abbildung 11: PSLA-Modus (M-Modus).

Von dieser Darstellung wird der Schallkopf um 90° nach rechts gedreht, um die kurze Achse des linken Ventrikels einzustellen. Auch hier werden sowohl eine Aufnahme im B- Modus als auch im M-Modus angefertigt (s. Abb.12,13).

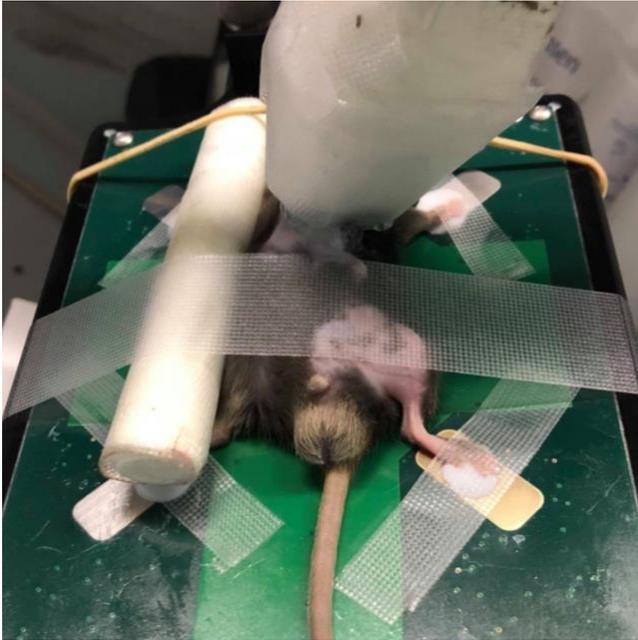


Abbildung 12: Position des Schallkopfes während Darstellung des SAX-Modus.

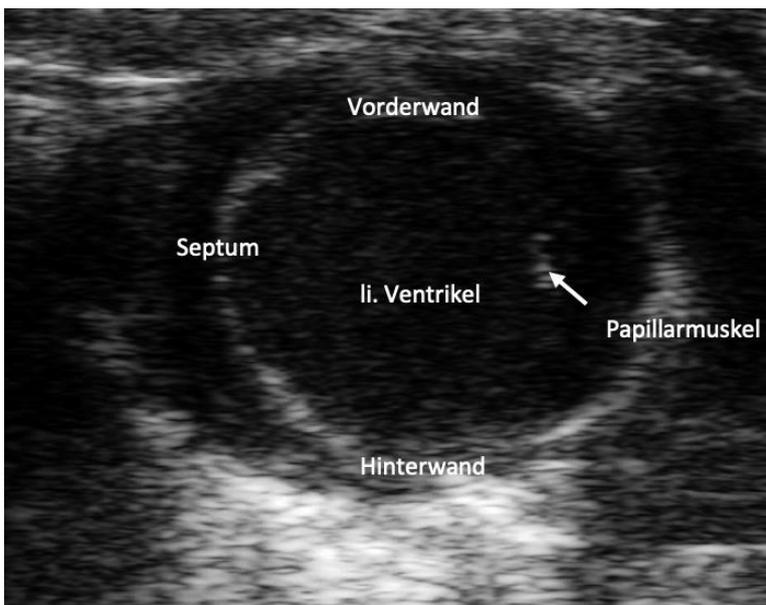


Abbildung 13: SAX-Modus (B-Bild).

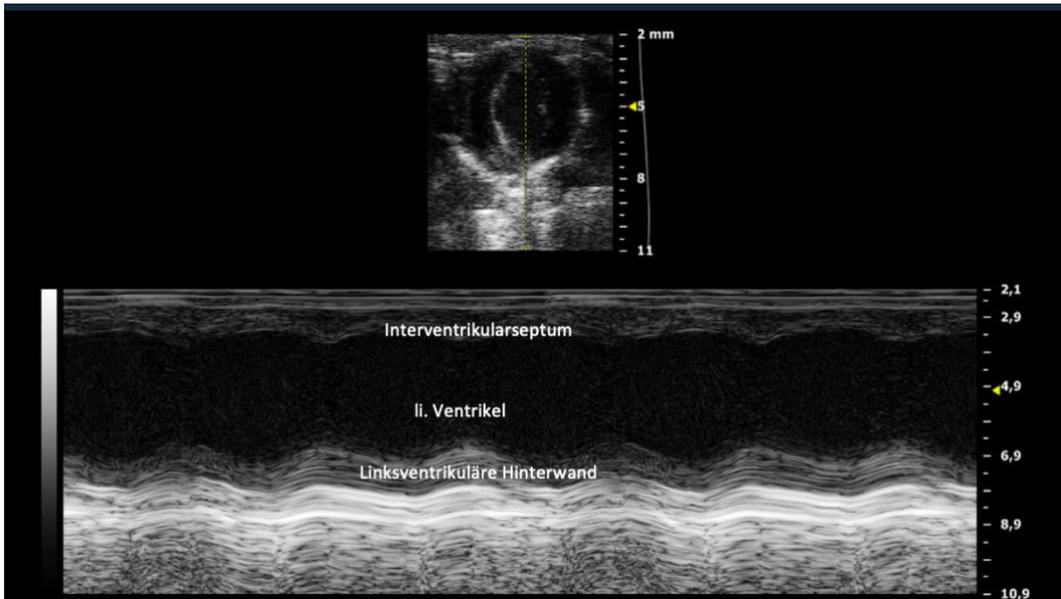


Abbildung 14: SAX-Modus (M-Modus).

Nun kann der Untersuchungstisch maximal nach kranial mit einer leichten Drehung zur linken Seite ausgerichtet werden, um einen apikalen Vierkammerblick zu ermöglichen. In dieser Einstellung lässt sich der Fluss über die Mitralklappe mithilfe der Doppler Funktion des Gerätes gut darstellen. Hierzu wird der Schallkopf kaudal des Sternums in einem Winkel von ca. 45° aufgesetzt. Anschließend wird der Thorax durchmustert, bis sich der linke Ventrikel mit der Mitralklappe gut darstellen lässt. Ist eine gute Position gefunden, wird der Doppler Modus genutzt, um den Fluss darzustellen (s. Abb. 15,16). Auch hier wird eine Videosequenz aufgenommen.

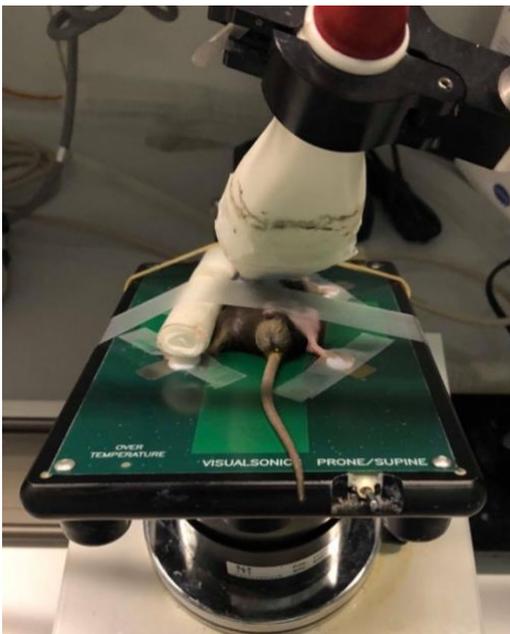


Abbildung 15: Aufbau während der Darstellung des Flusses über der Mitralklappe.

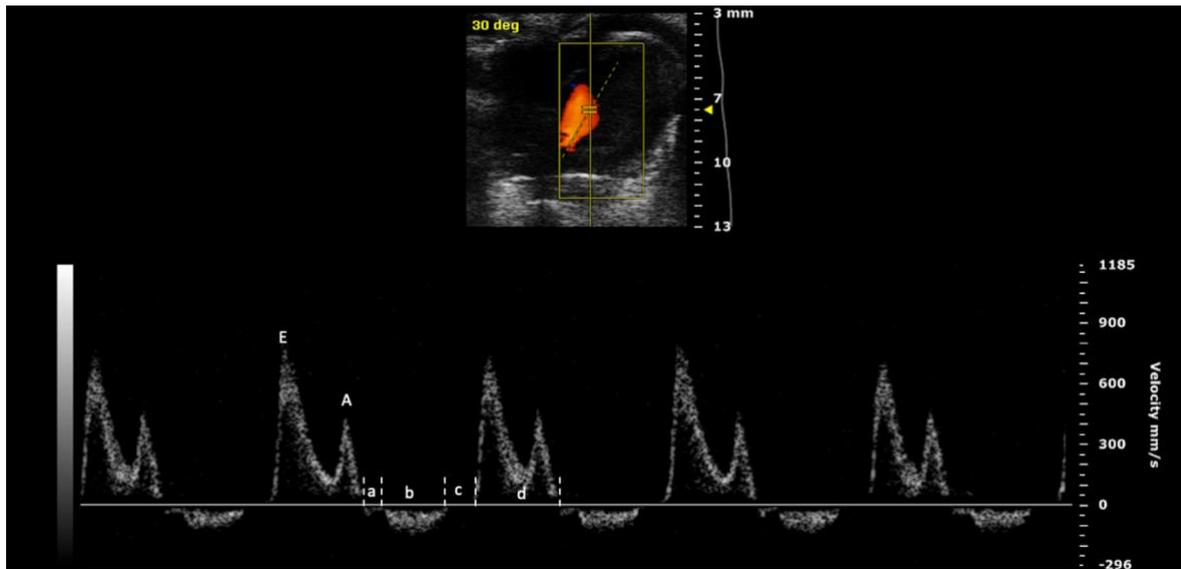


Abbildung 16: Darstellung des Flusses über der Mitralklappe.

E: E-Welle, frühe diastolische Füllung. A: A-Welle, späte diastolische Füllung.; a: isovolumetrische Kontraktionszeit; b: NFT= no-flow-time, c: isovolumetrische Kontraktionszeit, d: Diastole.

2.2.2 Fluss-vermittelte-Vasodilatation

Bei der Fluss-vermittelten-Vasodilatation (FMD) handelt es sich ebenfalls um eine nicht invasive ultraschallbasierte Untersuchungsmethode. Hier wird mit dem Schallkopf die Arteria iliaca aufgesucht und gut dargestellt. Zu Beginn der Untersuchung wird die Maus wie bereits oben beschrieben mit Isofluran sediert und anschließend auf dem beheizten Untersuchungstisch gelagert. Dazu werden die Pfoten der oberen Extremität sowie des rechten Beins an EKG-Elektroden fixiert. Auch der Schwanz wird auf einer solchen Elektrode befestigt. Anschließend wird ein Kissen unter die Maus geschoben und ein weiteres Kissen wird rechts auf dem Untersuchungstisch neben der Maus fixiert. Auf diesem wird das linke Bein des Tieres befestigt. Vorher wird eine Manschette (Vascular Occluder 10 mm, OC10, Kent scientific, Torrington, Connecticut, USA) am linken Oberschenkel angelegt. Diese Manschette ist mit einem Druckkalibriergerät (Druckkalibriergerät KAL 84, Halstrup Walcher, Kirchzarten, Deutschland) verbunden, das es ermöglicht den durch die Manschette erzeugten Druck zu regulieren. Nun kann der linke Unterbauch des Tieres mittels Rasur und Enthaarungscreme von Fell befreit und anschließend das Ultraschallgel aufgetragen werden (Abb. 17).

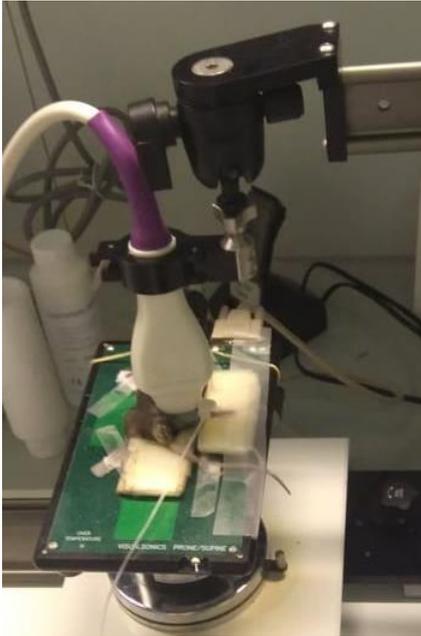


Abbildung 17: Position der Maus und des Schallkopfes während FMD.

Ist dies erfolgt, kann der Schallkopf parallel zum Bein aufgesetzt werden. Sobald die Ateria iliaca und deren Wände gut dargestellt sind, kann der Druck der Manschette zügig auf 300 mmHg erhöht werden. Der Ultraschallkopf verbleibt während der gesamten Untersuchung an der gleichen Stelle, um die Veränderungen des Gefäßdurchmessers über die Zeit auswerten zu können. In der folgenden fünfminütigen Okklusionsphase werden alle 30 Sekunden Ultraschallbilder des Gefäßes angefertigt. Nach fünf Minuten wird der Druck der Manschette abgelassen und die Reperfusion beginnt. In den ersten zwei Minuten dieser Phase werden alle 20 Sekunden sowohl B-Modus-Bilder als auch Doppler-Bilder aufgenommen. In den folgenden drei Minuten werden diese alle 30 Sekunden angefertigt (Abb. 18).

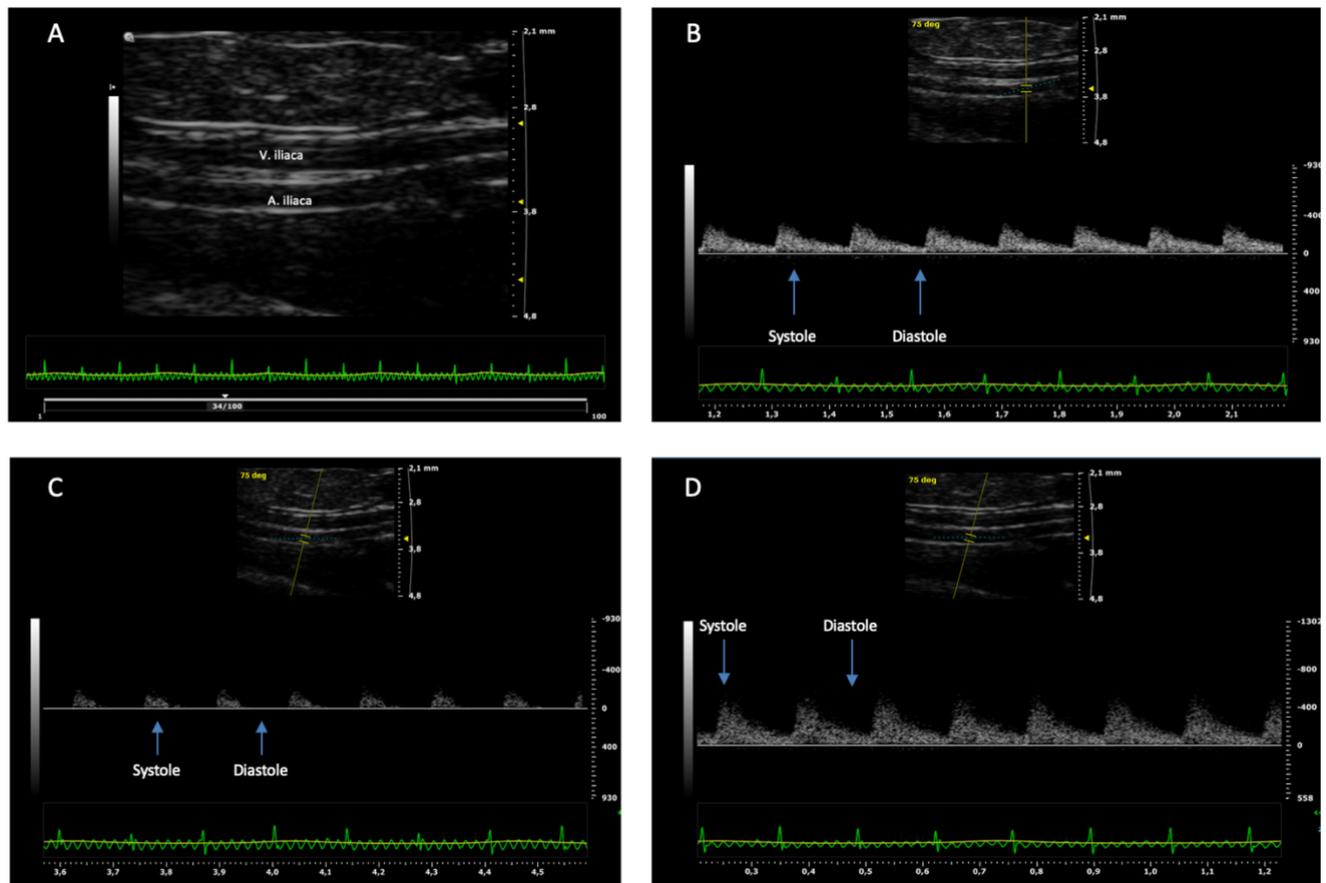


Abbildung 18: FMD in der *Arteria iliaca*.

(A) B-Bild der Arteria und Vena iliaca vor Beginn der Untersuchung. (B) Fluss in der Arteria iliaca unter Ruhebedingungen. (C) Fluss in der Arterie während der Okklusionsphase. (D) Fluss in der Arteria iliaca in der Reperfusionsphase.

Nach fünfminütiger Reperfusion wird die Untersuchung beendet und die Sedierung kann beendet werden. Die Fixierungen der Maus werden gelöst und sie wird noch so lange unterstützend mit Sauerstoff versorgt, bis sie wieder selbstständig atmen kann. Sobald die Sedierung nachlässt und eine eigenständige Atmung möglich ist, kann die Maus in den Käfig zurückgesetzt werden.

2.2.3 Ischämie/Reperfusion

2.2.3.1 Durchführung

Vor Beginn des Eingriffs werden die Mäuse in einer Einleitungskammer mit Isofluran sediert. Im Anschluss erfolgt die Intubation. Über einen speziellen Respirator erfolgt die Beatmung der Mäuse. Die Narkose wird mit 3% Vol. Isofluran induziert und mit 2% Vol. aufrechterhalten. Zudem erfolgt eine Analgesie mit dem Opioid Buprenorphin (0,05 mg/kg KG, s.c.) mit einem maximalen Volumen von 10 ml/kgKG. Während der Operation wird die rektale Temperatur der Maus kontinuierlich bestimmt und dafür gesorgt, dass diese 37°C nicht unterschreitet. Zur Vermeidung eines Wärmeverlustes wird eine Infrarotlampe eingesetzt (IL21, Fa. Breuer).

Der Thorax wird mittels medianer Sternotomie eröffnet. Die Schnittlänge beträgt dabei 1,5 cm. Unter Verwendung eines Operationsmikroskops erfolgt die Präparation des Herzens sowie die Anschlingung der proximalen linken Koronararterie (LAD) mit 7-0 Prolenefaden (Ethicon). Nun werden die Enden des Fadens durch einen ca. 3mm breiten PE10 Schlauchring geführt und jeweils mit 10g Gewicht befestigt. Anschließend kann die Ischämie ausgelöst werden. Dazu werden die Enden der Fäden vorsichtig angezogen, bis die Gewichte frei hängen und somit auf jeder Seite ein Zug von 1g besteht.

Als Kontrolle einer adäquaten Okklusion des Lumens der LAD werden ST-Streckenhebungen in der Echokardiographie herangezogen. Die Ischämie dauert 45 min. Währenddessen wird der offene Thorax mittels angewärmter Natriumchlorid-Lösung feucht gehalten. Die Maus wird zugedeckt, um einen Wärmeverlust durch Konvektion zu vermeiden. Nach 45 Minuten wird der Zug der Fäden wieder entfernt und die Schlaufe verbleibt offen im Thorax. Anschließend wird der Thorax wieder verschlossen. Dazu werden zunächst die Rippen wieder adaptiert. Dies erfolgt erstmal locker, da zunächst die Beatmung der Lungen getestet wird. Nun werden die Muskelschichten und anschließend die Haut mit 5-0 Prolene und Einzelknopfnähten verschlossen.

Zur Ausleitung wird das Isofluran abgeschaltet und die Maus weiter mit Sauerstoff angereicherter Luft (40%) beatmet, wobei der Atemreflex in regelmäßigen Abständen getestet wird. Ist dieser wieder vorhanden, kann das Tier extubiert werden und anschließend noch 10 Minuten mit einer speziellen Maske mit einem Gemisch aus Sauerstoff und Raumluft beatmet werden. Danach kann die Maus in einen sauberen Käfig gesetzt werden, der bis die Maus sich von Narkose erholt hat, unter einer Wärmelampe

verbleibt. Die Maus erhält alle 6-8 Stunden Buprenorphin subkutan in der maximalen Dosis (10ml/kg KG), um eine adäquate Analgesie zu gewährleisten.

Nach 24 Stunden wird die Echokardiographie nach myokardialer Ischämie/Reperfusion nach dem oben beschriebenen Versuchsaufbau durchgeführt.

2.2.4 Auswertung und Statistik

2.2.4.1 Auswertung der echokardiographischen Bilder

Die aufgenommenen Videosequenzen werden am Computer mit der Vevo-Software ausgewertet. Für die Auswertung der systolischen Parameter werden die Aufnahmen aus dem PSLA-Modus verwendet. Zunächst wird die maximale diastolische Ausdehnung gesucht und die Umrisse des linken Ventrikels werden mithilfe der Software abgegrenzt. Danach wird das gleiche am Bild der minimalen systolischen Ausdehnung gemacht. Anschließend berechnet das Programm anhand dieser Umrisse das Enddiastolische (EDV) und endsystolische Volumen (ESV), das Schlagvolumen, das Herzzeitvolumen (HZV) und die Ejektionsfraktion (EF). Dazu werden folgende Formeln verwendet:

$$\text{Schlagvolumen (SV; } \mu\text{l)} = \text{EDV} - \text{ESV}$$

$$\text{Ejektionsfraktion (EF; \%)} = \frac{\text{EDV} - \text{ESV}}{\text{EDV}} \times 100$$

$$\text{Herzzeitvolumen (HZV; ml/min)} = \text{SV} \times \text{Herzfrequenz}$$

Als nächstes wird der M-Modus des PSLA-Modus ausgewertet. Hierzu werden im M-Modus das Interventrikularseptum, der linke Ventrikel und die Hinterwand des linken Ventrikels in drei aufeinanderfolgenden Herzzyklen markiert. Auf Grundlage dieser Markierungen berechnet das Programm unter anderem die Dicke der Hinterwand des linken Ventrikels (s. Abb. 19).

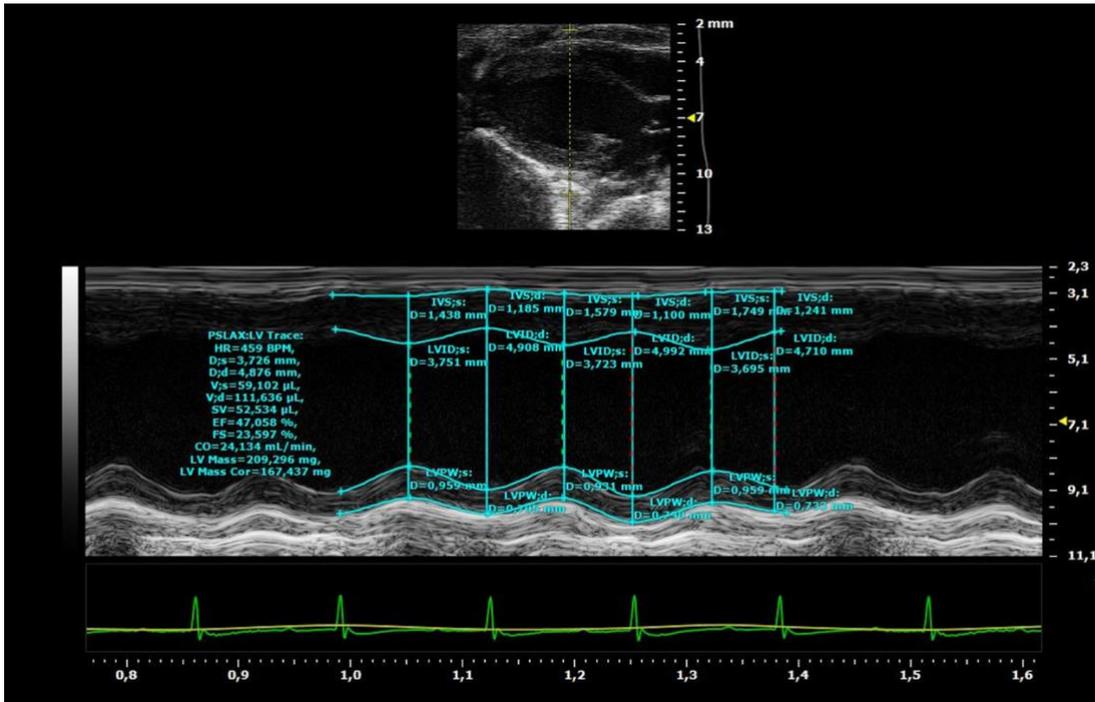


Abbildung 19: Auswertung des M-Modus des PSLA-Modus zur Ausmessung der Dicke des Interventrikularseptums und der Hinterwand des linken Ventrikels.

Für die Auswertung der diastolischen Parameter werden die Aufnahmen des Flusses über der Mitralklappe ausgewertet. Dabei werden isovolumetrische Kontraktionszeit, die isovolumetrische Relaxationszeit, die No-Flow-Time, die Mitralklappenauswurfzeit, die E-Wellen, die A-Welle und die Dezelerationszeit der E-Welle markiert. Anschließend berechnet das Programm anhand der Markierungen die entsprechenden Zeiten (s. Abb.20).

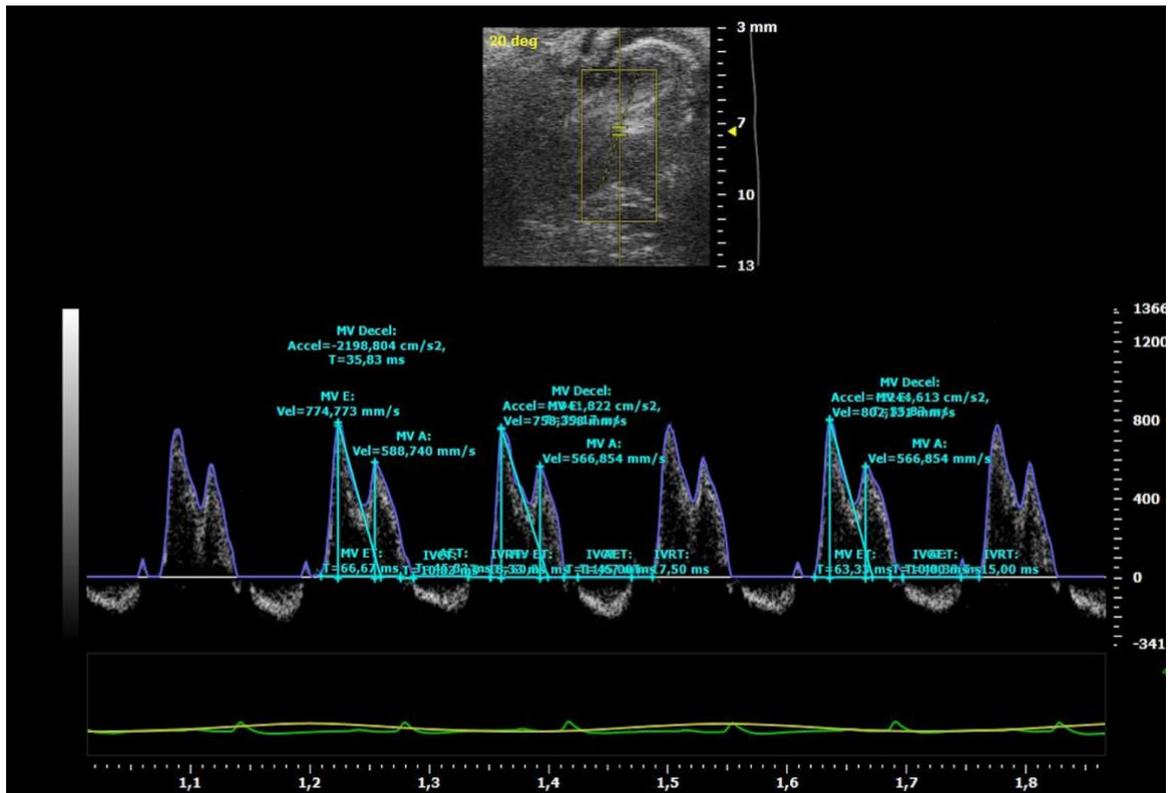


Abbildung 20: Auswertung des Flusses über der Mitralklappe.

2.2.4.2 Auswertung der Fluss-vermittelten-Vasodilatation

Der erste Auswertungsschritt erfolgt mithilfe der Vevo-Software. Hier werden die aufgenommenen B-Bild Sequenzen angeschaut und jeweils ein Bild ausgesucht. Um eine Vergleichbarkeit der Aufnahmen zu schaffen, werden diese zwischen der P-Welle und dem QRS-Komplex des EKGs und nicht während der Atmung aufgenommen. Im nächsten Schritt wird mit dem *Brachial Analyzer* (Medical Imaging Applications, USA) der Durchmesser des Gefäßes auf allen Bildern ermittelt. Hierzu wird der Wert vor der Okklusion als Ausgangswert (100%) festgelegt und ausgehend davon wird bestimmt, ob in der Reperfusionphase eine Vasodilatation stattgefunden hat.

2.3 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Echokardiographie und der FMD erfolgen mithilfe des Graph Pad Prism Programms (Version 9.0., Graphpad Software, USA). Für die Auswertung der echokardiographischen Parameter werden je zwei Gruppen miteinander verglichen. Als statistischer Test dient der ungepaarte t-test. Als Signifikanzniveau wird $p < 0,05$ gewählt.

Für die Auswertung der FMD wird die maximale Dilatation zweier Gruppen mittels ungepaartem t-test verglichen. Als Signifikanzniveau wird $p < 0,05$ gewählt.

3. Ergebnisse

3.1 Einfluss von eNOS auf die endotheliale und kardiale Funktion

3.1.1 Fluss-vermittelte-Vasodilatation

3.1.1.1 Wiedergewinn der endothelialen Funktion durch funktionale endotheliale eNOS

Vor Induktion des eNOS-KI liegt die endotheliale eNOS sowohl bei der cre-positiven als auch bei der cre-negativen Kontrollgruppe invertiert vor. Unsere Hypothese war, dass die Mäuse aufgrund dieser Inversion des Gens keine FMD zeigen dürften. Diese Hypothese hat sich bestätigt (s. Abb. 21, 22). Die cre-negative Gruppe zeigt vor Tamoxifen-Behandlung eine maximale FMD von 6%, während die cre-positive Gruppe eine maximale FMD von 11% zeigt.

Um den KI der endothelialen eNOS zu erzeugen, wurden die Tiere an fünf aufeinanderfolgenden Tagen mit Tamoxifeninjektionen behandelt. Die Messung der FMD fand an Tag 21 nach Beginn der Behandlung statt. Nach Induktion des KI der endothelialen eNOS zeigt sich, dass sich die endotheliale Funktion, gemessen durch FMD erholt. Bei den Cre-negativen Kontrollmäusen wird der KI nicht induziert, dementsprechend handelt es sich bei diesen Mäusen um globale eNOS-KO-Mäuse. Diese zeigen keine FMD. Hinsichtlich der maximalen Dilatation nach Eröffnung der Manschette zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen. Die Mäuse mit endothelialem eNOS-KI zeigen eine maximale FMD von 15%, während die cre-negativen Mäuse eine maximale FMD von 2% zeigen (Abb. 23, 24).

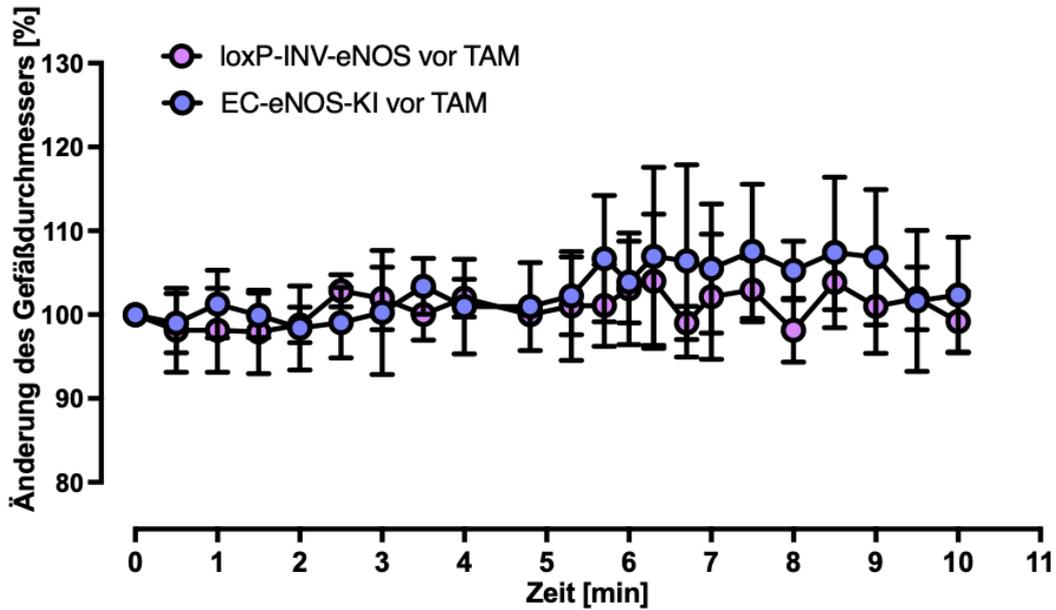


Abbildung 21: Kein Unterschied zwischen der LoxP-INV-eNOS-Gruppe und der EC-eNOS-KI-Gruppe vor Induktion des KIs.

loxP-INV-eNOS vor TAM: blau, n= 4. EC-eNOS-KI vor TAM: flieder, n=6. Es wurden je 3 Ultraschalluntersuchungen pro Gruppe von Dr. Tatsiana Suvorava durchgeführt. Die Aufarbeitung der aufgenommenen Bilder mittels der Vevo-Software und die statistische Auswertung erfolgten durch mich.

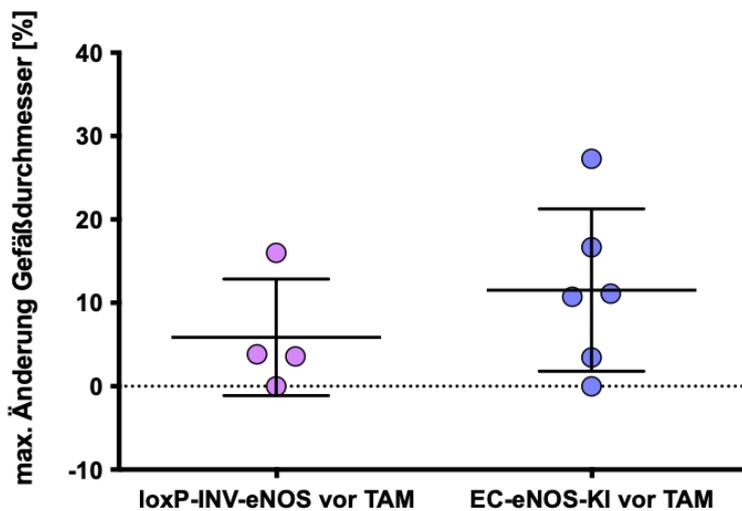


Abbildung 22: Kein signifikanter Unterschied im maximalen Gefäßdurchmesser zwischen der LoxP-INV-eNOS-Gruppe und der EC-eNOS-KI-Gruppe vor Tamoxifen.

LoxP-INV-eNOS vor TAM: blau, n= 4. EC-eNOS-KI vor TAM: flieder, n=6. Ungepaarter t-test: $p = 0,35$. Darstellung als Streudiagramm mit Standardabweichungen.

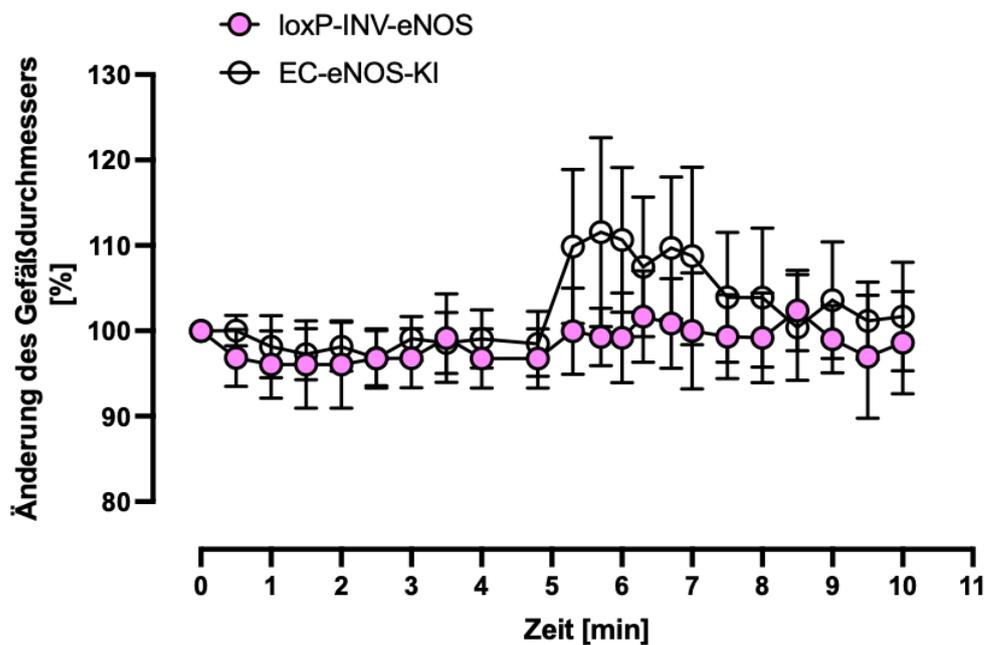


Abbildung 23: FMD in der EC-eNOS-KI-Gruppe.

Änderung des Gefäßdurchmessers über die Zeit zwischen der EC-eNOS-KI-Gruppe und der loxP-INV-eNOS-Gruppe. EC-eNOS-KI: weiß, n= 9. loxP-INV-eNOS: lila, n=5. Aus der EC-eNOS-KI-Gruppe wurden 4 Ultraschallaufnahmen von Francesca Leo durchgeführt. Die Aufarbeitung am Computer und statistische Auswertung erfolgten vollständig durch mich.

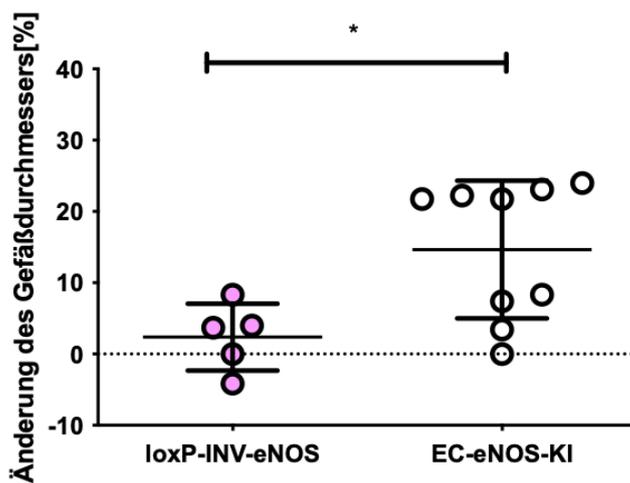


Abbildung 24: Signifikant gesteigerte FMD in der EC-eNOS-KI-Gruppe.

Es besteht ein signifikanter Unterschied in der FMD zwischen der EC-eNOS-KI-Gruppe und der LoXP-INV-eNOS-Gruppe. EC- eNOS-KI: weiß n= 9. LoXP-INV-eNOS: lila, n=5. Ungepaarter t-test $p= 0,022$ *. Darstellung als Streudiagramm mit Standardabweichungen.

3.1.1.2 Kein Einfluss der erythrozytären eNOS auf die FMD

Bei der erythrozytären eNOS-KO-Linie wurde die FMD ebenfalls gemessen. Als Kontrollgruppe diente die Lox-P-Linie mit normaler eNOS-Expression. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der FMD zwischen beiden Gruppen, sodass die erythrozytäre eNOS für die FMD nur eine untergeordnete Rolle spielt. Die maximale FMD lag bei beiden Gruppen bei ca. 16% (Abb. 25, 26).

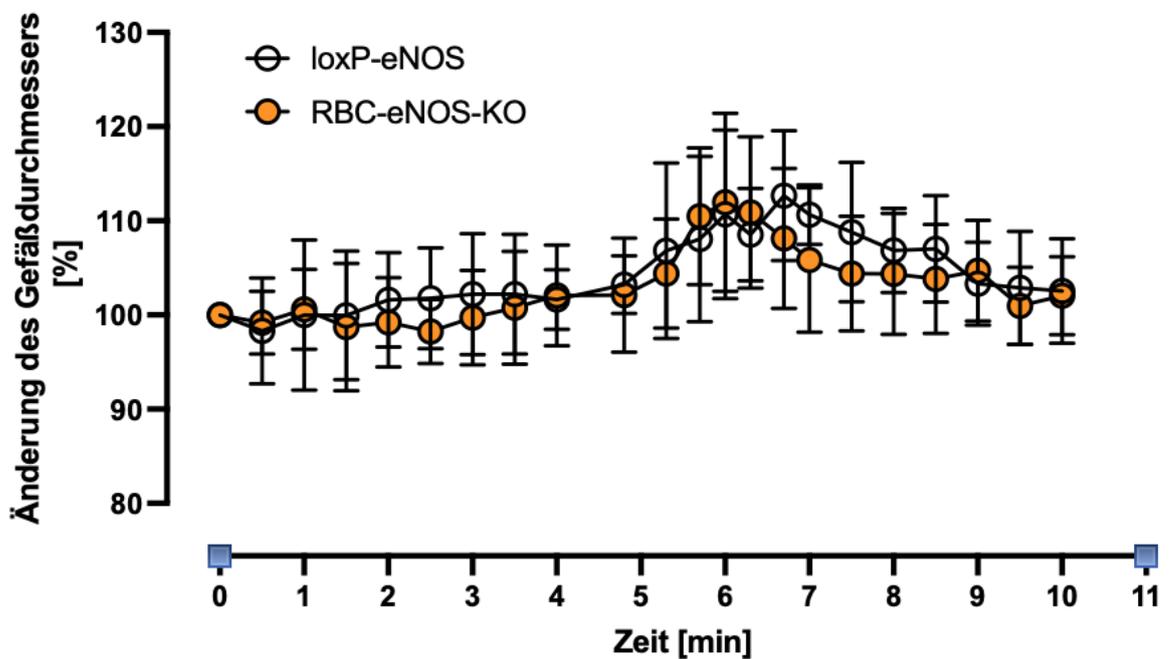


Abbildung 25: FMD der RBC-eNOS-KO.

Änderung des Gefäßdurchmessers über die Zeit zwischen der erythrozytären eNOS-KO-Gruppe und der Kontrollgruppe (LoxP-eNOS). RBC-eNOS-KO: orange, n=8. LoxP-eNOS: weiß, n=8.

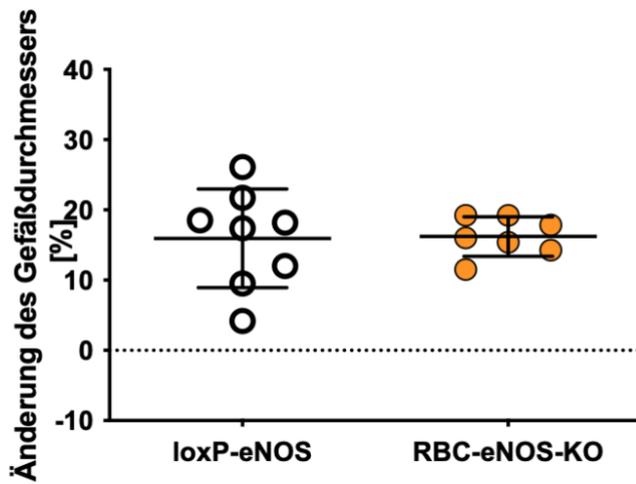


Abbildung 26: Keine Unterschiede in der maximalen FMD der RBC-eNOS-KO.

Es gibt keine signifikanten Unterschiede in der maximalen Dilatation durch FMD zwischen der RBC-eNOS-KO-Gruppe und der LoxP-eNOS-Gruppe. RBC-eNOS-KO: orange, n= 7. LoxP-eNOS/ Kontrollgruppe: weiß, n= 8. Ungepaarter t-test $p= 0,93$. Darstellung als Streudiagramm mit Standardabweichungen.

3.1.2 Echokardiographie/Kardiale Funktion

3.1.2.1 Kein Einfluss der erythrozytären eNOS auf die basale kardiale Funktion

Unter basalen Bedingungen konnten keine signifikanten Unterschiede in der kardialen Funktion zwischen der erythrozytären eNOS-KO-Gruppe und der Kontrollgruppe nachgewiesen werden (Abb. 27, Tab. 2).

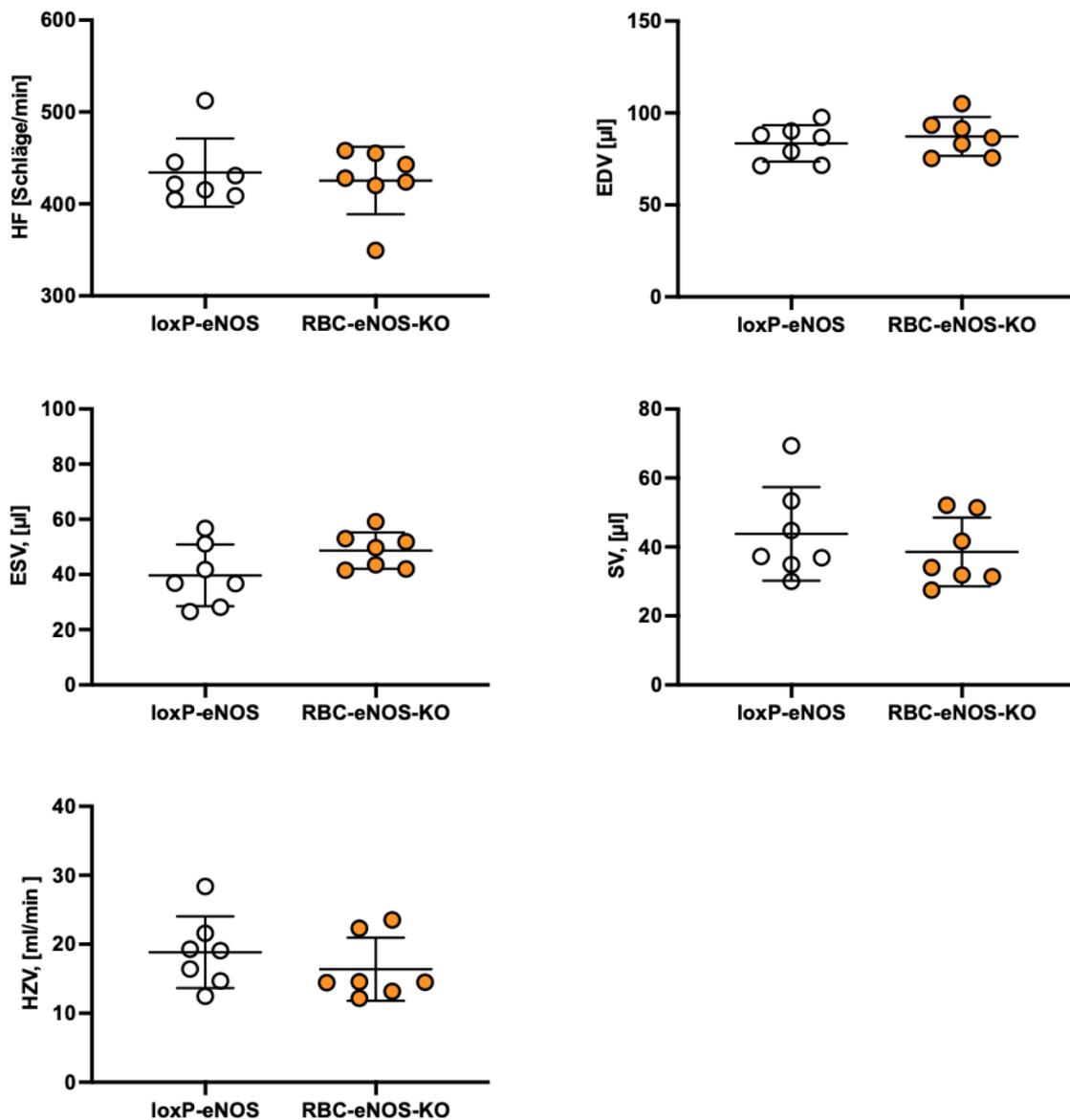


Abbildung 27: LV Parameter der RBC-eNOS-KO.

Keine signifikanten Unterschiede in den untersuchten Parametern zwischen der RBC-eNOS-KO-Linie (orange, n=7) und der LoxP-eNOS-Gruppe (weiß, n=7). In der LoxP-eNOS-Gruppe wurden drei Mäuse durch Dr. Tatsiana Suvorava untersucht. Die Auswertung erfolgte durch mich. Darstellung als Streudiagramm mit Standardabweichungen.

Tabelle 2: Statistik der kardialen Parameter der RBC-eNOS-KO-Gruppe.

Übersicht über die Mittelwerte und Standardabweichungen aller statistisch ausgewerteten Parameter der Echokardiographie sowie der zugehörigen P-Werte.

| | loxP-eNOS | RBC-eNOS-KO | P-Wert |
|-----------------|-----------------|-----------------|--------|
| n | 7 | 7 | |
| EF, % | 52,21 ± 12,72 | 43,84 ± 7,638 | 0,1616 |
| HF, Schläge/min | 434,1 ± 37,19 | 425,4 ± 36,67 | 0,6670 |
| SV, µl | 43,79 ± 13,59 | 38,55 ± 9,990 | 0,4271 |
| HZV, ml/min | 18,84 ± 5,198 | 16,38 ± 4,566 | 0,3646 |
| ESV, µl | 39,69 ± 11,16 | 48,67 ± 6,59 | 0,0914 |
| EDV, µl | 83,47 ± 9,850 | 87,22 ± 10,55 | 0,5051 |
| FS, % | 14,55 ± 5,372 | 12,48 ± 3,366 | 0,4048 |
| LVPW,d, mm | 0,9153 ± 0,1496 | 0,8475 ± 0,1493 | 0,4123 |
| LVPW,s, mm | 1,209 ± 0,2561 | 0,9934 ± 0,1429 | 0,0759 |
| Mitralklappe | | | |
| E/A | 1,300 ± 0,1558 | 1,271 ± 0,08949 | 0,6791 |
| DT, ms | 25,37 ± 7,416 | 24,64 ± 5,730 | 0,8414 |
| IVRT, ms | 14,88 ± 3,379 | 13,89 ± 1,628 | 0,4974 |
| IVCT, ms | 17,98 ± 5,690 | 16,43 ± 3,591 | 0,5542 |
| MVET, ms | 64,19 ± 12,40 | 60,24 ± 10,08 | 0,5255 |

3.2 Rolle von Arg-1 in Endothelzellen und Erythrozyten

3.2.1 Vaskuläre Funktion

3.2.1.1 Kein positiver Effekt des endothelialen Arg-1-KOs auf die endotheliale Funktion

Bei Untersuchung der EC-Arg-1-KO-Gruppe konnte kein signifikanter Unterschied in der durch FMD ermittelten vaskulären Funktion zwischen der EC-Arg-1-KO-Gruppe und der Kontrollgruppe mit normaler Arg-1-Expression festgestellt werden (Abb. 28,29). Der KO wurde durch Tamoxifenbehandlung induziert (s.o.). Die maximale FMD der EC-Arg-1-WT lag bei 25% und die der EC-Arg-1-KO-Gruppe bei 19%.

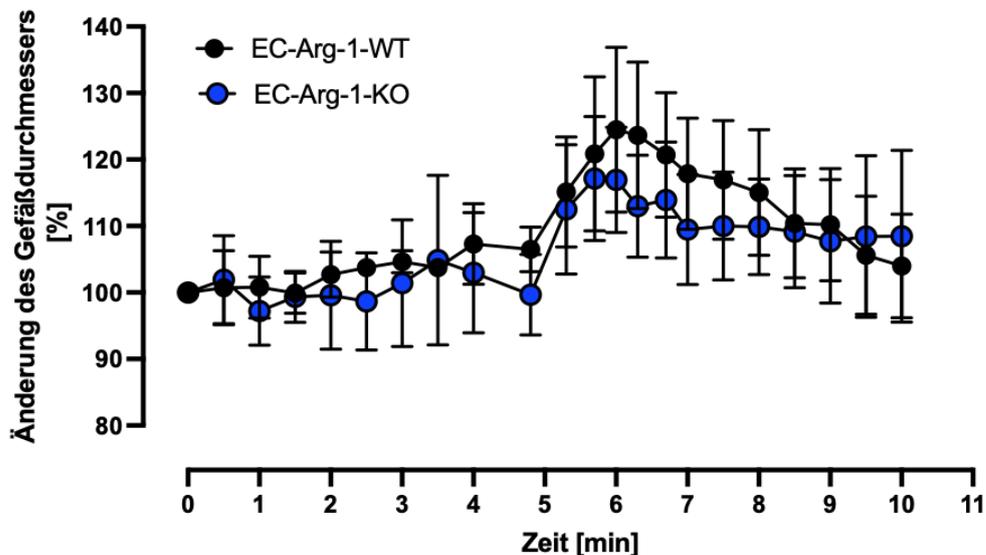


Abbildung 28: FMD der EC-Arg-1-KOs.

Veränderung des Gefäßdurchmessers der EC-Arg-1-KO-Gruppe und der EC-Arg-1-WT-Gruppe. EC-Arg-1-WT: weiß, n=4. EC-Arg-1-KO: blau, n=5. Die Ultraschalluntersuchungen wurden durch Dr. Tatsiana Suvorava durchgeführt. Die Aufarbeitung der aufgenommenen Ultraschallbilder und die statistische Auswertung erfolgten vollständig durch mich.

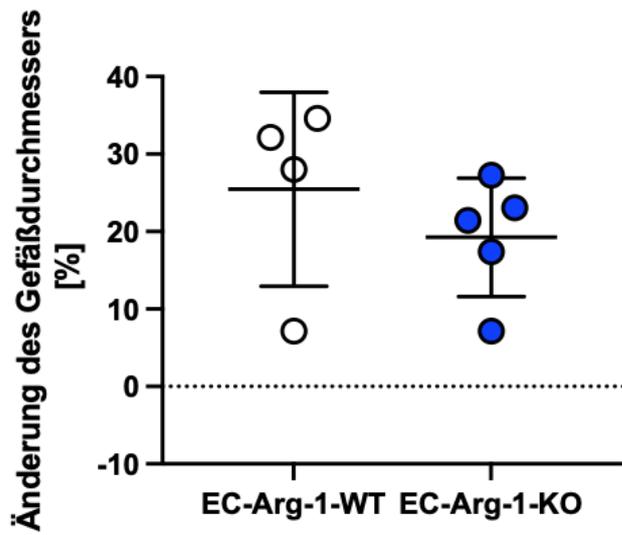


Abbildung 29: Max. FMD der EC-Arg-1-KOs.

Maximale FMD der EC-Arg-1-KO-Linie (blau, n=5) und der EC-Arg-1-WT-Gruppe (weiß, n=4). Ungepaarter t-test $p = 0,39$. Darstellung als Streudiagramm mit Standardabweichungen.

3.2.1.2 Kein Unterschied in der Endothelfunktion nach KO der erythrozytären Arg-1

Hinsichtlich der, durch FMD ermittelten, vaskulären Funktion lassen sich keine Unterschiede zwischen erythrozytären Arg-1-KO-Mäusen und Kontrolltieren feststellen (Abb. 30,31). Die erythrozytären Arg-1-KO-Mäuse zeigen eine normale maximale FMD von 19% und die LoxP-Arg-Mäuse (Kontrolle) von 20%.

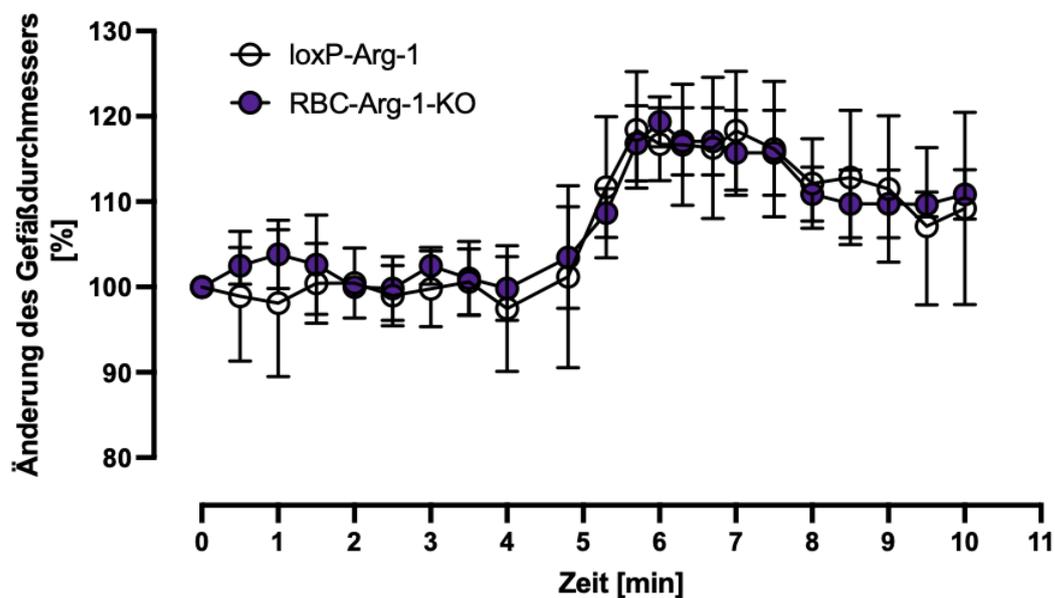


Abbildung 30: FMD der RBC-Arg-1-KO.

Veränderungen des Gefäßdurchmessers der RBC-Arg-1-KO- Gruppe und der LoxP-Arg-1-Gruppe. LoxP-Arg-1: weiß, n=6. RBC-Arg-1-KO: lila, n=3.

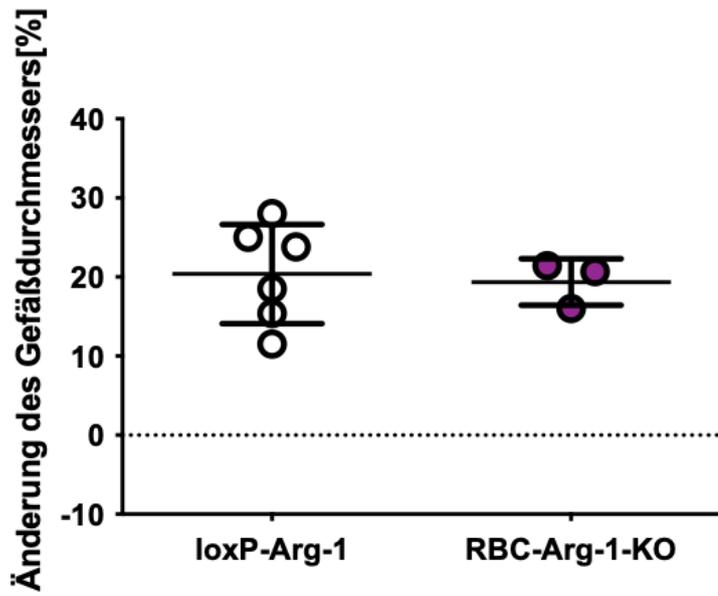


Abbildung 31: Maximale FMD der RBC-Arg-1-KOs.

Vergleich der maximalen FMD nach Reperfusion der RBC-Arg-1-KO-Gruppe (rot, n=3) und der LoxP-Arg-1-Gruppe (weiß, n=6). Ungepaarter t-test $p=0,81$. Darstellung als Streudiagramm mit Standardabweichungen.

3.2.2 Einfluss von Arg-1 auf die kardiale Funktion

3.2.2.1 Erythrozytäre Arg-1-KOs

Beim Vergleich der erythrozytären Arg-1-KO-Gruppe mit der loxP-Arg-1-Kontrollgruppe ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in der basalen kardialen Funktion (Abb. 32, Tab. 3).

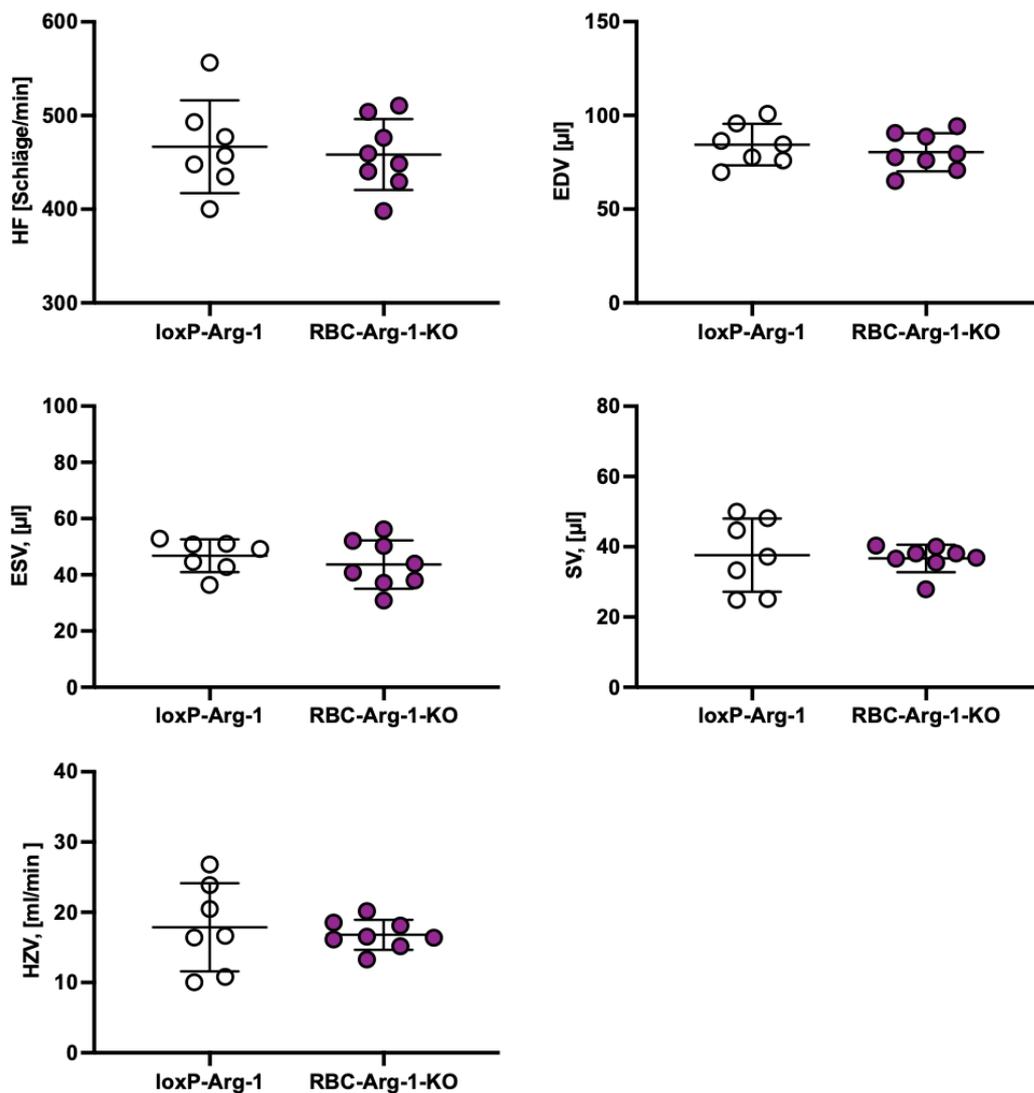


Abbildung 32: LV-Funktion der RBC-Arg-1-KO.

Keine Unterschiede in der basalen kardialen Funktion zwischen der RBC-Arg-1-KO-Gruppe (lila, n=8) und der LoxP-Arg-1-Gruppe (weiß, n=7). Ungepaarter t-test. Sechs Ultraschalluntersuchungen der erythrozytären Arg-1-KO-Mäuse und zwei Untersuchungen der loxP-Arg-1-Gruppe wurden von Dr. Tatsiana Suvorava

durchgeführt. Die Aufarbeitung der aufgenommenen echokardiographischen Bilder und die statistische Auswertung erfolgten vollständig durch mich. Darstellung als Streudiagramm mit Standardabweichungen.

Tabelle 3: Statistik der kardialen Parameter der RBC-Arg-1-KO.

Mittelwerte mit Standardabweichungen aller statistisch ausgewerteten Parameter mit zugehörigen P-Werten.

| | LoxP-Arg-1 | RBC-Arg-1-KO | P-Wert |
|-----------------|-----------------|-----------------|--------|
| n | 7 | 8 | |
| EF, % | 44,01 ± 8,314 | 45,97 ± 5,280 | 0,5908 |
| HF, Schläge/min | 466,7 ± 49,56 | 458,3 ± 37,83 | 0,7166 |
| SV, µl | 37,62 ± 10,44 | 36,68 ± 3,913 | 0,8170 |
| HZV, ml/min | 17,86 ± 6,285 | 16,79 ± 2,133 | 0,6558 |
| ESV, µl | 46,80 ± 5,844 | 43,67 ± 8,595 | 0,4316 |
| EDV, µl | 84,42 ± 11,05 | 80,35 ± 10,13 | 0,4704 |
| FS, % | 10,69 ± 3,433 | 13,71 ± 2,909 | 0,0880 |
| LVPW,d, mm | 0,9058 ± 0,2109 | 0,9332 ± 0,2076 | 0,8041 |
| LVPW,s, mm | 1,092 ± 0,2526 | 1,183 ± 0,3485 | 0,5785 |
| Mitralklappe | | | |
| E/A | 1,378 ± 0,3332 | 1,361 ± 0,2282 | 0,9097 |
| DT, ms | 22,06 ± 7,321 | 25,10 ± 6,665 | 0,4149 |
| IVRT, ms | 14,01 ± 3,915 | 13,16 ± 2,276 | 0,6105 |
| IVCT, ms | 17,10 ± 3,688 | 17,74 ± 2,478 | 0,6961 |
| MVET, ms | 56,35 ± 10,89 | 60,52 ± 9,389 | 0,4396 |

3.3 Kardiale Funktion nach Ischämie/Reperfusion

Durch die Gewebeschädigung durch die Ischämie und die Reperfusion kommt es im Allgemeinen zu einer Steigerung der Herzfrequenz und zu einem *Remodeling* des linken Ventrikels mit Dilatation, Hypertrophie der Myozyten und interstitieller myokardialer Fibrose [68].

3.3.1 Negative Auswirkung des KO der erythrozytären eNOS auf die kardiale Funktion nach I/R

Beim Vergleich der kardialen Funktion einer Kontrollgruppe mit der erythrozytären eNOS-KO Gruppe nach I/R zeigen die Kontrolltiere mit normaler eNOS-Expression eine signifikant bessere Ejektionsfraktion und Herzzeitvolumen (s. Abb. 33, Tab. 4).

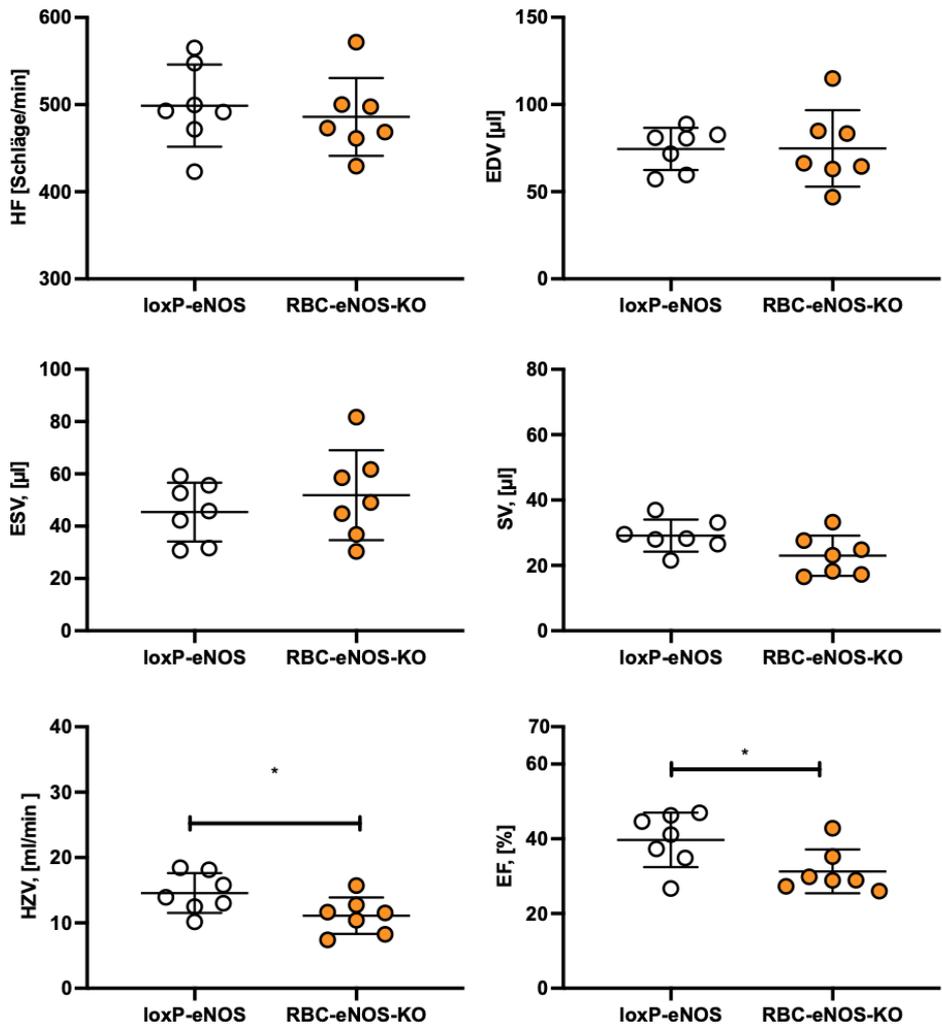


Abbildung 33: LV-Funktion der RBC-eNOS-KO nach I/R.

Keine signifikanten Unterschiede zwischen den Parametern EDV, ESV und SV zwischen der RBC-eNOS-KO Gruppe (orange, n=7) und der LoxP-eNOS-Gruppe (weiß, n=7) nach I/R. Die RBC-eNOS-KO Gruppe zeigt nach I/R eine signifikant schlechtere Ejektionsfraktion und Herzzeitvolumen im Vergleich zur LoxP-eNOS-Gruppe. Ungepaarter t-test. EF: $p < 0,05$ *. HZV: $p < 0,05$ *. Die echokardiographischen Aufnahmen wurden von Dr. Tatsiana Suvorova erhoben. Die anschließende Aufarbeitung der aufgenommenen echokardiographischen Bilder und die statistische Auswertung erfolgten vollständig durch mich. Darstellung als Streudiagramm mit Standardabweichungen.

Tabelle 4: Statistik der kardialen Parameter der RBC-eNOS-KO nach I/R.

Mittelwerte, Standardabweichungen und P-Werte aller statistisch ausgewerteten Parameter bei Vergleich der erythrozytären eNOS-KO Gruppe und der Kontrollgruppe nach I/R.

| | loxP-eNOS | RBC-eNOS-KO | P-Wert |
|-----------------|----------------|----------------|---------------|
| n | 7 | 7 | |
| EF, % | 39,71 ± 7,303 | 31,28 ± 5,865 | 0,0348 |
| HF, Schläge/min | 498,8 ± 47,15 | 486,0 ± 44,63 | 0,6099 |
| SV, µl | 29,12 ± 4,885 | 22,97 ± 6,150 | 0,0607 |
| HZV, ml/min | 14,57 ± 3,050 | 11,10 ± 2,786 | 0,0461 |
| ESV, µl | 45,40 ± 11,26 | 51,86 ± 17,21 | 0,4223 |
| EDV, µl | 74,52 ± 12,09 | 74,83 ± 21,92 | 0,9741 |
| Mitralklappe | | | |
| E/A | 1,397 ± 0,1973 | 1,487 ± 0,2790 | 0,4972 |
| DT, ms | 19,80 ± 3,726 | 22,18 ± 6,089 | 0,3949 |
| IVRT, ms | 17,02 ± 5,656 | 17,79 ± 4,553 | 0,7860 |
| IVCT, ms | 16,98 ± 3,354 | 22,58 ± 6,402 | 0,0631 |
| MVET, ms | 53,85 ± 8,960 | 53,61 ± 7,356 | 0,9576 |

3.3.2 Kein Effekt des KO der erythrozytären Arg-1 auf die kardiale Funktion nach I/R

Bei Vergleich der kardialen Funktion von erythrozytären Arg-1-KO-Mäusen und der LoxP-Arg-1 Kontrollgruppe, mittels Echokardiographie, zeigt die erythrozytäre Arg-1-KO Gruppe ein nahezu signifikant erhöhte Ejektionsfraktion (s.Tab. 5). Alle anderen ausgewerteten Parameter zeigen keine signifikanten Unterschiede.

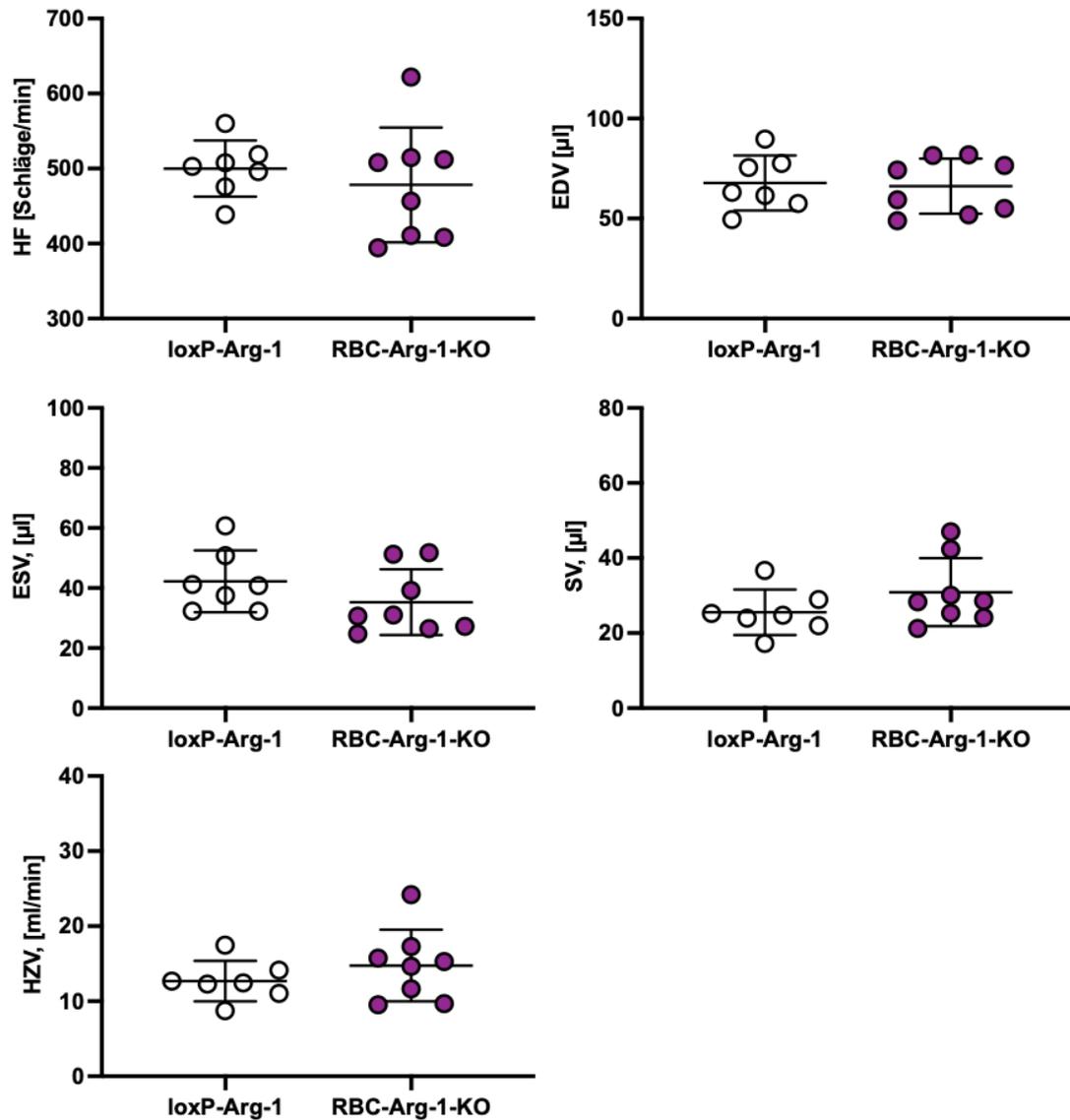


Abbildung 34: LV-Funktion der RBC-Arg-1-KO nach I/R.

Keine signifikanten Unterschiede der ausgewerteten Parameter zwischen der RBC-Arg-1-KO-Gruppe (lila, n=8) und der LoxP-Arg-1-Gruppe (weiß, n=7) nach I/R. Ungepaarter t-test. Die echokardiographischen Aufnahmen wurden von Dr. Tatsiana Suvorava aufgenommen. Die anschließende Aufarbeitung der aufgenommenen echokardiographischen Bilder und die statistische Auswertung erfolgten vollständig durch mich. Darstellung als Streudiagramm mit Standardabweichungen.

Tabelle 5: Statistik der kardialen Parameter der RBC-Arg-1-KO.

Mittelwerte, Standardabweichungen und P-Werte aller statistisch ausgewerteten Parameter bei Vergleich der erythrozytären Arg-1-KO Gruppe und der Kontrollgruppe nach I/R.

| | LoxP-Arg-1 | RBC-Arg-1-KO | P-Wert |
|-----------------|----------------|----------------|--------|
| n | 7 | 8 | |
| EF, % | 37,82 ± 5,822 | 46,88 ± 9,694 | 0,0509 |
| HF, Schläge/min | 499,9 ± 37,45 | 478,3 ± 76,49 | 0,5100 |
| SV, µl | 25,54 ± 6,083 | 30,89 ± 9,051 | 0,2089 |
| HZV, ml/min | 12,68 ± 2,691 | 14,75 ± 4,773 | 0,3292 |
| ESV, µl | 42,24 ± 10,31 | 35,30 ± 10,93 | 0,2303 |
| EDV, µl | 67,78 ± 13,76 | 66,19 ± 13,78 | 0,8275 |
| Mitralklappe | | | |
| E/A | 1,565 ± 0,3819 | 1,604 ± 0,3352 | 0,8392 |
| DT, ms | 23,96 ± 5,699 | 25,66 ± 3,293 | 0,4837 |
| IVRT, ms | 17,02 ± 8,055 | 16,46 ± 4,085 | 0,8637 |
| IVCT, ms | 15,20 ± 2,523 | 20,90 ± 7,341 | 0,0734 |
| MVET, ms | 50,09 ± 6,075 | 57,60 ± 11,88 | 0,1560 |

3.4 Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse

Tabelle 6: Übersicht der wesentlichen Unterschiede der einzelnen Gruppen.

| Linie | FMD | Echokardiographie Baseline | Echokardiographie post I/R |
|-------------------------------------|--|--|---|
| EC-eNOS-KI vs. LoxP-INV-eNOS | Wiedererlangung einer normalen FMD nach Induktion des KIs. | Nicht erhoben. | Nicht erhoben. |
| RBC-eNOS-KO vs. LoxP-eNOS | Keine signifikanten Unterschiede zur Kontrollgruppe. | Keine signifikanten Unterschiede zur Kontrollgruppe. | Verringerte EF und HZV im Vergleich zur Kontrollgruppe. |
| EC-Arg-1-KO vs. EC-Arg-1-WT | Keine signifikanten Unterschiede zur Kontrollgruppe. | Nicht erhoben. | Nicht erhoben. |
| RBC-Arg-1-KO vs. LoxP-Arg-1 | Keine signifikanten Unterschiede zur Kontrollgruppe. | Keine signifikanten Unterschiede zur Kontrollgruppe. | Keine signifikanten Unterschiede zur Kontrollgruppe. |

4. Diskussion

Ziel dieser Arbeit ist es den Beitrag der erythrozytären eNOS und Arginase auf kardiale und vaskuläre Funktionen näher zu untersuchen. Hierzu wurden transgene Mäuse mit gewebsspezifischen eNOS- und Arg-1-KOs und -KIs geschaffen.

Hierbei konnten wichtige neue Erkenntnisse gesammelt werden. Es konnte die wichtige Rolle der endothelialen eNOS für die Endothelfunktion, gemessen durch FMD, bestätigt werden. Ein KI der endothelialen eNOS führte zu einem Wiedergewinn der FMD. Die erythrozytäre eNOS hingegen hat keinen Einfluss auf die Endothelfunktion, wie sich in Versuchen mit erythrozytären eNOS-KO-Mäusen zeigen ließ. In Bezug auf die basale kardiale Funktion wurden bei den erythrozytären eNOS-KO-Tieren keine Veränderungen festgestellt. Nach I/R konnte jedoch ein protektiver Effekt einer funktionalen erythrozytären eNOS nachgewiesen werden. Der KO der erythrozytären Arg-1 führte weder zu einer Veränderung der endothelialen noch der basalen bzw. postischämischen kardialen Funktion.

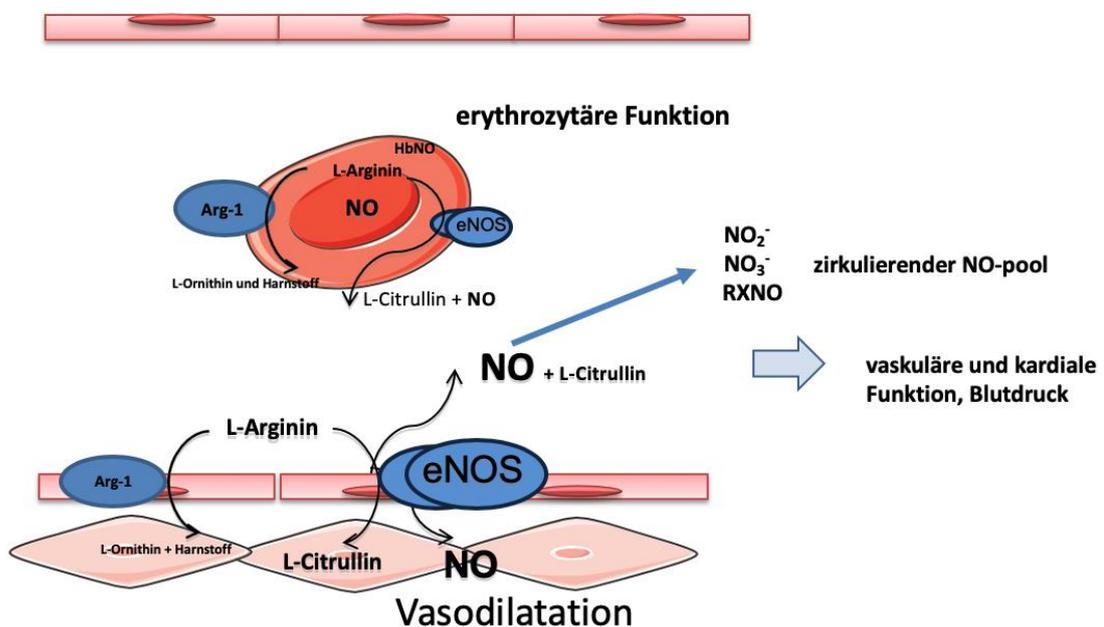


Abbildung 35: Rolle und Lokalisation von eNOS und Arg-1 im kardiovaskulären System.

Modifiziert nach [125].

4.1 Wesentliche Rolle der endothelialen eNOS für die Endothelfunktion

Die endotheliale Funktion der endothelialen eNOS-KI-Linie wurde durch FMD gemessen. Als Vergleichsgruppe diente eine Linie mit invertierter und dadurch dysfunktionaler eNOS. Demnach entspricht der Phänotyp der Kontrollgruppe dem einer globalen eNOS-KO-Linie. Die endotheliale eNOS-KI-Gruppe zeigt nach Induktion des KI eine normale FMD. Dieses Ergebnis verdeutlicht die entscheidende Rolle der endothelialen eNOS für die Regulation von Blutfluss und Gefäßtonus.

Beim Vergleich der LoxP-eNOS-Gruppe und der erythrozytären eNOS-KO-Gruppe konnten keine Unterschiede in der FMD nachgewiesen werden. Dies zeigt, dass die erythrozytäre eNOS keine Rolle in der Regulation der FMD spielt.

Im gesunden Endothel wird als Folge von erhöhtem Fluss, aber auch als Reaktion auf bestimmte Mediatoren NO freigesetzt, wodurch es zur Vasodilatation kommt [37, 40]. Die NO-Freisetzung als Reaktion auf einen erhöhten Blutfluss wird als FMD bezeichnet [36]. Zur Messung der FMD wird dabei eine Blutdruckmanschette über den systolischen Blutdruck aufgepumpt und eine 5-minütige Ischämie erzeugt. Anschließend wird der Druck abgelassen. Es kommt zu einer reaktiven Hyperämie, die eine erhöhte Schubspannung erzeugt. Dies löst eine NO-Freisetzung aus, die zu einer lokalen Vasodilatation führt [37]. Das Endothel ist in der Lage, Veränderungen in der Schubspannung wahrzunehmen. Die Membran der Endothelzellen enthält Ca^{2+} -abhängige Kaliumkanäle, die sich als Reaktion auf erhöhte Schubspannung öffnen. Dies führt zu einer Hyperpolarisation der Endothelzellen, die in einem erhöhte Ca^{2+} -Einstrom resultiert. Dadurch wird eNOS aktiviert und es kommt zur NO-Produktion und damit zur Vasodilatation [38]. Dies ist jedoch nicht der einzige Weg, der für die Vasodilatation sorgt. Der wichtigste Mechanismus ist die Phosphorylierung von eNOS an Ser1177 [33]. Es konnte gezeigt werden, dass eNOS durch Aktivierung von Akt und PKB Ca^{2+} -unabhängig aktiviert wird [33, 34]. Die FMD ist in den ersten 60 Sekunden eNOS-abhängig, anschließend greifen andere Signalwege [129].

Die FMD wurde 1992 zuerst nicht-invasiv durchgeführt [36] und ist ein Mittel zur Erfassung der endothelialen Funktion [36, 37, 48]. Darüber hinaus kann sie auch zur Erfassung der endothelialen Dysfunktion genutzt werden und dabei helfen, Aussagen über in der Zukunft liegende kardiovaskuläre Ereignisse zu treffen, [28, 38, 39] wobei die FMD anderen Scores in der Vorhersagekraft nicht überlegen ist [39]. FMD kann durch viele kardiovaskuläre Risikofaktoren beeinflusst werden [37] und kann schon im Alter von acht Jahren durch familiäre Hypercholesterinämie beeinträchtigt sein [36]. Dabei ist das Ausmaß der

Beeinträchtigung der FMD auch abhängig von der Menge der vorhandenen Risikofaktoren [130].

Schuler et. al. konnten zeigen, dass die erste Minute der FMD eNOS-abhängig ist und anschließend andere Mechanismen aktiviert werden [129]. Die Gruppe konnte dabei auch nachweisen, dass globale eNOS-KO-Mäuse fast keine FMD zeigen. In anderen Versuchen mit chimären Mäusen, die keine eNOS-Expression in Blutzellen zeigten, konnte ein Einfluss der erythrozytären eNOS auf die Regulation des Blutdrucks und den zirkulierenden Nitrit-Pool [89] nachgewiesen werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit Erythropoetin in murinen Erythrozyten zu einer zeit- und dosisabhängigen Steigerung der NO-Produktion durch Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges und Phosphorylierung an S1177 der erythrozytären eNOS führen [92]. In humanen Erythrozyten konnte ein ähnlicher Effekt durch Ausdauertraining erzielt werden [93]. Bei Inkubation der Erythrozyten in L-Arginin-freiem Medium und Behandlung mit Erythropoetin kam es zu einer Steigerung der Superoxid-Bildung [92].

Die hier gewonnenen Ergebnisse verdeutlichen, dass die FMD vor allem abhängig von einer intakten eNOS in den Endothelzellen ist. Die eNOS in den Erythrozyten scheint für die FMD hingegen nicht relevant zu sein. Unsere Arbeitsgruppe führte weitere Versuche durch, die diese Erkenntnisse unterstützen. EC-eNOS-KO-Mäuse zeigten einen Verlust der Acetylcholin-abhängigen Vasodilatation. Zudem wurde in dieser Linie ein erhöhter Blutdruck bei unveränderter Herzfrequenz gemessen [128]. Bei den EC-eNOS-KI hingegen konnte auch in ex-vivo Versuchen eine völlige Wiederherstellung der vaskulären endothelialen Funktion beobachtet werden. Zudem normalisierte sich der zuvor erhöhte Blutdruck [128]. Weitere Versuche der ex-vivo Endothelfunktion der RBC-eNOS-KO-Linie zeigten ebenfalls keine Veränderungen. Jedoch wurden auch bei diesen Tieren hypertensive Blutdruckwerte bei normofrequenter Herzfrequenz gemessen [128].

eNOS-KO-Mäuse zeigen keine NO-Aktivität als Antwort auf Acetylcholin [67] oder andere endothelabhängige Vasodilatoren [17, 28]. In anderen Tierversuchen kam es durch NOS-Inhibition zur Steigerung des Blutdrucks [49]. Beim Menschen kann die FMD durch Gabe von NOS-Inhibitoren aufgehoben werden [40]. Die physiologische Relevanz der intakten eNOS beim Menschen zeigt sich dadurch, dass es bei gesunden Kontrollpersonen als Reaktion auf eine NOS-Inhibition zu einer deutlichen Steigerung des Gefäßtonus und einer Senkung des Blutflusses kommt. Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass es bei Patienten mit essentieller Hypertonie zu einer Verschlechterung der endothelialen Funktion kommt, die vermutlich auf einer Verminderung der NO-Bioverfügbarkeit beruht [41]. Es gibt verschiedene Ursachen für die verminderte NO-Bioverfügbarkeit bei endothelialer Dysfunktion. Dazu gehören verminderte eNOS-Expression, L-Arginin Mangel, endogene

eNOS-Inhibition durch asymmetrisches Dimethylarginin, eNOS-Entkoppelung und viele weitere Faktoren [28].

Die Resultate von Sun et al. stehen auf den ersten Blick im Gegensatz zu unseren Ergebnissen. In ihren Versuchen an isolierten Arteriolen aus dem *Musculus gracilis* von eNOS-KO-Mäusen konnte die Gruppe eine normale endothelabhängige, flussvermittelte Vasodilatation nachweisen. Diese konnte durch NO-Inhibitoren nicht beeinflusst werden, aber durch Indomethacin, einen Prostaglandin-Inhibitor, vollständig inhibiert werden [131]. Eine Arbeit von Gödecke et al. zeigt ähnliche Ergebnisse an Koronargefäßen [21]. Vermutlich lassen sich diese Unterschiede im Vergleich zu den hier erhobenen und anderen [17] durch verschiedene Signaltransduktionswege in verschiedenen Regionen des Gefäßbaums erklären.

Insgesamt lässt sich durch die hier erhobenen Daten und die zusätzlich von unserer Arbeitsgruppe gewonnenen Erkenntnisse zeigen, dass die endotheliale eNOS eine entscheidende Rolle in der Endothelfunktion spielt, während die erythrozytäre eNOS hierauf keine wesentlichen Einfluss hat [128].

4.2 Protektiver Effekt der erythrozytären eNOS nach I/R

Unter Ruhebedingungen konnten keine Unterschiede in der kardialen Funktion der erythrozytären eNOS-KO-Linie und ihrer Kontrollgruppe, die eine normale eNOS-Expression zeigt, festgestellt werden. Nach I/R zeigte die erythrozytäre eNOS-KO-Gruppe jedoch signifikant reduzierte EF sowie HZV im Vergleich zur Kontrollgruppe.

eNOS-KO-Mäuse leiden unter Hypertonie [8, 17, 21, 63, 64] und zeigen zudem eine verringerte Herzfrequenz [8, 63]. In anderen Versuchen konnte unter Normalbedingungen zwischen globalen eNOS-KO-Mäusen und Wildtypen keine Unterschiede in Parametern wie HZV, EF und FS festgestellt werden [8]. Jedoch konnte in einigen Versuchen eine Hypertrophie des Herzens nachgewiesen werden [8]. Anderen Gruppen gelang dieser Nachweis nicht [21]. Hinsichtlich des basalen Flusses in den Koronarien sowie dem maximalen hyperämischen Fluss zeigten sich keine Unterschiede zwischen globalen eNOS-KO-Mäusen und Wildtypen [21]. eNOS-KO-Mäuse zeigten eine erhaltene kardiale Kontraktilität, während eine akute NOS-Inhibition bei Wildtyp-Mäusen zu einer Verschlechterung der Relaxation führte. Die eNOS-KO-Mäuse haben trotz des KOs normale cGMP-Level, die durch eine vermehrte Expression des cGMP-Stimulators ANP erreicht werden [66].

Unsere Gruppe konnte zeigen, dass Erythrozyten eine funktionelle eNOS bilden [89], die unter normoxischen Bedingungen aktiv ist [82]. Zudem gelang der Nachweis einer aktiven sGC in humanen und murinen Erythrozyten. Diese ist entscheidend für die von eNOS aktivierte Signalkaskade [91]. Unter hypoxischen Bedingungen können Erythrozyten NO bereitstellen, welches zur hypoxischen Vasodilatation führt [85]. Zudem ist die Nitritreduktion unter hypoxischen Bedingungen gesteigert [88]. Diese Nitritreduktion zu NO kann sowohl in Endothelzellen als auch in Erythrozyten stattfinden und wird je nach pH-Wert durch XOR oder eNOS vermittelt. Vermutlich erfolgt sie unter hypoxischen Bedingungen mit normalem pH-Wert durch eNOS und unter azidotischen Bedingungen durch XOR [83].

Durch L-Arginin Gabe konnte in verschiedenen Tiermodellen die Infarktgröße [57, 58] reduziert und zudem die endothelvermittelte Vasodilatation nach Infarkt erhalten werden [57]. Auch Infusion von NO-haltiger Infusionslösung führte zu signifikant kleineren Infarkten [29]. NO-Donor-Gabe während der Reperfusionphase konnte den myokardialen Blutfluss sowie die myokardiale Kontraktilität signifikant verbessern [56]. Zudem konnte die Infarktgröße durch NO-Donoren signifikant reduziert werden [56]. Durch NO-Donor-Gabe nach I/R konnte die Endothelfunktion im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant verbessert

werden [56, 58]. Beim Menschen konnten positive Effekte von NO auf die linksventrikuläre Funktion nachgewiesen werden [52].

Es zeigten sich kontroverse Ergebnisse hinsichtlich des Effekts des eNOS-KO auf die Infarktgröße. In einigen Studien entwickelten eNOS-KO-Tiere nach I/R größere Infarkte als Wildtypmäuse [64]. In anderen Versuchen wurden verschiedene eNOS-KO-Linien hinsichtlich ihrer Reaktion auf I/R verglichen. Dabei zeigte eine Linie signifikant größere Infarkte als Wildtypen, während die andere Linie signifikant kleinere Infarkte entwickelte. Die Linie mit kleiner Infarktgröße zeigte nach iNOS-Inhibition ebenfalls größere Infarkte als Wildtypen [67]. Dies könnte darauf hinweisen, dass in dieser Mauslinie iNOS durch den eNOS-KO hochreguliert wird und das so entstehende NO für den protektiven Effekt sorgt. In einer Studie an isolierten Herzen im Langendorff Modell konnte ein protektiver Effekt der NOS-Inhibition auf die mechanischen Kräfte nach Ischämie festgestellt werden, sofern die NOS-Inhibitoren vor Start der Ischämie gegeben wurden. Die entsprechenden Versuche wurden mit einer modifizierten Perfusionslösung mit besonders vielen freien Fettsäuren durchgeführt [60]. Auch in-vivo konnte durch L-NAME eine signifikante Reduktion der Infarktgröße erreicht werden [61]. Elrod et. al. konnten zeigen, dass eine Kardiomyozyten-spezifische Überexpression von eNOS zu einer Verringerung der Infarktgrößen mit nur gering verminderter EF führte [73]. In anderen Versuchen wurde ebenfalls die Auswirkung einer eNOS-Überexpression auf die kardiale Funktion nach I/R untersucht. Dabei zeigten sich zwar verringerte Infarktgrößen, aber die Mäuse zeigten trotzdem eine kontraktile Dysfunktion [132]. Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass RBC-eNOS-KO-Mäuse eine größere Infarktgröße nach mI/R sowie eine stärkere linksventrikuläre Dysfunktion als Kontrolltiere aufweisen [126]. Zudem konnte gezeigt werden, dass bei RBC-eNOS-KI-Tieren die Infarktgröße und linksventrikuläre Dysfunktion nach mI/R vermindert waren [126]. Bei EC-eNOS-KO und -KI-Tieren konnten hingegen keine Veränderungen der Infarktgrößen bzw. linksventrikulären Funktion im Vergleich zu ihren Kontrollgruppen nachgewiesen werden [126]. Diese Ergebnisse konnten durch ex-vivo Untersuchungen an isolierten Herzen gestützt werden [126].

Bei Versuchen an isolierten Herzen führte die Reperfusion nach einer Ischämie mit Blut statt mit Pufferlösung zu einer Protektion des Herzens. Da diese Effekte durch L-NAME inhibiert wurden und durch L-Arginin reproduziert werden konnten, sind sie vermutlich zumindest teilweise durch NO vermittelt [86]. Es konnte gezeigt werden, dass Erythrozyten NO kurzzeitig binden und transportieren können [82, 85]. In vorherigen Arbeiten wurde die Rolle der erythrozytären eNOS mittels chimärer Mäuse, die nur eine endotheliale eNOS exprimierten, näher untersucht. Diese Mäuse zeigten im Vergleich zu Wildtypen größere Infarkte und eine verschlechterte linksventrikuläre Funktion 24 Stunden nach I/R. Die

vaskuläre Funktion war hingegen nicht verändert [90]. Im Langendorff Modell konnte durch Arginase-Inhibition eine signifikant verbesserte Erholung nach einer Ischämie beobachtet werden. Wenn zusätzlich eine NOS-Inhibition stattfand, verschwanden diese Effekte. Dies deutet auf einen protektiven Effekt der erythrozytären eNOS während I/R hin [81]. Die hier erhobenen Daten zeigen ebenfalls einen kardioprotektiven Effekt der erythrozytären eNOS während I/R und lassen sich somit gut mit diesen Daten in Einklang bringen.

Im Tierversuch konnte mittels Nitrit-Substitution über die Nahrung eine Reduktion der Infarktgröße um 48% erreicht werden. Durch Substitution von Nitrat konnte ebenfalls eine Senkung der Infarktgröße beobachtet werden. Zudem konnte bei einer Diät ohne Nitrat und Nitrit eine Senkung der Plasmaspiegel von NO und Nitrit sowie eine signifikante Steigerung der Infarktgröße ermittelt werden [133]. Durch eine moderate Substitution von Nitrat konnte bei gesunden, jungen Probanden eine Senkung des Blutdrucks erreicht werden [47].

Bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit ist die Expression und Aktivität der erythrozytären eNOS verringert [82, 91]. Das Maß der Funktionseinschränkung korreliert dabei mit dem Ausmaß der endothelialen Dysfunktion [82]. Die sGC-Expression und -Aktivität sowie ihre Reaktion auf NO-Stimulation wird durch KHK und endotheliale Dysfunktion nicht beeinflusst [91]. Diese Daten deuten auf einen Einfluss der erythrozytären eNOS auf die vaskuläre Funktion unter pathologischen Bedingungen hin.

Die erythrozytäre eNOS hat unter basalen Bedingungen keinen Einfluss auf die kardiale Funktion. [134] Nach I/R zeigen die Tiere jedoch eine verschlechterte kardiale Funktion im Vergleich zur Kontrollgruppe. Somit spielt die erythrozytäre eNOS eine entscheidende Rolle in der Kardioprotektion während I/R [126]. Diese Ergebnisse können durch weitere Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe an RBC-eNOS-KI-Mäusen bestätigt werden. Diese zeigen nach Reinduktion der erythrozytären eNOS keine Unterschiede hinsichtlich der kardialen Funktion nach I/R im Vergleich zu Kontrolltieren mit normaler eNOS-Expression [126].

4.3 Kein Effekt der erythrozytären und endothelialen Arg-1 auf die vaskuläre Funktion

In Bezug auf die durch FMD ermittelte vaskuläre Funktion konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen der erythrozytären Arg-1-KO-Linie und der Kontrollgruppe mit normaler Arg-1-Expression nachgewiesen werden. Die endotheliale Arg-1-KO-Linie zeigte

ebenfalls keine signifikanten Unterschiede in der FMD im Vergleich zur Kontrollgruppe mit normaler Arg-1-Expression.

Das Enzym Arginase kommt in zwei Isoformen vor, der Arg-1 und Arg-2. Beide hydrolysieren L-Arginin zu L-Ornithin und Harnstoff [98, 101]. Dies stellt einen wichtigen Schritt im Harnstoffzyklus dar. Arg-1 ist für den Großteil der Arginase-Aktivität im Körper verantwortlich [98]. L-Ornithin wird in Prolin und Polyamine umgewandelt. Ersteres wird für die Kollagensynthese benötigt und Zweiteres für das Zellwachstum und die Zelldifferenzierung [100]. Durch reaktive Sauerstoffspezies, proinflammatorische Zytokine [105], Hypoxie [81, 106], Lipopolysaccharide, oxidiertes LDL, Glukose, Thrombin und Angiotensin-2 [106] wird die Aktivität der Arginase gesteigert. Dies spielt bei KHK, Arteriosklerose [135] und Herzinfarkten [105] eine Rolle [101, 107]. Bei L-Arginin, dem Substrat von NOS und Arginase handelt es sich um eine bedingt-essenzielle Aminosäure. Das heißt unter Normalbedingungen kann der Bedarf durch eigene Synthese aus L-Citrullin gedeckt werden. Kommt es jedoch zu Entzündungen oder Resorptionsstörungen im Dünndarm muss zusätzlich L-Arginin aus der Nahrung aufgenommen werden [99]. Andere Gruppen konnten nur Arg-2 aber keine Arg-1 in murinen Endothelzellen nachweisen [135]. Dies könnte erklären, warum der KO von Arg-1 in den Endothelzellen nicht zu einer Verbesserung der FMD führte. Eine Verbesserung hätten wir erwartet, da durch den KO der Arginase mehr L-Arginin für eNOS zur Verfügung steht und die Vasodilatation so verstärkt werden könnte. In weiteren Untersuchungen der EC-Arg-1-KO-Mäuse zeigte sich auch ex-vivo kein Einfluss des KO auf die Endothelfunktion. Zudem hatten die Tiere unveränderte Blutdruckwerte und normale Konzentrationen von L-Ornithin, L-Arginin und L-Citrullin. Hingegen wurden signifikante Verminderungen der eNOS-Expression bei unveränderten Nitrit Konzentrationen gemessen werden. [127] Diese Ergebnisse könnten auf eine gemeinsame Regulation, der eNOS- und Arginase-Expression hindeuten, die jedoch näher untersucht werden muss.

Bei Ratten mit Diabetes mellitus Typ 2 konnte durch Arginase-Inhibition eine Normalisierung der koronaren Flussgeschwindigkeit erreicht werden. Bei zusätzlicher NOS-Inhibition verschwand der Effekt wieder [107]. In verschiedenen Tiermodellen der Hypertension konnte eine Hochregulierung der Arginase-Expression in arteriellen Gefäßen nachgewiesen werden [111-113]. Bei hypertensiven Schweinen war zugleich die eNOS-Expression verringert. Die zuvor reduzierte Dilatation als Reaktion auf Adenosin konnte durch Arginase-Inhibition oder L-Arginin Gabe verbessert aber nicht vollständig normalisiert werden [111]. Zudem konnten in der Aorta alter Ratten eine erhöhte Arginase-Expression und -Aktivität sowie verminderte NO-Aktivität und cGMP-Level nachgewiesen werden [114]. Durch verschiedene Arginase-Inhibitoren konnte in isolierten Aortenringen von Ratten eine

Vasodilatation erzeugt werden. Für diesen Effekt war ein intaktes Endothel erforderlich und er konnte durch sGC-Inhibition verhindert werden [114].

Mäuse mit endothelspezifischer Überexpression von Arg-2 zeigten eine endotheliale Dysfunktion. Die endothelvermittelte Vasodilatation war eingeschränkt, aber es gab keine Unterschiede in der Reaktion auf SNP oder Noradrenalin. Die Acetylcholin-vermittelte Vasodilatation verschwand nach L-NAME-Gabe. Die Mäuse zeigten einen erhöhten Blutdruck. Im Plasma zeigten sie überraschenderweise keine signifikante Änderung der Plasma-Level von L-Arginin und seinen Metaboliten [136].

Unter verschiedenen pathologischen Bedingungen, wie Diabetes mellitus Typ 2, KHK und Hypertension, konnte im Tiermodell und beim Menschen eine Verbesserung bzw. Normalisierung der Endothelfunktion durch Inhibition der Arginase erreicht werden [104, 112, 113, 117]. Die positiven Effekte verschwanden nach NOS-Inhibition wieder [104]. In anderen Versuchen konnten die negativen Effekte, die durch Ischämie und anschließende Reperfusion des Arms erzeugt werden, durch Arginase-Inhibition verhindert werden [119]. Auch durch Supplementierung von L-Arginin konnte eine Normalisierung der endothelialen Funktion bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 erzielt werden [118]. Bei übergewichtigen Ratten konnte eine erhöhte Arginase-Aktivität und -Expression bei unveränderter eNOS-Expression beobachtet werden. Zudem zeigten die Tiere eine endotheliale Dysfunktion sowie Hypertonie. Die endotheliale Funktion und der Blutdruck konnten durch L-Arginin und Arginase-Inhibitoren normalisiert werden [137]. Isolierte humane aortale Endothelzellen setzen nach Arginase-Inhibition 20% mehr NO frei als unter normalen Bedingungen [116].

In vielen Studien konnte ein negativer Effekt einer erhöhten Arginase-Aktivität nachgewiesen werden. Zugleich kam es durch Inhibition der Arginase oftmals zu einer Verbesserung vaskulärer Funktionen. Demensprechend hätten wir erwartet, dass ein KO der Arg-1 zu einer Verbesserung der vaskulären Funktion führt. Wie oben bereits erwähnt, konnten andere Gruppen nur Arg-2, jedoch keine Arg-1 in murinen Endothelzellen nachweisen [135]. Dadurch ließe sich erklären, warum der KO der endothelialen Arg-1 nicht zu einer Steigerung der FMD führte. Eine andere mögliche Erklärung für die Beobachtungen könnte eine gemeinsame bzw. sich beeinflussende Regulierung der Expression von eNOS und Arginase sein. Diese Hypothese würde ebenfalls die verminderte eNOS-Expression in EC-eNOS-KO-Mäusen erklären [127].

4.4 Effekt der erythrozytären Arg-1 auf die kardiale Funktion

Hinsichtlich der kardialen Funktion konnte zwischen der erythrozytären Arg-1-KO-Gruppe und der Kontrollgruppe mit normaler Arg-1-Expression weder unter basalen Bedingungen noch nach I/R eine signifikante Veränderung der kardialen Parameter gemessen werden.

Ein vollständiger KO der Arg-1 führte bei Mäusen 10-14 Tage nach der Geburt zum Tod. Dieser trat aufgrund massiv gesteigerter Ammoniak-Level auf. Zudem zeigten die Tiere bis zu vierfach höhere Arginin-Level als Wildtypiere [109]. In anderen Versuchen wurde eine induzierbare globale Arg-1-KO-Linie geschaffen, um zu untersuchen, wie sich ein Fehlen des Enzyms auf den adulten Organismus auswirkt. Die Tiere starben ebenfalls kurz nach Induktion des KOs und lebten maximal 26 Tage ohne Arg-1. Zudem zeigten die Tiere nach Induktion des KOs Gewichtsverluste von bis zu 40%, wurden lethargisch und zeigten Schwierigkeiten zu stehen [110].

Eine Inhibition der Arginase mit Nor-NOHA konnte bei Ratten die Infarktgröße nach I/R um ca. 40% verkleinern. Wenn neben der Arginase-Inhibition auch eine Inhibition der NOS stattfand, konnte dieser Effekt nicht beobachtet werden [120]. Im ischämischen Teil des Herzens nach I/R konnte eine vermehrte Expression der Arg-1 nachgewiesen werden [120]. In anderen Versuchen mit Schweinen konnte die Infarktgröße durch intrakoronare Nor-NOHA-Infusion verkleinert werden. Bei systemischer Infusion der gleichen Menge Nor-NOHA konnte kein protektiver Effekt erreicht werden. Wurde zusätzlich L-NMMA intrakoronar infundiert, war ebenfalls kein protektiver Effekt zu erzielen. Im ischämischen Areal war die Arginase-Aktivität, aber nicht die -Expression, hochreguliert [103]. Es konnte gezeigt werden, dass die Arginase-Aktivität bei I/R durch eine Signalkaskade, an der Peroxynitrit und RhoA/Rho-Kinase beteiligt sind, hochreguliert wird. Entfernte ischämische Präkonditionierung schützt vermutlich unter anderem durch Inhibition dieser Signalkaskade und vermehrte eNOS-Aktivität vor I/R-Schäden [138]. Auch durch systemische Nor-NOHA Infusion nach Beginn der Ischämie, aber vor der Reperfusion, konnte eine signifikante Reduktion der Infarktgröße beobachtet werden. Dieser Versuchsaufbau wurde gewählt, um die klinische Situation des Myokardinfarkts besser nachzustellen. Der Effekt wurde durch vorherige L-NMMA Gabe inhibiert. Auch hier konnte eine Erhöhung der Arginase im ischämischen Myokard nachgewiesen werden. Zudem konnte gezeigt werden, dass der durch Arginase-Inhibition erreichte, protektive Effekt NO-vermittelt ist und eine Signalkaskade mit Aktivierung der PKC ϵ und mitochondrialen ATP-abhängigen Kaliumkanälen in Gang setzt [121]. Durch Arginase-Inhibition konnte eine Verbesserung

der linksventrikulären Funktion bei Mäusen, die unter einer Kardiomyopathie litten, festgestellt werden [116].

Bei Patienten, die einen Myokardinfarkt erlitten haben, konnte eine negative Korrelation zwischen den Arginase-Spiegeln im Plasma und der linksventrikulären Ejektionsfraktion beobachtet werden [108].

Arginase hat einen Einfluss auf die kardiale Kontraktilität [102, 122, 139]. Hierzu gibt es jedoch widersprüchliche Daten. Einerseits konnte eine Steigerung der Kontraktilität nach Arginase-Inhibition beobachtet werden, die durch Inhibition von nNOS verschwand [102]. In den Herzen alter Ratten konnte die altersabhängig verminderte Kontraktilität durch Inhibition der Arginase wiederhergestellt werden [139]. Andererseits konnte aber auch eine Senkung der kardialen Kontraktilität durch Arginase-Inhibition mit gleichzeitig gesteigerter cGMP-Produktion, vermutlich durch NOS-Aktivitätssteigerung, beobachtet werden [122]. Während der Ischämie-Phase könnte eine Hochregulation der Arginase einen protektiven Effekt haben, weil so weniger L-Arginin für NOS zur Verfügung steht. In dieser Phase wäre dies aufgrund der bestehenden Hypoxie ein Vorteil, da NO unter hypoxischen Bedingungen ROS anstelle von NO produziert. Mit Einsetzen der Reperfusion stellt eine erhöhte Arginase-Expression aber vermutlich einen Nachteil dar, da NOS in dieser Phase wieder einen protektiven Effekt durch NO-Produktion ausüben könnte [123]. Yang et. al. konnten im Langendorff-Modell einen protektiven Effekt durch Perfusion mit Erythrozyten und nor-NOHA beobachten. Wurden Erythrozyten von eNOS-KO-Mäusen verwendet, konnte dieser protektive Effekt nicht beobachtet werden. Zudem konnte diese Gruppe zeigen, dass murine Erythrozyten vor allem Arg-1 und keine Arg-2 besitzen [81]. Demnach zeigen die Daten, dass in den Erythrozyten eine Konkurrenz zwischen eNOS und Arg-1 um L-Arginin besteht.

Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass der KO der erythrozytären Arg-1 keinen Einfluss auf die kardiale Funktion nach I/R hat.

5. Schlussfolgerung und Ausblick

Die vorliegende Arbeit untersuchte die Auswirkung gewebespezifischer eNOS- und Arg-1-KO- und -KI-Mäuse auf die kardiale und vaskuläre Funktion. Hierzu wurden gewebespezifische KO- und KI-Mäuse erzeugt. Bei diesen wurde die Auswirkung der genetischen Veränderungen auf die kardiale Funktion mittels Echokardiographie untersucht. Die Funktion des Endothels wurde durch Messung der FMD mittels hochauflösenden Ultraschalls ermittelt.

Bei der Interpretation der Ergebnisse sollte beachtet werden, dass nicht nur die Konkurrenz mit Arginase um das gemeinsame Substrat L-Arginin die zur Verfügung stehende Menge des Substrats beeinflusst. Man geht davon aus, dass es innerhalb der Endothelzellen zu einer Kompartimentierung kommt, sodass nicht die gesamte L-Arginin-Menge für eNOS verfügbar ist [140]. In mehreren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass NOS und Arginase um das gemeinsame Substrat L-Arginin konkurrieren [114, 116].

Die entscheidende Bedeutung von eNOS in der durch FMD gemessenen Endothelfunktion konnte bestätigt werden. Zudem konnte durch die vorliegende Arbeit gezeigt werden, dass hierbei nur die endotheliale, aber nicht die erythrozytäre eNOS von Bedeutung ist. Der KI der endothelialen eNOS führte zu einem Wiedererlangen der FMD. Durch den KO der erythrozytären eNOS konnte hingegen keine Veränderung der FMD beobachtet werden. Weitere Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnten diese Untersuchungen bestätigen. In ex-vivo-Untersuchungen der genannten Mauslinien zeigten sich konkordante Ergebnisse [128].

Es konnten Hinweise darauf gewonnen werden, dass die erythrozytäre eNOS zur Kardioprotektion nach MI/R beiträgt. Dies konnte durch den Nachweis eines größeren Infarkts bei dieser Linie im Vergleich zur Kontrollgruppe bekräftigt werden. [126] In weiteren Versuchen konnte unserer Gruppe zeigen, dass RBC-eNOS-KI eine kleinere Infarktgröße und verminderte linksventrikuläre Dysfunktion nach MI/R entwickeln [126]. Ein KO der endothelialen eNOS zeigte jedoch keinen Einfluss auf Infarktgröße und linksventrikuläre Funktion nach MI/R [126]. Da es nach wie vor Zweifel am Beitrag der erythrozytären eNOS zum NO-Pool im Körper gibt und unklar ist, wie das produzierte NO die Erythrozyten verlassen kann, ohne mit Hämoglobin zu reagieren, muss die Rolle dieser Isoform in Zukunft noch näher erforscht werden.

Erstaunlich ist die Beobachtung, dass der KO der endothelialen Arg-1 tendenziell zu einer Verschlechterung der endothelialen Funktion führt, obwohl in vielen anderen Versuchen

eine Verbesserung der endothelialen Funktion durch Arginase-Inhibition beobachtet werden konnte [104, 111-113, 117, 141]. Allerdings muss dabei beachtet werden, dass die anderen Arbeitsgruppen eine Verbesserung durch Arginase-Inhibition unter Umständen beobachteten, in denen die Arginase-Aktivität hochreguliert ist, da die untersuchten Organismen an Diabetes, Hypertension, KHK oder Fettleibigkeit litten. Unsere Tiere waren jedoch bis auf den KO der Arg-1 in den Endothelzellen vollständig gesund. Bei der Betrachtung der von uns gewonnenen Ergebnisse muss zudem beachtet werden, dass die Gruppengröße recht klein ist. Diese sollte vergrößert werden, um verlässlichere Aussagen über die Rolle der endothelialen Arg-1 auf die vaskuläre Funktion treffen zu können. Ein Grund für unsere Beobachtungen könnte die Tatsache sein, dass in murinen Endothelzellen vor allem Arg-2 exprimiert wird [135]. Da bei den EC-Arg-1-KO-Mäusen zudem eine verminderte eNOS-Expression bei unveränderten Nitrit Konzentrationen gemessen werden konnte, liegt die Vermutung einer gemeinsamen Regulierung der Expression von Arg-1 und eNOS nahe [126].

Es konnte zudem gezeigt werden, dass die erythrozytäre Arg-1 eine untergeordnete Rolle bei der FMD spielt.

Auch hinsichtlich der kardialen Funktion unter basalen und postischämischen Bedingungen zeigte ein KO der RBC-Arg-1 keine Veränderungen. Eine weitere Untersuchung dieser Gruppe wäre interessant, insbesondere aufgrund der vermuteten Konkurrenz von Arginase und eNOS auch in diesem Kompartiment.

In Zukunft wäre es interessant die Langzeitwirkungen der I/R auf die kardiale Funktion der untersuchten, transgenen Mauslinien zu untersuchen. Des Weiteren wäre es aufschlussreich, die Auswirkungen körperlicher Anstrengungen auf die kardiale und vaskuläre Funktion der Mäuse zu untersuchen.

Literaturverzeichnis

1. S Bansilal, J.M.C., V Fuster, *Global burden of CVD: focus on secondary prevention of cardiovascular disease*. International Journal of Cardiology, 2015.
2. Paolo Verdecchia, F.A., Giorgio Gentile, Gianpaolo Reboldi, *More Versus Less Intensive Blood Pressure–Lowering Strategy*. Hypertension, 2016. **68**(3).
3. Julienne K. Kirk, J.A., Maggie Hansell, and E.M. Mann, *A Systematic Review of Hypertension Outcomes and Treatment Strategies in Older Adults*. Archives of Gerontology and Geriatrics, 2017.
4. Arun Kannan, R.J., *Hypertension as a Risk Factor for Heart Failure*. current Hypertension Reports, 2014.
5. M G Campbell, B.C.S., C S Potter, B Carragher, M A Marletta, *Molecular architecture of mammalian nitric oxide synthases*. PNAS, 2014.
6. U Förstermann, W.C.S., *Nitric oxide synthases: regulation and function*. European Heart Journal, 2011.
7. E D Costa, B.A.R., S F Cortes, V S Lemos, *Neuronal Nitric Oxide Synthase in Vascular Physiology and Diseases*. Frontiers in Physiology, 2016.
8. X-P Yang, Y.-H.L., E G Shesely, M Bulagannawar, F Liu, O A Carretero, *Endothelial Nitric Oxide Gene Knockout Mice*. Hypertension, 1999.
9. M Lind, A.H., M Caprnda, D Petrovic, L Rodrigo, P Kruzliak, A Zulli, *Inducible nitric oxide synthase: Good or bad?* Biomedicine and Pharmacotherapy, 2017.
10. B R Crane, A.S.A., D K Ghosh, C Wu, E D Getzoff, D J Stuehr, J A Tainer, *Structure of Nitric Oxide Synthase Oxygenase Dimer with Pterin and Substrate*. Science, 1998.
11. O W Griffith, D.J.S., *Nitric oxide synthases: Properties and Catalytic Mechanism*. Annual Review of Physiology, 1995.
12. R Carnicer, M.J.C., V Sivakumaran, B Casadei, D A Kass, *Nitric Oxide Synthases in Heart Failure*. Antioxidants & Redox Signaling, 2013.
13. L H Lin, O.T., W T Talman, *Identification and localization of cell types that express endothelial and neuronal nitric oxide synthase in the rat nucleus tractus solitarii*. Brain Research, 2007.
14. R M J Palmer, D.S.A., S Moncada, *Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine*. Nature, 1988.

15. R M J Palmer, A.G.F., S Moncada, *Nitric oxide release accounts for biological activity of endothelium-derived relaxing factor*. Nature, 1987.
16. L J Ignarro, G.M.B., K S Wood, R E Byrns, G Chaudhuri, *Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1987.
17. P L Huang, Z.H., H Mashimo, K D Bloch, M A Moskowitz, J A Bevan, M C Fishman, *Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase*. Nature, 1995.
18. H Lin, S.H., U Förstermann, *Vascular oxidative stress, nitric oxide and atherosclerosis*. Atherosclerosis, 2014.
19. Huang, P.L., *Lessons Learned from Nitric Oxide Synthase Knockout Animals*. Seminars in Perinatology, 2000.
20. R D Rudic, E.G.S., N Maeda, O Smithies, S S Segal, W C Sessa, *Direct Evidence for the Importance of Endothelium-derived Nitric Oxide in Vascular Remodeling*. Journal of Clinical Investigations, 1998.
21. A Gödecke, U.K.M.D., U Ding, J Hirchenhain, H-J Bidmon, S Gödecke, J Schrader, *Coronary Hemodynamics in Endothelial NO Synthase Knockout Mice*. Circulation Research, 1997.
22. C Martin, R.S., H Post, P Gres, G Heusch, *Effect of NO synthase inhibition on myocardial metabolism during moderate ischemia*. American Journal of Physiology, 2003.
23. P Liu, C.E.H., R Nagele, P Y-K Wong, *Formation of nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite in myocardial ischemia-reperfusion injury in rats*. American Journal of Physiology - Heart and Circulation Physiology, 1997.
24. L A Ridnour, D.D.T., D Mancardi, M G Espey, K M Miranda, N Paolocci, M Feelisch, J Fukuto and D A Wink, *The chemistry of nitrosative stress induced by nitric oxide and reactive nitrogen oxide species. Putting perspective on stressful biological situations*. Biological Chemistry, 2004.
25. R Erkens, T.S., C M Kramer, L Diederich, M Kelm, M M Cortese-Krott, *Modulation of Local and Systemic Heterocellular Communication by Mechanical Forces: A Role of Endothelial Nitric Oxide Synthase*. Antioxidants & Redox Signaling, 2017.
26. L J Ignarro, R.G.H., K S Wood and P J Kardowitz, *Activation of Purified Soluble Guanylate Cyclase by Endothelium-Derived Relaxing Factor from Intrapulmonary Artery and Vein: Stimulation by Acetylcholine, Bradykinin and Arachidonic Acid*. The Journal of Pharmacology and experimental therapeutics, 1986.
27. P Rajendran, T.R., J Thangavel, Y Nishigaki, D Sakthisekaran, G Sethi, I Nishigaki, *The Vascular Endothelium and Human Diseases*. International Journal of Biological Sciences, 2013

28. D N Atochin, P.L.H., *Endothelial nitric oxide synthase transgenic models of endothelial dysfunction*. Pflügers Arch. , 2010.
29. G Johnson III, P.S.T., A M Lefer, *Cardioprotective effects of authentic nitric oxide in myocardial ischemia with reperfusion*. Critical Care Medicine, 1991.
30. J J L Williams, T.M.P., *Cavin-1: caveolae-dependent signalling and cardiovascular disease*. Biochemical Society Transactions, 2014.
31. O Feron, F.S., J B Michel, T Michel, *The Endothelial Nitric-oxide Synthase-Caveolin Regulatory Cycle*. The Journal of Biological Chemistry, 1997.
32. J Liu, G.G.-C., W C Sessa, *Palmitoylation of Endothelial Nitric Oxide Synthase Is Necessary for Optimal Stimulated Release of Nitric Oxide: Implications for Caveolae Localization*. Biochemistry, 1996.
33. S Dimmeler, I.F., B Fisslthaler, C Hermann, R Busse, A M Zeiher, *Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation*. Letters to Nature, 1999.
34. B Fisslthaler, S.D., C Hermann, R Busse, I Fleming, *Phosphorylation and activation of the endothelial nitric oxide synthase by fluid shear stress*. Acta Physiologia, 1999.
35. P Kleinbongard, A.D., T Lauer, T Rassaf, A Schindler, O Picker, T Scheeren, A Gödecke, J Schrader, R Schulz, G Heusch, G A Schaub, N S Bryan, M Feelisch, M Kelm, *Plasma nitrite reflects constitutive nitric oxide synthase activity in mammals*. Free Radical Biology and Medicine, 2003.
36. D S Celermajer, K.E.S., V M Gooch, D J Spiegelhalter, O I Miller, I D Sullivan, J K Lloyd, J E Deanfield, *Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis*. The Lancet, 1992.
37. M L Bots, J.W., T J Rabelink, E J P de Koning, *Assessment of flow-mediated vasodilatation (FMD) of the brachial artery: effects of technical aspects of the FMD measurement on the FMD response*. European Heart Journal, 2004.
38. A L Moens, I.G., M J Claeys, C J Vrints, *Flow-Mediated Vasodilation - A Diagnostic Instrument, or an Experimental Tool?* Chest, 2005.
39. J Yeboah, J.R.C., F-C Hsu, G L Burke, D M Herrington, *Brachial Flow-Mediated Dilatation Predicts Incident Cardiovascular Events in Older Adults - The Cardiovascular Health Study*. Circulation, 2007.
40. R Joannides, W.E.H., L Linder, V Richard, B El Hassan, C Thuillez, T F Luscher *Nitric Oxide is Responsible for Flow-Dependent Dilatation of Human Peripheral Conduit Arteries In Vivo*. Circulation, 1995.

41. J A Panza, P.R.C., C M Kilcoyne, A A Quyyumi, *Role of Endothelium-Derived Nitric Oxide in the Abnormal Endothelium-Dependent Vascular Relaxation of Patients With Essential Hypertension*. *Circulation*.
42. J Vásquez-Vivar, B.K., P Martásek, N Hogg, B S Siler Masters, H Karoui, P Tordo, K A Pritchard, *Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: The influence of cofactors*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1998.
43. H Li, U.F., *Uncoupling of endothelial NO synthase in atherosclerosis and vascular disease*. *Current Opinion in Pharmacology*, 2013.
44. S Karbach, P.W., A Waisman, T Münzel, A Daiber, *eNOS Uncoupling in Cardiovascular Diseases - the Role of Oxidative Stress and Inflammation*. *Current Pharmaceutical Design*, 2014.
45. T Heitzer, K.K., S Albers, T Meinertz, *Tetrahydrobiopterin improves endothelium-dependent vasodilation by increasing nitric oxide activity in patients with Type II diabetes mellitus*. *Diabetologia*, 2000.
46. U Landmesser, S.D., S Russ Price, L McCann, T Fukai, S M Holland, W E Mitch, and D G Harrison, *Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension*. *The Journal of Clinical Investigation*, 2003. **111**.
47. F J Larsen, B.E., K Sahlin, J O Lundberg, E Weitzberg, *Effects of Dietary Nitrate on Blood Pressure in Healthy Volunteers*. *New England Journal of Medicine*, 2006.
48. C Heiss, T.L., A Dejam, P Kleinbongard, S Hamada, T Rassaf, S Matern, M Feelisch, M Kelm, *Plasma nitroso compounds are decreased in patients with endothelial dysfunction*. *Journal of the American College of Cardiology*, 2006.
49. D D Rees, R.M.J.P., S Moncada, *Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1989.
50. K Hishikawa, T.N., H Suzuki, R Kato und T Saruta, *Role of L-arginine-nitric oxide pathway in hypertension*. *Journal of Hypertension*, 1993.
51. T Imaizumi, Y.H., H Masaki, S Harada, M Momohara, T Tagawa und A Takeshita, *Effects of L-Arginine on Forearm Vessels and Responses to Acetylcholine*. *Hypertension*, 1992.
52. T Rassaf, L.W.P., P Brouzos, T Lauer, M Totzeck, P Kleinbongard, P Gharini, K Andersen, R Schulz, G Heusch, U Mödder, M Kelm, *Positive effects of nitric oxide on left ventricular function in humans*. *European Heart Journal*, 2006.
53. H Drexler, A.M.Z., K Meinzer, H Just, *Correction of endothelial dysfunction in coronary microcirculation of hypercholesterolaemic patients by L-arginine*. *The Lancet*, 1991.
54. S P Schulman, L.C.B., D A Kass, H C Champion, M L Terrin, S Forman, K V Ernst, M D Kelemen, S N Townsend, A Capriotti, J M Hare, G Gerstenblith, *L-Arginine Therapy*

in Acute Myocardial Infarction - The Vascular Interaction With Age in Myocardial Infarction (VINTAGE MI) Randomized Clinical Trial. Journal of the American Medical Association, 2006.

55. R Pabla, M.J.C., *Effects of NO Modulation on Cardiac Arrhythmias in the Rat Isolated Heart.* Circulation Research, 1995.

56. R Pabla, A.J.B., D M Flynn, D B Salzberg, D J Lefer, *Intracoronary nitric oxide improves postischemic coronary blood flow and myocardial contractile function.* American Journal of Physiology, 1995.

57. A S Weyrich, X.-L.M., A M Lefer, *The Role of L-Arginine in Ameliorating Reperfusion Injury After Myocardial Ischemia in the Cat.* Circulation, 1992.

58. K Nakanishi, J.V.-J., D J Lefer, Z Zhao, W C Fowler III, D S McGee, W E Johnston, *Intracoronary L-arginine during reperfusion improves endothelial function and reduces infarct size.* American Journal of Physiology, 1992.

59. E Rossitch Jr., E.A.I., P McL Black, und J P Cooke, *L-Arginine Normalizes Endothelial Function in Cerebral Vessels from Hypercholesterolemic Rabbits.* Journal of Clinical Investigations, 1991.

60. R Schulz, R.W., *Inhibition of nitric oxide synthesis protects the isolated working rabbit heart from ischaemia-reperfusion injury.* Cardiovascular Research, 1995.

61. V C Patel, D.M.Y., K J Singh, G H Neild, R G Woolfson, *Inhibition of nitric oxide limits infarct size in the in situ rabbit heart.* Biochemical and Biophysical Research Communications, 1993.

62. R Erkens, T.S., T R Sutton, B O Fernandez, M Mikus-Lelinska, F Barbarino, U Flögel, M Kelm, M Feelisch, M M Cortese-Krott, *Nrf2 Deficiency Unmasks the Significance of Nitric Oxide Synthase Activity for Cardioprotection.* Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2018.

63. E G Shesely, N.M., H-S Kim, K M Desai, J H Krege, V E Laubach, P A Sherman, W C Sessa, O Smithies, *Elevated blood pressures in mice lacking endothelial nitric oxide synthase.* Proceedings of the National Academy of Sciences, 1996.

64. S P Jones, W.G.G., A J Palazzo, D N Granger, M B Grisham, D Jourd'Heuil, P L Huang, D J Leffer, *Myocardial ischemia-reperfusion injury is exacerbated in absence of endothelial cell nitric oxide synthase.* American Journal of Physiology, 1999.

65. S Kulandavelu, D.Q., S L Adamson, *Cardiovascular Function in Mice During Normal Pregnancy and in the Absence of Endothelial NO Synthase.* Hypertension, 2006.

66. R Gyurko, P.K., M C Fishman, P L Huang, *Modulation of mouse cardiac function in vivo by eNOS and ANP.* American Journal of Physiology - Heart and Circulation Physiology, 2000.

67. B R Sharp, S.P.J., D M Rimmer, D J Lefer, *Differential response to myocardial reperfusion injury in eNOS-deficient mice*. American Journal of Physiology, 2002.
68. M Scherrer-Crosbie, R.U., K D Bloch, H Nakajima, B Nasser, H T Aretz, M L Lindsey, A-C Vançon, P L Huang, R T Lee, W M Zapol, M H Picard, *Endothelial Nitric Oxide Synthase Limits Left Ventricular Remodeling After Myocardial Infarction in Mice*. Circulation 2001.
69. Y-H Liu, J.X., X-P Yang, F Yang, E Shesely, O A Carretero, *Effect of ACE Inhibitors and Angiotensin II Type 1 Receptor Antagonists on Endothelial NO Synthase Knockout Mice With Heart Failure*. Hypertension, 2002.
70. T Rassaf, M.T., U B Hendgen-Cotta, S Shiva, G Heusch, M Kelm, *Circulating nitrite contributes to cardioprotection by remote ischemic preconditioning*. Circulation Research, 2014.
71. F Ichinose, K.D.B., J C Wu, R Hataishi, H T Aretz, M H Picard, M Scherrer-Crosbie, *Pressure overload-induced LV hypertrophy and dysfunction in mice are exacerbated by congenital NOS3 deficiency*. American Journal of Physiology - Heart and Circulation Physiology, 2003.
72. C Martin, R.S., H Post, K Boengler, M Kelm, P Kleinbongard, P Gres, A Skyschally, I Konietzka, G Heusch, *Microdialysis-based analysis of interstitial NO in situ: NO synthase-independent NO formation during myocardial ischemia*. Cardiovascular Research, 2007.
73. J W Elrod, J.J.M.G., N S Bryan, W Langston, J F Szot, and S.J. H Gebregzlabher, M Feelisch, D J Lefer, *Cardiomyocyte-Specific Overexpression of NO Synthase-3 Protects Against Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury*. arteriosclerosis thrombosis and vascular biology, 2006.
74. Y Ohashi, S.K., K-i Hirata, T Yamashita, T Ishida, N Inoue, T Sakoda, H Kurihara, Y Yazaki, M Yokoyama, *Hypotension and Reduced Nitric Oxide-elicited Vasorelaxation in Transgenic Mice Overexpressing Endothelial Nitric Oxide Synthase*. Journal of Clinical Investigations, 1998.
75. S Janssens, P.P., 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, K D Bloch, *Cardiomyocyte-Specific Overexpression of Nitric Oxide Synthase 3 Improves Left Ventricular Performance and Reduces Compensatory Hypertrophy After Myocardial Infarction*. Circulation Research, 2003.
76. S Kawashima, T.Y., M Ozaki, Y Ohashi, H Azumi, N Inoue, K-I Hirata, Y Hayashi, H Itoh, M Yokoyama, *Endothelial NO Synthase Overexpression Inhibits Lesion Formation in Mouse Model of Vascular Remodeling*. Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology, 2001.
77. R van Haperen, M.d.W., E van Deel, B Mees, M Kutryk, T van Aken, J Hamming, F Grosveld, D J Duncker, R de Crom, *Reduction of Blood Pressure, Plasma Cholesterol and Atherosclerosis by Elevated Endothelial Nitric Oxide*. Journal of Biological Chemistry, 2002.

78. M Ozaki, S.K., T Yamashita, T Hirase, M Namiki, N Inoue, K-i Hirata, H Yasui, and Y.Y. H Sakurai, M Masada, M Yokoyama, *Overexpression of endothelial nitric oxide synthase accelerates atherosclerotic lesion formation in apoE-deficient mice*. Journal of Clinical Investigation, 2002.
79. T Suvorava, G.K., *Reactive oxygen species as cardiovascular mediators: Lessons from endothelial-specific protein overexpression mouse models*. Biochimica et Biophysica Acta, 2009.
80. Kleinbongard, P., et al., *Red blood cells express a functional endothelial nitric oxide synthase*. Blood, 2006. **107**(7): p. 2943-2951.
81. J Yang, A.T.G., P-O Sjöquist, J O Lundberg, J Pernow, *Arginase regulates red blood cell nitric oxide synthase and export of cardioprotective nitric oxide bioactivity*. PNAS, 2013.
82. M M Cortese-Krott, A.R.-M., R Sansone, G G C Kuhnle, S Thasian-Sivarajah, T Krenz, P Horn, C Krisp, D Wolters, C Heiß, K-D Kröncke, Neil Hogg, M Feelisch, M Kelm, *Human red blood cells at work: identification and visualization of erythrocytic eNOS activity in health and disease*. Blood, 2012.
83. A J Webb, A.B.M., K S Rathod, W L Chu, S Qureshi, M J Lovell, F M J Lecomte, D Perrett, C Raimondo, E Khoshbin, Z Ahmed, R Uppal, N Benjamin, A J Hobbs, A Ahluwalia, *Mechanisms underlying erythrocyte and endothelial nitrite reduction to NO in hypoxia: role for Xanthine Oxidoreductase and eNOS*. Circulation Research, 2010.
84. J M May, Z.-C.Q., L Xia, C E Cobb, *Nitrite uptake and metabolism and oxidant stress in human erythrocytes*. American Journal of Physiology, 2000.
85. K Cosby, K.S.P., 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 III, M T Gladwin, *Nitrite reduction to nitric oxide by deoxyhemoglobin vasodilates human circulation*. Nature Medicine, 2003.
86. B C Yang, W.W.N., J L Mehta, *Cardioprotective Effects of Red Blood Cells on Ischemia and Reperfusion Injury in Isolated Rat Heart: Release of Nitric Oxide as a Potential Mechanism*. Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics, 1996.
87. B C Jubelin, J.L.G., *Erythrocytes May Synthesize Own Nitric Oxide*. American Journal of Hypertension, 1996.
88. J O Lundberg, E.W., *Nitrate and nitrite in biology, nutrition and therapeutics*. Nature chemical biology, 2014.
89. K C Wood, M.M.C.-K., J C Kovacic, A Noguchi, V B Liu, X Wang, N Raghavachari, M Boehm, G J Kato, M Kelm, M T Gladwin, *Circulating Blood eNOS Contributes to the Regulation of Systemic Blood Pressure and Nitrite Homeostasis*. Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology, 2013.
90. M W Merx, S.G., A M van de Sandt, M M Cortese-Krott, J Ohlig, M Stern, T Rassaf, A Gödecke, M T Gladwin, M Kelm, *Depletion of circulating blood NOS3 increases*

severity of myocardial infarction and left ventricular dysfunction. Basic Research in Cardiology, 2013.

91. M M Cortese-Krott, E.M., C M Kramer, W Lückstädt, J Yang, G Wolff, C Panknin, T Bracht, B Sitek, J Pernow, J-P Stasch, M Feelisch, D Koesling, M Kelm, *Identification of a soluble guanylate cyclase in RBCs: preserved activity in patients with coronary artery disease*. Redox Biology, 2017.
92. D Mihov, J.V., M Gassmann, A Bogdanova, *Erythropoietin activates nitric oxide synthase in murine erythrocytes*. American Journal of Cell Physiology, 2009.
93. F Suhr, J.B., R Müller, H Behrens, W Bloch, M Grau, *Moderate Exercise Promotes Human RBC-NOS Activity, NO Production and Deformability through Akt Kinase Pathway*. PLOS ONE, 2012.
94. A Belanger, C.K., T Kanas, M T Gladwin, D B Kim-Shapiro, *Effects of nitric oxide and its congeners on sickle red blood cell deformability*. Transfusion, 2016.
95. L Diederich, T.S., R Sansone, T C Stevenson Keller IV, F. Barbarino, T. R. Sutton, C. M. Kramer, W. Lückstädt, B. E. Isakson, H. Gohlke, M. Feelisch, M. Kelm, M. M. Cortese-Krott, *On the Effects of Reactive Oxygen Species and Nitric Oxide on Red Blood Cell Deformability*. Frontiers in Physiology, 2018.
96. M T Gladwin, A.N.S., D B Kim-Shapiro, R P Patel, N Hogg, S Shiva, R O Cannon III, M Kelm, D A Wink, M G Espey, E H Oldfield, R M Pluta, B A Freeman, J R Lancaster, M Feelisch, J O Lundberg, *The emerging biology of the nitrite anion*. Nature chemical biology, 2006.
97. H Li, C.J.M., J R Hawker Jr., T E Haynes, D Kepka-Lenhart, S K Mistry, S M Morris Jr., G Wu, *Regulatory role of arginase I and II in nitric oxide, polyamine, and proline syntheses in endothelial cells*. American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism, 2000.
98. W Durante, F.K.J., R A Johnson, *Arginase: a critical regulator of nitric oxide synthesis and vascular function*. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology, 2007.
99. Jr, S.M.M., *Recent advances in arginine metabolism: roles and regulation of the arginases*. British Journal of Pharmacology, 2009.
100. R B Caldwell, H.A.T., S Priya Narayananb, R W Caldwellb., *Arginase: an old enzyme with new tricks*. Trends in Pharmacological Sciences, 2015: p. 26.
101. Y Tratsiakovich, J.Y., A T Gonon, P-O Sjöquist , J Pernow, *Arginase as a target for treatment of myocardial ischemia-reperfusion injury*. European Journal of Pharmacology, 2013.
102. J Stepan, S.R., K H Schuleri, C Gregg, R K Hasan, A R White, L J Bugaj, M Khan, L Santhanam, D Nyhan, A A Shoukas, J M Hare, D E Berkowitz, *Arginase modulates myocardial contractility by a nitric oxide synthase 1-dependent mechanism*. PNAS, 2006.

103. A T Gonon, C.J., A Katz, H Westerblad, A Shemyakin, P- O Sjöquist, J O Lundberg, J Pernow, *Local Arginase Inhibition during Early Reperfusion Mediates Cardioprotection via Increased Nitric Oxide Production*. PLOS ONE, 2012.
104. A Shemyakin, O.K., A Rafnsson, F Böhm, P Svenarud, M Settergren, C Jung, J Pernow, *Arginase Inhibition Improves Endothelial Function in Patients With Coronary Artery Disease and Type 2 Diabetes Mellitus*. Circulation, 2012.
105. X Goa, X.X., S Belmadani, Y Park, Z Tang, A M Feldman, W M Chilian, C Zhang, *TNF- Contributes to Endothelial Dysfunction by Upregulating Arginase in Ischemia/Reperfusion Injury*. Vascular Biology, 2007.
106. J Pernow, C.J., *Arginase as a potential target in the treatment of cardiovascular disease: reversal of arginine steal?* Cardiovascular Research, 2013.
107. J Grönros, C.J., J O Lundberg, R Cerrato, C-G Östenson, J Pernow, *Arginase inhibition restores in vivo coronary microvascular function in type 2 diabetic rats*. American Journal of Physiology - Heart and Circulation Physiology, 2011.
108. S Bekpinar, F.G., Y Unlucerci, S Develi, A Yilmaz, *Serum levels of arginase I are associated with left ventricular function after myocardial infarction*. Clinical Biochemistry, 2011.
109. R K Iyer, P.K.Y., R M Kern, N Rozengurt, R Tsoa, W E O'Brien, H Yu, W W Grody, S D Cederbaum, *Mouse Model for Human Arginase Deficiency*. Molecular and Cellular Biology, 2002.
110. J Kasten, C.H., R Bhargava, H Park, D Tai, J A Byrne, B Marescau, P P De Deyn, L Schlichting, W W Grody, S D Cederbaum, G S Lipshutz, *Lethal phenotype in conditional late-onset arginase 1 deficiency in the mouse*. Molecular Genetics and Metabolism, 2013.
111. C Zhang, T.W.H., W Wang, M W Miller, T W Fossum, M M Mc Donald, J D Humphrey, L Kuo, *Upregulation of Vascular Arginase in Hypertension Decreases Nitric Oxide-Mediated Dilatation of Coronary Arterioles*. Hypertension, 2004.
112. F K Johnson, R.A.J., K J Peyton, W Durante, *Arginase inhibition restores arteriolar endothelial function in Dahl rats with salt-induced hypertension*. American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, 2004.
113. C Demougeot, A.P.-T., C Marie, A Berthelot, *Arginase inhibition reduces endothelial dysfunction and blood pressure rising in spontaneously hypertensive rats*. Journal of Hypertension, 2005.
114. D E Berkowitz, R.W., D Li, K M Minhas, A Cernetich, S Kim, S Burke, A A Shoukas, D Nyhan, H C Champion, J M Hare, *Arginase Reciprocally Regulates Nitric Oxide Synthase Activity and Contributes to Endothelial Dysfunction in Aging Blood Vessels*. Circulation, 2003.
115. T W Hein, C.Z., W Wang, C-I Chang, N Thengchaisri, L Kuo, *Ischemia-reperfusion selectively impairs nitric oxide-mediated dilatation in coronary arterioles: counteracting role of arginase*. The FASEB Journal, 2003.

116. T Toya, D.H., Y Shiraishi, T Kujirakoa, T Adachi, *Arginase inhibition augments nitric oxide production and facilitates left ventricular systolic function in doxorubicin-induced cardiomyopathy in mice*. *Physiological Reports*, 2014.
117. O Kövamees, A.S., A Checa, C E Wheelock, J O Lundberg, C-G Östenson, J Pernow, *Arginase Inhibition Improves Microvascular Endothelial Function in Patients With Type 2 Diabetes Mellitus*. *The Journal of clinical Endocrinology and Metabolism*, 2016.
118. T Beleznai, A.F., D Spielvogel, S L Lansman, Z Bagi, *Arginase 1 contributes to diminished coronary arteriolar dilation in patients with diabetes*. *American Journal of Physiology - Heart and Circulation Physiology*, 2010.
119. O Kövamees, A.S., J Pernow, *Effect of Arginase Inhibition on Ischemia-Reperfusion Injury in Patients with Coronary Artery Disease with and without Diabetes Mellitus*. *PLOS ONE*, 2014.
120. C Jung, A.T.G., P-O Sjöquist, J O Lungberg, J Pernow, *Arginase inhibition mediates cardioprotection during ischaemia–reperfusion*. *Cardiovascular Research*, 2009.
121. Y Tratsiakovich, A.T.G., A Krook, J Yang, A Shemyakin, P-O Sjöquist, J Pernow, *Arginase inhibition reduces infarct size via nitric oxide, protein kinase C epsilon and mitochondrial ATP-dependen tK⁺ channels*. *European Journal of Pharmacology*, 2013.
122. A S Jung, H.K., R Wilson, S R Houser, K B Margulies, *Modulation of contractility by myocyte-derived arginase in normal and hypertrophied feline myocardium*. *American Journal of Physiology - Heart and Circulation Physiology*, 2005.
123. K-D Schlüter, R.S., R Schreckenber, *Arginase induction and activation during ischemia and reperfusion and functional consequences for the heart*. *Frontiers in Physiology*, 2015.
124. Wood, K.C., et al., *Circulating blood endothelial nitric oxide synthase contributes to the regulation of systemic blood pressure and nitrite homeostasis*. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*, 2013. **33**: p. 1861-1871.
125. T Suvorava, M.M.C.-K., *Exercise-Induced Cardioprotection via eNOS: a Putative Role of Red Blood Cell Signaling*. *Current Medicinal Chemistry*, 2018.
126. M. M. Cortese-Krott, T.S., F. Leo, S. K. Heuser, A. LoBlue, J. Li, S. Becher, R. Schneckmann, T. Srivastava, R. Erkens, G. Wolff, J. P. Schmitt, M. Grandoch, J. O. Lundberg, J. Pernow, B. E. Isakson, E. Weitzberg, M. Kelm, *Red blood cell eNOS is cardioprotective in acute myocardial infarction*. *Redox Biology*, 2022.
127. S. K. Heuser, A.L., J. Li, Z. Zhuge, F. Leo, T. Suvorava, A. Olsson, R. Schneckmann, D. D. Guimaraes Braga, T. Srivastava, L. Montero, O. J. Schmitz, J. P. Schmitt, M. Grandoch, E. Weitzberg, J. O. Lundberg, J. Pernow, M. Kelm, M. Carlström, M. M. Cortese-Krott, *Downregulation of eNOS and preserved endothelial function in endothelial-specific arginase 1-deficient mice*. *Nitric Oxide*, 2022.
128. F Leo, T.S., S K Heuser, J Li, A LoBue, F Barbarino, E Piragine, R Schneckmann, B Hutzler, M E Good , B O Fernandez, L Vornholz, S Rogers, A Doctor, M Grandoch, J

Stegbauer, E Weitzberg, M Feelisch, J O Lundberg, B E Isakson, M Kelm, M M Cortese-Krott, *Red blood cell and endothelial eNOS independently regulate circulating nitric oxide metabolites and blood pressure*. Circulation, 2021.

129. D Schuler, R.S., T Freudenberg, A Rodriguez-Mateos, G Weber, T Y Momma, C Goy, J Altschmied, J Haendeler, J W Fischer, M Kelm, C Heiss, *Measurement of Endothelium-Dependent Vasodilation in Mice—Brief Report*. Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology, 2014.

130. M Charakida, S.M., T F Lüscher, J J P Kastelein, J E Deanfield, *Assessment of atherosclerosis: the role of flow-mediated dilatation*. European Heart Journal, 2010.

131. D Sun, A.H., C J Smith, C J stackpole, J A Connetta, E G Shesely, A Koller, G Kaley, *Enhanced Release of Prostaglandins Contributes to Flow-Induced Arteriolar Dilatation in eNOS Knockout Mice*. Circulation Research, 1999.

132. S P Jones, J.J.M.G., A K Kakkar, P D Ware, R H Turnage, M Hicks, R van Haperen, R de Crom, S Kawashima, M Yokoyama, D J Lefer, *Endothelial nitric oxide synthase overexpression attenuates myocardial reperfusion injury*. American Journal of Physiology - Heart and Circulation Physiology, 2003.

133. N S Bryan, J.W.C., J W Elrod, S Gundewar, S Y Ji, D J Lefer, *Dietary nitrite supplementation protects against myocardial ischemia-reperfusion injury*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2007.

134. Leo Francesca, et al., *Red Blood Cell and Endothelial eNOS Independently Regulate Circulating Nitric Oxide Metabolites and Blood Pressure* 2021: Circulation.

135. X-F Ming, C.B., H Viswambharan, B R Kwak, F Mach, L Mazzolai, D Hayoz, J Ruffieux, S Rusconi, J-P Montani, Z Yang, *Thrombin Stimulates Human Endothelial Arginase Enzymatic Activity via RhoA/ROCK Pathway - Implications for Atherosclerotic Endothelial Dysfunction*. Circulation, 2004.

136. B L Vaisman, K.L.A., S M L Khong, K C Wood, Y L Moore, Y Fu, D M Kepka-Lenhart, S M Morris Jr, A T Remaley, J P F Chin-Dusting, *Selective Endothelial Overexpression of Arginase II Induces Endothelial Dysfunction and Hypertension and Enhances Atherosclerosis in Mice*. PLOS ONE, 2012.

137. F K Johnson, K.J.P., X-M Liu, M A Azam, A R Shebib, R A Johson, W Durante, *Arginase promotes endothelial dysfunction and hypertension in obese rats*. Obesity, 2015.

138. A Kiss, Y.T., A T Gonon, O Fedotovskaya, J T Lanner, D C Andersson, J Yang, J Pernow, *The Role of Arginase and Rho Kinase in Cardioprotection from Remote Ischemic Preconditioning in Non-Diabetic and Diabetic Rat In Vivo*. PLOS ONE, 2014.

139. M Khan, J.S., K Schuleri, S Ryoo, E Tuday, L Bugaj, L Santhanam, T Berkowitz, D Nyhan, A A Shoukas, D E Berkowitz, *Upregulation of arginase-II contributes to decreased age-related myocardial contractile reserve*. European Journal of Applied Physiology, 2011.

140. H Post, B.P., *Arginase: a modulator of myocardial function*. American Journal of Physiology - Heart and Circulation Physiology, 2006.

141. J H Chung, J.M., Y S Lee, H-K Chung, S-M Lee, M-J Shin, *Arginase inhibition restores endothelial function in diet-induced obesity*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2014.

Danksagung und Anmerkungen

Für die Erstellung der Abbildungen wurden Bilder von <https://smart.servier.com> verwendet.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Miriam M. Cortese-Krott für die Chance meine Doktorarbeit in ihrer Arbeitsgruppe anzufertigen und für das zur Verfügung stellen des spannenden Themas der Arbeit. Ich bedanke mich für die gute Leitung durch die Thematik. Bei Prof. Dr. Malte Kelm möchte ich mich für das Bereitstellen der Räumlichkeiten bedanken. Auch bei meinem zweiten Korrektor PD Dr. Dr. Andre Heinen möchte ich mich für die freundliche Übernahme der Zweitbetreuung und die konstruktiven Anregungen bedanken.

Zudem möchte ich mich ganz herzlich bei meiner Betreuerin Dr. Tatsiana Suvorava bedanken, die mir in allen Situationen hilfsbereit zur Seite stand und immer ein offenes Ohr für meine Probleme hatte. Ich bedanke mich für die vielen Stunden, die sie in meine Ausbildung investiert hat. Zudem möchte ich mich bei ihr herzlichst für die Übernahme einiger Versuche bedanken.

An dieser Stelle möchte ich anmerken, dass die I/R-Operationen von Stefanie Becher durchgeführt wurden. Einige Ultraschalluntersuchungen der erythrozytären eNOS-KO und erythrozytären Arg-1-KO sowie der endothelialen eNOS-KI-Mäuse wurden von meiner Betreuerin Dr. Tatsiana Suvorava durchgeführt. Die anschließende Auswertung der erhobenen Daten erfolgte durch mich. Auch bei Dr. Patricia Wischmann möchte ich mich für die Hilfe bei einigen Untersuchungen bedanken.

Folgende Aufnahmen erfolgten durch Francesca Leo: vier FMD Untersuchungen der EC-eNOS-KI Gruppe. Zudem führte sie bei den Mäusen der EC-eNOS-KI Gruppe zwei echokardiographische Untersuchungen und aus der Gruppe der LoxP-INV-eNOS Gruppe eine echokardiographische Untersuchung durch.

Außerdem möchte ich mich bei meinen Eltern Brigitte und Heinz-Gerd Hocks für die moralische und finanzielle Unterstützung während des Studiums bedanken.