

Aus der  
Medizinischen Klinik und Poliklinik  
der Heinrich – Heine – Universität Düsseldorf  
Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie

Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. B. E. Strauer

**Erythrozytäre eNOS:  
NO-Synthese und Aktivität**

Dissertation

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

vorgelegt von

Miriam Münch

2008

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

Gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Bernd Nürnberg  
Dekan

Referent: Univ.-Prof. Dr. med. Malte Kelm  
Korreferent: Univ.-Prof. Dr. med. Karsten Schrör

„Alles Sollen gründet im Sein.“

Josef Pieper

Meinen Eltern  
in Liebe und Dankbarkeit gewidmet

### Liste der Abkürzungen:

Abb.	Abbildung
AE1	Anionenaustauscher 1 (anion exchange 1, engl.)
AMP	Adenosin-Monophosphat
AMPK	AMP-aktivierte Proteinkinasen
BH <sub>4</sub>	Tetrahydrobiopterin
BS <sub>3</sub>	Bis[Sulfosuccinimidyl]suberate
Ca <sup>++</sup>	Calcium
CaCl <sub>2</sub>	Calcium-Chlorid
CaM	Calmodulin
CaMKII	Calmodulin abhängige Kinase II
cAMP	zyklisches Adenosin-Monophosphat
Ci	Curie
CLD	Chemilumineszenzdetektion
cpm	Counts Per Minute
Cys	Cystein
DIDS	Disodium 4,4'-diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonate
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FAD	Flavin-Adenosin-Dinukleotid
Fe	Eisen
FIA	Fluss-Injektions-Analyse
FMN	Flavin-Mononukleotid
G6P	Glukose-6-Phosphat
G6PDH	Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase
GSNO	S-Nitrosoglutathion
HCl	Salzsäure
Hepes	4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinethansulfonat
HKT	Hämatokrit
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
IE	Internationale Einheit
IP <sub>3</sub>	Inositol-Triphosphat

L-NMMA	N <sub>G</sub> -Methyl-L-Arginin
L-NNA	N $\omega$ -Nitro-L-Arginin
MetHb	Methämoglobin
min	Minute
NADP <sup>+</sup>	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotidphosphat
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (reduziert)
NO $\cdot$	Stickstoffmonoxid*
NO <sup>-</sup>	Nitrosylanion
NO <sup>+</sup>	Nitrosoniumion
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Nitrit
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Nitrat
NOS	NO-Synthase
cNOS	konstitutive NO-Synthase (eNOS, nNOS)
eNOS	endotheliale NO-Synthase
iNOS	induzierbare NO-Synthase
nNOS	neuronale NOS
P-eNOS	Phosphorylierte eNOS
NR	Nitrat-Reduktase
NR-FIA	Nitratanalyse mittels enzymatischer Reduktion über Nitrat Reduktase zum Nitrit mit anschließender Bestimmung von Nitrit durch die Fluss-Injektions-Analyse
OxyHb	Oxyhämoglobin
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Superoxidanion
O <sub>3</sub>	Ozon
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung (phosphate buffered saline, engl.)
PI <sub>3</sub> -Kinase	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PKG	Proteinkinase G
RNO	gebundenes NO
RSNO	Nitrosothiol

RNNO	Nitrosoamin
RT-PCR	reverse transcriptase polymerase chain reaction
SE	Standardfehler (Standarderror)
Ser	Serin
Tab.	Tabelle
TBS	Tris-Bor-Säure
THF	Tetrahydrofuran
Thr	Threonin
U	Units

(\* Im folgenden Text ohne Kennzeichnung des freien Elektrons)

## Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>10</b>
1.1	Funktion und Synthese von Stickstoffmonoxid im zirkulierenden Blut und Gefäßsystem .....	10
1.2	Metabolismus von Stickstoffmonoxid .....	13
1.3	NO-Metabolismus im Plasma .....	14
1.4	NO-Metabolismus im Erythrozyten .....	15
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>19</b>
2.1	Probenaufarbeitung .....	19
2.1.1	Blutentnahme.....	19
2.1.2	Aufarbeitung der Blutproben zur Erythrozytenseparation .....	20
2.1.3	Aufarbeitung der Blutproben zur Separation von Erythrozytenmembranen.....	20
2.1.4	Aufarbeitung der Proben zur Vollblutinkubation.....	21
2.1.5	Reduktion der endogenen L-Arginin-Konzentration .....	21
2.1.6	Protokoll zur Untersuchung von Regulationsfaktoren der erythrozytären NOS .....	22
2.1.7	Probenaufarbeitung zur Nitrit- und Nitratmessung mittels FIA .....	23
2.1.8	Probenaufarbeitung zur plasmatischen Nitritbestimmung mittels CLD .....	23
2.1.9	Probenaufarbeitung zur Vollblutnitritbestimmung mittels CLD.....	23
2.1.10	Probenaufarbeitung für den Citrullin-Assay .....	25
2.2	Immunzytochemische Untersuchungen der erythrozytären NOS .....	26
2.3	Methoden zur Bestimmung von Nitrit.....	27
2.3.1	Fluss-Injektions-Analyse .....	27
2.3.2	Reduktive-Chemilumineszenzdetektion .....	29
2.4	Methode zur Bestimmung von Nitrat.....	31
2.4.1	Nitratreduktase-FIA (NR-FIA) .....	31
2.5	Methoden zur direkten Bestimmung von Stickstoffmonoxid.....	32

2.5.1	Der Oxyhämoglobin-Assay .....	32
2.5.2	Nicht-reduktive-Chemilumineszenzdetektion .....	33
2.6	Methode zur Bestimmung von L-Arginin .....	34
2.6.1	Argininbestimmung im Plasma .....	34
2.7	Mathematisch-statistische Tests .....	35
2.7.1	Berechnung der NO-Syntheserate der Erythrozyten.....	36
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>37</b>
3.1	NOx Metabolite .....	37
3.2	Charakterisierung der erythrozytären NOS-Aktivität .....	39
3.2.1	Substratumsatz .....	39
3.2.2	Einfluss der endogenen Substratkonzentration .....	41
3.2.3	Abhängigkeit der erythrozytären NOS-Aktivität von der Substratkonzentration .....	43
3.3	Regulationsmechanismen der erythrozytären NOS.....	44
3.3.1	Aktivitätsabhängigkeit von Ca <sup>++</sup> /CaM.....	44
3.3.2	Aktivität der erythrozytären NOS in Abhängigkeit von der Phosphorylierung an Serin <sup>1177</sup> .....	45
3.3.2.1	Biochemischer Nachweis einer Phosphorylierung .....	45
3.3.2.2	Immunzytochemischer Nachweis einer Phosphorylierung.....	46
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>47</b>
4.1	Quantitative Abschätzung der NO-Synthese im Erythrozyten.....	48
4.2	Regulationsfaktoren der erythrozytären NOS .....	50
4.3	Physiologische Relevanz und Ausblick.....	56
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>60</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>61</b>
<b>7.</b>	<b>Veröffentlichungen</b> .....	<b>71</b>
<b>8.</b>	<b>Danksagung</b> .....	<b>72</b>
<b>9.</b>	<b>Lebenslauf</b> .....	<b>73</b>

## **1. Einleitung**

Stickstoffmonoxid (NO) ist ein zentraler Mediator in vielen unterschiedlichen biologischen Prozessen. Als intrazellulärer und extrazellulärer Botenstoff ist NO nicht nur an physiologischen Regulationsmechanismen im Herzkreislaufsystem, sondern auch im Zentralnervensystem, im peripheren Nervensystem und im Immunsystem beteiligt<sup>1,2</sup>. Im zentralen Nervensystem dient NO als Neurotransmitter und ist u.a. an der Vermittlung von Schmerzreizen beteiligt. Im peripheren Nervensystem wirkt NO an der Signalübertragung in Teilen des Gastrointestinaltraktes, der Atemwege und des Urogenitaltraktes mit. NO ist an der Modulation der spezifischen und unspezifischen Immunabwehr beteiligt und spielt eine Rolle in der Pathophysiologie der Sepsis<sup>3-6</sup>. Viele dieser Vorgänge werden durch Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase und einem daraus resultierenden Anstieg des zyklischen Guanosinmonophosphates in der Zielzelle vermittelt.

Im folgenden Kapitel wird zunächst auf die Synthese von NO und deren Regulation eingegangen, bevor die Reaktionen des Radikals in Abhängigkeit vom umgebenden Medium beschrieben werden. Die bisher bekannten Möglichkeiten der Speicherung und des Transportes von NO wie auch der endogenen hämatogenen NO-Bildung werden anschließend veranschaulicht.

### **1.1 Funktion und Synthese von Stickstoffmonoxid im zirkulierenden Blut und Gefäßsystem**

Durch die kontinuierliche Freisetzung aus der Gefäßwand hat NO eine direkte Funktion in der Aufrechterhaltung der vaskulären Homöostase<sup>7,8</sup>. NO moduliert im vaskulären System verschiedene Funktionen in der luminalen und abluminalen Gefäßwand. Es senkt den Gefäßtonus in den Leitungsarterien vom muskulären Typ und in den präkapillären Widerstandsgefäßen und über diesen Mechanismus den Blutdruck. NO wirkt am Gefäßsystem anti-arteriosklerotisch, indem es Mitogenese und Proliferation der vaskulären glatten Muskelzellen und die Zelladhäsion von

Monozyten, neutrophilen Granulozyten und Thrombozyten an die Gefäßwand hemmt und die Lipidoxidation reduziert. Es unterdrückt infiltrative entzündliche Prozesse der Gefäßwand<sup>4,9</sup>. An Blutzellen sind verschiedene NO vermittelte Funktionen beschrieben: es erhöht die Verformbarkeit der Erythrozyten und hemmt die hämostatische Kaskade indem es Thrombozyten stabilisiert und plasmatische Gerinnungsfaktoren modifiziert und verhindert so eine intravasale Gerinnung,

Synthese: Stickstoffmonoxid wird mit L-Citrullin durch die NO-Synthase (NOS) aus der Aminosäure L-Arginin unter Beteiligung der Kofaktoren Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (NADPH), Tetrahydrobiopterin (BH<sub>4</sub>), Flavin-Adenosin-Dinukleotid (FAD), Flavin-Mononukleotid (FMN) und molekularem Sauerstoff<sup>10</sup> enzymatisch gebildet<sup>1</sup>. L-Arginin wird entweder mit der Nahrung aufgenommen oder im Körper durch den Harnstoffzyklus aus L-Citrullin gebildet<sup>11</sup>. Es sind verschiedene Subtypen der NO-Synthasen bekannt, eine von Calcium/Calmodulin (Ca<sup>++</sup>/CaM) abhängige (siehe unten), konstitutive Form (nNOS, eNOS) und eine Ca<sup>++</sup>/CaM-unabhängige, induzierbare Form (iNOS)<sup>12,13</sup>. Mittlerweile wurde diese Einteilung in eine konstitutive, CaM-abhängige (cNOS) und eine induzierbare, CaM-unabhängige (iNOS) Form der NOS durch eine Einteilung, die die molekularen Strukturen des Enzyms stärker berücksichtigt, abgelöst<sup>2,14</sup>. Nach dieser neuen Einteilung werden bislang drei Isoformen der NOS unterschieden: die neuronale konstitutive NOS (nNOS oder Typ I), die endotheliale konstitutive NOS (eNOS oder Typ III) und die induzierbare NOS der Makrophagen (iNOS oder Typ II)<sup>2</sup>. Darüber hinaus wurde eine weitere Isoform in Mitochondrien nachgewiesen<sup>15</sup>. Während CaM auch bei normalem intrazellulärem Ca<sup>++</sup>-Gehalt an die iNOS gebunden ist, kommt es bei der konstitutiven Form erst bei einem Anstieg des intrazellulären Ca<sup>++</sup>-Spiegels zu einer Bindung.

Im Folgenden wird speziell auf die eNOS und deren Regulation eingegangen: Die Aktivierung der konstitutiven NOS wird nach Rezeptorstimulation durch extrazelluläre Signale, wie z.B. einem Anstieg

der Schubspannung im Gefäß oder durch Freisetzung rezeptorabhängiger physiologischer Stimulatoren (z.B. Acetylcholin, Histamin, Serotonin, Bradykinin und Substanz P<sup>11</sup>), über einen Anstieg der Ca<sup>++</sup>-Konzentration mit nachfolgender CaM-NOS Assoziation vermittelt<sup>13,16,17</sup>. CaM ist ein Ca<sup>++</sup>-bindendes Protein, welches in einer Vielzahl eukariotischer Zellen vorkommt<sup>18,19</sup>. Es kontrolliert den Elektronenfluss zwischen der Reduktase- und der Oxygenase-Domäne der NOS, so dass der Anstieg der Ca<sup>++</sup>-Konzentration die NO-Bildung induziert<sup>20</sup>.

Als Proteinmodifikationen der NOS sind Phosphorylierungen und Alkylierungen durch Myristoylierung und Palmitoylierung beschrieben. Die Aktivität der eNOS wird durch Phosphorylierung an drei oder mehr Seiten des Enzyms beeinflusst: Serin 1177 (Ser<sup>1177</sup>), Threonin 495 (Thr<sup>495</sup>), Serin 116 (Ser<sup>116</sup>) und Serin 633 (Ser<sup>633</sup>)<sup>21-23</sup>. Die Regulation der eNOS über Ser<sup>1177</sup>-Phosphorylierung wird durch die Proteinkinase A und Akt<sup>22,23</sup>, die Proteinkinase C (PKC), die AMP-aktivierte Proteinkinase (AMPK)<sup>24</sup> sowie über die zyklische AMP-abhängige Proteinkinase<sup>25</sup> modifiziert. Die eNOS ist unter basalen Bedingungen an Serin- und Threoninresten schwach phosphoryliert<sup>24</sup>. Verschiedene Stimuli, wie z.B. Scherstress, bewirken eine verstärkte Phosphorylierung an Ser<sup>1177</sup> und damit eine Aktivierung der eNOS<sup>21,22,24</sup>. Die Aktivität der eNOS kann durch die Phosphorylierung an Ser<sup>1177</sup> unabhängig von einer Ca<sup>++</sup>-Zunahme reguliert werden<sup>26</sup>. Die Phosphorylierung an Thr<sup>495</sup> geht mit einer Abnahme der Enzymaktivität einher und ist begründet in der Lokalisation in der Bindungsdomäne von CaM<sup>24</sup>. Obwohl die Aktivierung der eNOS simultan mit Veränderungen der Phosphorylierung von Ser<sup>1177</sup> und Thr<sup>495</sup> einhergeht, gibt es zusätzliche Phosphorylierungswege des Enzyms: Ser<sup>116</sup> ist in der Oxygenase-Domäne lokalisiert. Eine Phosphorylierung geht, wie auch bei Thr<sup>495</sup>, mit einer Abnahme der Enzymaktivität einher<sup>25,26</sup>. Ser<sup>633</sup> ist an einem sogenannten Autoinhibitor-loop, einem Peptid, welches in den Ca<sup>++</sup>-abhängigen Isoformen der NOS vorkommt, lokalisiert. Ser<sup>633</sup> kann *in vitro* durch die cAMP-abhängige PKA und durch eine Proteinkinase G (PKG) phosphoryliert werden<sup>27</sup>. Bis jetzt konnte noch keine physiologische

Relevanz in intakten Zellsystemen nachgewiesen werden. In vergleichenden Studien von Ser<sup>1177</sup> mit Ser<sup>633</sup> wurde festgestellt, dass Ser<sup>1177</sup> eine zentrale Rolle in der NO-Produktion spielt, wohingegen eine Phosphorylierung von Ser<sup>633</sup> nicht detektierbar war oder konsequenzlos blieb<sup>22,23</sup>. Ein weiterer Regulationsweg ist die Phosphorylierung von Tyrosin.

## 1.2 Metabolismus von Stickstoffmonoxid

NO ist ein farbloses Gas, welches in wässrigen Phasen bis zu Konzentrationen von 2 mM löslich ist<sup>28</sup>. Es kann durch die Reaktion mit Sauerstoff entweder zu Nitrosylanionen (NO<sup>-</sup>) reduziert oder zu Nitrosoniumionen (NO<sup>+</sup>) oxidiert werden<sup>29</sup>. Das primäre Oxidationsprodukt von NO in wässriger Lösung ist Nitrit (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>). Es wurde gezeigt, dass 70-90% des im Blut zirkulierenden Nitrit aus dem L-Arginin-NO-Stoffwechsel stammen und dass Nitrit als spezifischer und sensitiver Marker für akute Veränderungen der NOS-Aktivität verwendet werden kann<sup>30,31</sup>. Die Kinetik der Autoxidation von NO hängt von der Ausgangskonzentration ab<sup>32,33</sup>. Somit ist die Halbwertszeit von NO umgekehrt proportional zur NO-Konzentration und kein konstanter Wert. Im biologischen System hängt der NO-Metabolismus von der Diffusionsgeschwindigkeit über biologische Membranen sowie von der jeweiligen Konzentration an NO, Sauerstoff und anderen möglichen Reaktionspartnern ab. Die Diffusionskonstante von NO in der Gefäßwand beträgt 3300 µm<sup>2</sup>/sek<sup>26</sup>. Somit diffundiert NO in kurzer Zeit durch mehrere benachbarte Zellen. Die Wirkung von NO selbst ist hiermit nicht nur auf den direkten Ort der Bildung beschränkt, vielmehr kann der parakrine Mediator deutliche Entfernungen vom Ort der Bildung bis zur Zielzelle zurücklegen (siehe 1.3). Einer der Reaktionspartner von NO während der Diffusion ist molekularer Sauerstoff. Es kommt hierbei zur Bildung höherer Stickoxide, z.B. Stickstoffdioxid und Distickstofftrioxid. Diese Stickoxide können entweder mit anderen Molekülen wie z.B. Thiolen oder Aminen reagieren oder zu Nitrit und Nitrat (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) hydrolysieren (siehe 1.3). Ferner reagiert NO mit Hämproteinen und Sauerstoffradikalen. Das Ausmaß jeder dieser Reaktionen ist abhängig

von den Bedingungen unter denen NO freigesetzt wird und von der Konzentration der jeweiligen Reaktionspartner<sup>34-36</sup>. Wichtige, am Abbau von NO beteiligte Komponenten sind Superoxidanionen ( $O_2^-$ ), Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) und Hydroxylradikale, die in unterschiedlichen Konzentrationen und in verschiedenen Zellen und Organen vorkommen<sup>35,37,38</sup>. Hieraus resultieren verschiedene Reaktionskinetiken von NO *in vivo*. Die sauerstoffabhängigen Radikale werden im Gefäßsystem überwiegend von Endothelzellen und Makrophagen gebildet.

### 1.3 NO-Metabolismus im Plasma

Der größte Anteil des intravaskulär gebildeten NO wird durch die Reaktion mit erythrozytärem Hämoglobin zu Nitrat inaktiviert (siehe 1.4). Das im Plasma vorliegende Nitrit wird rasch durch Oxidation via Oxyhämoglobin ebenfalls zu Nitrat umgewandelt. Nitrat stellt ein stabiles Abbauprodukt von NO *in vivo* dar. Es bleibt im Blut bis zu seiner Ausscheidung über die Nieren stabil und hat eine Halbwertszeit von 5-8 Stunden<sup>39,40</sup>. Die Konzentration des Nitrates im Blut wird jedoch in großem Maße von NO-Stoffwechsel-unabhängigen Faktoren beeinflusst, wie der Aufnahme durch die Nahrung, dem Metabolismus durch den Harnstoffzyklus<sup>41</sup>, der Absorption durch den Verdauungstrakt<sup>42</sup> und der Inhalation aus der Luft<sup>43</sup>. Die in der Literatur beschriebenen basalen Konzentrationen von Nitrat differieren stark und wurden im Plasma mit 0,8-95  $\mu\text{mol/l}$ <sup>44-46</sup> angegeben. Als Grund hierfür wurden bisher externe Einflußfaktoren benannt. Ein Teil des gebildeten NO entgeht der Umsetzung zu Nitrat und ist als Nitrit oder als gebundenes NO (RNO) im Plasma zu finden. Zur besseren Beurteilung des NO-Metabolismus wurde daher Nitrit als Marker für die akute eNOS-Aktivität gewählt. Es wurde gezeigt, dass dieser oxidative Metabolit durch Stimulation bzw. Inhibition in der Unterarmzirkulation des Menschen einen Marker für die akute eNOS-Aktivität darstellt<sup>47</sup>. Plasma eignet sich als einfache Matrix zur Bestimmung von Nitrit und Nitrat, den Markern der NO-Synthese.

Bis vor kurzem wurde angenommen, dass endothelial gebildetes NO ausschließlich parakrin, d.h. lokal in der Gefäßwand wirkt, weil das

instabile NO-Molekül abhängig von verschiedenen Faktoren nur eine Halbwertszeit von 0,05 bis 1 Sekunde aufweist. Mittlerweile gibt es jedoch Hinweise, dass die NO-Wirkung durch Speicherformen<sup>48,49</sup> auch systemisch, bildungsortfern, also endokrin, vermittelt werden kann<sup>50-52</sup>. Im Plasma wurden NO-Intermediate gefunden, in denen NO reversibel gebunden und auf diese Weise vor direktem Abbau geschützt ist. Weiterhin wurden Nitrosothiole, sogenannte RSNO<sup>51</sup> nachgewiesen. RSNO entstehen durch die nitrosative Reaktion mit plasmatischen Thiolgruppen von Albumin, Glutathion und Cystein. Die genaue Reaktion, die zur RSNO-Bildung führt ist noch nicht geklärt. Man geht jedoch davon aus, dass die Thiolgruppen in Anwesenheit von Elektronenakzeptoren über das Nitrosylkation zu RSNO<sup>53,54</sup> und nicht, wie lange angenommen, direkt mit NO reagieren<sup>52,55</sup>. Neben Thiolen im Plasma kann NO auch mit Aminen reagieren. Neue Befunde haben gezeigt, dass Nitrosamine (RNNO) einen physiologischen Bestandteil des humanen Plasmas darstellen und nicht nur in entzündlichen Prozessen gebildet werden. Welche Funktion RNNO übernehmen und ob auch sie NO freisetzen können, ist noch nicht geklärt.

#### **1.4 NO-Metabolismus im Erythrozyten**

Erythrozyten nehmen nicht alleine durch ihren großen Anteil am Blutvolumen von bis zu 50% eine zentrale Rolle im vaskulären NO-Metabolismus ein<sup>56</sup>. Erythrozyten, primär als Sauerstofftransporter bekannt, sind zellorganellfreie Blutzellen, die lediglich durch eine Plasmamembran vom Blutplasma abgegrenzt sind und vor allem das Protein Hämoglobin enthalten, welches 3/4 der erythrozytären Proteine ausmacht. Hämoglobin besteht aus vier Untereinheiten, von denen jede Untereinheit eine Hämgruppe trägt. Beim Sauerstofftransport wird der Sauerstoff (O<sub>2</sub>) reversibel an das Häm-Eisen angelagert (Oxygenierung). Je zwei der vier Untereinheiten besitzen identische Polypeptidketten, die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten. Die Erythrozyten wurden im Zusammenhang mit dem NO-Metabolismus bis vor kurzem lediglich als NO-abfangende Zellen betrachtet, bei denen endothelial gebildetes NO durch die Reaktion mit

oxygeniertem Hämoglobin bzw. durch die Bindung an deoxygeniertes Hämoglobin inaktiviert wird<sup>57,58</sup>. Erreicht endothelial gebildetes NO den Erythrozyten, so kann es mit Hämoglobin prinzipiell drei verschiedene Reaktionen eingehen. Einerseits kann es wie bereits beschrieben mit Oxyhämoglobin zu Methämoglobin und Nitrat reagieren. Bei der Bildung von Nitrosylhämoglobin reagiert NO mit dem Eisen des Deoxyhämoglobins. In einer von Jia et al.<sup>49</sup> diskutierten Hypothese kommt Hämoglobin in zwei verschiedenen Strukturen vor, in einer R-Form (mit hoher O<sub>2</sub>-Affinität) und einer T-Form (mit niedriger O<sub>2</sub>-Affinität). Methämoglobin ist strukturell der T-Form ähnlich. Nach der Oxygenierung des Hämoglobins in der Lunge (R-Form) bildet sich durch eine Nitrosierungsreaktion von NO an das Cystein-93 (Cys) der β-Kette des Hämoglobins S-nitroso-Hämoglobin<sup>59,60</sup>. Die O<sub>2</sub>-Abgabe des Hämoglobins in der Peripherie ist mit einer Strukturänderung zur T-Form verbunden. Dies resultiert ebenfalls in der Freisetzung des an Cys-93 gebundenen NO. Sowohl S-nitroso-Methämoglobin als auch S-nitroso-Hämoglobin führen infolge der durch die Strukturänderung des Hämoglobins induzierten Instabilität und nachfolgender NO-Abspaltung zu einer Dilatation der Blutgefäße. Nitrosyl-Hämoglobin führt wie natives Hämoglobin durch Abfangen endothelialen NO zu einer Vasokonstriktion. Außerdem ist eine Beeinflussung der Thrombozytenaggregabilität durch das aus S-nitroso-Hämoglobin freigesetzte NO beschrieben<sup>55</sup>. Wie das im Erythrozyten an Hämoglobin gebundene NO in das zellumgebende Plasma gelangt, konnte lange nicht geklärt werden. Inzwischen wird angenommen, dass ein in der Erythrozytenmembran lokalisierter AE1-Transporter (Anionenaustauscher 1-Transporter) NO über verschiedene Bindungen ins extrazelluläre Medium überführt<sup>61</sup>. Erythrozyten scheinen also nicht nur Abbauort von NO, sondern auch ein regulatorischer Bestandteil der vaskulären NO-Bioverfügbarkeit zu sein. Das im Vollblut befindliche Nitrit wurde wie oben beschrieben primär als intermediäres Zwischenprodukt im Abbau von NO betrachtet. Neueste Untersuchungen bestätigen jedoch eine ältere Hypothese, nach der auch im humanen Organismus, ähnlich der bakteriellen Nitrit-Reduktase, aus Nitrit NO

gebildet werden kann. Drei Mechanismen sind beschrieben: Die Xanthinoxidoreduktase<sup>62</sup>, die nicht-enzymatische Dysproportionierung oder Säure-Reduktion<sup>63,64</sup> und die nicht-enzymatische NO-Bildung durch Deoxyhämoglobin<sup>57,65</sup>.

Das aus Erythrozyten freigesetzte NO stammt nicht ausschließlich aus den NO-Speichern. In der Literatur bestehen sehr widersprüchliche Hinweise auf eine erythrozytäre NO-Synthase. Einerseits wird eine Aktivität im Zytosol oder ihrer Membran durch NO-Bildung nachgewiesen<sup>66,67</sup>, andererseits konnte zu diesem Zeitpunkt keine NOS-spezifische NO-Bildung detektiert werden. Der Beweis einer aktiven NOS wurde widerlegt<sup>61</sup> und der Proteinnachweis der erythrozytären NOS entweder als inaktives Protein oder als katalytisches Enzym interpretiert<sup>68</sup>. Es kam hinzu, dass die NO-Synthese nicht eindeutig einem aktiven Enzym zugeordnet werden konnte und sich der Proteinnachweis für den Erythrozyten als anfechtbar herausstellte. Somit konnte bisher keine physiologisch relevante basale NO-Bildung für ein Blutkompartiment erbracht werden. In Vorversuchen unserer Arbeitsgruppe konnte eine eNOS-Expression und Aktivität im Erythrozyten nachgewiesen werden. In diesen Voruntersuchungen gelang erstmals eine eindeutige und vollständige Beweisführung für eine NOS-Aktivität im Erythrozyten. Im Gegensatz zur widersprüchlichen Literatur konnte die Expression einer eNOS durch RT-PCR und im Western-Blot sowie immunzytochemisch nachgewiesen werden. Die Aktivität der erythrozytären NOS wurde über die Bestimmung von Nitrit als primärem Marker von NO bestimmt. Durch eine Stimulation mit dem L-Isomer von Arginin konnte im Gegensatz zu dem D-Isomer eine Synthesesteigerung gezeigt werden. In vitro Untersuchungen erbrachten erste Hinweise auf eine mögliche Bedeutung einer erythrozytären NO-Bildung für die vaskuläre Homöostase. Zum einen ist die Verformbarkeit der Erythrozyten als wesentliche Voraussetzung für eine erfolgreiche Passage der Mikrozirkulation unmittelbar von der eigenen NO-Bildung abhängig und kann durch NOS-Inhibition oder durch Abfangen von NO nahezu vollständig aufgehoben werden. Zum anderen konnten Evidenzen für einen Export von bioaktivem

NO aus Erythrozyten erhoben werden: a) nach Inkubation von Erythrozyten mit L-Arginin steigen die plasmatischen RNO-Konzentrationen an, b) L-Arginin-stimulierte Erythrozyten hemmen die Thrombozyten-Aggregation und c) dilatieren eNOS-defiziente Gefäßstreifen.

Ziel dieser Arbeit war die Quantifizierung der erythrozytären NOS-Aktivität durch eine vollständige, sensitive Detektion der Metabolite Nitrit, Nitrat und NO selbst sowie dem Nachweis der spezifischen Verstoffwechslung von Arginin. Durch Detektionsverfahren bei denen NO direkt bestimmt wurde, sollte abgeschätzt werden, welcher Anteil des synthetisierten NO aus dem Erythrozyten exportiert wird und potentiell bioaktiv sein könnte. Die Regulationsmechanismen die für eine endotheliale Isoform der NOS bekannt sind (siehe 1.1) sollten biochemisch und immunzytochemisch für die erythrozytäre NOS untersucht werden.

## **2. Material und Methoden**

Alle Chemikalien wurden, wenn nicht gesondert aufgeführt, von Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland bezogen.

### **2.1 Probenaufarbeitung**

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen wurde humanes Vollblut ausschließlich von gesunden, nicht-rauchenden, jungen Normalpersonen entnommen (20-32 Jahre). Alle Proben zur Nitrit- und Nitratbestimmung mittels Fluss-Injektions-Analyse (FIA) oder Reduktiver-Chemilumineszenzdetektion (Reduktiver-CLD) wurden als Dreifachbestimmung aufgegeben und der Mittelwert aus diesen gebildet. Der pH-Wert von Inkubationsmedien und Vollblutproben wurde nach Ansetzen, vor und nach der Probenaufarbeitung und Inkubation mittels pH-Meter (WTW pH522, Wissenschaftlich-technische Werkstätten, Weilheim, Deutschland) gemessen. Die Validierung des Gerätes wurde vor jeder Probenbestimmung mit Pufferlösungen der Werte pH 7 und pH 9 (Puffer 7,00, Puffer 9,00 Riedel-de Haën<sup>®</sup>, RdH Laborchemikalien, Seelze, Deutschland) durchgeführt. Bei allen biochemischen Untersuchungen zur erythrozytären NO-Synthese führte weder die Inkubation noch die Zugabe der verwendeten Reagenzien zum Vollblut zu messbaren Veränderungen des pH-Wertes.

#### **2.1.1 Blutentnahme**

Vollblut wurde über eine venöse Punktionskanüle (Venofix, 0,8 mm, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) aus der gestauten Vena cubiti unter Vermeidung einer Hämolyse entnommen. Als Antikoagulanzen wurde Heparin eingesetzt ( $10 \text{ IE} \cdot \text{ml}^{-1}$ , Liquemin 5000 IE, Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland) ( $1 \mu\text{l/ml}$  Vollblut). Bei den Proben zur späteren Nitratbestimmung (siehe 2.1.7) wurde stattdessen Lepirudin verwendet ( $62,5 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ , Schering, Berlin, Deutschland) ( $0,25 \mu\text{l/ml}$  Vollblut).

### **2.1.2 Aufarbeitung der Blutproben zur Erythrozytenseparation**

Eine Herstellung von Erythrozytenkonzentrat kam im OxyHämoglobin-Assay (OxyHb-Assay; siehe 2.5.1), bei der Nicht-reduktiven-CLD (siehe 2.5.2) und dem Versuch zum immunzytochemischen Nachweis einer Phosphorylierung (siehe 2.2) zur Verwendung. Vollblut wurde in einer an der Spitze verschlossenen Spritze ohne Kolben 20 min bei 800 xg und 4°C zentrifugiert. Der plasmatische Überstand wurde zu 2/3 abgenommen und je nach Versuchsaufbau bei 4°C bis zur weiteren Verwendung gelagert (siehe 2.2.) oder verworfen (siehe 2.5.1, 2.5.2). Nach Lösen des Verschlusses wurden ca. 2/3 der sedimentierten Erythrozyten durch vorsichtiges Abtropfen gewonnen, ohne dabei die leukozytäre Grenzschicht zu beschädigen. Bei der Erythrozytenseparation wurde ein Reinheitsgrad von >99% erreicht <sup>69</sup>.

### **2.1.3 Aufarbeitung der Blutproben zur Separation von Erythrozytenmembranen**

Zur Präparation der Erythrozytenmembranen (Ghosts) für den Citrullin-Assay (siehe 2.1.10) wurden reine Erythrozytenfraktionen (siehe 2.1.2.) mit hypotonem Lysepuffer 60 min auf Eis lysiert (Buffer EL Erythrocyte lysis buffer, QUIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland). Durch eine Ultrazentrifugation (SORVALL<sup>®</sup> SUPER T21, Du Pont de Nemours GmbH, Bad Homburg, Deutschland) wurden die Membranen von Zytosol und Lysepuffer getrennt (15 min, 27000 xg, 4°C). Das Membransediment wurde durch wiederholtes Waschen mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung pH 7,3 (PBS) nahezu vollständig von Hämoglobin-Rückständen befreit, bis Hämoglobin im Spektrophotometer (Beckman DU<sup>®</sup> 7500 Spectrophotometer, Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland) bei 415 nm nicht mehr nachweisbar war. Für die weiteren Untersuchungen wurden die Ghosts in der dem Vollblut entsprechenden Zellzahl in PBS aufgenommen (siehe 2.1.10).

#### **2.1.4 Aufarbeitung der Proben zur Vollblutinkubation**

Das Verfahren der Vollblutinkubation wurde für die Untersuchungen der NO-Synthese und des NO-Exportes in Erythrozyten in Abhängigkeit der erythrozytären NOS verwendet. Untersucht wurde der Export von NO direkt durch Bestimmung des NO-Radikals via OxyHb-Assay und Nicht-reduktiver-CLD (siehe 2.5.1, 2.5.2), als auch der Anstieg der oxidativen Metabolite via FIA, CLD und Nitratreduktase-FIA (NR-FIA) (siehe 2.3-2.4.1). Interventionen im Vollblut mit L-Arginin, N<sub>ω</sub>-Nitro-L-Arginin (L-NNA) und N<sub>G</sub>-Methyl-L-Arginin (L-NMMA) wurden, wenn nicht gesondert aufgeführt, mit einer Endkonzentration der Substanzen von 3 mM (Verdünnung 1:100; V/V; Inkubationsmedium:Vollblut) durchgeführt. Das Vollblut wurde direkt nach der Entnahme mit einem oder mehreren Inkubationsmedien (siehe Tab. 2.2) versetzt. Als Kontrolle diente eine Inkubation der Probe mit PBS. Eine aufgearbeitete Probe wurde zu zwei Anteilen aliquotiert. Ein Teil wurde als Basalwert direkt vermessen, der andere zuvor im Schüttelwasserbad bei 37°C für 30 min lichtgeschützt inkubiert. Die Reaktion wurde durch eine Verdünnung mit PBS (1:5; V/V; Probe:PBS) gestoppt. Nach Abzentrifugation der korpuskulären Bestandteile (800 xg, 4°C, 20 min) wurde der plasmatische Überstand je nach Bestimmungsverfahren gemessen (hinsichtlich der Nitritkonzentration mittels Reduktiver-CLD siehe 2.3.2) oder weiterverarbeitet (Nitrit-/ Nitratbestimmung mittels FIA/NR-FIA siehe 2.1.7, 2.3.1, 2.4.1).

Nitrit wurde ebenfalls als Marker verwendet, um die Abhängigkeit der NO-Synthese von der Substratkonzentration darzustellen (siehe Tab. 2.2). Vollblut wurde mit aufsteigenden L-Argininkonzentrationen inkubiert (0, 0,3, 3, 30, 300, 3000 μM, Endkonzentration), nach oben genanntem Protokoll aufgearbeitet und vermessen.

#### **2.1.5 Reduktion der endogenen L-Arginin-Konzentration**

Humanes Vollblut und Erythrozytenmembranen wurden vor der Durchführung des Citrullin-Assays (siehe 2.1.10 und Tab. 2.3) und vor der

Untersuchung zur Abhängigkeit der NO-Synthese von der Substratkonzentration (siehe 2.1.4) mittels Arginase an endogenem L-Arginin verarmt. Zur Kontrolle der Funktionalität der L-Argininverarmung wurde Vollblut nach Blutentnahme und Antikoagulation mit Arginase (1 Unit (U) Arginase setzt 1  $\mu\text{M}$  L-Arginin/min um) versetzt und bei 37°C 5 min im Schüttelwasserbad inkubiert. Zur Gegenüberstellung wurden Vollblutproben nach gleichem Protokoll ohne Zugabe von Arginase hinsichtlich ihres Nitritgehaltes via Reduktiver-CLD (siehe 2.3.2) vermessen. Durch Zugabe des Arginase-Inhibitors L-Valin (30 mM) wurde das Enzym nach Argininverarmung der Probe inhibiert. Somit wurde die endogene L-Argininkonzentration maximal vermindert und die Zugabe von exogenem L-Arginin standardisiert. Zur Kontrolle wurde neben der Nitritbestimmung an einem Subkollektiv die plasmatische L-Argininkonzentration bestimmt (siehe 2.6.1).

### 2.1.6 Protokoll zur Untersuchung von Regulationsfaktoren der erythrozytären NOS

Vollblut wurde neben L-Arginin mit jeweils einem oder mehreren Inkubationsmedien (Ca-Ionophor und Ethylendiamtetraessigsäure (EDTA), Konzentrationen siehe Tab. 2.1) versetzt. Nach Inkubation und Zentrifugation (siehe 2.1.4) erfolgte die direkte Nitritmessung des plasmatischen Überstandes mittels Reduktiver-CLD (siehe 2.3.2). Als Kontrolle wurde PBS-inkubiertes Vollblut verwendet.

**Tab. 2.1:** Regulationsmechanismen der NOS und zur Stimulation bzw. Inhibition eingesetzte Mediatoren in den jeweils zur Inkubation verwendeten Konzentrationen.

<b>Mechanismus</b>	<b>Inhibition</b>	<b>Stimulation</b>
Ca <sup>++</sup> /CaM	Fendilin [50 $\mu\text{M}$ ] Calmidazolium [15 $\mu\text{M}$ ] EDTA [5 mM]	Ca-Ionophor [50 $\mu\text{M}$ ]
Proteinkinasen	Wortmannin [20 nM]	Insulin [27,5 $\mu\text{U}$ ]

### **2.1.7 Probenaufarbeitung zur Nitrit- und Nitratmessung mittels FIA**

Zum biochemischen Nachweis einer erythrozytären NO-Synthese wurde Vollblut mit L-Arginin, dem Substrat der NOS sowie dem L-Arginin-Analogen L-NNA, einem Inhibitor des Enzyms, inkubiert. L-NNA wies eine hohe Kontamination (ca. 400  $\mu\text{M}$ ) an Nitrit, dem hier zu bestimmenden Marker der NO-Synthese, auf. Durch Zugabe von Nitrit (Merck, Darmstadt, Deutschland) wurden die basalen Nitritkonzentrationen in den Inkubationsmedien initial dem von L-NNA angeglichen. Vollblut wurde nach dem in 2.1.4 beschriebenen Protokoll zur Vollblutinkubation aufbereitet, inkubiert und zentrifugiert (siehe Tab. 2.2). Der plasmatische Überstand wurde in Ultrafiltrationsröhrchen Centricon<sup>®</sup> YM 10 (cut off 10 kDa, Millipore Corporation, Eschborn, Deutschland) überführt und 2 h, bei 4°C, 4000 xg ultrafiltriert. Anschließend erfolgte die Messung des Ultrafiltrates mittels FIA und NR-FIA (siehe 2.3.1 und 2.4.1).

### **2.1.8 Probenaufarbeitung zur plasmatischen Nitritbestimmung mittels CLD**

Nach den Vollblutinkubationen (siehe 2.1.4) wurden die Proben grundsätzlich mit PBS (1:5; V/V) verdünnt. Es folgte eine direkte Zentrifugation bei 800 xg, 4°C für 20 min. Der plasmatische Überstand wurde abgenommen und die Nitritkonzentration im Plasma mittels Reduktiver-CLD (siehe 2.3.2) bestimmt. Vor jeder Messung erfolgte eine Aufgabe wässriger Nitritstandards zur Eichung der Anlage.

### **2.1.9 Probenaufarbeitung zur Vollblutnitritbestimmung mittels CLD**

Neben der plasmatischen Bestimmung von Nitrit zur Quantifizierung der erythrozytären NO-Synthese (siehe 2.1.8) wurde Vollblut hinsichtlich seines Nitritgehalts vor und nach Inkubation mit verschiedenen Mediatoren (PBS, L-Arginin und L-NMMA) der NOS mittels Reduktiver-CLD (siehe 2.3.2) bestimmt<sup>70</sup>.

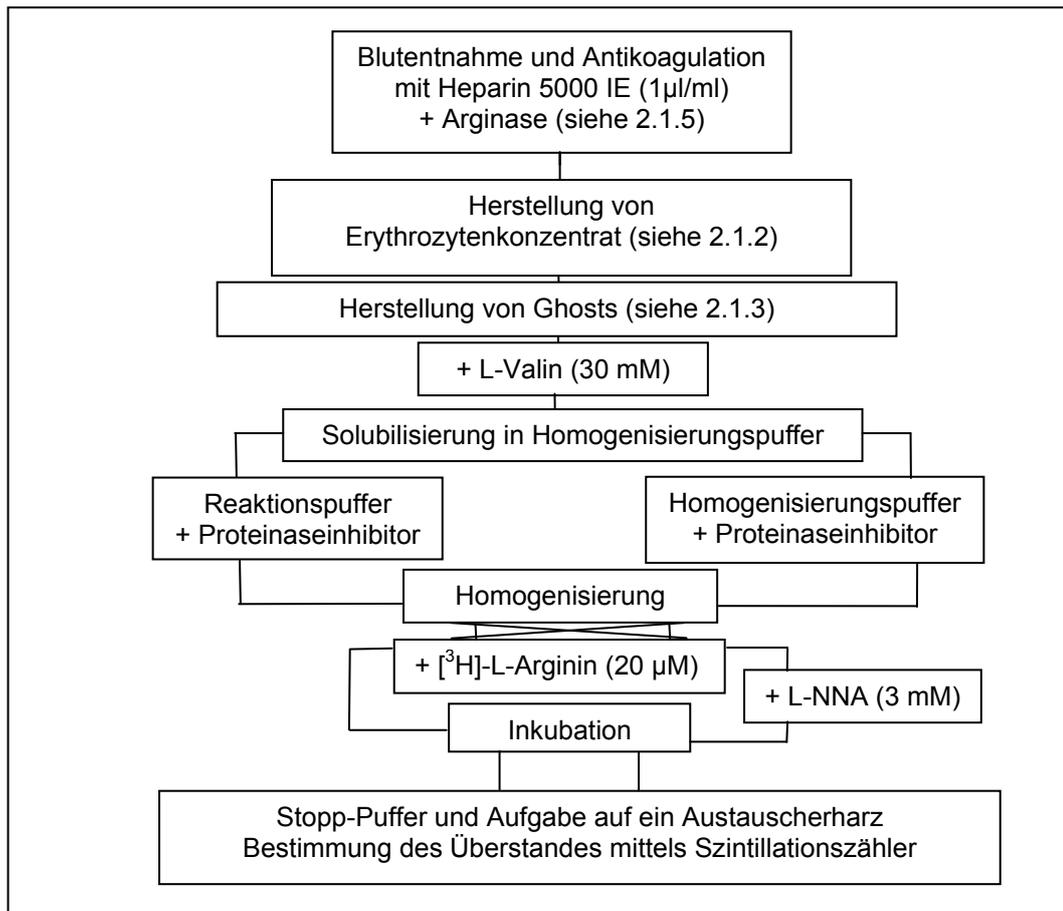
Tab. 2.2: Übersicht der Probenaufarbeitung

	Abschätzung der gesamten Aktivität				Regulationsfaktoren der erythrozytären NOS		
	Nitrit	Nitrat	VB-Nitrit	NO	biochemisch	immunzytochemisch	
	Nitrit	Nitrat	VB-Nitrit	NO	Substrat - Konzentration	CaM	Proteinkinasen
<b>Antikoagulanzen</b>	Lepirudin 0,25 µl/ml	Lepirudin 0,25 µl/ml	Heparin 1µl/ml	Heparin 1µl/ml	Heparin 1µl/ml	Heparin 1µl/ml	Heparin 1µl/ml
<b>Probenaufarbeitung</b>	PBS L-Arginin L-NNA	PBS L-Arginin L-NNA	PBS L-Arginin L-NMMA	Erythrozyten- konzentrat  Hkt 8% in Messkammer (PBS)	+Arginase  L-Arginin (0, 0,3, 3, 30, 300, 3000 µM)	PBS, Ca- ionophor EDTA, Fendilin Calmidazolium jeweils + L-Arginin	PBS Insulin Wortmannin jeweils + L-Arginin
<b>Inkubation</b>	37°C 30 min	37°C 30 min	37°C 30 min		37°C 30 min	37°C 30 min	37°C 30 min
<b>Probenaufarbeitung</b>	Verdünnung 1:5 Probe:PBS	Verdünnung 1:5 Probe:PBS	Verdünnung 1:5 Probe:PBS	PBS L-Arginin L-NMMA direkte Injektion in die Messkammer	Verdünnung 1:5 Probe:PBS	Verdünnung 1:5 Probe:PBS	Verdünnung 1:4 Probe:PBS
<b>Zentrifugation</b>	800 xg, 4°C, 20 min	800 xg, 4°C, 20 min	800 xg, 4°C, 20 min		800 xg, 4°C, 20 min	800 xg, 4°C, 20 min	800 xg, 4°C, 20 min
<b>Messmethode</b>	Ultrafiltrat mittels FIA	Ultrafiltrat mittels NR-FIA	VB-Nitrit mittels Reduktiver- CLD 20°C	NO mittels Nicht- reduktiver CLD 37°C	Plasma-Nitrit mittels Reduktiver-CLD 60°C	Plasma-Nitrit mittels Reduktiver-CLD 60°C	Plasma-Nitrit mittels Reduktiver-CLD 60°C

### 2.1.10 Probenaufarbeitung für den Citrullin-Assay

Aus Vollblut wurde nach endogener Argininverarmung (siehe 2.1.5) Erythrozytenkonzentrat (siehe 2.1.2) hergestellt und die Erythrozytenmembranen separiert (siehe 2.1.3). Nach Zugabe des Arginase-Inhibitors L-Valin wurden die Proben in Homogenisierungspuffer solubilisiert. Dieser war zusammengesetzt aus Tris-HCl pH 7,5 (50 mM), Dithiothreitol (DTT; 0,1 mM) und Phenylmethylsulfonylfluorid (1 mM). Ein Teil des Proteinextraktes wurde mit Reaktions-Puffer, bestehend aus Tris-HCl pH 7,5 (50 mM), Flavin-Adenosin-Dinukleotid (FAD; 2  $\mu$ M), CaM (1  $\mu$ M), CaCl<sub>2</sub> (1,5 mM), DTT (1 mM), BH<sub>4</sub> (15  $\mu$ M), L-Arginin (20  $\mu$ M) und Proteinase-Inhibitor, ein anderer als Kontrolle nur mit Homogenisierungspuffer und Proteinase-Inhibitor (siehe Tab. 2.3) mittels eines Ultra Turrax T25 (Ika, Staufen, Deutschland) 30 sek bei 24000 rpm auf Eis homogenisiert. Jeweils eine Probe wurde mit dem NOS-Inhibitor L-NNA versetzt. Allen Proben wurde als Stimulanz radioaktiv markiertes [<sup>3</sup>H]-L-Arginin (jeweils 2  $\mu$ Ci) hinzu gegeben und diese für 30 min bei 37°C im Heizblock (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) inkubiert. Die Reaktion wurde mit Stopp-Puffer (4°C) beendet und die Proben auf ein Dowex-Austauscherharz (50X8-400) gegeben. Der Stopp-Puffer setzte sich zusammen aus 4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinethansulfonat (Hepes) pH 5,5 (20 mM) und EDTA (2 mM). Das während der Inkubation entstandene [<sup>3</sup>H]-L-Citrullin wurde auf Grund seiner neutralen Ladung bei einem pH von 5,5 im Austauscherharz nicht durch dieses zurückgehalten. Nach einer weiteren Inkubation konnte es entnommen und die Radioisotope [<sup>3</sup>H] mittels Szintillationszähler gemessen werden.

**Tab. 2.3:** Probenaufarbeitung für den Citrullin-Assay



## 2.2 Immunzytochemische Untersuchungen der erythrozytären NOS

Auf proteinbiochemischer Ebene sollte untersucht werden, ob die im Rahmen dieser Arbeit gezeigte Steigerung der NO-Synthese der Erythrozyten durch eine Stimulation mit Insulin ebenfalls zu einer immunzytochemisch nachweisbaren Phosphorylierung führt. Separierte Erythrozyten (siehe 2.1.2) wurden in den zellfreien Überstand resuspendiert (1:1) und dem Ansatz L-Arginin hinzugegeben. Ein Teil der Probe wurde als Kontrolle direkt 1:15 mit PBS verdünnt. Der weitere Anteil der Probe wurde mit Insulin (27,5 µU) (Actrapid® NovoNordisc Bagsværd, Dänemark) 30 min im Schüttelwasserbad inkubiert (siehe 2.1.4). Die Reaktion wurde bei gleicher Verdünnung mit PBS gestoppt und die Zellen mit Paraformaldehyd (4%) in PBS für 30 min fixiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Erythrozyten auf

Deckgläsern (24x32 mm) ausgestrichen und hitzefixiert. Danach wurden sie in TBS (Tris-Bor-Säure 0,1 M) gewaschen, für 30 min mit Trypsin (0,1%) permeabilisiert und für 20 min in eine Lösung, bestehend aus PBS, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2%) und Methanol (80%) gegeben. Die Ausstriche wurden mit Milchpulver (3%), gelöst in TPS, für 30 min bei Raumtemperatur behandelt. Es folgte eine Inkubation in TPS mit Milchpulver (0,3%), Tween 20 (0,03%) und dem primären polyklonalen Kaninchen Antikörper gegen P-eNOS (Ser<sup>1177</sup>) (1:500, Upstate, Lake Placid, USA). Nach Waschen der Proben mit TPS wurden die Ausstriche mit dem zweiten Antikörper (goat-anti-rabbit-antibody, Dako, Glostrup, Dänemark) in einer Verdünnung von 1:400 für 30 min inkubiert. Als Negativkontrollen wurden Erythrozyten ohne den primären Antikörper inkubiert. Ein Streptavidin-Peroxidase-konjugiertes-Antigen (Verdünnung 1:150; Amershan, Buckinghamshire, England) wurde den Ausstrichen für 30 min hinzugegeben. Die Reaktion wurde mit 3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid gelöst in PBS durchgeführt.

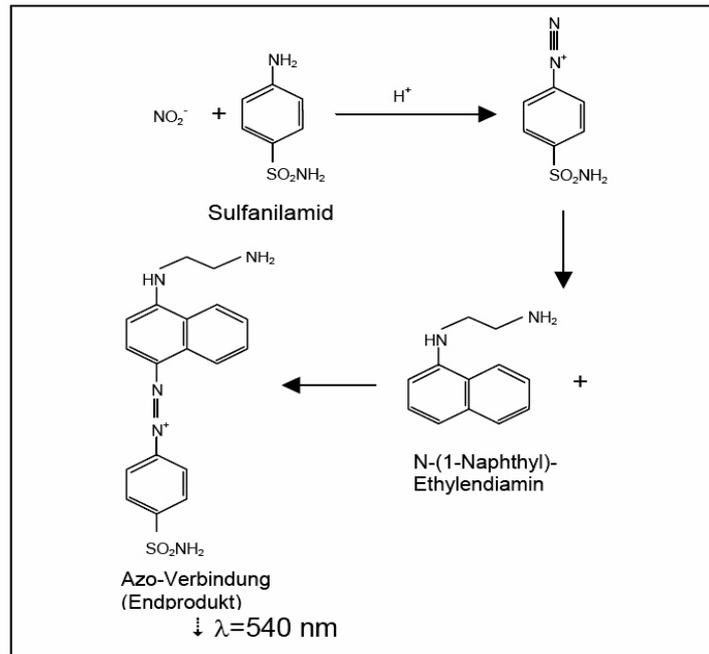
Die immunzytochemischen Untersuchungen der Erythrozytenausstriche wurden von Prof. W. Bloch und seinen technischen Assistenten/-innen an der Deutschen Sporthochschule Köln durchgeführt.

### **2.3 Methoden zur Bestimmung von Nitrit**

Der Nitritgehalt der Proben wurde mittels zwei verschiedener Methoden, der Fluss-Injektions-Analyse (siehe 2.3.1) und der Reduktiven-Chemilumineszenzdetektion (siehe 2.3.2), mit hoher Sensitivität und Spezifität bestimmt. Die Bestimmung plasmatischen Nitrits mittels beider Verfahren zeigt eine signifikante Korrelation: FIA/Reduktiver-CLD:  $r=0,96$ ;  $p>0.001$ <sup>30</sup>.

#### **2.3.1 Fluss-Injektions-Analyse**

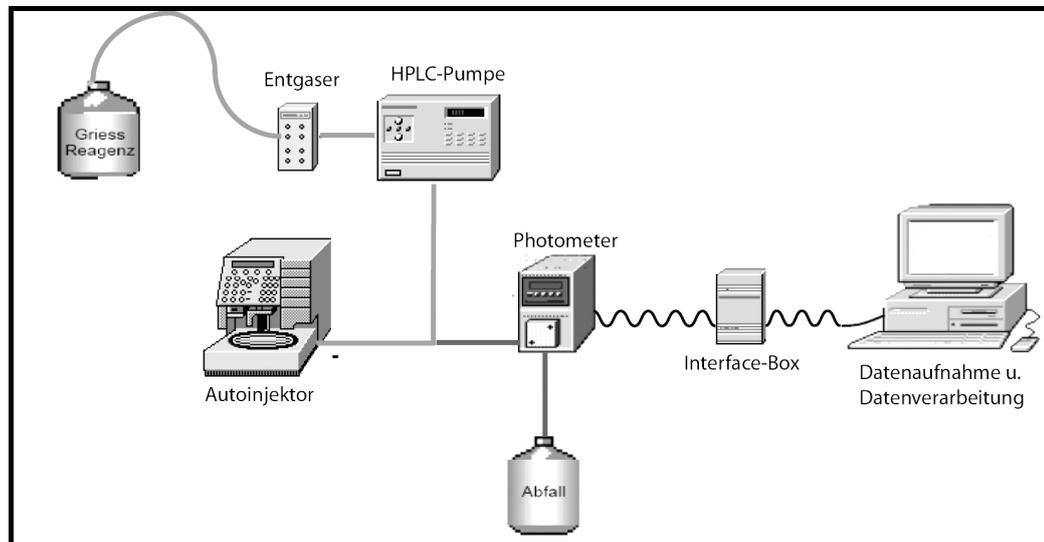
Die Nitritkonzentration wurde vor und nach enzymatischer Reduktion von Nitrat zu Nitrit der Proben (siehe 2.1.7, 2.4.1) mittels FIA bestimmt. Diese Technik beruht auf einer Absorptionsänderung bei der Reaktion von Nitrit mit N-(1-Naphthyl)-Ethylendiamin und Sulfanilamid, der Griess-Reaktion.



**Abb. 2.1:** Schematische Darstellung der Griess-Reaktion

Eine Hochdruckflüssigkeitschromatographie-Pumpe (HPLC-Pumpe) (Sunflow 100, SunChrom, Friedrichsdorf, Deutschland) pumpt mit einer konstanten Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min Griess-Reagenz durch einen Entgaser (2-Kanal Degaser Populair, SunChrom, Friedrichsdorf, Deutschland) in die Messkammer eines Photometers (Shimadzu SPD-6AV). Das Griess-Reagenz setzt sich aus gleichen Teilen Sulfanilamid (Merck, Darmstadt, Deutschland) mit einer Konzentration von 10 g/l gelöst in 1% Salzsäure (Merck, Darmstadt, Deutschland) und N-(1-Naphtyl)-Ethylendiamid mit einer Konzentration von 0,2 g/l gelöst in HPLC-Wasser (LiChrosolv®, Merck, Darmstadt, Deutschland) zusammen. Ein Autoinjektor (Triathlon, Spark Holland, Niederlande) injiziert ein Volumen von 20 µl der aufgearbeiteten Probe (siehe 2.1.7) in das fließende Griess-Reagenz. Die nun ablaufende Reaktion geht mit einer Absorptionsänderung bei 545 nm einher. Das nachgeschaltete Photometer misst diese Absorptionsänderung und übermittelt die Messdaten über eine Interface-Box (Knauer, Berlin, Deutschland) an einen handelsüblichen Computer. Die Daten werden mit der Chromatographie-Software Chromgate 2.55 (Knauer, Berlin, Deutschland) analysiert und die Nitritkonzentration über die Peakhöhe bestimmt. Vor jeder

Analyse wird durch Aufgabe wässriger Nitritstandards eine Eichung der Anlage durchgeführt.

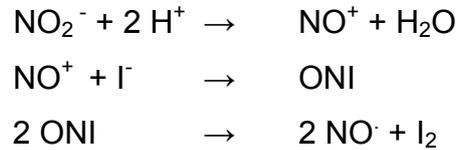


**Abb. 2.2:** Anordnung der Fluss-Injektions-Analyse

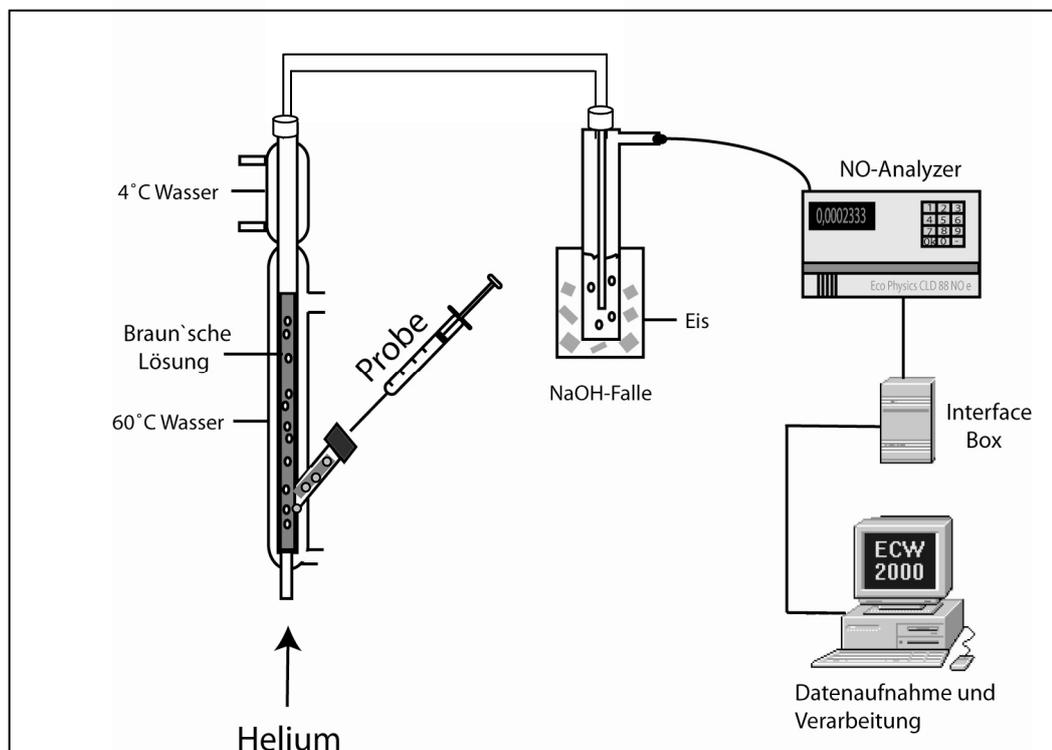
### 2.3.2 Reduktive-Chemilumineszenzdetektion

Die Reduktive-CLD detektiert gasförmiges Stickstoffmonoxid. Die Methode beruht auf der Messung von Lichtquanten, die stöchiometrisch bei der Reaktion von NO mit Ozon ( $O_3$ ) frei werden, so dass NO in eine gasförmige Form überführt werden muss. Zur Messung wurde eine Anlage der Firma Ecophysics (Typ CLD 88 NO e, Eco Physics, Schweiz) verwendet. Die Proben (siehe 2.1.4-2.1.6, 2.1.8, 2.1.9) wurden zunächst mit einer gasdichten Glasspritze (Typ 1710/50 RN, Hamilton, Bonaduz, Schweiz) durch eine Kunststoffmembran in die Reaktionskammer (Verhees, Neuss, Deutschland) der Anlage injiziert. Das Aufgabevolumen betrug bei den Nitritmessungen je 100  $\mu$ l. Das Reaktionsgefäß wurde mit 60°C warmem Wasser umspült. Durch eine Glasfritte strömte während der gesamten Messung mit konstantem Fluss Helium (Linde, Unterschleißheim, Deutschland). In der Injektionskammer befanden sich 20 ml iodhaltige-reduktive Reaktionslösung (Braun'sche Lösung). Diese enthielt 3,24 g Kaliumjodid (Merck, Darmstadt, Deutschland) und 1,14 g Iod gelöst in 30 ml HPLC-Wasser (Merck, Darmstadt, Deutschland), versetzt mit 405 ml konzentrierter Essigsäure

(Merck, Darmstadt, Deutschland). Die Braun'sche Lösung diente der reduktiven Freisetzung von NO aus der Probe, welche nach folgender Reaktionsgleichung abläuft:



Das auf diese Weise äquimolar aus Nitrit gebildete NO konnte dann mittels der oben beschriebenen Photoreaktion bestimmt werden. Aufgrund des hohen Löslichkeitskoeffizienten trat das gebildete NO schnell in die Gasphase über und gelangte so in die Reaktionskammer der Anlage, wo NO mit O<sub>3</sub> detektiert wurde. O<sub>3</sub> reagierte dabei spezifisch mit NO zu Stickstoffdioxid. Zur Datenaufnahme und Integration wurde ein handelsüblicher PC mit der Software Eurochrom (Knauer, Berlin, Deutschland) verwendet. Zur Verbindung zwischen Rechner und Anlage diente eine Interfacebox der Firma Knauer. Die Größe des Signals wurde als Fläche unter der Kurve bestimmt. Vor jeder Analyse wurde durch Aufgabe wässriger Nitritstandards eine Eichung der Anlage durchgeführt.



**Abb. 2.3:** Schematische Darstellung der Chemilumineszenzdetektion

## 2.4 Methode zur Bestimmung von Nitrat

### 2.4.1 Nitratreduktase-FIA (NR-FIA)

Im ersten Schritt wurde Nitrat mittels Nitratreduktase zu Nitrit reduziert. Die zu untersuchenden Proben wurden mit Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH), gelöst in Aqua ad injectabilia (Braun, Melsungen, Deutschland), sowie einer weiteren Lösung bestehend aus Nitratreduktase, Glucose-6-Phosphat (G6P; Roche Life Sciences, Mannheim, Deutschland) und Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PDH; Roche Life Sciences, Mannheim, Deutschland) gelöst in Aqua ad injectabilia und TRIS-HCl (BioRad, Kalifornien, USA) versetzt und in einem Wärmeschrank bei 25°C für 1 Stunde inkubiert. Das in der Probe vorhandene Nitrat wurde so durch die Nitratreduktase unter Verbrauch von NADPH zu Nitrit reduziert. NADP<sup>+</sup>, welches durch den Verbrauch aus der Reaktion entstanden war, wurde durch die G6PDH zu NADPH reduziert und so permanent dem Gleichgewicht der Nitratreduktasereaktion entzogen. So wurde eine vollständige Umwandlung des Nitrats zu Nitrit gewährleistet.

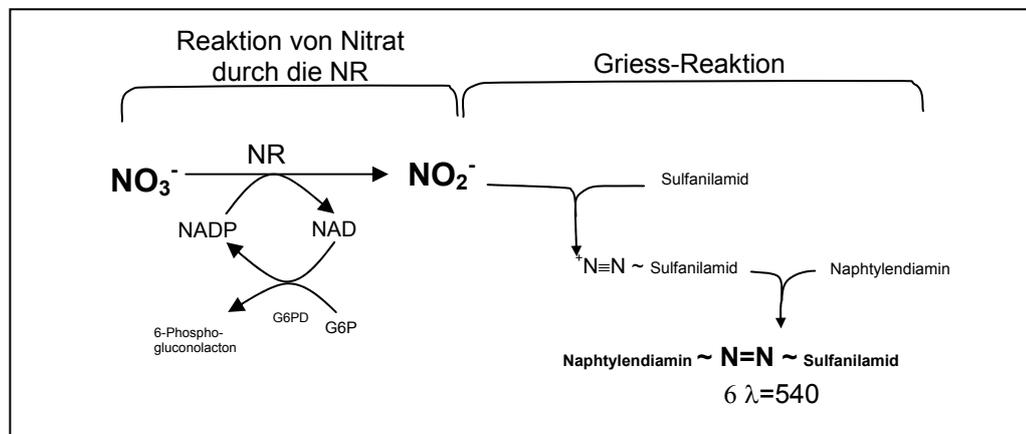


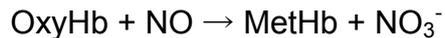
Abb.2.4: Nitratreduktase- und Griess-Reaktion

Im zweiten Schritt wurde das so zu Nitrit überführte Nitrat basierend auf der Griess-Reaktion quantifiziert (siehe 2.3.1). Die Messung des Ultrafiltrats (siehe 2.1.7) erfolgte mittels NR-FIA.

## 2.5 Methoden zur direkten Bestimmung von Stickstoffmonoxid

### 2.5.1 Der Oxyhämoglobin-Assay

Die Quantifizierung von NO über den Oxyhämoglobin-Assay basiert auf der stöchiometrischen Umwandlung von Oxyhämoglobin (OxyHb; Fe<sup>2+</sup>) durch NO zu Methämoglobin (MetHb; Fe<sup>3+</sup>) und Nitrat<sup>71,72</sup>.

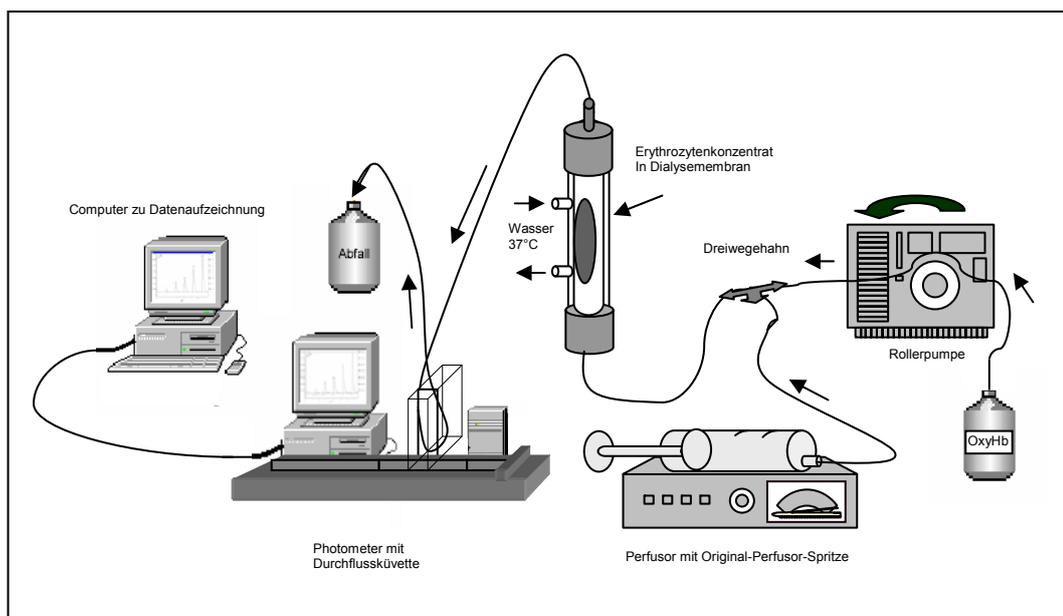


Die Bestimmung erfolgt über die Messung der Differenz zwischen der Messwellenlänge und einer Referenzwellenlänge. Die höchste Sensitivität wird durch Auswahl einer Messwellenlänge erreicht, bei der die Extinktionsdifferenz zwischen OxyHb und MetHb am größten ist (401 nm). Die Absorption dieser Wellenlänge wird von der Absorption des isosbestischen Punkt (411 nm) subtrahiert, um somit von apparativen und zeitlichen Schwankungen des Photometers und der Messlösung unbeeinflusst zu bleiben. Dieses Verfahren wird als Differenzspektrophotometrie bezeichnet. Als isosbestischer Punkt ist die Wellenlänge definiert, bei der die molaren Extinktionskoeffizienten zweier Substanzen, die ineinander überführbar sind, den gleichen Wert besitzen. Die NO-Bildung kann kontinuierlich durch die zeitabhängige Registrierung der Absorptionsänderung, ausgelöst durch Oxidation des Hämoglobins, beobachtet werden.

#### Messung im Durchflusssystem

Zur Messung der NO-Freisetzung wurde Erythrozytenkonzentrat (siehe 2.1.2) innerhalb eines Dialyseschlauchs (SpectrumLaboratories, Inc., Porengröße 25-30 Å, Carl Roth GmbH&Co, Karlsruhe, Deutschland) in eine auf 37°C temperierte Chromatographiesäule gegeben (Column 10/10 mit Adapter AC/10; Pharmacia, Freiburg). Die Erythrozyten wurden bei 37°C mit einem konstanten Fluss von 2 ml/min über eine IKA<sup>®</sup>-Schlauchpumpe (PASF, Janke&Kunkel, IKA-Labortechnik, Stauffen, Deutschland) mit der Oxyhämoglobin-Lösung umströmt. Es folgte eine kontinuierliche, zeitabhängige Registrierung der Extinktionsdifferenz mit Hilfe einer Durchflussküvette

(Schichtdicke 1 cm, QS 178-010, Hellma, Mühlheim, Deutschland) in einem Photodioden-Array-Spektralphotometer Beckman DU<sup>®</sup> 7500 Spectrophotometer (Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland). Interventionen mit L-Arginin und L-NMMA wurden mit einem konstanten Volumen von 2 ml/h mittels einer Spritzenpumpe (Infusomat Precidor; Infors AG, Basel, Schweiz) in das Schlauchsystem appliziert. Um die NO-Bildung quantitativ bestimmen zu können, wurde vor jeder Analyse der NO-Donator S-Nitrosoglutathion (GSNO; 100 µM) als Standard infundiert und die erythrozytäre NO-Synthese über die Fläche unter der Kurve berechnet. Zur Kontrolle erfolgte nach einer ca. 15 minütigen Aufzeichnung des Basissignals eine Perfusion der Erythrozyten mit PBS für ca. 20 Minuten. Zwischen den jeweiligen Infusionen lag eine Pause von 20 Minuten. Nach Erreichen der Basislinie wurden weitere Interventionen mit L-Arginin und L-NMMA durchgeführt.

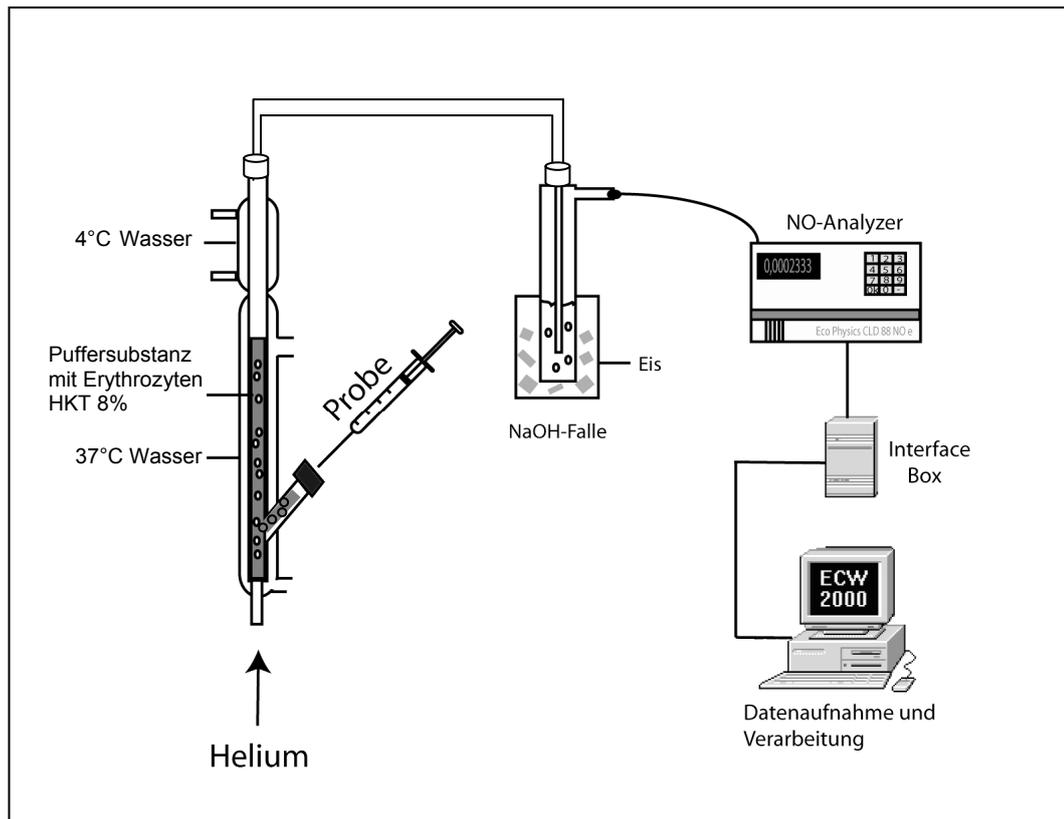


**Abb. 2.5:** Schematischer Aufbau des OxyHämoglobin-Assays

### 2.5.2 Nicht-reduktive-Chemilumineszenzdetektion

Als zweite Methode zum direkten Nachweis von NO aus Erythrozyten wurde die Nicht-reduktive-CLD verwendet. In die Injektionskammer wurde Erythrozytenkonzentrat (siehe 2.1.2) in PBS mit einem Hämatokrit (HKT) von 8% appliziert. Um Schaumentwicklung weitestgehend zu vermeiden, wurde

Silikon (Korasilon Entschäumer FT20, Bad Berleburg-Raumland, Deutschland) hinzugegeben. Das Reaktionsgefäß wurde während des Versuchszeitraums mit 37°C temperiertem Wasser umspült. Interventionen mit L-Arginin und L-NMMA erfolgten nach einer 5 minütigen Äquilibration des Messvorganges und wurden jeweils mit einem Volumen von 100 µl appliziert (siehe 2.3.2). Als Standard wurde zur Quantifizierung GSNO hinzu gegeben.



**Abb. 2.6:** Schematischer Aufbau zur Nicht-reduktiven-CLD

## 2.6 Methode zur Bestimmung von L-Arginin

### 2.6.1 Argininbestimmung im Plasma

Zur Separation und Quantifizierung von L-Arginin im Plasma wurde ein HPLC-Verfahren angewandt, das mit hoher Sensitivität L-Arginin nachweisen konnte. Die HPLC-Anlage bestand aus einer Doppelhubpumpe S 1100 mit einer aktiven Niederdruckmischkammer S 8110 (Sykam, Gilching, Deutschland) und einem eingeschleiften Handrheodyne 7125 (Rheodyne, Cotati CA, USA) mit 20 µl Injektionsschleife sowie einem kühlbaren

Probenaufgeber Triathlon (Spark Holland, Emmen, Niederlande). Die Fluoreszenzdetektion erfolgte mit einem Linear LC 304 (Reno, NE, USA), die Steuerung der Pumpen und des Lösungsmittelgradienten, die Datenaufnahme sowie die Integration mit dem AXXIOM-System 727 (Moorpark, CA, USA). Die Messungen wurden bei einer Exzitationswellenlänge  $\lambda=330$  nm und einer Emissionswellenlänge  $\lambda=450$  nm unter Verwendung einer 3,1  $\mu$ l Durchflusszelle und einer gepulsten Xenon-Lampe (4 W, Lampenfrequenz 20 Hz) durchgeführt. Als analytische HPLC-Säule wurde eine Hypersil ODS 125\*4,6 mm 3  $\mu$ m mit einer entsprechenden Vorsäule verwendet (Grom, Herrenberg, Deutschland). Durch eine Peltier-Kühlung S 4010 (Sykam, Gilching, Deutschland) wurde die Temperatur der HPLC-Säule konstant auf 20°C gehalten. Zur Elution der Aminosäuren von der stationären Phase wurde ein binäres Puffersystem verwendet. Der Grundpuffer bestand aus einem 12,5 mmol/L Natrium-Phosphatpuffer mit pH 7,2. Ein Teil dieses Grundpuffers wurde mit THF im Verhältnis 100:1,5 (V/V) vermischt und diente als Elutionspuffer A. Der restliche Grundpuffer wurde mit Methanol und ACN im Verhältnis 50:35:15 (V/V/V) versetzt und diente als Elutionspuffer B. In dem Verlauf einer HPLC-Analyse wurde der Elutionspuffer B zeitlich versetzt in prozentualen Anteilen dem Elutionspuffer A zugemischt. Dies diente der Erhöhung der Anteile organischer Lösungsmittel und damit der schnelleren Elution der Aminosäuren von der stationären Festphase. Zur Detektion der Aminosäuren mittels Fluoreszenz mussten die Proben zunächst mit o-Phthaldialdehyd derivatisiert werden. Die Proben wurden dann mittels Triathlon aufgegeben und vermessen.

## **2.7 Mathematisch-statistische Tests**

Von allen Daten werden Mittelwert $\pm$ Standardfehler (SE) nebst der Anzahl der Proben angegeben. Änderungen der biochemischen Parameter wurden durch den Mann-Whitney-U-Test erfasst (Computerprogramm SPSS® 12.0 für Windows, Chicago Ill., USA). Als statistisch signifikant galt ein p-Wert  $\leq 0,05$ . Zur graphischen Darstellung der Daten und der linearen Regression, insbesondere zur Erstellung der Eichgrade der Nitrit- und der

Nitratstandards, wurde das Computerprogramm MicroCal Origin<sup>®</sup> (Version 7.0 MicroCal Software Inc., North Hampton, MA, USA) verwendet.

### **2.7.1 Berechnung der NO-Syntheserate der Erythrozyten**

Die Berechnung der erythrozytären Syntheserate basierte auf physiologischen Größen und gemessene Werten.

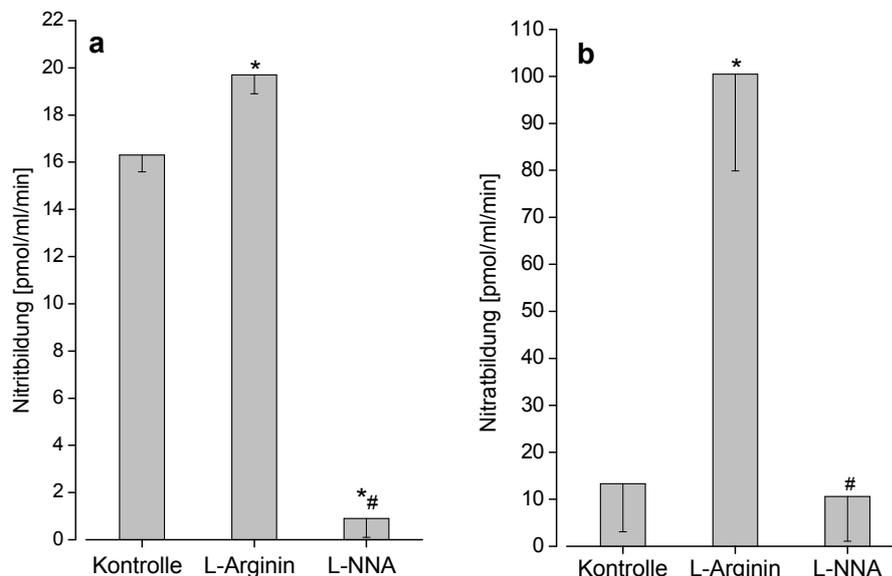
Bildung/Zelle= (Bildung)/ (Zellzahl/ml)

### 3. Ergebnisse

Um die Bildung erythrozytär gebildeten Stickstoffmonoxid abschätzen zu können, wurden oxidative Metabolite in Plasma und Vollblut, exportiertes NO aus Erythrozyten und die enzymatische Aktivität bestimmt und verglichen.

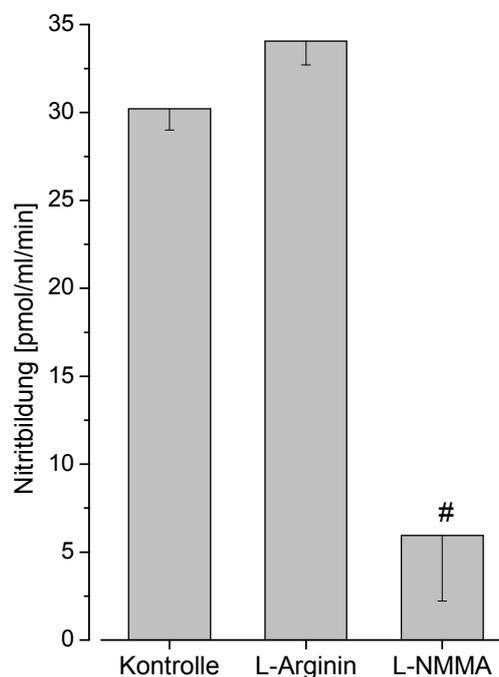
#### 3.1 NOx Metabolite

Die NO-Bildung aus Erythrozyten wurde über plasmatisches Nitrit und Nitrat mit der FIA bestimmt (jeweils n=6). Des Weiteren wurde NO direkt mittels OxyHämoglobin-Assay und Nicht-reduktiver-CLD gemessen. Nach Vollblutinkubation lag die Nitritbildung unter Kontrollbedingungen im Plasma bei  $16,3 \pm 0,7$  pmol/ml/min (Abb. 3.1a) und die Nitratbildung bei  $13,3 \pm 10,2$  pmol/ml/min (Abb. 3.1b). Sowohl die Nitrit- als auch die Nitratbildung konnten durch Zugabe von L-Arginin, dem Substrat der NOS, gesteigert werden: die Nitritbildung um ca. 20% auf  $19,3 \pm 0,8$  pmol/ml/min (Abb. 3.1a) und die Nitratbildung um ca. 655% auf  $100,6 \pm 20,6$  pmol/ml/min (Abb. 3.1b). Eine Inkubation mit dem spezifischen NOS-Inhibitor L-NNA hob das basale Signal im Vergleich zur Kontrolle fast vollständig auf: Nitrit  $0,9 \pm 0,8$  pmol/ml/min (Abb. 3.1a), Nitrat  $10,6 \pm 9,5$  pmol/ml/min (Abb. 3.1b).



**Abb. 3.1: Plasmatisches  $\text{NO}_2^-$  als auch  $\text{NO}_3^-$  steigt in Abhängigkeit der erythrozytären NOS an.** Bildung von Nitrit (Abb.a) und Nitrat (Abb.b), gemessen im Plasma nach humaner Vollblutinkubation mit PBS (Kontrolle), L-Arginin und L-NNA. \* zeigt einen signifikanten Unterschied zur Kontrolle, # einen signifikanten Unterschied zur Inkubation mit L-Arginin.

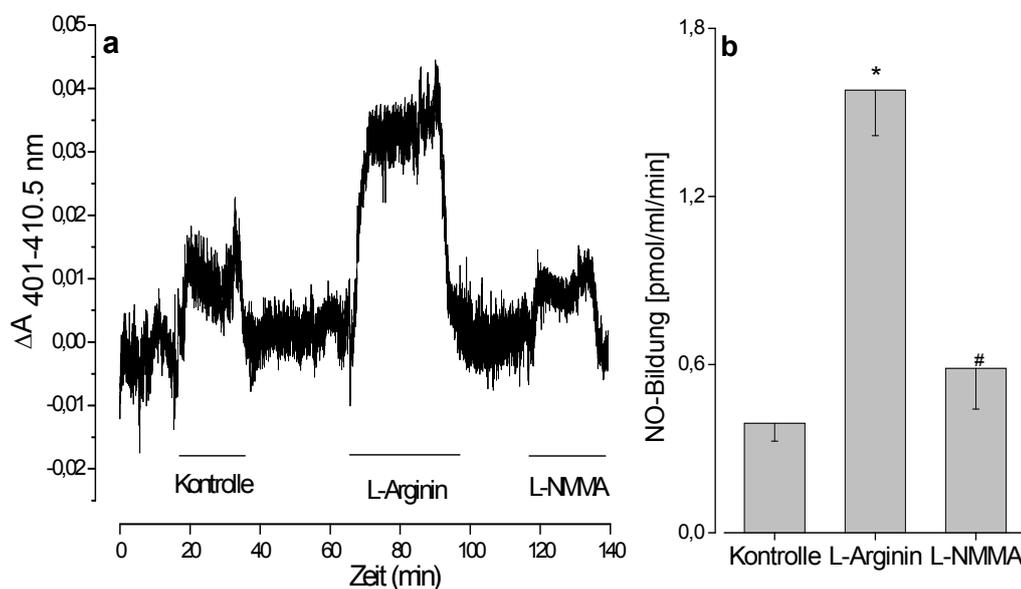
Die in 3.1 dargestellte Syntheserate bezog sich ausschließlich auf die NO-Bildung aus den Erythrozyten gemessen im Plasma. Diese Untersuchungen schlossen die intrazelluläre NO-Bildung in Abhängigkeit der erythrozytären NOS nicht ein. Durch die Vollblutnitritbestimmung mittels Reduktiver-CLD (n=3) konnte neben dem ins Plasma exportierten Nitrit das intrazelluläre Nitrit bestimmt werden. Die PBS-inkubierten Proben ergaben eine Syntheserate von  $30,21 \pm 1,2$  pmol/ml/min. L-Arginin-Stimulation führte zu einer Steigerung der Bildungsrate auf  $34,06 \pm 1,3$  pmol/ml/min. Durch die Zugabe von L-NMMA konnte das basale Signal stark reduziert werden [ $5,95 \pm 3,7$  pmol/ml/min].



**Abb. 3.2: Vollblutnitritkonzentration in Abhängigkeit erythrozytärer NO-Bildung.** Bildung von Nitrit gemessen in humanem Vollblut mittels CLD nach Inkubation mit PBS (Kontrolle), L-Arginin (Substrat) und L-NMMA (als NOS-spezifischer Inhibitor). # zeigt einen signifikanten Unterschied zur Inkubation mit L-Arginin an.

NO wurde direkt über den OxyHb-Assay gemessen (n=4). Die Stimulation der erythrozytären NOS mit L-Arginin führte zu einer signifikanten Steigerung der NO-Bildung (siehe Abb. 3.3a) von basal  $1,20$  pmol/ml/min auf  $2,82$  pmol/ml/min. L-NMMA inhibierte die NO-Synthese und diese sank auf  $1,54$  pmol/ml/min.

Die Ergebnisse des OxyHb-Assays konnten durch den ebenfalls direkten Nachweis einer erythrozytären NO-Synthese mittels Nicht-reduktiver-CLD bestätigt werden (n=4). Erythrozyten wurden mit PBS, L-Arginin und L-NMMA versetzt. Durch Zugabe von PBS konnte eine NO-Bildung von  $0,39 \pm 0,06$  pmol/ml/min detektiert werden. Die L-Arginin-Stimulation führte zu einer signifikant gesteigerten NO-Bildung von  $1,58 \pm 0,16$  pmol/ml/min im Gegensatz zu einer Inkubation mit L-NMMA mit einer verminderten NO-Synthese von  $0,59 \pm 0,15$  pmol/ml/min.



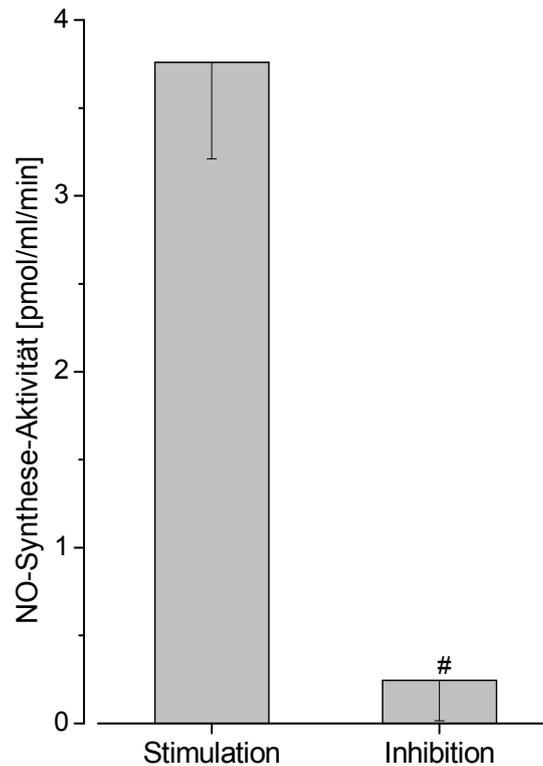
**Abb. 3.3: NO-Export aus Erythrozyten.** a) Originalregistrierung des OxyHämoglobin-Assays im Durchflusssystem. Absorptionsänderung der Umwandlung von Oxy- zu MethHb. Infusionen (2 ml/min) mit PBS (Kontrolle), Stammlösungen mit L-Arginin oder L-Arginin in Kombination mit dem spezifischen NOS-Inhibitor L-NMMA in den laufenden Fluss führten zu einer selektiven Absorptionsänderung im Oxyhämoglobinsignal. b) NO-Bildung ausgehend von Erythrozyten wurde mittels Nicht-reduktiver-CLD mit einem HKT von 8% in PBS unter Zugabe von PBS (Kontrolle), L-Arginin und L-NMMA erfasst. \* zeigt einen signifikanten Unterschied zur Kontrolle, # einen signifikanten Unterschied zur Inkubation mit L-Arginin an.

## 3.2 Charakterisierung der erythrozytären NOS-Aktivität

### 3.2.1 Substratumsatz

Ein unabhängiger Nachweis einer NOS-Aktivität im Erythrozyten wurde zusätzlich durch den Umsatz von L-Arginin zu L-Citrullin über den Citrullin-Assay erbracht. Für diesen Assay wurden aufgereinigte Erythrozytenmembranen (Ghosts) verwendet, um Artefakte durch Hämoglobin zu

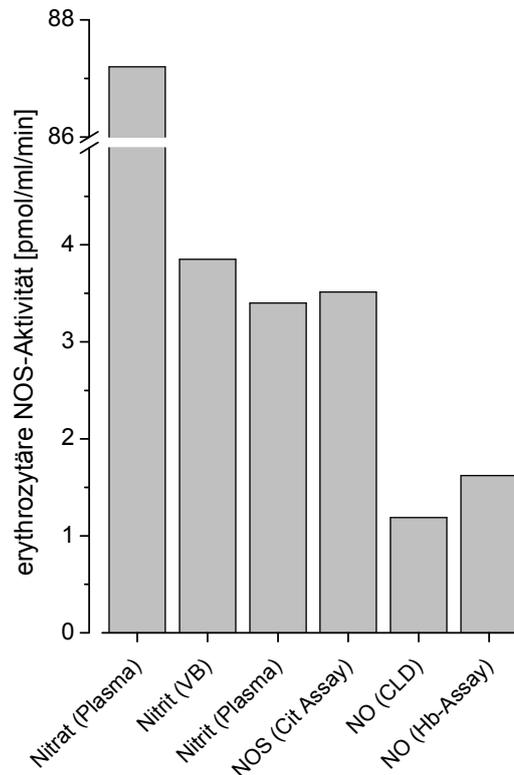
vermeiden. Die Messung ergab für die [<sup>3</sup>H]-L-Arginin-stimulierte Probe einen signifikanten Unterschied von 1473,5±214,9 cpm (Counts Per Minute) zur inhibierten Probe mit 98,3±90,4 cpm. Dies entsprach einem Umsatz der stimulierten Probe von 3,76±0,55 pmol/ml/min und 0,25±0,23 pmol/ml/min für die inhibierte Probe (siehe Abb. 3.4).



**Abb. 3.4: NOS-Aktivität in der Erythrozytenmembran.** Enzymatische Umsetzung gemessen mittels Citrullin-Assay; Stimulation durch Zugabe von [<sup>3</sup>H]-L-Arginin als Substrat, Inhibition durch zusätzliche Gabe des spezifischen NOS-Inhibitor L-NNA. # zeigt einen signifikanten Unterschied der inhibierten zur stimulierten Probe an.

In Abbildung 3.5 erfolgt eine Gegenüberstellung der Aktivität der erythrozytären NOS, ermittelt durch die verschiedenen Bestimmungsmethoden. Die Aktivität ist als Differenz zwischen basalen nicht-stimulierten und stimulierten Proben dargestellt. Die Nitratbildung wurde um 87,2 pmol/ml/min und Nitrit um 3,4 pmol/ml/min gesteigert. Durch die Messung mittels Nicht-reduktiver-CLD konnte eine Steigerung der NO-Bildung um 1,19 pmol/ml/min und im OxyHb-Assay ein Wert von 1,62 pmol/ml/min detektiert werden. Die Umwandlung von L-Arginin zu L-Citrullin im Citrullin-Assay ergab nach Stimulation der Probe eine Zunahme der Verstoffwechslung von 3,51 pmol/ml/min im Gegensatz zur inhibierten Probe. Die Inkubation und

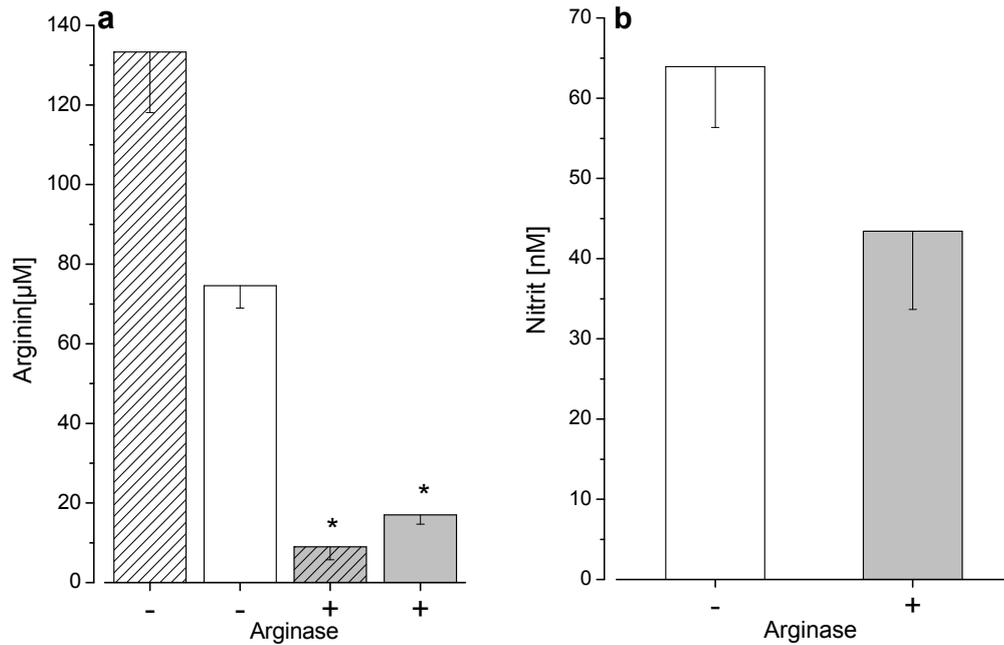
direkte Nitritbestimmung von Vollblut ergab eine Steigerung der Syntheserate von 3,85 pmol/ml/min.



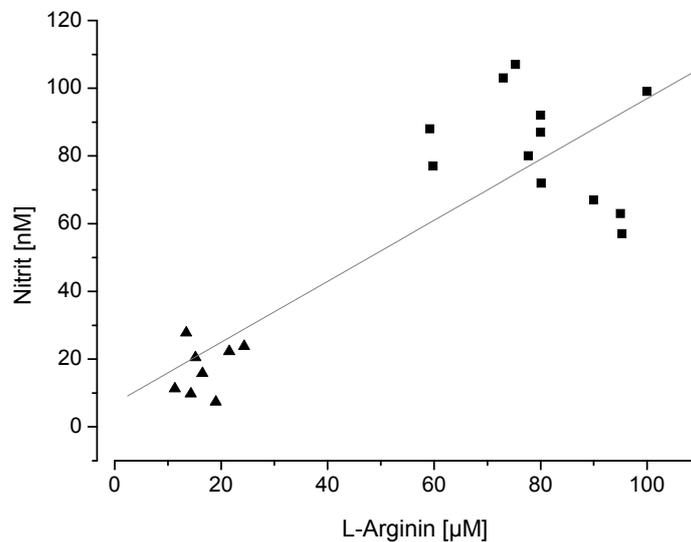
**Abb. 3.5: Abschätzung der NO-Synthese des Erythrozyten.** NOS-Aktivität in Erythrozyten dargestellt als Steigerung der NO-Bildungsrate bzw. Anstieg der NOx-Metabolite in pmol/ml/min nach Intervention mit L-Arginin.

### 3.2.2 Einfluss der endogenen Substratkonzentration

In humanem Vollblut ist ein endogener L-Argininspiegel von  $91,3 \pm 3,5 \mu\text{M}$  vorhanden. In diesem Versuchsansatz wurde parallel zur Bestimmung der Arginase-Aktivität via  $\text{NO}_2^-$  (n=13) die L-Argininkonzentration (n=7) bestimmt. Die endogene L-Argininkonzentration (Abb. 3.6a) zeigte eine Reduktion von  $74,6 \pm 5,6 \mu\text{M}$  um ca. 75% auf  $17 \pm 2,3 \mu\text{M}$  durch Arginasezusatz. Unter L-Argininverarmung wurden ca. 32% [Kontrolle:  $63,9 \pm 7,6 \text{ nM}$ ; Arginase:  $43,4 \pm 9,75 \text{ nM}$ ] (siehe Abb. 3.6b) weniger Nitrit gebildet. Die L-Argininkonzentration im Erythrozyten ohne Zugabe von Arginase ergab einen Wert von  $133,3 \pm 15,2 \mu\text{M}$ . Im Gegensatz dazu fand eine Reduktion der L-Argininkonzentration nach Substitution von Arginase auf  $9,02 \pm 3,3 \mu\text{M}$  statt.



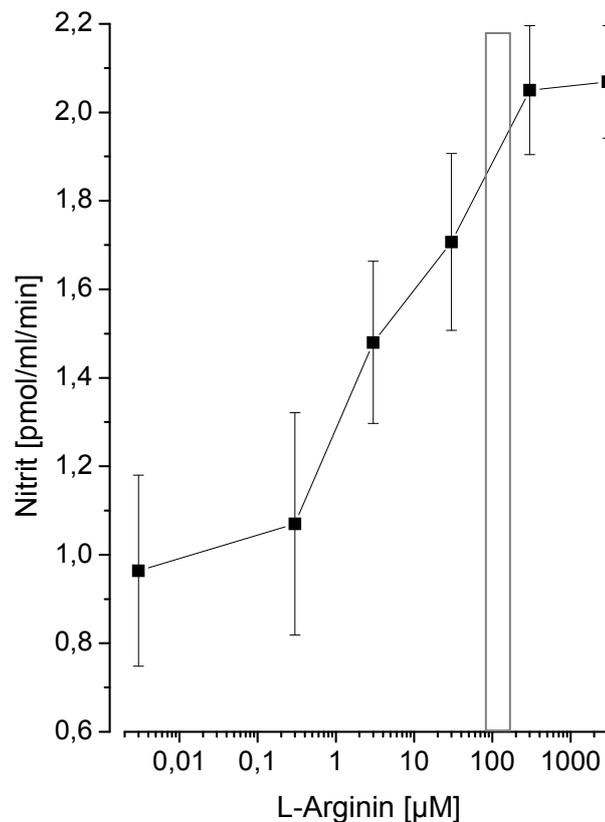
**Abb. 3.6: Substratreduktion vermindert Syntheseumsatz.** **a)** Bestimmung der L-Argininkonzentration ohne (-; weiß) und mit (+; grau) Zugabe von Arginase zu Vollblut. Bestimmung der L-Argininkonzentration im Erythrozyten (schraffiert) und im Plasma mittels HPLC. \* zeigt einen signifikanten Unterschied zum Basalwert (-) an. **b)** Nitritkonzentration in humanem Vollblut nach Inkubation ohne (-) oder mit (+) Applikation von Arginase, gemessen mittels CLD im plasmatischen Überstand.



**Abb. 3.7: Korrelation zwischen Substratangebot und Syntheserate.** Zusammenhang zwischen Reduktion der endogenen L-Arginin-Konzentration durch Zugabe von Arginase (▲) und resultierender Verminderung von Nitrit, als Marker der NO-Synthese.

### 3.2.3 Abhängigkeit der erythrozytären NOS-Aktivität von der Substratkonzentration

Durch eine Variation in der Substratkonzentration sollte eine Dosis-Wirkungs-Kurve der Syntheseaktivität untersucht werden (n=10). Nach Verarmung der endogenen L-Argininkonzentration durch Arginase wurde Vollblut mit L-Arginin in logarithmisch aufsteigenden Konzentrationen versetzt. Nach einer geringen Steigerung im Bereich von 0 bis 0,3  $\mu\text{M}$  von  $0,96 \pm 0,216$  pmol/ml/min auf  $1,07 \pm 0,251$  pmol/ml/min folgte ein fast exponentieller Anstieg der NO-Synthese bis zu einer L-Arginin-Konzentration von 300  $\mu\text{M}$  und einem daraus resultierenden Anstieg der erythrozytären Syntheserate auf  $2,05 \pm 0,146$  pmol/ml/min. Bei weiterer Erhöhung der Substratkonzentration [3000  $\mu\text{M}$ ] kam es nur noch zu einer geringen Steigerung der Aktivität auf  $2,07 \pm 0,127$  pmol/ml/min (siehe Abb. 3.8). Der Bereich der physiologischen L-Argininkonzentration lag im Plasma bei  $91,3 \pm 3,5$   $\mu\text{M}$  und im Erythrozyten bei  $133,3 \pm 15,2$   $\mu\text{M}$ .



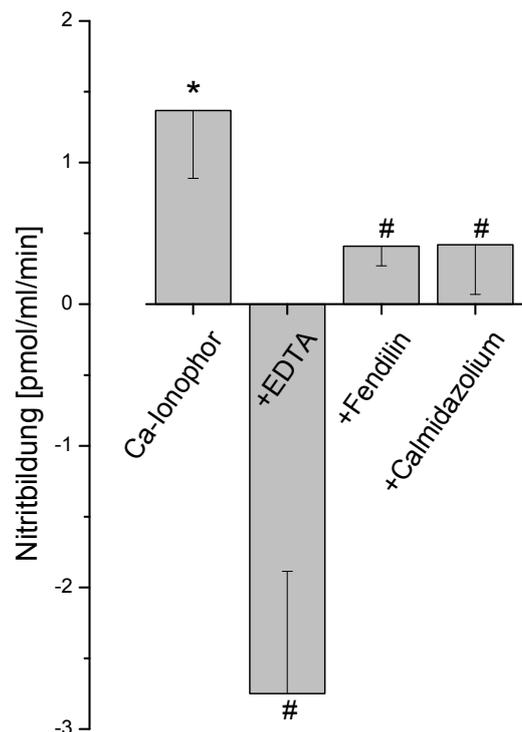
**Abb. 3.8: Aktivitätsabhängigkeit von der Substratkonzentration.** Bestimmung von Nitrit im plasmatischen Überstand mittels Reduktiver-CLD nach Inkubation von humanem Vollblut mit L-Arginin in aufsteigenden Konzentrationen. Der Bereich der physiologischen L-Arginin-Konzentration im Plasma und im Erythrozyten ist markiert.

### 3.3 Regulationsmechanismen der erythrozytären NOS

Die  $\text{Ca}^{++}$ /CaM-abhängige und unabhängige Aktivierung der erythrozytären NOS sowie die unabhängige Aktivierung (Phosphorylierung von  $\text{Ser}^{1177}$  der NOS) wurden in dieser Arbeit untersucht. Als Marker der NOS-Aktivität wurde Nitrit verwendet.

#### 3.3.1 Aktivitätsabhängigkeit von $\text{Ca}^{++}$ /CaM

Die Zugabe von Ca-Ionophor ( $5 \mu\text{M}$ ) führte zu einer zusätzlichen Stimulation der Nitritbildung um  $1,37 \pm 0,48 \text{ pmol/ml/min}$ . Die Inkubation mit dem  $\text{Ca}^{++}$ -Chelator EDTA ( $5 \mu\text{M}$ ) reduzierte die Nitritbildung um  $2,75 \pm 0,86 \text{ pmol/ml/min}$  (siehe Abb. 3.9) im Vergleich zum Basalwert. Eine Inkubation mit den spezifischen CaM-Antagonisten Fendilin ( $50 \mu\text{M}$ ) und Calmidazolium ( $15 \mu\text{M}$ ) reduzierte die durch Ca-Ionophor stimulierte Nitritbildung auf  $0,41 \pm 0,14 \text{ pmol/ml/min}$  und  $0,42 \pm 0,35 \text{ pmol/ml/min}$  ( $n=4$ ).



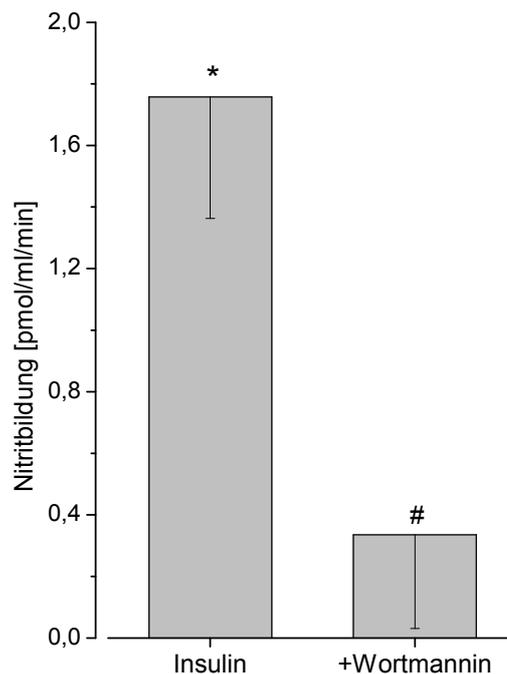
**Abb. 3.9: CaM-abhängige Regulation im Erythrozyten.** Nitritbildung aus einer Inkubation von Vollblut mit Ca-Ionophor oder Ca-Ionophor plus EDTA, plus Fendilin oder plus Calmidazolium. Dargestellt ist die veränderte Syntheserate nach Intervention im Vergleich zum Basalwert gemessen mittels Reduktiver-CLD im plasmatischen Überstand. \* zeigt einen signifikanten Unterschied zur Kontrolle, # einen signifikanten Unterschied der inhibierten zur stimulierten Probe.

### 3.3.2 Aktivität der erythrozytären NOS in Abhängigkeit von der Phosphorylierung an Serin<sup>1177</sup>

Die Aktivitätsabhängigkeit der erythrozytären NOS von einer Phosphorylierung wurde sowohl durch einen biochemischen als auch durch einen immunhistochemischen Nachweis erbracht.

#### 3.3.2.1 Biochemischer Nachweis einer Phosphorylierung

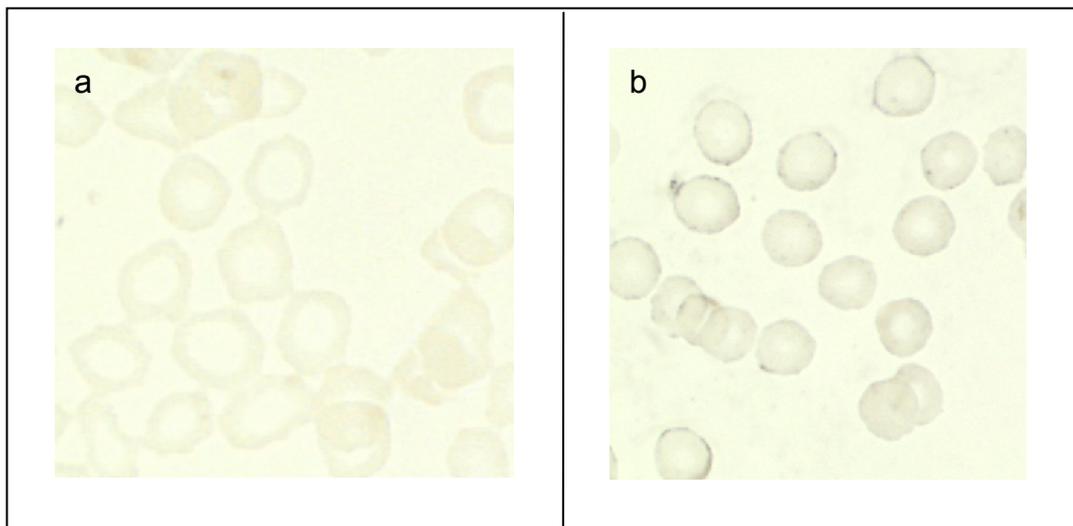
Humanes Vollblut wurde, zusätzlich zu L-Arginin, mit Insulin oder Insulin in Kombination mit Wortmannin inkubiert (n=6). Insulin [27,5 µU], ein Stimulus der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI<sub>3</sub>-Kinase) und dort Auslöser der NOS-Phosphorylierung führte zu einer Steigerung der Nitritsyntheserate um 1,76±0,4 pmol/ml/min im Gegensatz zur basalen Nitritbildung. Der Zusatz von Wortmannin [20 nM], einem Inhibitor der PI<sub>3</sub>-Kinase, führte zu einer Differenz der Bildung zum Basalwert von 0,34±0,3 pmol/ml/min.



**Abb. 3.10: Abhängigkeit der erythrozytären NOS-Aktivität von einer Phosphorylierung.** Dargestellt ist die veränderte Syntheserate nach Interventionen mit L-Arginin, dem Substrat der erythrozytären NOS, und Zugabe von Insulin oder Wortmannin, gemessen im plasmatischen Überstand mittels Reduktiver-CLD. \* zeigt einen signifikanten Unterschied zur Kontrolle, # einen signifikanten Unterschied der inhibierten zur stimulierten Probe.

### 3.3.2.2 Immunzytochemischer Nachweis einer Phosphorylierung

Neben dem biochemischen Nachweis einer Stimulierbarkeit der NOS-Aktivität durch Insulin wurde in Erythrozyten die NOS-Phosphorylierung von Ser<sup>1177</sup> durch Vollblutinkubation immunzytochemisch untersucht (n=12). Bei einer Detektion von P-eNOS Ser<sup>1177</sup> zeigte sich eine Phosphorylierung der eNOS an Ser<sup>1177</sup> nach Insulinbehandlung im Erythrozyten, während die Kontrollen negativ waren. Die Insulinstimulation führte durch eine Phosphorylierung an Ser<sup>1177</sup> zu einer Verstärkung des Signals um 175%. Im Vergleich ergab die Darstellung von P-eNOS Ser<sup>116</sup> unter Insulinstimulation eine Reduktion des Signals um 52% (n=5).



**Abb. 3.11: Translokation der NOS nach Phosphorylierung.** Eine Phosphorylierung der endothelialen NOS an Ser<sup>1177</sup> wurde nach Inkubation von Erythrozyten mit Insulin zum Nachweis einer Aktivitätsabhängigkeit durchgeführt. Abbildung **a** zeigt die negativen Kontrollerythrozyten, wohingegen Abbildung **b** eine Phosphorylierung der eNOS an Ser<sup>1177</sup> nach Insulinbehandlung zeigt.

#### **4. Diskussion**

Im einleitenden Abschnitt erfolgt eine kurze Abhandlung der Literatur zur erythrozytären NOS und aktuellen Forschungsergebnissen der eigenen Arbeitsgruppe, auf die in den jeweiligen Kapiteln spezifisch eingegangen wird. Diese beinhalten eine quantitative Abschätzung der NO-Synthese im Erythrozyten, die Regulation der erythrozytären NOS hinsichtlich bekannter endothelialer Mechanismen und die Diskussion über eine mögliche physiologische Relevanz.

In der Literatur waren widersprüchliche Hinweise auf eine NOS im Erythrozyten zu finden. Deliconstantinos et al. beschrieben als erste eine im Erythrozyten lokalisierte NO-Bildung<sup>66</sup>. Seitdem wurde die Frage nach dieser vor allem durch Untersuchungen zur Enzymaktivität kontrovers diskutiert. Weitere Hinweise, die eine mögliche Existenz einer erythrozytären NOS unterstützen, lassen sich in der Literatur finden. So konnte im Erythrozyten ein Enzym identifiziert werden, welches die physiologischen NOS-Inhibitoren ADMA und L-NMMA durch Hydrolyse abbauen kann. ADMA und L-NMMA wurden bei vielen pathophysiologischen Prozessen wie essentieller Hypertonie, Arteriosklerose, chronischem Nierenversagen und anderen nachgewiesen.

Basierend auf den vorliegenden Daten konnte die in der Literatur kontrovers diskutierte Expression einer NOS im Erythrozyten in Voruntersuchungen der Arbeitsgruppe nachgewiesen werden. Die im Erythrozyten identifizierte NOS wurde durch eine gemessene  $\text{Ca}^{++}$ -Abhängigkeit als konstitutive NOS differenziert. In Übereinstimmung mit den biochemischen Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe und am Modell der eNOS-Knock-Out-Maus konnte die NOS als endotheliale Isoform charakterisiert werden. Durch den Einsatz Blutzell-spezifischer Antikörper konnte die eNOS-Expression erstmalig eindeutig den Erythrozyten zugeordnet und der fehlende Transkriptionsnachweis für die eNOS im Erythrozyten erbracht werden. Die katalytische Aktivität einer konstitutiven NOS wurde durch die extrazelluläre NO-Freisetzung und dadurch bedingte Veränderungen in der Nitrit- und

Nitratkonzentration festgestellt. Die NO-Bildung konnte eindeutig einer NOS-Aktivität zugeordnet werden, da diese NOS-spezifisch stimulierbar, inhibierbar und abhängig von Kofaktoren war. In Untersuchungen von Kleinbongard et al.<sup>73</sup> konnte nachgewiesen werden, dass NO im Blut in Form von gebundenem NO gespeichert und bioaktiv transportiert wird. Durch die Inkubation von Erythrozyten mit L-Arginin-haltigem Plasma wurde gezeigt, dass erythrozytär synthetisiertes NO plasmatische NO-Speicher auffüllen und damit NO bioaktiv konserviert im Plasma zur Verfügung stellen kann.

In der vorliegenden Arbeit erfolgte erstmalig eine vollständige quantitative Abschätzung des, von der erythrozytären NOS, synthetisierten bioaktiven NO. Die für die endotheliale Isoform der NOS bekannten Regulationsmechanismen konnten durch Untersuchungen der  $\text{Ca}^{++}$ -Abhängigkeit durch Regulation über CaM, den  $\text{Ca}^{++}$ -unabhängigen Mechanismus über Proteinmodifikationen sowie eine Abhängigkeit von der Substratkonzentration für die erythrozytäre NOS bestätigt werden.

#### **4.1 Quantitative Abschätzung der NO-Synthese im Erythrozyten**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zur quantitativen Abschätzung der erythrozytären NO-Synthese die NO-Metabolite Nitrit und Nitrat, der Substratumsatz und die direkte NO-Synthese bestimmt.

In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass die Nitritkonzentration im Plasma einen Index für die NOS-Aktivität darstellt<sup>47,74-76</sup>. Diese These wurde unterstützt durch die Beobachtung, dass 70-90% der zirkulierenden Nitritspiegel humaner eNOS-Aktivität entstammen<sup>30,31</sup>. Zur Charakterisierung der NOS-Aktivität des Erythrozyten wurde Nitrit als sensibler Marker für die akute eNOS-Aktivität herangezogen. Die Bestimmung von plasmatischen Nitritkonzentrationen zum Nachweis einer erythrozytären NO-Synthese wurde in Vorversuchen bereits erbracht und konnte im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden. Zusätzlich zu der Nitritbestimmung im Plasma wurde erstmalig die Nitritkonzentration im Vollblut bestimmt. Da die genaue Lokalisation der NOS bislang noch unbekannt ist und daraus folgend die Richtung in die das synthetisierte NO abgegeben wird, ist die Bestimmung

der intrazellulären Nitritkonzentration für eine quantitative Abschätzung wichtig. Die Nitritbildung in Vollblut und Plasma unter stimulierten Bedingungen ist jedoch vergleichbar, so dass eine uneingeschränkte Nitritdiffusion zwischen Zytosol und Extrazellulärraum anzunehmen ist.

In der Literatur wurde eine Stimulation von Erythrozyten mit dem NOS-Substrat L-Arginin nachgewiesen, unter der die Umwandlung von L-Arginin zu L-Citrullin zunahm<sup>68</sup>. Kang et al.<sup>67</sup> interpretierten die Verstoffwechslung des [<sup>3</sup>H]-markierten L-Arginins in Erythrozyten als Arginase-Aktivität, da diese nicht mit NOS-Inhibitoren, sondern mit dem Arginase-Inhibitor Norvalin zu unterdrücken war. Der Citrullin-Assay wurde im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls als spezifischer Marker für die NO-unabhängige NOS-Aktivität verwendet<sup>76</sup>. Unter Arginaseinhibition wurden Erythrozytenmembranen mit radioaktiv markiertem L-Arginin stimuliert. Nach Substitution des Substrates L-Arginin war eine deutliche Verstoffwechslung zu L-Citrullin nachzuweisen. Die Aktivität konnte durch den NOS-Inhibitor L-NNA signifikant reduziert werden. Der Nachweis einer spezifischen Synthese-Aktivität in der erythrozytären Membran, läßt annehmen, dass die NOS im aktivierten Zustand in dieser lokalisiert ist (siehe 4.2; Translokation durch Phosphorylierung). Die Interpretation der Ergebnisse von Kang et al.<sup>67</sup> konnten durch die, im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen, widerlegt werden. Zur Lokalisation der NOS im Erythrozyten sind aus der bisherigen Literatur folgende Informationen zu entnehmen: Die Untersuchungen von Chen und Mehta<sup>68</sup> wurden sowohl an homogenisierten Zellfraktionen als auch dem Zytosol durchgeführt. Durch die Lyse der Erythrozyten wurde die Arginase-Aktivität erhöht und parallel gingen durch metabolische Prozesse die Kofaktoren verloren<sup>77</sup>. Es besteht die Möglichkeit, dass die für die NOS benötigten Kofaktoren, wie FAD und BH<sub>4</sub> während der Homogenisierung zerstört<sup>77</sup> und nicht substituiert wurden. Da aber zum Nachweis der katalytischen Aktivität der erythrozytären NOS weder essentielle Kofaktoren, noch ausreichend Substrat hinzugegeben wurden, ist eine Lokalisation der NOS im Erythrozyten, im von Chen und Metha angewandten Versuchsprotokoll, angreifbar.

Nitrat kann aufgrund von Voruntersuchungen der Arbeitsgruppe nur unter kontrollierten Bedingungen (siehe 1.3) und ausschließlich als Parameter für chronische Veränderungen eingesetzt werden. Da es sich bei den *in vitro* Versuchen zur erythrozytären NOS ausschließlich um das geschlossene System Vollblut handelte, welches unabhängig von potentiellen Einflussfaktoren (siehe 1.3) blieb, ist anzunehmen, dass die Nitratbildung in diesem System spezifisch für die NOS-Aktivität ist. Die Syntheserate von Nitrat war im Gegensatz zu NO und Nitrit sehr deutlich erhöht (siehe Abb. 3.5), konnte aber durch die Möglichkeit einer spezifische Inhibition der erythrozytären Genese zugeordnet werden. Die Nitratbildung nach Stimulation war ca. 25-fach höher, als die mittels Citrullin-Assay bestimmte Syntheserate. Eine Erklärung der erhöhten Werte könnte in der intraindividuellen Variabilität der Nitratkonzentration begründet sein. Aus der Schwankung resultiert eine hohe Standardabweichung, die unabhängig von der minimalen Auflösung (100 nM) der Nitratbestimmung zur verminderten Sensitivität dieses „Markers“ führt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde NO aus stimulierten Erythrozyten erstmals direkt bestimmt, um die bioaktiv exportierten Anteile abschätzen zu können. Ausgehend von der erythrozytären NOS-Aktivität (detektiert über Citrullin-Assay und Nitritbildung) konnte der Anteil des bioaktiv exportierten NO auf 40% abgeschätzt werden. Der Mechanismus des Exportes von endogen synthetisiertem NO aus dem Erythrozyten ist unbekannt. Möglich wäre, dass NO aktiv durch AE1-Transporter<sup>78</sup> über die erythrozytäre Membran transportiert wird<sup>30</sup>. Um den Transport weiter zu untersuchen, könnten Inhibitoren des AE1-Transporters, DIDS (Disodium 4,4'-diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonate) und BS<sup>3</sup> (Bis[Sulfosuccinimidyl]suberate), eingesetzt werden.

#### **4.2 Regulationsfaktoren der erythrozytären NOS**

Die Regulation der erythrozytären NOS wurde unter der Annahme einer endothelialen Isoform untersucht, die in einem Ca<sup>++</sup>-abhängigen und einem Ca<sup>++</sup>-unabhängigen Mechanismus unterschieden wird. Typische

Regulationsfaktoren des  $\text{Ca}^{++}$ -abhängigen Weges sind extrazelluläre Signale oder rezeptorabhängige physiologische Stimulatoren (siehe 1.1)<sup>11</sup>. Die  $\text{Ca}^{++}$ -Abhängigkeit konnte bezüglich der erythrozytären NOS in Vorversuchen bereits bestätigt werden. Im Folgenden konnte die Regulation über CaM hinsichtlich spezifischer inhibitorischer Faktoren weiter differenziert werden. Neben einem  $\text{Ca}^{++}$ -abhängigen Regulationsmechanismus wurde in den letzten Jahren eine  $\text{Ca}^{++}$ -unabhängige Regulation der eNOS-Aktivität über eine Phosphorylierung von Ser<sup>1177</sup> festgestellt<sup>23,24,79</sup>. Wichtige Stimuli für eine schnelle Aktivierung der eNOS in der Endothelzelle sind shear-stress, Östrogen<sup>80</sup>, VEGF<sup>23,25</sup>, Insulin<sup>81</sup> oder Bradykinin<sup>26</sup>. Die Phosphorylierung wurde ebenfalls biochemisch und immunzytochemisch hinsichtlich einer erythrozytären eNOS-Aktivität untersucht.

Die Syntheseaktivität der NOS ist erheblich von der Substratkonzentration abhängig. Bei der endothelialen NOS ist eine Stimulation der NO-Synthese nur nach vorheriger Arginindepletion möglich. Eine Reduktion der endogenen Arginkonzentration im Vollblut durch exogen hinzugefügte Arginase führte zu einer verminderten Synthese von Nitrit. Substitution von Arginin resultierte in einem deutlichen Anstieg der Enzymaktivität, gemessen in einer Korrelation zwischen Substratkonzentration und Produkt. Diese Ergebnisse konnten weiter durch eine Untersuchung zur Dosis-Wirkungs-Beziehung differenziert werden. Definitive Mengen exogenen L-Arginins wurden hinsichtlich einer Aktivitätszunahme der erythrozytären NOS untersucht. Es wurde festgestellt, dass supraphysiologische Konzentrationen von L-Arginin zu einer weiteren Aktivitätszunahme der NO-Synthese führten. Proben, die zuvor nicht an L-Arginin verarmt wurden zeigten eine weniger deutliche Aktivitätszunahme (siehe Abb. 3.1a). Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Enzymaktivität im Erythrozyten von der Substratkonzentration im umgebenden Medium abhängig ist. Aufgrund dieser Korrelation und der Möglichkeit einer weiteren Stimulation durch Substitution von L-Arginin ist davon auszugehen, dass es sich bei diesem Mechanismus um eine weitere Form der erythrozytären Regulation der NOS handelt.

Die L-Argininkonzentration im Erythrozyten entspricht der des Plasmas und ist geringer als die der Endothelzelle<sup>82</sup>. Des Weiteren besitzen Erythrozyten alle wichtigen Enzyme des L-Argininmetabolismus, wie die Arginase, Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase (Enzym, welches den endogenen Inhibitor der NOS metabolisiert)<sup>83</sup> und CAT-Transporter<sup>84</sup>. Spekulativ könnten Erythrozyten somit in der Lage sein ihre NOS-Aktivität selbst zu regulieren.

### **Erythrozytäre Proteinkinasen**

Humane Erythrozyten besitzen Proteinkinasen, die auf Membranproteine wirken. Diese Proteinkinasen sind ebenfalls in die Regulationswege der endothelialen NO-Synthese integriert.

Die PKC im Erythrozyten ist  $\text{Ca}^{++}$ -abhängig<sup>85</sup> und wird durch Agonisten induziert. Der Einfluss einer Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{++}$ -Konzentration, z.B. durch Ca-Ionophor A23187<sup>86</sup> bewirkt eine Translokation vom Zytosol hin zur Plasmamembran. Bei Patienten mit primärem Hypertonus<sup>87</sup> war der zytosolische Gehalt im Erythrozyten an PKC im Gegensatz zu gesunden Probanden deutlich erhöht. Betrachtet man in diesem Zusammenhang die Ergebnisse der, von einer  $\text{Ca}^{++}$ -Erhöhung abhängigen Zunahme der erythrozytären NO-Synthese, so stellt sich die Frage, ob eine Erhöhung der zytosolischen PKC-Konzentration bei Patienten mit Hypertonie eine Reaktion der Erythrozyten auf die erhöhten Scherkräfte im kapillären Strombett darstellt oder sogar die Ursache des primären Hypertonus in einer fehlerhaften NO-Synthese zu suchen ist.

Alle bekannten Regulationsmechanismen der eNOS auf Proteinebene durch posttranslationale Modifikationen (Phosphorylierung, Alkylierung) und Proteininteraktionen (Caveolin, Calmodulin, HSP 90, NOSIP, G-Protein-Rezeptor, Dynamin, Kinasen und Phosphatasen)<sup>88;89</sup> sind im Erythrozyten beschrieben<sup>90</sup>. Ob diese auch bei der Regulation der erythrozytären eNOS eine Rolle spielen könnten, ließ sich jedoch nicht ableiten.

### **Ca<sup>++</sup>/CaM-vermittelte Regulation**

CaM ist ebenfalls im Zytosol von Erythrozyten in mikromolaren Konzentrationen lokalisiert<sup>91,92</sup>. Die Literaturlage zu CaM-Bindungsstellen in Erythrozyten ist different: Es wird von bis zu 5000 CaM-Bindungsstellen pro Erythrozyten-Ghost ausgegangen<sup>93</sup>. CaM-Bindung an Erythrozyten ist Ca<sup>++</sup>-abhängig<sup>94</sup> und liegt maximal bei einer Konzentration von  $4 \times 10^{-7}$  mol/l. Die erste identifizierte Funktion dieses Proteins im Erythrozyten war die Regulation der Ca<sup>++</sup>-ATPase, welche für die Aufrechterhaltung der intrazellulären Ca<sup>++</sup>-Konzentration verantwortlich ist<sup>95</sup>. Aufgrund der Wichtigkeit dieses Proteins in vielen biologischen Regulationswegen und der fast 20-fach höheren Konzentration, als sie für die Aktivierung der Ca<sup>++</sup>-Pumpen notwendig wäre<sup>96</sup>, wird davon ausgegangen, dass CaM andere wichtige Funktionen im Erythrozyten übernimmt. In der Endothelzelle vermittelt CaM die stimulatorischen Effekte von Ca<sup>++</sup> an die eNOS mit nachfolgender Aktivierung der Signalkaskade über die PI<sub>3</sub>-Kinase und kann durch die CaM-Antagonisten Melittin, Mestoparan, Fendilin, Calmidazolium und Calcineurin<sup>97</sup> inhibiert werden. Stimulation mit Ca-Ionophor A23187 induziert in Anwesenheit von extrazellulärem CaCl<sub>2</sub> eine 9,2 fache Zunahme der cGMP-Synthese<sup>98</sup>.

Übertragen auf den Erythrozyten führte eine Stimulation mit Ca<sup>++</sup>-Ionophor zu einer vermehrten NOS-Aktivität und Synthese von Nitrit, dem Marker der NO-Synthese. Die Syntheserate konnte über zwei Mechanismen reduziert bzw. vollständig inhibiert werden. Ein Mechanismus führte durch einen kompetitiven Antagonismus mittels Calmidazolium und Fendilin zu einer Reduktion der NO-Synthese, der andere über die Applikation des Ca<sup>++</sup>-Chelators EDTA zu einer vollständigen Unterdrückung dieser. Diese Ergebnisse lassen einen Regulationsweg der erythrozytären NO-Synthese über CaM als sehr wahrscheinlich annehmen. Der Nachweis einer Stimulierbarkeit der NOS über Ca<sup>++</sup>-Substitution, die Reduktion der Syntheserate durch kompetitiven Antagonismus, die fehlende Bildung von Nitrit nach Reduktion der Ca<sup>++</sup>-Konzentration und die Tatsache einer Überexpression von CaM-Protein im Erythrozyten<sup>96</sup> (siehe oben), lassen

annehmen, dass es sich bei diesem Regulationsmechanismus der erythrozytären NOS um den endothelialen  $\text{Ca}^{++}$ -abhängige Regulationsweg über  $\text{Ca}^{++}/\text{CaM}$  handelt. Weiterer Indikator für diese Hypothese ist die Sensitivität der CaM-Bindung auf Phosphatidyl-Inositol-4,5-Bisphosphat ( $\text{PIP}_2$ ) und Inositol-1,4,5-Trisphosphat ( $\text{IP}_3$ )<sup>99</sup>.

### **Regulation über Proteinmodifikationen**

Proteinmodifikationen sind im Rahmen einer Phosphorylierung von Ser<sup>1177</sup>, Ser<sup>114</sup>, Ser<sup>633</sup>, Thr<sup>495</sup> und Tyrosin und einer Alkylierung im Sinne einer Myristoylierung, co-translational und irreversibel am terminalen Glycin, und Palmitoylierung, post-translational und reversibel an Cystein, für die Endothelzelle beschrieben. Für die Regulation der eNOS-Aktivität scheinen vor allem Ser<sup>1177</sup> und Thr<sup>495</sup> von Bedeutung zu sein. Dieser Aktivierungsweg wird vereinfacht als  $\text{Ca}^{++}$ -unabhängiger Weg bezeichnet, da die eNOS-Aktivität zwar von einer Änderung endothelialer  $\text{Ca}^{++}$ -Level abhängig, der intrazelluläre  $\text{Ca}^{++}$ -Anstieg aber nicht ausreichend für eine Aktivierung ist, bzw.  $\text{Ca}^{++}$  die durch Phosphorylierung induzierte Aktivität verstärkt<sup>100</sup>.

In eigenen Vorarbeiten konnten im Erythrozyten die unterschiedlichen Phosphorylierungen der NOS unter Verwendung spezifischer Antikörper nachgewiesen werden. Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob die Phosphorylierung von G-Protein-regulierten Kinasen abhängig ist. Dazu wurden die, an der Phosphorylierung/Dephosphorylierung beteiligten Kinasen spezifisch inhibiert und stimuliert. Die Kinasen, die in diesen Prozess involviert sind, variieren je nach Stimulus. Shear stress<sup>101</sup> induziert eine Phosphorylierung von Ser<sup>1177</sup> über eine Aktivierung von Akt<sup>23,26,101</sup>, Östrogen und VEGF phosphorylieren die eNOS hauptsächlich via Akt und die Bradikinin-induzierte Phosphorylierung von Serin wird über CaMKII vermittelt<sup>26</sup>. Insulin scheint sowohl Akt als auch die AMP-aktivierte Protein-Kinase (AMPK) zu aktivieren. Studien an Endothelzellen zeigten eine Aktivierung der eNOS nach Phosphorylierung von Ser<sup>1177</sup>, wohingegen eine Phosphorylierung an Thr<sup>495</sup> eine Inhibierung der Aktivität bewirkte<sup>21-23</sup>. Die konstitutiv aktive Kinase, die die eNOS an Thr<sup>495</sup> phosphoryliert, ist die

Proteinkinase C (PKC)<sup>25,26,102</sup>. Proteinkinase-Inhibitoren und eine aktivitätsmindernde Regulation der PKC führte zu einer Zunahme der endothelialen NO-Produktion<sup>103,104</sup>. Die Phosphatase, die Thr<sup>495</sup> dephosphoryliert, ist wahrscheinlich PP1. Eine Inhibierung dieser resultiert in einer Hyperphosphorylierung von Thr<sup>495</sup>, welche die eNOS-Aktivität inhibiert. Diese Befunde lassen sich auf den Erythrozyten übertragen: Erythrozyten, die mit Insulin in physiologischen Konzentrationen stimuliert wurden, zeigten eine Steigerung der Aktivität, gemessen als Anstieg in der Nitritbildung. Zugabe des PI<sub>3</sub>-Kinase-Inhibitors Wortmannin führte zu einer, im Gegensatz zur Stimulation, verminderten Nitritbildung. Diese Ergebnisse ergänzen die Studie von Bhattacharya et al.<sup>105</sup>, in der die über eine Säule separierte, biochemisch aktive NO-synthetisierende Fraktion solubilisierter Erythrozytenmembranen eine Aktivität von 506 pmol/Zelle/min aufwies. Obwohl eine Steigerung der NO-Bildung des gereinigten Enzyms durch Insulingabe erreicht wurde, konnte eine NOS-unspezifische Nitritproduktion nicht ausgeschlossen werden, da keine NOS-spezifische Inhibition oder Stimulation durchgeführt wurde. Bei Versuchen zum Nachweis einer in der Membran lokalisierten NOS fand sich hingegen keine basale Aktivität<sup>105</sup>. Kahn et al.<sup>79</sup> gingen ebenfalls von einer durch Insulin aktivierbaren, konstitutiven NOS im Erythrozyten aus. Erythrozyten könnten das wichtigste Zellkompartiment hinsichtlich einer Insulin-stimulierten NO-Bildung sein, da sie in ihren Untersuchungen herausfanden, dass Erythrozyten nach Stimulation mit Insulin eine vier- bis fünffach größere Menge an NO produzierten als Endothelzellen. Kahn et al.<sup>79</sup> identifizierten die NOS, ebenso wie Jubelin und Giermann<sup>106</sup>, als membrangebundenes Enzym im Erythrozyten.

Auch in unserer Arbeitsgruppe wurde von einer ausschließlich membranständigen Lokalisation der NOS ausgegangen. In Vorversuchen konnte biochemisch der Nachweis einer Membranständigkeit durch Inkubation von Erythrozytenmembranen und proteinbiochemisch durch Untersuchungen des Proteins in der membranösen Fraktion erbracht werden. Das eNOS-Protein konnte ebenfalls in der konfokalen Mikroskopie

membranständig dargestellt werden. Die humanen Ergebnisse der konfokalen Mikroskopie wurden am spezifischen Modell der eNOS-Knock-Out-Maus versus Wildtyp bestätigt. Diese Lokalisation des Enzyms stellt sich als eine Voraussetzung für die Entfaltung biologischer Effekte des erythrozytär gebildeten NO dar, ohne dass dieses im Zytosol durch Hämoglobin direkt inaktiviert würde. Erste Ergebnisse wurden durch weitere Untersuchungen vervollständigt. In elektronenmikroskopischen Untersuchungen der Erythrozyten konnte das Enzym vor allem im Zytosol lokalisiert werden. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass das erythrozytäre Enzym, wie auch die endotheliale Variante, unter basalen Bedingungen im Zytosol lokalisiert ist und nach Stimulation in die Membran transloziert wird. Diese These wurde in immunzytochemischen Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit weiter bestätigt. Nach Insulinstimulation von Erythrozyten konnte eine Phosphorylierung von Ser<sup>1177</sup> hauptsächlich membranständig dargestellt werden, wohingegen ohne vorherige Stimulation keine Phosphorylierung detektiert werden konnte.

Die erythrozytäre NOS verfügt über eine Ca<sup>++</sup>/CaM-abhängige Regulation und einen Ca<sup>++</sup>-unabhängigen Mechanismus über eine Phosphorylierung und entspricht damit den Regulationskriterien der eNOS. Zusätzlich konnte eine deutliche Abhängigkeit der NOS-Aktivität von der Substratkonzentration festgestellt werden.

### **4.3 Physiologische Relevanz und Ausblick**

Die physiologische Relevanz der erythrozytären NOS wurde durch das relative Verhältnis der NO-Bildung von Erythrozyten zu Endothelzellen hergeleitet. Dazu wurden die *in vitro* Daten aus dem OxyHb-Assay, die Quantifizierung der direkten NO-Bildung und die Messung der NOS-Aktivität mittels Citrullin-Assay verwendet. Interessanterweise lag die NO-Freisetzungsrates im Bezug auf das Zellprotein im gleichen Bereich wie die NOS-Aktivität pro Gramm Protein. Vorausgesetzt, dass beide Zelltypen eine vergleichbare NO-Bildung aufweisen, ist es bemerkenswert, dass die

Gesamtproteinmenge beider Zelltypen in einem vergleichbaren Bereich liegt: 1,1 kg Protein aus Erythrozyten und 1,5 kg Protein aus Endothelzellen bei einem erwachsenen Mann (70 kg).

Die erythrozytäre NO-Synthese kann im Vergleich zur endothelialen NO-Synthese nicht nur lokal wirken, sondern mit den zirkulierenden Erythrozyten im gesamten Gefäßsystem. Da die endotheliale NO-Synthese nicht in allen Gefäßabschnitten gleich ausgeprägt ist<sup>107</sup>, kann die NO-Synthese der Erythrozyten andere Funktionen einnehmen als die bisher für das Gefäßsystem als relevant angesehene endotheliale NO-Synthese. Zusätzlich ist im krankhaft veränderten Endothel im Rahmen beginnender oder manifester arteriosklerotischer Veränderungen eine geringere oder keine eNOS-Aktivität mehr nachzuweisen<sup>108</sup>. So könnte in den Arealen, in denen die endotheliale Synthese von NO deutlich geringer ist, die erythrozytäre NO-Bildung eine bedeutende Funktion in der Homöostase übernehmen. In der vorliegenden Arbeit wurde nachgewiesen, dass die NO-Synthese im Erythrozyten über einen  $\text{Ca}^{++}$ -abhängigen und  $\text{Ca}^{++}$ -unabhängigen Mechanismus und über eine Erhöhung der Substratkonzentration stimulierbar ist. Die aus einer Stimulation der NO-Synthese resultierende NO-Bildung liegt in einem physiologisch relevanten Bereich und ist ebenfalls in einer Anhebung plasmatischer NOx-Level wiederzufinden.

Daraus kann geschlossen werden, dass die erythrozytäre NO-Bildung ebenfalls viele andere NO-vermittelte Prozesse innerhalb der Zirkulation beeinflussen kann. Bei Gefäßerkrankungen konnte schon in der Vergangenheit die Relevanz von NO-Donatoren, z.B. Nitrosovasodilatoren, in der Therapie gezeigt werden. Bei der oralen Applikation wirken die als Medikament eingesetzten NO-Donatoren nur kurzfristig, so dass häufig eine kontinuierliche intravenöse Gabe nötig wird. Von Interesse ist also eine Quelle, die kontinuierlich bioaktives NO freisetzt. Erste Hinweise hierzu ergeben sich in einer Studie, bei der Patienten mit einem akuten Koronarsyndrom entweder das NOS-Substrat L-Arginin oder Nitroglycerin intravenös verabreicht wurde. Dabei zeigte sich in vorläufigen Ergebnissen,

dass L-Arginin dem bisherigen Therapiestandard Nitroglycerin hinsichtlich der Beschwerdefreiheit überlegen war. Dieser Effekt könnte durch die gesteigerte endotheliale, aber vor allem auch durch einen Anstieg der erythrozytären NO-Synthese und einer resultierende Erhöhung der NO-Verfügbarkeit erklärt werden (siehe 3.2.2). Diese Effekte können nicht nur durch die gesteigerte NO-Synthese, sondern ebenfalls durch die Auffüllung zirkulierender NO-Speicher in Plasma oder Erythrozyten bedingt sein. Ungeklärt ist bis jetzt der fehlende Einfluss einer erythrozytären NO-Bildung an der Pathogenese arteriosklerotischer Gefäßveränderungen oder ein Zusammenhang anderer, innerhalb der Arteriosklerose beschriebenen Prozesse. Bisher wurden pathologische Mikrozirkulationsstörungen zum Teil auf die veränderte NO-Verfügbarkeit und dadurch entstehende Veränderungen der Erythrozytenverformbarkeit zurückgeführt<sup>109,110</sup>. Veränderungen in der Verformbarkeit von Erythrozyten treten bei verschiedenen Erkrankungen auf, z.B. Arteriosklerose, Bluthochdruck, Diabetes, aber auch Sepsis<sup>111</sup>. Da die Synthese und der Abbau von NO innerhalb des Erythrozyten die basale Erythrozytenverformbarkeit beeinflussen, könnten Mikrozirkulationsstörungen eventuell durch eine Steigerung der NO-Synthese im Erythrozyten ausgeglichen werden. Sollten sich in weiteren Untersuchungen die o.g. Ergebnisse zur Relevanz der erythrozytären NO-Synthese *in vivo* bestätigen, könnten Therapien, die dauerhaft die erythrozytäre NO-Synthese beeinflussen, entscheidend die Behandlung vaskulärer Erkrankungen verbessern.

In dieser Arbeit konnte eine Abhängigkeit der erythrozytären NO-Regulation von Insulin nachgewiesen werden. Durch Stimulation von Erythrozyten mit Insulin wurden eine deutliche Zunahme der NO-Synthese und eine Phosphorylierung des eNOS-Enzyms an der erythrozytären Membran festgestellt. Wenn man durch diese Ergebnisse von einer Abhängigkeit der erythrozytären NO-Bildung von Insulin ausgeht, den Aspekt eines verminderten Vorkommens von Endothelzellen in den Kapillaren des vaskulären Systems betrachtet, könnte vielleicht ein Faktor der Pathogenese der Mikrozirkulationsstörungen bei Patienten mit Diabetes mellitus erklärt

werden. Eine Abhängigkeit von der Substratkonzentration könnte ebenfalls klinischen Bezug finden. Diagnostisch könnten L-Argininkonzentrationsbestimmungen Aufschluss über das Vorliegen einer Minderfunktion der NO-Synthese geben, und prophylaktisch bzw. therapeutisch könnte eine Substitution von L-Arginin bis zu physiologischen Werten eine Verbesserung der Homöostase bewirken.

## 5. Zusammenfassung

Stickstoffmonoxid (NO) wird von der NO-Synthase (NOS) aus der Aminosäure L-Arginin synthetisiert und ist an verschiedenen biologisch relevanten Funktionen beteiligt. Im kardiovaskulären System reguliert NO unter anderem Gefäßtonus, Gefäßwachstum, Adhäsion von Blutzellen und die Blutgerinnung. Neue Untersuchungen konnten zusätzlich zum Endothel eine NOS im Erythrozyten nachweisen. Unbekannt war jedoch, ob die NOS im Erythrozyten NO in physiologisch relevanten Mengen synthetisiert und exportiert. Des Weiteren waren die Regulationsmechanismen der erythrozytären NOS vollständig unbekannt.

- Die NOS-Aktivität der Erythrozyten konnte durch Detektion des Substratumsatzes, wie der Nitrit und Nitratbildung erstmalig quantitativ abgeschätzt werden.
- Der bioaktive, aus dem Erythrozyten exportierte, Anteil an synthetisiertem NO konnte durch Anwendung zwei verschiedener Methoden detektiert werden. 40% des synthetisierten NO wird von den Erythrozyten als NO exportiert.
- Die Regulationsmechanismen der erythrozytären NOS-Isoform sind mit denen der endothelialen Isoform der NOS in anderen Zellen vergleichbar. Die Abhängigkeit der NOS-Aktivität durch  $\text{Ca}^{++}$ /Calmodulin konnte in biochemischen Untersuchungen gezeigt werden. Der  $\text{Ca}^{++}$ -unabhängige Mechanismus über eine Phosphorylierung an Serin<sup>1177</sup> und eine damit einhergehende Steigerung der NO Synthese im Erythrozyten konnte als weiterer Regulationsmechanismus nachgewiesen werden.
- Die Substratverfügbarkeit ist essentiell für die NOS Aktivität im Erythrozyten. Die nahezu maximale Aktivität des Enzyms ist bei physiologischer Argininkonzentration nachzuweisen.

Die Erythrozyten stellen neben dem Endothel eine neue Quelle vaskulär synthetisiertem NO dar und sind damit ein aktiver Teil des zirkulierenden NO-Pools. Diese Untersuchungen könnten eine Basis für die Charakterisierung einer verminderten NO-Synthese bei pathologisch reduzierter Enzymaktivität darstellen und eventuell durch eine Steigerung der Aktivität eine mögliche therapeutische Relevanz besitzen.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Moncada,S. & Higgs,A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 329, 2002-2012 (1993).
2. Nathan,C. & Xie,Q. Nitric oxide synthases: Roles, tolls, and controls. *Cell* 78, 915-918 (1994).
3. Ignarro,L.J. Biosynthesis and metabolism of endothelium-derived nitric oxide. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 30, 535-560 (1990).
4. Moncada,S. & Higgs,E.A. Molecular mechanisms and therapeutic strategies related to nitric oxide. *FASEB J* 9, 1319-1330 (1995).
5. Palmer,R.M. The discovery of nitric oxide in the vessel wall. *Arch Surg* 128, 396-401 (1993).
6. Snyder,S.H. & Bredt,D.S. Biological roles of nitric oxide. *Sci Am* 266 (5), 68-77 (1992).
7. Rösen,P., Ballhausen,T., Stockklauser,K. & Hönack,C. Influence of glucose and diabetes on the endothelial NO-synthase. *Diabetologia* 38, A48 (1995).
8. Griendling,K. & Alexander,R.W. Endothelial control of the cardiovascular system: recent advances. *FASEB J* 10, 283-292 (1996).
9. Schrör,K. Organische Nitrate. I. Wirkmechanismen und neue therapeutische Ansätze bei Myokardischämie. *Internist* 36, 392-403 (1995).
10. Leone,A.M., Palmer,R.M.J., Knowles,R.G., Francis,P.L., Ashton,D.S., & Moncada,S. Constitutive and inducible nitric oxide synthases incorporate molecular oxygen into both nitric oxide and citrulline. *J Biol Chem* 266, 23790-23795 (1991).
11. Gardner,P.R., Gardner,A.M., Martin,L.A., & Salzman,A.L. Nitric oxide dioxygenase: an enzymic function for flavohemoglobin. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* 95, 10378-10383 (1998).
12. Nathan,C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.* 6, 3051-3064 (1992).
13. Busse,R. & Fleming,I. Regulation and functional consequences of endothelial nitric oxide formation. *Ann Med* 27, 331-340 (1995).
14. Blitzer,M.L., Loh,E., Roddy,M.A., Stamler,J.S., & Creager,M.A. Endothelium-derived nitric oxide regulates systemic and pulmonary

- vascular resistance during acute hypoxia in humans. *J Am Coll Cardiol* 28(3), 591-596 (1996).
15. Ghafourifar,P. & Richter,C. Nitric oxide synthase activity in mitochondria. *FEBS Lett* 418, 291-296 (1997).
  16. Mülsch,A., Bassenge,E., & Busse,R. Nitric oxide synthesis in endothelial cytosol: evidence for a calcium-dependent and a calcium-independent mechanism. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 340, 767-770 (1989).
  17. Mayer,B., Schmidt,K., Humbert,P., & Böhme,E. Biosynthesis of endothelium-derived relaxing factor: A cytosolic enzyme in porcine aortic endothelial cells  $Ca^{2+}$  dependently converts L-arginine into an activator of soluble guanylyl cyclase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 164, 678-685 (1989).
  18. Cheung,W.Y. Calmodulin plays a pivotal role in cellular regulation. *Science* 207, 19-27 (1980).
  19. Means,A.R. & Dedman,J.R. Calmodulin: an intracellular calcium receptor. *Nature* 258, 73-77 (1980).
  20. Abu-Soud,H.M. & Stuehr,D.J. Nitric Oxide Synthases Reveal a Role for Calmodulin in Controlling Electron Transfer. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90, 10769-10772 (1993).
  21. Gallis,B., Corthals,G.L., Goodlett,D.R., Ueba,H., Kim,F., Presnell,S.R., Figeys,D., Harrison,D.G., Berke,A.D., Aebersold,R., & Marshall,A.C. Identification of Flow-dependent Endothelial Nitric-oxide Synthase Phosphorylation Sites by Mass Spectrometry and Regulation of Phosphorylation and Nitric Oxide Production by the Phosphatidylinositol 3-Kinase Inhibitor LY294002\*. *The Journal of Biological Chemistry* 274, 30101-30108 (1999).
  22. Fulton,D., Gratton,J.-P., McCabe,T.J., Fontana,J., Fujio,Y., Walsh,K., Franke,T.F., Papapetropoulos,A., & Sessa,W.C. Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. *Nature* 399, 597-601 (1999).
  23. Dimmeler,S., Fleming,I., Fisslthaler,B., Hermann,C., Busse,R., & Zeiher,A.M. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* 399, 601-605 (1999).
  24. Chen,Z.-P., Mitchelhill,K.I., Michell,B.J., Stapleton,D., Rodriguez-Crespo,I., Witters,L.A., Power,D.A., Ortiz de Montellano,P.R., & Kemp,B.E. AMP-activated protein kinase phosphorylation of endothelial NO synthase. *FEBS Lett.* 443, 285-289 (1999).
  25. Michell,B.J., Chen,Z., Tiganis,T., Stapleton,D., Katsis,F., Power,D.A., Sim,A.T., & Kemp,B.E. Coordinated Control of Endothelial Nitric-oxide

- Synthase Phosphorylation by Protein Kinase C and the cAMP-dependent Protein Kinase. *J Biol Chem* 276, 17625-17628 (2001).
26. Fleming, I., Fisslthaler, B., Dimmeler, S., Kemp, B.E., & Busse, R. Phosphorylation of Thr<sup>495</sup> Regulates Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-Dependent Endothelial Nitric Oxide Synthase Activity. *Circ Res* 88, 68-75 (2001).
  27. Butt, E., Bernhardt, M., Smolenski, A., Kotsonis, P., Fröhlich, L.G., Sickmann, A., Meyer, H.E., Lohmann, S.M., & Schmidt, H.H.H.W. Endothelial nitric-oxide synthase (type III) is activated and becomes calcium independent upon phosphorylation by cyclic nucleotide-dependent protein kinases. *J Biol Chem* 275, 5179-5187 (2000).
  28. Kelm, M. Nitric oxide metabolism and breakdown. *Biochim Biophys Acta* 1411, 273-289 (1999).
  29. Heslop, R.B. & Jones, K. Inorganic chemistry. (Elsevier, Amsterdam; 1976).
  30. Kleinbongard, P., Dejam, A., Lauer, T., Rassaf, T., Schindler, A., Picker, O., Scheeren, T., Gödecke, A., Schrader, J., Schulz, R., Heusch, G., Schaub, G.A., Bryan, N.S., Feelisch, M., & Kelm, M. Plasma nitrite reflects constitutive nitric oxide synthase activity in mammals. *Free Radic Biol Med* 35, 790-796 (2003).
  31. Rhodes, P.M., Leone, A.M., Francis, P.L., Struthers, A.D., & Moncada, S. The L-arginine: nitric oxide pathway is the major source of plasma nitrite in fasted humans. *Biochem Biophys Res Commun* 209, 590-596 (1995).
  32. Ford, P.C., Wink, D.A., & Stanbury, D.M. Autoxidation kinetics of aqueous nitric oxide. *FEBS Lett* 326, 1-3 (1993).
  33. Malinski, T., Taha, Z., Grunfeld, S., Patton, S., Kapturczak, M., & Tomboulian, P. Diffusion of nitric oxide in the aorta wall monitored in situ by porphyrinic microsensors. *Biochem Biophys Res Commun* 193, 1076-1082 (1993).
  34. Bonner, F.T. & Stedman, G. in *Methods in nitric oxide research*. eds. Feelisch, M. & Stamler, J. 3-18 (John Wiley & Sons Ltd, Chichester; 1996).
  35. Beckman, J.S., Beckman, T.W., Chen, J., Marshall, P.A., & Freeman, B.A. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* 87, 1620-1624 (1990).
  36. Lancaster jr, J.R. Simulation of the diffusion and reaction of endogenously produced nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* 91, 8137-8141 (1994).

37. Beckman, J.S., Carson, M., Smith, C.D., & Koppenol, W.H. ALS, SOD and peroxynitrite. *Nature* 364, 584 (1993).
38. Hughes, M.N. & Nicklin, H.G. The chemistry of pernitrites. Part I. Kinetics of decomposition of pernitrous acid. *J Chem Soc* 450-452 (1968).
39. Tannenbaum, S.R., Witter, J.P., Gatley, S.J., & Balish, E. Nitrate and nitrite: origin in humans. *Science* 205, 1333-1337 (1979).
40. Wagner, D.A., Young, V.R., & Tannenbaum, S.R. Mammalian nitrate biosynthesis: incorporation of  $^{15}\text{NH}_3$  into nitrate is enhanced by endotoxin treatment. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* 80, 4518-4521 (1983).
41. Yoshida, K., Kasama, K., Kitabatake, M., & Imai, M. Biotransformation of nitric oxide, nitrite and nitrate. *Int Arch Occup Environ Health* 52, 103-115 (1983).
42. Castillo, L., DeRojas, T.C., Chapman, T.E., Vogt, J., Burke, J.F., Tannenbaum, S.R., & Young, V.R. Splanchnic metabolism of dietary arginine in relation to nitric oxide synthesis in normal adult man. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* 90, 193-197 (1993).
43. Lee, K., Greger, J.L., Consaul, J.R., Graham, K.L., & Chinn, B.L. Nitrate, nitrite balance, and de novo synthesis of nitrate in humans consuming cured meats. *Am J Clin Nutr* 44, 188-194 (1986).
44. Cicinelli, E., Ignarro, L.J., Schonauer, L.M., Matteo, M.G., Galantino, P., & Falco, N. Different plasma levels of nitric oxide in arterial and venous blood. *Clin Physiol* 19, 440-442 (1999).
45. Ishibashi, T., Matsubara, T., Ida, T., Hori, T., Yamazoe, M., Aizawa, Y., Yoshida, J., & Nishio, M. Negative  $\text{NO}_3^-$  difference in human coronary circulation with severe atherosclerotic stenosis. *Life Sci* 66, 173-184 (2000).
46. Toprakci, M., Ozmen, D., Mutaf, I., Turgan, N., Parildar, Z., Habif, S., Guner, I., & Bayindir, O. Age-associated changes in nitric oxide metabolites nitrite and nitrate. *Int. J. Clin. Lab. Res.* 30, 83-85 (2000).
47. Lauer, T., Preik, M., Rassaf, T., Strauer, B.E., Deussen, A., Feelisch, M., & Kelm, M. Plasma nitrite rather than nitrate reflects regional endothelial nitric oxide synthase activity but lacks intrinsic vasodilator action. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 12814-12819 (2001).
48. Gladwin, M.T., Lancaster jr, J.R., Freeman, B.A., & Schechter, A.N. Nitric oxide's reactions with hemoglobin: a view through the SNO-storm. *Nat Med* 9, 496-500 (2003).

49. Jia,L., Bonaventura,C., Bonaventura,J., & Stamler,J.S. S-nitrosohaemoglobin: a dynamic activity of blood involved in vascular control. *Nature* 380, 221-226 (1996).
50. Fox-Robichaud,A., Payne,D., Hasan,S.U., Ostrovsky,L., Fairhead,T., Reinhardt,P., & Kubes,P. Inhaled NO as a viable antiadhesive therapy for ischemia/reperfusion injury of distal microvascular beds. *J Clin Invest* 101, 2497-2505 (1998).
51. Rassaf,T., Preik,M., Kleinbongard,P., Lauer,T., Heiß,C., Strauer,B.E., Feelisch,M., & Kelm,M. Evidence for in vivo transport of bioactive nitric oxide in human plasma. *J. Clin. Invest.* 109, 1241-1248 (2002).
52. Rassaf,T., Kleinbongard,P., Preik,M., Dejam,A., Gharini,P., Lauer,T., Erckenbrecht,J., Duschin,A., Schulz,R., Heusch,G., Feelisch,M., & Kelm,M. Plasma nitrosothiols contribute to the systemic vasodilator effects of intravenously applied NO: Experimental and clinical study on the fate of NO in human blood. *Circ Res* 91, 470-477 (2002).
53. Clancy,R.M., Miyazaki,Y., & Cannon,P.J. Use of thionitrobenzoic acid to characterize the stability of nitric oxide in aqueous solutions and in porcine aortic endothelial cell suspensions. *Anal Biochem* 191, 138-143 (1990).
54. Hotchkiss,J.H. Nitrate, nitrite balance, and de novo synthesis of nitrate. *Am J Clin Nutr* 47, 161-162 (1988).
55. Stamler,J.S., Jaraki,O., Osborne,J., Simon,D.I., Keaney,J., Vita,J., Singel,D., Valeri,C.R., & Loscalzo,J. Nitric oxide circulates in mammalian plasma primarily as an S-nitroso adduct of serum albumin. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* 89, 7674-7677 (1992).
56. Lancaster jr,J.R. A tutorial on the diffusibility and reactivity of free nitric oxide. *Nitric Oxide: Biology and Chemistry* 1, 18-30 (1997).
57. Doyle,M.P. & Hoekstra,J.W. Oxidation of nitrogen oxides by bound dioxygen in hemoproteins. *J Inorg Biochem* 14, 351-358 (1981).
58. Recchia,F.A., Vogel,T.R., & Hintze,T.H. NO metabolites accumulate in erythrocytes in proportion to carbon dioxide and bicarbonate concentration. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 279, H852-H856 (2000).
59. Gross,S.S. & Lane,P. Physiological reactions of nitric oxide and hemoglobin: a radical rethink. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* 96, 9967-9969 (1999).
60. Megson,I.L., Sogo,N., Mazzei,F.A., Butler,A.R., Walton,J.C., & Webb,D.J. Inhibition of human platelet aggregation by a novel S-nitrosothiol is abolished by haemoglobin and red blood cells in vitro: implications for anti-thrombotic therapy. 131, 1391-1398 (2000).

61. Pawlowski, J.R., Hess, D.T., & Stamler, J.S. Export by red blood cells of nitric oxide bioactivity. *Nature* 409, 622-xx (2001).
62. Li, H., Samouilov, A., Liu, X., & Zweier, J.L. Characterization of the magnitude and kinetics of xanthine oxidase-catalyzed nitrate reduction: evaluation of its role in nitrite and nitric oxide generation in anoxic tissues. *Biochemistry (Mosc)*. 42, 1150-1159 (2003).
63. Modin, A., Bjorne, H., Herulf, M., Alving, K., Weitzberg, E., & Lundberg, J.O. Nitrite-derived nitric oxide: a possible mediator of 'acidic-metabolic' vasodilation. *Acta Physiol Scand* 171, 9-16 (2001).
64. Samouilov, A., Kuppusamy, P., & Zweier, J.L. Evaluation of the magnitude and rate of nitric oxide production from nitrite in biological systems. *Arch Biochem Biophys* 357, 1-7 (1998).
65. Cosby, K., Partovi, K.S., Crawford, J.H., Patel, R.P., Reiter, C.D., Martyr, S., Yang, B.K., Waclawiw, M.A., Zalos, G., Xu, X., Huang, K.T., Shields, H., Kim-Shapiro, D.B., Schechter, A.N., Cannon III, R.O., & Gladwin, M.T. Nitrite reduction to nitric oxide by deoxyhemoglobin vasodilates the human circulation. *Nat Med* 9, 1498-1505 (2003).
66. Deliconstantinos, G., Villiotou, V., Stavrides, J.C., Salemes, N., & Gogas, J. Nitric oxide and peroxynitrite production by human erythrocytes: a causative factor of toxic anemia in breast cancer patients. *Anticancer Res.* 15, 1435-1446 (1995).
67. Kang, E.S., Ford, K., Grokulsky, G., Wang, Y.-B., Chiang, T.M., & Acchiardo, S.R. Normal circulating adult human red blood cells contain inactive NOS proteins. *J Lab Clin Med* 135, 444-451 (2000).
68. Chen, L.Y. & Mehta, J.L. Evidence for the presence of L-arginine-nitric oxide pathway in human red blood cells: relevance in the effects of red blood cells on platelet function. *J Cardiovasc Pharmacol* 32, 57-61 (1998).
69. Kleinbongard, P., Schulz, R., Rassaf, T., Lauer, T., Dejam, A., Jax, T., Kumara, I., Gharini, P., Kabanova, S., Schnürch, H.-G., Gödecke, A., Robenek, H., Bloch, W., Rösen, P., and Kelm, M. Red blood cells express a functional endothelial nitric oxide synthase. *Blood* 106, 734-739 (2005).
70. Dejam, A., Hunter, C.J., Pelletier, M.M.L.C., Hsu, L.L., Machado, R.F., Shiva, S., Power, G.G., Kelm, M., Gladwin, M.T., & Schechter, A.N. Erythrocytes are the Major Intravascular Storage Sites of Nitrite in Human Blood. *Blood* 106, 734-739 (2005).
71. Spectrophotometry of Hemoglobin Derivatives. (Charles C. Thomas Publ., Springfield, Ill. USA; 1970).

72. Kelm,M., Feelisch,M., Spahr,R., Piper,H.M., Noack,E., & Schrader,J. Quantitative and kinetic characterization of nitric oxide and EDRF release from cultured endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 154, 236-244 (1988).
73. Kleinbongard, P. Physiologische Relevanz des L-Arginin-NO-Stoffwechsels im Blut der Säugetiere. 2003. Fakultät für Biologie der Ruhr-Universität Bochum.
74. Kelm,M., Preik-Steinhoff,H., Preik,M., & Strauer,B.E. Serum nitrite sensitively reflects endothelial NO formation in human forearm vasculature: evidence for biochemical assessment of the endothelial L-arginine-NO pathway. *Cardiovasc Res* 41, 765-772 (1999).
75. Lauer,T., Kleinbongard,P., Preik,M., Rauch,B.H., Deussen,A., Feelisch,M., Strauer,B.E., & Kelm,M. Direct biochemical evidence for eNOS stimulation by bradykinin in the human forearm vasculature. *Basic Res Cardiol* 98, 84-89 (2003).
76. Lauer,T., Kleinbongard,P., & Kelm,M. Indexes of NO-bioavailability in human blood. *News Physiol Sci* 17, 251-255 (2002).
77. Metha,J.L., Metha,P., & Li,D. Nitric oxide synthase in adult red blood cells: vestige of an earlier age or a biologically active enzyme? *J Lab Clin Med* 135, 430-431 (2000).
78. Pawloski,J.R., Hess,D.T., & Stamler,J.S. Export by red blood cells of nitric oxide bioactivity. *Nature* 409, 622-626 (2001).
79. Kahn,N.N., Acharya,K., Bhattacharya,S., Acharya,R., Mazumder,S., Bauman,W., & Sinha,A.K. Nitric Oxide: The "Second Messenger" of Insulin. *IUBMB Life* 49, 441-450 (2000).
80. Lantinhohermoso,R.L., Rosenfeld,C.R., Yuhanna,I.S., German,Z., Chen,Z., & Shaul,P.W. Estrogen acutely stimulates nitric oxide synthase activity in fetal pulmonary artery endothelium. *American Journal of Physiology Lung Cell Mol Physiol* 273, 119-126 (1997).
81. Kim,F., Gallis,B., & Marshall,A.C. TNF- $\alpha$  inhibits flow and insulin signaling leading to NO production in aortic endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 280, 1057-1065 (2001).
82. Divino Filho,J.C., Hazel, S.J, Fürst,P., Bergström,J., & Hall,K. Glutamate concentration in plasma,erythrocyte and muscle in relation to plasma levels of insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF binding protein-1 and insulin in patients on haemodialysis. *J. Endocrinol.* 156, 519-527 (1998).
83. Kang,E.S., Cates,T.B., Harper,D.N., Chiang,T.M., Myers,L.K., Acchiardo,S.R., & Kimoto,M. An enzyme hydrolyzing methylated

inhibitors of nitric oxide synthase is present in circulating human red blood cells. *Free Radic Res* 35, 693-707 (2001).

84. Angelo,S., Irrarázabal,C., & Devés,R. The binding specificity of amino acid transport system  $y^+L$  in human erythrocytes is altered by monovalent cations. *The Journal of Membrane Biology* 153, 37-44 (1996).
85. Raval,P.J. & Allan,D. The effects of phorbol ester, diacylglycerol, phospholipase C and  $Ca^{2+}$  ionophore on protein phosphorylation in human and sheep erythrocytes. *Biochem J* 232, 43-47 (1985).
86. Jones,B., Walker,T.F., & Chahwala,S.B.e.al. The effect of phorbol esters on human erythrocyte morphological discocyte-echinocyte transitions. *Exp Cell Res* 168, 309-317 (1987).
87. Kravtsov,G.M., Dulin,N.O., & Postnov,Y.V. Activity of protein kinase C in erythrocytes in primary hypertension. *J Hypertens* 6, 853-857 (1988).
88. Fleming,I. & Busse,R. Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 284, R1-R12 (2003).
89. Alderton,W.K., Cooper,C.E., & Knowles,R.G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 357, 593-615 (2001).
90. Cohen,C.M. & Gascard,P. Regulation and Post-translational Modification of Erythrocyte Membrane - Skeletal Proteins. *Semin Hematol.* 29, 244-292 (1992).
91. Jarrett,H.W. & Penniston,J.T. Purification of the  $Ca^{2+}$ -stimulated ATPase activator from human erythrocytes. Its membership in the class of  $Ca^{2+}$  binding modulator proteins. *J Biol Chem* 253, 4676-4682 (1978).
92. Sobue,K., Muramoto,Y., & Fujita,M.e.al. Calmodulin-binding protein of erythrocyte cytoskeleton. *Biochem Biophys Res Commun* 100, 1063-1070 (1981).
93. Husain,A., Howlett,G.J., & Sawyer,W.H. The interaction of calmodulin with erythrocyte membrane proteins. *Biochem Int* 10, 1-12 (1985).
94. Agre,P., Gardner,K., & Bennett,V. Association between human erythrocyte calmodulin and the cytoplasmic surface of human erythrocyte membranes. *J Biol Chem* 258, 6258-6265 (1983).
95. Lew,V.L., Tsien,R., & Miner,C.e.al. Physiological  $[Ca^{2+}]_i$  level and pump-leak turnover in intact red cells using an incorporated Ca chelator. *Nature* 298, 478-481 (1982).

96. Larsen,F.L. & Vincenzi,F.F. Calcium transport across the plasma membrane: Stimulation by calmodulin. *Science* 204, 306-309 (1979).
97. Busse,R. & Mülsch,A. Calcium-dependent nitric oxide synthesis in endothelial cytosol is mediated by calmodulin. *FEBS* 265, 133-136 (1990).
98. Gélinas,D.S., Bernatchez,P.N., Rollins,S., Bazan,N.G., & Sirois,M.G. Immediate and delayed VEGF-mediated NO synthesis in endothelial cells: Role of PI3K, PKC and PLC pathways. *Br J Pharmacol* 137, 1021-1030 (2002).
99. Davis,F.B., Davis,P.J., & Lawrence,W.D.e.al. Specific inositol phosphates inhibit basal and calmodulin-stimulated  $Ca^{2+}$ -ATPase activity in human erythrocyte membranes in vitro and inhibit binding of calmodulin to membranes. *FASEB J* 5, 2992-2995 (1991).
100. Fisslthaler,B., Dimmeler,S., Hermann,C., Busse,R., & Fleming,I. Phosphorylation and activation of the endothelial nitric oxide synthase by fluid shear stress. *Acta Physiol Scand* 168, 81-88 (2000).
101. Boo,Y.C., Sorescu,G., Boyd,N., Shiojima,I., Walsh,K., Du,J., & Jo,H. Shear stress stimulates phosphorylation of endothelial nitric-oxide synthase at Ser1179 by Akt-independent mechanisms: role of protein kinase A. *American Journal of Biological Chemistry* 277, 3388-3396 (2005).
102. Matsubara,M., Titani,K., & Taniguchi,H. Interaction of Calmodulin-Binding Domain Peptides of Nitric Oxide Synthase with Membrane Phospholipids: Regulation by Protein Phosphorylation an  $Ca^{2+}$ -Calmodulin. *Biochemistry (Mosc)*. 35, 14651-14658 (1996).
103. Davde,R.K., Chandler,L.J., & Guzman,N.J. Protein kinase C modulates receptor-independent activation of endothelial nitric oxide synthase. *Eur J Pharmacol* 266, 237-244 (1994).
104. Hirata,K., Kuroda,R., Sakoda,T., Katayama,M., Inoue,N., Suematsu,M., Kawashima,S., & Yokoyama,M. Inhibition of endothelial nitric oxide synthase activity by protein kinase C. *Hypertension* 25, 180-185 (1995).
105. Bhattacharya,S., Patra,S.C., Roy,S.B., Kahn,N.N., & Sinha,A.K. Purification and properties of insulin-activated nitric oxide synthase from human erythrocyte membranes. *Arch. Physiol. Biochem.* 109, 441-449 (2001).
106. Jubelin,B.C. & Gierman,J.L. Erythrocytes may synthesize their own nitric oxide. *Am J Hypertens* 9, 1214-1219 (1996).
107. Teichert,A.-M., Miller,T.L., Tai,S.C., Wang,Y., Bei,X., Robb,G.B., Phillips,M.J., & Marsden,P.A. In vivo expression profile of an

endothelial nitric oxide synthase promoter-reporter transgene. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 278, H1352-H1361 (2000).

108. Lüscher, T.F. The endothelium and cardiovascular disease - a complex relation. *N Engl J Med* 330, 1081-1083 (1994).
109. Montes, R.A.O., Eckamn, J.R., Hsu, L.L., & Wick, T.M. Sickle erythrocyte adherence to endothelium at low shear: role of shear stress in propagation of vaso-occlusion. *Am. J. Hematol.* 70, 216-227 (2002).
110. Ruschitzka, F.T., Wenger, R.H., Stallmach, T., Quaschnig, T., Witte, C., Wagner, K., Labugger, R., Kelm, M., Noll, G., Rüllicke, T., Shaw, S., Lindberg, R.L.P., Rodenwaldt, B., Lutz, H., Bauer, C., Lüscher, T.F., & Gassmann, M. Nitric oxide prevents cardiovascular disease and determines survival in polyglobulic mice overexpressing erythropoietin. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 11609-11613 (2000).
111. Bateman, R.M., Jagger, J.E., Sharpe, M.D., Ellsworth, M.L., Mehta, S., & Ellis, C.G. Erythrocyte deformability is a nitric oxide-mediated factor in decreased capillary density during sepsis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280, H2848-H2856 (2001).

## 7. Veröffentlichungen

**Abstract:** Gharini, P., Kleinbongard, P., Rassaf, T., **Münc**, M., Totzeck, M., Kelm ,M. Storage condition for nitrite-containing blood samples. European Journal of Clinical Pharmacology, 2006; 62.

## 8. Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. M. Kelm danke ich für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit selbständiges wissenschaftliches Arbeiten zu erlernen.

Frau Dr. rer. nat. P. Kleinbongard danke ich für die Einführung in das experimentelle Arbeiten und für ihre unermüdliche und hochmotivierte Betreuung bei der Planung und Durchführung von Experimenten. Vor allem möchte ich mich bei ihr für die freundliche und fürsorgliche Unterstützung in der letzten Zeit des Schreibens bedanken.

Für eine gute Kooperation danke ich Herrn Prof. Dr. med. P. Rösen, Herrn Prof. Dr. med. W. Bloch und Herrn Prof. Dr. med. N. Kühn-Velten.

Mein Dank gilt der gesamten Arbeitsgruppe des Kardiologischen Labors, insbesondere Frau Dr. med. P. Gharini und Herrn Dr. med. I. Kumara für die stetige Bereitschaft auf Fragen einzugehen und Hilfestellungen jeder Art zu leisten.

Herrn Dr. med. T. Rassaf danke ich für die konstruktive Kritik bei der Planung des Oxyhämoglobin-Assays.

Herrn Dr. med. B. Özüyaman danke ich für die Unterstützung bei der Durchführung des Citrullin-Assays.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie, die mich auf meinem Weg immer unterstützt und an mich geglaubt hat. In inniger Verbundenheit widme ich ihr diese Arbeit.

## 9. Lebenslauf

Name: Münch  
Vorname: Miriam  
Geburtsdatum: 11.01.1979  
Geburtsort: Recklinghausen  
Konfession: römisch-katholisch  
Eltern: Werner Münch  
Elisabeth Münch geborene Appelhoff  
Geschwister: Christina Münch  
Barbara Münch

### Schulbildung:

1985-1989 „Erich-Kästner“-Grundschule Recklinghausen  
1989-1998 Gymnasium Petrinum Recklinghausen mit Erlangung  
der Allgemeinen Hochschulreife

### Berufsausbildung:

1998-2001 Ausbildung zur staatlich examinierten Krankenschwester an der Krankenpflegeschule des Prosper-Hospital Recklinghausen

### Hochschulausbildung:

10/2001 Beginn des humanmedizinischen Studiums an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
09/2003 Ärztliche Vorprüfung  
08/2006 Immatrikulation und Beginn des Praktischen Jahres am Universitätsklinikum der RWTH Aachen  
11/2007 Zweite ärztliche Prüfung

### Ärztliche Tätigkeit:

12/2007 Assistenzärztin in der Klinik für Plastische Chirurgie, Hand- und Verbrennungschirurgie  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. Dr. med. N. Pallua  
Universitätsklinikum der RWTH Aachen