

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie

Direktor: Prof. Dr. med. Rainer H. Böger

Effekt des HNO-Donators NCA auf die Thromboxan A₂ Rezeptor vermittelte Gefäßkontraktion und Plättchenaggregation

DISSERTATION

zur

Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Christin Niemann

aus Prenzlau

Hamburg 2013

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 18.10.2013**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. R. Böger

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: PD Dr. E. Schwedhelm

Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in: Prof. Dr. Y. von Kodolitsch

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
1 Einleitung	5
1.1 Der Thromboxan A ₂ Rezeptor	6
1.1.1 Aufbau und Funktion	6
1.1.2 Übersicht der Signalkaskaden	8
1.1.3 Die primäre Hämostase – ein komplexes Zusammenspiel verschiedenster Rezeptoren und Signalwege	10
1.1.4 Die Desensibilisierung des TP durch eine cGMP/PKG-abhängige Phosphorylierung	13
1.2 Die Chemie von HNO	14
1.3 HNO-Donatoren	17
1.4 Die Pharmakologie von HNO	18
1.5 Fragestellung	21
2 Material und Methoden	22
2.1 C57Bl/6J Maus	22
2.2 Präparation der Maus-Aortenringe	22
2.3 Kontraktionsmessungen an Maus-Aortenringen im Organbad	23
2.3.1 Versuchsaufbau	23
2.3.2 Untersuchung verschiedener Konzentrationen von NCA	24
2.3.3 Kontrollexperimente	25
2.3.4 Datenanalyse	26
2.4. Aggregationsmessungen an humanen Thrombozyten	26
2.4.1 Probengewinnung und Aufbereitung	26
2.4.2 Untersuchung verschiedener Konzentrationen von NCA	27
2.4.3 Verwendung unterschiedlicher Induktoren der Plättchen- aggregation (U46619, ADP, Kollagen)	28
2.4.3 Funktionsprinzip des Aggregometers	28
2.4.4 Datenanalyse	29
2.5 cGMP-Enzymimmunoassay (EIA)	30
2.5.1 Inkubation der Maus-Aortenringe im Organbad	30

2.5.2	Bestimmung der cGMP-Konzentration (EIA)	31
2.5.3	Prinzip des EIA	31
2.5.4	Datenanalyse	33
2.6	HNO-Donator „NCA“	33
2.7	Liste der Chemikalien	34
2.8	Liste der Laborgeräte	36
2.9	Liste der Verbrauchsmaterialien	37
3	Ergebnisse	39
3.1	Effekt von NCA auf die TP-vermittelte Kontraktion von Maus-Aortenringen	39
3.2.1	Untersuchung verschiedener Konzentrationen von NCA	39
3.1.2	Kontrollexperimente	41
3.2	Effekt von NCA auf die Thrombozytenaggregation	43
3.3	Effekt von NCA auf die cGMP-Konzentration	45
4	Diskussion	47
4.1	Effekt von NCA auf die TP-vermittelte Gefäßkontraktion	48
4.2	Überprüfung der Wirksamkeit von HNO	49
4.3	Effekt von NCA auf die Thrombozytenaggregation	50
4.4	Effekt von NCA auf die cGMP-Konzentration	51
4.5	Die Desensibilisierung des TP durch eine cGMP/PKG-abhängige Phosphorylierung als möglicher Wirkmechanismus	53
4.6	Möglichkeiten des therapeutischen Einsatzes von NCA	54
5	Zusammenfassung	56
6	Abkürzungsverzeichnis	57
7	Literaturverzeichnis	60
8	Danksagung	64
9	Lebenslauf	65
10	Eidesstattliche Versicherung	66

1 Einleitung

Mit dem Erscheinen erster Berichte über die körpereigene Produktion des gasförmigen Signalmoleküls Stickstoffmonoxid (NO) vor mehr als 20 Jahren, wuchs das forschende Interesse an der Physiologie, Pathophysiologie, Biochemie und Pharmakologie von NO und verwandten Stickstoffoxiden immens (Ignarro et al. 1987, Palmer et al. 1987). Im Fokus der Forschung standen zunächst Stickstoffoxide, die in Bezug auf NO oxidiert sind, so zum Beispiel Stickstoffdioxid (NO_2), Distickstofftrioxid (N_2O_3) und Peroxynitrit (ONOO^-). Diese entstehen in biologischen Systemen hauptsächlich durch die Reaktion von NO mit molekularem Sauerstoff oder Sauerstoff abgeleiteten Verbindungen wie O_2^- und spielen eine Rolle in Signalwegen, bei der Modifikation von Makromolekülen oder als toxische Oxidantien (Paolucci et al. 2007). Mit der Vermutung mehrerer Studien, dass auch die reduzierten Stickstoffverbindungen endogen produziert würden (Fukuto et al. 2005), wuchs das Interesse vor allem an dem um ein Elektron reduzierten und protonierten Artverwandten von Stickstoffmonoxid, HNO (Nitroxyl). Obwohl die endogene Produktion von HNO in Säugetierorganismen abschließend zu beweisen bleibt, brachte die Arbeit mit so genannten HNO-Donatoren wie Angeli's Salz einzigartige biologische Effekte im kardiovaskulären System hervor. Neben der vasorelaxierenden Eigenschaft ist HNO in der Lage, die myokardiale Kontraktilität zu steigern und bietet somit eine neue therapeutische Strategie zur Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen wie der Herzinsuffizienz (Paolucci et al. 2003, Paolucci et al. 2007). Auch die atherothrombotischen Erkrankungen wie der Herzinfarkt und der Schlaganfall sind in diesem Zusammenhang von besonderer Bedeutung. Untersuchungen konnten zeigen, dass das Thromboxan A_2 und der dadurch aktivierte Thromboxan A_2 Rezeptor (TP) in die zugrunde liegenden pathophysiologischen Prozesse der Arteriosklerose und Thrombose involviert sind (Nakahata et al. 2008). Somit wurde das Ziel dieser Arbeit, herauszufinden, ob HNO auch in der Lage ist, die TP-vermittelten zellulären Antworten zu beeinflussen und womöglich weiteres therapeutisches Potential bietet.

1.1 Der Thromboxan A₂ Rezeptor

1.1.1 Aufbau und Funktion

In den 80er Jahren des 20. Jahrhunderts gelang es Forschern erstmals den humanen Thromboxan A₂ Rezeptor (TP) zu klonieren und zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren zuzuordnen (Huang et al. 2003). Er ist mit sieben Transmembrandomänen in der Zellmembran verankert, wobei der N-Terminus nach extrazellulär und der C-Terminus nach intrazellulär zeigt (Abb. 1.1; Horn 2009). Es existieren zwei unterschiedliche Isoformen des Rezeptors (Abb. 1.1), die sich hinsichtlich ihrer Aminosäuresequenz im C-terminalen Ende unterscheiden. Während der ursprünglich aus der Plazenta geklonte TP mit einer Länge von 343 Aminosäuren als α -Isoform bekannt ist, handelt es sich bei dem aus humanen Endothelzellen isolierten TP bestehend aus 407 Aminosäuren um die β -Isoform (Huang et al. 2003). Beide cDNAs stellen alternative *splice* Produkte des TP-Gens dar (Nakahata et al. 2008). Während die ersten 328 Aminosäuren identisch sind, zeichnet sich die β -Isoform durch eine erweiterte C-terminale zytoplasmatische Domäne aus. Diese Tatsache lässt vermuten, dass beide Isoformen nicht nur unterschiedliche Signalkaskaden aktivieren, sondern zusätzlich durch ihre heterogene Verteilung in den Organsystemen auch unterschiedliche Funktionen ausüben (Huang et al. 2003). Während die α -Isoform in zahlreichen Geweben stark exprimiert wird und in Thrombozyten hochkonzentriert vorhanden ist, wurde die β -Isoform nur in limitierten Geweben nachgewiesen und die Expression in Thrombozyten nicht dokumentiert (Huang et al. 2003). Mit der Erkenntnis, dass Ratten und Mäuse nur einen einzigen TP besitzen, der in seiner Sequenz der α -Isoform ähnlich ist, wird vermutet, dass die humane α -Isoform elementare und die β -Isoform ergänzende Funktionen besitzen könnte (Nakahata et al. 2008). Obwohl in den Untersuchungen zur Dissertation keine Spezialisierung auf eine der Isoformen erfolgte, jedoch die α -Isoform als einzige aus humanen Thrombozyten nachweisbar translatiert wurde und Mäuse nur eine Isoform des Rezeptors besitzen, die in ihrer Sequenz zu

76% mit der humanen α -Isoform identisch ist (Nakahata et al. 2008), lassen sich die Ergebnisse vorwiegend auf die genannte beziehen.

Mit der Erforschung seiner Funktion im biologischen System entdeckte man, dass der TP in unterschiedlichen Zelltypen und Organsystemen weit verbreitet ist. So konnte seine Existenz unter anderem in kardiovaskulärem, immunologischem, pulmonalem und neurologischem Gewebe nachgewiesen werden (Huang et al 2003). Bedingt durch die heterogene Verteilung ist der TP nicht nur in eine Vielzahl physiologischer, sondern auch pathologischer Prozesse wie Arteriosklerose, akuter Myokardinfarkt, Asthma und Thrombose involviert (Huang et al. 2003, Nakahata et al. 2008). Außerdem ermöglicht die Fähigkeit, viele verschiedene Signalkaskaden zu aktivieren, dieses breite Spektrum an zellulären Antworten hervorzurufen (Huang et al 2003).

Die größte Aufmerksamkeit hat der TP durch seine Mitwirkung in der primären Hämostase erlangt. Hierbei kommt es neben anderen Faktoren zur Stimulierung der auf den Thrombozyten und glatten Gefäßmuskelzellen befindlichen Rezeptoren durch das Thromboxan A_2 , was eine Thrombusbildung und Gefäßverengung zur Folge hat und einen wesentlichen Beitrag zur Blutstillung leistet (Rassow et al. 2008).

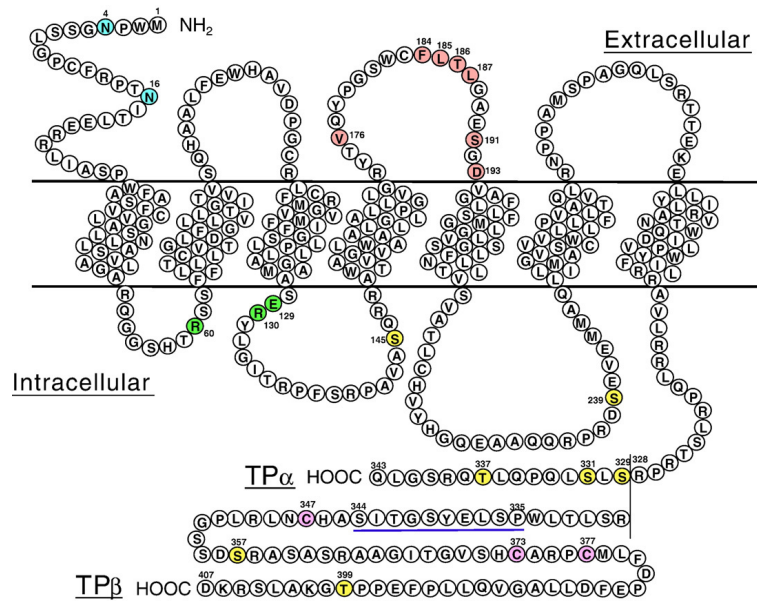


Abb. 1.1 Aminosäuresequenz der α - und β -Isoform des TP. TP α : α -Isoform des Thromboxan A_2 Rezeptors; TP β : β -Isoform des Thromboxan A_2 Rezeptors (Nakahata et al. 2008)

1.1.2 Übersicht der Signalkaskaden

Eine mögliche Erklärung für diese Vielfalt an Signalkaskaden und zellulären Antworten ist die Kopplung des TP an unterschiedliche G-Proteine (Huang et al. 2003). Die Abbildung 1.2 gibt einen Überblick über die wichtigsten Signalwege. Es wird angenommen, dass der TP vorwiegend über die G-Proteine G $_q$ und G $_{13}$ kommuniziert. Welches G-Protein an den Rezeptor gekoppelt ist, scheint wiederum vom Gewebe und Zelltyp abhängig zu sein (Nakahata et al. 2008).

Die Aktivierung des TP kann unter anderem durch die Bindung des Prostaglandinderivats Thromboxan A_2 (TXA $_2$) oder seinem Analogon 9,11-Dideoxy-11 α ,9 α -epoxy-methanoprostaglandin F $_{2\alpha}$ (U46619) erfolgen. Das TXA $_2$ wird während der Hämostase physiologisch sowohl von aktivierten Thrombozyten mithilfe der Cyclooxygenase und Thromboxansynthase aus Arachidonsäure produziert als auch aus thrombozytären Speichern freigesetzt (Horn 2009, Nakahata et al. 2008). Hingegen findet das U46619 wegen seiner höheren

Stabilität in experimentellen Untersuchungen seine Anwendung. Der stimulierte TP aktiviert in der Folge das an ihn gekoppelte G-Protein. Diese heterotrimeren G-Proteine sind aus drei Untereinheiten (α , β und γ) aufgebaut, wobei die α -Untereinheit eine GDP/GTP-Bindungsdomäne besitzt. Im inaktivierten Zustand bindet die α -Untereinheit GDP und ist mit der β - und γ -Untereinheit assoziiert. Im Zuge der Aktivierung wird an der α -Untereinheit das GDP gegen GTP ausgetauscht und das G-Protein zerfällt in seine Untereinheiten α und $\beta\gamma$ (Horn 2009). Sowohl die freigesetzte α -Untereinheit als auch die Untereinheiten $\beta\gamma$ als funktionelle Einheit können anschließend unterschiedliche Effektoren wie Adenylatzyklasen, Phospholipasen und Proteinkinasen als so genannte *second messenger* Systeme regulieren und zu einer physiologischen Antwort führen (Abb 1.2; Nakahata et al 2008). Der wahrscheinlich am besten erforschte Signalweg ist durch das G_q -Protein. Dabei aktiviert die G_{α_q} -Untereinheit die Phospholipase C- β (PLC), die durch die Spaltung von Phosphatidyl-Inositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) eine Akkumulation von Inositol-1,4,5-triphosphat (IP_3) und Diacylglycerin (DAG) verursacht. Das IP_3 wiederum führt zu einer Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration in der Zelle, indem es entsprechende Kanäle am Endoplasmatischen Retikulum öffnet, während das DAG die Proteinkinase C (PKC) anregt (Horn 2009, Nakahata et al. 2008). Kommt es hingegen zur Stimulation eines TP, der mit einem G_{13} -Protein gekoppelt ist, wird mithilfe eines GTP-Austauschfaktors (RhoGEF, Rho *guanine nucleotide exchange factor*) ein Rho-vermittelter Signalweg initiiert (Abb. 1.2). Dieser führt unter anderem zur Regulierung des Aktinzytoskeletts, der Zellmotilität, Kontraktion und Myosinleichtkettenkinase (Nakahata et al. 2008). Meist laufen die hier beschriebenen Signalwege jedoch nicht einzeln, sondern in einem komplexen Zusammenspiel miteinander und mit anderen Signalkaskaden ab und führen so zu einer umfassenden zellulären Antwort, wie z. B. bei der Hämostase, auf die im nachfolgenden Abschnitt genauer eingegangen wird.

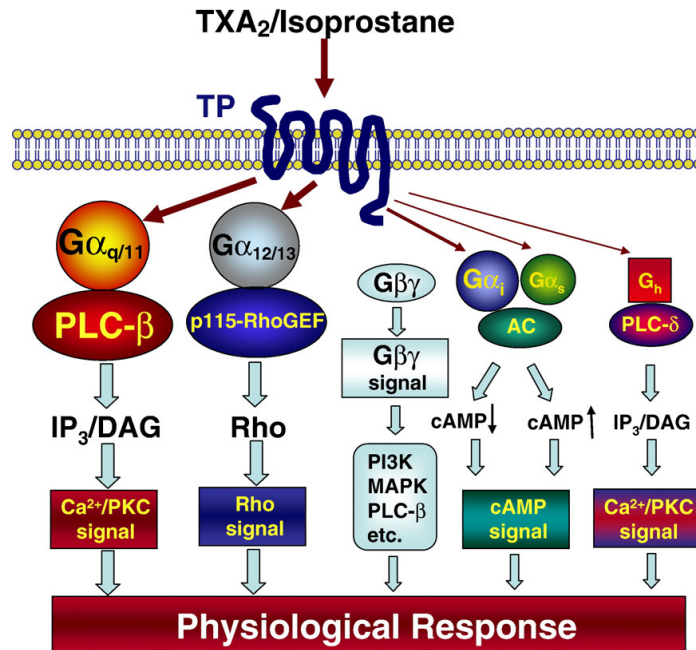


Abb. 1.2 Kopplung an G-Proteine und Signaltransduktion des TP. PLC- β : Phospholipase C- β ; p115-RhoGEF: p115 guanine nucleotide exchange factor für Rho; AC: Adenylatzyklase; PLC- δ : Phospholipase C- δ ; IP₃: Inositol-1,4,5-triphosphat; DAG: Diacylglycerin; cAMP: zyklisches Adenosinmonophosphat; PI3K: Phosphatidylinositol 3-Kinase; MAPK: mitogen-aktivierte Kinase, PKC: Proteinkinase C (Nakahata et al. 2008)

1.1.3 Die primäre Hämostase – ein komplexes Zusammenspiel verschiedenster Rezeptoren und Signalwege

Kommt es zur Verletzung eines Blutgefäßes, muss eine Blutung zur Vermeidung größerer Verluste schnellstmöglich und sicher abgedichtet werden. Unter dem Begriff der Hämostase fasst man dabei alle Prozesse zusammen, die an der Beendigung der Blutung beteiligt sind. Innerhalb weniger Minuten kommt es durch die Aggregation der Thrombozyten (Blutplättchen) in der Wunde zur Ausbildung eines so genannten weißen Thrombus sowie zur lokalen Vasokonstriktion. Dieser Vorgang wird als primäre Hämostase (zelluläre Hämostase, Blutstillung) bezeichnet. Unmittelbar daran schließt sich die sekundäre Hämostase (plasmatische Hämostase, Blutgerinnung) an,

bei der es mithilfe verschiedener Gerinnungsfaktoren zur Umwandlung von Fibrinogen zu Fibrin kommt und das so gebildete Fibrin-Fasernetze einen stabilen Wundverschluss gewährleistet (Rassow et al. 2008).

Normalerweise stellen die Endothelzellen der Gefäßwand eine natürliche Barriere zwischen den Thrombozyten und der extrazellulären Matrix dar. Entsteht jedoch ein Defekt, erhalten die Thrombozyten Kontakt zum Kollagen in der subendothelialen Schicht und können sich mithilfe mehrerer Rezeptorproteine in ihrer Zellmembran an dieses binden (Rassow et al. 2008). Unter der hohen Flussgeschwindigkeit im Blut wird zunächst der von-Willebrand-Faktor (vWF) benötigt, der als Adapterprotein fungiert und die Bindung über das Glykoprotein GP Ib an das Kollagen ermöglicht (Li et al. 2010). Durch die Verminderung der Geschwindigkeit kann dann zusätzlich die Assoziation über die Kollagenrezeptoren, GP VI und Integrin $\alpha_2\beta_1$, erfolgen (Rivera et al. 2009). Die Bindung an das Kollagen führt zur Stimulierung der Rezeptoren und zur Initiierung verschiedener Signalwege, die unter anderem über die PLC eine Aktivierung der Thrombozyten auslösen (Li et al. 2010). Diese Aktivierung zieht mehrere Veränderungen nach sich. Durch die Reorganisation des Aktinzytoskeletts kommt es zur Formänderung der Thrombozyten von rund zu flach sowie zur Ausbildung dünner Fortsätze. Thromboxan A_2 wird aus Granula unabhängigen Speichern freigesetzt als auch seine Neusynthese angeregt. Die α - und δ -Granula geben ihre Inhaltsstoffe frei und somit werden neben Fibronectin, Fibrinogen und weiteren Gerinnungsfaktoren auch ADP, Serotonin und Ca^{2+} -Ionen sezerniert (Rassow et al. 2008). Gemeinsames Ziel der löslichen Agonisten (TXA_2 , ADP und Serotonin) ist es, über die Bindung an ihre entsprechenden Rezeptoren sowohl die Eigenstimulation als auch die Rekrutierung und Aktivierung weiterer zirkulierender Thrombozyten zu bewirken (Li et al. 2010). Das ADP vermittelt dabei über die Rezeptoren $P2Y_1$ und $P2Y_{12}$. Sie gehören wie der TP zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Eine Bindung an den $P2Y_1$ -Rezeptor führt über das G-Protein G_q und die PLC zur Initiierung des IP_3/DAG -Signalweges während der stimulierte $P2Y_{12}$ -Rezeptor über das inhibitorische G-Protein G_i unter anderem die Adenylatzyklase hemmt und einen Abfall der cAMP-

Konzentration bewirkt. Dadurch kommt es zur Abnahme der aggregationshemmenden Wirkung des cAMP (Li et al 2010). Der durch das TXA₂ aktivierte TP setzt, wie in Abschnitt 1.1.2 beschrieben, ebenfalls den IP₃/DAG-Signalweg in Gang und verursacht einen Anstieg der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration in den Thrombozyten. Das Ca²⁺ ermöglicht wiederum die erneute Freisetzung von Botenstoffen aus intrazellulären Granula durch eine Verschmelzung mit der Plasmamembran sowie eine Formveränderung und Aggregation der Thrombozyten, ausgelöst vermutlich mithilfe des Calcium-Calmodulin-Komplex (Li et al. 2010). Auch der G₁₃-vermittelte Rho-Signalweg hat, wahrscheinlich durch eine Phosphorylierung der Myosinleichtkettenkinase, eine Formveränderung sowie Degranulation zur Folge (Li et al 2010). Dabei wird vermutet, dass in Bezug auf den TP die Formveränderung vorwiegend G₁₃ und die Plättchenaggregation in erster Linie G_q vermittelt abläuft (Nakahata et al 2008). In den glatten Muskelzellen der Gefäßwände führen die TP-initiierten Signalwege ebenso wie das Serotonin über den 5HT_{2A}-Rezeptor zur lokalen Vasokonstriktion und erleichtern so zusätzlich die Blutstillung (Rassow et al. 2008, Li et al. 2010). Das gemeinsame Ziel aller Signalwege ist neben der Degranulation und Formveränderung auch die Aktivierung des so genannten Integrins α_{IIb}β₃ (oder Glykoprotein GP IIb/IIIa; Li et al 2010). Es vollzieht dabei eine Konformationsänderung und ist dadurch in der Lage, sich an Kollagen, Fibronectin und vor allem Fibrinogen zu binden (Rassow et al. 2008). Durch die Bindung an das Fibrinogen werden die Thrombozyten zusätzlich untereinander quervernetzt und in das entstehende Fibrin-Fasernetz eingebunden. Dies stabilisiert den wachsenden Thrombus, der als weißer Thrombus bezeichnet wird und den Abschluss der Blutstillung definiert (Rassow et al. 2008).

1.1.4 Die Desensibilisierung des TP durch eine cGMP/PKG-abhängige Phosphorylierung

NO ist ein potenter und der bedeutendste endogen produzierte Vasodilator (Ignarro et al. 1987, Palmer et al 1987) als auch Hemmer der Plättchenaggregation (Wang et al 1998). Es ist bekannt, dass der Effekt in den glatten Gefäßmuskelzellen als auch in den Blutplättchen durch cGMP vermittelt wird, das eine cGMP-abhängige Proteinkinase aktiviert und so den G_{α_q} -PLC-IP₃/DAG-Signalweg als auch die intrazelluläre Calciummobilisierung inhibiert (Wang et al. 1998).

Genauere Untersuchungen von Wang et al. an Thrombozyten, die mit dem nicht hydrolysierbaren Analogon 8-Bromo-cGMP inkubiert und anschließend mit U46619 stimuliert wurden, konnten zeigen, dass es zu einer dosisabhängigen Abnahme der TP-gekoppelten GTPase-Aktivierung kommt. Die GTPase entspricht dabei der α -Untereinheit, die entsprechend ihres Aktivitätszustandes GDP oder GTP gebunden hat und durch ihre intrinsische GTPase-Aktivität in der Lage ist, nach der Signalübermittlung vom Rezeptor an die Effektoren, das GTP wieder zu spalten, so in die inaktive Form überzugehen und das Signal zu beenden (Strathmann et al. 1991). Darüber hinaus konnten Wang et al. in ihren Studien hohe Konzentrationen der Proteinkinase G nachweisen als auch eine Phosphorylierung des TP, vermutlich in der zytoplasmatischen C-terminalen Domäne, zeigen. Mit dieser Erkenntnis entwickelten sie die Hypothese, dass die Hemmung der Thrombozytenaktivierung zumindest zu einem Teil durch eine Phosphorylierung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren durch die Proteinkinase G (PKG) vermittelt sein könnte. Abbildung 1.3 demonstriert dabei die folgende Modellvorstellung. Wang et al. nehmen an, dass NO die lösliche Guanylatzyklase aktiviert und so eine Akkumulation von cGMP in der Zelle verursacht. Das cGMP wiederum aktiviert die Proteinkinase G, die ihrerseits einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor wie den TP phosphoryliert. Diese Phosphorylierung hätte eine Entkopplung des Rezeptors von seinem entsprechenden G-Protein zur Folge und würde somit auch die Aktivierung der nachgeschal-

teten *second messenger* verhindern. Letztlich wären die Agonisten damit weniger in der Lage die Rezeptor gekoppelte Signalkaskade zu aktivieren, was zu einem Abfall bis Ausbleiben der physiologischen Antwort von Thrombozyten oder Gefäßmuskelzellen führen würde.

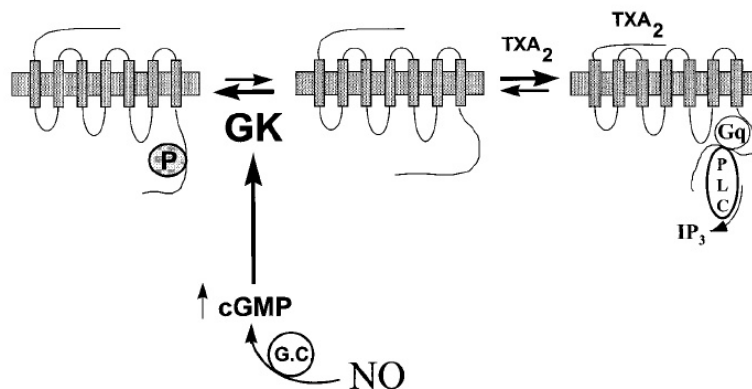


Abb.1.3 Modellvorstellung über die Desensibilisierung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren durch NO und cGMP. cGMP: zyklisches Guanosinmonophosphat; G.C: lösliche Guanylatzyklase; GK: Proteinkinase G; NO: Stickstoffmonoxid; P: Phosphor (Wang et al. 1998)

1.2 Die Chemie von HNO

HNO, das in der Literatur auch *Nitroxyl* genannt wird, ist die um ein Elektron reduzierte und protonierte Form von NO (Paolucci et al. 2007). Obwohl es sich dabei um ein nur dreiatomiges Molekül handelt, ist seine Chemie äußerst komplex. Der folgende Abschnitt soll einen Überblick über die wichtigsten chemischen Eigenschaften geben.

Entgegen früherer Annahmen haben Studien herausgefunden, dass es sich bei HNO um eine schwache Säure mit einem pK_a von 11,5 handelt (Paolucci et al. 2007). Dieser Tatsache zu Folge kann angenommen werden, dass HNO bei einem physiologischen pH dominierend gegenüber seiner korrespondierenden Base NO⁻ vorliegt. Dennoch lässt sich trotz der hohen Säurekonstante die Möglichkeit, dass genügend NO⁻ gebildet wird und dieses

durch biochemische Reaktionen die reine Wirkung von HNO beeinflusst, nicht ausschließen. Allerdings besitzen HNO und NO^- zusätzlich unterschiedliche *spin states*, die für den Protonentransfer zur Bildung der konjugierten Säure oder Base eine hohe kinetische Barriere darstellen und diesen somit unwahrscheinlich machen. Zusätzlich durch die hohe Reaktionsfreudigkeit gegenüber anderen kinetisch günstigeren Reaktionen als dem Protonentransfer lassen sich die beobachteten biochemischen Effekte nahezu ausschließlich der Ausgangssubstanz zuschreiben (Paolocci et al. 2007, Switzer et al. 2009).

Erschwerend für die Arbeit mit HNO ist die leicht ablaufende und vorherrschende Dimerisierung, der Reaktion mit sich selbst, bei der aus zwei Molekülen HNO $\text{H}_2\text{N}_2\text{O}_2$ entsteht, das in Distickstoffoxid (N_2O) und Wasser zerfällt (Fukuto et al. 2005, Paolocci et al. 2007). Die Metastabilität von HNO bedingt durch diesen konsumierenden Reaktionsweg und die gleichzeitige Unfähigkeit zur Speicherung macht den Gebrauch von HNO-Donatoren zur Erforschung des Moleküls erforderlich.

Neben seiner Autoreaktivität sind Thiole oder Proteine mit Thiolstrukturen als auch Metalloproteine die bevorzugten biologischen Targets von HNO (Paolocci et al. 2007, Irvine et al. 2008, Fukuto et al. 2009). Die direkte Interaktion von HNO mit Thiolen führt entweder bei Vorhandensein eines benachbarten Thiols zur reversiblen Ausbildung eines Disulfids oder aber zur irreversiblen Modifikation unter Bildung eines Sulfinamids, wenn kein weiterer Reaktionspartner vorhanden ist (Abb. 1.1). Eine solche Modulation der Thiolstrukturen (SH-Gruppen) von Cysteinen im aktiven Zentrum eines Proteins ermöglicht es, Enzyme, z. B. die Aldehyddehydrogenase (ALDH) oder Rezeptoren, z. B. den NMDA-Rezeptor, mit wichtigen Kontrollfunktionen in der Zelle in ihrer Aktivität zu beeinflussen und scheint der hauptsächliche Mechanismus für die pharmakologische Wirkung von HNO zu sein (Fukuto et al. 2009). Das wichtigste Metalloprotein, mit dem HNO interagiert, ist die lösliche Guanylatzyklase (*soluble guanylate cyclase*, sGC). Durch eine direkte Interaktion mit der regulatorischen Fe^{2+} -Hämgruppe ist HNO in der Lage, die

Aktivität der sGC und somit auch die cGMP-Konzentration zu steigern (Miller et al. 2009).

Die hohe Reaktionsfreudigkeit von HNO im biologischen System ist abhängig von der Konzentration der potentiellen Zielstrukturen in der zellulären Umgebung sowie von der Reaktionsgeschwindigkeit. Während die Reaktion von HNO mit Sauerstoff relativ langsam abläuft und somit nicht von signifikanter biologischer Relevanz zu sein scheint, wird der Interaktion mit Glutathion (GSH) größere Bedeutung beigemessen. Aufgrund der hohen zellulären Konzentration von GSH (1-10 mM) nahm man anfangs an, dass HNO sofort nukleophil angegriffen und dadurch größtenteils abgefangen werden würde. Neuere Studien zeigen jedoch, dass HNO selbst bei niedrigen Konzentrationen selektiv mit Thiolstrukturen bestimmter Proteine reagiert, ohne dabei die intrazelluläre GSH Konzentration zu verändern oder alle zellulären Thiole gleichermaßen zu modifizieren (Paolocci et al. 2007, Fukuto et al. 2009). Donzelli et al. (2006) vermuten, dass dieser Effekt auf die bevorzugte Assoziation von HNO mit Thiolaten (RS^-) gegenüber Thiolen zurückgeführt werden könnte.

Obwohl der direkte Nachweis von HNO wegen seiner Autoreaktivität und hohen Reaktionsfreudigkeit nicht möglich ist und auch Nachweise für seine In-vivo-Produktion in Säugetierorganismen fehlen, geben Studien In-vitro-Beweise für die potentielle endogene Produktion. Es wird angenommen, dass *Nitroxyl* sowohl direkt durch die NO-Synthase (NOS) als auch NOS unabhängig gebildet werden kann (Fukuto et al. 2005, Irvine et al. 2008). Mit der Frage nach der Produktion im biologischen System bleibt weiterhin zu klären, ob HNO ähnlich wie NO Teil endogener physiologischer Signalwege ist. Einer Antwort ist man nicht zuletzt aufgrund fehlender Detektionsmöglichkeiten bis heute schuldig geblieben. Gegenwärtig existieren nur indirekte Methoden zur Erfassung von HNO (Irvine et al. 2008). Ein möglicher Hinweis für seine Anwesenheit ist das Dimerisierungsprodukt N_2O . Da die Autoreaktivität jedoch bei biologischen oder pharmakologischen Konzentrationen von HNO eine untergeordnete Rolle spielt und N_2O zusätzlich durch den Zerfall von Stickstoffoxiden gebildet wird, bietet diese Methode nur ungenügend

Aussagekraft über die Existenz von freiem HNO (Paolocci et al. 2007). Untersuchungen von Donzelli et al. (2006) mittels HPLC haben gezeigt, dass bei der Reaktion von HNO mit Glutathion (GSH) neben oxidierten Thiolen (GSSG) auch Sulfinamid (GS(O)NH₂) entsteht, welches als ein zellulär stabiles Produkt nicht zusätzlich durch andere Stickstoffoxide gebildet wird und somit als ein eindeutiger Marker für die Anwesenheit von freiem HNO dienen könnte.

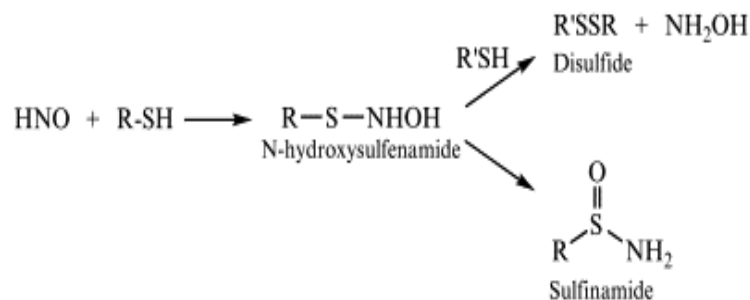


Abb. 1.4 Reaktion von HNO mit Thiolstrukturen (Fukuto et al. 2008)

1.3 HNO-Donatoren

Aufgrund der geringen Stabilität des HNO Moleküls und der damit verbundenen Unfähigkeit zur Speicherung bedient man sich für die experimentelle Erforschung so genannter HNO-Donatoren. Der am häufigsten genutzte und am besten erforschte Donator ist das Angeli's Salz (Na₂N₂O₃), das unter physiologischen Bedingungen in HNO und NO₂⁻ zerfällt (Paolocci et al. 2007). Aufgrund der schnellen Freisetzung von HNO und der damit verbundenen Bolusapplikation bedingt durch die kurze HWZ von ~2.5 min, dem alkalischen pH durch die Lösung in NaOH und der gleichzeitigen Freigabe von Nitrit ist seine Verwendung jedoch begrenzt (Paolocci et al. 2007, Irvine et al. 2008, Switzer et al. 2009). Ein weiterer HNO-Donator ist das Cyanamid (H₂NCN), das durch die Katalase via Oxidation bioaktiviert wird und anschließend zu HNO und Cyanid zerfällt. Durch die Fähigkeit von HNO selektiv die Aldehyddehydrogenase (ALDH) über eine Interaktion mit

den funktionellen Thiolstrukturen zu inhibieren und seine therapeutische Wirkung unterhalb der Toxizitätsschwelle des als Nebenprodukt entstehenden Cyanids zu entfalten, hat das Cyanamid in der Behandlung der Alkoholkrankheit bereits an Bedeutung erlangt (Paolucci et al. 2007, Irvine et al. 2008). Eine neue Gruppe von HNO-Donatoren sind die von Bruce King entwickelten *Acyloxy Nitroso Compounds*. Ein Beispiel hierfür ist das 1-Nitrosocyclohexylacetat (NCA), welches HNO durch eine spontane Hydrolyse oder Esteraseaktivität freisetzt (Abb. 1.2). Der Vorteil gegenüber dem bereits erwähnten Angeli's Salz liegt in der langsameren und kontrollierten sowie reinen Abgabe von HNO unter physiologischen Bedingungen. Darüber hinaus kann die Hydrolyserate in Abhängigkeit vom pH und durch eine Modulation der Struktur der organischen Gruppe variiert werden. Die charakteristische blaue Farbe ermöglicht es, die biochemische Reaktionskinetik leicht zu erfassen. Diese bevorzugten Eigenschaften stellen eine gute Voraussetzung für die In-vivo-Applikation als auch einen potentiell klinischen Gebrauch dar (Sha et al. 2006, Paolucci et al. 2007, Irvine et al. 2008, Switzer et al. 2009).

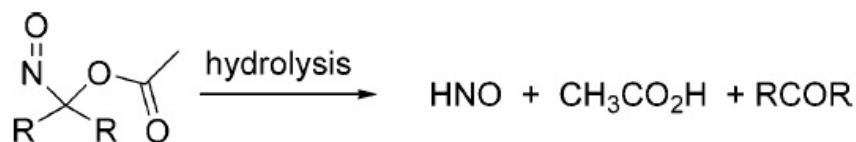


Abb. 1.5 Freisetzung von HNO durch Hydrolyse von NCA (Sha et al. 2006)

1.4 Die Pharmakologie von HNO

Dank intensiver Forschung wurden in den letzten Jahren eine Vielzahl pharmakologischer Wirkungen von HNO aufgedeckt, die vor allem im Hinblick auf das kardiovaskuläre System ein immenses Potential für einen möglichen therapeutischen Einsatz bieten. Von besonderer Bedeutung hierfür sind seine hohe Selektivität für spezifische Proteintargets sowie die ausgeprägte

Reaktionsfreudigkeit gegenüber Thiolstrukturen und Metalloproteinen, die schon das bereits erwähnte Cyanamid zur Behandlung der Alkoholkrankheit qualifizierte.

In den frühen 90er Jahren haben Untersuchungen mit Angeli's Salz gezeigt, dass HNO eine ausgeprägte vasorelaxierende Wirkung besitzt (Paolucci et al. 2007). Obwohl der Mechanismus bis zum heutigen Tag noch nicht komplett aufgeklärt ist, wird angenommen, dass HNO die Vasodilatation in erster Linie durch eine direkte Aktivierung der sGC und einer resultierenden zellulären Akkumulation von cGMP ausübt. Ebenfalls in den Wirkmechanismus involviert scheint, wenn auch nur zu einem geringen Anteil, das CGRP (*Calcitonin gene-related peptide*) zu sein, das von den Gefäß innervierenden sensorischen Nerven freigesetzt wird und über eine Erhöhung des cAMP-Spiegels sowie der Aktivierung von Kaliumkanälen zu den potentesten relaxationsfördernden Peptiden gehört (Irvine et al. 2008). Eine bedeutende Rolle spielt weiterhin der spannungsabhängige K⁺-Kanal (K_v). Es wird vermutet, dass seine Aktivierung zu einer Hyperpolarisation und somit zu einer Entspannung der glatten Gefäßmuskelzellen führt (Paolucci et al. 2007). Ob allerdings die Aktivierung des K_v-Kanals durch HNO direkt oder cGMP abhängig erfolgt, bleibt abschließend zu klären. Die Fähigkeit zur Interaktion mit Thiolen könnte aber HNO zur direkten Modulation des K_v-Kanals unabhängig vom cGMP befähigen (Irvine et al. 2003).

Weitere pharmakologische Eigenschaften von HNO, die im Hinblick auf Erkrankungen des kardiovaskulären Systems von besonderem Vorteil erscheinen, sind die Steigerung der myokardialen Kontraktilität bei gleichzeitig beschleunigter Entladung und Entspannung des Herzens (Paolucci et al. 2007). Dieser positiv inotrope und lusitrope Effekt bleibt auch bei einer β-Adrenorezeptorblockade unbeeinflusst und verhält sich additiv zur β-adrenergen Stimulation. Darüber hinaus haben Studien mit Angeli's Salz gezeigt, dass diese Eigenschaften sowohl am gesunden als auch am experimentellen Herzinsuffizienzmodell unabhängig von der Vor- und Nachlast des Herzen zu beobachten sind (Paolucci et al. 2003, Paolucci et al. 2007, Irvine et al. 2008). Als Wirkmechanismus wird eine Modifikation spezifischer Thiole des

Ryanodinrezeptors (RyR2) durch HNO vermutet, die die Freigabe von Calcium (Ca^{2+}) aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum (SR) steigert. Eine gleichzeitige Funktionszunahme der SR Ca^{2+} -ATPase (SERCA2a) fördert zusätzlich die Wiederaufnahme des Ca^{2+} in das SR ohne dabei die Ca^{2+} -Homöostase zu beeinflussen. Dieser kombinierte Effekt scheint für die Induktion und Aufrechterhaltung der positiven Inotropie und Lusitropie verantwortlich zu sein (Paolocci et al. 2007, Irvine et al. 2008). Außerdem wird angenommen, dass HNO in der Lage ist, die Ca^{2+} -Sensitivität der Myofilamente zu erhöhen und über einen sGC/cGMP-Signalweg eine Hypertrophie der Kardiomyozyten zu verhindern (*anti-remodelling*; Paolocci et al. 2007). Weiterer Investitionen bedarf auch die Thematik des so genannten frühen vorkonditionierungsähnlichen Effektes (IPC; *ischemic preconditioning*) als Schutz gegen Ischämie-Reperfusionsschäden, der entscheidend von der Applikationszeit von HNO abhängt. Während die Verabreichung von HNO vor der Reperfusion zu einer Exazerbation der Schäden führt, wirkt sich eine Administration vor der eigentlichen Ischämie als kardioprotektiv vergleichbar mit einer ischämischen Präkonditionierung aus (Paolocci et al. 2007, Irvine et al. 2008). Spekulativ eröffnet dieser Effekt die Möglichkeit, HNO-Donatoren vor geplanten ischämischen Episoden, z. B. bei chirurgischen Eingriffen am Herzen, einzusetzen (Paolocci et al. 2007).

Neuere Untersuchungen mit Angeli's Salz an humanen Thrombozyten haben gezeigt, dass HNO in der Lage ist die Plättchenaggregation konzentrationsabhängig und unabhängig vom Rezeptor, der in die Plättchenantwort involviert ist, zu inhibieren (Bermejo et al. 2005). Dabei wird vermutet, dass HNO auch hier zumindest teilweise über einen sGC/cGMP-abhängigen Signalweg agiert (Bermejo et al. 2005).

Eine Kombination der pharmakologisch einzigartigen Wirkungen von HNO wie die myokardiale Kontraktilitätssteigerung und die periphere Vasodilatation eröffnet neue Möglichkeiten in der Behandlung der Herzinsuffizienz. Durch die Unabhängigkeit vom cAMP-Signalweg und die fehlende Einflussnahme auf die Ca^{2+} -Homöostase könnten die Schwächen der bisher in der Akutbehandlung eingesetzten β -Agonisten wie die geringere Effektivität

bedingt durch das herunterregulierte β -adrenerge System und die Förderung von Arrhythmien vermieden werden (Paolucci et al 2007). Während die antithrombotische Eigenschaft potentiell therapeutische Relevanz in der Behandlung atherothrombotischer Syndrome findet, erweitert die Verbindung mit der vasorelaxierenden und antioxidativen Fähigkeit das Spektrum hin zu kardiovaskulären Erkrankungen wie Angina, akute hypertensive Krise und Arteriosklerose. Der Einsatz von HNO-Donatoren könnte die traditionell in der Behandlung eingesetzten NO-Donatoren, die im Gegensatz zu HNO zur Toleranzentwicklung neigen, unter oxidativen Stressbedingungen eine verringerte Effektivität und potentiell zytotoxische Wirkung aufzeigen (Irvine et al. 2008), ablösen.

1.5 Fragestellung

Das grundlegende Ziel der Arbeit war es, herauszufinden, welchen Einfluss HNO freigegeben durch den neuartigen Donator NCA auf die TP-vermittelten zellulären Antworten ausübt. Hiefür wurden intakte Maus-Aortenringe und humane Thrombozyten mit unterschiedlichen Konzentrationen von NCA inkubiert und anschließend Kontraktions- und Aggregationsmessungen durchgeführt. Im Verlauf der Untersuchungen wurde die Hypothese aufgestellt, dass HNO ebenso wie NO den TP über eine cGMP/PKG-abhängige Phosphorylierung desensibilisieren könnte und dies als möglicher Mechanismus der beobachteten Wirkung in Frage käme. Hierfür wurden cGMP-Messungen mithilfe eines Enzymimmunoassays an zuvor mit NCA inkubierten Aortenringen durchgeführt.

Im Einzelnen wurden folgende Fragen bearbeitet:

1. Welchen Einfluss hat HNO auf die TP-vermittelte Gefäßkontraktion?
2. Ist HNO freigegeben durch NCA in der Lage die Plättchenaggregation zu hemmen?
3. Stellt die cGMP/PKG-abhängige Phosphorylierung des TP einen möglichen Wirkmechanismus dar?

2 Material und Methoden

2.1 C57Bl/6J Maus

Als Versuchstiere für die folgenden Versuche (2.3, 2.5) wurden ausschließlich männliche Wildtyp-Mäuse der Linie C57Bl/6J im Alter von 13-15 Wochen verwendet. Für die Tierversuche liegt eine Genehmigung der Behörde für Wissenschaft und Gesundheit der Freien und Hansestadt Hamburg vor (G 21/1-46/04).

2.2 Präparation der Maus-Aortenringe

Das mit CO₂ betäubte Versuchstier wurde durch die Dekapitation getötet und zur Eröffnung der Bauchhöhle und des Thorax wurden ein Längsschnitt sowie zwei horizontale Entlastungsschnitte auf Höhe der Rippenbögen gesetzt. Nach der Entfernung des Sternums und der vorderen Rippenanteile erfolgte die Injektion von Heparin (0,5 ml einer 1.000 IU/ml Stammlösung = 500 IU) in den linken Ventrikel des noch schlagenden Herzens, um die Ausbildung von Blutkoagel in der Aorta zu verhindern. Um nun die Aorta darstellen zu können, wurden anschließend das abdominelle Organpaket sowie Herz und Lungen entfernt. Der Bereich der thorakalen Aorta beginnend vom Aortenbogen bis zum Zwerchfell wurde daraufhin vorsichtig von der Wirbelsäule mithilfe einer Präzisionspinzette (Dumont Medical # 5/45° 0,05 mm × 0,01 mm, Fine Science Medical, Schweiz) und einer Mikroschere (15000-08, Fine Science Medical, USA) freipräpariert. Nach der Entnahme aus dem Situs wurde die Aorta in eine Petrischale gefüllt mit oxygenierter Pufferlösung (in mM: 99 NaCl, 4,7 KCl, 2,5 CaCl₂, 1,2 MgSO₄, 25 NaHCO₃, 1,03 KH₂PO₄, 11,1 D-Glucose, pH 7,35) überführt und auf Flockeneis (-0,5 °C) gelagert. Unter dem Mikroskop erfolgte die Feinpräparation, bei der die Aorta vom umgebenen Fettgewebe und Bindegewebe befreit wurde (Abb. 2.1 A, B) und mit einem Skalpel in 3-4 mm große Ringe geschnitten wurde. Aus einer Aorta wurden dabei stets zwei Ringe für die weitere Untersuchung gewonnen und

in das bereits vorbereitete Organbadsystem überführt. Um möglichst funktionsfähige Aortenringe zu erhalten, muss die Zeitspanne zwischen der Tötung des Versuchstieres und der Überführung der Ringe in das mit oxygenierter Pufferlösung gefüllte, auf 37 °C erwärmte Organbad möglichst im Bereich von 30 min liegen.

2.3 Kontraktionsmessungen an Maus-Aortenringen im Organbad

Das Organbadsystem zur Durchführung der Kontraktionsmessungen an den Maus-Aortenringen bestand aus einem Organbad, einem Kraftaufnehmer (Ingenieurbüro Jäckel, Hanau, Deutschland) und einem in Folge geschalteten Signalverstärker. Die über den Kraftmesser eingehenden Signale ausgelöst durch eine isometrische Kontraktion der Aortenringe wurden mithilfe der Software BeMon (IBJ BeMon 3.55, Ingenieurbüro Jäckel, Hanau, Deutschland) aufgezeichnet und anschließend ausgewertet.

2.3.1 Versuchsaufbau

Bevor die eigentliche Digitalisierung der Kontraktion der Aortenringe mithilfe der BeMon Software erfolgen konnte, wurde zunächst eine Kalibrierung von Verstärker als auch Kraftaufnehmer mit einem 5 g Gewicht vorgenommen. Dadurch wurde eine Aufzeichnung der Kontraktion bis zu einer Kraft von 50 mN ermöglicht.

Nach einer reinigenden Spülung des Organbades mit deionisiertem Wasser erfolgte die Befüllung der Kammer mit 25 ml der zuvor hergestellten Pufferlösung. Über das doppelwandige System mit Anschluss an einen Warmwasserzirkulator (C29 CS Lauda) wurde die Pufferlösung konstant bei einer Temperatur von 37 °C gehalten. Zusätzlich erfolgte eine kontinuierliche Begasung mit einer Mischung aus 95% O₂ und 5% CO₂. Im Anschluss an die Vorbereitung wurden die Aortenringe präpariert, mithilfe speziell gebogener Drähte horizontal in die Kraftmesser eingespannt (Abb. 2.1 C) und in die

Kammer des Organbades eingelassen. Über eine Zeitspanne von circa 30 min erfolgte eine schrittweise Vorspannung der Ringe auf eine passive Kraft von 11 mN. Nach der Äquilibration wurden die Ringe durch die Zugabe von KCl (Endkonzentration: 80 mM) für 5 min auf ihre Kontraktionsfähigkeit hin untersucht. Anschließend erfolgte die Spülung des Organbades durch den Austausch der Pufferlösung und nach dem Erreichen der Ausgangsspannung von 11 mN schloss sich eine zweite Kontraktionstestung mit KCl an. Mit einem funktionsfähigen Maus-Aortenring konnte nun der eigentliche Versuch durchgeführt werden. Die aus einer Aorta gewonnenen zwei Ringe wurden dabei in getrennten Organbädern untersucht und die Kontraktionen auf getrennten Messkanälen aufgezeichnet. Des Weiteren wurde jeder Ring stets nur für einen Versuchsdurchlauf verwendet.

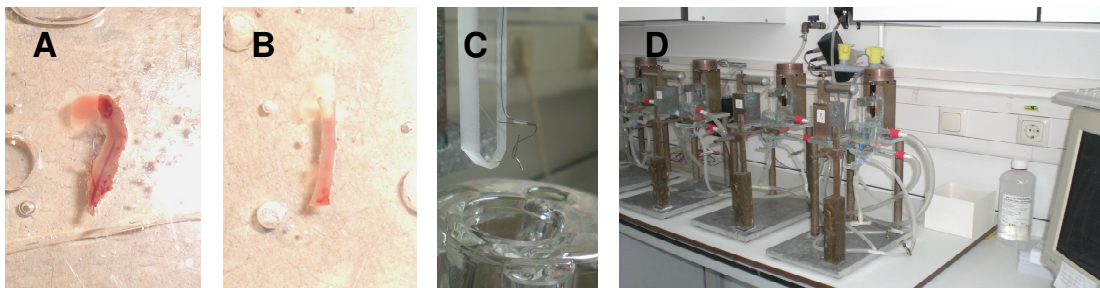


Abb. 2.1 *Präparation der Maus-Aortenringe und Versuchsaufbau (A) thorakale Aorta, (B) von Binde- und Fettgewebe befreite Aorta, (C) horizontal eingespannter Aortenring, (D) Organbadsystem*

2.3.2 Untersuchung verschiedener Konzentrationen von NCA

Zu Beginn eines Kontraktionsversuches wurde die Vorspannung der Aortenringe erneut auf eine passive Kraft von 11 mN hin kontrolliert und gegebenenfalls korrigiert. Anschließend wurde durch eine kumulative Zugabe des Thromboxan A₂ Analogon U46619 in aufsteigender Konzentration (10^{-10} - 10^{-6} M) eine Konzentrations-Wirkungskurve konstruiert. Die mit der steigenden

Dosis an U46619 kongruente Zunahme der isometrischen Kontraktion der Aortenringe wurde vom Kraftaufnehmer erfasst und in der BeMon Software als steigende Kraftkurve (mN) dargestellt (Abb. 2.2). Diese Kurve galt für den weiteren Versuchsablauf als Kontrollkurve. Nach dem Erreichen der maximalen Kontraktionskraft (10^{-6} M) der Ringe, dem so genannten Plateau wurde das Organbad so oft durch einen Austausch der Pufferlösung in der Kammer gespült, bis die Ringe wieder auf die Ausgangsspannung von 11 mN relaxiert waren. Im Anschluss daran erfolgte die Zugabe des Metallchelators Diethylentriaminpentaessigsäure (DTPA, 50 μ M) in das Organbad und die Inkubation der Aortenringe mit unterschiedlichen Konzentrationen des HNO-Donators 1-Nitrosocyclohexylacetat (100 μ M, 300 μ M, 500 μ M) für eine Dauer von 30 min. Das DTPA diente dabei als Hemmer der Konversion von HNO zu NO. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Kammer dreimalig gespült und erneut eine Konzentrations-Wirkungskurve durch die kumulative Zugabe von U46619 in aufsteigender Konzentration (10^{-10} - 10^{-6} M) konstruiert.

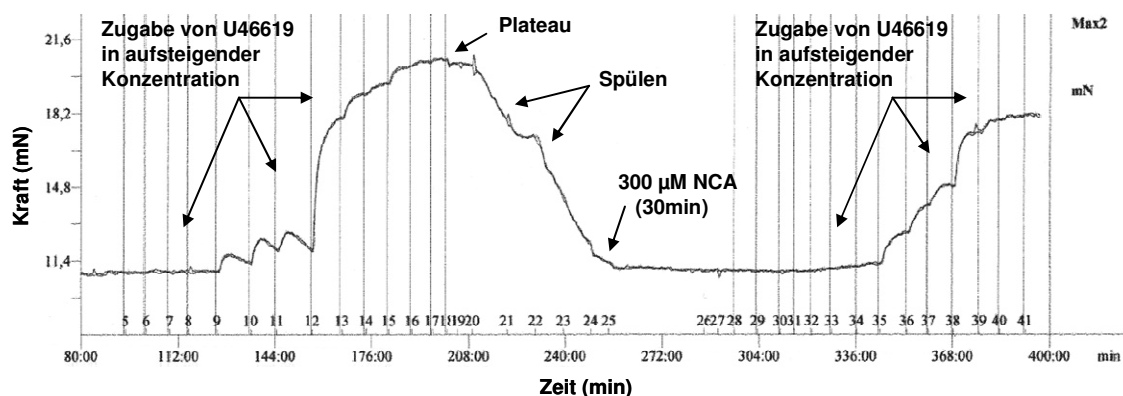


Abb. 2.2 Ablauf eines Kontraktionsversuches mit 300 μ M NCA

2.3.3 Kontrollexperimente

Die Kontrollexperimente erfolgten in ähnlicher Weise. In der ersten Kontrolle zur Untersuchung der Verweildauer der Aortenringe im Organbad als mögli-

cher Einflussfaktor auf die Funktionsfähigkeit des TP wurde die Inkubationszeit der Ringe ohne die Zugabe von NCA abgewartet und anschließend eine zweite Konzentrations-Wirkungskurve konstruiert. Im Ablauf des zweiten Kontrollexperimentes zur Überprüfung des Einflusses von Glutathion auf die Wirkung von NCA wurde der Pufferlösung in der Kammer des Organbades zusätzlich Glutathion in einer Endkonzentration von 1 mM hinzugefügt und anschließend die Inkubation der Aortenringe mit 300 μ M NCA vorgenommen. Während des dritten Kontrollexperimentes erfolgte die Inkubation stattdessen mit 300 μ M 3-Methyl-NCA.

2.3.4 Datenanalyse

Die experimentellen Daten zur konzentrationsabhängigen Kontraktion (mN) der Aortenringe wurden als prozentualer Anteil der maximalen Kontraktion der Kontrollkurve (10^{-6} M entspricht 100%) berechnet. Die statistische Analyse der aufgezeichneten Daten wurde mithilfe der Graph-Pad Prism 5.0 Software durchgeführt. Bei einem Vergleich der Messergebnisse vor und nach der Zugabe der zu untersuchenden Substanz wurde der Student t-test herangezogen. Ein P Wert von <0.05 wurde als statistisch signifikant angesehen. Alle angegebenen Messwerte sind Mittelwerte \pm SEM.

2.4 Aggregationsmessungen an humanen Thrombozyten

Die Plättchenaggregationsversuche wurden mithilfe von venösem Blut gesunder Erwachsener und dem APACT 2 Aggregometer (Greiner Biochemica, Fracht, Deutschland) sowie der entsprechenden Software durchgeführt.

2.4.1 Probengewinnung und Aufbereitung

Durch eine saubere Venenpunktion wurde venöses Blut gesunder Erwachsener, die während der vorangegangenen zwei Wochen keine Medikamente

einnahmen, gewonnen und in einer Gerinnungsmonovette mit 3,8% Natriumcitrat (Verhältnis 1:10) antikoaguliert. Zur weiteren Aufbereitung wurde das venöse Blut bei 200 G und 25 °C für 15 min zentrifugiert. Der anschließend abpipettierte trübe Überstand stellte das plättchenreiche Plasma (*platelet rich plasma*, PRP) dar. Eine zweite Zentrifugation des in der Monovette enthaltenen Überrestes bei 2000 G und 25 °C für 10 min diente der Gewinnung des plättchenarmen Plasmas (*platelet poor plasma*, PPP). Auch dieses wurde abpipettiert und als klarer Überstand aufgefangen. Die Monovette wurde anschließend verworfen und das gewonnene PRP und PPP zur Durchführung der Experimente verwendet.

2.4.2 Untersuchung verschiedener Konzentrationen von NCA

Für jeden Versuch wurden eine Küvette mit 250 ml PPP (Referenzküvette) und zwei Küvetten (1,5 × 4 mm, Greiner Biochemica) mit je 250 ml PRP befüllt und im Inkubator des Gerätes unter konstanter Verwirbelung mit einem Rührstäbchen bei einer Temperatur von 37 °C gehalten. An eine Vorinkubation mit dem Metallchelator DTPA (50 µM) für 5 min schloss sich die Inkubation des PRP mit unterschiedlichen Konzentrationen von NCA (6 µM, 12,5 µM, 25 µM, 50 µM, 100 µM, 300 µM, 500 µM) für 15 min an. Nach Ablauf der Inkubationszeit sowie der Kalibrierung des Aggregometers mit der Referenzküvette wurden die Proben in die Messkanäle eingesetzt, die Thrombozytenaggregation induziert und der Verlauf der Aggregationskurve für 240 Sekunden aufgezeichnet. Das pipettierte Endvolumen der unterschiedlichen Verdünnungen von NCA betrug konstant 4 µl und als Kontrolle diente ein mit DTPA und einem äquivalenten Volumen an DMSO versetztes PRP. Für die anschließende Auswertung wurde die im Verlauf der 240 s maximal erreichte Aggregation in %, die durch den größten Ausschlag jeder Kurve definiert war, verwendet. Durch die Besetzung zweier Kanäle im ATRACT 2 Aggregometer erfolgte je Versuchsdurchlauf eine Doppelbestimmung.

2.4.3 Verwendung unterschiedlicher Induktoren der Plättchenaggregation (U46619, ADP, Kollagen)

Zur Induktion der Plättchenaggregation wurden in den Experimenten unterschiedliche Induktoren verwendet. Zu diesen zählten neben dem TXA₂ Analogon U46619 auch das ADP und das Kollagen. Die Konzentration der Induktoren wurde dabei stets so gewählt, dass eine irreversible Aggregation der Thrombozyten hervorgerufen wurde. Diese betrug für U46619 10 µM, für das ADP 6 µM und für das Kollagen 4 µM/ml. Die Verdünnung der Stammlösungen von ADP und Kollagen erfolgten dabei mit 0.9% NaCl und die von U46619 mit DMSO. Das pipettierte Endvolumen der Induktoren betrug konstant 10 µl.

2.4.4 Funktionsprinzip des Aggregometers

Das Prinzip der Messung beruht auf der Veränderung der Lichtdurchlässigkeit des PRP im Verlauf der Thrombozytenaggregation (Methode nach Born, 1962). Dabei wird eine Küvette befüllt mit PRP im Strahlengang des Photometers mit monochromatischem Licht der Wellenlänge 546 nm platziert (Bruhn et al. 2011). Unter Verwendung eines Rührmagnets wird das PRP konstant vermischt und bei einer Temperatur von 37 °C gehalten. Zu Beginn erscheint das PRP durch die vielen Thrombozyten trübe und zeigt eine geringe Lichtdurchlässigkeit (Transmission; Abb. 2.3 A). Tritt durch die Zugabe des Induktors jedoch die Aggregation ein, sinken die Thrombozyten auf den Boden der Messküvette und die Lichtdurchlässigkeit nimmt zu (Abb. 2.3 B; Bruhn et al. 2011). Diese Veränderung der Transmission wird photometrisch erfasst und mithilfe der AFACT Software als kontinuierlicher Kurvenverlauf dargestellt. Eine mit PPP befüllte Küvette, die eine maximale Transmission ermöglicht, dient als Referenzwert und wird vor Beginn der Messung zur Kalibrierung des Aggregometers benötigt. Sie definiert die maximal mögliche Aggregation (100%) der Thrombozyten. Die während der Aufzeichnung über

240 s maximal erreichte Aggregation wird anschließend in Relation zum Referenzwert (100% Aggregation) in Prozent ermittelt.

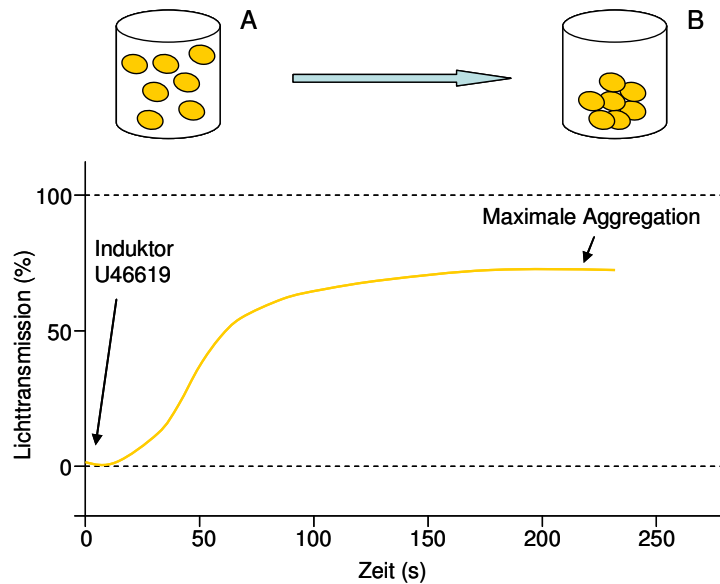


Abb. 2.3 Aggregationskurve einer irreversiblen, durch U46619 induzierten Thrombozytenaggregation (A) in einer Messküvette befindliche, ruhende Thrombozyten, (B) aggregierte Thrombozyten

2.4.5 Datenanalyse

Die experimentellen Daten zur maximal erreichten Aggregation der Thrombozyten wurden in Relation zur Referenzprobe (100%) in Prozent angeben. Die statistische Analyse der aufgezeichneten Daten wurde mithilfe der Graph-Pad Prism 5.0 Software durchgeführt. Bei einem Vergleich der Messergebnisse ohne und mit Zugabe der unterschiedlichen Konzentrationen von NCA wurde der Student t-test herangezogen. Ein P Wert von <0.05 wurde als statistisch signifikant angesehen. Alle angegebenen Messwerte sind Mittelwerte \pm SEM.

2.5 cGMP-Enzymimmunoassay (EIA)

Für die Bestimmung der cGMP-Konzentration wurde das cGMP-Enzymimmunoassay System von Amersham Biosciences (Amersham cGMP EIA Biotrak System, GE Healthcare, UK) verwendet und erfolgte im Anschluss an die Vorbehandlung der Maus-Aortenringe mit unterschiedlichen Testsubstanzen im Organbad.

2.5.1 Inkubation der Maus-Aortenringe im Organbad

Für die Behandlung mit den unterschiedlichen, die cGMP-Konzentration potentiell beeinflussenden Testsubstanzen wurden die Aortenringe nach der Präparation (siehe 2.2) entsprechend dem Versuchsaufbau 2.3 in das Organbadsystem transferiert und vorbereitet. Zusätzlich wurde die Endothelfunktion durch eine Vorkontraktion der Aortenringe mit dem Prostaglandin F₂ α (PGF₂ α , 1,6 μ M) und anschließender Relaxation durch Acetylcholin (Ach, 100 μ M) überprüft. Für die relaxierungsfähigen Aortenringe galt das Endothelium als intakt und sie wurden für den weiteren Versuch verwendet. Nach fünfmaligem Spülen des Organbades wurde das 3-Isobutyl-1-Methylxanthin (IBMX, 500 μ M) und in allen mit NCA durchgeführten Experimenten zusätzlich der Metallchelator Desferrioxamin (DFO, 50 μ M) zur Pufferlösung hinzugefügt. Das IBMX sollte als Phosphodiesterasehemmer die Degradation des gebildeten cGMP während der Inkubation mit den Testsubstanzen verhindern, während das DFO zur Vermeidung der Konversion von HNO zu NO diente. Anschließend erfolgte die Inkubation der Aortenringe mit unterschiedlichen Konzentrationen von NCA (100 μ M, 300 μ M), 3-Methyl-NCA (300 μ M) oder Spermine NONOate (Sper/NO, 100 μ M, 300 μ M) für eine Dauer von 30 min. In der Kontrollgruppe zur Bestimmung der basalen cGMP-Konzentration wurden die Aortenringe ohne die Zugabe einer Testsubstanz inkubiert. Bei der zusätzlichen Verwendung von Ascorbinsäure (1 mM) oder carboxy-PTIO (cPTIO, 100 μ M) im Versuch erfolgte die Zugabe der entsprechenden

Substanz ebenfalls vor der Inkubationszeit von 30 min mit einer Vorlaufzeit von 5 min.

2.5.2 Bestimmung der cGMP-Konzentration (EIA)

Um eine Degradation des cGMP durch äußere Einflüsse zu verhindern, wurden die Aortenringe nach der Inkubation schnellstmöglich aus dem Organbad entnommen, einzeln gewogen und auf einer Aluminiumfolie in Trockeneis tiefgefroren. Der gefrorene Aortenring wurde dann in ein entsprechend beschriftetes Eppendorfgefäß überführt und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C gelagert.

Bevor das cGMP-Enzymimmunoassay durchgeführt werden konnte, erfolgte eine Gewebeaufreinigung. Dafür wurde der im Eppendorfgefäß befindliche Aortenring mit 1 ml 6% Trichloressigsäure versetzt und bei 2-8 °C mithilfe eines *Tissue Lyser* (30 Hz, 12 min) zerkleinert. Anschließend wurden die Eppendorfgefäße zentrifugiert (2000 × G, 4 °C, 15 min) und der gewonnene Überstand viermal mit 1,8% wassergesättigtem Diethylether gewaschen. Nach der Entfernung des Diethylethers wurde die übergebliebene wässrige Phase im SpeedVac (RVC 2-25 Christ) in Abhängigkeit von der Menge für 2-3 h bei einer Temperatur von 60 °C und unter einem durch Flüssigstickstoff erzeugten Vakuum getrocknet. Anschließend wurde das eingetrocknete Extrakt mit 400 µl *Assay Buffer* (Bestandteil des Amersham cGMP-Enzymimmunoassay Systems) resuspendiert und alle weiteren Schritte entsprechend dem Protokoll 1 des Amersham cGMP-Enzymimmunoassay Systems durchgeführt. Die Messung der cGMP-Konzentration erfolgte mithilfe eines Mikrotiterplatten-Photometers (Tecan Sunrise).

2.5.3 Prinzip des EIA

Das EIA System basiert auf einem kompetitiven Prinzip, bei dem das aus der Probe extrahierte cGMP mit einer festgeschriebenen Menge an Peroxidase-

konjugiertem cGMP um eine begrenzte Anzahl von Bindungsstellen eines cGMP-spezifischen Kaninchen-Antikörpers konkurriert, welcher wie in Abb. 2.4 wiederum über einen immobilisierten Antikörper (Esel) an eine 96-Well-Mikrotiterplatte fixiert ist (Amersham cGMP EIA Product Booklet 2006). Während also die Menge an Peroxidase-konjugiertem cGMP stets konstant bleibt, variiert die Konzentration an cGMP in der Probe, sodass bei hohen Konzentrationen mehr unkonjugiertes cGMP und bei niedrigen Konzentrationen mehr Peroxidase-konjugiertes cGMP an den spezifischen Antikörper bindet. Somit verhält sich die Menge an gebundenem, Peroxidase-konjugiertem cGMP umgekehrt proportional zur cGMP-Konzentration in der Probe. Die Zugabe des für die Peroxidase spezifischen Substrates Tetramethylbenzidin (TMB) initiiert eine Farbreaktion, die nach 30 min mithilfe von 1 M Schwefelsäure gestoppt wird und eine Detektion der optischen Dichte bei 450 nm ermöglicht (Amersham cGMP EIA Product Booklet 2006). Die optische Dichte verhält sich dabei wie das Peroxidase-konjugierte cGMP umgekehrt proportional zur cGMP-Konzentration. Die Ermittlung der cGMP-Konzentration erfolgt anhand einer mitgeführten Standardreihe.

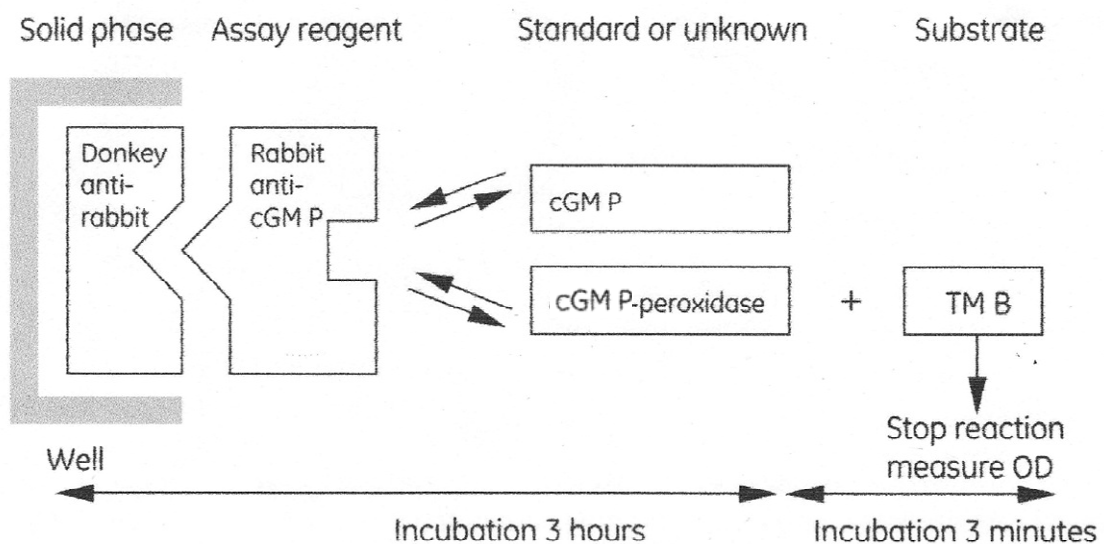


Abb. 2.4 Prinzip des EIA. cGMP: zyklisches Guanosinmonophosphat, TMB: Tetramethylbenzidin, OD: Optische Dichte (modifiziert nach dem Amersham cGMP EIA Biotrak System – Product Booklet 2006)

2.5.4 Datenanalyse

Die experimentellen Daten zur cGMP-Konzentration (fmol/well) wurden auf das gemessene Feuchtgewicht (mg) des Aortenringes bezogen und als cGMP-Konzentration in fmol pro mg Feuchtgewicht dargestellt. Die statistische Analyse der aufgezeichneten Daten wurde mithilfe der Graph-Pad Prism 5.0 Software durchgeführt. Bei einem Vergleich der Messergebnisse ohne und mit Zugabe der zu untersuchenden Substanzen wurde der Student t-test herangezogen. Ein P Wert von <0.05 wurde als statistisch signifikant angesehen. Alle angegebenen Messwerte sind Mittelwerte \pm SEM.

2.6 HNO-Donator „NCA“

Der in den durchgeführten Experimenten verwendete HNO-Donator ist das 1-Nitrosocyclohexylacetat (NCA; Abb. 2.4). Es gehört zur Gruppe der neuartigen HNO-Donatoren, den *Acyloxy Nitroso Compounds* und wurde im Labor von Bruce King in den USA entwickelt. Die Freigabe von HNO erfolgt durch die Hydrolyse des Moleküls (Abb. 1.5), wobei die Hydrolyserate in Abhängigkeit vom pH und durch eine Modulation der organischen Gruppe variiert werden kann (Sha et al. 2006). NCA ist in DMSO löslich und muss lichtgeschützt bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert werden. Das Molekulargewicht beträgt $171,19\text{ g/mol}$. Weiterhin charakteristisch für NCA ist die tiefblaue Farbe. Sie ermöglicht es, die biochemische Reaktionskinetik leicht zu erfassen (Switzer et al. 2009) und stellt gemeinsam mit dem typisch stechenden Geruch ein Kriterium für die Unversehrtheit des Donators dar. Da das wiederholte Auftauen und Einfrieren die Qualität verschlechtern, erfolgte eine Aliquotierung der Stammlösung. Hierfür wurden $5\text{ }\mu\text{l}$ der NCA-Stammlösung mit $15\text{ }\mu\text{l}$ DMSO vermischt und anschließend bis zum Versuch bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Direkt vor einem Versuch wurden dann aus dieser 2 M Lösung gemäß der gewünschten Endkonzentration weitere Verdünnungen mit DMSO vorgenommen. Während des gesamten Versuchs wurde der Donator zum Schutz vor Licht in Aluminiumfolie verpackt und auf Eis gelagert. Unter neutralen Bedingungen

und in DMSO gelöst, ist NCA stabil und gibt kein HNO ab. Wird NCA jedoch in Phosphatpuffer bei einem pH von 7,4 gelöst, werden bei Raumtemperatur und über einen Zeitraum von zwei Stunden 28% N₂O gebildet (bezogen auf die theoretisch zu bildende Menge an N₂O; 50%; Sha et al. 2006). N₂O ist das Dimerisierungsprodukt aus zwei Molekülen HNO und wird aufgrund fehlender Detektionsmöglichkeiten zum Nachweis von HNO verwendet. Unter basischen Bedingungen steigt der Ertrag von N₂O sogar noch weiter an (Sha et al. 2006). Diese Erkenntnisse weisen darauf hin, dass NCA in der Lage ist, HNO in physiologischer Umgebung abzugeben und so gute Voraussetzungen für die In-vivo-Applikation schafft. Ein weiterer Vorteil ist die kontinuierliche Abgaberate von HNO als auch das Fehlen schädlicher Nebenprodukte, wie es bei dem bisher verwendeten Angeli's Salz der Fall ist.

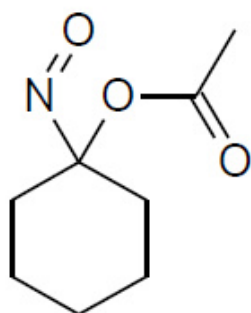


Abb. 2.5 Strukturformel von NCA (Sha et al. 2006)

2.7 Liste der Chemikalien

Substanzname	Hersteller
Acetylcholin (Ach)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Adenosindiphosphat (ADP)	Sigma-Aldrich, Steinheim
2-(4-carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide (cPTIO)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Desferrioxamin mesylate (DFO)	Sigma-Aldrich, Steinheim

D-(+)-Glukose Monohydrat	Merck, Darmstadt
9,11-Dideoxy-11 α ,9 α -epoxy-methanoprostaglandin F _{2α} (U46619)	Cayman Chemical, Ann Arbor, USA
Diethylentriaminpentaessigsäure (DTPA)	Merck, Darmstadt
Diethylether (C ₄ H ₁₀ O)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Ethanol (96%)	Merck, Darmstadt
Glutathion (GSH)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Heparin-Natrium (25000 IE/5 ml)	Ratiopharm GmbH, Ulm
3-Isobutyl-1-Methylxanthin (IBMX)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Isotonische Kochsalzlösung 0.9%	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt
Kalziumchlorid Dihydrat (CaCl ₂ × 2 H ₂ O)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kollagen	Sigma-Aldrich, Steinheim
L-Ascorbinsäure	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat Heptahydrat (MgSO ₄ × 7 H ₂ O)	Merck, Darmstadt
3-Methyl-NCA	Prof. S. Bruce King, Wake Forest University, Winston-Salem, NC, USA
Natriumchlorid (NaCl)	J. T. Baker, Deventer, Niederlande
Natriumhydrogenkarbonat (NaHCO ₃)	Merck, Darmstadt
Natronlauge (NaOH)	Merck, Darmstadt
1-Nitrosocyclohexylacetat (NCA)	Prof. S. Bruce King, Wake Forest University, Winston-Salem, NC, USA
Prostaglandin F _{2α} (PGF _{2α})	Sigma-Aldrich, Steinheim
Salzsäure (HCl)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄)	Merck, Darmstadt
Spermine NONOate (Sper/NO)	Sigma-Aldrich, Steinheim

Trichloressigsäure (C₂HCl₃O₂)

Merck, Darmstadt

Amersham cGMP EIA Biotrak System, GE Healthcare, UK:

Antibody

Assay Buffer

cGMP conjugate

Standard solution (for non-acetylation assay)

TMB substrate (3,3',5',5'-tetramethylbenzidine/hydrogen peroxide)

Wash buffer

2.8 Liste der Laborgeräte

Gerätebezeichnung

Hersteller

Accu jet® Pipettierhilfe

Brand, Wertheim

Analytische Waage

Sartorius AG, Göttingen

APACT 2 Aggregometer

Greiner Biochemica, Flacht

Drehschieber Vakuumpumpe

Vaccubrand GmbH, Wertheim

Gefriertrocknungsanlage,
SpeedVac RVC 2-25

Martin Christ GmbH, Osterode

Kaltlichtquelle KL 1500 LED

Schott AG, Mainz

Kraftmesser

Ingenieurbüro Jäckel, Hanau

Kühlzentrifuge 5415 R

Eppendorf, Hamburg

Kühlzentrifuge Rotina 35 R

Hettich, Tuttlingen

Lichtmikroskop

Carl Zeiss AG, West Germany

Magnetrührer

Heidolph, Schwabach

Milli-Q Plus Reinstwasseranlage

Millipore, Schwalbach

Mikrotiterplatten-Schüttler,
Titramax 101

Heidolph, Schwabach

Mikrotiterplatten-Spüler

Dynatec Medical Products, Britain

Mikrotiterplatten-Photometer

Tecan Sunrise, Männedorf, Schweiz

Organbadkammer

Otto Jahn OHG, Oberhausen

pH Meter	Knick, Berlin
Pipetten Reference, 0.5-10 µL, 10-100 µL, 100-1000 µL	Eppendorf, Hamburg
Präzisionswaage CP225D	Sartorius AG, Göttingen
Scotsman Flockeneisbereiter	Kälte Klima Jacobsen GmbH, Hamburg
Tissue Lyser	Retsch GmbH, Haan
Vortex Reax top	Heidolph, Schwabach
Warmwasserzirkulator, C20 CS Lauda	Lauda-Königshofen, Deutschland

Software: APACT 2 Gerätesoftware
IBJ BeMon 3.55
Tecan Magellan 4.0

2.9 Liste der Verbrauchsmaterialien

Produktbezeichnung	Hersteller
Cellstar® tubes 5 ml, 10 ml, 15 ml, 50 ml	Greiner Bio-One GmbH, Solingen
Einwegspritzen	B. Braun, Melsungen
Mikro-Küvetten inklusive Mixer, 1,5 x 4 mm	Greiner Biochemica, Deutschland
Mikrotiterplatte (12 x 8 well)	Amersham cGMP EIA Biotrak System, GE Healthcare, UK
Petrischalen (10 mm)	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße 1,5 ml, 2 ml	Eppendorf, Hamburg
Safety-Multifly®-Kanüle	Sarstedt, Nümbrecht
Serologische Pipette 25 ml	Sarstedt, Nümbrecht
S-Monovette® Gerinnung (Citrat)	Sarstedt, Nümbrecht

Skalpellklinge
Sterican® Einwegkanülen

Bayha GmbH, Tuttlingen
B. Braun, Melsungen

3 Ergebnisse

3.1 Effekt von NCA auf die TP-vermittelte Kontraktion von Maus-Aortenringen

3.1.1 Untersuchung verschiedener Konzentrationen von NCA

Zu Beginn wurde die Wirkung des HNO-Donators NCA auf die durch U46619 induzierte Kontraktion der Maus-Aortenringe im Organbad untersucht. Hiefür erfolgte die Versuchsdurchführung entsprechend dem Abschnitt 2.3.2 und eine Inkubation der Ringe mit 100 μM NCA für 30 min. Anschließend wurden die Konzentrations-Wirkungskurven miteinander verglichen und kein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollkurve und der Kurve nach der Inkubation mit 100 μM NCA festgestellt (Abb. 3.1 A). Daran schlossen sich Untersuchungen mit höheren Konzentrationen von NCA (300 μM und 500 μM) bei unveränderter Inkubationszeit an. Nach der Inkubation mit 300 μM NCA zeigte sich im Bereich von 10^{-8} bis 10^{-6} M U46619 eine signifikante Abnahme der Kontraktion um durchschnittlich 23% im Vergleich zur Kontrollkurve ($P < 0,01$; Abb. 3.1 B). Dies spiegelte sich in einem Anstieg der EC_{50} von U46619 auf das 2,6-fache (von 0,011 μM auf 0,029 μM) wieder. Die EC_{50} beschreibt dabei die mittlere effektive Konzentration, sprich die Konzentration, bei der der halbmaximale Effekt beobachtet wird. Hingegen hat sich die maximale Kontraktionskraft (10^{-6} M U46619) nicht signifikant verändert. Der gleiche Effekt ist auch bei einer Konzentration von 500 μM NCA zu beobachten, bei der es im Bereich von 10^{-9} bis 10^{-7} M U46619 ebenfalls zu einer signifikanten Abnahme der Kontraktion um durchschnittlich 24% kam ($P < 0,01$; Abb. 3.1 C) und die EC_{50} einen Anstieg auf das 2,7-fache (von 0,016 μM auf 0,043 μM U46619) erfuhr. Da jedoch mit höheren Konzentrationen an NCA auch die Wahrscheinlichkeit der Toxizität als möglicher Einflussfaktor zunimmt, wurden 300 μM NCA als Standardkonzentration für die folgenden Versuche gewählt und stellen somit einen Kompromiss zwischen Wirksamkeit bei gleichzeitiger Verträglichkeit dar.

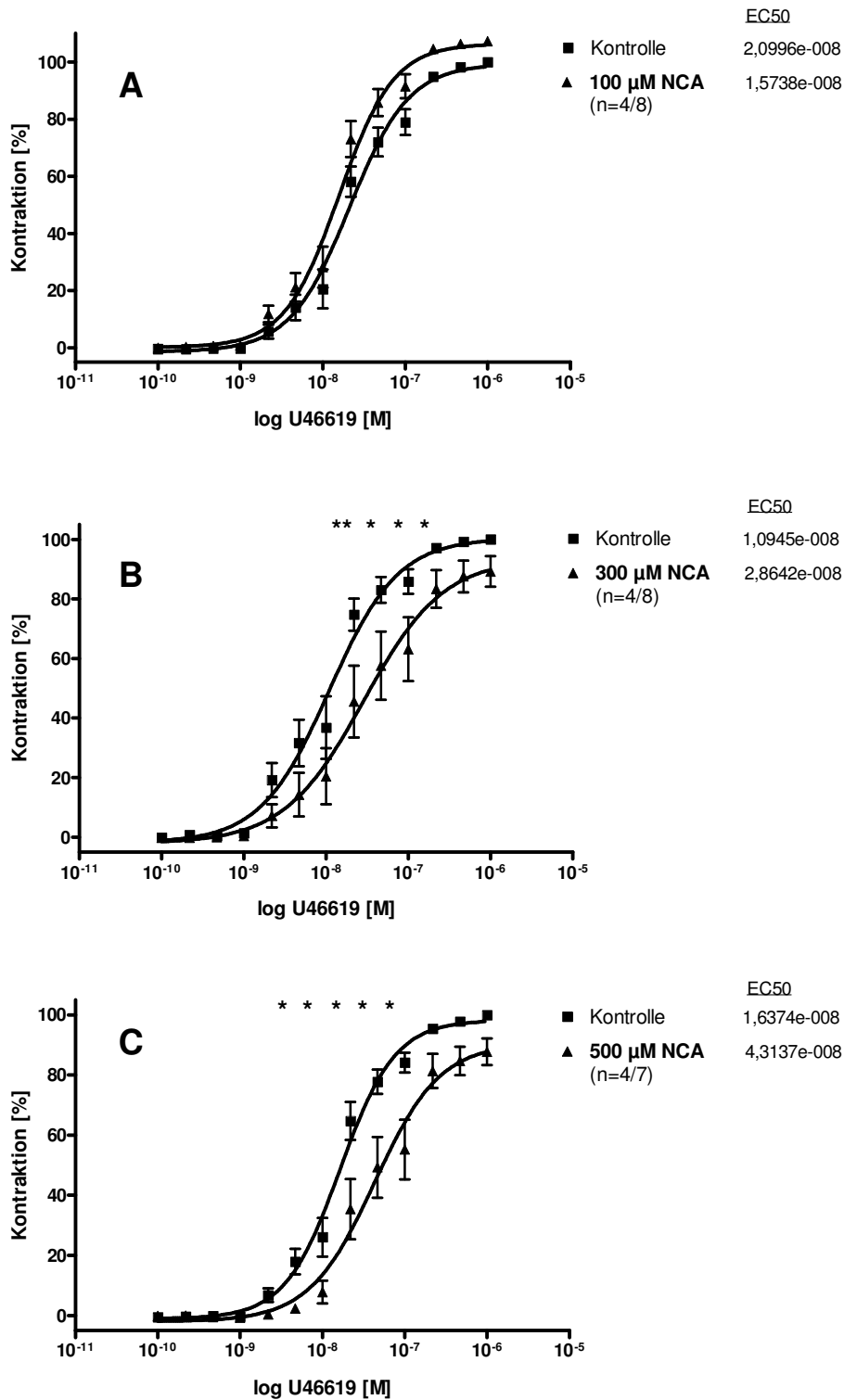


Abb. 3.1 Effekt unterschiedlicher Konzentrationen von NCA (A) 100 μ M, (B) 300 μ M, (C) 500 μ M auf die U46619-vermittelte Kontraktion. * $P < 0,01$, ** $P < 0,001$ vs. Kontrolle, Student's t-test, n=Anzahl der Mäuse/Ringe

3.1.2 Kontrollexperimente

Um zu überprüfen, ob der in 3.1.1 beschriebene Effekt auf das HNO freigegeben durch den Donator NCA zurückzuführen ist, wurden verschiedene Kontrollexperimente durchgeführt. Das erste Experiment erfolgte unter der Annahme, dass die lange Verweildauer der Aortenringe im Organbad, die durchschnittlich 6 h betrug, einen Einfluss auf die Funktionsfähigkeit des TP und somit auf die U46619-vermittelte Kontraktion haben könnte. Deshalb wurde der Versuch entsprechend dem Versuchsprotokoll in 2.3.1-2.3.3 durchgeführt, wobei die Inkubationszeit ohne die Zugabe einer Substanz ablief. Der anschließende Vergleich der Kontraktionskurven nach 70 min (Kontrollkurve) und 250 min ergab keinen signifikanten Unterschied (Abb. 3.2 A). In einem weiteren Kontrollexperiment (Abb. 3.2 B) wurde durch die Zugabe von Glutathion (1 mM) vor der Inkubation mit NCA ein thiolhaltiges Milieu im Organbad geschaffen. Aufgrund der sehr guten Reaktivität von HNO gegenüber Thiolen ist das Glutathion durch ein Überangebot an SH-Gruppen in der Lage, das freigesetzte HNO abzufangen. Ein Vergleich der Konzentrations-Wirkungskurven in Abbildung 3.2 B stellt keinen signifikanten Unterschied der Kurven dar und zeigt, dass der zuvor beschriebene Effekt von 300 μM NCA durch die Zugabe von Glutathion aufgehoben wurde. Das dritte Kontrollexperiment wurde durchgeführt, um zu überprüfen, ob das freigesetzte HNO selbst oder aber das NCA-Molekül vor der Abspaltung von HNO für den beobachteten Effekt verantwortlich sein könnte. Hierfür wurden die Aortenringe für 30 min mit einem modifizierten Donator, dem 3-Methyl-NCA (300 μM) inkubiert. Bei dem 3-Methyl-NCA ist das HNO durch eine kovalente Bindung so fest gebunden, dass es nur schwer abgespalten werden kann. Wie in Abbildung 3.2 C dargestellt, konnte unter dem Einfluss von 3-Methyl-NCA kein signifikanter Unterschied der Kontraktionskurven festgestellt werden.

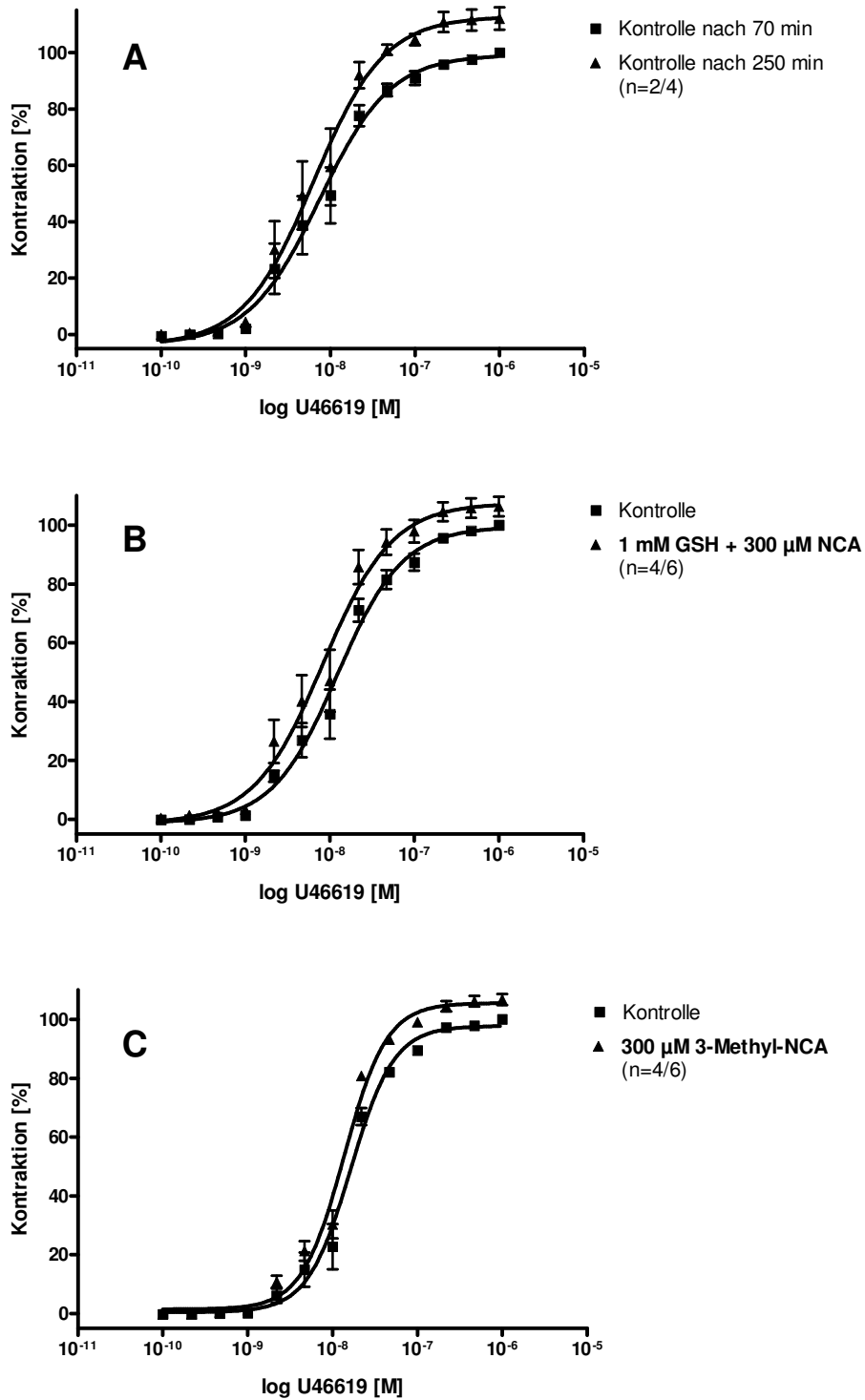


Abb. 3.2 Kontrollexperimente (A) Zeiteffekt, (B) Glutathion, (C) 300 μ M 3-Methyl-NCA, n=Anzahl der Mäuse/Ringe

3.2 Effekt von NCA auf die Thrombozytenaggregation

Zur Untersuchung der Wirkung des HNO-Donators NCA auf die Thrombozytenaggregation wurde PRP für 15 min mit unterschiedlichen Konzentrationen von NCA inkubiert. Da für den Einsatz von NCA an Thrombozyten derzeit keine Konzentrationsangaben vorlagen, wurde zunächst eine Dosis-Wirkungskurve erstellt. Ausgehend von 6 μM wurde die Konzentration schrittweise verdoppelt (12,5 μM , 25 μM , 50 μM , 100 μM) und zusätzlich die bereits im Organbad verwendeten 300 μM und 500 μM NCA getestet. Als Induktor der Plättchenaggregation wurde zunächst wieder das TXA_2 Analogon U46619 verwendet. Der anschließende Vergleich der maximalen Aggregation nach der Inkubation mit NCA mit der Kontrolle, dargestellt in Abbildung 3.3 A, verdeutlicht, dass es ab einer Konzentration von 100 μM zu einem signifikanten Abfall der Aggregation um 30,6% kam ($P < 0,0001$). Bei der Verwendung von 300 μM NCA konnte ein Abfall der Plättchenaggregation um 86,4% ($P < 0,0001$) beobachtet werden und wurde bei einer Konzentration von 500 μM NCA (maximale Aggregation 1,2%; $P < 0,0001$) fast vollständig gehemmt. Mit dieser Erkenntnis wurde weiterhin untersucht, welchen Einfluss NCA ausübt, wenn stattdessen die Induktoren ADP und Kollagen verwendet werden. Abbildung 3.3 B zeigt, dass bei der Verwendung von ADP bereits bei der niedrigsten Konzentration (6 μM NCA) ein signifikanter Abfall der Aggregation beobachtet werden konnte. Bei der gewählten Standardkonzentration von 300 μM NCA betrug der Abfall im Vergleich zu U46619 bereits 94,1% ($P < 0,0001$). Hingegen zeigte die Thrombozytenaggregation bei der Induktion durch Kollagen erst ab einer Konzentration von 300 μM NCA einen signifikanten Abfall um 73,4% ($P < 0,0001$; Abb. 3.3 C). Zusammenfassend bleibt festzustellen, dass bei allen verwendeten Induktoren, die die Thrombozytenaggregation auf unterschiedlichen Wegen in Gang setzen, ein signifikanter Abfall zu verzeichnen war, jedoch im Vergleich zu U46619 bei ADP niedrigere Konzentrationen von NCA ausreichend und bei Kollagen höhere Konzentrationen von NCA notwendig waren.

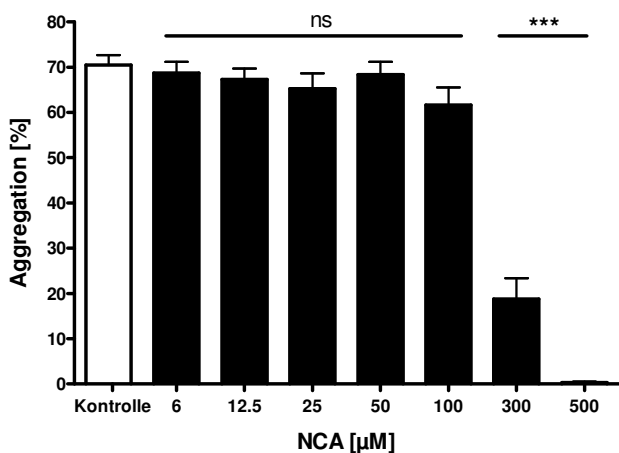
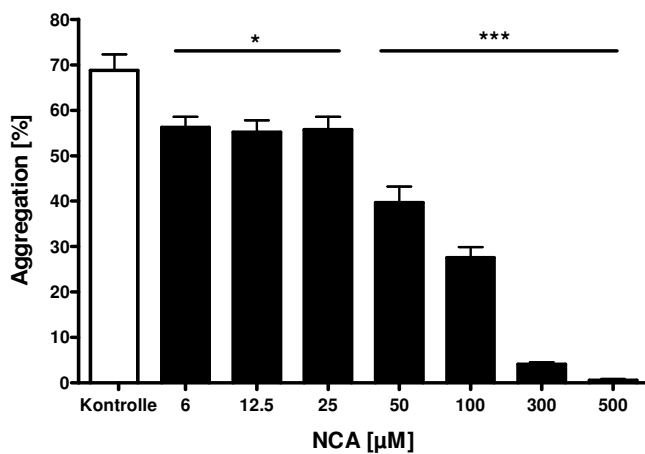
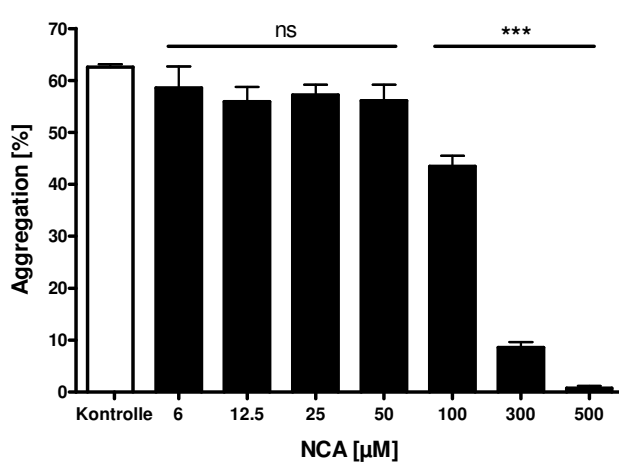


Abb. 3.3 Effekt von NCA auf die Thrombozytenaggregation induziert durch (A) 10 μM U46619, (B) 6 μM ADP, (C) 4 $\mu\text{M/ml}$ Kollagen, * $P < 0,01$, *** $P < 0,0001$ vs. Kontrolle, Student's t-test, n=Anzahl der Probanden

3.3 Effekt von NCA auf die cGMP-Konzentration

Um zu erforschen, ob der HNO-Donator NCA in der Lage ist, über eine Aktivierung der sGC die cGMP-Konzentration zu steigern, wurden entsprechende Messungen mithilfe eines EIA durchgeführt. Hierfür wurden intakte Maus-Aortenringe mit unterschiedlichen Konzentrationen von NCA, 3-Methyl-NCA und Sper/NO im Organbad inkubiert und anschließend die cGMP-Konzentration bestimmt. In Abbildung 3.4 sind die Ergebnisse der Messungen dargelegt. Während nach der Inkubation mit 100 μM NCA kein signifikanter Anstieg zu beobachten war, zeigte sich bei der festgelegten Standardkonzentration von 300 μM ein Anstieg der cGMP-Konzentration um das 9,8-fache ($P < 0,001$) im Vergleich zur basalen cGMP-Konzentration der Kontrolle. Dieser Effekt konnte durch die Zugabe von Ascorbinsäure (1 mM), die ähnlich wie das Glutathion als so genannter HNO *scavenger* in der Lage ist, das freigesetzte HNO abzufangen, um 64,5% abgeschwächt werden. Die Inkubation mit 3-Methyl-NCA (300 μM), das bereits im Organbadversuch zur Untersuchung eines möglichen Effektes des NCA-Moleküls vor der Abspaltung von HNO verwendet wurde, führte zu keinem Anstieg der cGMP-Konzentration. In der Gegenüberstellung zu NO, bei dem der cGMP-steigernde Effekt bereits nachgewiesen wurde (Wang et al. 2008), konnte bei einer Konzentration von 100 μM Sper/NO (NO-Donator) ein signifikanter Anstieg der cGMP-Konzentration um das 6,5-fache ($P < 0,001$) und bei 300 μM Sper/NO um das 12,2-fache ($P < 0,0001$) verzeichnet werden. Der Effekt von 300 μM Sper/NO ließ sich durch die Zugabe von carboxy-PTIO (cPTIO; 100 μM), welches durch die Reaktion mit NO unter Bildung von carboxy-PTI-Derivaten in der Lage ist, das freigesetzte NO abzufangen, um 60,7% abschwächen. Interessanterweise konnte auch der Effekt von 300 μM NCA durch die Zugabe von cPTIO (100 μM) um 66,1% verringert werden.

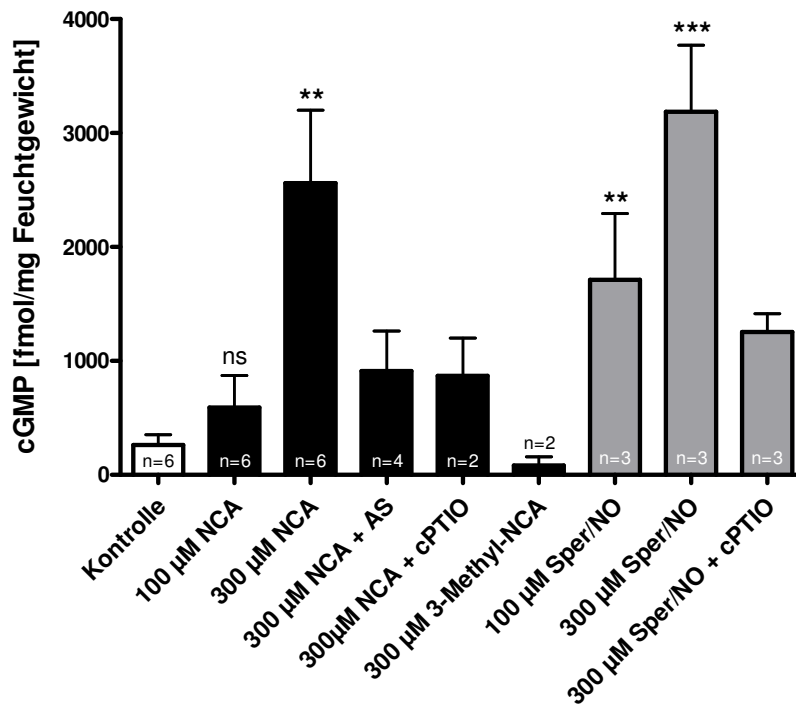


Abb. 3.4 Effekt von NCA und Sper/NO auf die cGMP-Konzentration. AS: Ascorbinsäure (1 mM), cPTIO: carboxy-PTIO (100 µM), ** $P < 0,001$, *** $P < 0,0001$ vs. Kontrolle, Student's t-test, n=Anzahl der Ringe

4 Diskussion

Die Entdeckung der vielfältigen Wirkungen von HNO besonders im kardiovaskulären System ließen das Molekül ununterbrochener, gegenwärtiger Forschung werden. Zahlreiche Erkenntnisse über die Auswirkungen auf das Gefäßsystem und das Herz hat man dabei bereits erlangt. Die Studien wurden in den überwiegenden Fällen mithilfe des alt bekannten und gut erforschten HNO-Donators Angeli's Salz durchgeführt. Probleme in der Durchführung und Bewertung der Experimente ergeben sich jedoch durch seine Löslichkeit in NaOH, der Coproduktion von NO_2^- und der sehr kurzen HWZ von ~2.5 min (37 °C), die eher einer Bolusapplikation als einer kontinuierlichen Freigabe von HNO entspricht. Biologische Systeme mit nur geringer Pufferkapazität reagieren dabei sensibel auf den basischen Donator, sodass der beobachtete Effekt ebenso der Veränderung des lokalen pH zugeschrieben werden kann (Fukuto et al. 2008). Neuere HNO-Donatoren wie die *Acyloxy Nitroso Compounds*, zu denen auch das NCA gehört, versprechen hingegen eine kontinuierliche Abgaberate von HNO bei einem physiologischen pH von 7,4 sowie das Ausbleiben schädlicher Nebenprodukte (Sha et al. 2006, Paolucci et al. 2007, Switzer et al. 2009), was die Unsicherheit hinsichtlich der Interpretation der Ergebnisse unterbinden würde.

Die atherothrombotischen Erkrankungen sind von besonderer Bedeutung für die heutige Gesellschaft, da sie zu den häufigsten Todesursachen zählen. Es konnte gezeigt werden, dass der TP in diesem Zusammenhang in die zugrunde liegenden pathologischen Prozesse der Arteriosklerose und Thrombose involviert ist (Cayette et al. 2000, Nakahata et al. 2008), sodass sich als Ziel der Arbeit ergab, herauszufinden, welche grundlegende Wirkung HNO auf die TP-vermittelten zellulären Antworten ausübt. Hierfür wurden Untersuchungen zur Gefäßkontraktion und Plättchenaggregation durchgeführt. Zusätzlich erfolgten Versuche zur Klärung eines möglichen Wirkmechanismus als Ursache der beobachteten Effekte. Zur Anwendung kam dabei der neuartige und gegenüber Angeli's Salz vorteilhaftere HNO-Donator NCA.

4.1 Effekt von NCA auf die TP-vermittelte Gefäßkontraktion

Bei der Untersuchung der Wirkung von NCA auf die TP-vermittelte Gefäßkontraktion konnte nach der Inkubation mit einer Konzentration von 300 μM im Vergleich zur Kontrollkurve eine signifikante Abnahme der Kontraktion bei erhaltener maximaler Kontraktionskraft (10^{-6} M U46619) beobachtet werden. Dies spiegelte sich ebenso in einem Anstieg der EC_{50} um das 2,6-fache wieder, was bedeutet, dass die Konzentration an U46619, um den halbmaximalen Effekt zu erreichen, im Vergleich zur Kontrolle um das 2,6-fache höher sein musste. Objektiv betrachtet, kommt es also zu einer Parallelverschiebung der Konzentrations-Wirkungskurve auf der Abszisse nach rechts, die sich pharmakologisch als kompetitiver Antagonismus beschreiben lässt. Dies würde bedeuten, dass der Agonist U46619 mit einem Antagonisten um die gleiche Bindungsstelle am TP konkurriert. Eine zunehmend höhere Konzentration an U46619 würde diesen vom Rezeptor verdrängen und so zu einem Erreichen der maximalen Kontraktionskraft führen. Aufgrund seiner hohen Reaktionsfreudigkeit wird jedoch vermutet, dass das HNO freigegeben durch NCA nicht wie ein klassischer Antagonist agiert, sondern zu einer Veränderung am Rezeptor geführt haben könnte. Es ist vorstellbar, dass diese Veränderung zu einer Abnahme der Signalweiterleitung durch den Rezeptor oder aber zu einer Abnahme der Bindungsfähigkeit von U46619 geführt haben könnte und so die verminderte Kontraktion bedingt. Die Tatsache, dass am Ende des Experimentes trotzdem die maximale Kontraktionskraft erreicht wurde, könnte zum einen daran liegen, dass es sich um eine reversible Veränderung handelt oder aber nicht alle Rezeptoren gleichermaßen verändert wurden. Unveränderte TP würden durch das U46619 stimuliert und durch den Verstärkungsmechanismus der G-Proteine innerhalb der Signaltransduktion (Horn 2005, S. 342-347) könnte die maximale Kontraktionskraft erreicht worden sein. Da jedoch die Möglichkeit einer Reversibilität der Effektes, für die im Anschluss an ein Experiment gemäß der Anleitung in 2.2 eine erneute Kontrollkurve hätte konstruiert werden müssen, nicht bearbeitet wurde, bleibt die Klärung dieser Vermutung hier offen.

Die Konzentration von 300 μM NCA wurde als Standardkonzentration festgelegt und stellt einen Kompromiss aus Wirksamkeit bei gleichzeitiger Verträglichkeit dar. Grund hierfür ist die Annahme, dass bei höheren Konzentrationen von NCA die Wahrscheinlichkeit der Toxizität durch HNO oder aber das zunehmend gebildete N_2O als möglicher Einflussfaktor zunimmt. Außerdem konnte nach der Inkubation mit 500 μM NCA im Vergleich zur Standardkonzentration nur eine unwesentliche Steigerung des Effektes beobachtet werden, was sich durch die zunehmende Dimerisierungsreaktion bei hohen Konzentrationen von HNO erklären lässt (Fukuto et al. 2008).

4.2 Überprüfung der Wirksamkeit durch HNO

Da die Erforschung von HNO nur durch den Gebrauch von HNO-Donatoren möglich ist, sind Kontrollexperimente, um zu überprüfen, ob der beobachtete Effekt tatsächlich auf HNO zurückzuführen ist, notwendig (Fukuto et al. 2008). Problematisch für die Interpretation der Ergebnisse sind unter anderem die Entstehung von Nebenprodukten beim Zerfall oder aber die biologische Aktivität des Donator-Moleküls an sich (Fukuto et al. 2008, Switzer et al. 2009).

Im Rahmen der Untersuchungen wurde zunächst überprüft, ob die lange Verweildauer der Aortenringe von mehr als 6 h für den beobachteten Effekt verantwortlich sein könnte. Ein Vergleich der Kurven nach 70 und 250 min hat dabei gezeigt, dass es zu keiner Veränderung der Kontraktionskraft gekommen ist und somit die Zeit keinen Einfluss auf die Funktionsfähigkeit des TP hat. In einem zweiten Kontrollexperiment wurde vor der Inkubation mit NCA dem Organbad GSH (1 mM) hinzugefügt, was dazu führte, dass die Wirkung von NCA auf die Kontraktion aufgehoben wurde. Durch das Wissen, dass hohe Konzentrationen an GSH in der Lage sind, HNO abzufangen (Paolucci et al. 2007, Irvine et al. 2008) und so seine Wirkung zu unterbinden, lässt vermuten, dass der Einfluss auf die Gefäßkontraktion durch HNO ausgelöst wurde. Das dritte Kontrollexperiment diente zur Überprüfung der biologischen Aktivität des Donator-Moleküls an sich. Dafür wurden die Aor-

tenringe mit 300 μM 3-Methyl-NCA inkubiert. Bei dem 3-Methyl-NCA ist das HNO durch eine kovalente Bindung so fest gebunden, dass es nur schwer abgespalten werden kann. Da sich der beobachtete Effekt auf die Kontraktion nicht reproduzieren ließ und außerdem in allen Experimenten der Metallchelator DTPA zur Hemmung der Konversion von HNO zu NO verwendet wurde, lässt sich die beschriebene Wirkung auf HNO zurückführen.

4.3 Effekt von NCA auf die Thrombozytenaggregation

Bisherige Studien an humanen Thrombozyten haben gezeigt, dass HNO in der Lage ist, die Thrombozytenaggregation dosisabhängig zu hemmen. Da diese unabhängig vom Rezeptor, der in die Plättchenantwort involviert war, erfolgte, wurde die Vermutung eines allgemein aktivierten Mechanismus aufgestellt (Bermejo et al 2005). Obwohl kein eindeutiger Signalweg offenbart werden konnte, wird angenommen, dass HNO zumindest teilweise über einen sGC/cGMP-abhängigen Signalweg agiert (Bermejo et al. 2005).

In den Untersuchungen zur Wirkung von NCA auf die Plättchenaggregation konnten die bisherigen Erkenntnisse bestätigt werden. Es zeigte sich ebenfalls eine dosisabhängige Hemmung der Aggregation, die unabhängig vom verwendeten Induktor zur Aktivierung der Plättchenantwort (U46619, ADP, Kollagen) zu beobachten war. Darüber hinaus konnten Unterschiede in der wirksamen Konzentration von NCA in Abhängigkeit vom Induktor festgestellt werden. Während bei U46619 eine Konzentration von 100 μM NCA eine signifikante Abnahme der Plättchenaggregation bewirkte, waren bei ADP bereits 6 μM NCA ausreichend. Bei Kollagen hingegen war erst bei einer Konzentration von 300 μM NCA eine signifikante Wirkung zu beobachten. Offenbar handelt es sich bei ADP im Vergleich zu U46619 um einen schwächeren Induktor, während Kollagen einen stärkeren Induktor der Thrombozytenaggregation darstellt. Trotz der übereinstimmenden Erkenntnisse liegt der Unterschied in der Verwendung des HNO-Donators. Während in den bisherigen Studien das alt bewährte Angeli's Salz zum Einsatz kam, wurde in den aktuellen Untersuchungen der neuartige HNO-Donator NCA

verwendet. Sein Vorteil liegt in der kontinuierlichen Abgaberate von HNO bei einem physiologischen pH von 7,4 und dem Fehlen schädlicher Nebenprodukte, was ihn für die In-vivo-Applikation und einen potentiellen klinischen Gebrauch qualifiziert.

4.4 Effekt von NCA auf die cGMP-Konzentration

Noch bis vor kurzem nahm man an, dass NO das einzig biologisch relevante Stickoxid sei, das in der Lage ist, die lösliche Guanylatzyklase (sGC) zu aktivieren (Miller et al. 2009). Neusten Studien zu Folge konnte jedoch gezeigt werden, dass auch HNO die Fähigkeit besitzt, die sGC direkt durch eine Interaktion mit der regulatorischen Fe²⁺-Hämgruppe in ihrer Aktivität zu steigern (Miller et al. 2009). Dies wiederum führt zur Anregung der Produktion des *second messenger* cGMP in der Zelle. Basierend auf dieser Erkenntnis wurden intakte Maus-Aortenringe im Organbad für 30 min mit NCA inkubiert und anschließend die cGMP-Konzentration mithilfe eines EIA gemessen. Hierbei konnte eine signifikante Steigerung der cGMP-Konzentration im Vergleich zur Kontrolle nachgewiesen werden, die bei einer Konzentration von 300 µM NCA das 9,8-fache betrug. Als Positivkontrolle wurde zusätzlich der NO-Donator Sper/NO verwendet, der bei einer Konzentration von 300 µM einen Anstieg um das 12,2-fache verursachte. Um zu überprüfen, ob die beobachtete Wirkung dem HNO zuzuschreiben ist, wurden wiederum Kontrollexperimente durchgeführt. Der Gebrauch von 300 µM 3-Methyl-NCA offenbarte keinen signifikanten Anstieg des cGMPs, sodass hier nicht von einer biologischen Eigenaktivität des Donator-Moleküls ausgegangen wurde. Bei der zusätzlichen Applikation von Ascorbinsäure neben 300 µM NCA in das Organbad konnte ein Abfall der cGMP-Konzentration um 64,5% beobachtet werden. Ascorbinsäure ist wie GSH ein HNO *scavenger* und besitzt die Fähigkeit, das HNO abzufangen und so seine Wirkung zu unterbinden. Folglich lässt sich vermuten, dass die beobachtete Steigerung der cGMP-Konzentration durch HNO ausgelöst wurde. Fraglich bleibt jedoch, warum trotz der relativ hohen Konzentration an Ascorbinsäure (1 mM) der

cGMP-steigernde Effekt nicht vollständig unterbunden wurde. Um die Wirkung von Sper/NO zu überprüfen, wurde der NO scavenger cPTIO verwendet. Hierunter konnte die cGMP-Konzentration trotz 300 μ M Sper/NO um 60,7% abgeschwächt werden. Auch hier wurde die Wirkung nicht vollständig unterbunden, was sich allerdings dadurch erklären lassen könnte, dass die Konzentration von 100 μ M cPTIO für den Versuch als zu gering gewählt wurde um alle freigesetzten NO-Moleküle abzufangen. Erstaunlicherweise zeigte sich auch nach der Applikation von cPTIO zu 300 μ M NCA ein Abfall der cGMP-Konzentration um 66,1%. Dies würde bedeuten, dass offenbar auch NO an der Steigerung der cGMP-Konzentration durch NCA beteiligt wäre. Zwar haben Untersuchungen gezeigt, dass NCA einen kleinen Anteil NO produziert, jedoch würde dieser unter neutralen Bedingungen weniger als 1% betragen (Sha et al. 2006). Eine mögliche Erklärung wäre, dass die Konzentration des verwendeten Metallchelators DFO (50 μ M) zu gering gewesen sein könnte. Dadurch wären im Organbad noch eben so viele Metalle vorhanden gewesen, dass es zu einer Konversion von HNO zu NO kommen konnte. Dadurch könnte sich ebenso die Restaktivität nach der Applikation von Ascorbinsäure erklären lassen und würde aus dem gleichzeitigen Vorhandensein von NO resultieren. Weiterhin bestände ebenso die Möglichkeit, dass es sich bei NCA unter den Versuchsbedingungen entgegen aller Untersuchungen eben doch nicht um einen reinen HNO-Donator handelt oder aber weitere bisher ungeklärte Prozesse eine Rolle spielen. Dies zeigt, dass die Eigenschaften von HNO trotz intensiver Forschung noch nicht vollständig aufgeklärt wurden und es auch zukünftiger Investitionen bedarf, um eines der komplexesten und reaktionsfreudigsten Stickoxide zu verstehen.

Ein direkter Vergleich hinsichtlich einer besseren Wirksamkeit von NCA oder Sper/NO kann in diesem Zusammenhang nicht ohne weiteres gezogen werden. Grund hierfür ist zum einen, dass ein Sper/NO-Molekül zwei Moleküle NO abgibt, während bei der Hydrolyse von einem Molekül NCA nur ein Molekül HNO freigegeben wird. Zum anderen erschwert die zunehmende Dimerisierungsreaktion bei hohen Konzentrationen von HNO, die zu einem

nicht-linearen Verhältnis zwischen Donator-Konzentration und HNO-Konzentration führt, die Interpretation der Dosis-Wirkungskurven (Fukuto et al. 2008).

4.5 Die Desensibilisierung des TP durch eine cGMP/PKG-abhängige Phosphorylierung als möglicher Wirkmechanismus

In den durchgeführten Studien konnte gezeigt werden, dass HNO freigegeben durch den Donator NCA in der Lage ist, die TP-vermittelte Gefäßkontraktion zu reduzieren und die Plättchenaggregation zu hemmen. Basierend auf den Erkenntnissen, dass NO die Fähigkeit besitzt über einen sGC/cGMP/PKG-abhängigen Signalweg den TP zu desensibilisieren (Wang et al. 1998) und auch HNO in der Lage ist, die sGC zu aktivieren (Miller et al. 2009), wurde folgende Hypothese aufgestellt. Es wurde vermutet, dass HNO seine Wirkung zumindest teilweise über eine Stimulierung der sGC ausüben könnte. Dies würde zu einer Akkumulation von cGMP in der Zelle führen und könnte über die cGMP-abhängige Proteinkinase G eine Phosphorylierung des TP womöglich in der zytoplasmatischen C-terminalen Domäne auslösen. Diese Phosphorylierung wiederum würde zu einer verminderten oder fehlenden Signalweiterleitung durch den Rezeptor an sein G-Protein trotz Stimulierung durch den Agonisten führen und hätte somit eine Desensibilisierung zur Folge. Ein Vergleich der Ergebnisse von Organbad und EIA stützt diese Vermutung. Bei einer Konzentration von 300 μM NCA zeigte sich sowohl eine hemmende Wirkung auf die U46619-induzierte Gefäßkontraktion als auch eine Steigerung der cGMP-Konzentration um das 9,8-fache. Dadurch könnte sich auch die hemmende Wirkung auf die Plättchenaggregation trotz Stimulierung durch TXA_2 und ADP erklären lassen, denn beide Agonisten binden in der Folge an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren. Da jedoch ein direkter Nachweis der Phosphorylierung fehlt, bleibt offen, ob die Wirkung im Organbad und die gesteigerte cGMP-Konzentration tatsächlich im Zusammenhang stehen. Ebenso stellt sich die Frage, ob nicht auch weitere Prozesse wie zum Beispiel eine Modulation von Thiolstrukturen von Bedeutung

sein könnten. Es ist bekannt, dass HNO sehr reaktionsfreudig gegenüber Thiolen ist (Paolocci et al. 2007, Irvine et al. 2008, Fukuto et al. 2009) und der TP in seiner molekularen Struktur an unterschiedlichen Positionen die Aminosäure Cystein besitzt, die in ihrer Seitenkette eine endständige Thiolgruppe trägt und für die Rezeptorfunktion von Bedeutung ist (D'Angelo et al. 1996). Fraglich bleibt weiterhin, ob nicht auch Veränderungen an der Bindungsstelle für den Agonisten eine Rolle spielen oder aber nicht der Rezeptor, sondern die *second messenger* modifiziert wurden. Ungeklärt bleibt in diesem Zusammenhang ebenso die Möglichkeit eines zellschädigenden Effektes durch die relativ hohe Konzentration an NCA oder aber das durch die Dimerisierung zunehmend gebildete N₂O. Dies hätte mit einer erneuten Kontrollkurve am Ende eines Experimentes im Organbad überprüft werden können. Zwar wäre eine Akkumulation größerer Mengen von N₂O unwahrscheinlich, da NCA das HNO kontinuierlich und nicht als Bolus abgibt, kann aber als möglicher Teilmechanismus nicht ausgeschlossen werden. Offen bleibt auch die Aufklärung der überraschenden Abnahme der cGMP-Konzentration nach der Inkubation mit dem NO *scavenger* cPTIO und 300 µM NCA und einer möglichen Einflussnahme von NO in diesem Zusammenhang.

Abschließend scheint offenbar, dass HNO in der Lage ist, die Gefäßkontraktion zu reduzieren, die Plättchenaggregation zu hemmen und die cGMP-Konzentration zu steigern. Als möglicher Mechanismus käme eine Desensibilisierung des TP infolge einer cGMP/PKG-abhängigen Phosphorylierung in Frage. Nichts desto trotz sind weitere Investitionen notwendig, um den genauen Wirkmechanismus der beobachteten Effekte zu erforschen.

4.6 Möglichkeiten des therapeutischen Einsatzes von NCA

Die Herz-/Kreislaufkrankungen gehören zu den häufigsten Todesursachen in Deutschland. Allein im Jahr 2010 sind sie verantwortlich für 41,4% aller Sterbefälle (Statistisches Bundesamt 2012). Hierzu zählen auch die atherothrombotischen Erkrankungen wie der Herzinfarkt und der Schlaganfall. Zahlreiche Untersuchungen haben gezeigt, dass das TXA₂ und der TP in

pathologische Prozesse wie die Arteriosklerose, Thrombose und den Myokardinfarkt involviert sind (Nakahata et al 2008). Dabei spielt offenbar eine entzündungstriggerte, vermehrte Produktion von TXA₂ und anderen Eicosanoiden eine Rolle, die neben der Plättchenaggregation und Thrombusformation auch die Plaquebildung im Rahmen der Arteriosklerose fördern (Cayette et al. 2000). Durch seine Fähigkeit, die Plättchenaggregation zu hemmen und die TP-vermittelte Gefäßkontraktion zu reduzieren, könnte HNO eine neue therapeutische Strategie zur Behandlung atherothrombotischer Erkrankungen darstellen. Während das Aspirin in diesem Zusammenhang lediglich die TXA₂-Synthese verhindert, scheint HNO seine Wirkung über eine Desensibilisierung des TP zu erzielen. Damit könnte auch eine Aktivierung des TP durch andere Eicosanoide unterbunden werden, sodass ebenso der Einsatz zur Bekämpfung der Atherogenese denkbar wäre. Trotz des Potentials von HNO sind vorerst weitere Untersuchungen notwendig, um den Wirkmechanismus genauer zu erfassen und die in-vivo Verträglichkeit von NCA zu überprüfen.

5 Zusammenfassung

Intensive Forschungen haben einzigartige und vielversprechende Effekte der Stickstoffspezies HNO offenbart. Von besonderem Interesse ist dabei das kardiovaskuläre System. Durch seine Fähigkeit, die Gefäße zu relaxieren und die myokardiale Kontraktilität zu steigern, bietet es eine neue therapeutische Strategie zur Behandlung von Herz-/Kreislaufkrankungen wie Bluthochdruck und Herzinsuffizienz. Von großer Bedeutung sind in diesem Zusammenhang auch die durch Atherothrombose verursachten Erkrankungen wie der Herzinfarkt und der Schlaganfall, da sie zu den häufigsten Todesursachen in Deutschland zählen. Genauere Untersuchungen konnten zeigen, dass der TP in die zugrunde liegenden pathologischen Prozesse wie die Arteriosklerose und Thrombose involviert ist. Infolgedessen ergab sich als Ziel der Studie, herauszufinden, welchen grundlegenden Einfluss HNO auf die TP-vermittelten zellulären Antworten ausübt. Hierfür wurden Untersuchungen zur Gefäßkontraktion und Plättchenaggregation durchgeführt. Zur Anwendung kam dabei der neuere HNO-Donator NCA. Seine Vorteile gegenüber dem alt bekannten Angeli's Salz liegen in der kontinuierlichen Abgaberate von HNO bei einem physiologischen pH von 7,4 sowie dem Ausbleiben schädlicher Nebenprodukte, was gute Voraussetzungen für die In-vivo-Applikation schafft.

In den Studien konnte gezeigt werden, dass HNO freigegeben durch NCA in der Lage ist, die TP-vermittelte Gefäßkontraktion zu reduzieren und die Plättchenaggregation dosisabhängig und unabhängig vom Rezeptor, der in die Plättchenantwort involviert ist, zu hemmen. Als ein möglicher Wirkmechanismus käme eine cGMP/PKG-abhängige Phosphorylierung des TP in Frage, die durch ein Verhindern der Signalweiterleitung des Rezeptors an sein G-Protein zu einer Desensibilisierung geführt haben könnte. Diese Fähigkeiten offenbaren HNO nicht nur als neue therapeutische Strategie zur Behandlung atherothrombotischer Erkrankungen, sondern auch zur Bekämpfung der zugrunde liegenden Arteriosklerose.

6 Abkürzungsverzeichnis

Vorsätze für SI-Einheiten

k	Kilo (10^3)
m	Milli (10^{-3})
μ	Mikro (10^{-6})
n	Nano (10^{-9})
p	Pico (10^{-12})
f	Femto (10^{-15})
%	Prozent
°C	Grad Celsius
AC	Adenylatzyklase
Ach	Acetylcholin
ADP	Adenosindiphosphat
ALDH	Aldehyddehydrogenase
Angeli's Salz	$\text{Na}_2\text{N}_2\text{O}_3$ (Donator)
AS	Ascorbinsäure
Ca^{2+}	Calcium
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CGRP	<i>Calcitonin gene-related peptide</i>
CO_2	Kohlenstoffdioxid
cPTIO	carboxy-PTIO (NO scavenger)
DAG	Diacylglycerin
DFO	Desferrioxamin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTPA	Diethylentriaminpentaessigsäure
EC_{50}	Mittlere effektive Konzentration
EIA	Enzymimmunoassay
G	Zentrifugalwirkung, $G = r * (\text{U/min} / 1000)^2 \times 11,18$ m/s^2

g	Gewicht
GDP	Guanosindiphosphat
GK	Proteinkinase G
GP	Glykoprotein
GSH	Glutathion
GSSG	Dimer von GSH (Glutathion)
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HNO	Nitroxyl
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
5HT2A-Rezeptor	Serotoninrezeptor
HWZ	Halbwertszeit
Hz	Hertz
IBMX	3-Isobutyl-1-Methylxanthin
IPC	<i>ischemic preconditioning</i>
IP₃	Inositol-1,4,5-triphosphat
IU	<i>international unit</i> , internationale Einheit
K_v	Kaliumkanal
l	Liter
M	Molar
m	Meter
MAPK	mitogen-aktivierte Kinase
Min	Minuten
N	Newton
NCA	1-Nitrosocyclohexyl-Acetat (HNO Donator)
NMDA Rezeptor	N-Methyl-D-Aspartat = Glutamatrezeptor
NO	<i>nitric oxide</i> , Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthase
O₂	Sauerstoff
OD	Optische Dichte
P	Phosphor
PGF_{2α}	Prostaglandin F _{2α}

PI₃K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PIP₂	Phosphatidyl-Inositol-4,5-biphosphat
pKa	Säurekonstante
PKC	Proteinkinase C
PKG	Proteinkinase G
PLC	Phospholipase C
PPP	<i>platelet poor plasma</i> , Plättchenarmes Plasma
PRP	<i>platelet rich plasma</i> , Plättchenreiches Plasma
RhoGEF	Rho <i>guanine nucleotide exchange factor</i>
RyR2	Ryanodinrezeptor Typ 2
s	Sekunden
SEM	<i>Standard Error of the Mean</i> , Standardfehler
SERCA2a	Sarkoendoplasmatisches-Retikulum-Calcium-ATPase 2a
sGC	<i>soluble guanylate cyclase</i> , lösliche Guanylatzyklase
Sper/NO	Spermine NONOate (NO-Donator)
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
t	Zeit
TMB	Tetramethylbenzidin
TP	Thromboxan A ₂ Rezeptor
TXA₂	Thromboxan A ₂
U46619	9,11-Dideoxy-11 α ,9 α -epoxy-methanoprostaglandin F _{2α} , Thromboxan A ₂ Analogon
UK	United Kingdom
USA	United States of America
vs	versus
vWF	von-Willebrand-Faktor
z. B.	zum Beispiel

7 Literaturverzeichnis

Bermejo E, Sáenz DA, Alberto F, Rosenstein RE, Bari SE, Lazzari MA (2005) Effect of nitroxyl on human platelet function. *Thromb Haemost.* 94: 578-584.

Bruhn HD, Hach-Wunderle V, Schambeck CM, Scharf RE (2011) *Hämostaseologie für die Praxis: Sicher durch den klinischen Alltag*, 2. Aufl., Schattauer Verlag, Stuttgart, 117-120.

Cayatte AJ, Du Y, Oliver-Krasinski J, Lavielle G, Verbeuren TJ, Cohen RA (2000) The Thromboxane Receptor Antagonist S18886 but Not Aspirin Inhibits Atherogenesis in Apo E-Deficient Mice: Evidence That Eicosanoids Other Than Thromboxane Contribute to Atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20: 1724-1728.

D'Angelo D, Eubank J, Davis M, Dorn G (1996) Mutagenic analysis of platelet thromboxane receptor cysteines. Roles in ligand binding and receptor-effector coupling. *J Biol Chem.* 271: 6233-6240.

Donzelli S, Espey MG, Thomas DD, Mancardi D, Tocchetti CG, Ridnour LA, Paolocci N, King SB, Miranda KM, Lazzarino G, Fukuto JM, Wink DA (2006) Discriminating formation of HNO from other reactive nitrogen oxide species. *Free Radic Biol Med.* 40: 1056-1066.

Donzelli S, Fischer G, King BS, Niemann C, DuMond JF, Heeren J, Wieboldt H, Baldus S, Gerloff C, Eschenhagen T, Carrier L, Böger RH, Espey MG (2013) Pharmacological Characterization of 1-Nitrosocyclohexyl Acetate, a Long-Acting Nitroxyl Donor That Shows Vasorelaxant and Antiaggregatory Effects. *J Pharmacol Exp Ther.* 344: 339-347.

Dorn WG II, Becker MW (1993) Thromboxane A₂ stimulated signal transduction smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther.* 265: 447-456.

Fukuto JM, Dutton AS, Houk KN (2005) The chemistry and biology of Nitroxyl (HNO): a chemically unique species with novel and important biological activity. *Chembiochem.* 6: 612-619.

Fukuto JM, Jackson MI, Kaludercic N, Paolocci N (2008) Examining Nitroxyl In Biological Systems. *Methods Enzymol.* 440: 411-431.

Fukuto JM, Bianco CL, Chavez TA (2009) Nitroxyl (HNO) signaling. *Free Radic Biol Med.* 47: 1318-1324.

Gachet C (2008) P2 receptors, platelet function and pharmacological implications. *Thromb Haemost.* 99: 466-472.

Horn F (2009) *Biochemie des Menschen*, 4. Aufl., Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 342-347.

Huang JS, Ramamurthy SK, Lin X, Le Breton GC (2004) Cell signalling through thromboxane A₂ receptors. *Cell signal.* 16: 521-533.

Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G (1987) Endothelium derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA.* 84: 9265-9269.

Irvine JC, Favalaro JL, Kemp-Harper BK (2003) NO⁻ activates soluble guanylate cyclase and K_v channels to vasodilate resistance arteries. *Hypertension.* 41: 1301-1307.

Irvine JC, Ritchie RH, Favalaro JL, Andrews KL, Widdop RE, Kemp-Harper BK (2008) Nitroxyl (HNO): the Cinderella of the nitric oxide story. *Trends Pharmacol Sci.* 29: 601-608.

Li Z, Delaney MK, O'Brien KA, Du X (2010) Signaling During Platelet Adhesion and Activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 30: 2341-2349.

Lüllmann H, Mohr K, Hein L (2010) *Pharmakologie und Toxikologie, Arzneimittelwirkungen verstehen – Medikamente gezielt einsetzen*, 17. Aufl., Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 12-15.

Miller TW, Cherney MM, Lee AJ, Francoleon NE, Farmer PJ, King SB, Hobbs AJ, Miranda KM, Burstyn JN, Fukuto JM (2009) The Effects of Nitroxyl (HNO) on Soluble Guanylate Cyclase Activity: Interactions at Ferrous Heme and Cysteine Thiols. *J Biol Chem.* 284: 21788-21796.

Nakahata N (2008) Thromboxane A₂: Physiology/pathophysiology, cellular signal transduction and pharmacology. *Pharmacol Ther.* 118: 18-35.

Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S (1987) Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature.* 327: 524-526.

Paolucci N, Katori T, Champion HC, St John ME, Miranda KM, Fukuto JM, Wink DA, Kass DA (2003) Positive inotropic and lusitropic effects of HNO/NO⁻ in failing hearts: Independence from β-adrenergic signalling. *Proc Natl Acad Sci USA.* 100: 5537-5542.

Paolucci N, Jackson MI, Lopez BE, Miranda K, Tocchetti CG, Wink DA, Hobbs AJ, Fukuto JM (2007) The pharmacology of nitroxyl (HNO) and its therapeutic potential: Not just the janus face of NO. *Pharmacol Ther.* 113: 442-458.

GE Healthcare (2006) *Amersham cGMP Enzymeimmunoassay Biotrak (EIA) System – Product Booklet.* Little Chalfont, Buckinghamshire, UK.

Rassow J, Hauser K, Netzker R, Deutzmann R (2008) Duale Reihe – Biochemie, 2. Aufl., Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart, 736-742.

Rivera J, Lozano ML, Navarro-Nunez L, Vicente V (2009) Platelet receptors and signaling in the dynamics of thrombus formation. *Haematologica*. 94: 700-711.

Sha X, Isbell TS, Patel RP, Day CS, King SB (2006) Hydrolysis of Acyloxy Nitroso Compounds Yields Nitroxyl (HNO). *J Am Chem Soc*. 128: 9687-9692.

Statistisches Bundesamt (2010) Herz-/Kreislaufkrankungen verursachen 41% aller Todesfälle. Wiesbaden [Online im Internet].

URL:<https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Aktuell.html?nn=50808> [28.03.2012]

Strathmann MP, Simon MI (1991) Gα12 and Gα13 subunits define a fourth class of G protein α subunits. *Proc Natl Acad Sci USA*. 88: 5582-5586.

Switzer CH, Flores-Santana W, Mancardi D, Donzelli S, Basudhar D, Ridnour LA, Miranda KM, Fukuto JM (2009) The emergence of nitroxyl (HNO) as a pharmacological agent. *Biochim Biophys Acta*. 1787: 835-840.

Wang GR, Zhu Y, Halushka PV, Lincoln TM, Mendelsohn ME (1998) Mechanism of platelet inhibition by nitric oxide: In vivo phosphorylation of thromboxane receptor by cyclic GMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci USA*. 95: 4888-4893.

8 Danksagung

Herrn Prof. Dr. R. Böger danke ich für die Möglichkeit, im Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie diese Arbeit durchzuführen sowie für die stets hilfreiche und umfassende Art der Betreuung.

Frau Dr. S. Donzelli danke ich für die Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe sowie für die Hilfe bei der Planung und der kritischen Bewertung meiner Versuche. Ebenso danke ich ihr für die stets motivierenden und hilfreichen Gespräche, welche entscheidend zu dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn G. Fischer danke ich für die großartige Unterstützung bei der Einarbeitung.

Weiterhin möchte ich allen nicht genannten Mitgliedern des Instituts, insbesondere den Mitgliedern des Arbeitsbereichs Klinische Pharmakologie, für den freundlichen und hilfreichen Umgang danken.

Abschließend danke ich meiner Familie für ihre uneingeschränkte Unterstützung.

9 Lebenslauf

Christin Niemann

Geb. am 14.08.1985 in Prenzlau

Schulische Ausbildung

1992-1998	Pestalozzi-Grundschule Prenzlau
1998-2005	Städtisches Gymnasium Prenzlau
06/2005	Abitur in Biologie, Englisch, Mathematik und Geschichte

Studium

2005-2011	Studium der Humanmedizin am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
12/2011	Ärztliche Prüfung
01/2009	Beginn der Promotion im Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Beruflicher Werdegang

06/2012	Tätigkeit als Ärztin in der Frauenklinik des Allgemeinen Krankenhaus Celle
---------	---

10 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift: