

Aus dem Zentrum der Chirurgie
des Klinikums der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Klinik für Thorax-, Herz- und thorakale Gefäßchirurgie
Direktor: Prof. Dr. A. Moritz

in Zusammenarbeit mit dem
Institut für Physiologie I
Arbeitsgruppe Kreislaufphysiologie
Prof. Dr. rer.nat. A. Mülsch

Verfahren
zur elektrochemischen Messung von
Stickstoffmonoxid und
S-Nitrosothiolen in Flüssigkeiten

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades des Fachbereichs
Medizin an der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

vorgelegt von
Jan Dirk Wolff
aus Münster (Westf.)

Frankfurt am Main, 2001

Die Vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung der Herren PD. Dr. G. Wimmer-Greinecker, Prof. Dr. A. Moritz und Dr. G. Matheis am Zentrum für Chirurgie, sowie von Herrn Prof. Dr. A. Mülsch am Institut für kardiovaskuläre Physiologie der Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main angefertigt.

Dekan: Prof. Dr. J. Pfeilschifter

Gutachter 1: Priv. Doz. Dr. G. Wimmer-Greinecker

Gutachter 2: Prof. Dr. A. Mülsch

Tag der mündlichen Prüfung: 31.11.2002

Meiner Familie

INHALT

INHALT	2
VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN	4
VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN	5
1. EINLEITUNG	6
1.1 Stickstoffmonoxid (NO), ein biologisches Signalmolekül	7
1.1.1 Geschichtliches und Wirkungen.....	7
1.1.2 Reaktions- und Stoffwechselwege des Stickstoffmonoxid	9
1.2 S-Nitrosothiole, NO-Transportmoleküle mit intrinsischer Wirkung	11
1.3 Bisherige Methoden zur S-Nitrosothiolmessung	15
1.4 Aufgabenstellung:	16
2. MATERIAL UND METHODEN	18
2.1 Material	18
2.1.1 Messgerät	18
2.1.2 Sonstige Materialien.....	19
2.2 Methoden	20
2.2.1 Plasmagewinnung.....	20
2.2.2 Die NO-Elektrode von WPI	20
2.2.3 Eichung der Elektrode mittels KNO_2	22
2.2.4 Benutzte Lösungen.....	25
3. ERGEBNISSE	27
3.1 Detektion von S-Nitrosothiolen mit der 2 mm WPI-Sonde	27
3.1.1 Zersetzung von S-Nitrosothiolen durch die Detektionslösung und Stabilität der Eichlösung	27
3.1.2 Detektion von S-Nitrosothiolen in humanem Plasma, Einfluß der L-Cystein Konzentration in der Detektionslösung	29
3.1.3 Detektion von S-Nitrosothiolen im Phosphatpuffer.....	34
3.1.3.1 Einfluss von CuSO_4	37
3.1.3.2 Einflüsse durch Art der Herstellung der Detektionslösung.....	38
3.1.3.3 Spezifität des Messverfahrens für S-Nitrosothiole bei saurem pH-Wert, Einfluß des pH-Werts der Detektionslösung.....	38
3.2 Detektion von S-Nitrosothiolen mit der 0,2 mm WPI-Sonde	41
3.2.1 Detektion von S-Nitrosothiolen mit der 0,2 mm Sonde in wässriger Pufferlösung.....	41
3.2.1.1 S-Nitrosocystein	41

3.2.1.2 S-Nitrosoalbumin.....	43
3.2.2 Einfluß von Konvektion während der Messung.....	44
3.2.3 Einfluß der Ionenstärke	45
3.2.4 Einfluß der Cysteinkonzentration in der Detektionslösung.....	45
3.2.5 Einfluß der Volumina von Detektions- und Probenlösung.....	47
3.2.6 Ersatz von Cystein durch DTT in der Detektionslösung bei S- Nitrosothiolbestimmung in wässriger phosphatgepufferter Lösung	48
3.2.7 Einfluß der Reihenfolge der Zugabe von S-Nitrosothiol und Detektionslösung auf die Detektierbarkeit des S-Nitrosothiols	51
3.3 Detektion von S-Nitrosothiolen mit der 0,2 mm WPI Sonde im Plasma	53
3.3.1 Einfluß von Konvektion während der Meßung	55
3.3.2 Verlängerung der Halbwertszeit von NO im Plasma	57
3.4 Artefakte und physikochemische Einflüsse mit 0,2 und 2 mm Sonden	58
4. DISKUSSION.....	59
4.1 Hintergrund und Fragestellung.....	59
4.2 Detektion von S-Nitrosothiolen mit der 2 mm WPI-Sonde	60
4.3 Detektion von S-Nitrosothiolen mit der 0,2 mm WPI-Sonde.....	61
4.4 Einfluß der Matrix	64
4.5 NO-Freisetzungskinetik	64
4.6 Plasmabehandlung.....	64
4.7 Artefakte	64
4.8 Schlußfolgerung	65
5. LITERATUR	66
6. ZUSAMMENFASSUNG	73
7. ANHANG.....	75
7.1 Ehrenwörtliche Erklärung.....	75
7.2 Lebenslauf	76
7.3 Danksagung.....	77

VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN

BS-NO	S-Nitrososerumalbumin
cGMP	zyklisches Guanosin-3'-5'-Monophosphat
Cys-NO	S-Nitroso-L-Cystein
DTT	Dithiotreitol
ϵ	Molekularer Extinktionskoeffizient [$M^{-1}cm^{-1}$]
EDRF	Endothelium derived relaxing factor
GS-NO	S-Nitrosoglutathion
GTP	Guanosin-5'-Triphosphat
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxidsynthase
NADPH	Nicotinamid-Adenindinucleotid-Phosphat
NO	Nitric Oxide, Stickstoffmonoxid
NO_2^-	Nitrit
NO_3^-	Nitrat
NOS	Stickstoffmonoxidsynthase
nNOS	Neuronale Stickstoffmonoxidsynthase
RSNO	S-Nitrosothiol (R = organischer Rest)

VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN

Abbildung 1: Das Iso-NO Messgerät mit verschiedenen Sonden.	18
Abbildung 2: Aufbau des Messgeräts zur Kalibrierung der Sonde	21
Abbildung 3: Aufbau der 2 mm ISO-NO Sonde.....	21
Abbildung 4: Aufbau der 0,2 mm Sonde	22
Abbildung 5: Originalregistrierung: Eichkurve einer 2 mm WPI Sonde bei der Eichung mit Kaliumnitrit.....	23
Abbildung 6: Korrelation von Sondenstrom und Kaliumnitritkonzentration mit der 2 mm Sonde.....	24
Abbildung 7: Korrelation von Sondenstrom und Kaliumnitritkonzentration mit der 0,2 mm Sonde..	24
Abbildung 8: Originalregistrierung der Absorptionsspektren von S-Nitrosothiol-Eichlösung im Spektralphotometer	28
Abbildung 9: Originalregistrierung mit 2 mm WPI-Sonde in Plasma	30
Abbildung 10: Originalregistrierung einer amperometrischen Detektion von S-Nitroso-Cystein in Plasma	32
Abbildung 11: : Originalregistrierung einer amperometrischen Detektion von S-Nitroso-BSA in Phosphatpufferlösung.....	35
Abbildung 12: Korrelation zwischen S-Nitroso-BSA-Konzentration und Sondenstrom (DI_{max})	35
Abbildung 13: Originalregistrierung einer amperometrischen Detektion von S-Nitroso-Cystein.	36
Abbildung 14: Korrelation zwischen S-Nitroso-Cystein-Konzentration und Sondenstrom (DI_{max}).....	36
Abbildung 15: Originalregistrierung einer amperometrischen Detektion von Nitrit.	39
Abbildung 16: Korrelation zwischen Nitrit-Konzentration und Sondenstrom (DI_{max}).....	40
Abbildung 17: Originalregistrierung einer amperometrischen Detektion von S-Nitroso-Cystein.	41
Abbildung 18: Korrelation zwischen S-Nitroso-Cystein-Konzentration und Sondenstrom (DI_{max})	42
Abbildung 19: Originalregistrierung einer amperometrischen Detektion von S-Nitroso-BSA.	43
Abbildung 20: Korrelation Zwischen S-Nitroso-BSA-Konzentration und Sondenstrom (DI_{max})	44
Abbildung 21: Originalregistrierung einer amperometrischen Detektion von S-Nitroso-BSA.	46
Abbildung 22: Originalregistrierung einer amperometrischen Detektion von S-Nitroso-BSA.	49
Abbildung 23: Korrelation Zwischen S-Nitroso-BSA-Konzentration und Sondenstrom (DI_{max}) mit der 0,2 mm Sonde und DTT-Detektionslösung	50
Abbildung 24: Originalregistrierung einer amperometrischen Detektion von S-Nitroso-BSA mit DTT als Detektionsreagenz mit S-Nitroso-BSA dotiertem Phosphatpuffer und Kontrolle.....	52
Abbildung 25: Originalregistrierung einer amperometrischen Detektion von S-Nitrosoalbumin in Plasma	54
Abbildung 26 : Originalregistrierung einer amperometrischen Detektion von S-Nitrosoalbumin in Plasma, bewegte Lösung.....	56
Abbildung 27: Korrelation von Messsignal zu Cysteinkonzentration im Detektionsreagenz für die 2 mm Sonde in Humanplasma	62
Abbildung 28: Korrelation von Messsignal zu Cysteinkonzentration im Detektionsreagenz für die 0,2 mm Sonde in Phosphatpufferlösung	63

1. EINLEITUNG

Innerhalb der letzten Jahre ist der Stoffwechsel und die Bedeutung von Stickstoffmonoxid (NO) zum Gegenstand einer großen Fülle von Forschungsprojekten geworden. Aus der Zahl der Publikationen in der medizinisch-biologischen Literatur seit 1980 (ca. 50000) wird die Vielfalt des erzeugten Wissens deutlich. Die gängigen Bezeichnungen sind Stickstoffmonoxid oder Stickoxid im deutschen, sowie Nitric Oxide im anglo-amerikanischen Sprachgebrauch, sowie übergreifend das chemische Symbol NO.

Die medizinische Bedeutung von NO ist weitreichend. Stickstoffmonoxid wird eine wesentliche Rolle zugeschrieben unter anderem bei Herzinsuffizienz, Atherosklerose, Nitrattoleranz, Muskeldystrophie, Kreislaufchock und Erektionsstörungen des Mannes (Gail et al. 2001). Therapeutisch wird gasförmiges NO bisher hauptsächlich benutzt als Vasorelaxanz bei pulmonaler Hypertonie. NO ist aber letztlich Wirkprinzip bei einigen der gängigsten blutdrucksenkenden Medikamenten wie z.B. organischen Nitraten.

Was aber ist Stickstoffmonoxid? Lange Zeit kannte man den Begriff Stickoxid lediglich aus Autozeitschriften oder Meldungen über Schadstoffemissionen. Stickstoffmonoxid ist kein neu gefundenes Gas. Es ist wahrscheinlich schon eines jener Gase gewesen, von denen Joseph Priestley im März 1772 in seinen Vorlesungen mit dem Titel "Observations on different kinds of air" vor der Royal Philosophical Society in London berichtet.

In diesen Erklärungen allein findet sich noch nicht das rege Interesse, das heute diesem kleinen, labilen Radikalmolekül entgegengebracht wird, begründet.

1.1 Stickstoffmonoxid (NO), ein biologisches Signalmolekül

1.1.1 Geschichtliches und Wirkungen

Die Bedeutung des Endothels für die Regulation des Gefäßtonus begann sich abzuzeichnen, als 1980 zuerst Furchgott und Zawadzki (Furchgott et al.), und 1981 Chand und Altura (Chand et al.), eine acetylcholinvermittelte Relaxation isolierter Gefäße beschrieben, die unabdingbar ein intaktes Endothel voraussetzt. Weitere Arbeiten führten zu dem Schluß, daß die Endothelzellen sowohl kontinuierlich als auch unter Stimulation einen kurzlebigen Stoff abgeben, der für diese Reaktion verantwortlich ist. Man schrieb ihm die beobachtete Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur und darüber hinaus eine Hemmung der Anheftung von Thrombozyten an die Gefäßwand zu. Beschreibend wurde diese Substanz „Endothelium derived relaxing factor“ (EDRF) bezeichnet (Bassenge et al. 1988, 1990, Furchgott et al. 1983, 1989, Vanhoutte et al. 1986). Verschieden Arbeitsgruppen fanden in den Jahren 1987 und 1988 durch unterschiedliche Methoden Hinweise darauf, daß es sich bei EDRF um Stickstoffmonoxid (NO) handeln könnte (Palmer et al. 1987, Ignarro et al. 1987, Kelm et al. 1988, 1989). Schließlich konnte die Identität von NO als EDRF stichhaltig bewiesen werden. Die Kontroverse um andere Stickoxide als potentielle Agonisten von NO mit ähnlicher Wirkung war beendet (Feelisch et al. 1994).

In kurzer Zeit wurde der Stoffwechselweg der NO-Bildung in seinen Einzelschritten aufgedeckt (Bredt et al. 1990, Knowles et al. 1994, Marletta et al. 1994, Moncada et al. 1993, Nathan et al. 1994, Palmer et al. 1988, Rees et al. 1989, Sakuma et al. 1988, Schmidt et al. 1988).

Die kardiovaskuläre Wirkung von NO, die ursprünglich den Anfang der Forschungen begründet hatte, blieb nicht die einzige, aber die herausragende wichtige Rolle, die NO im Stoffwechsel zugeordnet werden konnte. Das Endothel in seiner Gesamtheit wird heute immer mehr als ein disseminiertes Organ betrachtet, das die Durchblutung und damit die Funktion zahlreicher Organe beeinflusst. Zusammengerechnet wiegt dieses Organ etwa 1,5-2.5 kg und hat eine Oberfläche von etwa 700 Quadratmetern (Deussen et al. 1991). NO ist nicht alleiniger Regulator dieses Organsystems. Neben dem NO System sind weitere Regulationsmechanismen aufgedeckt und näher erforscht worden. Dies sind unter anderem das Renin-Angiotensin- und das Kalikrein-Kininsystem,

natriuretische Peptide, Endothelin, mechanosensitive Ionenkanäle, Prostanoide, Katecholamine und endothelabhängiger hyperpolarisierender Faktor (Dzau et al. 1994).

Die kardiovaskuläre Wirkung des von Endothelzellen gebildeten NO ist vielfältig. Nach luminal freigesetztes NO hemmt die Aggregation von Thrombozyten, sowie die Adhäsion von neutrophilen Granulozyten und Monozyten an die Gefäßwand (Moncada et al. 1993, Radomski et al. 1993). Die Anlagerung dieser Zellen an die Gefäßwand ist einer der Schlüsselprozesse für die Entstehung von Atherosklerose (Ross 1986). Beeinflussung des NO Metabolismus und der NO Synthese können sogar zur Rückbildung von atherosklerotischen Veränderungen führen (Moncada et al. 1993). Nach abluminal freigesetztes NO wirkt vor allem durch die lösliche Guanylatcyclase vermittelt relaxierend auf die glatte Muskulatur (Moncada et al. 1993, Mülsch et al. 1993,1994). Das wesentliche Signalmolekül hierbei ist das zyklische Guanosinmonophosphat (Ignarro et al. 1985, Radomski et al. 1991, Walter 1989). Das Endothel übt auf diese Weise einen wesentlichen Einfluß auf den Gefäßtonus, und damit auf die Durchblutung, sowie den Blutdruck aus (Rees et al. 1989). Diese Wirkungen aus dem Tiermodell konnten auch für den Menschen nachgewiesen werden (Lefroy et al. 1993, Stamler et al. 1994). Das endothelial gebildete NO wirkt aber nicht nur parakrin auf benachbarte Zellen, sondern greift auch autokrin in den Stoffwechsel der Endothelzelle selbst ein (Ignarro 1990). Es gibt Hinweise, daß die Angiogenese, die Expression von Adhäsionsmolekülen, sowie die vaskuläre Permeabilität durch NO reguliert werden (Kubes 1993, Moncada 1989, Pipli-Synetos 1993). Etwa zeitgleich zur Entdeckung von NO als EDRF wurde nachgewiesen, daß NO das aktive Wirkprinzip der organischen Nitrate darstellt (Feelisch 1987).

Durch die kontinuierliche Freisetzung von NO durch die Endothelzellen und seine Wirkung auf den Gefäßtonus entstand die Hypothese, die Erhöhung des peripheren arteriellen Widerstands und damit eine Erhöhung des diastolischen Blutdrucks, sowie weitere intensivmedizinische Zustände, beispielsweise bei septischen Kreislaufverhältnissen oder adult respiratory distress syndrome (ARDS), dem Lungenversagen des Erwachsenen, könnten mit einer Veränderung der endothelialen NO Freisetzung zusammenhängen. Unabdingbare Voraussetzung, solche Modelle zu verifizieren ist die Möglichkeit, die freigesetzte NO Menge zu quantifizieren.

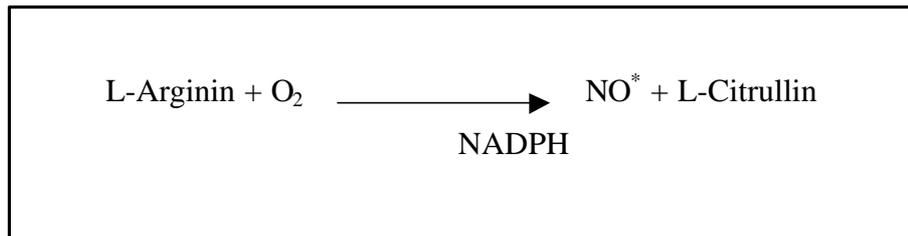
Der Wirkmechanismus der Gefäßrelaxation ist bekannt. In der glatten Muskelzelle wird die lösliche Guanylylcyclase durch NO aktiviert (Murat, Ignarro Review, Snyder et al. 1992). Es wird Guanosin-Triphosphat (GTP) in zyklisches Guanosin-Monophosphat (cGMP) umgewandelt. Durch eine cGMP-aktivierbare Proteinkinase werden verschiedene Proteine phosphoryliert, wodurch u.a. die intrazelluläre Konzentration an freien Kalziumionen (Ca^{2+}) sinkt, was die Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur bewirkt (Kukovetz et al., 1985). Außerdem aktiviert die Proteinkinase G die Myosin-Leichte-Ketten-Phosphatase (MLCP), was zur Dephosphorylierung der MCL und somit zu einer Desensitivierung der kontraktilen Filamente gegenüber Kalziumionen führt (Meyer et al., 1994).

1.1.2 Reaktions- und Stoffwechselwege des Stickstoffmonoxid

Stickstoffmonoxid Synthase

In einer phylogenetisch sehr alten Reaktion wird NO durch Stickstoffmonoxid-Synthasen (NOS) aus L-Arginin gebildet. Diese Reaktion konnte sogar in Hämatozyten eines Pfeilschwanzkrebses nachgewiesen werden, der einem entwicklungsgeschichtlichen Stand von vor 300 Millionen Jahren entspricht (Moncada et al. 1991).

Bei der NOS werden drei Isoformen unterschieden: die neuronale NOS (NOS I), die makrophagozytäre NOS (NOS II) und die endotheliale NOS (NOS III) (Knowles, Moncada 1994). L-Arginin wird in NO und L-Citrullin umgewandelt. Eines der beiden Guanidino-Stickstoffatome des L-Arginins wird dabei unter Verbrauch von Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (NADPH) als Elektronendonator und Sauerstoff in NO umgewandelt.



Bildung von NO aus L-Arginin durch NO-Synthasen

Die NOS bestehen jeweils aus zwei identischen Untereinheiten und haben vier prosthetische Gruppen: ein Flavinadenindinukleotid, ein Flavinmononukleotid, ein Häm und ein Tetrahydrobiopterin. Die Elektronen vom NADPH werden von den Flavinen auf das Häm übertragen, welches dann den Sauerstoff aktiviert (Marletta, 1994, Griffith & Stuehr, 1995). Die Wirkung von Tetrahydrobiopterin ist noch nicht geklärt. Wahrscheinlich wirkt es allosterisch und nicht direkt katalytisch an der Reaktion mit (Giovanelli et al, 1991).

Nach ihrer Aktivität werden die verschiedenen NOS unterteilt in die konstitutive, zu denen die neuronale NOS und die endotheliale NOS gerechnet werden, und die induzierbare NOS (iNOS), die makrophagozytäre NOS.

Die Aktivität der konstitutiven NOS wird durch die intrazelluläre Konzentration der Kalziumionen über Kalzium/Kalzium-Kalmodulin Komplexe, sowie auch über mechanische Einflüsse wie Schubspannung der Gefäßwand gesteuert. Die Induktion der iNOS erfolgt unabhängig von der Kalziumkonzentration über eine Genaktivierung durch Cytokine und bakterielle Endotoxine (Griffith & Stuehr, 1995).

Das gebildete NO hat in physiologischen Salzlösungen eine sehr kurze Halbwertszeit. In Gegenwart von Sauerstoff ist sie mit kürzer als 6 Sekunden beschrieben (Ignarro, 1988). Im Blut, wo NO mit Oxyhämoglobin sehr schnell zu Nitrat und Methämoglobin reagiert, liegen die Halbwertszeiten im Bereich von Millisekunden (Kelm et al. 1988). Das äußerst reaktive NO reagiert besonders in Form von Additions- und Redoxreaktionen. Im physiologischen Medium kommen dafür besonders Oxyhämoglobin, Sauerstoff (O₂), Sauerstoffsuperoxid (O₂⁻) und freie Übergangsmetallionen infrage. Die Reaktionsprodukte können sodann Additionsreaktionen mit nucleophilen Zentren eingehen, die sich im Körper besonders in Form von freien oder proteingebundenen Thiolgruppen finden (Stamler et al. 1992a, Mohr et al. 1994).

1.2 S-Nitrosothiole, NO-Transportmoleküle mit intrinsischer Wirkung

Nach dem oben beschriebenen Muster wird das freigesetzte NO im Körper schnell umgewandelt. Die Wirkungen von NO zeigen jedoch nicht die drastischen Schwankungen, die diese kurze Halbwertszeit nahe legen würde. Für diesen Effekt könnten S-Nitrosothiole mitverantwortlich sein (Stammler et al. 1992b). Sulfhydrylgruppen von Proteinen werden im Körper durch oxidiertes NO, also NO₂ oder N₂O₃, nitrosyliert (Stamler et al. 1992b, Wink et al. 1994, Pietraforte et al. 1995). Es entstehen S-Nitrosothiole. Albumin ist das Plasmaprotein mit der höchsten Konzentration. Es hat dementsprechend auch den größten Anteil an den im Plasma vorliegenden S-Nitrosothiolen (82%, Stamler et al. 1992a). Der überwiegende Teil des Plasma-NO liegt in nitrosylierter Form vor (20 nM gegenüber einer Konzentration von 3 nM des freien NO, Stamler et al. 1992c). S-Nitrosothiole werden als extrazellulärer NO-Speicher angesehen. Darüberhinaus haben sie aber auch selbst eine sehr große Bandbreite von Wirkungen, die in der folgenden Tabelle zusammengefasst sind.

Tabelle: S-Nitrosothiole und ihre Funktion (n. Bartsch)

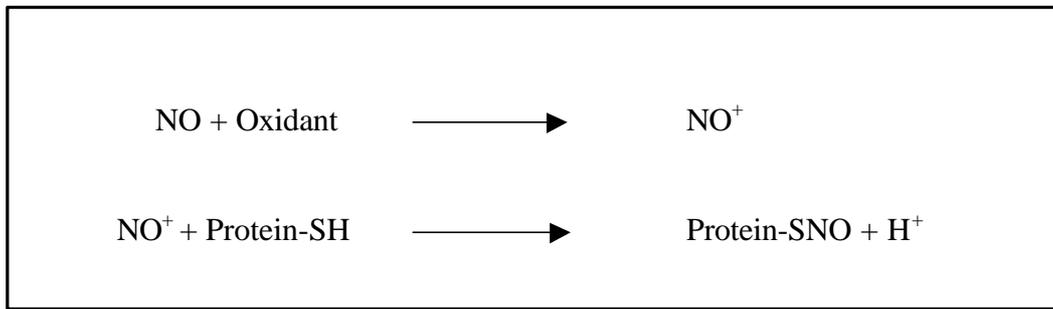
Protein	Funktion	Nachweis	Referenz
NMDA-Rezeptor	Herabsetzung der Rezeptoraktivität	indirekt	Lei et al., 1992
L-Typ-Ca ²⁺ -Kanäle	Steigerung des Ca ²⁺ -Einstroms	indirekt	Campell et al., 1996
Calcium release channel	Aktivierung	direkt	Xu et al., 1998
Ca ²⁺ -abhängige K ⁺ -Kanäle	Aktivierung	indirekt	Bolotina et al., 1994
Neurophile NADPH-Oxidase	Hemmung	indirekt	Clancy et al., 1992
G-Proteine/p21 ^{ras a}	Aktivierung	direkt	Lander et al., 1994
Proteinkinase C	Hemmung	indirekt	Gopalakrishna et al., 1993
Adenylatcyclase (Typ 1)	Hemmung	indirekt	Duhe et al., 1994
BM-SH	antibakterielle Wirkung	indirekt	Morris et al., 1984
GAPDH	Hemmung	indirekt	Padgett et al., 1996
SNAP-25	Hemmung der Palmitoylierung des Proteins	indirekt	Hess et al., 1993
GAP-43	Hemmung der Palmitoylierung des Proteins	indirekt	Hess et al., 1993
tissue plasminogen activator	Aktivierung	direkt	Stamler et al., 1992c
Kathepsin B	Hemmung	direkt	Stamler et al., 1992d
Aldolase	Hemmung	indirekt	O'Leary, Solberg 1976
Alkoholdehydrogenase	Hemmung	direkt	Gergel, Cederbaum, 1996
		indirekt	McDonald, Moss, 1993
Gluthathionperoxidase	Hemmung	direkt	Asahi et al., 1995
Gamma-Glutamyl-cysteinylsynthetase	Hemmung	indirekt	Han et al., 1995
OMDM-Transferase	Hemmung	indirekt	Laval, Wink, 1994
Aktin	ADP-Ribosylierung	indirekt	Clancy et al., 1993
Glutathion*	Speicherung von NO	indirekt	Gaston et al., 1993
Albumin*	Speicherung und Transport von NO	direkt	Stamler et al., 1992a
S-Nitrosohämoglobin*	Modulation der Sauerstoffabgabe ins Gewebe	direkt	Jia et al., 1996
NF-kappaBp50	Verminderung der DNA-Bindungsaffinität	direkt	DelaTorre et al., 1997
AP-1	Hemmung	indirekt	Tabuchi et al., 1994
OxyR*	Aktivierung	direkt	Hausladen et al., 1996
H ⁺ -ATPase	Hemmung	indirekt	Wolosker et al., 1996
Calpain	Hemmung	indirekt	Michetti et al., 1995
Caspase	Hemmung	indirekt direkt	Mohr et al., 1997 Rössing et al., 1999
ADP-Ribose-Pyrophosphatase I	Hemmung	indirekt	Ribeiro et al., 1995
5' Ektonuklease	Hemmung	indirekt	Siegried et al., 1996
Phosphotyrosin Protein-	Hemmung	indirekt	Caselli et al., 1994

Phosphatase			
EGFR-Tyrosinkinase	Hemmung	indirekt	Estrada et al., 1997
Muskarinischer-M2-Rezeptor	Entkopplung der Rezeptor-G-Protein-Kopplung	indirekt	Aronstam et al., 1995
GSH-Reduktase	Hemmung	direkt	Böse et al., 1996

direkt: direkter Nachweis der S-NO Bindung

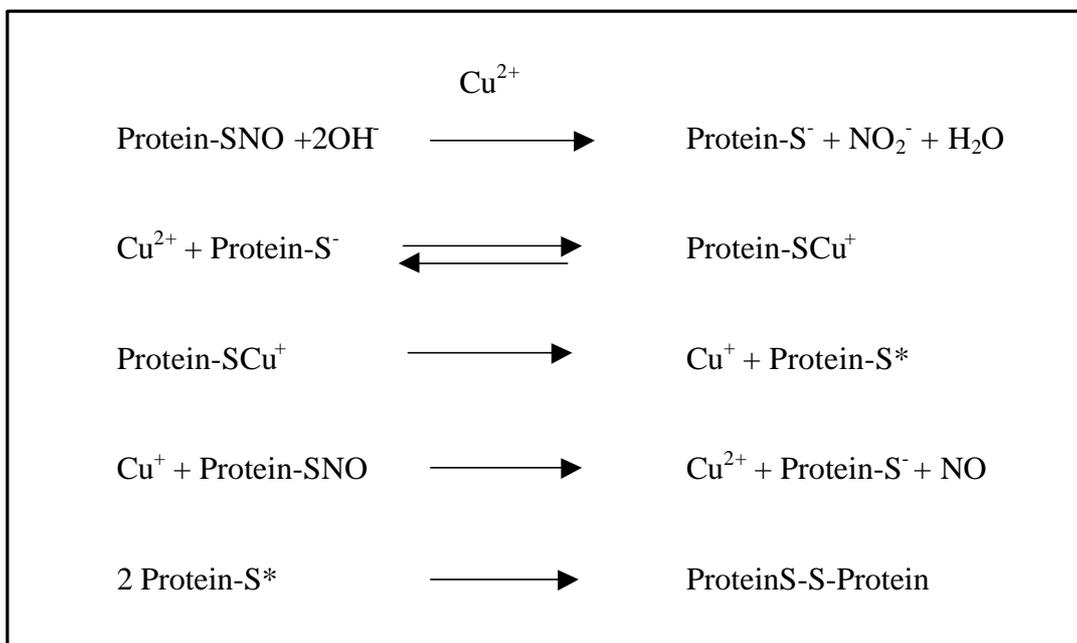
indirekt: kein direkter Nachweis der S-NO Bindung

Fortsetzung Tabelle: S-Nitrosothiole und ihre Funktion



Bildung von S-Nitrosothiolen

Eine Freisetzung des gespeicherten NO wird durch verschiedene Metallionen, wie das Cu²⁺, bewirkt (Mathews et al. 1993, Singh et al. 1996, Stamler 1994, Wiliams 1996).

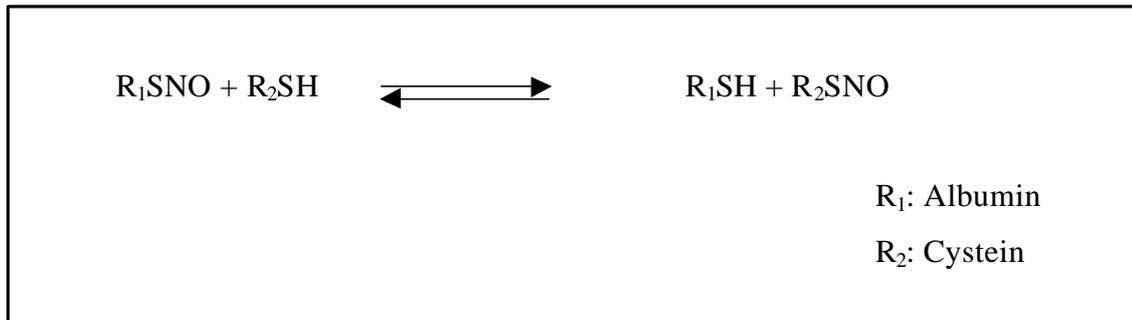


Freisetzung von NO aus S-Nitrosothiolen durch Kupferionen Kupfer(I) ist das aktive Prinzip, das die NO-Freisetzung aus S-Nitrosothiolen katalysiert. (Wiliams, 1996) Protein S* ist ein proteinständiges Cysteinylradikal. Die Nettoreaktion ist die Bildung von Disulfidgruppen am Protein und freien NO aus dem S-Nitrosoprotein.

Die Molekülgröße der Reste an der Thiolgruppe hat einen Einfluß auf die Freisetzungskinetik. Aus niedermolekularen Verbindungen, wie dem S-Nitrosocystein erfolgt eine Freisetzung etwa doppelt so schnell, wie aus dem hochmolekularem S-Nitrosoalbumin (Meyer et al. 1994, Scharfstein et al. 1994).

Ebenfalls möglich ist eine Übertragung des NO von einem freien Thiol auf ein Proteinthiol oder umgekehrt. So kann man aus S-Nitrosoproteinen niedermolekulare S-Nitrosothiole herstellen, indem man die niedermolekularen Thiolreste im Überschuß zusetzt. Diese Reaktion wird Transnitrosylierung genannt (Meyer et al. 1994, Pietraforte

et al. 1995, Scharfstein et al. 1994). Diese Art Reaktion soll bei der Freisetzung von NO aus der gespeicherten Form an den Wirkort eine Rolle spielen (Stamler et al. 1992a). Vermutet werden spezifische Rezeptoren auf der Zellmembran von Leukozyten, Endothelzellen und Thrombozyten als Ort der Reaktion (Mordvintsev et al. 1986, Bates et al. 1990, Simon et al. 1993, Stamler et al. 1994).



Transnitrosylierung. Die S-Nitrosogruppe kann von einem Thiol auf ein anderes übertragen werden. Die Gleichgewichtskonstante k der Reaktion und das Konzentrationsverhältnis von nieder- und hochmolekularen Thiolen bestimmen das Verhältnis von nieder- und hochmolekularem S-Nitrosothiol.

1.3 Bisherige Methoden zur S-Nitrosothiolmessung

Andere sensitive Verfahren zur Quantifizierung von S-Nitrosothiolen spalten zuerst das NO aus der Verbindung ab, um es dann quantitativ zu erfassen.

Nach einem von Saville beschriebenen Verfahren wird NO erst mit Quecksilber aus der Verbindung abgespalten und dann in einer Methode nach Griess bestimmt (Saville 1958).

Bei der Ultraviolett-Photometrie nach Griess wird Nitrit in ein Diazoniumsalz überführt und nach Azokupplung von Betanaphthol an Naphtyläthylendiamin bei einer Wellenlänge von 550 nm quantifiziert (Griess 1879).

Ein weiterer Nachweis beruht auf der NO-induzierten Bildung von Methämoglobin aus Oxyhämoglobin und Messung der Extinktionsänderung beider Hämoglobinformen im Differenzspektrophotometer (Feelisch, 1987, Kelm et al. 1988).

Bei einem anderen Verfahren wird das NO mittels UV-Licht aus dem S-Nitrosothiol gelöst und über die Chemilumineszenzreaktion mit Ozon nachgewiesen (Stamler et al. 1992 b).

Die beiden letztgenannten Methoden sind jedoch experimentell sehr aufwendig. Es werden komplexe, kommerziell nicht erhältliche Apparaturen benötigt und der Zeitaufwand, unter anderem für die Herstellung der benötigten Lösungen ist

beträchtlich. Dadurch sind diese Methoden weit von der klinischen Anwendbarkeit entfernt.

1.4 Aufgabenstellung:

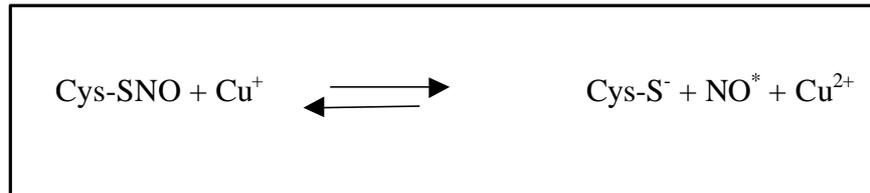
Entwicklung eines Verfahrens zur quantitativen Bestimmung von S-Nitrosothiolen in biologischen Medien mittels eines amperometrischen NO-Detektors

Ziel der Untersuchungen war, ein Verfahren zu finden, mit dem das in S-Nitrosothiolen gebundene NO schnell und quantitativ in eine für die amperometrische Detektion messbare Form überführt wird.

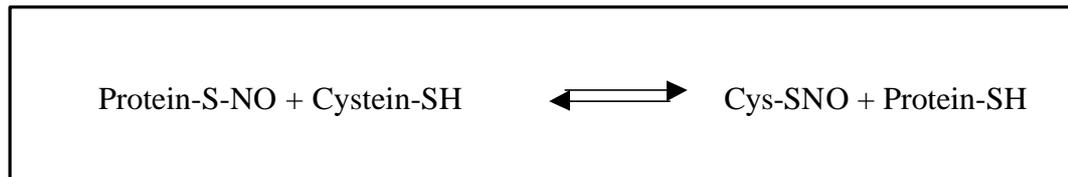
Diese Technik sollte für verschiedene Anwendungen entwickelt werden. So sollten niedermolekulare und proteinständige S-Nitrosothiole in wässriger, gepufferter Lösung, und im Blutplasma reproduzierbar detektiert und quantifiziert werden. Dabei sollten falsch positive Messsignale durch andere NO-Verbindungen (NO_3^- , NO_2^-) vermieden werden. Ebenfalls sollte die Spezifität der erhaltenen Messsignale für NO nachgewiesen werden. Physikalische und chemische Störfaktoren sollten systematisch erfasst werden, um die Rahmenbedingungen für eine zuverlässige Arbeitsmethode zu etablieren.

Eine Freisetzung von NO aus höhermolekularen S-Nitrosothiolen durch Kupferzugabe findet nur sehr langsam statt. Aufgrund der langsamen Freisetzung und der kurzen Halbwertszeit von NO im Plasma ist anzunehmen, dass die Konzentrationen des freien NO unterhalb der Nachweisgrenze liegt. Bei niedermolekularen S-Nitrosoverbindungen ist die Freisetzungskinetik deutlich günstiger. Es ergeben sich bei der Spaltung von S-Nitrosocystein deutlich höhere Spiegel. Daher sollte zur Detektion von höhermolekularen S-Nitrosothiolen noch ein Transnitrosylierungs-Schritt zwischengeschaltet werden.

Der chemische Hintergrund des Verfahrens findet sich in der Verknüpfung von zwei eingangs beschriebenen Reaktionen:



Kupfer katalysierte Freisetzung von NO aus S-Nitroso-Cystein . Durch Kupferionen kann NO aus der Nitrosylgruppe niedermolekularer S-Nitrosothiole, wie dem S-Nitrosocystein, abgespalten werden.



Transnitrosylierungsreaktion zwischen Proteinthiol und S-Nitrosocystein. Die Nitrosogruppe wird von der einen Thiolgruppe auf eine andere übertragen. die Reaktion folgt dem Massenwirkungsgesetz. Durch eine hohe Cysteinkonzentration wird das Gleichgewicht auf die Seite des S-Nitrosocysteins verschoben.

Die Transnitrosylierung sollte vorzugsweise durch die Zugabe einer sehr großen Menge von Cystein bewirkt werden, unter der Vorstellung, nach dem Massenwirkungsgesetz ein Übergewicht auf der Seite der niedermolekularen S-Nitrosothiole zu schaffen. Diese setzen dann, wie oben beschrieben durch Zugabe von Kupferionen NO frei, welches an der Sonde oxidiert und so amperometrisch nachweisbar ist.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Messgerät

ISO-NO-Meter

Benutzt wurde das amperometrische System der Firma WPI, bestehend aus den Sonderelektroden, einem Anzeigergerät und einem Computer als Datenerfassungsgerät.

Der Aufbau wird im Folgenden noch gesondert beschrieben.

Elektroden: ISO-NOP (2 mm Durchmesser)

ISO-NOP200 (0,2 mm Durchmesser)

Alles von WPI, World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA

PC zur NO-Elektrode, Targa-PC, 486, 66 Mhz

Registrierungs- und Auswerte-Software Duo 18 von WPI

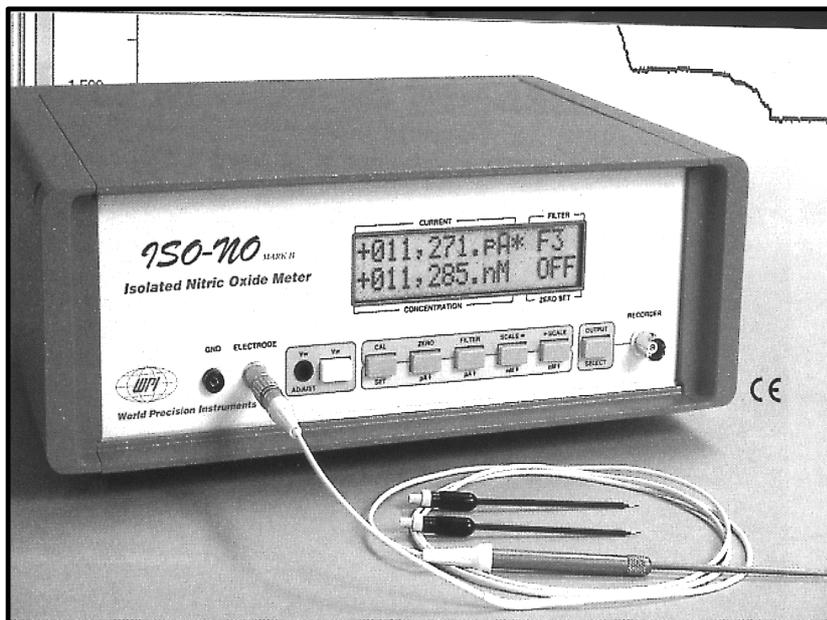


Abbildung 1: Das Iso-NO Messgerät mit verschiedenen Sonden.

Die Messeinheit kann mit einem Aufzeichnungs- und Auswertungsgerät, z.B. einen PC verbunden werden. Näheres s. Text. (Abbildungen aus dem WPI-Manual)

2.1.2 Sonstige Materialien

L-Ascorbinsäure, Bovines Serum Albumin, L-Cystein, Diethyltriaminpentaessigsäure (DETAPAC), Natriumnitrit Schwefelsäure Phosphatpuffer, (50 mmol/l) pH 7,4:

Di-Natriumhydrogenphosphat: Sigma, Deishofen,

Kaliumiodid (KJ), K_2SO_4 , Kupfer(II)sulfat-Pentahydrat, Kaliumdihydrogenphosphat:
Merck, Darmstadt.

2.2 Methoden

2.2.1 Plasmagewinnung

Für die Versuche mit Plasma wurde periphervenöses Blut in kliniküblichen Monovetten von nüchternen Probanden abgenommen und zur Antikoagulation mit 3,8% Natriumzitrat im Verhältnis 1:10 ml gemischt. Durch Zentrifugation bei 4°C wurde Plasma gewonnen. Dieses wurde entweder frisch verwendet oder bei -22°C aufbewahrt. Bei der Gewinnung des Plasmas war es wichtig, die Plasmaschicht unvermischt von den Erythrozyten abzupipettieren, da Hämoglobin die freie NO Konzentration im Plasma herabsetzt.

2.2.2 Die NO-Elektrode von WPI

Die quantitative Bestimmung der NO Konzentration wurde mittels eines amperometrischen Systems, basierend auf einer NO-selektiven Mikroelektrode, durchgeführt (ISO-NO-Meter, WPI, World Precision Instruments, Sarasota). An dieser Elektrode werden die NO-Moleküle bei einer Arbeitsspannung von + 0.865 V oxidiert. Die Elektrode ist von der Probenlösung durch eine gasdurchlässige Polymermembran getrennt. Obwohl auch andere Gase wie N₂ und O₂ in den Elektrodenraum gelangen, ist das Signal proportional zur NO-Konzentration an der äußeren Oberfläche der Membran, weil bei der gegebenen Elektrodenspannung nur das NO oxidiert wird. So ist die Sonde hochsensitiv ausschließlich für NO über einen Meßbereich von 1 nM bis 20 µM.

Die hier benutzten Sonden mit Spitzendurchmessern 0,2 und 2,0 mm wurden jeweils mit einem Anzeigergerät verbunden. Auf einem mit dem System verbundenen PC wurden mit einer entsprechenden Software (Duo 18) die Daten kontinuierlich registriert und als Echtzeit Strom-/Zeitdiagramm auf dem Monitor dargestellt. Die Anzahl der Messpunkte pro Zeitintervall und die Spreizung der Zeitachse auf dem Monitor, sowie die Empfindlichkeit der Messung waren frei wählbar. Nach einigen Minuten stellte sich ein stabiler Wert ein, der als Nullwert eingestellt wurde. Nach einem Membranwechsel dauerte es ca. 12 Stunden bis die Sonde mit der neuen Membran stabil polarisiert ist. Daher wurde ein zusätzliches System bestehend aus einer Sonde und einem Polarisationsgerät benutzt, um immer ein funktionsfähige Sonde in Bereitschaft vorzuhalten.

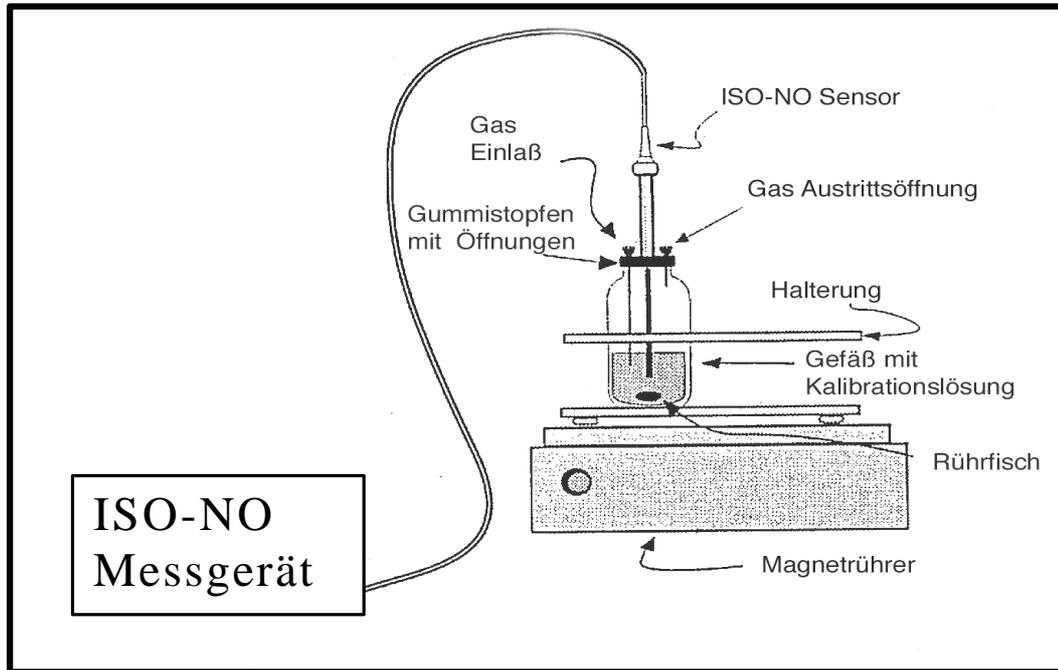


Abbildung 2 : Aufbau des Messgeräts zur Kalibrierung der Sonde

Die Eichlösung befindet sich in einem 10 ml Glasgefäß, das mit einem Septum verschlossen ist. Durch Kanülen im Septum wird kontinuierlich mit Reinst N_2 begast. Weiterhin wird durch das Septum die NO Elektrode eingetaucht. Die Lösung wird mit einem Magnetrührer kontinuierlich durchmischt. Zur Zusammensetzung der Eichlösung s. Text. (Abbildungen nach dem WPI-Manual)

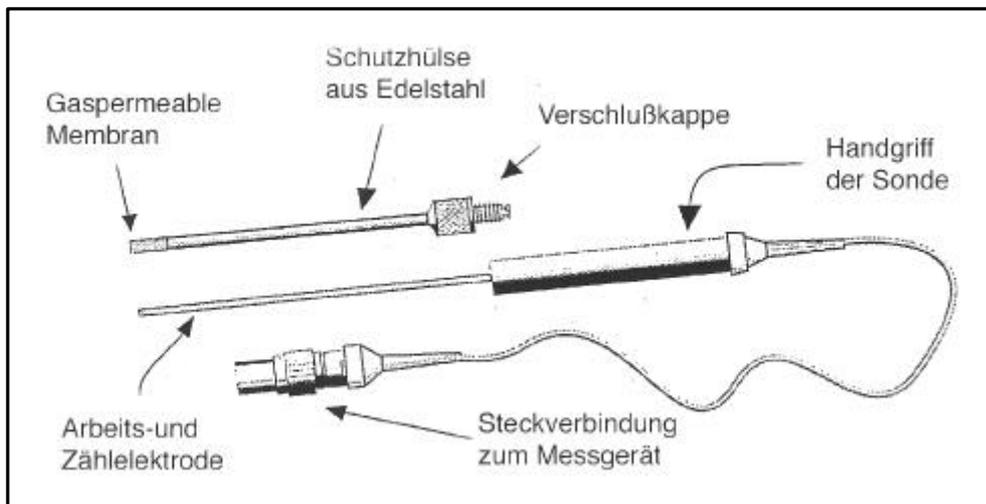


Abbildung 3: Aufbau der 2 mm ISO-NO Sonde

Die Sonde besteht aus einem Handgriff mit Verbindungskabel, an dessen Ende sich die eigentliche Sonde befindet, und einer auswechselbaren Stahlhülle, die am Ende mit der Polymermembran abschließt. Näheres s. Text. (Abbildungen nach dem WPI-Manual)

Die Elektrode ist eine Kombination aus Arbeitsanode und einer Referenzelektrode/ Gegenelektrode. Die 2 mm Sonde wird jeweils selbst zusammengebaut, indem die Elektrode in eine Stahlmuffe geschoben wird, an deren Ende sich die Membran befindet. Hier muß lediglich die Muffe mit der Membran ausgewechselt werden, wenn die Sonde keine verlässlichen Werte mißt.

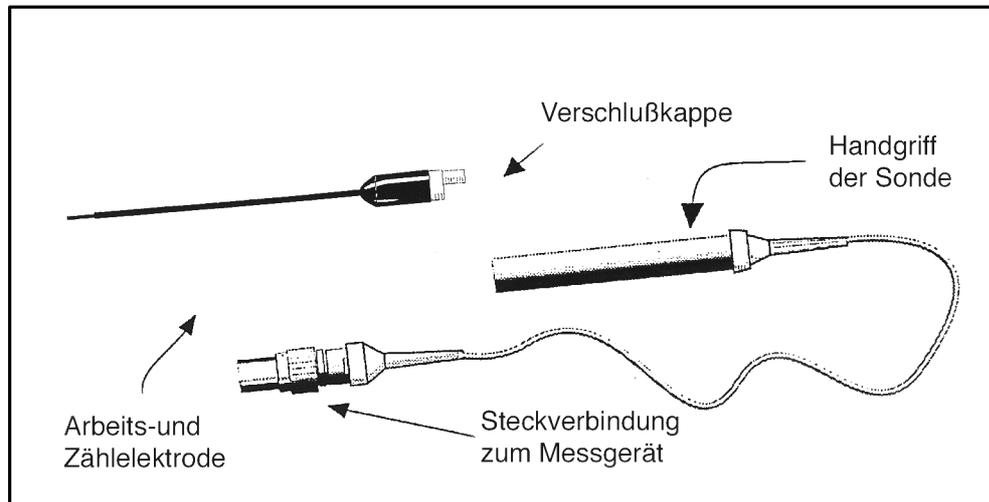


Abbildung 4: Aufbau der 0,2 mm Sonde

Die Sonde besteht aus einem Handgriff mit Verbindungskabel, an dessen Ende die eigentliche Sonde aufgesteckt wird, bei der 0,2 mm Sonde ist die Messeinheit in die Membran an der Sondenspitze integriert. Näheres s. Text. (Abbildungen nach dem WPI-Manual)

Bei der 0,2 mm Sonde sind Elektrode und Membran integriert. Hier muß das ganze System bei Bedarf gewechselt werden.

2.2.3 Eichung der Elektrode mittels KNO_2

Das verwendete Verfahren zur Eichung der Sonde basiert auf einer stöchiometrischen Bildung einer definierten Menge von NO aus Kaliumnitrit (KNO_2) in Gegenwart von Iodid und unter sauren Bedingungen, unter Ausschluß von O_2 (N_2 -Begasung).



Gleichung: Chemische Reaktion bei Eichung der Elektrode

Die Eichung der Sonde wurde nach Membranwechsel (2 mm Sonde) oder Sondenwechsel (0,2 mm Sonde) durchgeführt, um ihre Sensitivität zu überprüfen. Es ergab sich kein Anhalt für eine abnehmende Sensitivität der Sonde nach dem Wechsel. Allerdings nahm die Empfindlichkeit der Sonde nach mehrstündigem Einsatz in Plasma deutlich ab. Die generelle Funktionsfähigkeit der Sonde wurde zu Beginn durch eine Äquilibrierung in stark konzentrierter Kochsalzlösung geprüft. Stellte sich hier keine stabile Grundlinie ein, so war die Sonde oder die Sondenmembran auszutauschen.

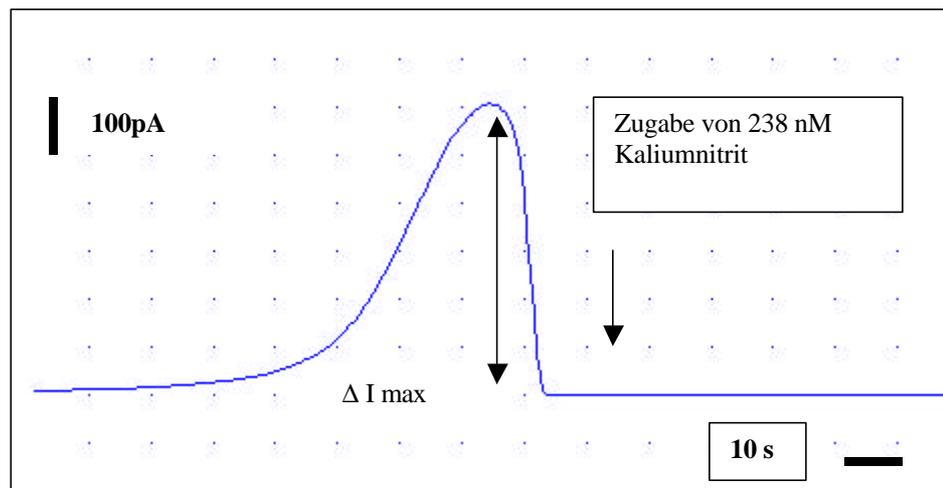


Abbildung 5: Originalregistrierung: Eichkurve einer 2 mm WPI Sonde bei der Eichung mit Kaliumnitrit.

Bei Zugabe von Kaliumnitrit lassen sich konzentrationsabhängige Stromamplituden messen. Stromstärkenzunahme nach oben und Zeitachse nach links. Die Sonde zeigte einen stabilen Ruhestrom. Nach Zugabe von 238 nM Kaliumnitrit erfolgte eine transiente Änderung des Sondenstroms mit ΔI_{\max} 600 pA.

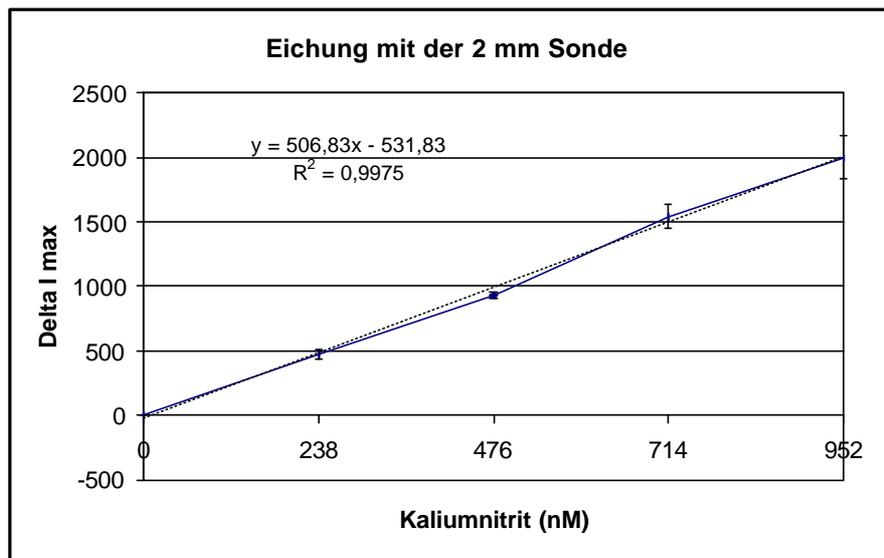


Abbildung 6: Korrelation von Sondenstrom und Kaliumnitritkonzentration mit der 2 mm Sonde

Bei Zugabe von Kaliumnitrit lassen sich konzentrationsabhängige Stromamplituden messen. Die Konzentration von Kaliumnitrit wird jeweils 238 nM angehoben. Auf die Zugabe erfolgt eine transiente Schwankung des Sondenstrom. Die Stromstärkenänderungen (ΔI_{\max}) werden gegen die Konzentration aufgetragen.

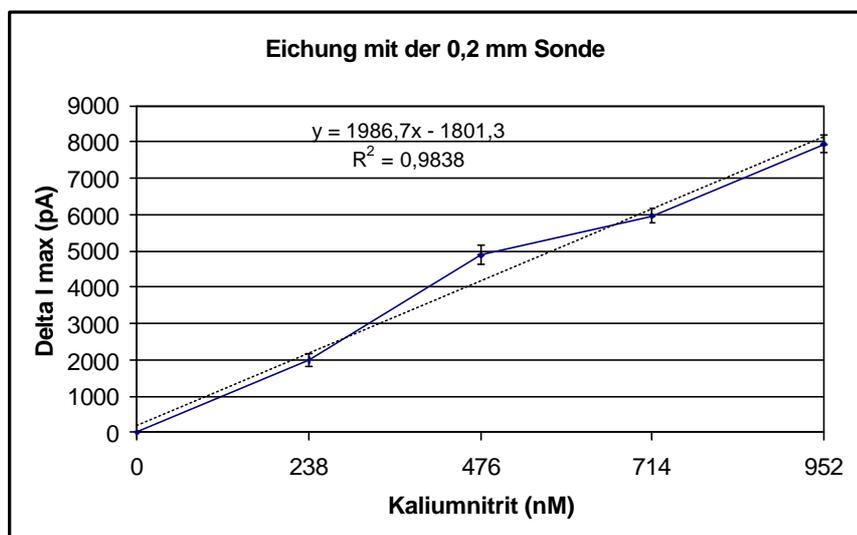


Abbildung 7: Korrelation von Sondenstrom und Kaliumnitritkonzentration mit der 0,2 mm Sonde

Bei Zugabe von Kaliumnitrit lassen sich konzentrationsabhängige Stromamplituden messen. Die Konzentration von Kaliumnitrit wird jeweils 238 nM angehoben. Auf die Zugabe erfolgt eine transiente Schwankung des Sondenstrom. Die Stromstärkenänderungen (ΔI_{\max}) werden gegen die Konzentration aufgetragen.

Die Elektrode wurde in einer Stickstoff-Atmosphäre unter Sauerstoff Ausschluß in einer 0,1 molaren Kaliumjodid-Phosphatpufferlösung (10 ml) äquilibriert, bis eine stabile Grundlinie entstanden war. Die Lösung wurde mit einem Magnetrührer beständig durchmischt. Durch die Zugabe von definierten Volumina (50, 100, 150, 200, 250 µl) einer 5×10^{-6} molaren KNO_2 -Lösung konnte so eine Eichkurve erstellt werden.

2.2.4 Benutzte Lösungen

Synthese von S-Nitrosothiolen

Die benötigten S-Nitroso-BSA-, S-Nitroso-Glutathion- und S-Nitroso-Cystein-Stammlösung als Eichlösungen wurden jeweils nach dem gleichen Verfahren hergestellt.

Dazu wurden 2 mM fettsäurefreies Rinder-Serumalbumin (BSA), oder 50 mM Cystein oder 50 mM Glutathion in 1 ml Wasser bei Raumtemperatur aufgelöst. War durch leichtes Schwenken die ganze Menge in Lösung gegangen, wurde die Lösung in ein breites Glasgefäß gegeben. Unter konstanter Kühlung auf Eis und beständigem Rühren, wurde die Lösung mit 1 M Salzsäure angesäuert (1 ml auf 2,5 ml entspricht etwa 0,4 M). Die Säure wurde vorsichtig und langsam eingebracht, damit kein Eiweiß denaturiert wurde. Wurde nun äquimolar das Nitrit (NaNO_2 , Sigma S-2252) in 0,5 ml Wasser aufgelöst hinzugegeben, so kam unter Ausbildung eines charakteristischen Geruchs die Reaktion in Gang. Nach 10 minütiger Inkubation war die Reaktion beendet. Die Lösung bekam einem leichten Rosastich. Der typische Geruch war bei dieser Konzentration nur ganz schwach zu bemerken. Die ermittelten Konzentrationen wurden mit dem Photometer anhand der folgenden Absorptionskoeffizienten bestimmt (Beispielextinktionskurve s. Kap. 3):

S-Nitroso BSA:	$\epsilon_{547} = 16,1 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$	(Meyer 1994)
Nitroso-Gluthation	$\epsilon_{547} = 16,1 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$	(Kowaluk 1990)
S-Nitroso-Cystein	$\epsilon_{547} = 16,7 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$	(Stamler 1993)

Es zeigte sich eine vollständige Umsetzung des Nitrits und des Proteins zu S-Nitrosothiol. Die photometrisch bestimmten Konzentrationen bewegten sich im Bereich von $470 \pm 50 \text{ µM}$ S-Nitrosothiol bei Konzentrationen der Ausgangsstoffe von 500 µM (n=6).

Die fertige Lösung wurde in flüssigem Stickstoff getropft und die gefrorenen Tropfen in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Für die Versuchsreihen, bei denen man durch Zugabe weniger Mikroliter (1-10) Konzentrationen von 30-300 nM herstellen wollte, mußte die Lösung dann jeweils entsprechend verdünnt werden.

Phosphatpuffer 0,025 M

Es wurden jeweils 1 M Lösungen von Di-Natriumhydrogenphosphat und Kaliumdihydrogenphosphat hergestellt, die dann zu einer Lösung vom pH-Wert 7,4 zusammen gegeben wurden. Die 1 M Stammlösung wurde bis auf die gewünschte Konzentration mit Aqua bidest. verdünnt.

L-Cysteinlösung

Die jeweils benötigte Menge L-Cysteinlösung (Sigma, MW: 176) wurde in Phosphatpuffer hergestellt. Dabei lag die maximale Löslichkeit von Cystein in der Pufferlösung bei einer Konzentration von ca. 3 M. Höherkonzentrierte Cysteinlösungen konnten unter Erwärmung nur kurzzeitig hergestellt werden, da sich bei Erkalten der Lösung Cysteinkristalle absetzten. Diese Lösung hatte einen pH-Wert von 1 und mußte mit Natronlauge neutralisiert werden, was die Konzentration durch den Verdünnungseffekt wiederum herabsetzte.

3. ERGEBNISSE

3.1 Detektion von S-Nitrosothiolen mit der 2 mm WPI-Sonde

Das Messverfahren zur Detektion von S-Nitrosothiolen sollte zunächst mit einer NO-Elektrode mit 2 mm Spitzendurchmesser und auswechselbarer Elektroden-Schutzmembran etabliert werden, da diese Elektrode von der Firma WPI als kostengünstige Standardelektrode angeboten wird. Es wurden die Einflüsse von pH-Wert, Ionenstärke, Cystein-Konzentration und humanem Blutplasma auf die Detektierbarkeit von niedermolekularem S-Nitroso-L-Cystein (Cys-SNO) und proteinständiger S-Nitroso-Gruppen in S-nitrosyliertem Rinderserumalbumin (S-Nitrosoalbumin) untersucht.

3.1.1 Zersetzung von S-Nitrosothiolen durch die Detektionslösung und Stabilität der Eichlösung

Zur Kontrolle der Stabilität der S-Nitrosothiol Standardlösungen bei mehrwöchiger Lagerung in flüssigem Stickstoff und der Effektivität der Umsetzung der S-Nitrosothiole durch die Detektionslösung wurden die tiefgefrorenen S-Nitrosoalbumin- und S-Nitroso-L-Cystein Stammlösungen bei Raumtemperatur aufgetaut und die Konzentration wie beschrieben (Kap. 2) spektralphotometrisch überprüft. Unmittelbar nach Präparation betrug die Extinktion der S-Nitrosoalbumin Lösung 0,008 bei Wellenlänge 547 nm. Die Extinktion der Lösungen betrug nach 2 monatiger Lagerung in flüssigem Stickstoff ebenfalls 0,008.

Die Konzentration der S-Nitrosothiole war durch Einfrieren, Lagerung für zwei Monate und Auftauen nicht signifikant verändert worden (S-Nitrosoalbumin: 98 ± 3 % der Ausgangslösung, 3 Messungen, S-Nitrosocystein: 96 ± 5 %, ebenfalls 3 Messungen).

Um die Wirksamkeit der Detektionslösung zur Zerstörung der S-Nitrosothiolgruppe zu überprüfen, wurde frisch angesetzte Detektionslösung (450 µl Cystein, 3 M und 50 µl Kupfersulfat, 100 mM) zu 1 ml konzentrierter Standardlösung gegeben und unmittelbar darauf das Absorptionsspektrum im UV/VIS-Bereich registriert. Es zeigte sich, daß die Detektionslösung sofort zum Verschwinden (Kurve 2) des für S-Nitrosoalbumin typischen Absorptionsmaximums bei 547 nm (Kurve 1) führt. Damit konnte unabhängig von der amperometrischen Detektion die Effektivität der Detektionslösung zur NO-Freisetzung aus S-Nitrosothiolen nachgewiesen werden.

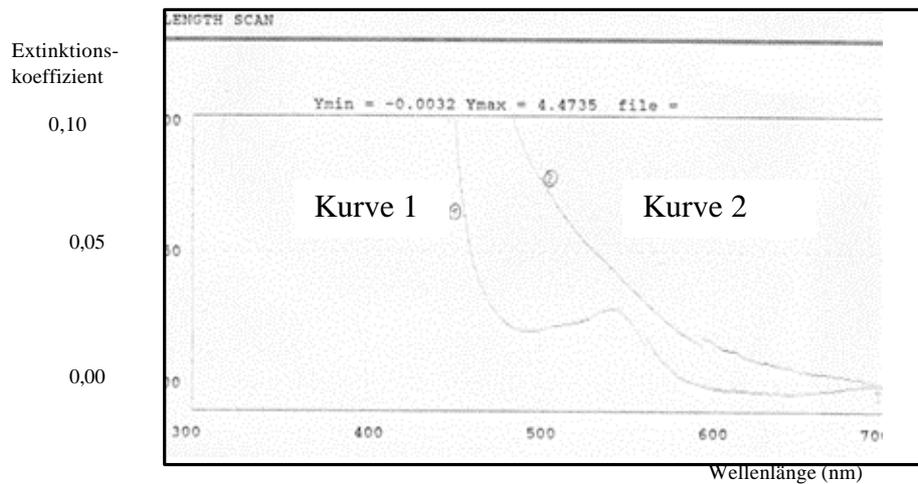


Abbildung 8: Originalregistrierung der Absorptionsspektren von S-Nitrosothiol-Eichlösung im Spektralphotometer

Im Spektralphotometer wird das Absorptionsspektrum der Eichlösung bestimmt. Es zeigt sich das typische Absorptionsmaximum bei 547 nm. Um die Aufspaltung der S-Nitrosothiolgruppe zu überprüfen, wurde frisch angesetzte Detektionslösung (450 μ l Cystein, 3 M und 50 μ l Kupfersulfat, 100 mM) zu 1 ml konzentrierter Standardlösung gegeben und unmittelbar darauf das Absorptionsspektrum im UV/VIS-Bereich registriert. Es zeigte sich, daß die Detektionslösung sofort zum Verschwinden des für S-Nitrosoalbumin typischen Absorptionsmaximums bei 547 nm führt.

Aus diesen Ergebnissen ist zu schließen, daß die Standardlösungen die ursprünglichen Konzentrationen S-Nitrosothiol enthielten und daß die chromophore S-Nitrosogruppe durch Zugabe von hochkonzentriertem L-Cystein und Kupfersulfat zerstört wurde.

3.1.2 Detektion von S-Nitrosothiolen in humanem Plasma, Einfluß der L-Cystein Konzentration in der Detektionslösung

Mit der nachfolgend beschriebenen Versuchsreihe sollte die optimale L-Cystein Konzentration zur Detektion von S-Nitrosothiolen in humanem Plasma ermittelt werden. Dazu wurde die NO-Elektrode in eine Probe humanem Plasma (Gewinnung Kap. 2) eingetaucht, die frisch angesetzte Detektionslösung (wässrige Lösung von L-Cystein und Kupfersulfat) zugemischt, und nach Stabilisierung des Sondenstroms S-Nitrosothiole in definierter Konzentration zugesetzt. Die Konzentration des L-Cysteins wurde variiert, die anderen Messparameter jedoch konstant gehalten.

Dazu wurde die Elektrodenspitze mit Hilfe einer Mikrometerschraube vorsichtig in eine mit Humanplasma und frisch angesetzter Detektionslösung gefüllte Vertiefung einer 96-fach Mikrotiterplatte gesenkt. Nach Stabilisierung der Stromanzeige (Grundlinie) nach ca. 1 Minute wurde eine wässrige Lösung von S-Nitrosocystein oder S-Nitrosoalbumin (30 µl, 1,2 bzw. 1,3 µM; pH 7,0) vorsichtig zupipettiert, wobei die Messlösung durch dreimaliges schnelles Füllen und Leeren der Pipettenspitze (30 µl) durchmischt wurde.

Cystein 7 M

Die Konzentration von Cystein in der Detektionslösung wurde mit 7 M angesetzt. Es wurden 50 µl Detektionslösung (45 µl 7 M Cysteinlösung, die mit 1 N NaOH auf pH 7,4 eingestellt wurde, mit 5 µl 90 mM Kupfersulfatlösung) und 250 µl Plasma eingesetzt. Die Plasmaprobe (200 µl) wurde in einer 96-fach Mikrotiterplatte vorgelegt und auf Raumtemperatur äquilibriert. Anschließend wurde die NO Elektrode etwa 1mm tief eingetaucht und die Stabilisierung des Sondenstroms abgewartet (ca 5 min).

Das Ansetzen der hochkonzentrierten L-Cysteinlösung bereitete Schwierigkeiten. Das Cystein löste sich nur sehr langsam unter Erwärmung vollständig auf. Bei Aufbewahrung im Kühlschrank kristallisierte das L-Cystein aus, so dass die Konzentration nicht mehr definiert war.

Durch Zugabe des Detektionsreagenz (50 μ l) wurde ein transienter Abfall der Grundlinie um etwa 1500 ± 100 pA beobachtet (Mittelwert aus 15 Versuchen, Beispielregistrierung s. Abbildung 9). Anschließend stieg der Sondenstrom innerhalb von 10 Sekunden auf etwa die Hälfte des Ausgangswertes an; erst in ca. 15 Minuten wurde die Ausgangsspannung in etwa wieder erreicht. Die Änderungen des Sondenstroms nach Zugabe der Detektionslösung waren so groß, daß auch nach Zugabe von 10 μ M S-Nitrosocystein zum Plasma kein spezifisches Messsignal beobachtet werden konnte. Mittels dieser Technik war die endogene S-Nitrosothiolkonzentration im Plasma nicht zu bestimmen, da das Sondensignal bei einer Plasmakonzentration von etwa 100 nM S-Nitrosothiol (s. Kap 1) in der Größenordnung von etwa 100 pA zu erwarten gewesen wäre.

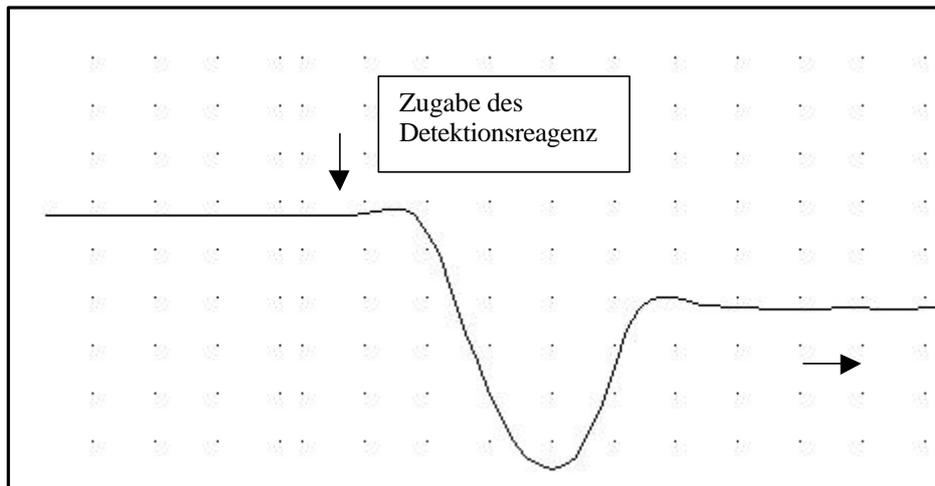


Abbildung 9: Originalregistrierung mit 2 mm WPI-Sonde in Plasma

Durch Zugabe von 50 μ l Detektionslösung (90 μ l 7 M Cysteinlösung, die mit 1n NaOH auf pH 7,4 eingestellt wurde, mit 10 μ l 90 mM Kupfersulfatlösung) zu 200 μ l unbehandeltem Plasma wurde ein transienten Abfall des Sondenstroms um ca. 1500 pA innerhalb einer Minute ausgelöst, der sich über einen Zeitraum von ca 15 Minuten etwa wieder auf den Ausgangswert einstellte. Abszisse: Stromstärke Punktabstand 250 pA, Ordinate: Zeit, Punktabstand 5 Sek.

Cystein 6 M

Die Konzentration von Cystein in der Detektionslösung wurde auf 6 M reduziert und der Versuchsansatz geringfügig modifiziert. Zur Herstellung der Detektionslösung wurden 90 μl 6 M Cysteinlösung, die mit 1 N NaOH auf pH 7,4 eingestellt wurde, mit 10 μl 90 mM Kupfersulfatlösung gemischt. Die Plasmaprobe (200 μl) wurde vorgelegt und auf Raumtemperatur äquilibriert. Anschließend wurde die NO Elektrode etwa 1 mm tief eingetaucht und die Stabilisierung des Sondenstroms abgewartet (ca. 5 min). Auf Zugabe der frisch angesetzten Detektionsreagenz (50 μl) wurde ein transienter Abfall der Grundlinie um etwa 1500 ± 100 pA beobachtet (Mittelwert aus 15 Versuchen). Anschließend stieg der Sondenstrom innerhalb von 10 Sekunden auf etwa die Hälfte des Ausgangswertes an; erst nach ca. 15 Minuten wurde die Ausgangsspannung in etwa wieder erreicht. Bei anschließender S-Nitrosothiolzugabe (1,3 μM S-Nitrosocystein, 1200 nM S-Nitrosoalbumin) konnte ein schneller, transienter Anstieg des Sondenstroms beobachtet werden. Das ΔI_{max} nahm bei 1,3 μM S-Nitrosocystein Werte um 24000 ± 2000 pA ab, die nach ca. 15 Sekunden auf den Ausgangswert zurückfielen. Nach Zugabe von S-Nitrosoalbumin (1200 nM) wurden schwache Signale registriert, die jedoch von der Lösungsmittelkontrolle (Zugabe von 50 μl Phosphatpuffer) nicht zu unterscheiden waren.

In einem abgewandelten Versuchsansatz wurde die Reihenfolge der Substanzzugabe geändert. Das Plasma (200 μl) wurde mit S-Nitrosothiol präpariert und anschließend die Detektionslösung zum Ansatz zugegeben. Zugabe von S-Nitrosothiol (S-Nitrosoalbumin 1200 nM) induzierte nur sehr schwache Änderungen des NO Elektrodenstroms (10-20 pA). Nach Zugabe von Detektionslösung (90 μl 6 M Cysteinlösung, die mit 1 N NaOH auf pH 7,4 eingestellt wurde, mit 10 μl 90 mM Kupfersulfatlösung) war lediglich das oben beschriebene Artefakt auf Zugabe der Detektionsreagenz zu beobachten, welches sich nicht von dem im nicht mit S-Nitrosothiol dotierten Plasma unterschieden ließ (Daten nicht gezeigt).

Die Versuche wurden mit verschiedenen Sonden abwechselnd durchgeführt, um die Reproduzierbarkeit zu überprüfen. Die drei benutzten Membranen zeigten hinsichtlich Größe des Mischartefakts, Signalgröße und Zeitverlauf des Messsignals nach S-Nitrosothiol-Zugabe identische Ergebnisse. Gleichartige Artefakte zeigten sich bei der Zugabe von L-Cystein zum Plasma, unabhängig von der Anwesenheit von S-Nitrosothiolen.

Cystein 3 M

Die Konzentration von Cystein in der Detektionslösung wurde daher auf 3 M verringert und der gleiche Versuchsansatz wie mit 6 M Cystein durchgeführt. Zur Herstellung der Detektionslösung wurden 90 μ l 3 M Cysteinlösung, die mit 1 N NaOH auf pH 7,4 eingestellt wurde, mit 10 μ l 90 mM Kupfersulfatlösung gemischt. Die Plasmaprobe (200 μ l) wurde vorgelegt und auf Raumtemperatur äquilibriert. Anschließend wurde die NO Elektrode etwa 1 mm tief eingetaucht und die Stabilisierung des Sondenstroms abgewartet (ca. 5 min). Die Zugabe der Detektionslösung mit der 3 M Cysteinlösung zum Plasma ergab einen Anstieg des Sondenstroms um ca. 120 ± 40 pA. Bei anschließender S-Nitrosothiolzugabe (1,3 μ M S-Nitrosocystein, 1,2 μ M S-Nitrosoalbumin) konnte ein schneller, transienter Anstieg des Sondenstroms in gleicher Größenordnung wie bei 6 M Cystein beobachtet werden (s. Abb 10). Das ΔI_{\max} stieg mit der Konzentration des S-Nitrosocysteins an, bei 1,3 μ M wurden ebenfalls Werte um 24000 ± 2000 pA ($n = 4$) gemessen, die jedoch erst nach ca. 5 Minuten auf den Ausgangswert zurückfielen (Registrierung nicht gezeigt). Nach Zugabe von S-Nitrosoalbumin (1200 nM) wurden schwache Signale beobachtet, die jedoch ebenfalls, wie bei 1 M Cystein, von der Lösungsmittelkontrolle nicht zu unterscheiden waren.

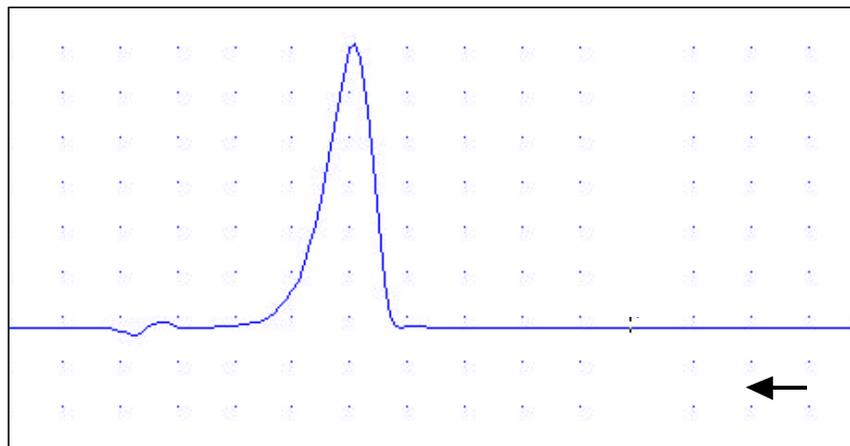


Abbildung 10: Originalregistrierung einer amperometrischen Detektion von S-Nitroso-Cystein in Plasma.

Auf die Zugabe von S-Nitroso-Cystein (1,2 μ M) in den Messansatz (200 μ l Plasma, 90 μ l 3 M Cysteinlösung, die mit 1 N NaOH auf pH 7,4 eingestellt wurde, 10 μ l 90 mM Kupfersulfatlösung) wurde eine transiente Zunahme des Sondenstroms beobachtet, der wenige Sekunden nach der Zugabe begann, nach etwa 20 Sekunden ein Maximum von 24000 ± 2000 pA erreichte (ΔI_{\max}), um nach etwa 15 Sekunden in den Bereich des Ausgangswertes abzusinken. 2 mm WPI Sonde, Raumtemperatur, statische Lösung. Abszisse: Stromstärke Punktabstand 4000 pA, Ordinate: Zeit, Punktabstand 10 Sek.

In einem abgewandelten Versuchsanstz wurde die Reihenfolge der Substanzzugabe geändert. Das Plasma (200 μ l) wurde mit S-Nitrosothiol präpariert und anschließend die Detektionslösung zum Ansatz zugegeben. Zugabe von S-Nitrosothiol (S-Nitrosoalbumin 1200 nM) induzierte nur sehr schwache Änderungen des NO Elektrodenstroms (10-20 pA) Nach Zugabe von Detektionslösung (90 μ l 3 M Cysteinlösung, die mit 1 N NaOH auf pH 7,4 eingestellt wurde, mit 10 μ l 90 mM Kupfersulfatlösung) wurden nur schwache ΔI_{\max} beobachtet, die sich nicht von den Stromänderungen des nicht mit S-Nitrosothiol dotierten Plasmas unterschieden (Daten nicht gezeigt).

Cystein 1 M

Zur Herstellung der Detektionslösung wurden 90 μ l 1 M Cysteinlösung, die mit 1 N NaOH auf pH 7,4 eingestellt wurde, mit 10 μ l 90 mM Kupfersulfatlösung gemischt. Die Plasmaprobe (200 μ l) wurde vorgelegt und auf Raumtemperatur äquilibriert. Anschließend wurde die NO Elektrode etwa 1 mm tief eingetaucht und die Stabilisierung des Sondenstroms abgewartet (ca 5 min). Auf Zugabe der frisch angesetzten Detektionslösung wurde eine schwache Zunahme des Sondenstroms um ca 50 pA beobachtet, der nach ca. 10 Minuten auf den Ausgangswert abfiel. Bei anschließender Zugabe von niedermolekularem S-Nitrosothiol (S-Nitrosocystein) konnte ein schneller, transienter Anstieg des Sondenstroms registriert werden. ΔI_{\max} stieg mit der Konzentration des S-Nitrosocysteins an, bei 1,3 μ M wurden Signale bis 25000 pA registriert.

Bei Zugabe von S-Nitrosoalbumin (1-10 μ l; entsprechende 1-10 μ M in der Messlösung) wurden nur sehr geringe transiente Zunahmen des Sondenstroms beobachtet ($\Delta I_{\max} = 30 - 180$ pA). Zudem war die Streuung der ΔI_{\max} -Werte so groß, daß keine Konzentrationsabhängigkeit festgestellt werden konnte (Daten nicht gezeigt).

Dieser Befund zeigte, daß die Detektionslösung, 1 M Cystein und 3 mM CuSO₄, eine quantitative Messung von niedermolekularen S-Nitrosothiolen in einer Matrix aus humanem Plasma ermöglicht. Jedoch war es nicht möglich, unter gleichen Bedingungen eine NO-Freisetzung aus S-Nitrosoalbumin in Konzentrationen bis 10 μ M nachzuweisen. Offenbar erfolgte keine ausreichende Transnitrosylierung vom proteingebundenen S-Nitrosothiol zum freien L-Cystein.

In einem abgewandelten Versuchsanstz wurde die Reihenfolge der Substanzzugabe geändert. Nun wurde das Plasma (200 μ l) mit S-Nitrosothiol präpariert und anschließend die Detektionslösung zum Ansatz zugegeben. Zugabe von S-Nitrosothiol (S-Nitrosoalbumin 1200 nM) induzierte nur sehr schwache Änderungen des NO Elektrodenstroms (10-20 pA). Nach Zugabe von Detektionslösung (90 μ l 1 M Cysteinlösung, die mit 1 N NaOH auf pH 7,4 eingestellt wurde, mit 10 μ l 90 mM Kupfersulfatlösung) wurden nur schwache ΔI_{\max} beobachtet, die sich nicht von den Stromänderungen des nicht mit S-Nitrosothiol dotierten Plasmas unterschieden (Daten nicht gezeigt).

3.1.3 Detektion von S-Nitrosothiolen im Phosphatpuffer

Um Matrixeinflüsse durch Serumbestandteile auszuschließen wurde zunächst die Detektierbarkeit von S-Nitrosothiolen in einer Phosphat-gepufferten wässrigen Lösung (Zusammensetzung s. Kap.2) bei Raumtemperatur untersucht. Dazu wurden die Elektrodenspitze mit Hilfe einer Mikrometerschraube vorsichtig in eine mit 200 μ l Phosphatpuffer und 100 μ l frisch angesetzter Detektionslösung (90 μ l Cystein, 2 M, pH 7,0; 10 μ l Kupfer(II)sulfat, 3 mM) gefüllte Vertiefung einer 96-fach Mikrotiterplatte gesenkt. Nach Stabilisierung der Stromanzeige (Grundlinie) nach ca. 1 Minute wurde eine wässrige Lösung von S-Nitrosocystein oder S-Nitrosoalbumin (1-10 μ l, 0,7-7 μ M; pH 7,0) vorsichtig zupipettiert, wobei die Messlösung durch dreimaliges schnelles Füllen und Leeren der Pipettenspitze durchmischt wurde. Repräsentative Originalregistrierungen sind in der Abbildung 11 bzw. 13, die summerische Auswertung mehrerer Registrierungen in Abb. 12 bzw. 14 dargestellt.

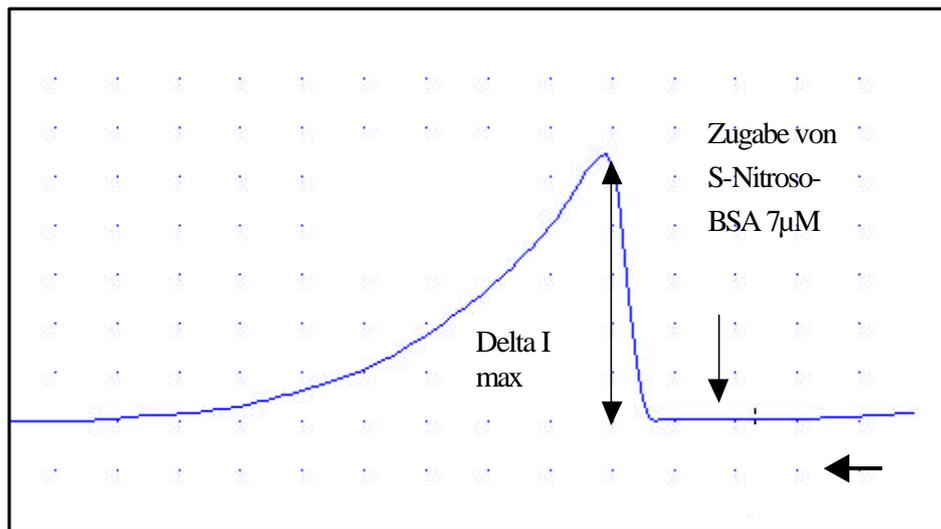


Abbildung 11: : Originalregistrierung einer amperometrischen Detektion von S-Nitroso-BSA in Phosphatpufferlösung.

Auf die Zugabe von S-Nitroso-BSA ($7\mu\text{M}$) in den Messansatz mit Cystein und Kupfer ($90\ \mu\text{l}$ Cystein, $2\ \text{M}$, $\text{pH}\ 7,0$; $10\ \mu\text{l}$ Kupfer(II)sulfat, $3\ \text{mM}$) wurde eine transiente Zunahme des Sondenstroms beobachtet, die wenige Sekunden nach der Zugabe begann, nach etwa 15 Sekunden ein Maximum (ΔI_{max} . $600\ \text{pA}$), erreichte, um nach etwa 70 Sekunden in den Bereich des Ausgangswertes abzusinken. 2mm WPI Sonde, Raumtemperatur, Phosphatpuffer $\text{pH}\ 7,4$, statische Lösung. Abszisse: Stromstärke Punktabstand $150\ \text{pA}$, Ordinate: Zeit, Punktabstand $10\ \text{Sek}$.

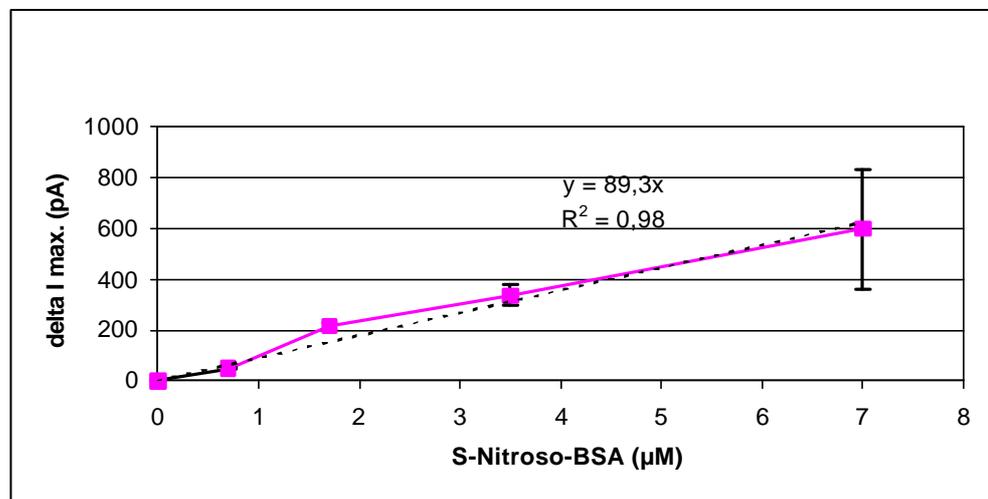


Abbildung 12: Korrelation zwischen S-Nitroso-BSA-Konzentration und Sondenstrom (ΔI_{max} .)

Detektion von S-Nitroso-BSA in Phosphatpuffer. Die maximale Stromstärkenzunahme (ΔI_{max}) nach Zugabe verschiedener Konzentrationen von S.-Nitroso-BSA wurden gemittelt und Funktion der jeweiligen Konzentration dargestellt. Symbole repräsentieren Mittelwert \pm Standardabweichung, $n=4$.

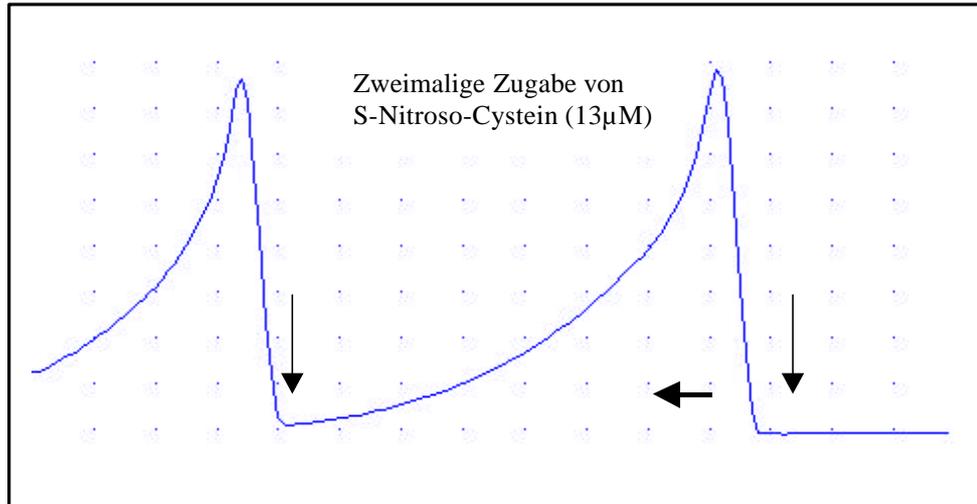


Abbildung 13: Originalregistrierung einer amperometrischen Detektion von S-Nitroso-Cystein.

Auf die Zugabe von S-Nitroso-Cystein (13 μM) in den Messansatz mit Cystein und Kupfer (90 μl Cystein, 2 M, pH 7,0; 10 μl Kupfer(II)sulfat, 3 mM) wurde eine transiente Zunahme des Sondenstroms beobachtet, der wenige Sekunden nach der Zugabe begann, nach etwa 5 Sekunden ein Maximum erreichte (ΔI_{\max} : 1100 pA), um nach etwa 70 Sekunden in den Bereich des Ausgangswertes abzusinken. 2 mm WPI Sonde, Raumtemperatur, Phosphatpuffer pH 7,4, statische Lösung. Abszisse: Stromstärke Punktabstand 250 pA, Ordinate: Zeit, Punktabstand 10 Sek.

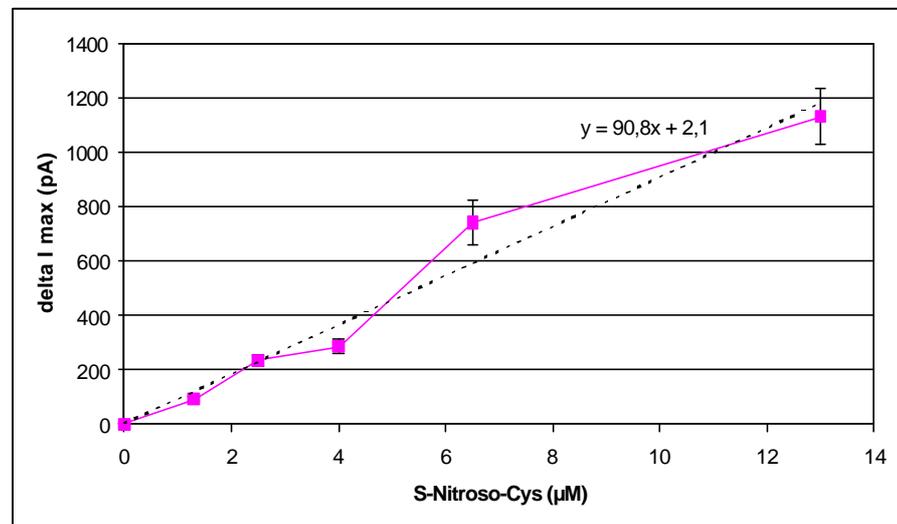


Abbildung 14: Korrelation zwischen S-Nitroso-Cystein-Konzentration und Sondenstrom (ΔI_{\max}).

Die Stromamplituden bei verschiedenen Konzentrationen werden gemittelt und als Funktion der jeweiligen Konzentration dargestellt. Angegeben: Mittelwert, Standardabweichung, Funktion der Ausgleichsgeraden. n=4.

Die Zugabe von S-Nitrosothiolen induzierte einen konzentrationsabhängigen transienten Anstieg des Elektrodenstroms, wobei zwischen dem S-Nitroso-L-Cystein und dem S-Nitrosoalbumin unterschiedliche Kinetiken beobachtet wurden. Die Stromstärke erreichte beim S-Nitrosocystein ca. 5 Sekunden nach Zugabe des S-Nitrosothiols ein transientes Maximum, beim S-Nitrosoalbumin deutlich langsamer erst nach ca. 15 Sekunden (s. Abb.11 und 13). Die Anstiegs- und Abnahmegeschwindigkeit der Signale war weitgehend unabhängig von der Konzentration der S-Nitrosothiolen. Bei Auftragen der jeweiligen Maximalwerte ΔI_{\max} gegen die Konzentration des S-Nitrosothiols ergab sich im untersuchten Konzentrationsbereich für S-Nitrosoalbumin und Cys-NO eine annähernd lineare Abhängigkeit (Abb. 12 und 14). Ohne Zusatz der kompletten Detektionslösung (L-Cystein und Kupfer(II)sulfat) wurden nach Zugabe von S-Nitrosocystein (13 μM) und S-Nitrosoalbumin (7 μM) nicht die zuvor beschriebenen Änderungen des Elektrodenstroms beobachtet, sondern lediglich Stromstärkenschwankungen im Bereich der Mischartefakte ($\pm 50 \text{ pA}$).

3.1.3.1 Einfluss von CuSO_4

Um zu überprüfen, ob Kupferionen für den Nachweis von S-Nitrosothiolen mit der NO Elektrode notwendig sind, wurden Versuche mit kupferfreier Detektionslösung durchgeführt. Als Detektionslösung wurden 100 μl 3 M Cysteinlösung, die mit 1 N NaOH auf pH 7,4 eingestellt wurde, ohne Kupfersulfat benutzt. Der Phosphatpuffer (200 μl) wurde vorgelegt und auf Raumtemperatur äquilibriert. Anschließend wurde die NO Elektrode etwa 1 mm tief eingetaucht und die Stabilisierung des Sondenstroms abgewartet (ca 5 min). Auf Zugabe der frisch angesetzten Detektionslösung wurde eine schwache Zunahme des Sondenstroms um ca 50 pA beobachtet, der nach ca 10 Minuten auf den Ausgangswert abfiel. Es zeigten sich auf Zugabe S-Nitrosoalbumin (1,2 μM , 30 μl) und S-Nitrosocystein (1,3 μM , 30 μl) die gleichen unspezifischen Stromstärkenänderungen, die sich nicht von den durch Lösungsmittelzugabe (30 μl) alleine ausgelösten unterschieden (ΔI_{\max} von 10-15 pA). Es zeigte sich kein Unterschied mehr in der Detektierbarkeit von S-Nitrosocystein und S-Nitrosoalbumin.

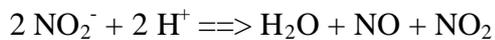
Ohne Kupfersulfat ließen sich keine reproduzierbaren Ergebnisse mit niedermolekularem S-Nitrosocystein und makromolekularem S-Nitrosoalbumin bei Konzentrationen von 1 μM erhalten. Die Kupferionen waren für die Dekomposition des S-Nitrosothiols unabdingbar.

3.1.3.2 Einflüsse durch Art der Herstellung der Detektionslösung

Beim Ansetzen der Detektionslösung mit einer 3 M Cysteinlösung und der 100 mM Kupfersulfat-Stammlösung reagierten beide Komponenten. Nach etwa 15 Minuten kam es zu einer Präzipitatbildung. Um zusätzliche Artefakte durch Konzentrationsveränderungen infolge der Präzipitation auszuschließen, wurde die L-Cystein- und die Kupfersulfat-Lösung bei allen beschriebenen Versuchen erst kurz vor Zugabe zur Messlösung gemischt.

3.1.3.3 Spezifität des Messverfahrens für S-Nitrosothiole bei saurem pH-Wert, Einfluß des pH-Werts der Detektionslösung

In den nachfolgenden Untersuchungen sollte die Spezifität der amperometrischen NO Detektion für S-Nitrosothiole unter verschiedenen Messbedingungen überprüft werden. Als wichtigster Störfaktor, der eine erhöhte S-Nitrosothiolkonzentration vortäuschen könnte, mußte das Nitrit berücksichtigt werden, das einerseits etwa 1-2 % des NO-Gehalts der S-Nitrosothiol-Stadardlösungen ausmachte, andererseits z.B. im Plasma in Konzentrationen von 200 nM vorliegt (Kelm et al. 1999). Nitrit wird besonders in saurer Lösung zu NO umgesetzt:



Daher wurden die S-Nitrosothiolbestimmungen soweit möglich unter neutralen Bedingungen (pH 7,4) durchgeführt. Bei der Neutralisation der 7 M L-Cystein-Lösung konnte wegen der Überschreitung der Löslichkeit des Cysteins die Konzentration nicht gehalten werden.

Es wurde untersucht, in welchem Konzentrationsbereich Nitrit unter sauren Bedingungen (pH 2) ein Messsignal generiert. Der oben (Kap 3.1.2) benutzte Versuchsansatz mit 200 µl Probenlösung (Plasma oder Phosphatpuffer) und 100 µl Detektionslösung wurde hierfür modifiziert. Zu 200 µl Phosphatpuffer (250 mM) wurden 100 µl HCl (1 M) zugesetzt, um den pH auf 2 einzustellen. Nach Eintauchen der Sonde in die Probenlösung stellte sich nach etwa einer Minute ein stabiler Sondenstrom ein. Auf Zugabe von Nitrit (0,5-4 µM, 1 µl) wurden, schnell ansteigende, transiente Stromstärkenänderungen gemessen (Abb. 15), die mit einer Halbwertszeit von 60 s auf das Ausgangsniveau abfielen. Auf Zugabe von 4 µM Nitrit konnten

Stromstärkenänderungen mit ΔI_{\max} von 200 ± 10 pA gemessen werden. Die ΔI_{\max} - Werte zeigten eine Konzentrationsabhängigkeit (Abb. 16).

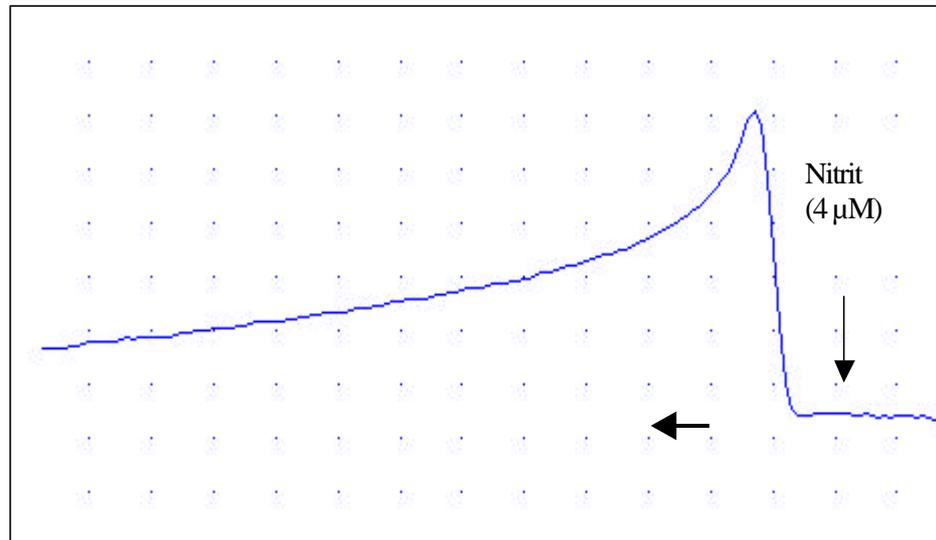


Abbildung 15: Originalregistrierung einer amperometrischen Detektion von Nitrit.

Auf die Zugabe von Nitrit ($4 \mu\text{M}$) in den Messansatz Phosphatpuffer ($200 \mu\text{l}$) mit Kupfer 100 mM ($5 \mu\text{l}$) und Cystein ($95 \mu\text{l}$, pH 2,0) wird eine transiente Zunahme des Sondenstroms beobachtet, der wenige Sekunden nach der Zugabe begann, nach etwa 8 Sekunden ein Maximum erreichte, um nach etwa 90 Sekunden in den Bereich des Ausgangswertes abzusinken. 2 mm WPI Sonde, Raumtemperatur, Phosphatpuffer pH 2,0, statische Lösung, Abszisse: Stromstärke Punktabstand 50 pA, Ordinate: Zeit, Punktabstand 10 Sek.

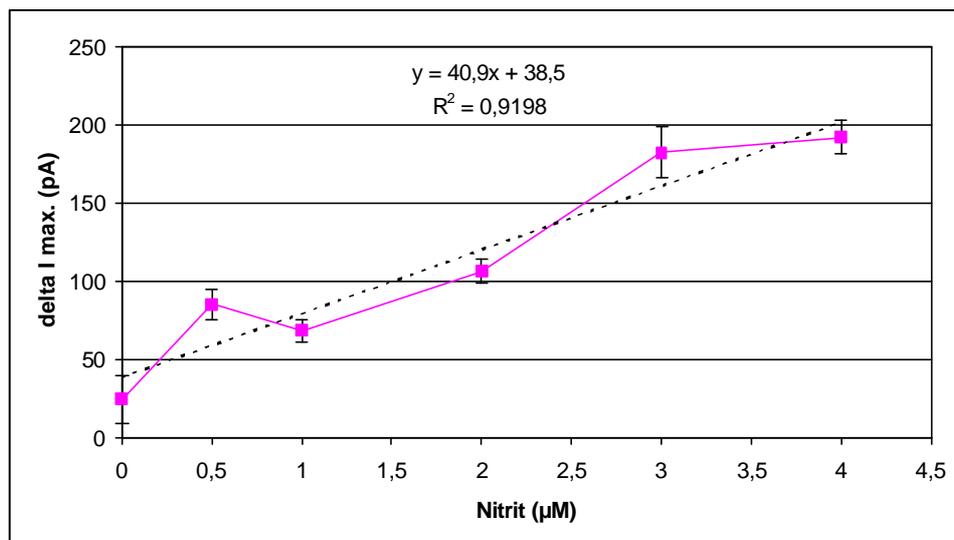


Abbildung 16: Korrelation zwischen Nitrit-Konzentration und Sondenstrom (ΔI_{\max})

Die ΔI_{\max} -Werte w bei verschiedenen Konzentrationen wurden gemittelt und als Funktion der Nitritkonzentration dargestellt. Der Wert von 40 ± 15 pA bei einer Nitritkonzentration von $0 \mu\text{M}$ ist durch den Mischartefakt bei Lösungsmittelzugabe bedingt. Symbole repräsentieren Mittelwert \pm Standardabweichung, $n = 4$.

Der Mischartefakt (y Achsenabschnitt bei $0 \mu\text{M}$ Nitrit) entsprach etwa dem durch $1 \mu\text{M}$ Nitrit ausgelösten ΔI_{\max} (40 ± 15 pA). Die Sensitivität der 2 mm Sonde zur Detektion von Nitrit unter sauren Bedingungen ist etwa halb so groß wie die Sensitivität zur Detektion von S-Nitrosothiolen unter neutralen, aber sonst identischen Bedingungen.

In einem weiteren Versuchsansatz wurde untersucht, mit welcher Empfindlichkeit Nitrit in angesäuertem Plasma detektiert wird. Dazu wurde eine Plasmaprobe ($200 \mu\text{l}$) mit $100 \mu\text{l}$ HCl, 1 N angesäuert. Nach Eintauchen der Sonde stellte sich nach ca 3 Minuten ein stabiler Sondenstrom ein. Zugabe von Nitrit ($1 - 4 \mu\text{M}$, $1 - 4 \mu\text{l}$) wurde eine transiente Zunahme des Sondenstroms beobachtet, der den gleichen Zeitgang wie in Phosphatpuffer aufwies.

Damit konnte gezeigt werden, daß Nitrit unter sauren Bedingungen auch im Plasma detektiert wird und bei der amperometrischen Detektion ein erhöhte S-Nitrosothiolkonzentration vortäuschen kann. Es ist daher für die spezifische Detektion von S-Nitrosothiolen unabdingbar, die Messungen unter neutralen pH Bedingungen durchzuführen.

3.2 Detektion von S-Nitrosothiolen mit der 0,2 mm WPI-Sonde

Da die Sensitivität der 2 mm WPI-Sonde zur Detektion von S-Nitrosothiolen nicht ausreichte, um die im Plasma zu erwartenden Konzentrationen von S-Nitrosoprotein nachzuweisen (< 100 nM), wurde untersucht, ob mit einer kleineren Sonde (0,2 mm) eine höhere Empfindlichkeit zu erzielen ist.

Laut Hersteller detektiert die 0,2 mm Sonde NO viermal so sensitiv wie die 2 mm Sonde (www.wpiinc.com).

3.2.1 Detektion von S-Nitrosothiolen mit der 0,2 mm Sonde in wässriger Pufferlösung

3.2.1.1 S-Nitrosocystein

In dieser Versuchsreihe wurde die NO-Elektrode in Phosphatpuffer (200 μ l, pH 7,4) eingetaucht und bei Raumtemperatur äquilibriert. Anschließend wurde die NO Elektrode etwa 1 mm tief eingetaucht und die Stabilisierung des Sondenstroms abgewartet (ca 5 min).

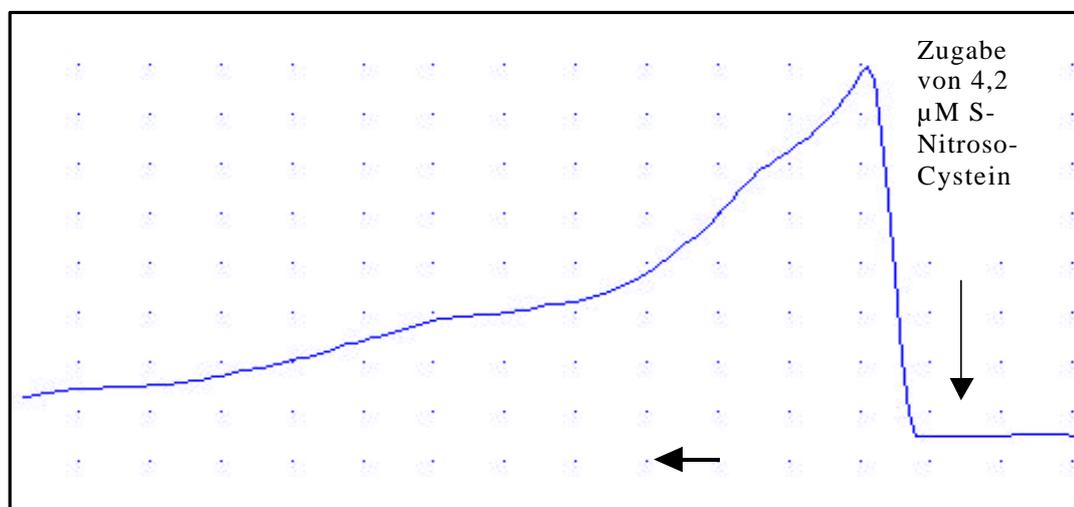


Abbildung 17: Originalregistrierung einer amperometrischen Detektion von S-Nitroso-Cystein.

Auf die Zugabe von S-Nitroso-Cystein (4,2 μ M) in den Messansatz mit Kupfer und Cystein wird eine transiente Zunahme des Sondenstroms beobachtet, der wenige Sekunden nach der Zugabe begann, nach etwa 10 Sekunden ein Maximum erreichte, um nach etwa 120 Sekunden in den Bereich des Ausgangswertes abzusinken. 0,2mm WPI Sonde, Raumtemperatur, Phosphatpuffer pH 7,4, statische Lösung. Abszisse: Stromstärke Punktabstand 1500 pA, Ordinate: Zeit, Punktabstand 10 Sek.

Auf Zugabe der frisch angesetzten Detektionslösung (100 μl , davon 90 μl 2 M Cysteinlösung, die mit 1 N NaOH auf pH 7,4 eingestellt wurde und 10 μl 90 mM Kupfersulfatlösung) wurde ein starker Negativausschlag der Sonde beobachtet, der nach ca 3 Minuten bei ΔI_{max} von ca -20000 pA sein Maximum erreichte und nach ca 15 Minuten auf den Ausgangswert zurückkehrte. Bei anschließender Zugabe von niedermolekularem S-Nitrosothiol (S-Nitrosocystein) konnte ein schneller, transients Anstieg des Sondenstroms registriert werden (Abb 17). ΔI_{max} stieg mit der Konzentration des S-Nitrosocysteins an, bei 7 μM wurden Signale bis 10000 pA registriert. Dies ist etwa eine Zehnerpotenz größer, als mit der 2 mm Sonde. Der Artefakt nach Zugaben von 30 μl Wasser zur Meßlösung betrug ca. 80 pA (Abb. 19). Die ΔI_{max} Werte nahmen mit steigender S-Nitrosothiol Konzentration zu. Die Empfindlichkeit zum Nachweis des S-Nitrosocysteins betrug ca. 2 pA/nM. Die 0,2 mm Sonde detektierte daher das S-Nitrosocystein mit ca. 22,6 mal höherer Sensitivität als die 2 mm Sonde (Abb. 18).

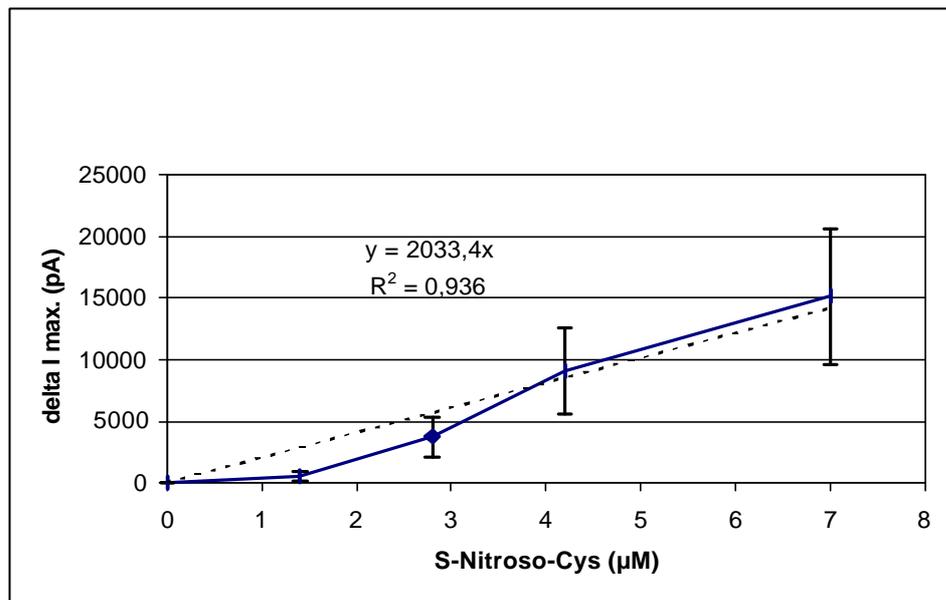


Abbildung 18: Korrelation zwischen S-Nitroso-Cystein-Konzentration und Sondenstrom (ΔI_{max})

Amperometrische Detektion von S-Nitrosocystein in Phosphatpuffer mit der 0,2 mm WPI-Sonde. Die ΔI_{max} Werte bei verschiedenen Konzentrationen wurden gemittelt und als Funktion der S-Nitrosocystein-Konzentration dargestellt. Symbole repräsentieren Mittelwert, \pm Standardabweichung. n=4.

3.2.1.2 S-Nitrosoalbumin

Analog zu den Versuchen mit S-Nitrosocystein wurde in dieser Versuchsreihe die NO-Elektrode in Phosphatpuffer (200 μ l, pH 7,4) eingetaucht und bei Raumtemperatur äquilibriert. Anschließend wurde die NO Elektrode etwa 1 mm tief eingetaucht und die Stabilisierung des Sondenstroms abgewartet (ca 5 min). Auf Zugabe der frisch angesetzten Detektionslösung (100 μ l, davon 90 μ l 2 M Cysteinlösung, die mit 1 N NaOH auf pH 7,4 eingestellt wurde und 10 μ l 90 mM Kupfersulfatlösung) wurde der selbe Negativauschlag der Sonde wie in den Vorversuchen mit S-Nitrosocystein beobachtet, der nach ca 3 Minuten bei ΔI_{\max} von ca -20000 pA sein Maximum erreichte und nach ca 15 Minuten auf den Ausgangswert zurückkehrte. Bei anschließender Zugabe von höhermolekularem S-Nitrosothiol (S-Nitrosoalbumin) konnte ein schneller, transienter Anstieg des Sondenstroms registriert werden, der etwa 4 Sekunden nach der Zugabe begann und nach weiteren 10 Sekunden einen Maximalwert erreichte. Nach ca 40 Sekunden ging die Stromstärke wieder auf den Ausgangswert zurück (Abb 19). ΔI_{\max} stieg mit der Konzentration des S-Nitrosothiols an, bei 1,2 μ M wurden Signale bis 1500 pA registriert. Der Artefakt nach Zugaben von 30 μ l Wasser zur Meßlösung betrug ca. 80 pA (Abb. 20).

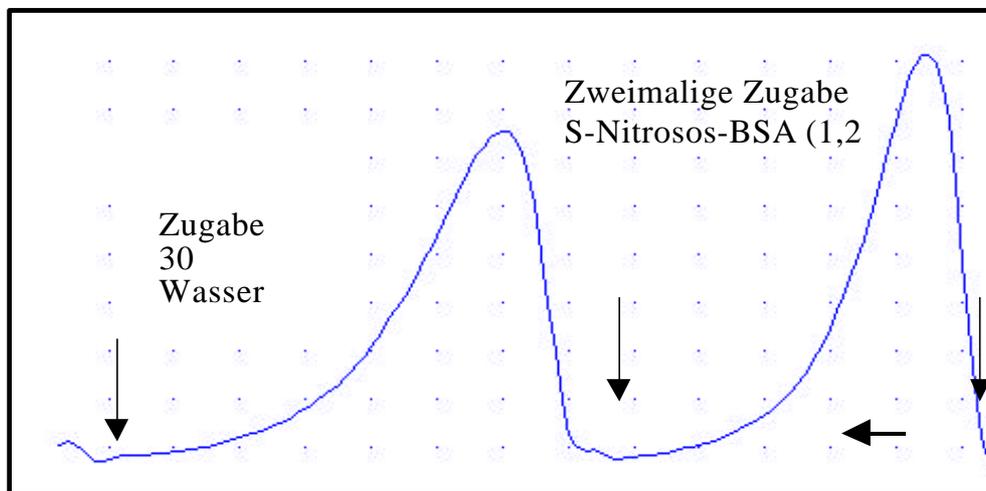


Abbildung 19: Originalregistrierung einer amperometrischen Detektion von S-Nitroso-BSA.

Auf die Zugabe von S-Nitroso-BSA (1,2 μ M) in den Messansatz mit Kupfer und Cystein wird eine transiente Zunahme des Sondenstroms beobachtet, der wenige Sekunden nach der Zugabe begann, nach etwa 10 Sekunden ein Maximum erreichte, um nach etwa 60 Sekunden in den Bereich des Ausgangswertes abzusinken. 0,2mm WPI Sonde, Raumtemperatur, Phosphatpuffer pH 7,4, statische Lösung. Abszisse: Stromstärke Punktabstand 250 pA, Ordinate: Zeit, Punktabstand 10 Sek.

Die ΔI_{\max} Werte nahmen mit steigender S-Nitrosothiol Konzentration zu. Die Empfindlichkeit zum Nachweis des S-Nitrosoalbumins betrug ca. 1 pA/nM. Die 0,2 mm Sonde detektierte daher das S-Nitrosoalbumin mit ca. 11 mal höherer Sensitivität als die 2 mm Sonde (Abb. 20).

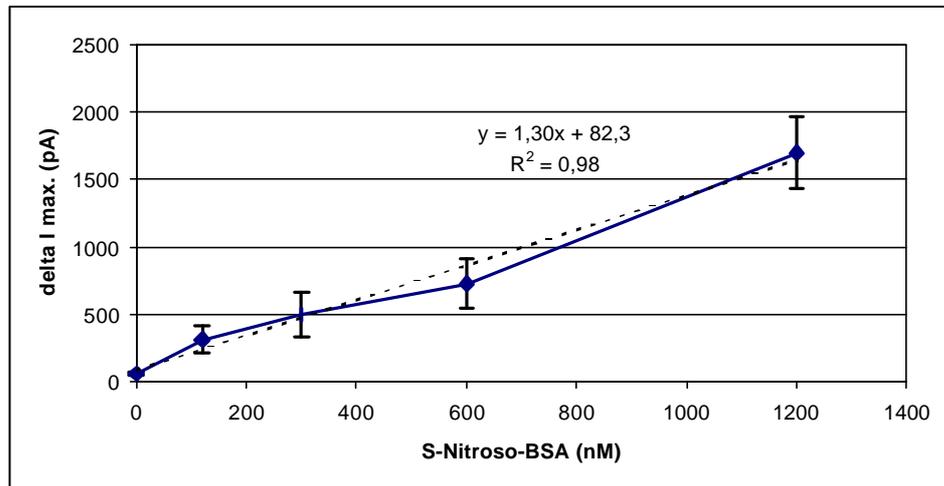


Abbildung 20: Korrelation Zwischen S-Nitroso-BSA-Konzentration und Sondenstrom (ΔI_{\max} .)

Amperometrische Detektion von S-Nitrosoalbumin in Phosphatpuffer mit der 0,2 mm WPI-Sonde. Die ΔI_{\max} Werte bei verschiedenen Konzentrationen wurden gemittelt und als Funktion der S-Nitrosoalbuminkonzentration dargestellt. Symbole repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichung, n=4.

3.2.2 Einfluß von Konvektion während der Messung

Der im vorigen Kapitel beschriebene Versuchsansatz war für eine Messung von unbekanntem Proben nicht geeignet, da nicht die Detektionslösung dem Ansatz mit dem S-Nitrosothiol zugegeben wurde, sondern die Eichlösung mit dem S-Nitrosothiol erst nach der Detektionslösung. Weiterhin bestand das Problem des sehr großen Artefaktes bei Zugabe der Detektionslösung aus Cystein und Kupfer (s.o.). Die beschriebenen Ergebnisse waren jeweils nach der Einstellung eines stabilen Hintergrundstroms nach Zugabe der Detektionslösung aus Cystein und Kupfer. Deshalb wurden weiter Untersuchungen der Ursache dieses Ausschlags notwendig.

3.2.3 Einfluß der Ionenstärke

Die Beobachtung der Amplitudenschwankung bei Zugabe der Detektionslösung legten einen Ionenstärkeneffekt nahe, entstehend durch die starken Konzentrationsschwankungen in der Probenlösung durch die Zugabe der Detektionslösung. Eine Angleichung der Ionenstärken der Lösungen sollte erreicht werden.

Ein Versuch die Ionenstärke der Pufferlösung mittels Zugabe von NaCl auf das Niveau der Detektionslösung zu bringen ergab keine Minimierung des Artefakts. Eine Mischung von Detektionslösung und der mit NaCl versetzten Pufferlösung ergab unabhängig von der Reihenfolge der Zugabe einen positiven Ausschlag von 4500 pA (Daten nicht gezeigt).

Um zu klären, ob der Artefakt durch das Cystein verursacht wurde, wurden Versuche mit unterschiedlicher Cysteinkonzentration durchgeführt.

3.2.4 Einfluß der Cysteinkonzentration in der Detektionslösung.

Um das Problem des Mischartefaktes bei Zugabe der Detektionsreagenz zu minimieren wurde in weiteren Versuchen die Cysteinkonzentration weiter verringert.

Cysteinkonzentration 0,1 M

Zur Herstellung der Detektionslösung (100 μ l) wurden 90 μ l 0,1 M Cysteinlösung, die mit 1 N NaOH auf pH 7,4 eingestellt wurde, mit 10 μ l 90 mM Kupfersulfatlösung gemischt. Der Phosphatpuffer (150 μ l) wurde vorgelegt und auf Raumtemperatur äquilibriert. Anschließend wurde die NO Elektrode etwa 1 mm tief eingetaucht und die Stabilisierung des Sondenstroms abgewartet (ca. 5 min). Auf Zugabe der frisch angesetzten Detektionslösung wurde eine schwache Zunahme des Sondenstroms um ca. 200 pA beobachtet, der nach ca. 5 Minuten auf den Ausgangswert abfiel. Bei anschließender Zugabe von niedermolekularem S-Nitrosothiol (S-Nitrosocystein) konnte ein schneller, transienter Anstieg des Sondenstroms registriert werden (Registrierung s. Kap 3.1.2). ΔI_{\max} stieg mit der Konzentration des S-Nitrosocysteins an, bei 1,3 μ M wurden Signale bis 25000 pA registriert.

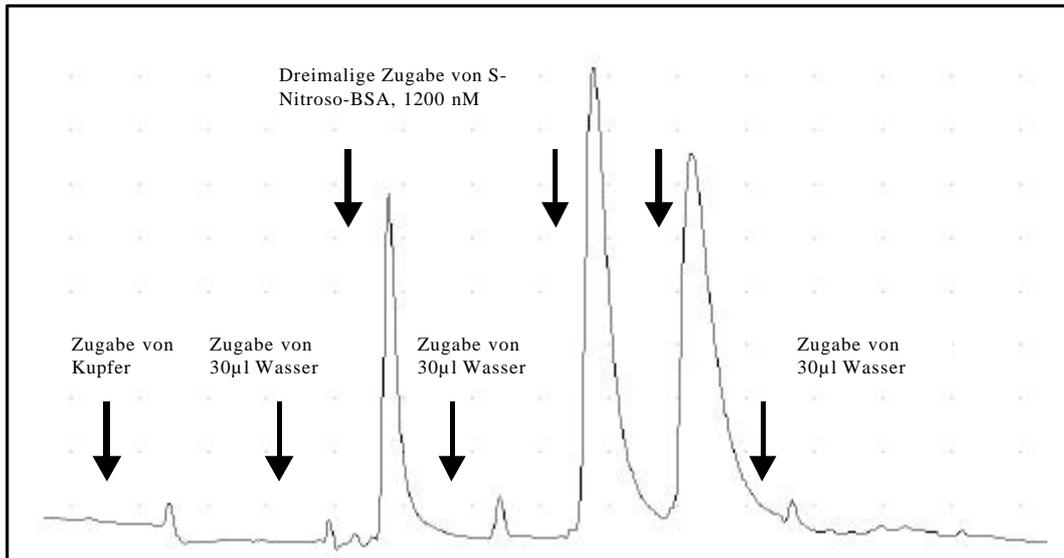


Abbildung 21: Originalregistrierung einer amperometrischen Detektion von S-Nitroso-BSA.

Auf die Zugabe von S-Nitroso-BSA (30 µl, 1,2 µM) in den Messansatz mit Kupfer (5 µl, 90 mM) und Cystein (90 µl, 0,1 M) wird eine transiente Zunahme des Sondenstroms beobachtet, der wenige Sekunden nach der Zugabe begann, nach etwa 15 Sekunden ein Maximum erreichte, um nach etwa 10 Sekunden in den Bereich des Ausgangswertes abzusinken. 0,2mm WPI Sonde, Raumtemperatur, Plasma. Dargestellt ist ebenfalls der Artefakt durch die Zugabe von Wasser. Abszisse: Stromstärke Punktabstand 250 pA, Ordinate: Zeit, Punktabstand 30 Sek.

Durch die schwach konzentrierte Cysteinlösung wurde der Artefakt etwas reduziert. Die ausgelöste Schwankung lag im Bereich von bis zu $\Delta I_{\max} + 1000$ pA. Die Schwankung durch die Beimengung von 30 µl Wasser lag im Bereich von 200 pA. Durch 30 µl verdünnter S-Nitrosoalbumin-Eichlösung, entsprechend 1,2 µM, wurden Signale von 1500-2000 pA ausgelöst. Bei Zugabe von S-Nitrosoalbumin (1 - 10 µl; entsprechende 40 - 400 µM in der Messlösung) wurden nur sehr geringe transiente Zunahmen des Sondenstroms beobachtet ($\Delta I_{\max} = 105 \pm 75$ pA). Zudem war die Streuung der ΔI_{\max} -Werte so groß, daß eine Konzentrationsabhängigkeit nicht festgestellt werden konnte (Daten nicht gezeigt).

Cysteinkonzentration 100 μM

In einer weiteren Versuchsreihe wurde die Cysteinkonzentration im Versuchsansatz auf 100 μM reduziert. Der übrige Ansatz blieb wie im Vorversuch beschrieben.

Zur Herstellung der Detektionslösung (100 μl) wurden 90 μl 100 μM Cysteinlösung, die mit 1 N NaOH auf pH 7,4 eingestellt wurde, mit 10 μl 90 mM Kupfersulfatlösung gemischt. Der Phosphatpuffer (150 μl) wurde vorgelegt und auf Raumtemperatur äquilibriert. Anschließend wurde die NO Elektrode etwa 1 mm tief eingetaucht und die Stabilisierung des Sondenstroms abgewartet (ca. 5 min). Die Schwankung der Grundlinie bei der Zugabe von Cysteinlösung und Lösungsmittel war in etwa gleich. Auf einen Abfall der Sondenstromstärke von bis zu 2000 pA folgte ein Anstieg des Sondenstroms von bis zu ΔI_{max} 450 pA. Auf Zugabe von 30 μl S-Nitrosoalbumin-Eichlösung (1,2 μM) konnten in diesem Ansatz transiente Änderungen des Sondenstroms von gleicher Größe wie bei Cystein (1 mM) beobachtet werden, mit $\Delta I_{\text{max}} = 1400 \pm 500$ pA ($n = 3$). Eine Zugabe von 30 μl Phosphatpuffer bewirkte eine Zunahme des Sondenstroms 600 ± 100 pA ($n = 3$). Wurde im Ansatz das Cystein weggelassen, so induzierte die Zugabe von 1,2 μM S-Nitrosoalbumin gleichgroßes Signal wie Lösungsmittel.

Bei noch niedrigerer Cysteinkonzentration wurde der Artefakt nicht weiter reduziert. Die Änderungen des Sondenstroms betragen ± 2000 pA.

Eine weitere Reduktion von Cystein brachte keine Verbesserung des Signal/Artefakt-Verhältnisses. Wurde die Konzentration von Cystein in der Detektionslösung unter 1 mM reduziert, so verringerte sich auch die Sensitivität zum Nachweis für S-Nitrosothiole. Der Artefakt auf Cysteinzugabe dagegen reduzierte sich nur wenig. Für die maximal erwartete Plasmakonzentration von S-Nitrosothiolen lagen die zu erwartenden Meßsignale wiederum nur im Bereich der Mischartefakte.

3.2.5 Einfluß der Volumina von Detektions- und Probenlösung

Ein veränderter Ansatz sollte die durch Schwankung des Füllstands im Reaktionsgefäß verursachten Mischartefakte verringern. Die zugegebenen Volumina wurden halbiert. Es wurden jetzt 50 μl einer 2 mM Cysteinlösung und 5 μl Kupfersulfat (90 mM) zu 250 ml Phosphatpuffer gegeben. Die Form und Größe des Mischartefaktes war identisch wie bei Verwendung der 1 mM Cysteinlösung. Das Verhältnis der Größe der Artefakte durch Cysteinzugabe Sondenstromänderungen durch S-Nitrosothiolzugabe wurde nicht besser, so daß dieser Ansatz nicht weiter verfolgt wurde (Registrierung nicht gezeigt).

3.2.6 Ersatz von Cystein durch DTT in der Detektionslösung bei S-Nitrosothiolbestimmung in wässriger phosphatgepufferter Lösung

Weil das Verhältnis von Artefakt und Meßsignal mit Cystein als Mediator der Transnitrosylierung eine Detektion von S-Nitrosoalbumin nicht ermöglichte, wurden Versuche angeschlossen mit Dithiotreitol (DTT) als alternativer Transnitrosylierungs-Mediator.

Zur Herstellung der Detektionslösung (55 μ l) wurden 50 μ l 1 mM DTT (mit 1 N NaOH auf pH 7,4 eingestellt) mit 5 μ l 90 mM Kupfersulfatlösung gemischt (finale Konzentration: 160 μ M DTT, 1,47 mM Cu^{2+}). Der Phosphatpuffer (250 μ l) wurde vorgelegt und auf Raumtemperatur äquilibriert. Anschließend wurde die NO Elektrode etwa 1 mm tief eingetaucht und die Stabilisierung des Sondenstroms abgewartet (ca. 5 min). Auf Zugabe der Einzelkomponenten der Detektionslösung wurde für die Zugabe von DTT eine Zunahme des Hintergrundstroms von ca. +500 pA beobachtet, die nach Zugabe von Kupfer wieder in den Bereich des Ausgangsniveaus zurückfiel. Wurde eine Mischung beider Komponenten zugegeben, so ergab sich lediglich eine transiente Änderung des Sondenstroms im Bereich des Mischartefaktes von Lösungsmittel 150 ± 50 pA. Nach 10 Sekunden stellte sich wieder ein stabiler Hintergrundstrom ein.

Bei anschließender Zugabe von S-Nitrosoalbumin (1200 nM, 30 μ l) konnte ein schneller, transients Anstieg des Sondenstroms registriert werden mit ΔI_{max} Werten von 1800 ± 300 pA (Abb 22). Die Mischartefakte, ausgelöst durch dreimaliges Ein- und Ausziehen der 30 μ l Pipette oder Zugabe 30 μ l Puffer, bewegten sich im Bereich schnell transients Schwankungen von 140 ± 80 pA.

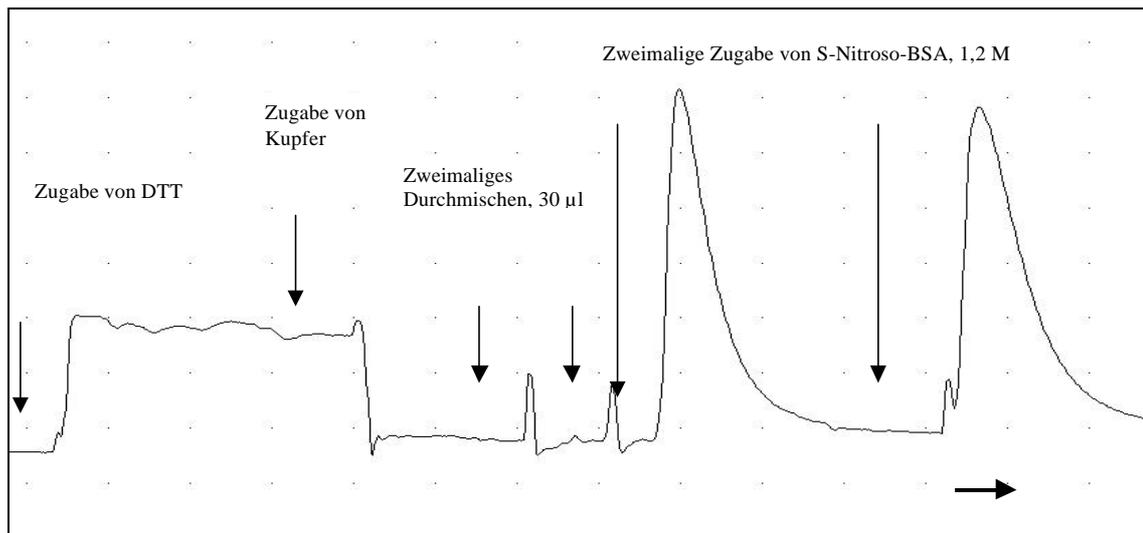


Abbildung 22: Originalregistrierung einer amperometrischen Detektion von S-Nitroso-BSA.

Auf die Zugabe von S-Nitroso-BSA (30 µl, 1,2 µM) in den Messansatz mit Kupfer und DTT (50 µl 1 mM DTT, 5 µl 90 mM Kupfersulfat) wird eine transiente Zunahme des Sondenstroms beobachtet, der wenige Sekunden nach der Zugabe begann, nach etwa 10 Sekunden ein Maximum erreichte, um nach etwa 40 Sekunden in den Bereich des Ausgangswertes abzusinken. 0,2mm WPI Sonde, Raumtemperatur, Phosphatpuffer pH 7,4, statische Lösung. Abszisse: Stromstärke Punktabstand 300 pA, Ordinate: Zeit, Punktabstand 20 Sek.

Eine Erhöhung der DTT Konzentration vergrößerte den Mischartefakt. Mit einer Anhebung der Kupferkonzentration ließ sich dieser Effekt nicht ausgleichen. Zugabe von 50 µl 10 mM DTT zu 250 µl Phosphatpuffer induzierte eine Zunahme des Sondenstroms von ΔI_{\max} 4500 pA, das bedeutet, die Verschiebung des Hintergrundstroms der Sonde stieg mit der DTT-Konzentration linear an.

Wurden statt der S-Nitrosothiol-Eichlösung 30 µl Nitritlösung, 1 µM, zugegeben, so wurden transiente Änderungen des Sondenstroms im Bereich der Mischartefakte beobachtet. Gegebenenfalls vorhandenes Nitrit in der Eichlösung beeinflusste den Messwert demnach nicht.

Wurden im Versuchsansatz DTT oder Kupfersulfat durch Lösungsmittel ersetzt, so ergaben sich andere Änderungen des Sondenstroms auf S-Nitrosothiolzugabe. Ohne DTT wurde ein sehr langsamer Anstieg auf etwa +400 pA nach Zugabe von 1,2 µM S-Nitrosoalbumin-Eichlösung beobachtet. Das entsprach nur einem Viertel des Werts in Anwesenheit von DTT. In Abwesenheit von Kupfersulfat wurde durch S-Nitrosoalbumin allein kein Meßsignal induziert.

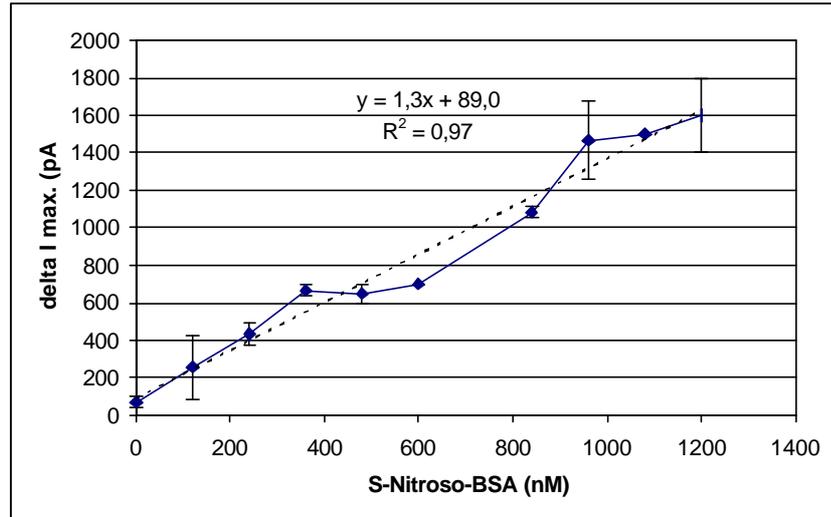


Abbildung 23: Korrelation Zwischen S-Nitroso-BSA-Konzentration und Sondenstrom ($\Delta I_{\max.}$) mit der 0,2 mm Sonde und DTT-Detektionslösung

Zusammenfassung von 4 Versuchen mit unterschiedlichen S-Nitrosoalbuminkonzentrationen. Die Stromamplituden bei verschiedenen Konzentrationen werden gemittelt und als Funktion der jeweiligen Konzentration dargestellt. Pufferlösung. Angegeben: Mittelwert, Standardabweichung, Funktion der Ausgleichsgeraden. n=4.

Nach diesem Protokoll konnte S-Nitrosoalbumin mit hoher Sensitivität nachgewiesen werden. Die Größe der Artefakte bewegte sich in einem bisher nicht erreichten Minimum. Nitrit in gleicher Konzentration wie S-Nitrosoalbumin induzierte kein Sonden-signale, die über den Mischartefakt hinausgingen.

Auf diese Weise konnte eine Eichkurve für S-Nitrosoalbumin in wässriger Pufferlösung erstellt werden (Abb 23). Steigende Konzentrationen S-Nitrosothiol ergaben ansteigende ΔI_{\max} Werte.

3.2.7 Einfluß der Reihenfolge der Zugabe von S-Nitrosothiol und Detektionslösung auf die Detektierbarkeit des S-Nitrosothiols

Im bisherigen Protokoll wurde das S-Nitrosothiol dem Meßansatz erst nach Zugabe von DTT und Kupfer zugefügt. Bei der Bestimmung von S-Nitrosothiolen in biologischen Proben, z.B. Patientenplasma liegt das S-Nitrosothiol jedoch schon in der Meßlösung vor, und die Detektionslösung muß zugefügt werden. In weiteren Untersuchungen wurde daher überprüft, ob die amperometrische Detektion von S-Nitrosothiol mit der DTT/Cu²⁺-haltigen Detektionslösung auch mit bereits in der Meßlösung vorhandenem S-Nitrosothiol möglich ist.

Dabei wurde der Phosphatpuffer (250 µl) vorgelegt und auf Raumtemperatur äquilibriert. Anschließend wurde die NO Elektrode etwa 1 mm tief eingetaucht und die Stabilisierung des Sondenstroms abgewartet (ca. 5 min).

Anschließend wurde vor Zugabe der Detektionsreagenz das S-Nitrosothiol (Nitrosoalbumin, 1200 nM, 30 µl) zugefügt. Dies induzierte Stromstärkenänderungen von $\Delta I_{\max} 100 \pm 150$ pA. Die Mischartefakte, ausgelöst durch dreimaliges Ein- und Ausziehen der 30 µl Pipette oder 30 µl Pufferzugabe, bewegten sich ebenfalls im Bereich von $\Delta I_{\max} 150 \pm 100$ pA.

Zur Herstellung der Detektionslösung (55 µl) wurden 50 µl 1 mM DTT (mit 1 N NaOH auf pH 7,4 eingestellt) mit 5 µl 90 mM Kupfersulfatlösung gemischt. Bei Zugabe des Reagenz wurde ein schneller, transienter Anstieg des Sondenstroms registriert mit ΔI_{\max} Werten von 1900 ± 900 pA (n = 8). Bei anschließender erneuter Zugabe von S-Nitrosothiol (Nitrosoalbumin, 1200 nM, 30 µl) konnte abermals ein schneller, transienter Anstieg des Sondenstroms registriert werden mit ΔI_{\max} Werten um 1800 ± 300 pA (Abb. 24).

Zugabe des Detektionsreagenz (DTT/Cu) zur S-Nitrosothiol-freien Meßlösung ergab sich lediglich eine transiente Änderung des Sondenstroms im Bereich des Mischartefaktes von Lösungsmittel 150 ± 50 pA. Nach 10 Sekunden wurde wieder das Ausgangsniveau des Sondenstroms erreicht.

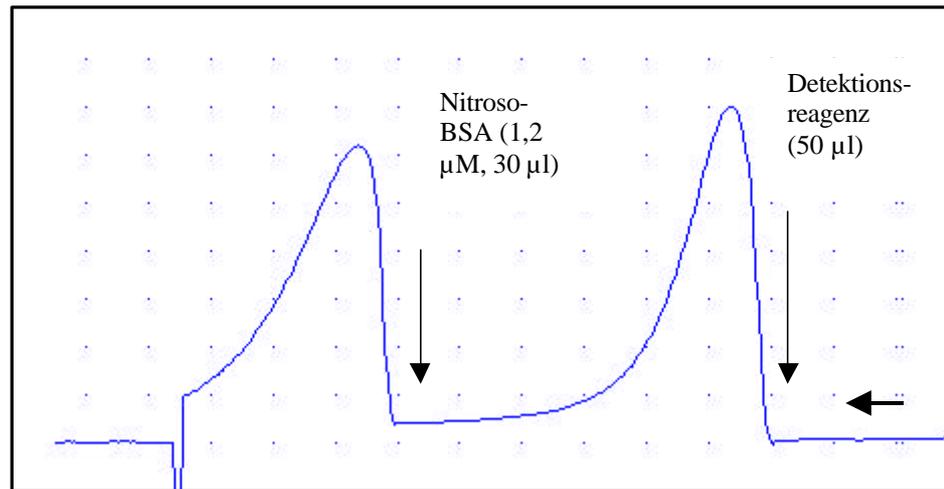


Abbildung 24: Originalregistrierung einer amperometrischen Detektion von S-Nitroso-BSA mit DTT als Detektionsreagenz mit S-Nitroso-BSA dotiertem Phosphatpuffer und Kontrolle.

Auf die Zugabe von 55 µl Detektionsreagenz (50 µl 1 mM DTT, 5 µl 90 mM Kupfersulfat) zu Phosphatpufferlösung 250 µl mit S-Nitroso-BSA (30 µl, 1,2µM) wurde eine transiente Zunahme des Sondenstroms beobachtet, der wenige Sekunden nach der Zugabe begann, nach etwa 15 Sekunden ein Maximum erreichte, um nach etwa 120 Sekunden in den Bereich des Ausgangswertes abzusinken. Desweiteren dargestellt sind die Stromstärkenänderungen von einer erneuten Zugabe von Nitroso-BSA gleicher Konzentration. 0,2mm WPI Sonde, Raumtemperatur, Phosphatpuffer pH 7,4, statische Lösung. Abszisse: Stromstärke Punktabstand 300 pA, Ordinate: Zeit, Punktabstand 25 Sek.

3.3 Detektion von S-Nitrosothiolen mit der 0,2 mm WPI Sonde im Plasma

In den folgenden Versuchen wurde eine Übertragbarkeit der im vorigen Absatz beschriebenen Methode (250 μ l Matrixlösung (Plasma), 50 μ l DTT, 1 mM, 5 μ l 90 mM Kupfersulfatlösung, statischer Ansatz) der S-Nitrosothioldetektion in Phosphatpufferlösung auf eine Anwendbarkeit im Plasma untersucht.

Zur Herstellung der Detektionslösung (55 μ l) wurden 50 μ l 1 mM DTT (mit 1 N NaOH auf pH 7,4 eingestellt) mit 5 μ l 90 mM Kupfersulfatlösung gemischt. Die Plasmaprobe (250 μ l) wurde vorgelegt und auf Raumtemperatur äquilibriert. Anschließend wurde die NO Elektrode etwa 1 mm tief eingetaucht und die Stabilisierung des Sondenstroms abgewartet (ca. 5 min). Auf Zugabe der Detektionslösung zeigte sich lediglich eine transiente Schwankung des Sondenstroms im Bereich des Mischartefaktes von zuerst -800 , dann $+500$ pA. Nach 20 Sekunden stellte sich wieder ein stabiler Hintergrundstrom ein.

Bei anschließender Zugabe von S-Nitrosothiol (S-Nitrosoalbumin, 1200 nM, 30 μ l) konnte eine schwache Schwankung des Sondenstroms registriert werden mit ΔI_{\max} Werten um 30 ± 200 pA registriert (s. Abb. 25). Die Umrührartefakte, ausgelöst durch dreimaliges Ein- und Ausziehen der 30 μ l Pipette oder 30 μ l Pufferzugabe, bewegten sich im Bereich schnell transienter Schwankungen von 40 ± 50 pA.

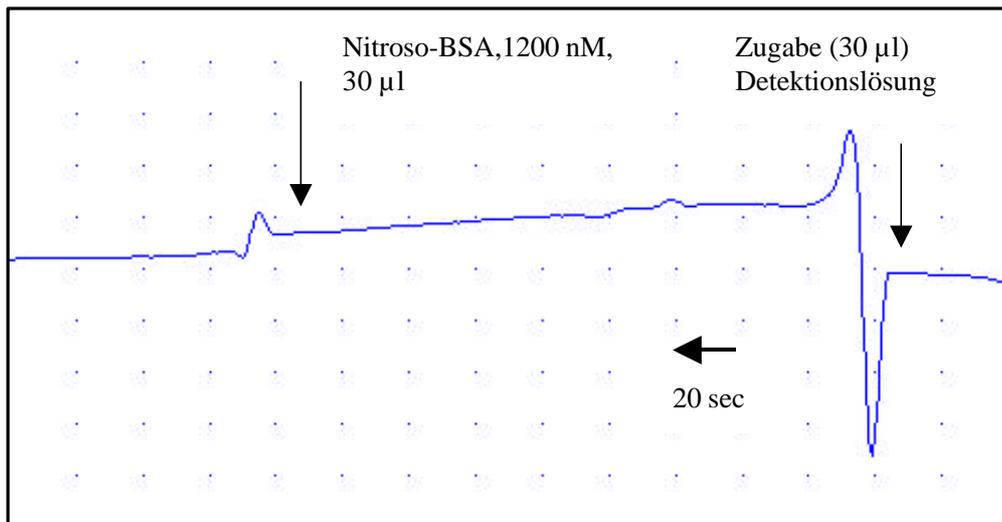


Abbildung 25: Originalregistrierung einer amperometrischen Detektion von S-Nitrosoalbumin in Plasma.

Auf Zugabe der Detektionslösung (50 µl 1 mM DTT, 5 µl 90 mM Kupfersulfat) wurde eine schwache Schwankung des Sondenstroms registriert mit ΔI_{\max} Werten um 30 ± 200 pA. Auf die Zugabe von S-Nitrosoalbumin (30 µl, 1,2 µM) in den Meßansatz mit Kupfer und DTT zeigte sich lediglich eine transiente Schwankung des Sondenstroms im Bereich des Mischartefaktes von zuerst -800 , dann $+500$ pA. 0,2 mm WPI Sonde, Raumtemperatur, Plasma, statische Lösung. Abszisse: Stromstärke Punktabstand 200 pA, Ordinate: Zeit, Punktabstand 20 Sek.

Eine Übertragung der Ergebnisse in eine Plasmamatrix ergab deutlich andere Stromstärkenänderungen als die Vorversuche im Phosphatpuffer. Die Zugabe von 1,2 µM Eichlösung bewirkten transiente Stromstärkenänderungen im Bereich von lediglich 100 pA, und hoben sich damit nicht signifikant auswertbar von ebenfalls beobachteten Artefakten durch Matrixbewegungen (50-200 pA s. 3.1.) bei Zugabe ab. Die gemessenen Ströme, die sich bei Ersatz der Pufferlösung durch menschliches Plasma einstellten, waren wesentlich kleiner (Faktor 10), als im Phosphatpuffer. Die weiterführenden Überlegungen sollten mögliche Gründe hierfür herausfinden.

Das freigesetzte NO konnte nicht an der Elektrode, an der es oxidiert werden soll, detektiert werden. Es wurden verschieden mögliche Ursachen hierfür untersucht.

Grundsätzlich gab es zwei Arten von möglichen Ursachen zu unterscheiden:

- A. Einflüsse aus dem Plasma setzen die Sensitivität der Sonde selbst herab.
- B. Das entstehende NO wird zu schnell umgesetzt. Es werden entsprechend geringere Konzentrationen an der Sonde erzielt.

3.3.1 Einfluß von Konvektion während der Meßung

Unter der Annahme, dass Ablagerungen aus dem Plasma an der Membran der Sonde ein Durchdringen der Membran für das zu messende NO erschweren, wurde der Versuchsaufbau grundsätzlich verändert. Das Probenvolumen wurde von 300 µl auf 500 µl in einer 56-Loch-Mikrotiterplatte erhöht und mittels eines Magnetrührers kontinuierlich mit etwa 500 Umdrehungen pro Minute durchmischt. Neben der Verhinderung von Ablagerungen an der Membran hatte dieses Verfahren zusätzlich den Vorteil, daß eine zusätzliche Durchmischung der Probe nach Zugabe von Lösungen entfiel, und damit auch Durchmischungsartefakte, etwa das dreimalige Aufziehen der 30 µl Pipette, wie oben beschrieben.

Zur Herstellung der Detektionslösung (110 µl) wurden 100 µl 1 mM DTT (pH 7,4) mit 10 µl 90 mM Kupfersulfatlösung gemischt. Die Plasmaprobe (500 µl) wurde vorgelegt und auf Raumtemperatur äquilibriert. Anschließend wurde die NO Elektrode etwa 1 mm tief eingetaucht und die Stabilisierung des Sondenstroms abgewartet (ca. 5 min). Bei Zugabe von S-Nitrosothiol (S-Nitrosoalbumin, 1200 nM, 60 µl) konnte eine schwache Schwankung des Sondenstroms von -400 pA registriert werden. Nach 10 Sekunden stellte sich stabiler Hintergrundstrom ein. Auf Zugabe der Detektionslösung zeigte sich lediglich eine transiente Schwankung des Sondenstroms mit ΔI_{\max} Werten um 2100 ± 500 pA ($n = 3$) ein. Gleichgroße Artefakte ergabensich bei Zugabe der Detektionslösung in Abwesenheit von S-Nitrosoalbumin. Nach 20 Sekunden stellte sich wieder ein stabiler Hintergrundstrom ein. Eine erneute Zugabe von Detektionslösung ergab lediglich ΔI_{\max} Werten um 100 ± 60 pA ($n = 3$, Abb 26). Mischartefakte durch 150 µl Pufferlösung lagen im Bereich schnell transientser Schwankungen von etwa 70 pA.

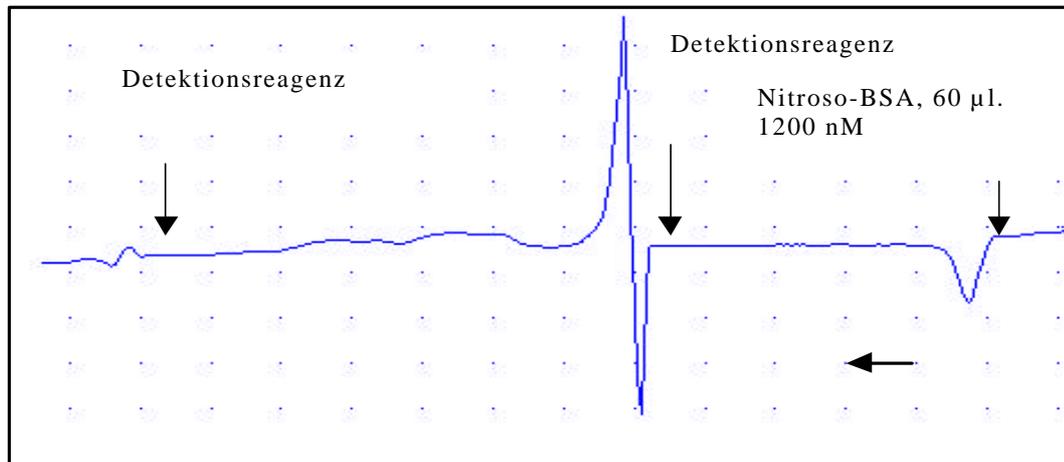


Abbildung 26 : Originalregistrierung einer amperometrischen Detektion von S-Nitrosoalbumin in Plasma, bewegte Lösung.

Auf Zugabe von S-Nitrosoalbumin (60 µl, 1,2 µM) zum Plasma zeigte sich eine transiente Schwankung des Sondenstroms mit ΔI_{\max} von 350 ± 175 pA. Auf die Detektionsreagenz (100 µl 1 mM DTT, 10 µl 90 mM Kupfersulfat) wurde eine Schwankung des Sondenstroms registriert mit ΔI_{\max} Werten um 2100 ± 500 pA. Eine weitere Zugabe von Detektionsreagenz in den Meßansatz mit Kupfer und DTT bewirkte eine transiente Schwankung des Sondenstroms im Bereich des Mischartefaktes 100 ± 60 pA. 0,2 mm WPI Sonde, Raumtemperatur, Plasma, bewegte Lösung. Abszisse: Stromstärke Punktabstand 250 pA, Ordinate: Zeit, Punktabstand 20 Sek.

Diese Ergebnisse ließen sich nicht reproduzieren. Die Stromstärkenänderung bei Zugabe der Detektionslösung war unabhängig von der Dotierung des Plasmas mit S-Nitrosoalbumin. Es gelang nicht, die Ursache für die stark variierenden Ergebnisse zu finden.

Die mechanische Belastung der stetigen Bewegung für die sehr empfindliche Membran erschien als mögliche Ursache genauso denkbar wie eine schwankende Sensitivität der Sonden selbst. In dieser Phase wurden zwei Sonden parallel benutzt und ein erweitertes Protokoll zur Sondenprüfung entwickelt. Eine Anzahl von Sonden warf die Frage nach ihrer gleichbleibenden, vergleichbaren Funktionsfähigkeit auf. Trotz Überprüfung verschiedenster Parameter, wie Austausch aller verwendeten Lösungen waren letztlich keine aussagekräftigen Ergebnisse zu reproduzieren. Auch mit Sonden, die intakt und sensitiv erschienen gelang dies nicht. So wurde eine weitere Suche nach anderen Gründen für einen verstärkten NO-Abbau angeschlossen.

3.3.2 Verlängerung der Halbwertszeit von NO im Plasma

Wie eingangs im Kapitel Stoffwechsel beschrieben, wird in vivo das freigesetzte NO durch verschiedene Substanzen, wie Superoxidanionen, eisenhaltige Moleküle, usw., schnell abgefangen. Diese Einflüsse kommen als Erklärung der verminderten Meßbarkeit im Plasma in Frage.

Abtrennung der korpuskulären Anteile des Bluts durch längere Zentrifugation

Zur Gewinnung Erythrozyten-freien Plasmas wurde das Zitrat-Vollblut 30 Minuten, anstatt 10 Minuten, bei 1000 g zentrifugiert. Die Messungen wurden nach dem gleichen Protokoll wie in 3.3.1 beschrieben durchgeführt.

Bei den Versuchen konnte S-Nitrosoalbumin in der Pufferlösung mit der gleichen Sensitivität, wie in 3.3.1.2 beschrieben, bestimmt werden. Die Ergebnisse der Messungen in Plasma ergaben keine besseren Ergebnisse als in den vorbeschriebenen Versuchen ab (3.2.1). Die Stromstärkenänderungen auf Zugabe von S-Nitrosoalbumin blieben relativ zu den Artefakten auf Zugabe von Lösungsmittel oder Plasma zu schwach für eine Auswertung.

3.4 Artefakte und physikochemische Einflüsse mit 0,2 und 2 mm Sonden

Bei der Handhabung der Sonden stellte sich heraus, daß eine Reihe von Faktoren einen Einfluß auf die Ergebnisse haben. Besonders zu erwähnen ist hier der in den einzelnen Versuchen beschriebene Artefakt auf Zugabe einer anderen Lösung.

Das Einbringen einer Menge Flüssigkeit in die Probe ergab transiente Stromstärkenänderungen (Artefakte), die es jeweils von den zu beobachtenden potentiellen Meßwerten abzugrenzen galt. Um NO sensitiv nachweisen zu können, müssen die Stromstärkenschwankungen durch die Zugabe von Lösungen möglichst klein sein. Diese Mischartefakte ließen sich minimieren durch Optimierung von:

Mechanischen Einflüssen: Die Mengen der Flüssigkeitszugabe war möglichst klein zu halten. Die Größe der Schwankung ist abhängig von dem Volumen der Flüssigkeit die zugegeben wird.

Temperatur: Bei der Zugabe von Flüssigkeiten ist eine gleiche Temperatur der Komponenten von Bedeutung. Mischartefakte sind größer, wenn die Lösungen größere Temperaturunterschiede aufweisen.

pH-Wert: Ungepufferte Lösungen erzeugen stärkere Schwankungen.

Ionenstärke: Größere Ionenstärkeunterschiede ergeben stärkere Schwankungen.

4. Diskussion

4.1 Hintergrund und Fragestellung

S-Nitrosothiole im Plasma gelten als Monitor für endogenes NO und die endogene NO-Synthese (Stammler 1992). Sie sind Intermediate des NO-Metabolismus mit deutlich längerer biologisch-chemischer Halbwertszeit als freies NO, das wegen seiner Flüchtigkeit und Oxidationsempfindlichkeit im Plasma ex vivo nicht bestimmt werden kann. Weiterhin wird die S-Nitrosothiolkonzentration im Plasma durch exogene NO_x Aufnahme (Nahrung) nicht im gleichen Ausmaß verfälscht wie die Konzentration der stabilen NO-Metabolite Nitrit und Nitrat. Beide Aspekte, Stabilität und Unabhängigkeit von diätetischen Einflüssen lassen vermuten, daß die Bestimmung der S-Nitrosothiolkonzentration im Plasma ein zuverlässiger Indikator für die endogene NO-Produktion sein könnte.

Deshalb wurde in dieser Studie untersucht, ob mit Hilfe eines amperometrischen Detektionsverfahrens eine zuverlässige Bestimmung im Plasma möglich ist. Dazu wurden NO-selektive Elektroden der Firma WPI eingesetzt, die freies NO in wässriger Lösung im nM Konzentrationsbereich nachweisen können. Aus der Literatur war bekannt daß die Konzentration von S-Nitrosothiolen in Humanplasma im Bereich von 20-100 nM liegen sollte, wobei der überwiegende Teil als S-Nitroso-Serumalbumin vorliegt (Stammler 1992). Es war das Ziel der Untersuchung die Meßbedingungen gezielt so zu modulieren, daß das NO in S-Nitrosoproteinen freigesetzt und mit hoher Sensitivität im Plasma nachgewiesen werden kann. Das Prinzip der Methode bestand darin, zunächst durch einen Transnitrosylierungsschritt das NO aus dem stabilen S-Nitrosoalbumin auf ein niedermolekulares Thiol zu übertragen, und NO aus diesem mit Hilfe von Kupferionen freizusetzen (s. Kap 2).

In Voruntersuchungen konnte gezeigt werden, daß beide Sondentypen (2 mm und 0,2 mm Sonde) NO, das aus Kaliumnitrit chemisch freigesetzt wurde, mit großer Sensibilität detektieren (s. Abb. 41,42). Die Maxima der transienten Änderungen des Sondenstroms nahmen im Konzentrationsbereich von 0,2-1 µM linear zu. Eine Auftragung der Signalamplitude gegen die Konzentration ergab Ursprungsgeraden. Die Empfindlichkeit der 2 mm Sonde betrug ca. 2pA/nM NO und die der 0,2 mm Sonde ca. 8 pA/nM NO. Unter Berücksichtigung der in der Literatur angegebenen S-Nitrosothiolkonzentration von 20 -100 nM war bei gleicher Empfindlichkeit von S-Nitrosothiol- und Nitrit-Detektion mit Stromstärkenänderungen von 40-800 pA zu

rechnen. In der Folge wurde versucht, ein Meßprotokoll zu entwickeln, das diese Empfindlichkeit zur RSNO Detektion gewährleistete.

4.2 Detektion von S-Nitrosothiolen mit der 2 mm WPI-Sonde

Zersetzung von S-Nitrosothiolen durch die Detektionslösung und Stabilität der Eichlösung

Eine photometrische Kontrolle der S-Nitrosothiol-Standardlösung nach zweimonatiger Lagerung in flüssigem Stickstoff ergab keinen Hinweis auf eine Abnahme der Konzentration der S-Nitrosothiole in der Lösung. Die Konzentration konnte anhand der typischen Absorptionsmaxima der S-NO-Gruppe bestimmt werden. Wurde das Detektionsreagenz aus Kupfer und Cystein zugegeben, so konnten diese Absorptionsmaxima nicht mehr nachgewiesen werden, d. h., das S-Nitrosothiol wurde vollständig zersetzt.

Die Eichlösung ließ sich demnach für diesen Zeitraum ohne signifikante Konzentrationsabnahme aufbewahren. Vorhandene S-Nitrosothiole wurden durch die Zugabe der Detektionslösung zersetzt.

Detektion von S-Nitrosothiolen in wässriger Pufferlösung mit der 2 mm Sonde und Cystein als Agens für die Transnitrosylierung.

Cystein übernahm im Versuchsansatz die Funktion eines intermediären NO-Akzeptors bei der Transnitrosylierung. Durch eine hohe Konzentration an Cystein sollte das Reaktionsgleichgewicht auf die Seite des S-Nitrosocystein verschoben werden. Cystein selbst verursachte im Meßansatz ein konzentrationsabhängiges Artefakt, das zu erwartende Stromstärkenänderungen durch S-Nitrosothiol-Dekomposition überdeckt (s. Abb. 9). Die Stromstärkenänderungen selbst zeigten eine positive Korrelation mit der Cysteinkonzentration. In Versuchsreihen sollte die optimale Cysteinkonzentration zur Erzeugung möglichst geringer Artefakte bei gleichzeitig größtmöglicher Stromstärkenänderung auf S-Nitrosothiolzugabe gefunden werden. Es zeigte sich, daß eine Detektion mittels einer Lösung aus 90 µl M Cystein (3 M) und 10 µl Kupfersulfat (3 mM) auf 200 µl Probenlösung für einen Bereich von 500 nM bis 7 µM S-Nitrosoalbumin möglich war. Die Empfindlichkeit betrug aber nur ca. 90 pA/µM S-Nitrosoalbumin. Dieser Nachweis gelang in wässriger Pufferlösung und bei nachträglicher Zugabe des S-Nitrosothiol zum Reaktionsansatz. In Humanplasma gelang der Nachweis nicht. Ebenso gelang eine Detektion von bereits in der

Probenlösung enthaltenem S-Nitrosothiol mittels cysteinhaltiger Detektionslösung nicht, da allein die Zugabe von Cystein eine Stromstärkenänderung auslöste, die das Meßsignal bei weitem überdeckte.

Einfluß von Kupfer

Der Versuchsansatz mit Cystein und Kupfer als Detektionslösung erlaubte eine Detektion von S-Nitrosoalbumin und S-Nitrosocystein in Phosphatpuffer. Ohne Kupferionen in der Detektionslösung blieben die beobachteten Stromstärkenamplituden auf S-Nitrosothiolzugabe aus.

Ohne Kupfer konnten weder S-Nitrosoalbumin noch niedermolekulares S-Nitrosocystein nachgewiesen werden. Kupferionen waren für die NO Freisetzung aus S-Nitrosocystein unabdingbar.

Herstellung der Detektionslösung, Spezifität der Messung im sauren pH-Wert

Eine hochkonzentrierte Cysteinlösung hatte einen sauren pH-Wert von 2. Eine nicht neutralisierte Detektionslösung bewirkte einen ebenfalls stark sauren pH-Wert von ca. 2 im Versuchsansatz. Dadurch wurde im Ansatz vorhandenes Nitrit in NO über intermediäre Bildung von HNO₂ umgewandelt und ebenfalls mitdetektiert. Eine höhere S-Nitrosothiolkonzentration wurde dadurch vorgetäuscht. Eine Neutralisation der Detektionslösung zeigte sich deshalb als unabdingbar.

Wurden die Cystein- und Kupferlösung gemischt, so zeigten sich nach etwa 15 Minuten Präzipitate, die eine genaue Konzentrationsangabe unmöglich machten. Die beiden Komponenten durften daher erst kurz vor der Zugabe zur Probenlösung gemischt werden.

4.3 Detektion von S-Nitrosothiolen mit der 0,2 mm WPI-Sonde

Bei der Detektion mit der für NO Detektion sensitiveren 0,2 mm Sonde (nach Herstellerangaben 4 mal sensitiver als die 2 mm Sonde) waren deutlich größere Messingale zu beobachten. Es wurde der gleiche Versuchsansatz mit Cystein und Kupfer als Detektionsreagenz benutzt wie in den Versuchen mit der 2 mm Sonde.

S-Nitrosocystein

Für den Konzentrationsbereich von 1 bis 7 µM konnte S-Nitrosocystein in wässriger Pufferlösung nachgewiesen werden. Die Empfindlichkeit betrug 2 pA/nM. Das entsprach einer 22,6 fach höheren Empfindlichkeit als mit der 2 mm Sonde.

S-Nitrosoalbumin

Für den Konzentrationsbereich von 0 bis 1200 nM konnte S-Nitrosoalbumin in wässriger Pufferlösung nachgewiesen werden. Die Empfindlichkeit betrug etwa 1,3 pA/nM. Das entsprach einer 14-fach höheren Empfindlichkeit als mit der 2 mm Sonde.

Diese Ergebnisse wurden erreicht, indem eine definierte Menge an S-Nitrosothiol zu einem Ansatz, der die Detektionslösung bereits enthielt, zugegeben wurde. Dieser Ansatz eignete sich nicht dafür, die in einer Probenlösung bereits enthaltenen S-Nitrosothiole durch nachfolgende Zugabe der Kupfer/Cysteinlösung zu detektieren, da hierdurch ein großer Messartefakt entstand. Es wurden Modifikationen des Verfahrens entwickelt, die zu einer Verringerung der Artefakte und damit zu einer besseren Detektion von S-Nitrosothiolen unbekannter Konzentration in Probenlösungen führen sollten.

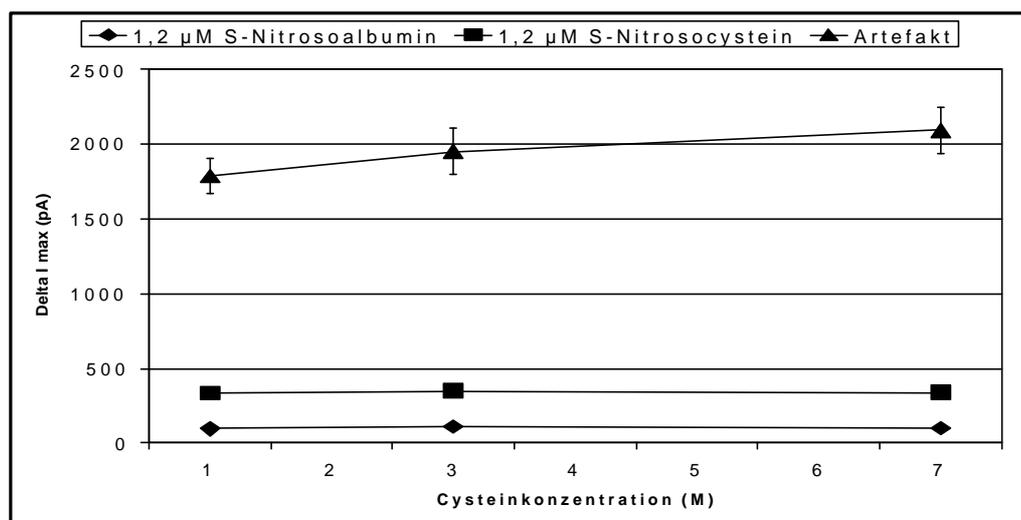


Abbildung 27: Korrelation von Messsignal zu Cysteinkonzentration im Detektionsreagenz für die 2 mm Sonde in Humanplasma

Dargestellt sind die Messsignale ($n = 3$) bei der Zugabe von S-Nitrosothiolen (1,2 µM S-Nitrosoalbumin, 1,2 µM S-Nitrosocystein) zu Versuchsansätzen mit unterschiedlichen Konzentrationen von Cystein in der Detektionsreagenz und der jeweilige Artefakt bei Zugabe des Detektionsreagenz zum Versuchsansatz.

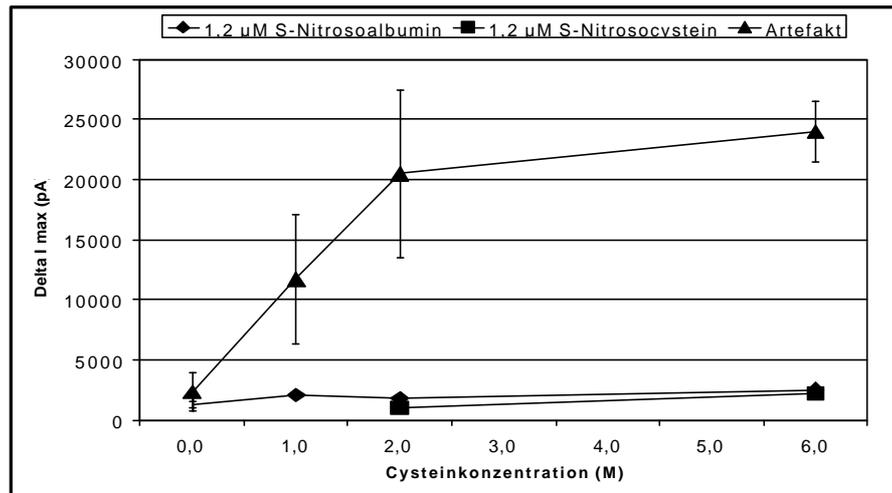


Abbildung 28: Korrelation von Messignal zu Cysteinkonzentration im Detektionsreagenz für die 0,2 mm Sonde in Phosphatpufferlösung

Dargestellt sind die Messignale ($n = 3$) bei der Zugabe von S-Nitrosothiolen (1,2 μM S-Nitrosoalbumin, 1,2 μM S-Nitrosocystein) zu Versuchsansätzen mit unterschiedlichen Konzentrationen von Cystein in der Detektionsreagenz und der jeweilige Artefakt bei Zugabe des Detektionsreagenz zum Versuchsansatz.

Arbeiten zur Angleichung der Ionenstärkenunterschiede zwischen den Lösungen, zur Messung in einem stetig durchmischten Probengefäß, eine Optimierung der Cysteinkonzentration (Abb. 27, 28), sowie Veränderungen der Probenvolumina verbesserten die Auswertbarkeit nicht. In den Abbildungen der Unterschied zwischen der Artefaktgröße und dem Messignal gegenübergestellt.

Im Versuchsansatz wurde Cystein als Agens für die Transnitrosylierung in der Detektionslösung durch DTT (Dithiotreithol) ersetzt. Mittels DTT konnte S-Nitrosoalbumin in wässriger Pufferlösung über einen Konzentrationsbereich von 0 bis 1200 nM mit einer Empfindlichkeit von etwa 1 pA/nM detektiert werden. Mit diesem Verfahren war es im gleichen Konzentrationsbereich ebenfalls möglich, bereits in der Probenlösung enthaltenes S-Nitrosoalbumin zu detektieren.

4.4 Einfluß der Matrix

Bewertung der Ergebnisse im Plasma

Das Ziel einer verlässlichen Messung von S-Nitrosotholen im menschlichen Plasma konnte in der vorliegenden Arbeit nicht realisiert werden. Es wurden verschiedene störende Einflüsse untersucht. Letztlich konnte nicht eindeutig herausgefunden werden, warum die Ergebnisse im Plasma derart unterschiedlich sind, und wie man eine sichere Messung durchführen kann. Es muss diesbezüglich einen Einfluß aus der Matrix geben, der bisher nicht zu identifizieren war.

Ein Ansatzpunkt für weitere Arbeiten kann der Umstand sein, dass sich immer besonders verlässliche Messungen erzielen lassen, wenn man die Eichlösung mit den S-Nitrosothiolen zum Ansatz von Puffer und Detektionslösung hinzugibt, während die Zugabe von Detektionslösung zum Ansatz von Puffer/Plasma und Eichlösung keine validen Antworten ergeben.

4.5 NO-Freisetzungskinetik

Die Freisetzung von NO aus niedermolekularen S-Nitrosothiolen erfolgt sehr rasch. Die Transnitrosylierung scheinen langsamer abzulaufen. Während also geringe Menge an Nitosocystein entstehen, wird dieses sehr schnell zur NO-Abgabe angeregt. Die entstehenden NO-Konzentrationen sind daher relativ klein und damit schwer zu erfassen. Wünschenswert wäre eine schnelle, fast explosionsartige Umsetzung aller Reaktionsschritte, so daß hohe NO-Konzentrationen an der Sonde anfallen würden.

4.6 Plasmabehandlung

Es wurden bereits mögliche Ansätze zur notwendigen Behandlung des Plasmas geprüft. Alleine mit einer längeren Zentrifugation konnten keine besseren Ergebnisse erzielt werden.

4.7 Artefakte

Mit dem in der vorliegenden Arbeit benutzten ISO-NO System steht ein Instrument zur Verfügung, mit dem sich in wässrigen Lösungen sehr geringe Konzentrationen von freiem NO messen lassen. Nach den Herstellerangaben lassen sich die beschriebenen Eichgeraden gut erstellen. In den vorliegenden Versuchen stellte sich die NO selektive Polymermembran als Schwachstelle des Systems heraus. Die Lebensdauer der Membranen ist sehr unterschiedlich. In unseren Versuchen schwankte sie zwischen

Stunden und Wochen. Der bei den 2 mm Sonden notwendige Wechsel der Membranen ist zeitaufwendig, da die ausgewechselten Membranen 12 Stunden zur Einstellung einer stabilen Grundlinie brauchen. Bei der Herstellung der Membranen scheint es schwierig zu sein, eine exakt gleichbleibende Qualität sicher zustellen. Manche defekt ausgelieferte Membran wurde erst während des Gebrauchs identifiziert.

Die 0,2 mm Sonde ist für die Detektion von S-Nitrosoalbumin um etwa eine Zehnerpotenz sensitiver als die 2 mm Sonde. Die bei der Handhabung des Geräts auftretenden Störungen sind aber ebenfalls größer.

4.8 Schlußfolgerung

Eine Messung von S-Nitrosothiolen anhand der Freisetzung von NO ist grundsätzlich möglich. Das entstandene NO kann mittels einer amperometrischen NO-selektiven Sonde quantifiziert werden. Höhermolekulare S-Nitrosoverbindungen, wie das für Plasmamessungen besonders wichtige S-Nitrosoalbumin, können über den Zwischenschritt der Transnitrosylierung in niedermolekulare S-Nitrosoverbindungen überführt werden, die schneller das gespeicherte NO abgeben. Die Abspaltung des NO kann durch die Zugabe von Kupferionen erreicht werden.

Die hohe Reaktionsbereitschaft von NO und damit seine kurze Halbwertszeit bedingen eine besondere Ausrichtung der Reaktionsschritte während der Umsetzung. Es ist für die quantitative Erfassung in diesen geringen Konzentrationen wichtig, dass möglichst das gesamte enthaltene NO innerhalb kurzer Zeit freigesetzt wird. Nur so können an der Elektrode Konzentrationen erreicht werden, die sich von den Störfaktoren der Messung deutlich absetzen. Diese Störfaktoren zu identifizieren und auszuschalten ist eine weitere existentiell wichtige Bedingung für verlässliche Ergebnisse. Besonders wichtig ist dieser Punkt für eine zukünftige Methode zur Messung von S-Nitrosothiolen im Blutplasma.

5. Literatur

Bassenge E, Busse R, Endothelial modulation of coronary tone, *Prog Cardiovasc Dis.* 1988; 5:349-380.

Bassenge E, Heusch G, Endothelial and neuro-humoral control of coronary blood flow in health and disease, *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 1990;116:79-165.

Bredt DS, Hwang PM, Snyder SH. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide, *Nature.* 1990;347:768-770.

Bredt DS, Snyder SH. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme, *Proc Natl Acad Sci.* 1990;87:682-685.

Chand N, Altura BM, Acetylcholin and bradykinin relay intrapulmonary arteries by acting on endothelial cells: role in lung and vascular diseases, *Science.* 1981,213:1376-1379.

Deussen A, Walter C, Borst M, Schrader J. Transmural gradient of adenosine in canine heart during functional hyperemia, *Am. J Physiol.* 1991;260:H671-H680.

Dzau VJ, Gibbons GH, Morishita R, Pratt RE. New perspectives in hypertension research: potentials of vascular biology, *Hypertension.* 1994;23:1132-1139.

Feelisch M, Noack E. Correlation between nitric oxide formation during degradation of organic nitrates and activation of guanylate cyclase, *Eur J Pharmacol.* 1987;139:19-30.

Feelisch M, te Poel M, Zamora R, Deussen A, Moncada S. Understanding the controversy over the identity of EDRF, *Nature.* 1994;368:62-65.

Furchgott RF, Zawadzki JV, The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholin, *Nature.* 1980;288:373-376.

Furchgott RF, Role of endothelium in responses of vascular smooth muscle, *Circ Res.* 1983; 53:557-573.

Furchgott RF, Vanhoutte PM, Endothelium-derived relaxing and contracting factors, *FASEB J.* 1989;3:2007-2013.

Griess JP. Bemerkungen zu der Abhandlung der HH. Wesely und Benedikt "Über einige Azoverbindungen". 1879;12:426-428.

Griffith OW, Stuehr, DJ. Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanism. *Annu Rev Physiol* 1995; 57:707-736.

Giovanelli J, Campos KL, Kaufmann S. Tetrahydrobiopterin, a cofactor for rat cerebellar nitric oxide synthase does not function as a reactant in the oxygenation of arginine. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991;88,7091-7095.

Ignarro LJ, Byrns RE, Buga GM, Wood KS. Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical, *Circ Research.* 1987;61:866-879.

Ignarro LJ, Kadowitz PJ. Pharmacological and physiological role of cGMP in vascular smooth muscle relaxation, *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1985;25:171-191.

Ignarro LJ. Biological actions and properties of EDNO formed and released from artery and vein, *Circ Res.* 1988;65(1):1-21.

Ignarro LJ. Haem-dependent activation of guanylate cyclase and cyclic GMP formation by endogenous nitric oxide: a unique transduction mechanism for transcellular signalling. *Pharmacol Toxicol.* 1990;67,1-7.

Kelm M, Kardiovaskuläre Wirkungen von Stickstoffmonoxid und ihre Bedeutung für die arterielle Hypertonie, Habilitationsschrift, Heine-Universität Düsseldorf, 1995.

Kelm M, Feelisch M, Spahr R, Piper H, Noack E, Schrader J, Quantitative and kinetic characterization of nitric oxide and EDRF released from cultured endothelial cells, *Biochem Biophys Res Comm.* 1988;154:236-244.

Kelm M, Feelisch M, Schrader J, Release of the free nitric oxide radical and EDRF from endothelial cells, *Z Kardiol.* 1989;78 (Suppl. 6):70-74.

Kelm M, Preik-Steinhoff H, Preik M, Strauer BE, Serum nitrite sensitively reflects endothelial NO formation in human forearm vasculature: evidence for biochemical assessment of the endothelial L-arginine-NO-pathway, *Cardiovasc Res* 1999 Mar;41(3):765-72.

Khrapova, NV, Malenkova, IV, Vanin AF. S-nitrosothiols and dinitrosylthiol iron complexes as a source of nitric oxide in animals, *Biofizika* 1995;40:117-121.

Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide synthases in mammals, *Biochem J.* 1994;298:249-258.

Kubes P. Nitric oxide-induced microvascular permeability alterations: a regulatory role for cGMP, *Am J Physiol.* 1993;265:H1909-H1915.

Kukovetz WR, Holzmann S. Mechanism of nitrate-induced vasodilatation and tolerance on a biochemical base, *Z Kardiol.* 1985;74(Suppl. 1),39-44.

Lefreoy DC, Crake T, Uren NG, Davies GJ, Maseri A. Effect of inhibition of nitric oxide synthesis on epicardial coronary artery caliber and coronary blood flow in humans, *Circulation.* 1993;88:43-54.

Marletta MA. Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis, *Cell.* 1994;78:927-930.

Mathews WR, Kerr SW. Biological Activity of S-Nitrosothiols: The Role of Nitric Oxide, *J Pharm Exp Ther.* 1993;267:1529-1537.

Meyer DJ, Kramer H, Özer N, Coles B, Ketterer B. Kinetics and equilibria of S-Nitrosothiol exchange between glutathione, cysteine, penicillamines and serum albumin. FEBS 1994;345:177-180.

Mordvintsev PI, Rudneva VG, Vanin AF, Shimkevich LL, Khodorov BI. Inhibition of platelet aggregation by dinitrosyl iron complexes with low molecular weight ligands, Biokhimiia. 1986;51,1851-1857.

Mohr S, Stamler JS, Brüne B. Mechanism of covalent modification of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase at its active site thiol by nitric oxide, peroxynitrite and related nitrosating agents, FEBS Lett.1994;348,223-227.

Moncada S, Palmer RMJ, Higgs A. Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine: a pathway for the regulation of cell function and communication, Ciochem Pharmacol. 1989;38:1709-1715.

Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide, biology pathophysiology and pharmacology, Pharmacol Rev. 1991;43:109-142.

Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway, N Engl J Med. 1993; 329:2002-2012.

Moncada S, Martin JF, Higgs A. Symposium on regression of atherosclerosis, Eur J Clin Invest. 1993;23:385-398.

Mülsch A, Busse R, Mordvintsev PI, Vanin AF, Nielsen EO, Scheel-Kruger J, Olesen SP.

Nitric oxide promotes seizure activity in kainate-treated rats, Neuroreport 1994 Nov 21;23:385-398.

Mülsch A, Schray-Utz B, Mordvintsev PI, Hauschildt S, Busse R. Diethyldithiocarbamate inhibits induction of macrophage NO synthase. FEBS Lett 1993 Apr 26;321(2-3):215-8.

Nathan C, Xie Q-W. Regulation of biosyntheses of nitric oxide, *J Biol Chem*. 1994;269:13725-13728.

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

Palmer RMI, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine, *Nature*. 1988;333:664-666.

Pietraforte D, Mallozzi C, Scorza G, Minetti M. Role of Thiols in the targeting of S-Nitroso Thiols to red blood cells, *Am Chem Soc*. 1995;7177-7185.

Pipili-Synetos E, Sakkoula E, Maragoudakis ME. Nitric oxide is involved in the regulation of angiogenesis, *Br J Pharmacol*. 1993;108:855-857.

Radomski MW, Martin JF, Moncada S. Synthesis of nitric oxide by the haemocytes of the american horseshoe crab (*Limulus polyphemus*), *Philos Trans R Soc Lond (Biol)*. 1991;334:129-133.

Radomski MW, Moncada S. Regulation of vascular homeostasis by nitric oxide, *Thromb Haemost*. 1993;70:36-41.

Rees DD, Palmer RMJ, Moncada S. Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure, *Proc Natl Acad Sci*. 1989;86:3375-3378.

Rees DD, Palmer RMJ, Schulz R, Hodson HF, Moncada S. Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo, *Br J Pharmacol*. 1990; 101:746-752.

Rössig L, Fichtlscherer B, Breitschopf K, Haendeler J, Zeiher AM, Mülsch A, Dimmeler S. Nitric oxide inhibits caspase-3 by S-nitrosation in vivo. *J Biol Chem* 1999 Mar 12;274(11):6823-6.

Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis - an update. *N Engl J Med.* 1986;324:488-500.

Sakuma I, Stuehr DJ, Gross SS, Nathon C, Levi R. Identification of arginine as a precursor of endothelium-derived relaxing factor, *Proc Natl Acad Sci.* 1988;85:8664-8667.

Saville B. A scheme for the colorimetric determination of microgram amounts of thiols, *Analyst.* 1958;83:670-672.

Scharfstein JS, Keaney JF, Slivka A, Welch GN, Vita JA, Stamler JS. In vivo transfer of nitric oxide between a plasma protein-bound reservoir and low molecular weight thiols, *J Clin Invest.* 1994;94:1432-1439.

Schmidt HHHW, Nau H, Wittfoht W, Gerlach J, Prescher K, Klein MM, Niroomand F, Böhme E. Arginine is a physiological precursor of endothelium-derived nitric oxide, *Eur J Pharmacol.* 1988;154:213-216.

Singh RJ, Hogg N, Joseph J, Kalyanaraman B. Mechanism of Nitric Oxide release from S-Nitrosothiols, *J Biol Chem.* 1996;271:18596-18603.

Simon DI, Stamler JS, Jakari O, Keaney JF, Osborne JA, Francis SA, Singel DJ, Loscalzo J. Antiplatelet properties of protein S-nitrosothiols derived from nitric oxide and endothelium-derived relaxing factor, *Arterioscl Thromb.* 1993;13:791-799.

Snyder SH, Brecht DS, Biological roles of nitric oxide, *Sci Am.* 1992, 266,68-77.

Stamler JS, Loh E, Roddy MA, Currie KE, Creager MA. Nitric oxide regulates basal systemic and pulmonary vascular resistance in healthy humans, *Circulation.* 1994;89:2035-2044.

Stamler JS, Jakari O, Osborne J, Simon DI, Keaney J, Vita J, Singel D, Valeri CR, Lascalo J. Nitric oxide circulates in mammalian plasma primarily as an S-nitroso adduct of serum albumin, *Proc Natl Acad Sci USA.* 1992a;89:7674-7677.

Stamler JS, Simon DI, Osborne JA, Mullins ME, Jakari O, Michel T, Singel DJ, Lascalo

J: S-nitrosation of proteins with nitric oxide: synthesis and characterization of biologically active compounds, *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992b;89:444-448.

Stamler JS, Jaraki O, Osborne J, Simon D, Keaney J, Vita J, Loscalzo J: S-Nitrosoalbumin is the predominant bioactive form of nitric oxide in human plasma, *Circulation*. 1992c;86 (Suppl. 4),3012.

Stamler JS: Redox Signaling: Nitrosylation and related target interactions of Nitric Oxide, *Cell*. 1994;78:931-936.

Thomas GD, Zhang W, Victor RG, Nitric oxide deficiency as a cause of clinical hypertension: promising new drug targets for refractory hypertension. *JAMA*. 2001; Apr 25;285(16):2055-7

Vanhoutte PM, Rubanyi GM, Miller VM, Houston DS, Modulation of vascular smooth muscle contraction by the endothelium, *Ann Rev Physiology*. 1986;48:307-320.

Walter U. Physiological role of cGMP and the cGMP-dependent protein kinase in the cardiovascular system. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*. 1989;113:41-88.

Williams DL: The mechanism of nitric oxide formation from S-Nitrosothiols (thionitrites), *Chem Commun*. 1996;1085-1091.

Wink DA, Cook JA, Pacelli R, Liebmann J, Krishna MC, Mitchell JB: Nitric Oxide (NO) protects against cellular damage by reactive oxygen species, *Toxicology Letters*. 1995;82/83,221-226.

6. Zusammenfassung

Stickstoffmonoxid (NO) ist in den letzten Jahren als Kreislaufregulator und biologischer Botenstoff in den Mittelpunkt des Interesses gerückt. Inzwischen gilt als sicher, dass NO an vielen Schlüsselstellen, nicht nur in der Kreislaufregulation, aber dort besonders, eine prominente Rolle spielt. Das Endothel als disseminiertes Organ betrachtet ist als Produktionsort des zu Beginn der Forschungen phänomenologisch „endothelium derived relaxing factor“ genannten NO scheinbar von größerer Bedeutung, als zunächst angenommen. Anstelle einer einfachen Gefäßauskleidung ist das Endothel Regulator vieler wichtiger Prozesse. Diskutierte Wirkungen reichen vom septischen Kreislaufversagen bei überschießender NO-Produktion, bis zur Atherosklerose bei gestörter Endothelfunktion mit verminderter NO-Produktion. Es gibt hier „gute“ und „böse“ Wirkungen, so das hier von einer Janusköpfigkeit, also Doppelgesichtigkeit, gesprochen wird. NO wird hier jeweils eine Schlüsselrolle als Botenstoff und Effektor zugewiesen. Bisher gibt es aber keine praktikablen Verfahren, um die effektive NO-Produktion zeitnah und in vivo zu quantifizieren. In der vorliegenden Arbeit ist im Anschluß an vorbestehenden Überlegungen und Verfahren eine Methode entwickelt worden, mit deren Hilfe Rückschlüsse auf die jeweilige Produktion und den Plasmaspiegel von NO gezogen werden können.

Stickstoffmonoxid hat eine Halbwertszeit von wenigen Sekunden im Plasma. Ein wichtiges Stoffwechselprodukt aus dem Abbau des freien NO sind S-Nitrosothiole. Freies NO geht eine Verbindung mit Thiolgruppen von Plasmaproteinen ein. Diese gebundene Form von NO ist relativ stabil und gilt als Plasmaspeicher von NO. Es kann aus dieser Verbindung wieder herausgelöst werden und liegt dann wieder als freies NO vor. In der vorliegenden Arbeit werden die Grundlagen geschaffen für ein Verfahren, mit dem der Plasmaspiegel von S-Nitrosothiolen bestimmt, und Rückschlüsse auf die NO Produktion gezogen werden können. Die Methode basiert auf dem Umstand, dass man mittels Metallionen, wie beispielsweise Kupferionen, S-Nitrosothiole zur Dekomposition bringen kann. Das freigesetzte NO wurde dann mittels einer amperometrischen NO-selektiven Sonde gemessen. Die zu erwartenden Konzentrationen sind sehr gering und einer verlässlichen Messung nur bedingt zugänglich, da die Abspaltung von NO aus hochmolekularen S-Nitrosothiolen, wie dem S-Nitrosoalbumin, nur sehr langsam abläuft. Günstiger ist die Zerfallskinetik von niedermolekularen S-Nitrosoverbindungen. Daher wird der Zwischenschritt der Transnitrosylierung, der Übertragung der Nitrosylgruppe von Albumin auf einen

niedermolekularen Baustein mit einer Nitrosogruppe, eingeschaltet.

Die Konzentrationen des zu messenden NO bleiben aber sehr gering, so dass die Minimierung der Störeinflüsse der Methodik einen großen Teil der Arbeit einnimmt.

Es konnte in dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass S-Nitrosoalbumin mittels des beschriebenen Verfahrens quantitativ bestimmbar ist. Eine Übertragung des Verfahrens auf Messungen im Blutplasma wird der Gegenstand weiterer Forschungen sein.

7. Anhang

7.1 Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, daß ich die dem Fachbereich Humanmedizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel

„Verfahren zur elektrochemischen Messung von Stickstoffmonoxid und S-Nitrosothiolen in Flüssigkeiten“

im Zentrum der Chirurgie der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main, Abteilung für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie unter der Leitung von Herrn PD. Dr. med. Wimmer-Greinecker mit Unterstützung durch Herrn Dr. G. Matheis, in Zusammenarbeit mit dem Institut für kardiovaskuläre Physiologie, Direktor Prof. Dr. R. Busse in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. A. Mülsch, ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- und ausländischen medizinischen Fakultät bzw. Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Frankfurt am Main, den 19.12.2001

7.2 Lebenslauf

für Jan-Dirk Wolff

Geburtsdatum: 15. Juli 1970

Geburtsort: Münster (Westf.)

Eltern: Theo Wolff und Elisabeth, geb. Esser

Schule: 1977-81 Katholische Grundschule Everswinkel
1981-90 Gymnasium Laurentianum Warendorf
28.05.90 Abitur

Studium: 10/90-9/91 Studium der Philosophie an der Heinrich-Heine-
Universität Düsseldorf
10/91-9/92 Studium der Naturwissenschaften an der Westfälischen
Wilhems-Universität Münster
seit 10/92 Studium der Humanmedizin an der Johann-Wolfgang-
Goethe-Universität Frankfurt am Main

Examina: 06.04.95 Ärztliche Vorprüfung
15.04.96 1. Staatsexamen
08.98 2. Staatsexamen
11.99 3. Staatsexamen

Berufserfahrung:

Famulaturen 7/95 Maria Theresia Klinik, München, Chirurgie
8/96-9/96 Uniklinik Düsseldorf, Kardiologie
8/97-9/97 Cedars-Sinai-Medical-Center, Los Angeles, Ca., USA,
Herz/Thorax-Chirurgie

Praktisches Jahr
10/98-10/99 Uniklinik Frankfurt und Uniklinik Siena, Italien

Ärztliche Tätigkeit
12/99-6/01 Assistenzarzt im Praktikum,
seit 7/01 Assistenzarzt, beides in der Klinik für Herz-, Thorax-
und thorakale Gefäßchirurgie der Uniklinik Frankfurt,
Direktor Herr Professor Dr. A. Moritz.

Frankfurt am Main, den 19.12.2001

7.3 Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstammt einer Zusammenarbeit der Klinik für Herz-Thorax- und Gefäßchirurgie und dem Institut für Physiologie. Daher gilt mein besonderer Dank Herren Professores Moritz und Mülsch für die Vergabe des Themas und die Bereitstellung der hervorragenden Arbeitsbedingungen, sowie meinen Betreuern den Herren PD. Dr. Wimmer-Greinecker, Dr. Matheis und Herrn Professor Mülsch, für die ständige Gesprächsbereitschaft und praktische Mithilfe.

Sowohl im Labor der Abteilung für Herz-Thorax- und Gefäßchirurgie, der Chirurgie als auch der Physiologie, haben viele kluge und praktische Geister bei der Ausführung dieser Arbeit, auf so viele unterschiedliche Weisen mitgeholfen, daß ich jetzt hier auf eine Aufzählung verzichte, mich aber für die geduldige, menschliche Art des Umgangs und die kompetenten Hinweise besonders bedanke.