

Aus der Medizinischen Poliklinik  
der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

Kommissarischer Direktor: Prof. Dr. M. Reincke  
Direktor emeritus: Prof. Dr. D. Schlöndorff

**Intraendothelialer Metabolismus von Tetrahydrobiopterin  
unter dem Einfluss atherosklerotischer Risikofaktoren -  
Zusammenhang mit der endothelialen Dysfunktion**

Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät  
der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von  
Robert Hilge aus Berlin  
2009

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

**Berichterstatter:**

**PD Dr. med. N. Weiss**

**Mitberichterstatter:**

**Prof. Dr. med. G. Eißner**

**Prof. Dr. med. N. Plesnila**

**Dekan:**

**Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR**

**Tag der mündlichen Prüfung:**

**15.01.2009**

*Meiner Familie.*

# Inhaltsverzeichnis

---

---

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1  Kardiovaskuläre Erkrankungen und endotheliale Dysfunktion.....	1
1.1.1  Schwierigkeiten bei Prävention und Therapie atherosklerotischer Erkrankungen .....	1
1.1.2  Endotheliale Dysfunktion .....	2
1.2  Die Rolle von Tetrahydrobiopterin.....	6
1.2.1  eNOS und Tetrahydrobiopterin.....	6
1.2.2  Synthese und Recycling von Tetrahydrobiopterin .....	7
1.2.3  Kardiovaskuläre Risikofaktoren und Tetrahydrobiopterin.....	9
1.3  Pteridinzufuhr .....	10
1.3.1  Tetrahydrobiopterinsupplementation .....	10
1.3.2  Sepiapterinsupplementation.....	12
1.4  Widersprüche und Limitationen bisheriger Studien .....	13
1.5  Ziel der Arbeit .....	15
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>16</b>
2.1  Material.....	16
2.1.1  Endothelzellen.....	16
2.1.2  Zellkulturmedien, Zusätze und fertige Pufferlösungen .....	16
2.1.3  Proteine und Enzyme .....	17
2.1.4  Chemikalien und fertige Lösungen .....	17
2.1.5  Kulturbehältnisse und Verbrauchsmaterialien.....	20
2.1.6  Technische Geräte.....	21
2.1.7  Software.....	22

<b>2.2</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>23</b>
2.2.1	Endothelzellkultur und Behandlungsmethoden.....	23
2.2.2	Gewinnung der Low Density Lipoproteine .....	27
2.2.3	Proteinmessung .....	28
2.2.4	Oxidation der Low Density Lipoproteine und Messung des Oxidationsgrades mit der TBARS-Methode.....	29
2.2.5	Bestimmung des intrazellulären Tetrahydrobiopterinspiegels mittels HPLC.....	31
2.2.6	Fluorometrische NO-Messung mit DAF-2.....	35
2.2.7	Statistik.....	43
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>45</b>
3.1	Intrazelluläre Tetrahydrobiopterinspiegel .....	45
3.1.1.	Tetrahydrobiopterinspiegel ohne Sepiapterinsupplementation .....	45
3.1.2.	Tetrahydrobiopterinspiegel nach Sepiapterinsupplementation .....	47
3.2.	NO-Produktion .....	50
3.2.1.	NO ohne Sepiapterinsupplementation .....	50
3.2.2.	NO nach Sepiapterinsupplementation mit 100 µM.....	53
3.2.3.	NO nach Sepiapterinsupplementation mit 10 µM.....	55
3.2.4.	NO unter aufsteigenden Sepiapterinkonzentrationen .....	57
3.2.5.	NO nach Tetrahydrobiopterinsupplementation.....	58
3.2.6.	NO nach PKC-Stimulation mit PMA.....	61
3.2.7.	NO nach Behandlung mit Tiron .....	64
<b>4.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>67</b>
4.1	Bewertung der Methodik.....	67
4.2	Zusammenhänge von intrazellulärem Tetrahydrobiopterinspiegel und endothelialer NO-Produktion .....	69
4.2.1	Auswirkungen proatherogener Bedingungen .....	69
4.2.2	Auswirkungen exogener Pteridinzufuhr .....	74
4.2.3	Konsequenzen für die Interpretation vorheriger Studien und Planung zukünftiger Untersuchungen .....	80
4.2.4	Mögliche Rolle von Phosphokinase C und Superoxidanionen.....	85
4.3.	Limitationen der aktuellen Arbeit.....	91

<b>5. Zusammenfassung der Arbeit.....</b>	<b>92</b>
<b>6. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>95</b>
<b>Tabellenanhang .....</b>	<b>111</b>
<b>Erklärung häufig verwendeter Abkürzungen .....</b>	<b>123</b>
<b>Danksagung .....</b>	<b>125</b>
<b>Lebenslauf.....</b>	<b>126</b>

“When the first stunning revelations about the many roles of nitric oxide (NO) in normal physiology began to appear in the literature a little more than a decade ago, those of us who had been studying NO's toxic effects were sceptical. It seemed unlikely that such a simple diatomic radical, whose status as a noxious air pollutant and toxic cigarette smoke constituent had long been known, could possibly be a natural anticoagulant, vasodilator, neurotransmitter, and mediator of immune system function - to name only a few of the bioregulatory phenomena that have been attributed to NO.”

Larry K. Keefer, 1998 [68]

### **1.1 Kardiovaskuläre Erkrankungen und endotheliale Dysfunktion**

#### **1.1.1 Schwierigkeiten bei Prävention und Therapie atherosklerotischer Erkrankungen**

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind in den Industrienationen weiterhin die häufigste aller Todesursachen und verantwortlich für einen großen Teil der Gesamtmorbidität. In den USA sterben mehr Menschen an kardiovaskulären Erkrankungen als an den vier nächsthäufigsten Todesursachen zusammen. Es entstehen zudem dadurch jährlich Kosten von 400 Milliarden US-Dollar [145]. Atherosklerotische Gefäßerkrankungen, vor allem die koronare Herzerkrankung mit über 50%, nehmen hierunter den allergrößten Teil ein. In Deutschland fanden sich kardiovaskuläre Erkrankungen auf den ersten vier Plätzen in der Todesursachenstatistik (chronisch ischämische Herzerkrankung 10,1%, Herzinsuffizienz 7,4%, akuter Myokardinfarkt 6,3% und Schlaganfall 4,3%) [13].

Dabei setzen therapeutische Strategien präventiv bislang meist nur bei der Behandlung der bekannten Risikofaktoren wie Hypercholesterinämie, Nikotinabusus, Diabetes mellitus und arterielle Hypertonie an, solange diese vor klinischer Manifestation der atherosklerotischen Erkrankung überhaupt erkannt werden. Andere, wie z.B. familiäre Belastung, sind bislang überhaupt nicht zu beeinflussen. Darüberhinaus sind etwa 30% der atherosklerotischen Erkrankungen durch konventionelle Risikostratifizierung überhaupt nur unzureichend zu erklären [41].

So setzt die Behandlung oft erst ein, wenn die atherosklerotische Erkrankung, z.B. in Form von zerebraler Ischämie, Claudicatio intermittens, Angina pectoris, oder akutem

Myokardinfarkt klinisch in Erscheinung getreten ist. Die Erstmanifestation der koronaren Herzerkrankung ist jedoch auch die Ursache von 50% aller Fälle des plötzlichen Herztodes [99, 165].

In jedem Fall ist es wichtig zu verstehen, dass es sich zu diesem Zeitpunkt schon um eine sehr weit fortgeschrittene Erkrankung handelt, bei der symptomatische Therapie und Behandlung von Komplikationen, sei es medikamentös oder interventionell, im Vordergrund stehen, selbst wenn dann alle Risikofaktoren optimal behandelt werden.

Wir wissen heute, dass diesem Stadium eine viele Jahre oder sogar Jahrzehnte dauernde, meist asymptomatische Phase vorausgeht, in der an den Blutgefäßen deutliche Zeichen der gestörten Funktion nachzuweisen sind [17, 117]. Dies ist bereits der Fall, lange bevor sich typische atherosklerotische Veränderungen wie Plaques, Stenosen oder Gefäßverschlüsse finden.

Motivation für Grundlagenforschung über dieses Stadium der Gefäßfehlfunktion ist es deshalb stets, möglicherweise mittelfristig bereits dann in pathologische Mechanismen eingreifen zu können, bevor es zur Ausbildung einer manifesten Atherosklerose kommt.

Charakteristisches Merkmal dieses frühen Zustandes ist unter anderem die verminderte arterielle Vasodilatation auf verschiedene Stimuli wie Scherstress, postischämische Hyperämie oder Acetylcholin [2, 22].

An zentraler Stelle steht hierbei das Endothel, weshalb die pathologischen Phänomene unter dem Begriff der endothelialen Dysfunktion zusammengefasst werden.

### **1.1.2 Endotheliale Dysfunktion**

Das gesunde Endothel spielt eine entscheidende Rolle in der Aufrechterhaltung der normalen Gefäßfunktion. Von ihm gehen die Regulation des Gefäßtonus, die Aufrechterhaltung wichtiger antithrombotischer und fibrinolytischer Eigenschaften sowie wichtige Signale für Proliferation und Apoptose anderer Gefäßzellen aus [27].

An zentraler Stelle der Vermittlung dieser Funktionen steht das von den Endothelzellen gebildete Signalmolekül Stickstoffmonoxid (NO), das erstmals 1978

von Robert F. Furchgott als endothelium derived relaxing factor (EDRF) beschrieben worden war [37]. Wie dieser Name impliziert, vermittelt es endothelabhängige Vasodilatation. Dies geschieht über eine Aktivierung der löslichen Guanylatcyclase und damit eine Erhöhung des intrazellulären cGMP-Spiegels in glatten Gefäßmuskelzellen [33]. Mittlerweile sind jedoch noch eine Reihe weiterer wichtiger Funktionen bekannt: So hemmt NO die Plättchenaggregation und die Adhäsion von Leukozyten an das Endothel über Interaktion mit Leukozytenadhäsionsmolekülen (CD11/18) [93] und Hemmung der Expression von endothelialen Adhäsionsmolekülen [115, 149]. Es konnten außerdem inhibitorische Effekte auf DNA-Synthese, Mitogenese und Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen gezeigt werden [34]. Darüberhinaus wurde nachgewiesen, dass NO in der Lage ist, Oxidation von Low Density Lipoproteinen (LDL) zu verhindern [121].

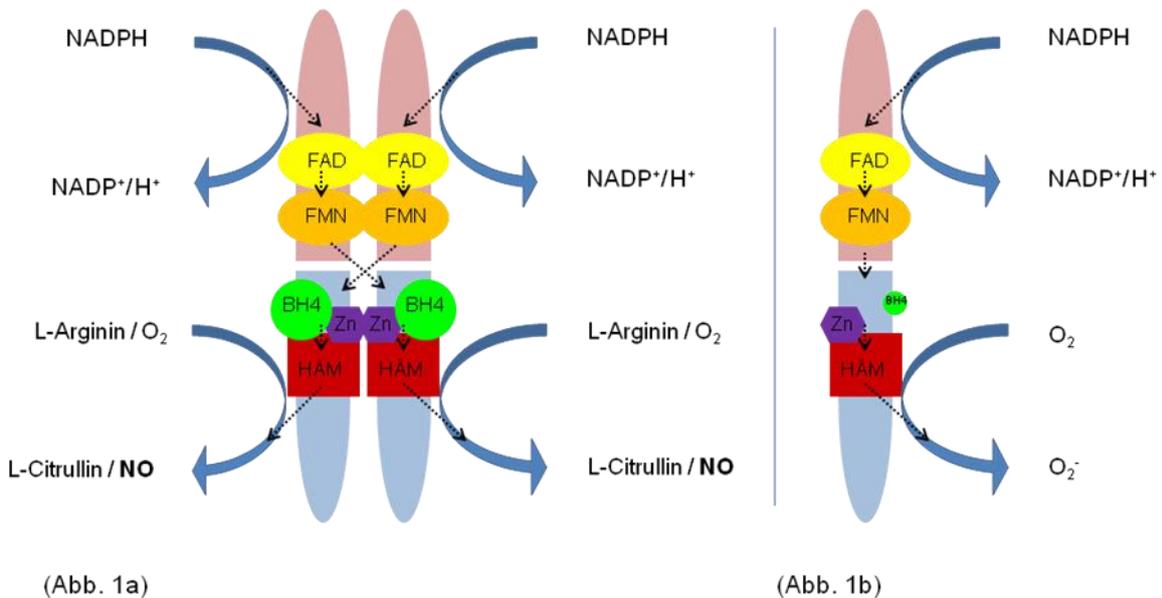
NO wirkt also auf einer Vielzahl von Ebenen den verschiedenen Schritten der Atheroskleroseentwicklung entgegen, begonnen von Lipidoxidation, Leukozytenadhäsion an das Endothel und Extravasation von Entzündungszellen, Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen mit Fibrosebildung bis hin zur Thrombusbildung. NO stellt somit eine herausragende endogene gefäßprotective Substanz dar.

Das Vorhandensein einer endothelialen Dysfunktion gemessen an einer verringerten NO-vermittelten Vasodilatation erwies sich auch in einer Reihe klinischer Studien als starker Prädiktor für die Entwicklung einer Atherosklerose und bei Individuen mit und ohne bereits vorhandener Atherosklerose als Prädiktor für kardiovaskuläre Ereignisse [44, 123, 141].

Das NO-bildende Enzym ist die NO-Synthetase (NOS), von der drei Isoformen existieren. Vor allem in Nervengewebe findet sich die neuronale Form (nNOS), in glatten Muskelzellen und Leukozyten die mit iNOS bezeichnete induzierbare und in Endothelzellen die mit eNOS bezeichnete konstitutiv exprimierte endotheliale Form [85].

NOS besitzt eine dimere Struktur. Unter physiologischen Bedingungen wird Nicotinamiddinukleotidphosphat (NADPH), Flavinmononukleotid (FMN) und Flavinadenindinukleotid (FAD) an eine C-terminale Reduktasedomäne des einen Monomers gebunden, die mit einer N-terminalen Oxygenasedomäne des anderen Monomers in Verbindung steht. Diese Oxygenasedomäne beinhaltet einen zentralen

Häm-Komplex und bindet den wichtigen Kofaktor (6R-)5,6,7,8-Tetrahydrobiopterin (BH4), molekularen Sauerstoff und das Substrat L-Arginin (siehe Abb. 1a).



**(Abbildung 1) eNOS in seiner physiologischen Form als Dimer (Abb.1a) und unter pathophysiologischen Bedingungen als Monomer, z.B. bei verringerter BH4-Bioverfügbarkeit (Abb. 1b)**

(NADPH: Nikotinadenindinukleotidphosphat in reduzierter Form; NADP<sup>+</sup> : in oxidiert Form; H<sup>+</sup>: Proton; O<sub>2</sub>: molekularer Sauerstoff; NO: Stickstoffmonoxid; FMN: Flavinmononukleotid; FAD: Flavinadenindinukleotik; BH4: Tetrahydrobiopterin; Zn: Zinc im Zinc-Thiolatkomplex; O<sub>2</sub><sup>•-</sup>: Superoxidradikal; .....> : Richtung des Elektronenflusses; ■ : Reduktasedomäne; ■ : Oxygenase-domäne)

Die wichtigste Bindungsstelle für Tetrahydrobiopterin an dieser Stelle stellt ein Cysteinmolekül innerhalb eines zentralen interdimeren Zinc-Thiolat-Clusters dar [34], wahrscheinlich sind aber auch Sequenzen nahe dem Cysteinliganden an der L-Arginin- und Tetrahydrobiopterinbindung beteiligt .

Die NO-Synthetase katalysiert in dieser Form einen flavinvermittelten Elektronenfluss von dem NADPH des C-terminalen Endes auf das Häm des N-terminalen Endes. Hier werden die Elektronen auf O<sub>2</sub> übertragen. In einem ersten Schritt wird dabei L-Arginin zu N-hydroxy-L-Arginin hydroxyliert. In einem zweiten Schritt wird N-hydroxy-L-Arginin oxidiert und es entstehen die Endprodukte L-Citrullin und NO [34].

Unter bestimmten Bedingungen kann es zu einer Dissoziation der dimeren Enzymstruktur kommen (Abb. 1b). Die Elektronen werden dann vom Sauerstoff nicht mehr weiter auf das N-hydroxy-L-Arginin übertragen. Es entsteht dann  $O_2^-$  statt NO, bzw. Peroxynitrit ( $OONO^-$ ) als ein Reaktionsprodukt aus  $O_2^-$  und vorhandenem NO. Man spricht bei diesem Phänomen von einem „NOS-uncoupling“ [166].

Dies ist ein postulierter Mechanismus, wie es zu einer Verminderung der Bioverfügbarkeit von NO unter pathophysiologischen Bedingungen kommen kann. So konnte ein NOS-uncoupling in Endothelzellkultur unter hyperglykämieimitierenden Bedingungen und in Endothelzellen aus Gefäßsegmenten von Patienten mit Diabetes mellitus nachgewiesen werden [43, 53]. Hinweise auf ein solches uncoupling zeigen sich auch unter Einwirkung von nativem und oxidiertem LDL [139] und Homocystein [148].

Ein weiterer Mechanismus, der an einer Verringerung der NO-Bioverfügbarkeit beteiligt zu sein scheint, sind erhöhte Spiegel des endogenen kompetitiven NOS-Inhibitors asymmetrisches Dimethylarginin (ADMA), wie sie unter Einfluss von oxidiertem LDL durch vermehrte Produktion und verminderten Abbau von ADMA auftreten [9, 20, 21, 60].

Darüber hinaus hatten sich Hinweise ergeben, dass unter bestimmten Bedingungen auch eine verminderte Bereitstellung des Substrates L-Arginin auftreten kann, z.B. durch Störung intraendothelialer Transportmechanismen [67] oder unter Einwirkung vermehrter Mengen von Sauerstoffradikalen durch eine gestörten L-Argininverwertung [155].

Letztendlich kann natürlich auch eine direkte oxidative Inaktivierung von NO durch Sauerstoffradikale eine Rolle spielen.

Die Expression von eNOS hingegen scheint unter dem Einfluss kardiovaskulärer Risikofaktoren eher gesteigert zu sein [83].

Bezüglich der Frage in welchem Ausmaße und in welchem Zusammenspiel die genannten Phänomene beteiligt sind, herrschen weiterhin viele Unklarheiten.

In den vergangenen Jahren ist nun ein weiterer Mechanismus in den Blickwinkel der wissenschaftlichen Aufmerksamkeit geraten. Dabei wird davon ausgegangen, dass unter proatherogenen Bedingungen einer verminderten Verfügbarkeit des eNOS-

Kofaktors Tetrahydrobiopterin als Ursache einer reduzierten NO-Produktion eine besondere Bedeutung zukommt.

## 1.2 Die Rolle von Tetrahydrobiopterin

### 1.2.1 eNOS und Tetrahydrobiopterin

Tetrahydrobiopterin (BH<sub>4</sub>) wurde erstmals 1963 als Kofaktor der Phenylalaninhydroxylase beschrieben [66]. Es wurde dann im weiteren Verlauf als Kofaktor weiterer Hydroxylasen aromatischer Aminosäuren erkannt. Ein angeborener Tetrahydrobiopterinmangel ist Ursache einer diätresistenten Hyperphenylalaninämie und der sogenannten Dopa-sensitiven Dystonie, die beide mit schweren Störungen der zentralnervösen Neurotransmitterproduktion einhergehen [129, 137]. Der eindeutige Nachweis einer BH<sub>4</sub>-Abhängigkeit der endothelialen NO-Synthetase gelang erst 1992 [125].

Dabei ist Tetrahydrobiopterin bei der physiologischen Funktion der NO-Synthetase an verschiedenen Stellen beteiligt. Es nimmt Einfluss auf den Zustand des Häm-Moleküls und verstärkt dadurch die L-Argininbindung und die dimere Enzymstruktur [97], es erhöht die Substrataffinität und nimmt selbst am Elektronentransfer teil, indem es temporär die Gestalt eines BH<sub>3</sub>-Radikals annimmt. Die Stabilisierung des Dimers ist besonders gut für die induzierbare NO-Synthetase untersucht [107]. Auch die Teilnahme des Eisenmoleküls an dem Elektronenfluss bei der Produktion von NO ist von einem Elektron des BH<sub>4</sub> abhängig. Es bildet sich sonst ein Eisen-II-Sauerstoffkomplex, der Superoxidanionen generiert [97]. Auch der funktionsfähige Zustand des Häm-Molekül hängt maßgeblich von der Anwesenheit des BH<sub>4</sub> ab [1, 156]. Darüber hinaus besitzt BH<sub>4</sub> selber antioxidative Eigenschaften und kann so in der Umgebung der NO-Synthetase entstehende Sauerstoffradikale neutralisieren [79, 119].

Auf die Folgen eines funktionellen uncoupling der beiden Enzymdomänen wurde bereits hingewiesen. Eine Untersuchung dieses Phänomens unter in-vivo Bedingungen ist jedoch sehr schwierig.

Im hyperphenylalanininen Mausmodell, dessen Tiere nur 10% der Aktivität des BH<sub>4</sub>-bildenden Schlüsselenzyms GTP-Cyclohydrolase (s.u.) besitzen, konnte jedoch eine

verminderte NO- und vermehrte  $O_2^-$ -Produktion als Hinweis auf ein uncoupling nachgewiesen werden [23].

Analog konnte durch GTP-Cyclohydrolasehemmung auch eine endotheliale Dysfunktion, gemessen an einer verminderten Vasorelaxation, in caninen Koronar- und Basilararterien induziert werden [25, 71].

In Zellkultur konnte umgekehrt nach Gentransfer von GTP-Cyclohydrolase und konsekutivem Anstieg des intrazellulären BH<sub>4</sub>-Spiegels eine vermehrte Dimerisierung mit vermehrter NO-Produktion eindrücklich beschrieben werden [14].

Der essentielle Charakter von Tetrahydrobiopterin für die physiologische Funktion der NO-Synthetase ist also von mehreren Seiten her gut belegt.

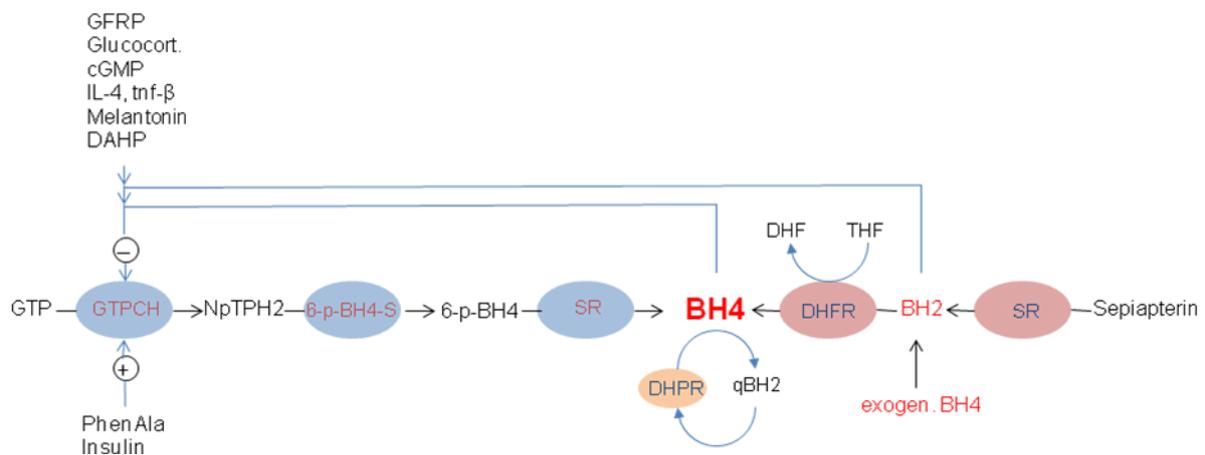
### 1.2.2 Synthese und Recycling von Tetrahydrobiopterin

BH<sub>4</sub> kann entweder de novo synthetisiert oder über einen Recyclingweg regeneriert werden (siehe Abb. 2). Bei der Synthese dient Guanosintriphosphat (GTP) als Ausgangsstoff, aus dem in insgesamt drei Schritten über die Zwischenprodukte 7,8-Dihydroneopterintriphosphat und 6-pyruvoyl-5,6,7,8-Tetrahydrobiopterin BH<sub>4</sub> entsteht. Die entsprechenden Enzyme sind die Guanosintriphosphatcyclohydrolase (GTPCH), die 6-pyruvoyl-5,6,7,8-Tetrahydrobiopterinsynthase und die Sepiapterinreduktase [89]. Die GTP-Cyclohydrolase stellt das geschwindigkeitslimitierende Enzym dar [39]. Magnesium, Zink und NADPH sind als Kofaktoren beteiligt. Das Enzym wird durch ein Regulatorprotein inhibiert, dem GTP-Cyclohydrolase feedback regulatory protein (GFRP) und im Sinne eines negativen feed-back Mechanismus durch das Endprodukt BH<sub>4</sub>; ferner durch Glucocorticoide [63, 92], cyclisches Guanosinmonophosphat und hohe Dihydrobiopterinspiegel [74]. Ferner durch Interleukin-4, Tumornekrosefaktor- $\beta$ , Melantonin und dem synthetischen Hemmstoff 2,4-diamino-6-Hydroxypyrimidin, der in dieser Arbeit noch eine Rolle spielen wird.

Aktivitätssteigerung bewirken Phenylalanin und Insulin via einem von Phosphoinositol-3-Kinase abhängigem Mechanismus [97]. Eine vermehrte Expression des Enzyms bewirken 17- $\beta$ -Estradiol [95], Calcium, HMG-CoA-Reduktaseinhibitoren und verschiedene Zytokine wie Interferon- $\gamma$  und Interleukin-1 $\beta$

[57] sowie einige weitere Hormone und Wachstumsfaktoren (follikelstimulierendes Hormon, epidermal growth factor, nerve growth factor, platelet-derived growth factor und vasointestinales Peptid [97]).

Der Recyclingweg, oder *salvage pathway*, dient der Regeneration von Tetrahydrobiopterin aus oxidierten Pteridinprodukten. Dies ist auch der Weg wie exogen zugeführte Pteridine dem Tetrahydrobiopterinpool zugeführt werden können.



**(Abbildung 2) BH4-Synthese und salvage pathway**

(GTP: Guanosintriphosphat; NpTP: 7,8-Dihydroneopterin; 6-p-BH4: 6-pyrovoyl-5,6,7,8-Tetrahydrobiopterin; BH4: Tetrahydrobiopterin; BH2: Dihydrobiopterin; GTPCH: Guanosintriphosphatcyclohydrolase; 6-p-BH4-S: 6-pyrovoyl-5,6,7,8-Tetrahydrobiopterinsynthetase; SR: Sepiapterinreduktase; DHFR: Dihydrofolatreduktase; DHF: Dihydrofolat; THF: Tetrahydrofolat; qBH2: Quininoid-Dihydrobiopterin, DHPR: Dihydropteridin-Reduktase; GFRP: GTP-Cyclohydrolase feedback regulatory protein; cGMP: cyclisches Guanosinmonophosphat; IL-4: Interleukin-4; tnf-β: Tumornekrosefaktor-β; DAHP: 2,4-diamino-6-hydroxypyrimidin; PhenAla: Phenylalanin)

So kann das stabilere Sepiapterin durch das Enzym Sepiapterinreduktase in Dihydrobiopterin überführt werden. Letzteres kann dann durch die Dihydrofolatreduktase unter dem Verbrauch von Tetrahydrofolsäure in Tetrahydrobiopterin reduziert werden [101]. Der salvage pathway ist jedoch nicht in der Lage einen durch verminderte primäre Synthese entstandenen Tetrahydrobiopterinmangel zu kompensieren [8, 31, 42, 101]. Schlussendlich kann durch Einwirkung von Sauerstoffradikalen entstandenes Quininoid-Dihydrobiopterin (qDH2) durch das Enzym Dihydropteridin-Reduktase (DHPR) wieder in BH4

umgewandelt werden, es ist jedoch nicht bekannt, ob dieser Weg für die Überführung von exogenen Pteridinen in den BH<sub>4</sub>-pool eine Rolle spielt.

### 1.2.3 Kardiovaskuläre Risikofaktoren und Tetrahydrobiopterin

Drei wesentliche Mechanismen für eine verminderte Bioverfügbarkeit von Tetrahydrobiopterin unter dem Einfluss kardiovaskulärer Risikofaktoren sind denkbar.

So könnte es zu einer verminderten Synthese oder zu einem vermehrten Abbau kommen oder BH<sub>4</sub> könnte in irgendeiner Form aus seiner Bindung am Zinc-Thiolat-Komplex verdrängt oder seine Affinität dort vermindert werden.

Eine gängige Hypothese geht von der allgemein anerkannten Beobachtung aus, dass es unter dem Einfluss verschiedener proatherogener Risikofaktoren zu einem erhöhten Anfall reaktiver Sauerstoffspezies kommt [110]. Von Letzteren ist bekannt, dass sie

- eine verringerte GTP-Cyclohydrolaseexpression verursachen [164],
- das sowohl für die de novo Synthese als auch für das Recycling notwendige NADPH vermindern [128],
- die am salvage pathway beteiligte Tetrahydrofolatreduktase hemmen [18], und
- eine BH<sub>4</sub>-Oxidation hervorrufen [72, 160].

Das so vermehrt anfallende Dihydrobiopterin kann die GTP-Cyclohydrolaseaktivität über den schon erwähnten Rückkopplungsmechanismus weiter hemmen [74] und außerdem Tetrahydrobiopterin aus seiner Bindung am Zinc-Thiolat-Komplex kompetitiv verdrängen [40]. Hierdurch werden über ein uncoupling wiederum vermehrt reaktive Sauerstoffspezies gebildet, die erneut BH<sub>4</sub> inaktivieren können. Ein circulus vitiosus ist so denkbar.

Tatsächlich ist unter Einwirkung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> auch experimentell in Endothelzellkultur ein verminderter intrazellulärer Tetrahydrobiopterinspiegel und eine verminderte NO-Produktion bei gleichzeitig vermehrter O<sub>2</sub><sup>-</sup>-Produktion nachzuweisen [11].

Unter dem Einfluss von supraphysiologischen Glucosekonzentrationen konnte ebenfalls ein verminderter Tetrahydrobiopterinspiegel zusammen mit einer verminderten Menge GTP-Cyclohydrolase mRNA und GTP-Cyclohydrolaseaktivität in

bovinen aortalen Endothelzellen gemessen werden, der zu einer verminderten NO- und einer vermehrten  $O_2^-$ -Produktion führte [30]. Diese Ergebnisse wurden von einer anderen Arbeitsgruppe bestätigt und die pathologischen Phänomene konnten durch einen GTP-Cyclohydrolase Gentransfer kompensiert werden [14].

Eine Verminderung des intrazellulären Tetrahydrobiopterinspiegels konnte auch an Aortenringen hypercholesterinämischer Hasen und an mit Fruktoseüberladung ernährten Ratten nachgewiesen werden [135, 152]. Der genaue molekulare Mechanismus bleibt aber hypothetisch.

## **1.3 Pteridinzufuhr**

### **1.3.1 Tetrahydrobiopterinsupplementation**

In Kenntnis der Möglichkeit externe Pteridine in den salvage pathway einzuschleusen, lag es nahe zu versuchen, auf diesem Wege auch pathologische Phänomene unter dem Einfluss proatherogener Risikofaktoren zu beeinflussen.

In der bereits zitierten Arbeit über mit Fruktoseüberladung ernährte Ratten hatte sich ein erniedrigter Tetrahydrobiopterinspiegel in Aortenringen gefunden, der mit einer verminderten NO- und vermehrten  $O_2^-$ -Produktion einherging. Beides normalisierte sich nach exogener Tetrahydrobiopterinzufuhr [135].

Identische Befunde ergaben sich in einem hypertensiven Rattenmodell [26]. Im selben Modell konnte eine andere Arbeitsgruppe nach chronischer BH4-Zufuhr auch eine Normalisierung der verminderten Vasorelaxation und eine Verhinderung der Entwicklung einer arteriellen Hypertonie nachweisen [56].

Weitere Tierversuche konnten durch Tetrahydrobiopterininkubation in einem streptozocininduzierten diabetischen Rattenmodell eine Normalisierung der gestörten acetylcholinvermittelten Vasorelaxation an Aortenringen [111] oder im Modell der spontan diabetischen Mäuse eine Normalisierung der Endothelfunktion von Mesenterialarterien zeigen [109].

In einer erst kürzlich erschienenen Arbeit gelang es sogar in Apo-E-knock-out-Mäusen durch eine Tetrahydrobiopterinsupplementation die Entwicklung einer Atherosklerose zu verringern [46].

Bei Menschen konnte in einer Studien an Patienten mit familiärer Hypercholesterinämie eine deutliche Verbesserung der verschlussplethysmographisch gemessenen agoniststimulierten Unterarmdurchblutung gemessen werden, wenn Tetrahydrobiopterin und L-Arginin zusammen in die Brachialarterie infundiert wurden [140]. Mit der gleichen Methode gelang dies einer anderen Arbeitsgruppe auch bei chronischen Rauchern und Patienten mit Diabetes, hier sogar auch, wenn nur BH4 ohne L-Arginin infundiert wurde [48, 49]. Identische Resultate fanden sich bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz [131].

Bei chronischen Rauchern fand sich zudem eine Reversibilität der verminderten Vasorelaxation von Venenpräparaten der V. saphena magna nach BH4-Präinkubation [52].

In insgesamt drei Studien wurde BH4 direkt in die Koronararterien von Patienten mit und ohne koronare Herzerkrankung appliziert. Hier konnte einmal nur eine Verhinderung medikamentös ausgelöster Vasokonstriktion bewirkt werden, während BH4 alleine keinen vasodilatierenden Effekt hatte [87]. In einer anderen Studie konnte BH4 eine deutliche Verbesserung der agoniststimulierten Vasorelaxation bewirken, allerdings nur bei den Patienten, bei denen sie zuvor auch vermindert gewesen war [132]. Die dritte Studie verglich die Effekte von Patienten mit und ohne Hypercholesterinämie. Auch hier kam es zu einer Zunahme des koronaren Gefäßdiameters und des Blutflusses nach BH4-Gabe bei den hypercholesterinämischen Patienten, nicht aber bei jenen mit normalem Cholesterinspiegel [35].

In einer neueren Studie wurde eine längerdauernde orale Substitution bei Patienten mit Hypercholesterinämie durchgeführt. Auch hier fand sich in der Behandlungsgruppe eine verbesserte agoniststimulierte Unterarmperfusion gemessen mit der Verschlussplethysmographie [24].

Bei der Administration von BH4 als Pharmakon ergeben sich jedoch mehrere Probleme: Es ist in der Gegenwart von Sauerstoff nicht stabil [73] und wird somit unter Umgebungsbedingungen oder im Organismus praktisch sofort vollständig zu Dihydrobiopterin oxidiert [122]. Es musste deshalb bisher bei -20°C gelagert werden und hat zudem in den bisherigen oralen Zubereitungsformen einen sehr unangenehmen sauren Geschmack [97]. Erst seit kurzem ist eine stabilere Zubereitung verfügbar.

BH4 wird also nach Applikation aller Wahrscheinlichkeit nach sehr schnell vollständig zu Dehydrobiopterin oxidiert und als solches in den salvage pathway aufgenommen. Vermutlich könnte es in vollständig reduzierter Form auch gar nicht über die Zellmembran transportiert werden [45].

### **1.3.2 Sepiapterinsupplementation**

Um diese technischen Probleme zu umgehen war untersucht worden, ob nicht gleich eine teiloxydierte Form verabreicht werden könnte. Sepiapterin stellt eine solche stabile und daher einfacher zu handhabende Form dar. Im Tierversuch mit Mäusen war die Sepiapterinapplikation einer Tetrahydrobiopterin-Gabe sogar überlegen, was ein Anheben des intrazellulären Tetrahydrobiopterinspiegels betraf [45, 122].

In einer Vielzahl der Studien, in denen es um eine medikamentöse Anhebung des Tetrahydrobiopterinspiegels zu Beeinflussung der endothelialen Dysfunktion geht, ist seither Sepiapterin die bevorzugt verwendete Substanz.

Auf Ebene von Zellkulturversuchen konnte in koronaren Endothelzellen spontan diabetischer Ratten eine Anhebung des erniedrigten BH4-Spiegels und damit eine Normalisierung der NO-Produktion erreicht werden [90]. In einer sehr aktuellen Arbeit mit murinen mikrovaskulären Endothelzellen unter Einfluss erhöhter Glucosekonzentrationen konnte dies reproduziert und zusätzlich eine Abnahme des oxidativen Stresses gemessen werden [28]. In humanen Endothelzellen unter Einwirkung erhöhter Glucosekonzentrationen zeigte sich ebenfalls eine Verbesserung der NO-Synthese durch Sepiapterin [133]. In den beiden letztgenannten Arbeiten wurden allerdings keine BH4-Spiegel gemessen.

Der überwiegende Teil aller bisherigen Untersuchungen fand jedoch an Gefäßsegmenten von Versuchstieren statt: Hier konnte die herabgesetzte agoniststimulierte Vasorelaxation an Aorten apoE-defizienter Mäuse [80], an Mesenterialarterien spontan diabetischer Mäuse [108,109], an Grazilismuskulararteriolen von Ratten mit streptomycininduziertem Diabetes [5,6], an bovinen Koronararterien nach Glucosebelastung [102], an Koronararteriolen hypercholesterinämischer Schweine [147] und an Aortenringen hypercholesterinämischer Hasen durch Sepiapterin-Gabe normalisiert werden [152]. Nur in zwei dieser Arbeiten wurden dabei intrazellulärer Tetrahydrobiopterinspiegel gemessen [108, 152].

In entnommenen humanen Koronararteriolen von Patienten mit Arteriosklerose konnte ebenfalls eine Verbesserung agoniststimulierter Vasorelaxation durch Sepiapterinsupplementation erzielt werden [147].

Die selbe Autorin gibt deshalb in einem Editorial eine weit verbreitete Ansicht wieder, wenn sie schreibt „eine Manipulation des Tetrahydrobiopterinmetabolismus könnte vielversprechend sein, im Bezug auf eine zukünftige Behandlung der endothelialen Dysfunktion“ [146] (eigene Übersetzung).

## **1.4 Widersprüche und Limitationen bisheriger Studien**

Die These einer veränderten BH4-Bioverfügbarkeit als wesentliche Ursache der endothelialen Dysfunktion und damit der Begünstigung von Atherogenese ist ein attraktives Erklärungsmodell. Der Ansatz durch eine exogene Zufuhr von Vorläufersubstanzen wie Sepiapterin darauf Einfluss zu nehmen, erscheint durch die zitierten Untersuchungen auf den ersten Blick gerechtfertigt.

Dennoch ergeben sich bei genauer Durchsicht der Literatur erhebliche Widersprüche: So konnte eine Arbeitsgruppe entgegen der bisher aufgezählten Ergebnisse an humanen Mammaria-interna-Segmenten von Patienten mit kardiovaskulären Risikofaktoren durch Sepiapterin keine Verbesserung der agonistvermittelten Vasorelaxation bewirken [58]. Eine weitere Arbeitsgruppe fand an isolierter endothelialer NO-Synthetase durch Sepiapterinzugabe eine vermehrte Superoxidproduktion [153]. Weiter konnte gezeigt werden, dass Sepiapterin im Falle einer pharmakologischen eNOS-Hemmung die verminderte Vasorelaxation weiter reduzieren kann [91]. Sepiapterin hatte zudem keinen Effekt auf die Superoxidproduktion in diabetischen Ratten [12] und auf die NO- und Superoxidproduktion in eNOS-transduzierten humanen Arteriae carotides [144].

Tsutsui et al. fanden sogar an caninen zerebralen Arterien eine Verminderung der NO-Produktion und der Vasodilatation nach Sepiapterinsupplementation [151].

Eine sehr ausführliche, bereits zuvor zitierte Arbeit zeigte ebenfalls überraschend, dass Sepiapterininkubation von Aorten hypercholesterinämischer Hasen die gestörte Vasorelaxation trotz Korrektur des intrazellulären Tetrahydrobiopterinspiegels noch weiter verstärkte [152].

Diese Ergebnisse lassen erhebliche Zweifel daran aufkommen, dass die vorhandenen wissenschaftlichen Daten eine Anwendung von Sepiapterin als pharmakologisches Therapeutikum bereits ausreichend rechtfertigen können.

Hinzu kommt, dass die Evidenz auf zellulärer Ebene noch erhebliche Lücken aufweist und wesentliche Mechanismen des Tetrahydrobiopterinstoffwechsels unter der Einwirkung proatherogener Risikofaktoren noch lange nicht ausreichend verstanden sind.

Trotz der beeindruckenden Zahl an Veröffentlichungen, die sich mit diesem Thema beschäftigen, erstaunt z.B., dass in den wenigsten Fällen, in denen eine Verringerung des BH<sub>4</sub>-Spiegels angenommen wurde, dieser auch tatsächlich gemessen wurde. Hingegen wurde meist aus der Reversibilität pathophysiologischer Phänomene nach Sepiapteringabe auf einen vorherigen Mangel und einen anschließenden Anstieg geschlossen. So gab es bis vor kurzem keinen einzigen Zellkulturversuch, der eine Verringerung von BH<sub>4</sub> unter Einfluss von Cholesterin oder oxidiertem LDL nachweist. Erst zeitgleich mit der aktuellen Arbeit erschien eine Veröffentlichung, die eine Verringerung von Tetrahydrobiopterin unter Einfluss nativer Low Density Lipoproteine nachweist [24]. Für oxidierte Lipoproteine fehlt dieser Nachweis, ebenso existiert keiner an einer humanen Zelllinie.

Unter diabetischen Bedingungen sind es gerade drei Zellkulturversuche, und nur einmal ist in einem ein tatsächlicher Anstieg nach Supplementation mit Sepiapterin beschrieben worden. Der Nachweis an einer humanen Zelllinie fehlt auch hier völlig.

Deshalb findet sich bislang auch keine direkte Korrelation von Tetrahydrobiopterinspiegel mit NO-Produktion unter Einfluss von Risikofaktoren in humanen Endothelzellen vor und nach Sepiapteringabe.

Vor diesem Hintergrund muss die Frage unbeantwortet bleiben, ob es sich bei den tierexperimentellen und klinischen Studien nicht in einem Großteil der beobachteten Fälle um ganz unspezifische antioxidative oder vasodilatatorische Effekte der Tetrahydrobiopterin- oder Sepiapterintherapie handelt.

Ein letzter Kritikpunkt liegt in der Schwierigkeit begründet, zuverlässig NO direkt zu messen. So wurden, bis auf einzelne Ausnahmen, immer wenn NO-Produktion beurteilt wurde, eigentlich Folgeprodukte der NO-Produktion gemessen, wie z.B.

cGMP, Citrullin, Nitrat oder Nitrit. Hieraus wurde dann nachträglich stöchiometrisch auf die NO-Menge geschlossen (s.u.).

## 1.5 Ziel der Arbeit

Die aktuelle Arbeit soll daher in Kenntnis der oben genannten Wissenslücken folgende Fragestellungen ergänzend untersuchen:

- Reduzieren zwei der wichtigsten proatherogenen Risikofaktoren, oxidierte Low Density Lipoproteine und supraphysiologische Glucosekonzentrationen, im Vergleich zu Kontrollbedingungen den intrazellulären Tetrahydrobiopterinspiegel in kultivierten humanen Endothelzellen?
- Führt die Inkubation mit Sepiapterin, als Modell einer Sepiapterinsupplementation, trotz Exposition gegenüber proatherogenen Risikofaktoren, zu einer Steigerung intrazellulärer Tetrahydrobiopterinspiegel?
- Resultiert die Reduktion endothelialer Tetrahydrobiopterinspiegel durch Inkubation mit proatherogenen Risikofaktoren oder durch pharmakologische Inhibition der Biopterinbiosynthese den direkt gemessenen stimulierten zellulären NO-Output?
- Hat die Supplementation unterschiedlicher Sepiapterinkonzentrationen in nativen und mit proatherogenen Risikofaktoren inkubierten Zellen einen Einfluss auf den stimulierten NO-Output?
- Kann die Inkubation mit einem Superoxidanionfänger die durch Inkubation mit proatherogenen Risikofaktoren verringerte zelluläre Tetrahydrobiopterinkonzentration und den reduzierten zellulären NO-Output verhindern?
- Welchen Einfluss hat hierauf die Aktivierung der endothelialen NO Synthetase durch Aktivierung der zellulären Phosphokinase C?

# Kapitel 2

## Material und Methoden

---

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Endothelzellen

Humane Endothelzelllinie EA.hy 926

Prof. Dr. C.J. Edgell  
University of North Carolina  
Department of Pathology  
Chapel Hill, USA [32]

#### 2.1.2 Zellkulturmedien, Zusätze und fertige Pufferlösungen

Zellkulturmedium, „low glucose“  
Dulbecco's Modified Eagle Medium  
(D-MEM) , Glucose 1000 mg/l

Fa. Gibco, Karlsruhe, Deutschland

Zellkulturmedium, „high glucose“  
Dulbecco's Modified Eagle Medium  
(D-MEM), Glucose 4500 mg/l

Fa. Gibco, Karlsruhe, Deutschland

Fetales bovines Serum, endotoxinfrei  
(FBS)

Fa. Gibco, Karlsruhe, Deutschland

Penicillin/Streptomycin-Lösung  
(10000 units/ml/10000 µg/ml)

Fa. Gibco, Karlsruhe, Deutschland

Phosphate-buffered-Saline mit CaCl<sub>2</sub> und MgCl<sub>2</sub> 100 mg/l (PBS +/-)

Fa. Gibco, Karlsruhe, Deutschland

Phosphate-buffered-Saline ohne CaCl<sub>2</sub> und MgCl<sub>2</sub> (PBS -/-)

Fa. Gibco, Karlsruhe, Deutschland

### 2.1.3 Proteine und Enzyme

Bovines Serumalbumin (BSA)

Fa. Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

Trypsin-EDTA-Lösung 5%

Fa. Gibco, Karlsruhe, Deutschland

### 2.1.4 Chemikalien und fertige Lösungen

(6R)-5,6,7,8-Tetrahydrobiopterindihydrochlorid

Fa. Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

L-Sepiapterin

Fa. Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

2,4-Diamino-6-hydroxypyrimidin

Fa. Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

N<sub>ω</sub>-Nitro-L-Argininmethylesterhydrochlorid (L-NAME)

Fa. Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

Calcium Ionophore A23187  
(Diethyl-*N,N*-[(4*R*,5*R*)-4,5-dimethyl-1,8-dioxo-3,6-dioxaoctamethylene]bis(12-methylaminododecanoate))

Fa. Fluka, Buchs, Schweiz

Diethyl-NONOate (2-(*N,N*-Diethylamino)-diazenolate 2-oxid Natriumsalz)

Fa. Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

4,5-Diaminofluorescein (DAF-2)	Fa. Callbiochem, Nottingham, UK
Phorbol 12-myristat 13-acetat (PMA)	Fa. Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
4,5-Dihydroxy-1,3-benzenedisulfonat (Tiron)	Fa. Fluka, Buchs, Schweiz
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Fa. Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Reagenz A für Proteinbestimmung nach Lowry	Fa. Biorad Laboratories, Ismaning, Deutschland
Reagenz S für Proteinbestimmung nach Lowry	Fa. Biorad Laboratories, Ismaning, Deutschland
Reagenz B für Proteinbestimmung nach Lowry	Fa. Biorad Laboratories, Ismaning, Deutschland
Kupfer(II)-Sulfat	Fa. Fluka, Buchs, Schweiz
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Fa. Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Kaliumbromid	Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid	Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
Lugol'sche Lösung	Fa. Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Salzsäure	Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland

Natronlauge	Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
Ascorbinsäure	Fa. Herbeta, Berlin, Deutschland
Acetonitril	Fa. Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Kaliumphosphat	Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
1,1,3,3-Tetramethoxypropan- Malonaldehyd bis (dimethylacetat)	Fa. Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Thiobarbitursäure	Fa. Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Fa. Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Essigsäure	Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
3,5-Di-tert-butyl-4-hydroxytoluol (BHT)	Fa. Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
1-Butanol-Lösung	Fa. Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Pyrimidin-Lösung	Fa. Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

### 2.1.5 Kulturbehältnisse und Verbrauchsmaterialien

Zellkulturfläche (175 cm <sup>2</sup> , 550 ml)	Cellstar, Fa. Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturschale (Ø 10 cm x 2 cm)	Cellstar, Fa. Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
6-well-Zellkulturschale	Multidish 6 well, Fa. Nunc, Roskilde, Dänemark
Polypropylenteströhrchen (50 ml)	Cellstar, Fa. Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Polypropylenteströhrchen (15 ml)	Cellstar, Fa. Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Polypropylenteströhrchen (1 ml)	Fa. Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Ultrazentrifugationsröhrchen	QS PA Coulter Röhrchen Fa. Beckmann, München, Deutschland
7,5 ml-Blutabnahmeröhrchen	EDTA-Monovette, Fa. Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Reinigungs- und Entsalzungssäule Econo-Pac	Fa. Biorad Laboratories, Ismaning, Deutschland
Amicon Ultra-4 Centrifugal Filter Unit	Fa. Millipore, Bedford, USA
Sterilfilter Millex GP	Fa. Millipore, Bedford, USA
Pipettenspitzen	Fa. Eppendorf, Hamburg, Deutschland

### 2.1.6 Technische Geräte

Zellkulturschrank Heracell	Fa. Heraeus, Hanau, Deutschland
Sicherheitswerkbank HERAsafe	Fa. Heraeus, Hanau, Deutschland
Lichtmikroskop Axiovert 25	Fa. Zeiss, Jena, Deutschland
Pipettierhilfe Reference	Fa. Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge 1 GS 6 KR	Beckmann, Palo Alto, USA
Zentrifuge 2 Centrifuge 5402	Fa. Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Ultrazentrifuge L8-55M Rotor TI 50.2	Fa. Beckmann, Palo Alto, USA
Densitometer Density meter DMA48	Fa. AP Paar, Graz, Österreich
HPLC-Pumpe System Gold	Fa. Beckmann, Palo Alto, USA
Vorsäule LiChroCART 4-4	Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
Hauptsäule LiChroCART 250-4	Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
Fluorescent detector RF-10A XL	Fa. Shimadzu, Tokyo Japan
Photometer Ultrospec 3000	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland
Spectrofluorimeter L5 SS Fluorescens Spectrometer	Fa. PerkinElmer Life And Analytical Sciences, Inc, Waltham, USA

Ultraschallhomogenisator Sonifier Cell Disruptor	Fa. Branson Sonic Power Company Danbury, Connecticut, USA
pH-Meter 761 Calimatic	Fa. Knick, Berlin, Deutschland
Analysenwaage AE 240	Fa. Mettler-Toledo, Giessen, Deutschland
Temperierbad TS 2	Fa. IKA, Staffen, Deutschland
Absauger Vacusafe	Fa. Integra-Bioscience, Fernwald, Deutschland
Reagenzglasschüttler Reamix 2789	Fa. Karl Hecht, Sondheim, Deutschland

### **2.1.7 Software**

Textverarbeitung, Datenerfassung, Graphik: Microsoft Office 2007	Fa. Microsoft Deutschland, Unterschleißheim, Deutschland
Statistik: GraphPad InStat 3	Fa. GraphPad Software San Diego, USA
Graphik: SigmaPlot 9	Fa. Systat Software Erkrath, Deutschland
Referenzen/Bibliographie: Endnote 9.0	Fa. Thomson ResearchSoft Carlsbad, USA
Auswertungssoftware für Fluoreszenzspektrometrie: FL WinLab 4.0	Fa. PerkinElmer Life And Analytical Sciences, Waltham, USA

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Endothelzellkultur und Behandlungsmethoden

Alle Versuche wurden mit der humanen Endothelzelllinie EA.hy 926 durchgeführt, die 1983 durch die Fusion von humanen venösen Nabelschnurendothelzellen mit der Zelllinie A549 gewonnen worden waren und eine stabile humane Endothelzellcharakteristik aufweist [32]. Verwendet wurden die Kulturpassagen 34 bis 40.

Die Lagerung erfolgte in Dimethylsulfoxid bei  $-80^{\circ}\text{C}$ . Nach Auftauen wird die Zellsuspension in 5 ml DMEM Zellkulturmedium (+ 10 FBS, + 1% Penicillin/Streptomycin, low glucose 1000 mg/L) aufgenommen und rasch zentrifugiert (2000 U, 10 min,  $20^{\circ}\text{C}$ ), das entstandene Pellet in DMEN resuspendiert, verdünnt und in 550 ml Plastikzellkulturflaschen ausgesät.

Die weitere Kultur findet im Inkubator bei  $37^{\circ}\text{C}$  unter 5%  $\text{CO}_2$ -Atmosphäre und 100% Luftfeuchtigkeit statt. Ein Mediumwechsel wurde dreimal pro Woche durchgeführt.

Nach durchschnittlich zehn bis 14 Tagen hatten die Zellen einen konfluenten Monolayer ergeben. Es konnte nun die Teilung der Zellkultur erfolgen. Hierzu werden die Zellen zweimalig mit vorgewärmten PBS -/- (ohne Calcium und Magnesium) gewaschen und die adhärenen Zellen daraufhin mit je 1 ml Trypsinlösung abgelöst. Das Lösen der Zellen von der Kulturunterlage wird mechanisch durch Schwenken der Kulturflasche und Klopfen auf den Flaschenboden unterstützt. Lichtmikroskopisch wird kontrolliert, ob die Zellen ausreichend gelöst sind. Die Trypsinaktivität wird dann durch Zugabe des FBS-haltigen Kulturmediums gestoppt. Es folgt Zentrifugation (2000 U/min, 10 min,  $20^{\circ}\text{C}$ ) und Resuspension des Pellets sowie Aussaat der Zellen auf neue Kulturträger. Dabei wird die Zellsuspension aufgeteilt, zur Weiterkultur werden 250-ml- Plastikkulturflaschen benutzt, für die Versuche entweder einzelne Plastikkulturplatten (100x20 mm) oder sechs-well-Platten mit Kulturflächen von 4 cm Durchmesser.

Alle Arbeiten an den Zellkulturen wurden an einer kontaminationssicheren sterilen Werkbank mit laminarem Luftfluss und unter Unterdruckbedingungen durchgeführt.

Fünf Tage vor Versuchsdurchführung wurde ein Teil der Zellen als Modell diabetischer Stoffwechselbedingungen unter den Bedingungen einer supraphysiologischen (4,5 g/l) und der andere Teil unter physiologischen Glucosekonzentration (1 g/l) weiterkultiviert. Die Wahl fiel auf diese Konzentrationen zunächst der Einfachheit halber, weil sie von der entsprechenden Firma als fertige Medien angeboten werden, entspricht aber auch denen, die andere Arbeitsgruppen in ähnlichen Zellkulturversuchen verwendet haben [30, 138].

Die Wahl der zweiten proatherogenen Substanz fiel auf oxidierte Low Density Lipoproteine. Sie stellen einen der stärksten atherogenen Stimuli dar [16]. Am bekanntesten ist ihre Wirkung auf Makrophagen mit der folgenden Bildung von Schaumzellen und dem Auslösen einer zytokinvermittelten proinflammatorischen Antwort [163]. Aber auch als Auslöser einer verminderten NO-Bioverfügbarkeit und einer endothelialen Dysfunktion sind sie gut beschrieben [100]. Die hierbei beteiligten Mechanismen sind immer noch Gegenstand intensiver Forschung. Die Inkubation der Endothelzellen erfolgte in konfluentem Zustand 24 Stunden vor Versuchsdurchführung. Wir entschieden uns für eine Endkonzentration von 100 µg/ml, wie sie in vergleichbaren Zellkulturversuchen verwendet worden war [62].

Für jeden Versuch wurden parallel native Zellen belassen und ebenfalls 24 Stunden vor Versuchsdurchführung eine Negativkontrolle vorbereitet. Wir behandelten hierfür Zellen mit dem synthetischen GTP-Cyclohydrolase-Hemmstoff 2,4-Diamino-6-hydroxypyrimidin (DAHP) in einer Konzentration von 10 mM. In der Vergangenheit waren Konzentrationen zwischen 5 und 20 mM verwendet worden, um die endogene Tetrahydrobiopterinsynthese vollständig zu unterdrücken [125, 158].

DAHP als Hemmstoff der Biopterinbiosynthese wird schon sein Jahrzehnten in den verschiedensten Versuchsaufbauten verwendet. Aufgrund seiner offensichtlichen strukturellen Homologie mit dem GTP-Cyclohydrolase-Substrat GTP (siehe Abbildung 3) wurde stets eine kompetitive Hemmung angenommen. Erst in den letzten Jahren hatten sich durch Versuche am isolierten Enzym in An- und Abwesenheit des endogenen Inhibitors GTP-Cyclohydrolase feedback regulatory protein (GFPP) Hinweise darauf ergeben, dass die DAHP-Wirkung vor allem durch eine Aktivierung des GFRP zustande kommt [77].

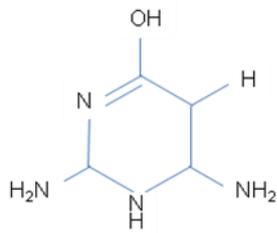


Abb. 3a

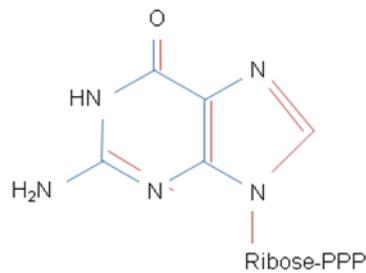


Abb. 3b

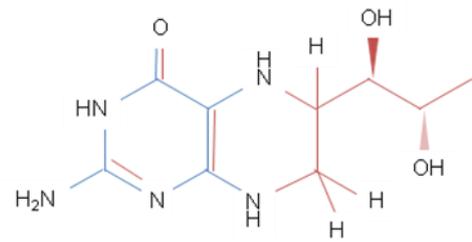


Abb. 3c

**(Abbildung 3) Strukturelle Ähnlichkeiten von a) Diaminohydroxypyrimidin, b) Guanosin triphosphat und c) Tetrahydrobiopterin**

Dabei ist die Lösung des DAHP nach Herstellerangaben nur in 1-normaler HCl-Lösung oder Dimethylsulfoxid (DMSO) möglich. Um störende Einflüsse des Lösungsmittels auf die kultivierten Zellen auszuschließen, versuchten wir jedoch eine Lösung in Zellkulturmedium, was schließlich gelang. Voraussetzung hierfür ist eine Erwärmung des Medium auf 37°C, eine Zeit für den Lösungsvorgang von etwa vier Stunden und wiederholtes mechanisches Mischen mittels Vortex sowie eine unmittelbare Verdünnung auf die oben genannte Endkonzentration. Beim Versuch zuerst eine höhere Konzentration herzustellen, fiel DAHP immer wieder aus.

Zur Untersuchung des Tetrahydrobiopterinspiegels unter Supplementation mit Sepiapterin wurden Zellen der oben genannten Behandlungsgruppen mit Sepiapterin in einer Endkonzentration von 100 µM inkubiert, wie es in ähnlichen Versuchsaufbauten vormals durchgeführt worden war [82, 152].

Sepiapterin lässt sich gut in Nährmedium lösen, so dass eine Verdünnung auf die angestrebte Konzentration ohne Probleme erfolgen kann.

Für die NO-Messung wurde mit 10 µM noch eine zweite Sepiapterinkonzentration untersucht, da es neben denen mit 100 µM auch andere Arbeiten gibt, die eine solche niedrigere Konzentration verwendet hatten [80, 105].

Zusätzlich wurde zum Vergleich die NO-Produktion von Zellen gemessen, die direkt mit Tetrahydrobiopterin, ebenfalls in einer Endkonzentration von 10 und 100 µM

behandelt worden waren. Dies entspricht den zwei häufigsten verwandten Konzentrationen in den zitierten zell- und gewebskulturellen Arbeiten mit Tetrahydrobiopterinsupplementation.

Alle Sepsiapterin- und Tetrahydrobiopterinlösungen wurden frisch vor Gebrauch aus tiefgefrorenem Pulver hergestellt.

Der Inkubationszeitraum bestand stets aus 24 Stunden vor Versuchsdurchführung.

Als weitere zusätzliche, über die Kernfragestellung hinausgehende Untersuchung sollte NO-Produktion unter dem Einfluss von Phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) gemessen werden. Diese ursprünglich als Tumorpromoter entwickelte Substanz ist in der Lage statt des physiologischen Signalmoleküls 1,2-Diacylglycerol eine Aktivierung der Phosphokinase C auszulösen [84]. Außerdem ist bekannt, dass es über eine Aktivierung der endothelialen Phosphokinase C eine erhöhte Transkription und Expression von eNOS mit einer folgenden Steigerung der NO-Produktion bewirkt [116]. Auch mit der von uns geplanten NO-Messmethode mittels Diaminofluorescein war PMA schon verwendet worden [81]. Die Anwendung erfolgte unter der Vorstellung, dass Unterschiede in der NO-Produktion unter den genannten proatherogenen Bedingungen sowie nach Sepsiapterin- und Tetrahydrobiopterinbehandlung nach PMA-Behandlung besser detektierbar werden würden.

Gemäß der oben zitierten Arbeit von Leikert et al. wählten wir deshalb eine PMA-Endkonzentration im Kulturmedium von 2 nM für 18 Stunden vor Versuchsdurchführung. Dabei wurden entsprechende PMA-Aliquots in PBS hergestellt, vor Zugabe zu den Zellkulturen ebenfalls in PBS vorverdünnt und dann in das Kulturmedium gegeben.

Um zu untersuchen, ob oxidativer Stress in Form von Superoxidradikalen einen Einfluss auf die NO-Produktion unter den besprochenen Bedingungen hat, wurde ein Teil der Zellen außerdem mit 4,5-Dihydroxy-1,3-benzenedisulfonat (Tiron) behandelt.

Diese Substanz wird vom Hersteller eigentlich zur Verwendung bei komplexometrischen Messungen und zur Metalltitration angeboten, findet aber in der vaskulären Forschung schon lange Verwendung als membranpermeabler Superoxidanionenfänger [96, 162]. Wir entschieden uns für eine vergleichsweise hohe Konzentration von 1 mM, wie sie aber auch in anderen zellkulturellen

Experimenten zum Nachweis superoxidvermittelter Effekte verwendet worden war [61].

Tiron ist gut wasserlöslich und wurde nach Vorverdünnung mit PBS zeitgleich mit den anderen verwendeten Substanzen 24 Stunden vor Versuchsdurchführung zu dem Zellkulturmedium gegeben.

### **2.2.2 Gewinnung der Low Density Lipoproteine**

Als Ausgangsmaterial für die Herstellung der oxidierten Low Density Lipoproteine diente EDTA-Blut von gesunden Probanden (Laborpersonal, ärztliche Kollegen). Die EDTA-Konzentration in der entnommenen Probe beträgt 1 mg/ml, die Proben wurden in 7,5 ml-Röhrchen gewonnen.

Die Isolation der LDL-Fraktion (Dichte 1,019-1,063 g/ml) erfolgte nach der Methode nach Havel durch isopyknische, sequentielle Ultrazentrifugation [47]. Durch Zentrifugation (3000 U, 15 min, 20°C) wird zunächst das Plasma von den korpuskulären Blutbestandteilen getrennt. Es folgen dann zwei Ultrazentrifugationsschritte. Für den ersten werden 7,7 ml des Plasma mit 4,7 einer Dichtelösung (15,5 g NaCl + 1000 ml H<sub>2</sub>O) von 1,006 g/ml versetzt. Die erzielte Dichte wird jeweils im Densitometer bei Raumtemperatur kontrolliert. Das Zentrifugationsröhrchen wird mit einem LötKolben verschlossen.

Diese Mischung aus Plasma und Dichtelösung wird dann mit 150000xg für 16 Stunden ultrazentrifugiert (40000 U/min., 16°C, Ultrazentrifuge L8-55M, Rotor TI 50.2, Fa. Beckmann, Palo Alto, USA). Es sammeln sich dadurch die VLDL und Chylomikronen im Überstand, die LDL- und HDL-Fraktion im Unterstand, welcher mit einem Schneidegerät abgetrennt werden kann.

Aus 0,9%iger Natriumchloridlösung und einer Dichtelösung (1,338 g/ml: 35,4 g Kaliumbromid + 15,3 g NaCl + 1000 ml H<sub>2</sub>O) wird dann eine erneute Lösung mit der Dichte 1,12 g/ml hergestellt. Davon werden 4,3 ml mit 7,8 ml des gewonnenen Volumens aus der ersten Ultrazentrifugation (UZ) versetzt. Nach erneuter UZ (40000 U/min., 22 h, 16 °C) finden sich dann die HDL im Unterstand und die Low Density Lipoproteine im Überstand, welcher zur Weiterverarbeitung abgetrennt wird.

Zur Entfernung möglicher EDTA- und Kaliumbromidreste wird die LDL-Lösung dann dreimal durch eine mit PBS voräquilibrierte Entsalzungs- und Reinigungssäule (Econo-Pac, Fa. Biorad, Ismaning, Deutschland) laufen gelassen. In einem Polyacrylgel werden hier alle Moleküle mit einem Molekulargewicht kleiner 6000 Dalton zurückgehalten.

Zu Beginn der Versuche hatten wir bereits nach diesem Schritt versucht, das LDL zu oxidieren. Dies gelang jedoch erst nach Einführung eines weiteren Reinigungsschrittes, weswegen wir davon ausgingen, dass durch die Entsalzungs- und Reinigungssäule das EDTA oder anderweitige antioxidative Substanzen aus der Blutprobe doch noch nicht ausreichend entfernt worden waren.

Wir verwendeten deshalb einen zusätzlichen Reinigungs- und Konzentrationsfilter mit einer Porengröße von 3000 Dalton (Amicon Ultra-4 Centrifugal Filter Unit, Fa. Millipore, Bedford, USA). Dieser kann auf einen 50 ml Plastiktube aufgesetzt werden. Durch Zentrifugation (3000 U/min., 45 min, 20°C, Zentrifuge 1 GS 6 KR, Rotor GH 3.8, Fa. Beckmann, Palo Alto, USA) kann so die Probe auf etwa ein Viertel ihres Ausgangsvolumens konzentriert und anschließend wieder mit PBS verdünnt werden. Diese Prozedur wiederholten wir fünfmal.

### **2.2.3 Proteinmessung**

Die Bestimmung der Konzentration der LDL-Lösung fand wie üblich bezogen auf den Proteingehalt statt. Wir verwendeten hierbei die Methode nach Lowry [86]. Dabei findet zuerst eine Biuretreaktion statt, bei der je zwei Peptidbindungen in alkalischer Lösung mit Kupfer(II)-Ionen einen tief blau-violetten Komplex bilden. Um die Sensitivität des Nachweises zu erhöhen kombinierte Lowry die Biuretreaktion mit einem zweiten Schritt: Dabei reduziert der zuerst entstandene Komplex weiter ein Folin-Ciocalteu Reagenz (Molybdän- und Wolfram-Heteropolysäuren), so dass eine blaue Farbe entsteht, die sensitiv photometrisch erfasst werden kann.

Nach Erstellung einer Standardkurve mit Albumin, wird darauf die Konzentration der Probe abgelesen und für die Versuche mit PBS auf eine Konzentration von 0,5 mg/ml eingestellt.

Die Messung des Proteingehaltes und Einstellung der Konzentration wurde insgesamt zweimal durchgeführt, einmal nach Isolation des LDL und den zwei Reinigungsschritten und einmal nach erfolgter Oxidation und Bestimmung der TBARS (s.u.).

#### **2.2.4 Oxidation der LDL und Messung des Oxidationsgrades mit der TBARS-Methode**

Zur Oxidation inkubierten wir die gewonnene LDL-Lösung (1 mg/ml) mit Kupfer(II)-Sulfat in einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  für 24 Stunden (37°C) wie vormals beschrieben [142]. Die Reaktion wird anschließend durch Zugabe von EDTA (Endkonzentration 1 mM) gestoppt. Zur Entfernung des Kupfersulfats und des EDTAs muss dann vor Versuchsdurchführung die Reinigung der Lösung mittels Biorad-Säule, wie oben beschrieben, wiederholt werden.

Erfolgreiche Oxidation ist schon makroskopisch an einem Farbumschlag der gelblichen LDL-Lösung nach weißlich zu erkennen. Bei einzelnen Durchgängen war eine Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  nicht ausreichend, was an einem ausbleibenden Farbumschlag zu erkennen war. Hier musste die Kupfer(II)-Sulfat-Konzentration z.T. auf 15 bis 20  $\mu\text{M}$  erhöht werden.

Die Quantifizierung des Grades der Oxidation der LDL-Lösung fand mit Hilfe der sogenannten TBARS-Methode statt, wobei TBARS für thiobarbitursäurereaktive Äquivalente steht. Schon in den 50er Jahren machte man sich bei zum Nachweis oxidierten Lipiden das Phänomen zu Nutze, dass als Oxidationsprodukt von Fettsäuren entstehende Aldehyde mit Thiobarbitursäure farbige Komplexe bilden. Als Erstbeschreiber gilt Sidwell 1954 [136]. Später entstanden daraus verschiedene Protokolle zur quantitativen Berechnung des Oxidationsgrades [104, 106, 161], die seither in modifizierter Form verwendet werden [70, 94]. Uns dienten vor allen die Arbeiten von Schuh und Kosugi als Vorlage [78, 127]. Das Maß der Lipidoxidation wird hierbei an Hand einer mit Malondialdehyd erstellten Standardkurve bestimmt (Abb. 4).

Diese Bestimmung basiert auf der Reaktion von zwei Molekülen Thiobarbitursäure (TBA) und einem Molekül Malondialdehyd (MDA) unter dem Einfluss von Hitze in



Bei unseren Messungen fanden sich im Mittel 33  $\mu\text{M}$  TBARS, bezogen auf den Proteingehalt der Lösungen ergab dies ein Ergebnis von 16 nmol/mg (siehe Tabelle 1).

Messwert	Protein	TBARS	TBARS/Prot.
<b>Mittelwert</b> (n = 6)	2,0 (0,21)	33 (3,23)	16 (0,42)
Einheit	mg/ml	$\mu\text{M}$	nmol/mg

**(Tabelle 1) Ergebnisse der Quantifizierung thiobarbitursäurereaktiver Substanzen als Grad der Oxidation nach Behandlung der Low Density Lipoproteine mit Kupfersulfat**

(Angabe als Mittelwert mit Standardfehler in Klammern)

Der Grad der Oxidation lag damit bei allen verwendeten oxLDL-Proben im Bereich dessen, was in der Literatur für vergleichbare Versuche angegeben wird [143, 157].

Bei der Herstellung der Probenansätze und Messung der TBARS ist ein Arbeiten unter Luftabzug notwendig (einschließlich der photometrischen Messung), da Dämpfe der Lösungsmittel und starke Gerüche der Chemikalien, insbesondere des Pyrimidins, aufsteigen.

Zuletzt erfolgt Sterilfiltration der LDL-Lösung und Aufbewahrung im Kühlschrank bei 4°C.

### **2.2.5 Bestimmung des intrazellulären Tetrahydrobiopterinspiegels mittels HPLC**

Bei der Bestimmung von Tetrahydrobiopterin ergeben sich zwei wesentliche Probleme: Zum Einen ist die voll reduzierte Form nicht stabil genug um ohne Verluste in einem analytischen Prozess vollständig in seiner unoxidierten Form gemessen werden zu können und zum Zweiten liegt es intrazellulär in unbehandelten Zellen in einer sehr niedrigen Konzentration, nämlich im nanomolaren Bereich vor.

Erst 1980 gelang es Fukushima et al. ein Protokoll zur Bestimmung zu entwickeln, das seither mit geringen Veränderungen Verwendung findet [36, 103, 159]. Er bediente sich hierbei der Methode der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl. High Performance Liquid Chromatography, HPLC). Dabei machte er sich das Phänomen zu nutze, dass Tetrahydrobiopterin und Dihydrobiopterin im sauren Milieu vollständig als Biopterin vorliegen, welches fluorimetrisch erfasst werden kann. Unter basischen Bedingungen wird das Tetrahydrobiopterin jedoch zu nichtfluoreszierenden Verbindungen degradiert, während Dihydrobiopterin bestehen bleibt. Aus der Differenz der Messwerte in Salzsäure und Natronlauge lässt sich also BH4 quantitativ berechnen. Es sind also für jede Tetrahydrobiopterinbestimmung zwei Messdurchläufe notwendig.

Bei der HPLC wird eine zu messende Substanz in einer mobilen Phase, dem Eluent, aufgenommen und mit einem definierten Fluss durch eine Säule geströmt, in der sich eine stabile Phase befindet. Im Falle unserer Messungen findet eine sogenannte C18-Säule Verwendung, in deren Inneren sich ein im Sinne eines Octadecylsilan verändertes Silicagel befindet. Da hier also, anders als im herkömmlichen HPLC-Aufbau eine unpolare stationäre Phase und ein polares Eluent verwendet wird, spricht man von reversed phase HPLC (RP-HPLC). Zum Schutz der Hauptsäule vor zu starker Verunreinigung ist in unserem Aufbau noch eine Vorsäule zwischengeschaltet.

Je nach Polarität der Bestandteile der Lösung kommt es in der Säule zu unterschiedlich starken Interaktionen mit der unpolaren Oberfläche des Säuleninneren und die Bestandteile treten dadurch mit unterschiedlicher zeitlicher Verzögerung wieder aus der Säule hervor. Anhand dieser unterschiedlichen Retentionszeiten findet eine Auftrennung der einzelnen Bestandteile der Lösung statt. Diese können nach Anregung mit einer bestimmten Wellenlänge und nach Messung ihrer Abstrahlung durch einen UV- oder Fluoreszenzdetektor als Peaks aufgezeichnet werden. Durch Messung einer bekannten Referenzsubstanz kann der Peak der zu bestimmenden Substanz identifiziert werden. Da Peakhöhe oder auch Fläche des Peaks mit der Konzentration der Substanz korrelieren, kann nach Erstellung einer Standardkurve mit bekannten Konzentrationen die Konzentration der zu bestimmenden Substanz berechnet werden.

Bei der Messung des zellulären Tetrahydrobiopterinspiegels werden die behandelten Zellen zunächst wie zuvor beschrieben von ihrer Unterlage gelöst. Die abgelösten Zellen werden dann in PBS +/- aufgenommen, zu je zwei Aliquots mit gleicher Zelldichte geteilt und zentrifugiert (2000 U/min, 10 min, 20°C). Die Pettets werden dann in je 500 µl einmal saurer (0,02 M KI/I<sub>2</sub> in 0,1 M HCl) und einmal alkalischer (0,02 M KI/I<sub>2</sub> in 0,1 M NaOH) Kaliumiodidlösung resuspendiert.

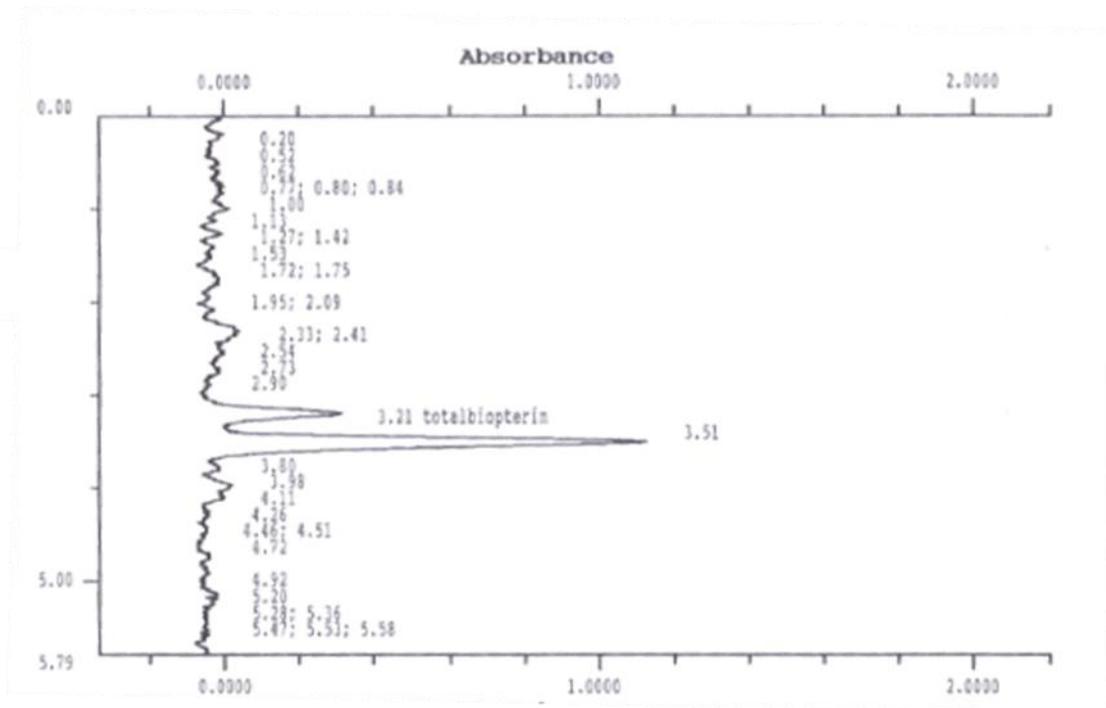
Es folgt eine Lyse und Homogenisierung der Zellsuspension mittels Ultraschallkavitation (30 sec, duty cycle 30%, output control 3, Sonifier 250, Fa. Branson, USA), welche wegen Wärmeentstehung auf Eis durchgeführt wird. Es wird dann jeweils ein kleines Aliquot der Proben zur späteren Proteinbestimmung beiseite gestellt und das verbleibende Homogenat 90 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert.

Anschließend wird das überschüssige Kaliumiodid durch Zugabe von 15 µl Ascorbinsäure-Lösung (0,2 M) neutralisiert. Nach erneuter Zentrifugation werden je 10 µl der Proben mittels einer Pumpe (System Gold, Fa. Beckmann) und über eine Vorsäule (LiChroCART 4-4, Länge 4 mm, Innendurchmesser 4 mm, Füllpartikelgröße 5 µm, LiChrospher 60 RP-select B, Fa. Merck, Darmstadt) in die Hauptsäule (LiChroCART 250-4, Länge: 250 mm, Innendurchmesser 4 mm, Füllpartikelgröße 5 µm, LiChrosphere RP 18, Fa. Merck Darmstadt) injiziert.

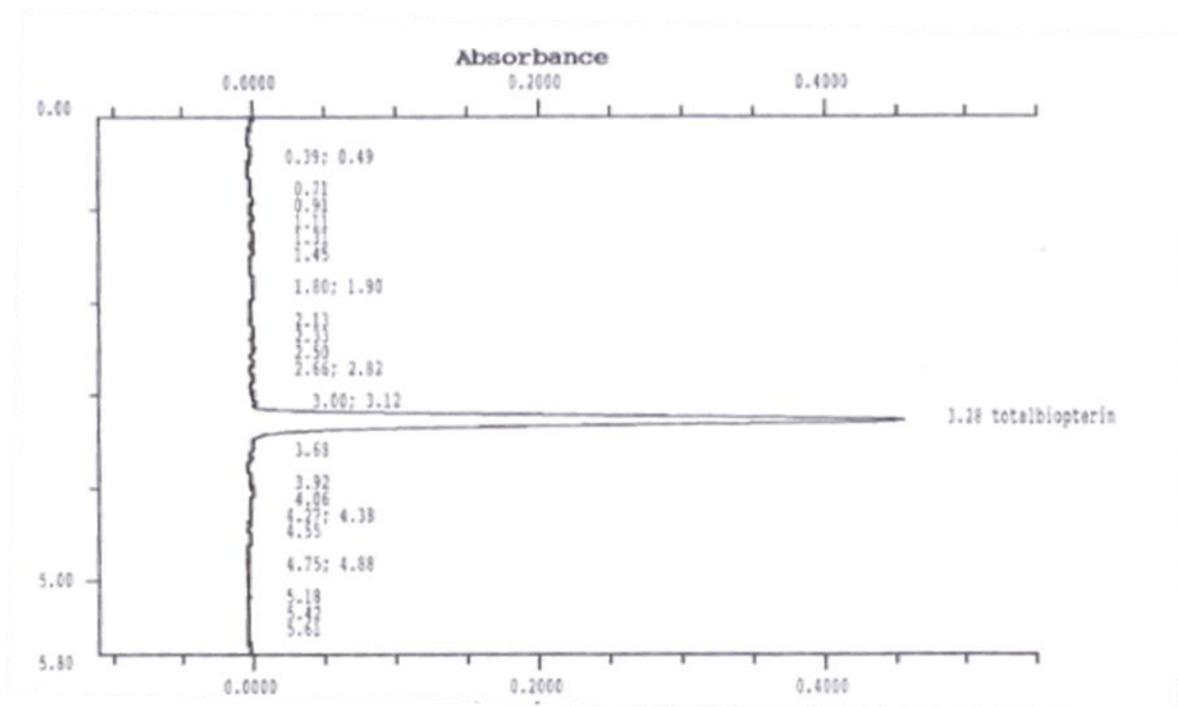
Als Eluent wird dabei ein Kaliumphosphat-Puffer (pH 6,4) in einer Konzentration von 15 mM mit 5% Acetonitril und einer Flussrate von 1,3 ml/min verwendet.

Die einzelnen Bestandteile der Lösung treten nun gemäß ihrer unterschiedlichen Retentionszeiten aus der Säule heraus. Die nach Exzitation mit einer Wellenlänge von 350 nm entstehenden Emissionspeaks werden bei 440 nm durch den Fluoreszenzdetektor (Fluorescent detector RF-10A XL, Fa. Shimadzu, Tokyo Japan) erfasst.

Mit Hilfe der Standardkurve wird der zu der Dihydrobiopterin- und Gesamtbiopterinemission gehörende Peak identifiziert und die entsprechenden Konzentrationen im Verhältnis zur Fläche unter der Kurve abgelesen.



(Abb. 5a)



(Abb. 5b)

(Abbildung 5) Beispiele zweier HPLC-Chromatogramme im Rahmen der Tetrahydrobiopterinbestimmung, a) Gesamtbiopterin, b) Gesamtbiopterin nach Sepiapterinsupplementation 100  $\mu$ M (Wegen des unterschiedlichen Messbereiches mit unterschiedlichen Geräteeinstellungen)

Bei sehr niedrigen Peaks oder Verschmelzung zweier nahe beieinander liegender Peaks kann es gelegentlich hilfreich sein das Signal zu „spiken“. Hierzu wird eine bekannte Konzentration der zu messenden Substanz mit durch die Säule perfundiert. Der entstehende Peak kann dann besser identifiziert werden, die bekannte Konzentration muss dann von der gemessenen Konzentration abgezogen werden. Zur besseren Standardisierbarkeit haben wir in die Auswertung allerdings nur „ungespikete“ Messungen aufgenommen.

Die Messung des Tetrahydrobiopterinspiegels wurde unter jeder Bedingung fünfmal, mit Zellen von jeweils unterschiedlichen Kulturplatten und an jeweils unterschiedlichen Tagen durchgeführt.

Zusätzlich wurden die gewonnenen Ergebnisse der Tetrahydrobiopterinspiegel noch auf den Proteingehalt des Zelllysats der Kulturplatten bezogen. Die Proteinkonzentration dient dabei als ein Maß für die Zellmenge der einzelnen Platten. Zwar war es unsere Beobachtung, dass ausreichend konfluente Platten einen sehr homogenen Zellrasen aufwiesen, so dass man auch die reine BH<sub>4</sub>-Konzentration im Zelllysats als direkte Aussage über den intrazellulären Tetrahydrobiopterinspiegel betrachten kann, man erreicht aber dennoch durch den Bezug auf die Proteinmenge in pmol/mg eine gewisse Korrektur für eventuelle Ungleichheiten der Zellzahl pro Kulturplatte. Dieser Vorteil muss jedoch abgewogen werden, gegen in diesem Fall möglicherweise zusätzlich auftretenden Messfehler bei der Proteinbestimmung. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte dabei nach der bereits beschriebenen Methode nach Lowry. Ebenso wie bei den DAF-2-Messungen wurde sich im Ergebnisteil, aus Gründen der besseren Übersichtlichkeit, auf die üblichere Angabe der Ergebnisse bezogen auf Protein in pmol/mg beschränkt. Alle Ergebnisse einschließlich der Darstellung als reine Konzentrationen sind im Tabellenanhang wiedergegeben.

### **2.2.6 Fluorometrische NO-Messung mit DAF-2**

Auch die quantitative Messung von NO ist anspruchsvoll, da es sich um eine ausgesprochen flüchtige und hochreaktive Substanz handelt, die von der endothelialen NO-Synthetase noch dazu nur in sehr niedriger Konzentration produziert wird.

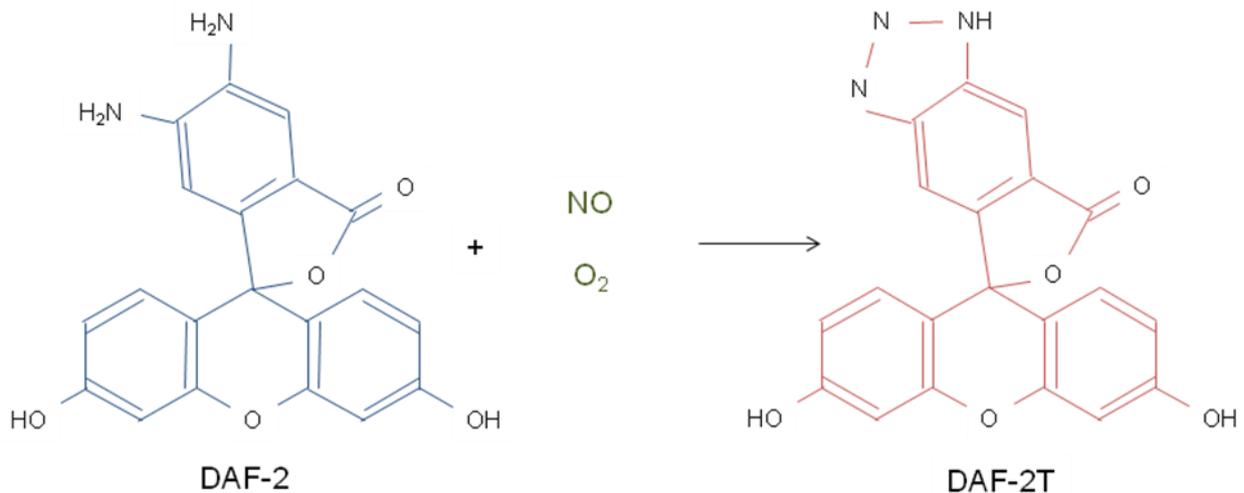
In der wissenschaftlichen Praxis finden verschiedene Ansätze Anwendung. Am häufigsten wird NO indirekt über entstehende Folgeprodukte nachgewiesen.

Da aus einem Mol L-Arginin je ein Mol NO und ein Mol Citrullin entstehen, wird oft durch den Nachweis von Citrullin [120] stöchiometrisch auf die NO-Konzentration rückgeschlossen. Hier wird allerdings vorausgesetzt, dass Citrullin bis zur Messung von den Zellen nicht relevant weiter metabolisiert wird. Noch problematischer ist der Nachweis des second messenger cGMP [98]. Hier muss die Intaktheit der Signalkaskade einschließlich unbeeinflussbarer Aktivität der Guanylatcyclase und konstanter Konzentration an Kofaktoren angenommen werden, was insbesondere unter pathophysiologischen Bedingungen fraglich erscheint. Außerdem ist der maßgebliche Produktionsort von cGMP im Gefäß die glatte Muskulatur, so dass dieser Nachweis in einer isolierten Endothelzellkultur nicht in Frage kommt. Auch der Nachweis der NO-Reaktionsprodukte Nitrat und Nitrit ist störanfällig, da sowohl die quantitative Bildung der zwei Substanzen als auch deren Nachweismethoden von verschiedenen Faktoren beeinflusst werden können, insbesondere den in Zellkulturen häufig vorhandenen SH-Gruppen [150]. Auch das Reaktionsprodukt Oxy-Hämoglobin wird zeitweise zum Nachweis verwandt, besitzt aber den Nachteil geringer Spezifität, da Oxy-Hämoglobin ebenso aus der Reaktion von Hämoglobin mit anderen Substanzen hervorgehen kann, z.B. mit Peroxynitrit oder Nitrit [124].

Eine direktere Detektion von NO findet in der Elektronenspinresonanz-Messung (EPR) durch Nachweis von Molekülen mit ungepaarten Elektronen [51] und mit der ISO-NO-Elektrode statt [59]. Beide sind sehr spezifisch und zumindest letztere auch sehr sensitiv, setzen aber eine sehr umfangreiche und teure Ausrüstung voraus.

Alle genannten Methoden haben also relevante Nachteile.

1998 gelang es Kojima et al. Fluoreszenzfarbstoffe zu entwickeln, die schnell, unmittelbar und stabil mit NO reagieren [76]. Der am häufigsten verwendete dieser Farbstoffe ist 4,5-Diaminofluoreszin (DAF-2), welches mit NO zu der stark fluoreszierenden Substanz Triazolofluoreszin (DAF-2T) reagiert (siehe Abb. 6).



**(Abbildung 6) Reaktion von Diaminofluoreszin (DAF-2) mit Stickstoffmonoxid und Sauerstoff zu Triazolfluoreszin (DAF-2T)**

DAF-2T strahlt nach Photoexcitation ein Fluoreszenzspektrum ab, von dem bestimmte Wellenlängen mit konzentrationsabhängiger Intensität fluorimetrisch erfasst werden können. Es stellt damit einen praktikablen Direktnachweis dar, der aus unserer Sicht einige der oben genannten Nachteile anderer Methoden umgeht.

DAF-2 kann entweder extrazellulär mit NO reagieren, oder es kann als membranpermeables Diaminofluoreszindiazetat (DAF-2 DA) in die Zellen geschleust werden um intrazelluläres NO zu messen [81]. Letzteres erlaubt eine Untersuchung der intrazellulären NO-Produktion mit einfacher Fluoreszenzmikroskopie oder FACS.

Wir entschieden uns jedoch für die Messung des extrazellulären NO. Zum einen sahen wir im extraendothelialen Raum den Hauptwirkungsort des NO, zum anderen waren Zweifel an der Genauigkeit der intrazellulären Messung und der Verdacht eines möglicherweise störenden Einflusses intrazellulärer zweiwertiger Ionen bei der Reaktion von DAF-2 nach DAF-2T aufgekommen [81]. Die extrazelluläre Messung ist daher möglicherweise verlässlicher. Da NO ein frei über die Zellmembran diffusibles Molekül ist, kann davon ausgegangen werden, dass die intra- und extrazellulären Konzentrationen ohnehin in einem quantitativen Gleichgewicht stehen, und die extrazelluläre Messung damit eine gute Beurteilung der Gesamt-NO-Produktion zulässt.

Bezüglich der NO-Messung mit DAF-2 in Endothelzellkultur verdienen die Überarbeitungen von Leikert et al. große Anerkennung [81]. Erst durch seine

Arbeiten entstand ein zuverlässiges Protokoll zur Erfassung von NO in sehr niedrigen Konzentrationen ( $< 1 \mu\text{M}$ ). Seine Leistung bestand einmal im Herausarbeiten einer DAF-Konzentration, bei der das Verhältnis aus Eigenfluoreszenz zu Fluoreszenz nach Reaktion mit NO in einem so günstigen Verhältnis steht, dass eine sensitive NO-Messung möglich wird. Dabei muss die DAF-2-Konzentration sehr niedrig gewählt werden ( $0.1 \mu\text{M}$ ). Zum anderen gelang es ihm durch Subtraktion der DAF-2-Eigenfluoreszenz, ein lineares Verhältnis von Fluoreszenzmesswerten und NO-Konzentration auch in niedrigen Bereichen zu erzielen.

Zur Durchführung wird am Versuchstag zunächst das benötigte DAF-2-Reagenz hergestellt. Es erfolgt dazu die Verdünnung der DAF-2-Stocklösung ( $5 \text{ mM}$ ) auf eine Konzentration von  $0,1 \mu\text{M}$ . Darin wird L-Arginin, als Substrat der NO-Synthetase in einer Endkonzentration von  $100 \mu\text{M}$  verdünnt. Zuletzt wird in einer Endkonzentration von  $10 \mu\text{M}$  Calcium Ionophor A23187 zugesetzt. Dieses ist in der Lage durch die Auslösung eines Calciumeinstroms in die Zelle und eine Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern eine kurzfristige Aktivitätssteigerung der NO-Synthetase und somit der NO-Produktion zu bewirken [75, 113]. Es wird schon lange im Rahmen von NO-Messungen verwendet. Man spricht deshalb von der Messung einer agoniststimulierten NO-Produktion als Parameter der endothelialen Funktion. Die Unterschiede unstimulierter endothelialer NO-Produktion liegen unter der Nachweisgrenze der meisten Messmethoden [4].

Schon bei der Vorbereitung des Reagenz sowie bei allen weiteren Schritten ist es wichtig, dass in größtmöglicher Dunkelheit gearbeitet wird, da es ansonsten zur einem Ausbleichen des Fluoreszenzfarbstoffes kommen kann [76].

Ein Teil des DAF-Reagenz wird nun zur Inkubation der Proben verwendet, der andere Teil für die Erstellung der Standardkurve zurückgelegt.

Zuerst findet eine Präinkubation der Negativkontrolle statt. Dafür werden pro Versuchsdurchgang zwei wells mit dem  $\text{N}_\omega$ -Nitro-L-Argininmethylesterhydrochlorid (L-NAME) in einer Endkonzentration von  $2 \text{ mM}$  vorinkubiert. L-NAME ist ein L-Arginin-Analogon, das statt L-Arginin an die NO-Synthetase binden aber nicht zur Produktion von NO verwendet werden kann. Es stellt somit einen kompetitiven NOS-Inhibitor dar und wird als solches schon lange experimentell eingesetzt [118].

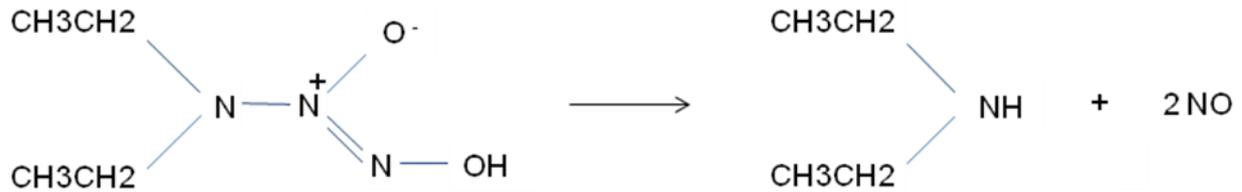
Anschließend werden alle wells zweimal mit PBS +/- gewaschen, um eventuell bei der DAF-Reaktion störende Reste der Behandlungssubstanzen oder des Kulturmediums zu entfernen und eine Äquilibration der Zellen zu erreichen.

Es wird dann pro well 1 ml des DAF-Reagenz zugegeben. Diese Menge wurde gewählt, um eine noch ausreichende Bedeckung der Zellen bei gleichzeitig möglichst kleinem Volumen zu erzielen, so dass für die anschließende Messung eine möglichst hohe NO-Konzentration entsteht.

Zu dem Reagenz auf den Zellen der Negativkontrolle wird wieder L-NAME in der o.g. Konzentration zugefügt. Es folgt dann eine Inkubation der Zellen mit dem Reagenz für 60 Minuten im Brutschrank bei 37°C.

In der Zwischenzeit wird mit dem zweiten Teil des DAF-Reagenz eine Standardkurve vorbereitet. Wir stellen deshalb eine Verdünnungsreihe mit Diethyl-NONOate (1µM/750/500/375/250/187,5/125/93,8/62,5/46,9/31,3/23,4/15,6/11,7/7,8/5,9/3,9/2,9/2nM) her. Bei Diethyl-NONOate (2-(N,N-Diethylamino)-diazennitrat 2-oxid Natriumsalz) handelt es sich um einen etablierten NO-Donor, wie er häufig als Referenzsubstanz verwendet wird [69]. Diethyl-NONOate zerfällt in wässriger Lösung und bei einem pH von 7,4 mit einer Halbwertszeit von zwei Minuten zu NO und einem verbleibenden Amin. Dabei würden theoretisch zwei Mol NO und ein Mol des Amins entstehen (siehe Abb. 7). Die tatsächliche Menge an entstehendem NO beträgt jedoch nur 1,5 Mol pro Mol, da nicht das gesamte Diethyl-NONOate die Reaktion durchläuft [68].

Von den Endothelzellen wird das DAF-2-Reagenz nach Inkubation abpipettiert. Die verbleibenden Zellen werden bis zur anschließenden Proteinmessung mit PBS +/- bedeckt. Nach Zentrifugation des Reagenz von den Zellkulturen in Eppendorf cups (2000 U/min, 5 min, 16°C) wird der Überstand abgenommen und die entstandenen Proben zusammen mit denen der Standardkurve fluorimetrisch gemessen.



(Abbildung 7) Theoretischer Zerfall von 1 Mol Diethyl-ONOate in wässriger Lösung zu Diethylamin und 2 Mol Stickstoffmonoxid (Effektiv werden nur 1,5 Mol NO freigesetzt)

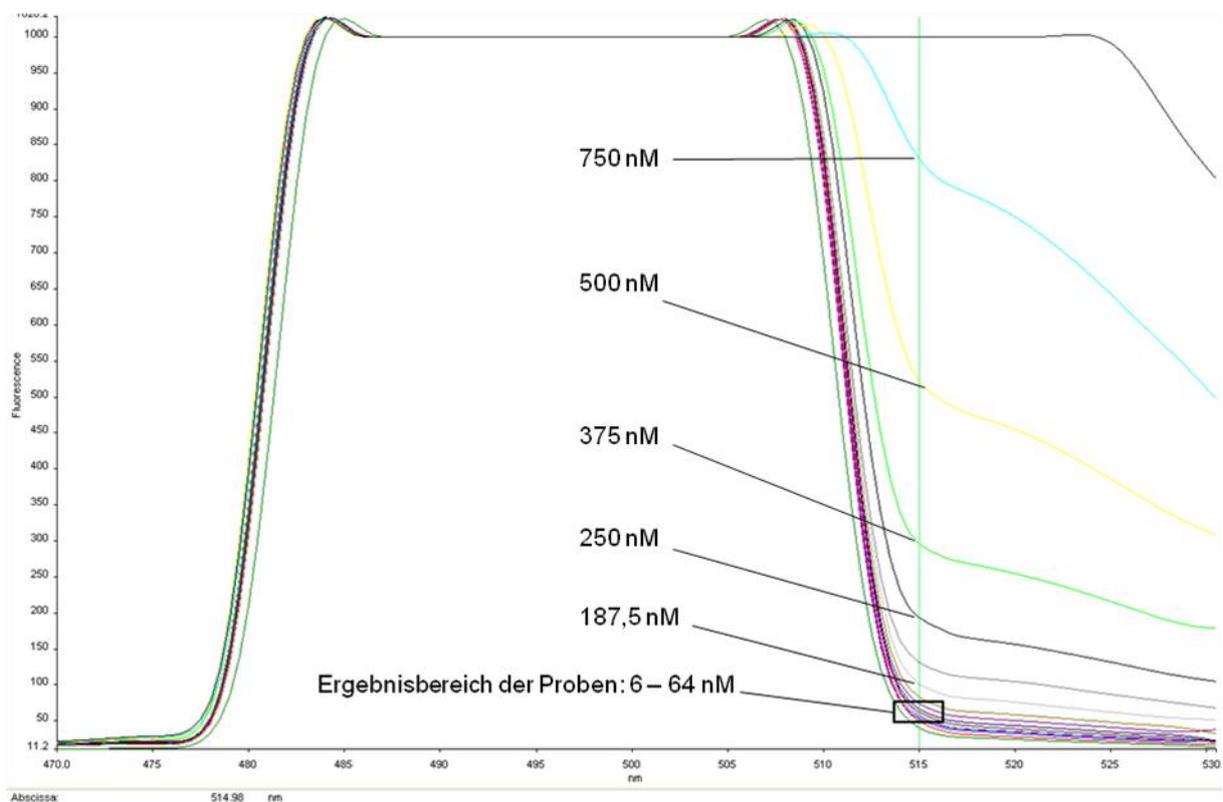
Hierzu wird ein Spektrofluorimeter (L5 SS Fluorescence Spectrometer, Fa. Perkin Elmer) verbunden mit einer entsprechenden Auswertungssoftware (FL WinLab 4.0, Fa. Perkin Elmer) verwendet. Die Proben werden in einer Standardquarzmessküvette in die Messhalterung eingebracht. Es erfolgt eine Anregung (Excitation) des DAF-2T mit einer Wellenlänge von 495 nm, welche sich bei anderen Arbeitsgruppen [81] als auch bei uns als die mit der besten folgenden Emission gezeigt hatte. Die Messung der Emission wird bei ihrem Maximum von 515 nm vorgenommen. Weitere Einstellungen am Gerät sind die Schlitzweiten für Emission und Excitation, die empfindlich mit 10 nm gewählt werden, und die Detektorverstärkung, die auf ihre maximale Stärke von 850 Volt gestellt wird.

Mehrfach wird während des Versuchs der Leerwert des DAF-2-Reagenz bestimmt, der nachher als Eigenfluoreszenz von den Messwerten der Proben abgezogen werden muss. Die Ablesung erfolgt zunächst als Fluoreszenzintensität in *arbitrary units* (A.U.) und wird dann anhand der Werte der Standardkurve und in Kenntnis der Stöchiometrie des Diethyl-ONOate in nmol NO umgerechnet.

Es folgt zuletzt, analog zu den Versuchen der Tetrahydrobiopterinbestimmungen (s.o.), die Bestimmung des Proteingehalts des Zellysats der Kulturplatten als Maß für die Zelldichte. Die Ergebnisse der NO-Messungen können dann in Picomol NO pro Milligramm Protein angegeben werden.

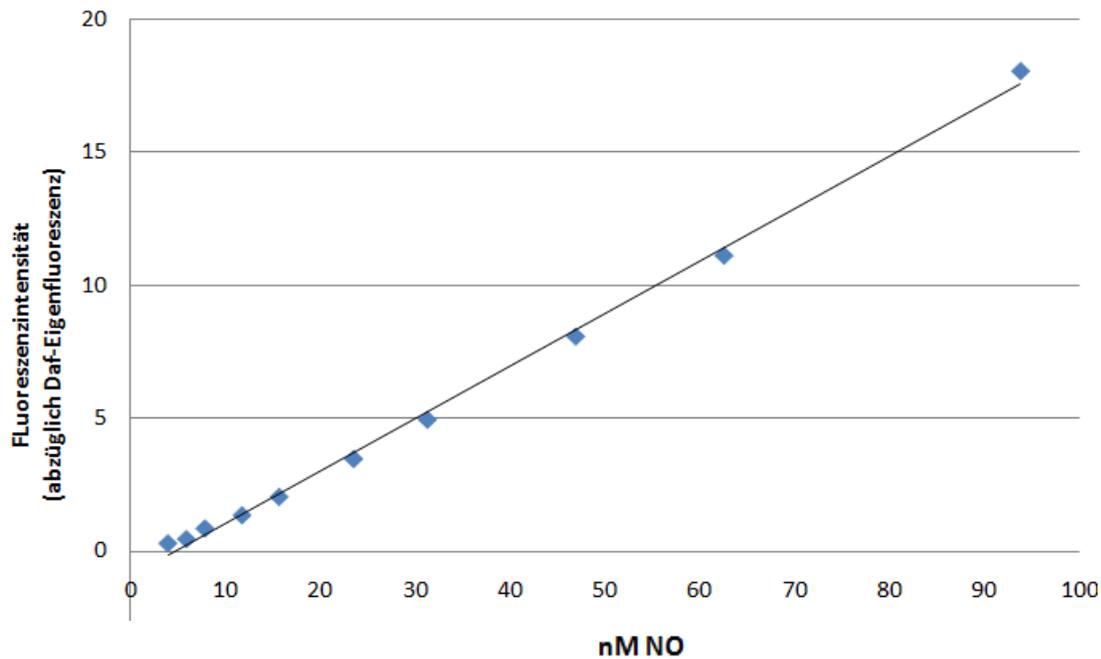
Die NO-Messungen wurden unter jeder Bedingung jeweils fünfmal, zeitlich getrennt voneinander und mit Zellen von jeweils unterschiedlichen Kulturplatten durchgeführt.

Schon bei den Messungen der Emissionsintensität des DAF-Reagenz nach Inkubation der Zellen, fiel auf, dass diese in einem sehr niedrigen Bereich liegen. Die entsprechenden Emissionskurven und –messwerte der einzelnen Gruppen liegen sehr nah beieinander. Nur unter Ausnutzung der maximalen Gerätesensitivität, z.B. Einstellung einer maximalen Detektorverstärkung, gelingt es verlässlich Unterschiede zu messen (siehe Abb 8).



**(Abbildung 8) Emissionsintensitäten verschiedener NO-Konzentrationen im Daf-Assay bei 515 nm nach Anregung bei 495 nm bei maximaler Detektorverstärkung (850 Volt)**

Entsprechend schwierig ist das Erstellen einer NO-Standardkurve mit einem linearen Konzentrations-Intensitätsverhältnis in diesem Bereich (siehe Abb. 9). Es zeigt sich schließlich, dass es sich um nanomolare Konzentrationen zumeist im unteren zweistelligen Bereich handelt. Die Unterschiede der Mittelwerte der einzelnen Gruppen liegen also in einer einstelligen nanomolaren Größenordnung.



(Abbildung 9) Emissionsintensitäten verschiedener NO-Konzentrationen im Daf-Assay bei 515 nm nach Anregung bei 495 nm bei maximaler Detektorverstärkung (850 Volt) in dem niedrigen Bereich der zu messenden NO-Konzentrationen

Dies entspricht allerdings den Beobachtungen die auch andere Arbeitsgruppen zuvor mit der gleichen Methode gemacht haben [81]. Es gelingt jedoch eine sehr gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse, sowohl bei wiederholter Messung gleicher Proben, als auch unterschiedlicher Proben unter gleichen Behandlungsbedingungen und Wiederholung der Experimente mit zeitlichem Abstand.

Die erhobenen Messwerte lassen sich dabei als Fluoreszenzintensitäten der Emission in arbitrary units, als NO-Konzentration in nM nach Ablesung an der Standardkurve und in pmol/mg nach Bezug auf die Proteinmenge im Probenvolumen darstellen. Jede Darstellungsform hat Vor- und Nachteile. Die Angabe der Emissionsintensität ist die direkteste, vermittelt aber keinen guten Eindruck von der tatsächlichen Höhe der NO-Produktion. Die NO-Konzentration hingegen beinhaltet schon wieder mögliche sich addierende Messfehler bei Erstellung der und Ablesung an der Standardkurve. Sie setzt außerdem voraus, dass die Zellzahl konstant ist, was gemessen an der Proteinkonzentration auch annähernd der Fall war. Die Angabe in direktem Bezug auf Protein in pmol/mg gleicht diese Variable aus, schafft aber auch

wieder zusätzlich die Gefahr weiterer hinzukommender Messungengenauigkeiten bei der Proteinmessung.

Da die durchweg parallele Angabe aller drei Darstellungsformen bei den Ergebnissen der aktuellen Arbeit die Lesbarkeit allerdings sehr eingeschränkt hätte, haben wir uns deshalb im Ergebnisteil wieder auf die gebräuchlichste Darstellung der Konzentration bezogen auf den Proteingehalt beschränkt.

Um dennoch ein möglichst seriöses Bild der Messergebnisse zu gewährleisten, werden alle drei Darstellungsformen der Ergebnisse nebeneinander in einem Tabellenanhang wiedergegeben.

### **2.2.7 Statistik**

Die gewonnenen Daten wurden in Microsoft Excel-Tabellen gesammelt, und dann zur statistischen Analyse in das Programm InStat der Firma GraphPad importiert. Hier wurden die Mittelwerte berechnet. Als Streuungsmaß wurde der Standardfehler des Stichproben-Mittelwertes angegeben. Er wird häufiger verwendet, wenn Unterschiede eher durch Messungengenauigkeiten als durch eine natürliche biologische Streuung zu erwarten sind und erlaubt zudem noch eine gewisse Aussage über die Zahl der in den Mittelwert eingegangenen Messungen.

Die Daten wurden dann mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test auf Normalverteilung getestet. Da wiederholt Nichtnormalverteilung vorlag, wurden Unterschiede der Mittelwerte zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen mit dem Kruskal-Wallis-H-Test als nichtparametrischer Test für unverbundene Stichproben zur Varianzanalyse bei Vorliegen mehrerer Gruppen untersucht. Es folgte eine Post-hoc-Analyse für multiple Vergleiche und Adjustierung mit dem Dunn's Multicomparison Test.

Getestet wurde in erster Linie auf Unterschiede zwischen den nativen und den mit oxLDL sowie mit hoher Glucosekonzentration behandelten Zellen. Da die mit DAHP behandelten Zellen als Negativkontrolle dienen sollten und hier ein stärkerer Unterschied zu den anderen Gruppen zu erwarten war, wurden diese nicht primär in den Mehrgruppenvergleich mit einbezogen. Es hätte sonst durch Einbeziehung leicht eine Signifikanz im Mehrgruppenvergleich vorgetäuscht werden können.

Es wurde stattdessen in einem zweiten Durchgang ein Mehrgruppenvergleich einschließlich der DAHP-behandelten Zellen gerechnet und das Ergebnis nach Adjustierung für multiple Vergleiche in Klammern angegeben.

Eine zusätzliche statistische Analyse der Variablen Sepiapterin- oder Tetrahydrobiopterin-, PMA- oder Tironzugabe jeweils innerhalb der Gruppen oxLDL, DAHP, high Glucose oder native Zellen, ist statistisch problematisch. Es würde sich dann eine Situation ergeben, in der sozusagen alles mit allem verglichen würde und es müsste dann für eine sehr hohe Zahl an multiplen Vergleichen adjustiert werden. Bei einer solchen Adjustierung ließen sich keine Signifikanzen mehr aufzeigen. Wir haben uns daher auf die Analyse der vier Hauptgruppen beschränkt (nativ, oxLDL, HG, DAHP). Für alle anderen oben genannten Variablen haben wir lediglich zum Zwecke der Veranschaulichung Zweigruppenvergleiche gerechnet, obwohl dies formal statistisch nicht ohne weiteres zulässig ist. Es kam dann jeweils ein Mann-Whitney-U-Test als nichtparametrischer Test für unverbundene Stichproben zum Einsatz.

Ein p-Wert von  $<0,05$  wurde als signifikant, ein p-Wert  $<0,005$  als hochsignifikant angenommen.

Die graphische Darstellung erfolgte mit Hilfe des Programmes Sigma Plot der Firma Systat unter Angabe von Mittelwert und Standardfehler.

### 3.1 Intrazelluläre Tetrahydrobiopterinspiegel

#### 3.1.1. Tetrahydrobiopterinspiegel ohne Sepiapterinsupplementation

Bei den Messungen des intrazellulären Tetrahydrobiopterinspiegels ohne Behandlung mit Sepiapterin ergaben sich insgesamt Messwerte zwischen maximal 4,93 und minimal 0,003 pmol/mg bezogen auf die Proteinmenge der Zellkulturplatten. Aus den jeweils fünf Messungen ergab sich für die nativen Zellen ein Mittelwert von 2,55 pmol/mg.

Sowohl bei den mit oxidierten Low Density Lipoproteinen behandelten Zellen als auch bei den mit hoher Glucosekonzentration inkubierten Zellen kam es im Vergleich dazu zu einer sehr deutlichen Erniedrigung des intrazellulären Tetrahydrobiopterinspiegels. So lagen die die Mittelwerte der oxLDL-Gruppe um 87% und die der HG-Gruppe um 79% niedriger als die der nativen Zellen. Die Erniedrigung erreichte damit in beiden Fällen fast das Niveau der Negativkontrolle der DAHP-behandelten Zellen, deren Spiegel 91% unter dem der nativen Zellen lag (siehe Tabelle 2).

Es ergaben sich insbesondere in der Gruppe nativer Zellen z.T. hohe Varianzen mit einem hohen Standardfehler. Dies ist wahrscheinlich auch der Grund dafür, dass trotz der großen Unterschiede der Mittelwerte nach statistischer Testung und Adjustierung für den Vergleich multipler Gruppen nur der Unterschied der oxLDL- und DAHP- behandelten Zellen zu den nativen signifikant bleibt, während das Signifikanzniveau der HG-behandelten Zellen verloren geht.

	nativ	oxLDL	HG	DAHP
<b>BH4</b> (pmol/mg)	2,55 (0,76)	0,32 (0,11)*	0,54 (0,24)	0,23 (0,1)*
<b>BH-gesamt</b> (pmol/mg)	3,73 (0,67)	3,28 (1,67)	1,99 (0,31)	1,20 (0,15)*
<b>BH<sup>4</sup>/BHox</b>	2,62 (1,1)	0,25 (0,13)*	0,53 (0,28)	0,40 (0,20)*

je n=5

**(Tabelle 2) Intrazellulärer Tetrahydrobiopterinspiegel ohne Behandlung mit Sepsippterin**

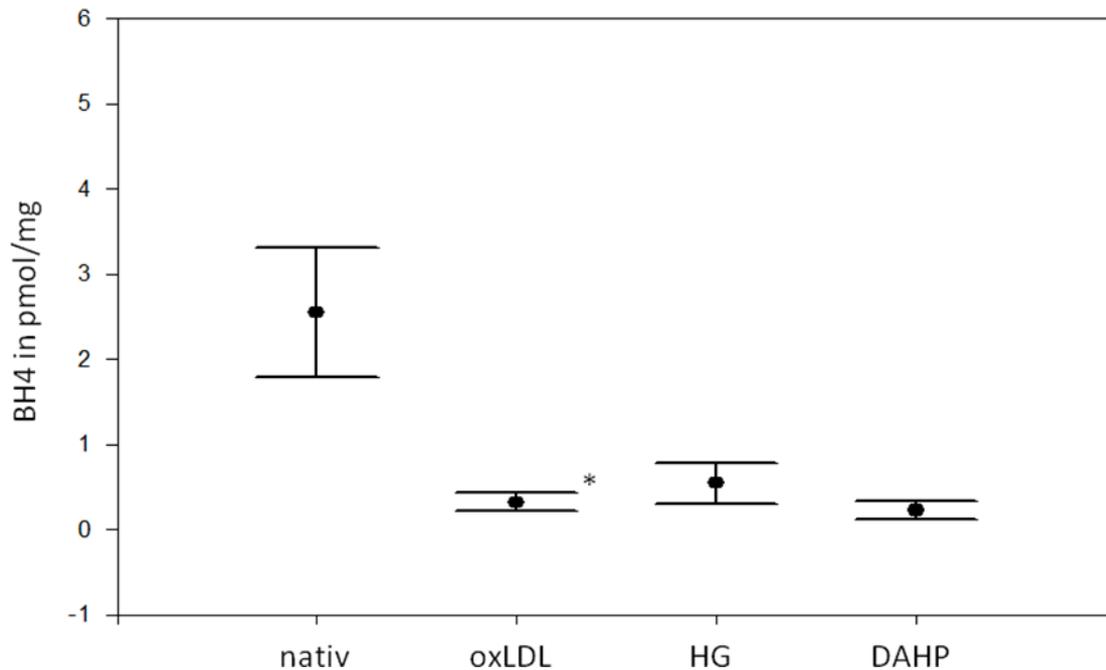
(Angabe als Mittelwerte mit Standardfehlern in Klammern, BH4 = Tetrahydrobiopterin, BH-gesamt = Gesamtbiopterin,  $\text{BH}^4/\text{BHox}$  = Verhältnis des vollreduzierten Tetrahydrobiopterins zu den oxidierten Formen Dihydrobiopterin und Biopterin, oxLDL = oxidierte Low Density Lipoproteine, HG = hohe Glukosekonzentration, DAHP = Diaminohydroxypyrimidin, \* = signifikant versus nativ nach Kruskal-Wallis-H-Test und Adjustierung für multiple Vergleiche mit Dunn's multiple comparison test, \*\* = hoch signifikant versus nativ)

Die Gruppen mit niedrigen Werten, hier vor allem die mit DAHP behandelte, lieferten bei der Messung in Natronlauge (Dihydrobiopterin+Biopterin) Werte nur sehr knapp über der Grenze der Detektierbarkeit, wie dies auch schon von anderen Gruppen beschrieben worden war [50].

Unterschiede finden sich ebenfalls bei den Werten für Gesamtbiopterin. Hier fand sich vor allem der Mittelwert der mit hoher Glucosekonzentration behandelten Zellen am deutlichsten erniedrigt. Dieser lag 47% unter dem der nativen Zelle. Bei den mit oxLDL behandelten Zellen hingegen fand sich nur eine Erniedrigung um 12%. Die drastischste Verminderung des Gesamtbiopterins findet sich jedoch, wie auch beim Tetrahydrobiopterin, bei der DAHP-Kontrollgruppe.

Sehr aufschlussreich ist die Analyse des Verhältnisses von Tetrahydrobiopterin zu den oxidierten und teiloxidierten Formen Dihydrobiopterin und Biopterin (BH4/BH). Unter oxLDL- und high-glucose-Behandlung findet sich eine deutliche Verschiebung hin zu den teiloxidierten und oxidierten Formen, allerdings fällt hier die Erniedrigung des Quotienten bei den oxLDL-behandelten Zellen am deutlichsten aus. Das Verhältnis liegt hier um den Faktor 10 niedriger als bei den nativen Zellen, in der HG-Gruppe immerhin auch um den Faktor 5. Auch bei den DAHP-behandelten Zellen

zeigt sich eine solche Verschiebung, allerdings ist sie weniger ausgeprägt als bei den oxLDL-behandelten Zellen.



**(Abbildung 10) Intrazellulärer Tetrahydrobiopterinspiegel ohne Behandlung mit Sepiapterin**

(graphische Darstellung der Mittelwerte als Punkte und der Standardfehler als Error Bars (BH4 = Tetrahydrobiopterin, oxLDL = oxidierte Low Density Lipoproteine, HG = hohe Glukosekonzentration, DAHP = Diaminohydroxypyrimidin, \* = signifikant versus nativ nach Kruskal-Wallis-H-Test und Adjustierung für multiple Vergleiche mit Dunn's multiple comparison test)

Da auch hier wieder eine nicht unerhebliche Varianz der Messwerte bestand erreichen dennoch nur die Unterschiede der oxLDL- und DAHP-Gruppe im Vergleich zu den nativen Zellen das Niveau der Signifikanz.

### 3.1.2. Tetrahydrobiopterinspiegel nach Sepiapterinsupplementation

Auch bei den Ergebnissen des intrazellulären Tetrahydrobiopterinspiegels nach Präinkubation mit Sepiapterin konnten zum Teil hohe Varianzen der Messwerte mit entsprechendem Standardfehler festgestellt werden. In allen Gruppen kommt es jedoch nach der Sepiapterininkubation im Vergleich zu den oben beschriebenen Werten ohne Sepiapterin zu einem Anstieg des intrazellulären Tetrahydrobiopterinspiegels um mehr als das Tausendfache. Die Werte liegen damit

nun im micromolaren Bereich, bzw. im Bereich von nmol/mg, wenn eine Korrektur auf die Proteinmenge erfolgt. In der folgenden Tabelle sind die Werte jedoch nochmal in pmol/mg angegeben, um den Unterschied zu den vorherigen Werten zu verdeutlichen.

Dabei bleiben allerdings die Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen in ähnlichem Verhältnis erhalten wie ohne Sepiapterinsupplementation.

	nativ	oxLDL	HG	DAHP
<b>BH4</b> (pmol/mg)	2933 <sub>(527)</sub>	1040 <sub>(263)</sub> *	1850 <sub>(325)</sub>	812 <sub>(250)</sub> *
<b>BH-gesamt</b> (pmol/mg)	3119 <sub>(489)</sub>	1268 <sub>(252)</sub> *	2092 <sub>(269)</sub>	1001 <sub>(201)</sub> **
<b>BH<sup>4</sup>/BHox</b>	31,6 <sub>(14,4)</sub>	5,6 <sub>(1,4)</sub>	14,8 <sub>(8,0)</sub>	16,50 <sub>(12,0)</sub>

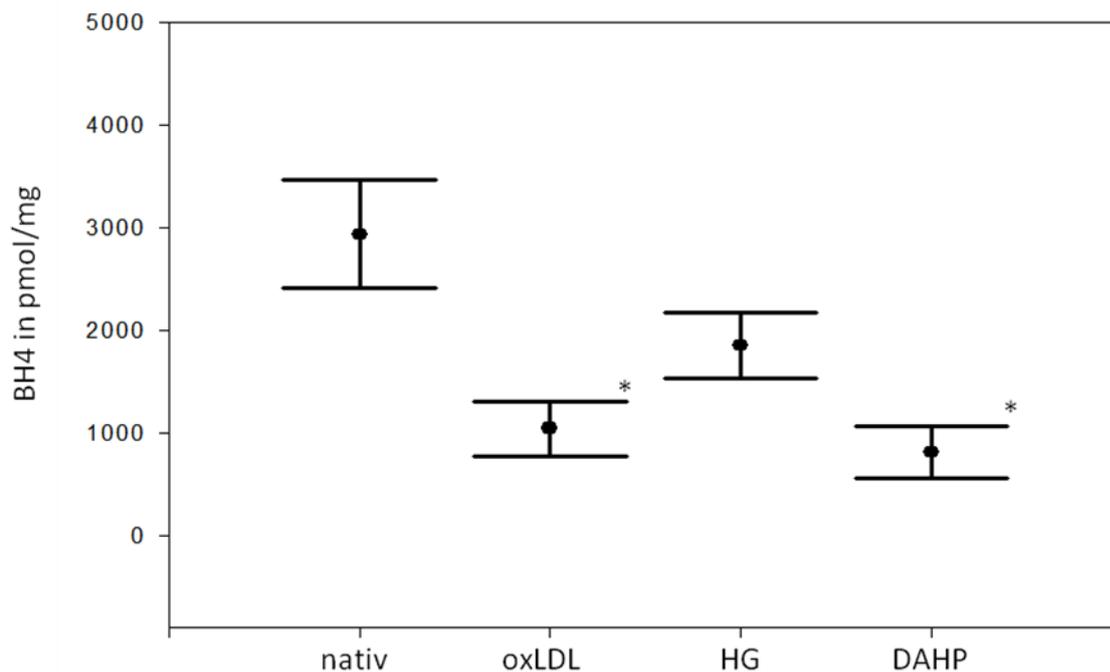
je n=5

**(Tabelle 3) Intrazellulärer Tetrahydrobiopterinspiegel nach Behandlung mit Sepiapterin 100 µM**

(Angabe als Mittelwerte mit Standardfehlern in Klammern, BH4 = Tetrahydrobiopterin, BH-gesamt = Gesamtbiopterin,  $\text{BH}^4/\text{BHox}$  = Verhältnis des vollreduzierten Tetrahydrobiopterins zu den oxidierten Formen Dihydrobiopterin und Biopterin, oxLDL = oxidierte Low Density Lipoproteine, HG = hohe Glukosekonzentration, DAHP = Diaminohydroxypyrimidin, \* = signifikant versus nativ nach Kruskal-Wallis-H-Test und Adjustierung für multiple Vergleiche mit Dunn´s multiple comparison test, \*\* = hoch signifikant versus nativ)

Der Mittelwert des intrazellulären Tetrahydrobiopterinspiegels liegt auch nach Behandlung mit Sepiapterin bei den mit oxLDL behandelten Zellen um 65% niedriger als bei den nativen, was trotz der Varianzen und auch nach Adjustierung für Mehrgruppenvergleich ein signifikanter Unterschied ist. Der Mittelwert der mit hoher Glucosekonzentration behandelten Zellen liegt nur 36% unter dem der nativen Zellen und verfehlt nach Adjustierung das Niveau der Signifikanz.

Am niedrigsten bleibt nach externer Pteridinzufuhr wiederum der Tetrahydrobiopterinspiegel der DAHP-behandelten Zellen, der sich im Mittel 72% unter dem Wert der nativen Zellen befindet.



**(Abbildung 11) Intrazellulärer Tetrahydrobiopterinspiegel nach Behandlung mit Sepiapterin 100  $\mu$ M**

(graphische Darstellung der Mittelwerte als Punkte und der Standardfehler als Error Bars, BH4 = Tetrahydrobiopterin, oxLDL = oxidierte Low Density Lipoproteine, HG = hohe Glukosekonzentration, DAHP = Diaminohydroxypyrimidin, \* = signifikant versus nativ nach Kruskal-Wallis-H-Test und Adjustierung für multiple Vergleiche mit Dunn´s multiple comparison test)

Bei der Analyse der Gesamtbiopterinwerte ergibt sich folgendes Bild: Vor Behandlung mit Sepiapterin hatten sich die Mittelwerte nur in nicht signifikanter Weise voneinander unterschieden und der Unterschied der Tetrahydrobiopterinspiegel war vor allem durch eine Verschiebung des Verhältnisses von oxidierten zu nichtoxidierten Formen zustande gekommen. Dabei hatte der Tetrahydrobiopterinspiegel der mit Glucose behandelten Zellen unter dem der mit oxLDL behandelten Zellen gelegen. Dieses Verhältnis kehrt sich nun um und die Werte der oxLDL-Gruppe liegen nun 59% unter denen der nativen Zellen, nur noch geringfügig über denen der mit DAHP behandelten Zellen.

Das BH4/BH-Verhältnis der einzelnen Gruppen unterscheidet sich weiterhin deutlich voneinander, die Unterschiede sind jetzt jedoch nach Adjustierung für den Mehrgruppenvergleich nicht mehr signifikant. Es liegt nun bei allen Gruppen der allergrößte Teil des Gesamtbiopterins als Tetrahydrobiopterin vor. Der Quotient der high-glucose- und DAHP-behandelten Zellen ist etwa halb so hoch wie der der

nativen. Am geringsten ist dieses Verhältnis allerdings bei den mit oxLDL behandelten Zellen, wo es nur etwas über ein Sechstel dessen der nativen Zellen ausmacht.

## 3.2. NO-Produktion

### 3.2.1. NO ohne Sepiapterinsupplementation

Die Messungen wurden wieder pro Bedingung fünfmal wiederholt und fanden an unterschiedlichen Zeitpunkten statt. Die Mittelwerte der einzelnen Gruppen weisen diesmal nur sehr geringe Varianzen auf.

Zur besseren Übersicht sind hier nur die Ergebnisse der errechneten NO-Konzentration bezogen auf die Proteinmenge der jeweiligen Kulturplatten als Maß für die Zelldichte angegeben. Die Werte der Fluoreszenzintensitäten abzüglich der Leerwerte (DAF-Eigenfluoreszenz) und der NO-Werte in reinen Konzentrationsangaben finden sich im Tabellenanhang.

Bei den mit oxLDL und hoher Glucosekonzentration behandelten Zellen kommt es zu einer deutlich geringeren NO-Produktion im Vergleich zu den unbehandelten Zellen.

Die NO-Produktion der oxLDL-behandelten Zellen liegt 23% unter der der nativen Zellen, bei den HG-behandelten Zellen macht der Unterschied 38% aus.

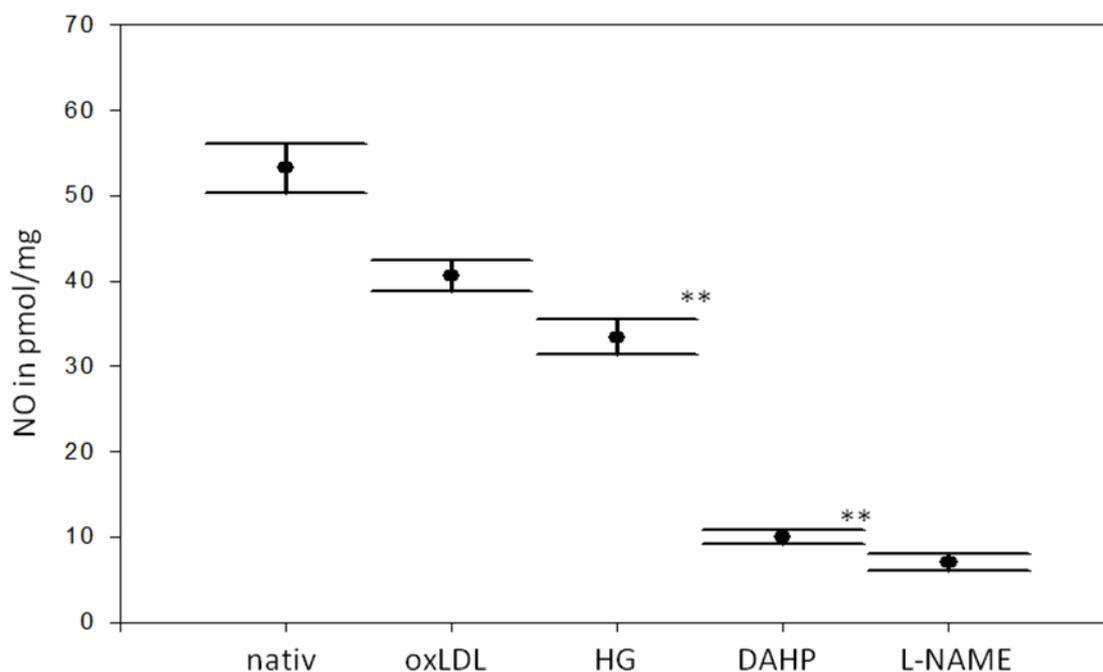
	nativ	oxLDL	HG	DAHP	L-NAME
<b>NO</b> (pmol/mg)	53 (2,9)	41 (1,8)	33 (2,0)**	10 (0,8)**	7 (1,0)
je n=5					

**(Tabelle 4) Ergebnisse der NO-Messung der unterschiedlichen Behandlungsgruppen im DAF-Assay ohne Sepiapterinsupplementation** (angegeben als NO-Konzentration bezogen auf Proteinmenge, Angabe als Mittelwerte mit Standardfehlern in Klammern, oxLDL = oxidierte Low Density Lipoproteine, HG = hohe Glukosekonzentration, high glucose, DAHP = Diaminohydroxypyrimidin, L-NAME = Nitro-L-Argininmethylester, \* = signifikant versus nativ nach Kruskal-Wallis-H-Test und Adjustierung für multiple Vergleiche mit Dunn's multiple comparison test, \*\* = hoch signifikant versus nativ)

Der Unterschied zwischen HG und nativ ist dabei statistisch hoch signifikant, der Unterschied von oxLDL und nativ verliert seine Signifikanz jedoch nach Adjustierung für die Durchführung multipler Vergleiche.

Die NO-Produktion der DAHP-behandelten Zellen wird praktisch auf das Niveau der Zellen reduziert, bei denen die NO-Produktion mit dem eNOS-Inhibitor L-NAME gehemmt worden war und macht weniger als ein Fünftel der NO-Produktion der nativen Zellen aus.

Erstaunlicherweise lagen die Werte der mit DAHP und L-NAME behandelten Zellen immer noch merklich über denen, bei denen keine Stimulation der NO-Synthese mit Calcium Ionophore A23187 erfolgt war. Letztere entsprachen praktisch dem Leerwert des DAF-2-Reagenz (Eigenfluoreszenz), so dass hier von keiner messbaren NO-Produktion ausgegangen werden kann.



**(Abbildung 12) NO-Produktion ohne Sepiapterininkubation** (angegeben als NO-Konzentration bezogen auf Proteinmenge in pmol/mg, graphische Darstellung der Mittelwerte als Punkte und der Standardfehler als Error Bars, oxLDL = oxidierte Low Density Lipoproteine, HG = hohe Glucosekonzentration, high glucose, DAHP = Diaminohydroxypyrimidin, L-NAME = Nitro-L-Argininmethylester, \*\* = hoch signifikant versus nativ nach Kruskal-Wallis-H-Test und Adjustierung für multiple Vergleiche mit Dunn´s multiple comparison test)

Die Messwerte der mit DAHP und L-NAME behandelten Zellen befinden sich unmittelbar an der Nachweisgrenze. Es ist sicherlich fraglich, inwiefern solch niedrige Werte noch sinnvoll an der Standardkurve in NO-Konzentration umgerechnet und dann auf Proteinmenge bezogen werden sollten.

Zur Veranschaulichung wurde dies hier trotzdem noch näherungsweise durchgeführt, nur für die unstimulierten Zellen ergibt sich kein sinnvoller Wert mehr.

	DAHP	L-NAME	unstimuliert	PMA
<b>Intensität</b> (A.U.) <sup>°</sup>	0,69 (0,05)	0,38 (0,06)	0,23 (0,02)	10,30 (0,13)
<b>NO</b> (nM)	8 (0,5)	6 (0,5)	[1]	58 (1,7)
<b>NO/Prot.</b> (pmol/mg)	10 (0,8)	7 (1,0)	[1]	66 (7,6)

je n=5

<sup>°</sup> abzüglich DAF-2-Eigenfluoreszenz

**(Tabelle 5) Ergebnisse der NO-Messung der Negativkontrollen, unstimulierter und PMA-behandelter Zellen im DAF-Assay ohne Sepiapterinsupplementation** (angegeben als Intensität abzüglich DAF-Eigenfluoreszenz, NO-Konzentration und NO-Konzentration bezogen auf Proteinmenge, Angabe als Mittelwerte mit Standardfehlern in Klammern, DAHP = Diaminohydroxypyrimidin, L-NAME = Nitro-L-Argininmethylester, unstim. = unstimuliert, PMA = Phorbol 12-myristat 13-acetat, Prot.= Korrektur bezogen auf Proteinkonzentration, [ ] = Ergebnis ist zu klein um sinnvoll auf der Standardkurve abgelesen werden zu können)

Bei den Messreihen zur NO-Bestimmung ohne Sepiapterinsupplementation wurde interessenthalber zum Vergleich NO von Zellen je einer Kulturplatte mitbestimmt, die mit Phorbolmyristat (PMA) zur Aktivierung der endothelialen Phosphokinase C behandelt worden waren. Hierbei fanden sich im Mittel noch einmal um 25% höhere Werte als bei den ohne oxLDL oder HG behandelten Zellen, wenngleich auch dieser Unterschied im Mehrgruppenvergleich nicht das Niveau der Signifikanz erreicht.

### 3.2.2. NO nach Sepiapterinsupplementation 100 $\mu\text{M}$

Zur Untersuchung der Auswirkung einer Sepiapterinsupplementation auf die NO-Produktion der unbehandelten sowie der mit oxLDL und hoher Glucosekonzentration behandelten Zellen wurde NO zunächst nach Inkubation der Zellen mit Sepiapterin in einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  gemessen, wie sie zur Bestimmung des intrazellulären Tetrahydrobiopterinspiegels nach Sepiapterininkubation mittels HPLC angewandt worden war.

	nativ	oxLDL	HG	DAHP
<b>NO</b> (pmol/mg)	30 (1,6)	38 (1,5)	34 (2,1)	24 (1,6) **
<b><math>\Delta</math> NO mit vs. ohne Sep.</b> (pmol/mg)	-23**	-4	+1	+14**

je n=5

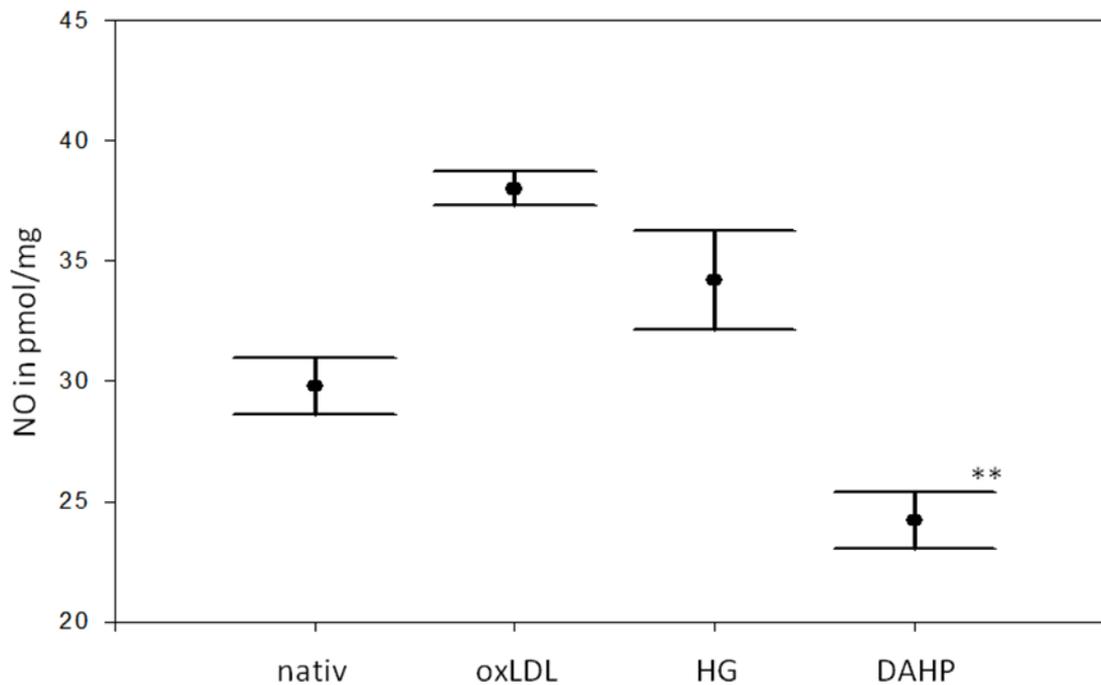
**(Tabelle 6) Ergebnisse der NO-Messung der unterschiedlichen Behandlungsgruppen im DAF-Assay nach Sepiapterininkubation 100  $\mu\text{M}$**  (angegeben als NO-Konzentration bezogen auf Proteinmenge, Angabe als Mittelwerte mit Standardfehlern in Klammern, oxLDL = oxidierte Low Density Lipoproteine, HG = hohe Glukosekonzentration, high glucose, DAHP = Diaminohydroxypyrimidin,  $\Delta$  NO mit vs. ohne Sep. = Differenz im Vergleich zu den Zellen ohne Sepiapterininkubation, \*\* = hoch signifikante Zu- oder Abnahme mit versus ohne Sepiapterin im Mann-Whitney-U-Test innerhalb einer Behandlungsgruppe)

Dabei blieb die NO-Produktion der mit oxLDL und hoher Glucosekonzentration behandelten Zellen annähernd gleich. In der oxLDL-Gruppe kommt es zu einer statistisch nicht signifikanten Abnahme, in der HG-Gruppe zu einer statistisch nicht signifikanten Zunahme.

Die eigentliche Überraschung findet sich jedoch bei den nicht mit oxLDL oder HG behandelten Zellen: Hier findet sich eine sehr deutliche und statistisch hoch signifikante Abnahme der NO-Produktion nach Sepiapterininkubation, die 57% des Wertes der unbehandelten Zellen ausmacht.

Bei den mit DAHP behandelten Zellen kommt es hingegen durchweg zu einer deutlichen und statistisch signifikanten Zunahme der NO-Produktion, im Mittel um 37%.

Die Unterschiede der Mittelwerte innerhalb der Gruppen mit verschiedenen Behandlungsbedingungen sind hingegen nicht mehr so ausgeprägt. Die NO-Konzentrationen liegen nun bei den nicht mit oxLDL und hoher Glucosekonzentration behandelten Zellen am niedrigsten, wenn man von den DAHP-behandelten Zellen absieht. Die Unterschiede sind nicht statistisch signifikant.



**(Abbildung 13) NO-Produktion nach Sepiapterininkubation 100  $\mu$ M** (angegeben als NO-Konzentration bezogen auf Proteinmenge in pmol/mg, graphische Darstellung der Mittelwerte als Punkte und der Standardfehler als Error Bars, oxLDL = oxidierte Low Density Lipoproteine, HG = hohe Glucosekonzentration, high glucose, DAHP = Diaminohydroxypyrimidin, \*\* = hoch signifikant versus nativ nach Kruskal-Wallis-H-Test und Adjustierung für multiple Vergleiche mit Dunn's multiple comparison test)

Lediglich die mit DAHP behandelten Zellen weisen eine hoch signifikante Erniedrigung der NO-Produktion im Vergleich zu den nativen Zellen auf. Dies trifft zu, obwohl es bei ihnen als einziges zu einer hoch signifikanten Zunahme der NO-Produktion unter Sepiapterinzufuhr kommt.

### 3.2.3. NO nach Sepiapterinsupplementation 10 $\mu\text{M}$

Um zu klären ob sich identische Veränderungen ergäben, wenn eine niedrigere Sepiapterinkonzentration gewählt würde, wurde als nächstes die NO-Produktion der Endothelzellen nach Inkubation mit 10  $\mu\text{M}$  Sepiapterin untersucht. Der übrige Versuchsaufbau blieb unverändert, es wurden wieder je fünf zeitlich voneinander getrennte Wiederholungen durchgeführt.

Unter dieser Konzentration kommt es bei den mit oxLDL und hoher Glucosekonzentration behandelten Zellen nun zu einem signifikanten Anstieg der NO-Produktion. Bei den oxLDL-behandelten Zellen handelt es sich dabei um einen Anstieg um 50%, bei den HG-behandelten Zellen sogar um mehr als 150%.

Bei den nicht mit oxLDL oder hoher Glucosekonzentration behandelten Zellen kommt es nach Inkubation mit Sepiapterin 10  $\mu\text{M}$  lediglich zu einem ganz leichten Anstieg der NO-Produktion, der nicht signifikant ist.

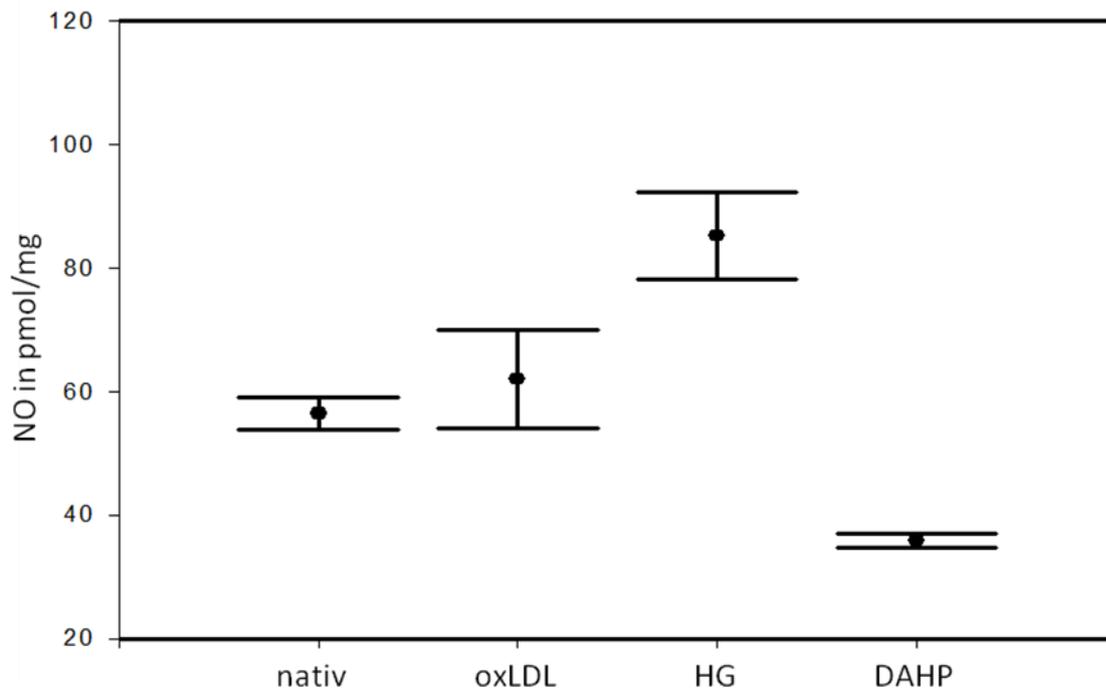
	nativ	oxLDL	HG	DAHP
<b>NO</b> (pmol/mg)	56 (2,6)	62 (8,0)	85 (7,1)	36 (1,1)
<b><math>\Delta</math> NO mit vs. ohne Sep.</b> (pmol/mg)	+3	+21*	+52*	+26*

je n=5

(Tabelle 7) Ergebnisse der NO-Messung der unterschiedlichen Behandlungsgruppen im DAF-Assay nach Sepiapterininkubation 10  $\mu\text{M}$  (angegeben als NO-Konzentration bezogen auf Proteinmenge, Angabe als Mittelwerte mit Standardfehlern in Klammern, oxLDL = oxidierte Low Density Lipoproteine, HG = hohe Glucosekonzentration, high glucose, DAHP = Diaminohydroxypyrimidin,  $\Delta$  NO mit vs. ohne Sep. = Differenz im Vergleich zu den Zellen ohne Sepiapterininkubation, \* = signifikant versus nativ nach Kruskal-Wallis-H-Test und Adjustierung für multiple Vergleiche mit Dunn´s multiple comparison test oder signifikante Zu- oder Abnahme mit versus ohne Sepiapterin im Mann-Whitney-U-Test innerhalb einer Behandlungsgruppe)

War ohne Sepiapterin die NO-Produktion der nativen Zellen am höchsten und hatten sich die Mittelwerte der NO-Produktion unter 100  $\mu\text{M}$  Sepiapterin eher angeglichen, so liegen die Werte der oxLDL- und HG-Gruppe jetzt sehr deutlich über denen der nicht mit proatherogenen Substanzen behandelten Zellen.

Bei Anwendung eines parametrischen Tests, z.B. einer ANOVA, wäre der Unterschied auch statistisch signifikant. In dem nichtparametrischen Test, zu dessen Durchführung wir uns konsequenterweise entschlossen hatten, geht jedoch nach Adjustierung für den Vergleich multipler Gruppen in diesem Fall sogar die Signifikanz des Unterschiedes der oxLDL-Gruppe zu der nativen Gruppe verloren, obwohl die oxLDL-behandelten Zellen im Mittel 50% mehr NO-Produktion aufwiesen.



**(Abbildung 14) NO-Produktion nach Sepiapterininkubation 10  $\mu\text{M}$**  (angegeben als NO-Konzentration bezogen auf Proteinmenge in pmol/mg, graphische Darstellung der Mittelwerte als Punkte und der Standardfehler als Error Bars, oxLDL = oxidierte Low Density Lipoproteine, HG = hohe Glukosekonzentration, high glucose, DAHP = Diaminohydroxypyrimidin)

Die NO-Produktion der mit DAHP behandelten Zellen ist weiterhin von allen Gruppen die niedrigste.

Betrachtet man innerhalb der DAHP-behandelten Zellen die Veränderung der NO-Produktion unter 10 µM Sepiapterin im Vergleich zu denen ohne Sepiapterin, so kommt es wie auch schon unter 100 µM zu einer deutlichen Zunahme. Diese ist statistisch signifikant und erstaunlicherweise unter 10 µM Sepiapterin um 85% höher als unter 100µM Sepiapterin.

### 3.2.4. NO unter aufsteigenden Sepiapterinkonzentrationen

Die beobachteten Effekte unter hoher (100 µM) und niedrigerer (10 µM) Sepiapterinkonzentration unterscheiden sich also deutlich voneinander. Unter erstgenannter kommt es bei oxLDL und HG- behandelten Zellen zu keiner wesentlichen Veränderung, bei nativen Zellen zu einem deutlichen Abfall und unter der zweiten kommt es bei oxLDL und HG zu einer deutlichen Zunahme, während die NO-Produktion der nativen Zellen unverändert bleibt.

Um zu untersuchen, ob es eine Dosis-Wirkungsbeziehung zwischen Sepiapterinkonzentration und NO-Produktion gibt, wurden im Folgenden native Zellen mit aufsteigenden Konzentrationen von Sepiapterin behandelt.

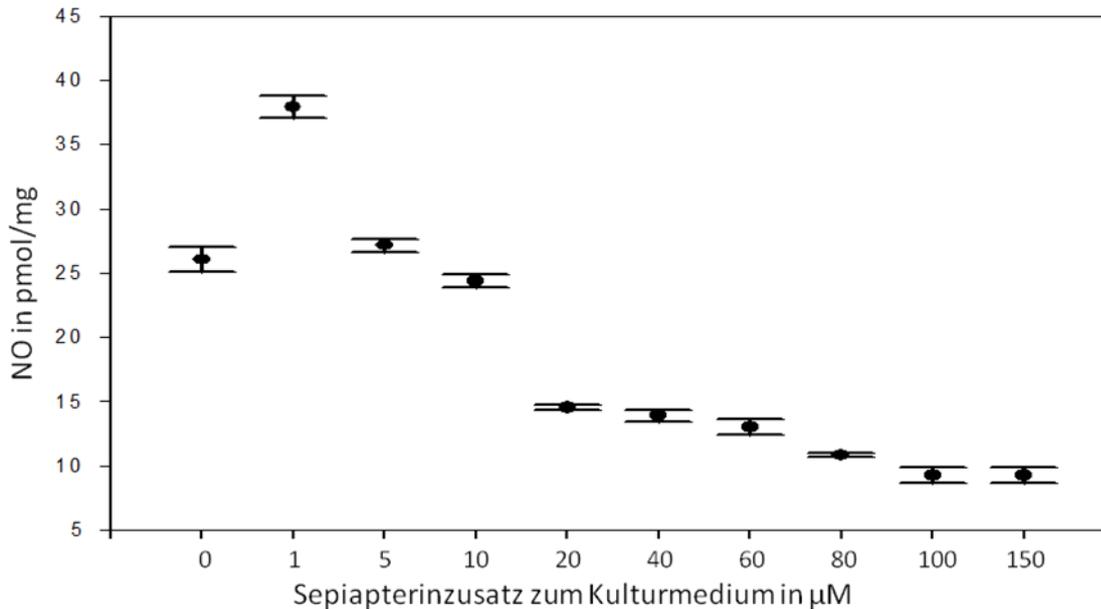
Sep. (µM)	0	1	5	10	20	40	60	80	100	150
NO (pmol/mg)	26	38	27	24	15	14	13	11	9	9
SE (M)	1,0	0,9	0,4	0,5	0,2	0,6	0,5	0,2	0,7	0,7

je n=5

**(Tabelle 8) Ergebnisse der NO-Messung unter verschiedenen Sepiapterinkonzentrationen** (angegeben als NO-Konzentration bezogen auf Proteinmenge in pmol/mg, Sep.: Konzentration der Sepiapterinkonzentration, SE (M) = Standardfehler des Mittelwertes)

Es wurden Konzentrationen zwischen null und 150 µM gewählt. Die Unterschiede der Mittelwerte der NO-Produktion zwischen den nächstgelegenen Konzentrationen sind zum Teil klein, es zeigt sich jedoch bei sehr geringen Varianzen eine deutliche Tendenz mit einer anfänglichen geringen Zunahme bei 1 µM, einer anschließenden

Abnahme auf den Ausgangswert der unbehandelten Zellen zwischen 5 und 10  $\mu\text{M}$  und einer sich dann fortsetzenden kontinuierlichen Abnahme zwischen 20 und 150  $\mu\text{M}$  bis auf weniger als ein Drittel des Ausgangswertes.



(Abbildung 15) NO-Produktion unter verschiedenen Sepsipaterinkonzentrationen (angegeben als NO-Konzentration bezogen auf Proteinmenge in pmol/mg)

### 3.2.5. NO nach Tetrahydrobiopterinsupplementation

Wie beschrieben kann der intrazelluläre Tetrahydrobiopterinspiegel auch durch Einschleusung von Tetrahydrobiopterin selbst in den salvage pathway angehoben werden. Um zu untersuchen ob die beobachteten Auswirkungen einer Sepsipaterininkubation ein exklusiver Effekt des Sepsipaterin sind oder ebenso durch Inkubation mit der voll reduzierten Form hervorgerufen werden können, führten wir die zuvor beschriebenen NO-Messungen mit identischer Methodik nach Inkubation der Endothelzellen mit Tetrahydrobiopterin 10 und 100  $\mu\text{M}$  für ebenfalls 24 Stunden durch.

Unter 10  $\mu\text{M}$  Tetrahydrobiopterin kommt es wie unter 10  $\mu\text{M}$  Sepsipaterin zu einem deutlichen Anstieg der NO-Produktion bei den mit oxLDL, hoher Glucosekonzentration und DAHP behandelten Zellen. Es handelt sich um signifikante Unterschiede im Vergleich zu den gleichen Behandlungsbedingungen

ohne Tetrahydrobiopterinsupplementation, die Werte liegen um 68, 118 und 140% höher.

Die Mittelwerte der NO-Produktion nähern sich unter 10 µM Tetrahydrobiopterin ähnlich wie unter Sepiapterin 10 µM an, es bestehen keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen mehr. Die proatherogen behandelten Zellen produzieren unter diesen Bedingungen mehr NO als die nicht proatherogen behandelten Zellen.

	nativ	oxLDL	HG	DAHP
<b><u>NO</u> (pmol/mg)</b>				
<b>+ BH4 10 µM</b>	54 (2,6)	69 (9,0)	72 (4,5)	34 (1,0)
<b>+ BH4 100 µM</b>	36 (3,0)	38 (1,9)	40 (4,1)	16 (2,9)
<b><u>Δ NO mit vs. ohne BH4</u> (pmol/mg)</b>				
<b>+ BH4 10 µM</b>	+/- 0	+28*	+39*	+24*
<b>+ BH4 100 µM</b>	-18*	-3	6	6*

je n = 5

**(Tabelle 9) Ergebnisse der NO-Messung der unterschiedlichen Behandlungsgruppen im DAF-Assay nach Inkubation mit 10 und 100 µM Tetrahydrobiopterin** (angegeben als NO-Konzentration bezogen auf Proteinmenge, Angabe als Mittelwerte mit Standardfehlern in Klammern, BH4 = Tetrahydrobiopterin, oxLDL = oxidierte Low Density Lipoproteine, HG = hohe Glukosekonzentration, high glucose, DAHP = Diaminohydroxypyrimidin, Prot. = Korrektur bezogen auf Proteinkonzentration, Δ NO mit vs. ohne BH4 = Differenz im Vergleich zu den Zellen ohne Tetrahydrobiopterininkubation, \* = signifikant versus nativ nach Kruskal-Wallis-H-Test und Adjustierung für multiple Vergleiche mit Dunn´s multiple comparison test oder signifikante Zu- oder Abnahme mit versus ohne Tetrahydrobiopterininkubation im Mann-Whitney-U-Test innerhalb einer Behandlungsgruppe)

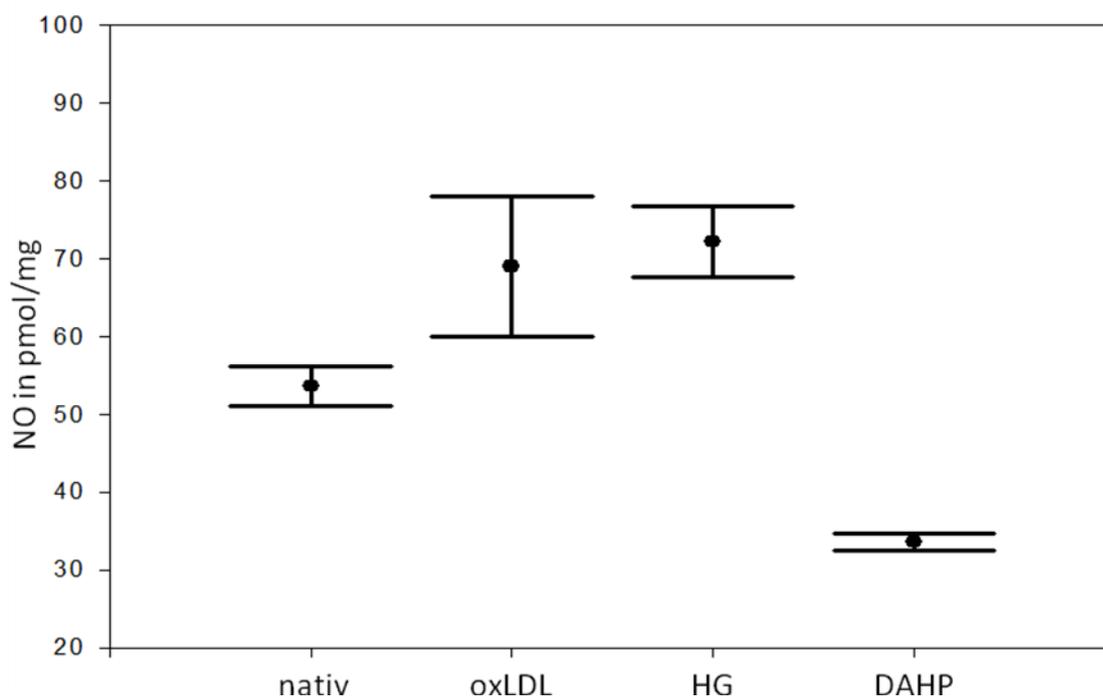
Hingegen ändert sich die NO-Produktion bei den nativen Zellen unter 10  $\mu\text{M}$  Tetrahydrobiopterin nicht, bzw. nicht signifikant.

Unter 100  $\mu\text{M}$  Tetrahydrobiopterin beobachtet man dann, wie auch unter 100  $\mu\text{M}$  Sepiapterin, wieder ein deutliches Absinken der NO-Konzentration in allen Behandlungsgruppen.

Die Werte der mit oxLDL und hoher Glucosekonzentration behandelten Zellen liegen nun praktisch wieder auf ihrem Ausgangsniveau, bzw. unterscheiden sich nicht mehr signifikant davon und die der nativen Zellen sinken sogar signifikant unter den Mittelwert der ohne Tetrahydrobiopterin oder Sepiapterin behandelten Zellen ab.

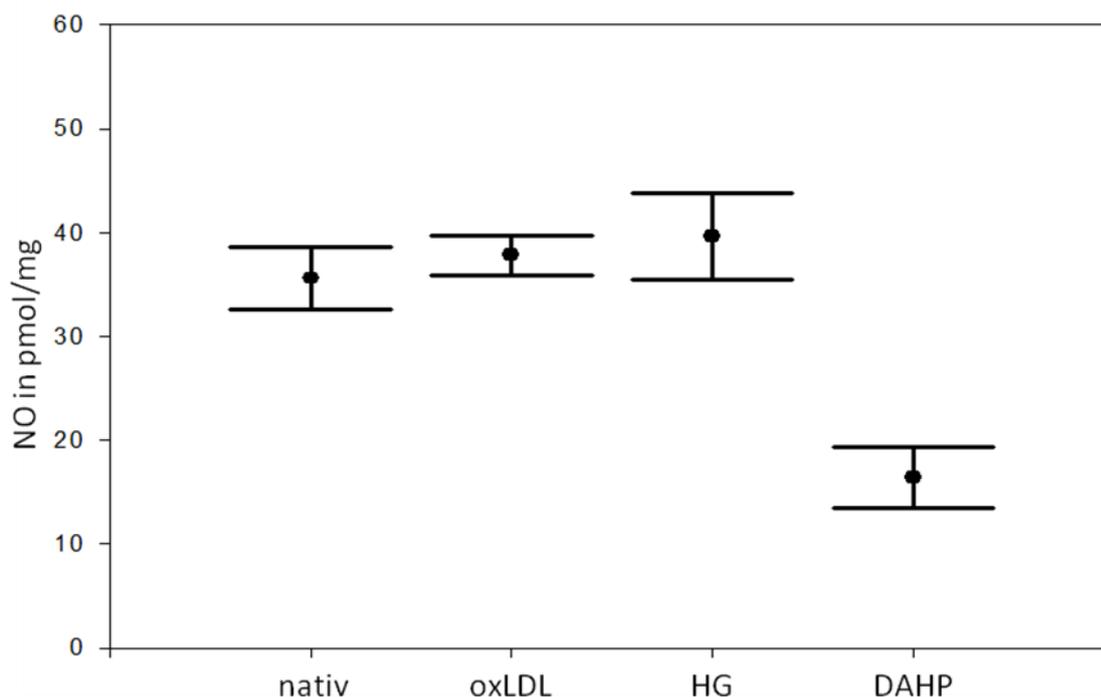
Lediglich die NO-Produktion der mit DAHP behandelten Zellen weist noch signifikant höhere Werte auf als ohne Tetrahydrobiopterin.

Die Dynamik, die wir unter Sepiapterin beobachtet hatten, wiederholt sich also unter den gleichen Konzentrationen Tetrahydrobiopterin in nahezu identischer Weise.



**(Abbildung 16) NO-Produktion nach Tetrahydrobiopterininkubation 10  $\mu\text{M}$  in pmol/mg**

(graphische Darstellung der Mittelwerte als Punkte und der Standardfehler als Error Bars, oxLDL = oxidierte Low Density Lipoproteine, HG = hohe Glukosekonzentration, DAHP = Diaminohydroxypyrimidin)



**(Abbildung 17) NO-Produktion nach Tetrahydrobiopterininkubation 100  $\mu$ M in pmol/mg**

(graphische Darstellung der Mittelwerte als Punkte und der Standardfehler als Error Bars, oxLDL = oxidierte Low Density Lipoproteine, HG = hohe Glukosekonzentration, DAHP = Diaminohydroxypyrimidin)

Innerhalb der Behandlungsgruppen (nativ, oxLDL, HG, DAHP) kommt es unter Tetrahydrobiopterin 100  $\mu$ M zu einem nahezu vollständigen Angleich des Ausmaßes der NO-Produktion.

### 3.2.6. NO nach PKC-Stimulation mit PMA

In Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen hatte sich gezeigt, dass die NO-Produktion von Endothelzellen durch Aktivierung der Phosphokinase C (PKC) mittels Phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) noch weiter gesteigert werden kann [81]. Der Grund hierfür liegt aller Wahrscheinlichkeit nach in einer gesteigerten Transkription der für eNOS kodierenden Genabschnitte und damit einer Steigerung der vorhandenen Enzymmenge [116]. Um zu untersuchen, inwiefern die unter Einfluss der proatherogenen Substanzen und der Sepiapterin- und Tetrahydrobiopterininkubation beobachteten Effekte auch unter einer zusätzlichen

PKC-Stimulation auftreten, wurden die oben beschriebenen Versuche nun nach 18-stündiger Vorinkubation der Endothelzellen mit PMA wiederholt.

Dass die NO-Produktion hiermit noch weiter gesteigert werden kann, hatte sich, wie weiter oben gezeigt, auch bei uns im Direktvergleich mit den nicht mit PMA behandelten Zellen bestätigt. Bei Betrachtung der folgenden Ergebnisse mag auffallen, dass die direkten Messergebnisse, z.B. der nativen Zellen ohne Tetrahydrobiopterin oder Sepiapterin, nun nicht höher erscheinen als die oben beschriebenen. Ein Vergleich mit den absoluten Zahlen der vorherigen Ergebnisse ist jedoch irreführend, da die folgenden Messungen mit PMA mehr als einen Monat später (andere Zellkulturpassagen, etwas älteren Reagenzien) stattgefunden haben und deshalb nur untereinander verglichen werden dürfen.

	<b>Nativ</b>	<b>oxLDL</b>	<b>HG</b>	<b>DAHP</b>
	<b><u>NO</u> (pmol/mg)</b>			
<b>ohne BH4/Sep.</b>	37 (3,0)	7 (0,5)**	23 (1,0)	8 (0,6)*
<b>BH4 10 µM</b>	39 (1,5)	47 (3,5)	56 (2,6)*	28 (1,2)
<b>BH4 100 µM</b>	33 (0,7)	39 (1,0)	52 (2,1)**	27 (1,0)
<b>Sep 10 µM</b>	51 (1,7)	32 (1,2)	61 (1,5)	10 (0,7)*
<b>Sep 100 µM</b>	21 (0,7)	19 (0,8)	51 (2,5)	14 (0,9)

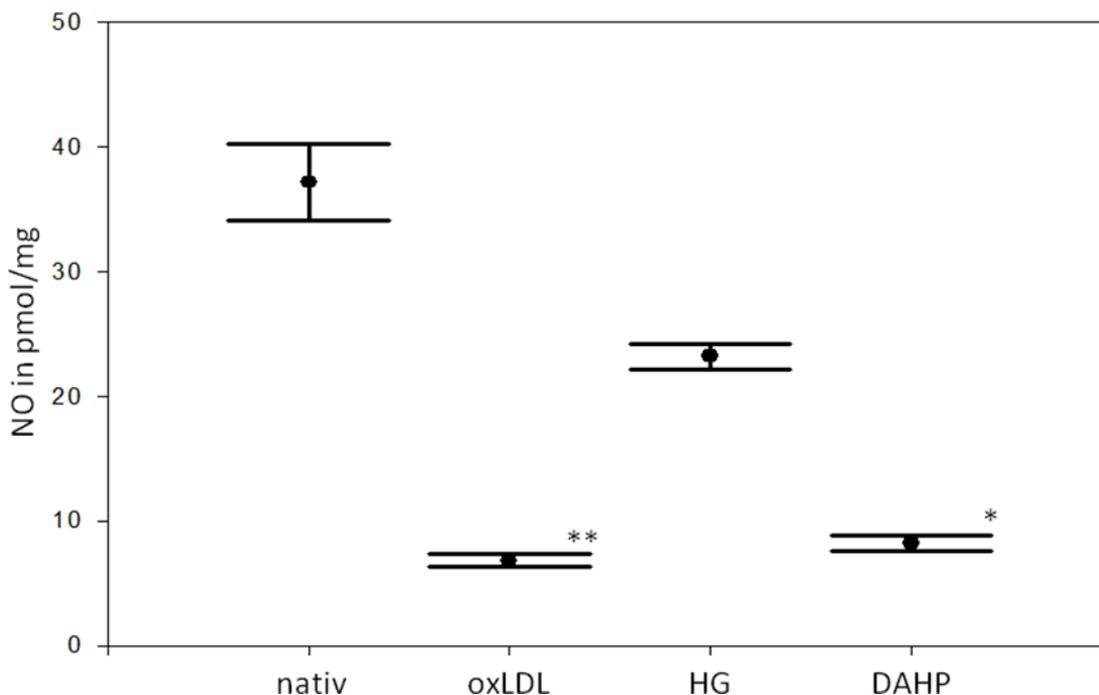
je n = 5

(Tabelle 10) Ergebnisse der NO-Messung der unterschiedlichen Behandlungsgruppen im DAF-Assay nach Stimulation der Phosphokinase C mit Phorbol-12-myristate-13-acetate und unter verschiedenen Konzentrationen Tetrahydrobiopterin und Sepiapterin (angegeben als NO-Konzentration bezogen auf Proteinmenge, Angabe als Mittelwerte mit Standardfehlern in Klammern, BH4 = Tetrahydrobiopterin, Sep = Sepiapterin, oxLDL = oxidierte Low Density Lipoproteine, HG = hohe Glukosekonzentration, high glucose, DAHP = Diaminohydroxypyrimidin, Prot. = Korrektur bezogen auf Proteinkonzentration, \* = signifikant versus nativ nach Kruskal-Wallis-H-Test und Adjustierung für multiple Vergleiche mit Dunn´s multiple comparison test)

Ohne Vorinkubation mit Tetrahydrobiopterin oder Sepiapterin finden sich nach PMA-Stimulation ähnliche Verhältnisse der Mittelwerte der NO-Produktion wie ohne PMA. Die Werte der oxLDL- und HG-Gruppe liegen wieder deutlich unter denen der nativen Zellen. Die NO-Produktion unter HG-Bedingungen fällt um knapp 40% geringer aus, die unter oxLDL-Bedingungen sogar um über 80%. Der Unterschied der NO-Produktion der nativen und der mit oxLDL behandelten Zellen ist hoch signifikant.

Die NO-Produktion der mit oxLDL behandelten Zellen liegt damit auf dem Niveau der mit DAHP behandelten Zellen.

Nach Inkubation mit Sepiapterin oder Tetrahydrobiopterin 10  $\mu\text{M}$  kommt es wieder zu einem deutlichen Anstieg der NO-Produktion, diesmal auch der nativen Zellen. Die Unterschiede mit und ohne Sepiapterin bzw. Tetrahydrobiopterin sind im Mann-Whitney-U-Test signifikant. Die Werte der oxLDL- und high-glucose-Gruppe liegen nun sogar höher, als die der nativen Zellen.



**(Abbildung 18) NO-Produktion nach PKC-Stimulation mit Phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) ohne Sepiapterin oder Tetrahydrobiopterin in pmol/mg** (graphische Darstellung der Mittelwerte als Punkte und der Standardfehler als Error Bars, oxLDL = oxidierte Low Density Lipoproteine, HG = hohe Glukosekonzentration, DAHP = Diaminohydroxypyrimidin, \* = signifikant versus nativ nach Kruskal-Wallis-H-Test und Adjustierung für multiple Vergleiche mit Dunn´s multiple comparison test, \*\* = hoch signifikant)

Nach 100  $\mu\text{M}$  Sepiapterin oder Tetrahydrobiopterin sinken die Werte in allen Gruppen wieder ab, allerdings bleiben sie diesmal in der oxLDL- und high-glucose-Gruppe deutlich über dem Ausgangsniveau, bei den nativen Zellen sinken sie wieder signifikant unter das Ausgangsniveau ab.

Die größten Anstiege nach Sepiapterin bzw. Tetrahydrobiopterininkubation sind in der high-glucose-Gruppe zu beobachten. Die mit oxLDL behandelten Zellen scheinen nicht in gleicher Weise von Tetrahydrobiopterin und Sepiapterin zu profitieren, der Anstieg ist hier viel geringer als bei den high-Glucose-behandelten Zellen.

Dieser Unterschied ist noch drastischer bei den mit DAHP behandelten Zellen. Hier findet sich ein sehr viel stärkerer Anstieg unter Tetrahydrobiopterin als unter Sepiapterin.

Der Mittelwert der NO-Produktion der mit dem eNOS-Inhibitor L-Name behandelten Zellen lag mit 5 pmol/mg nochmal unter dem der mit DAHP-behandelten.

### **3.2.7. NO nach Behandlung mit Tiron**

Parallel zu den zuletzt wiedergegebenen Versuchen wurde die NO-Produktion von Zellen nochmal unter identischen Bedingungen, jetzt jedoch nach Behandlung mit dem Superoxidanionenfänger Tiron (1 mM), gemessen. Auf diese Weise sollte untersucht werden, inwiefern die beobachteten Effekte von der Anwesenheit von Superoxidanionen abhängig sind. Da hier vor allem die Unterschiede im Vergleich zu den ohne Tiron gemessenen Werten von Interesse waren, werden sie zur besseren Übersicht im Folgenden auch als Differenz ( $\Delta$ ) angegeben. Da jetzt auch nur jeweils ein Mittelwert mit einem anderen und nicht mehr primär die Unterschiede innerhalb der Behandlungsgruppen verglichen werden sollen, kann nun auch ohne Bedenken jeweils ein Zweigruppenvergleich im Sinne eines Mann-Whitney-U-Tests durchgeführt werden.

Auf den ersten Blick wirken die Veränderungen der NO-Konzentrationen nach Inkubation mit Tiron uneinheitlich und scheinen keinem klaren Prinzip zu folgen. Bei genauerer Betrachtung ergibt sich jedoch folgendes Bild: Zunahmen an NO-Produktion finden sich bei allen mit oxLDL behandelten Zellen, mit und ohne

Tetrahydrobiopterin- oder Sepiapterinsupplementation, egal in welcher Konzentration. Außerdem bei den nativen und mit hoher Glucosekonzentration behandelten Zellen unter den hohen Konzentrationen Sepiapterin und Tetrahydrobiopterin (100 µM).

Abnahmen hingegen fanden sich bei den nativen und HG-Zellen ohne Tetrahydrobiopterin oder Sepiapterin, sowie unter den niedrigen Konzentrationen (10 µM).

	nativ	oxLDL	HG	DAHP
<b><u>Δ NO mit vs. ohne Tiron</u></b> (pmol/mg)				
<b>ohne BH4/Sep.</b>	-7 (3,7)	+18 (1,3)*	-3 (1,4)	+6 (0,5)*
<b>+ BH4 10 µM</b>	-5 (6,0)	+1 (2,3)	-20 (9,1)*	+2 (1,3)
<b>+ BH4 100 µM</b>	+2 (1,7)	+7 (0,7)*	0 (3,1)	+6 (2,5)*
<b>+ Sep. 10 µM</b>	-15 (2,1)*	+14 (2,6)*	+2 (2,5)	-4 (1,3)*
<b>+ Sep. 100 µM</b>	+14 (1,4)*	+13 (2,0)*	+1 (3,6)	-4 (1,7)*

je n = 5

(Tabelle 11) Zu- und Abnahmen der PKC-stimulierten NO-Produktion nach Tironbehandlung und unter verschiedenen Konzentrationen Tetrahydrobiopterin und Sepiapterin (angegeben als Unterschiede in NO-Konzentration bezogen auf Proteinmenge, Angabe als Mittelwerte mit Standardfehlern in Klammern, Signifikanzniveaus der Zu- und Abnahmen nach Zweigruppenvergleich durch Mann-Whitney-U-Test, BH4 = Tetrahydrobiopterin, Sep. = Sepiapterin, oxLDL = oxidierte Low Density Lipoproteine, HG = hohe Glucosekonzentration, high glucose, DAHP = Diaminohydroxypyrimidin, Prot. = Korrektur bezogen auf Proteinkonzentration, \* = signifikante Zu- oder Abnahme nach Mann-Whitney-U-Test)

Das heißt, überall dort wo zuvor, absolut oder in Relation zu den anderen Gruppen, eine deutliche Erniedrigung vorgelegen hat, nimmt die NO-Produktion unter

Tirongabe eher zu. Wo sie nur gering vermindert oder normal war oder nach Tetrahydrobiopterin- oder Sepiapterinbehandlung zugenommen hatte, nimmt sie nach Tirongabe eher ab.

Eine besondere Situation ergibt sich bei den mit DAHP behandelten Zellen: Hier nimmt die NO-Produktion bei den ohne Tetrahydrobiopterin oder Sepiapterin sowie den mit Tetrahydrobiopterin behandelten Zellen zu. Bei den mit Sepiapterin behandelten Zellen, die auch ohne Tiron diese überraschend niedrigen NO-Konzentrationen gezeigt hatten, nimmt sie noch weiter ab.

### 4.1 Bewertung der Methodik

Das ausgewählte Zellkultursystem erwies sich als zuverlässig und einfach zu handhaben. Die Zellen der beschriebenen Zelllinie EA.hy 926 sind unanfällig und weisen bei den verwendeten Passagen ein konstantes Wachstumsverhalten auf. Die Verwendung der beschriebenen Geräte und Einmalmaterialien erwiesen sich für die genannten Untersuchungen als praktikabel. Bezüglich der verwendeten Lösungen und Chemikalien ist lediglich das schwierige Lösungsverhalten des DAHP zu nennen, das unterhalb von 37°C und bei Konzentrationen höher als 10 mM zum Ausfällen neigt. Ferner fiel die rasche Autooxidation des als Pulver gelieferten Tetrahydrobiopterin auf, so dass mindestens vor jeder Tetrahydrobiopterinbestimmung, besser jedoch mehrfach pro Versuchstag eine jeweils neue Standardkurve erstellt werden muss. Auch bei optimaler Lagerung sollte sicherheitshalber alle vier Wochen neues Tetrahydrobiopterin beschafft werden.

Als schwierig stellte sich die Standardisierung der Lipidoxidation mit Kupfersulfat heraus. Selbst wenn „gepooltes“ LDL der Spender verwendet wurde, fand sich doch eine sehr variable Oxidierbarkeit. Dabei handelte es sich stets um Spender die keine Medikamente einnahmen. Auch nach Einführung des zweiten Reinigungsschrittes mit dem Amicon-Filter unterschied sich der Zeitpunkt des Farbumschlages als sichtbares Zeichen einer erfolgreichen Oxidation oft noch deutlich voneinander. Vereinzelt musste die Konzentration des Kupfersulfats auf 15 bis 20 µM erhöht werden. Die Vergleichbarkeit des resultierenden Oxidationsergebnisses wurde durch die Durchführung der TBARS-Messungen gewährleistet. Für zukünftige, ähnliche Versuche besäße jedoch die Verwendung kommerziell gewonnener und gereinigter Low Density Lipoproteine Vorteile.

Ein wesentlicher Nachteil und möglicher Kritikpunkt an der verwendeten Methodik betrifft in ähnlicher Weise die Messung des intrazellulären Tetrahydrobiopterinspiegels durch HPLC sowie die NO-Messung mittels DAF-2-Assay. Bei beiden Methoden lagen die niedrigsten erhobenen Messwerte im nanomolaren Bereich, bzw. im Bereich von Picomol pro Milligramm, wenn auf die Proteinkonzentration korrigiert wurde. Bei den HPLC-Messungen war die Varianz der Ergebnisse trotz sorgfältigstem Arbeiten nicht ganz unerheblich. Als am wichtigsten erwies sich hier das Verwenden einer ganz neuen Hauptsäule. Die Ergebnisse der DAF-2-Messungen waren sehr viel besser reproduzierbar und es kam praktisch zu keinen Überschneidungen von Messwerten zwischen den einzelnen Gruppen, weswegen wir die erhobenen Werte trotz der niedrigen Konzentrationen als valide ansahen. Hier ist die Ausnutzung der maximalen Gerätesensitivität notwendig um Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen detektieren zu können.

Bei beiden Verfahren befindet man sich jedoch sicherlich bei den erhobenen Werten nur knapp über der Grenze der Messbarkeit. Die HPLC ist dabei dennoch als Messmethode der Wahl für die Tetrahydrobiopterinbestimmung etabliert und setzt lediglich ein hohes Maß an Erfahrung und Einarbeitung voraus. Der große Nachteil des DAF-2-Assays ist das Fehlen größerer Mengen an Vergleichsdaten. So wurde damit zwar wie beschrieben schon häufiger extrazellulär NO gemessen, allerdings kaum um Unterschiede zwischen verschieden behandelten Zellen zu detektieren. Dies erschwert die Diskussion der gewonnenen Ergebnisse. Es existieren außerdem eine Reihe von möglichen Fehlerquellen, insbesondere die Lichtempfindlichkeit des DAF-2-Reagenz, das eine akribische Standardisierung der Versuchsvorbereitung notwendig macht. Sollten in Zukunft Veröffentlichungen von Vergleichsdaten weiterhin spärlich bleiben, ist die Frage, ob nicht die Anwendung einer anderen Methode zur NO-Messung, z.B. die der ISO-NO-Elektrode, eine bessere Vergleichbarkeit schaffen würde.

Zu guter Letzt muss unterstrichen werden, dass es sich bei der NO-Messung um die Messung einer stimulierten NO-Produktion, in diesem Falle mit A23187 Calciumionophor handelt. Dies entspricht zwar ausnahmslos der gängigen Praxis vergleichbarer Untersuchungen, da NO unstimuliert praktisch nicht ausreichend gemessen werden kann, es könnte aber durchaus berechtigt die Frage gestellt werden, inwiefern stimulierte NO-Produktion wirklich physiologische Verhältnisse widerspiegelt.

## **4.2 Zusammenhänge von intrazellulärem Tetrahydrobiopterin- spiegel und endothelialer NO-Produktion**

### **4.2.1 Auswirkungen proatherogener Bedingungen**

Dass Tetrahydrobiopterin eine essentielle Rolle für die physiologische Funktion der endothelialen NO-Synthetase spielt, ist ausreichend belegt und gilt als allgemein akzeptiert [125]. Die Ansicht, dass es unter proatherogenen Bedingungen zu einer Verminderung der Tetrahydrobiopterinbioverfügbarkeit kommt, die mit einer endothelialen Dysfunktion einhergeht und der man durch exogene Zufuhr entgegenwirken kann, ist nahezu genau so weit verbreitet [97]. In einer Vielzahl an gerade tierexperimentellen Studien wird seither schlichtweg eine Reversibilität pathologischer Phänomene nach Sepiapterinzufuhr als Beleg für eine kausale Rolle eines vorherigen Tetrahydrobiopterinmangels angenommen. Wie zuvor zitiert hatte es bereits klinische Studien gegeben und Pharmafirmen bemühten sich um Zulassung von Tetrahydrobiopterin und Sepiapterin als Medikamente [24]. Diese verbreitete Gewissheit steht aber, wie in der einleitenden Literaturübersicht dargestellt, in einem deutlichen Gegensatz zu dem eigentlichen Wissen über den Tetrahydrobiopterinmetabolismus unter proatherogenen Bedingungen und unter Substitution von Tetrahydrobiopterin oder seinen Vorläufersubstanzen auf zellulärer Ebene.

Der erste Teil dieser Arbeit bestand deshalb darin, den intrazellulären Tetrahydrobiopterinspiegel unter dem Einfluss von oxidierten Low Density Lipoproteinen und supraphysiologischen Glucosekonzentrationen in einer humanen endothelialen Zelllinie zu beurteilen, um ihn im zweiten Teil mit entsprechenden Veränderungen bei der NO-Produktion korrelieren zu können.

Wir konnten an einer humanen Zelllinie die Ergebnisse mit bovinen aortalen Endothelzellen bestätigen, bei denen sich unter supraphysiologischen Glucosekonzentrationen eine deutliche Verminderung des intrazellulären BH<sub>4</sub>-Spiegels gezeigt hatte [30]. Allerdings war diese Verminderung nach Adjustierung für den Vergleich mehrerer Gruppen miteinander nicht mehr signifikant, was auch an nicht unerheblichen Varianzen der Messwerte lag. Bei einem Zweigruppenvergleich hätten sich jedoch stets signifikante Ergebnisse ergeben.

Dabei sanken in der high-glucose-Gruppe das Gesamtbiopterin und das Verhältnis von Tetrahydrobiopterin zu den oxidierten oder teiloxidierten Formen ab. Allerdings ergibt sich auch hier nur in einem Zweigruppenvergleich ein signifikantes Ergebnis. Man gewinnt jedoch den Eindruck, es käme sowohl zu einer verminderten de novo Synthese als auch zu einer vermehrten oxidativen Inaktivierung bzw. einem verminderten Recycling oxidierteter Formen. Von den Versuchen mit den bovinen aortalen Endothelzellen her wissen wir, dass unter Einwirkung hoher Glucosekonzentrationen eine Verminderung von mRNA des Schlüsselenzyms der Tetrahydrobiopterinsynthese, der GTP-Cyclohydrolase, gemessen werden konnte [30], was auf eine verminderte de novo Synthese hindeutet.

Diese Informationen zusammengenommen könnten zu zwei verschiedenen pathophysiologischen Mechanismen passen. Bei dem ersten käme es unter einen Diabetes mellitus simulierenden Bedingungen zu einer Herabregulation der GTP-Cyclohydrolaseaktivität über eine verminderte Transkription. Dies könnte direkt oder über eine vermehrte Aktivierung des Cyclohydrolase feedback regulatory protein (GFRP) geschehen. Wahrscheinlicher ist ein direkter Effekt, da für GFRP zwar inhibierende Effekte auf das Enzym, aber keine transkriptionshemmenden Effekte beschrieben sind [39, 88]. Die daraus resultierende verminderte Bioverfügbarkeit von Tetrahydrobiopterin führt dann zu einem vermehrten uncoupling der endothelialen NO-Synthetase mit einer vermehrten  $O_2^-$ -Produktion. Dass dem so ist, hatte ebenfalls an bovinen Endothelzellen gezeigt werden können [30]. Die vermehrten Superoxidanionen würden dann zusätzlich eine vermehrte Oxidation des verbliebenen Tetrahydrobiopterin bewirken und könnten so das verschobene Verhältnis von Tetrahydrobiopterin zu den oxidierten Formen (Dihydrobiopterin und Biopterin) erklären.

Die zweite Möglichkeit bestände darin, dass supraphysiologische Glucosespiegel primär ein eNOS-uncoupling mit einem konsekutiven  $O_2^-$ -Exzess bewirken. Eine so entstehende große Menge an oxidierten Pteridinen könnte über einen feedback-Mechanismus die BH<sub>4</sub>-Synthese über die GTP-Cyclohydrolase hemmen. Ein solcher feedback-Mechanismus wird zwar postuliert [97], unsere Ergebnisse mit dem Superoxidanionenfänger Tiron unterstützen aber eher die erste der geschilderten Varianten. Wie später noch ausführlicher diskutiert werden wird, hatte Tiron in der aktuellen Arbeit keine steigernde Wirkung auf die NO-Produktion unter high-glucose-

Bedingungen ohne Sepsiapterin- oder Tetrahydrobiopterinzufuhr, was stark gegen eine Schlüsselrolle von Superoxidanionen spricht.

Die Ergebnisse eines verminderten intrazellulären Tetrahydrobiopterinspiegels unter supranormalen Glucosekonzentrationen ließen sich gut mit einer hoch signifikanten Verminderung der NO-Produktion im DAF-2-Assay korrelieren. Die Zunahme der NO-Produktion unter geringen Konzentrationen von Sepsiapterin oder Tetrahydrobiopterin legt auch einen kausalen Zusammenhang nahe. Dass Tiron als Antioxidans diesen Effekt bei den mit hohen Glucosekonzentrationen behandelten Zellen nicht imitieren konnte, spricht gegen einen unspezifischen, rein antioxidativen Effekt der Sepsiapterin- oder Tetrahydrobiopterininkubation.

Unsere Ergebnisse zeigen auch, dass es sich bei der verminderten Tetrahydrobiopterinbioverfügbarkeit unter proatherogenen Bedingungen nicht nur um eine Verdrängung des Tetrahydrobiopterins aus seiner Bindung am Zinc-Thiolat-Cluster der endothelialen NO-Synthetase handelt, wie vormals auch vermutet wurde [166], sondern um ein tatsächliches Absinken des intrazellulären Spiegels.

Mit der aktuellen Arbeit ergibt sich also an einer humanen Zelllinie ein guter Beleg für das Modell eines Tetrahydrobiopterinmangels als Ursache oder Mitursache der endothelialen Dysfunktion bei Diabetes mellitus.

Unter der Einwirkung oxidierter Low Density Lipoproteine kommt es zu einem noch viel deutlicheren und in allen Darstellungsformen signifikanten Absinken des intrazellulären Tetrahydrobiopterinspiegels. Erstaunlicherweise hatte es bislang hierfür keinen zellkulturellen Nachweis, schon gar nicht an einer humanen Endothelzelllinie, gegeben. Zeitgleich mit den aktuellen Experimenten erschien erstmals eine zellkulturelle Arbeit mit humanen aortalen Endothelzellen unter dem Einfluss nativer Low-Density-Lipoproteine [24].

Im Gegenteil zu den mit hoher Glucosekonzentration behandelten Zellen kam es in unseren Versuchen kaum zu einem Absinken des Gesamtbiopterins, sondern zu einem signifikanten Absinken des Verhältnisses von Tetrahydrobiopterin zu den oxidierten Formen. Unter nativen Bedingungen liegt nahezu zehnmal so viel Gesamtbiopterin als Tetrahydrobiopterin vor, wie unter Einfluss oxidierter Low Density Lipoproteine. Es muss also unter diesen Bedingungen zu einer drastischen

Zunahme der Oxidation von Tetrahydrobiopterin oder zu einer drastischen Abnahme seines reduktiven Recycling kommen.

Diese These wird in der aktuellen Arbeit noch von einer zweiten Seite her unterstützt, nämlich durch die Reversibilität der verminderten NO-Produktion nach Tirongabe. Die NO-Produktion war unter oxLDL-Einfluss in hoch signifikanter Weise vermindert und gleicht sich dem nativen Wert nach Tirongabe praktisch vollständig an. Dass die verminderte NO-Produktion eher Ausdruck einer oxidativen Inaktivierung von Tetrahydrobiopterin als nur von NO ist, lässt sich durch unsere Ergebnisse ebenfalls belegen, da es durch Anheben des intrazellulären Tetrahydrobiopterinspiegels nach exogener Zufuhr von Tetrahydrobiopterin oder Sepiapterin in geringer Dosierung ebenfalls zu einer vollständigen Reversibilität kam.

Wir können also auch für die endotheliale Dysfunktion unter dem Einfluss oxidierter Low Density Lipoproteine ein schlüssiges Erklärungsmodell anbieten, dass auf einer Verminderung des eNOS-Kofaktors Tetrahydrobiopterin beruht. Übertragen auf die Stoffwechselbedingungen, die unser Versuchsaufbau imitiert, würde dies aber auch nahelegen, dass bei der Hypercholesterinämie im Gegensatz zum Diabetes mellitus nicht eine verminderte Tetrahydrobiopterinsynthese, sondern primär eine Oxidation des Tetrahydrobiopterin im Vordergrund steht.

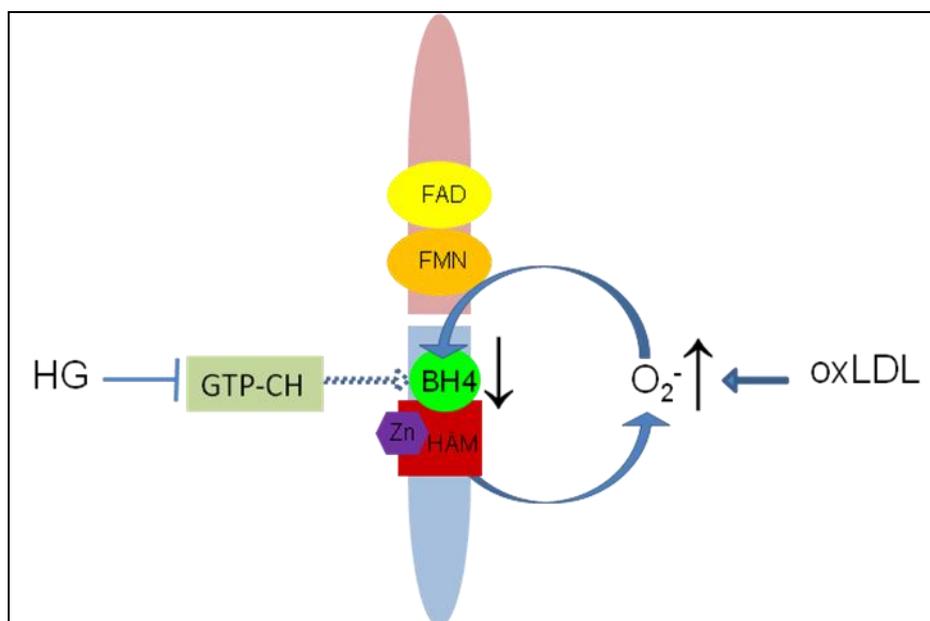
Dass diese Oxidation nicht direkt durch die oxidierten Lipoproteine, sondern über den Umweg von Superoxidanionen geschieht, scheint ebenfalls aus den Beobachtungen der NO-Produktion nach Tirongabe hervorzugehen, denn Tiron inaktiviert ja  $O_2^-$ -Radikale, nicht oxidiertes LDL.

Dabei werden die  $O_2^-$ -Radikale aller Wahrscheinlichkeit nach von der endothelialen NO-Synthetase, z.B. im Zustand eines uncoupling, selber generiert, nicht durch andere Oxidasen, wie z.B. NADPH-Oxidase oder Xantinoxidase. Das geht aus Versuchen hervor, in denen die Superoxidproduktion unter Einfluss von oxidierten oder nichtoxidierten Lipoproteinen durch den eNOS-Inhibitor L-NAME verhindert werden konnte [155].

Aus dem gleichen Grund ist auch eine Verminderung der NO-Produktion unter Einfluss von oxidiertem LDL durch eine Hemmung der NO-Synthetase-Aktivität unwahrscheinlich, wie sie über eine reduzierte Expression oder verstärkte Hemmung

über den endogenen eNOS-Inhibitor asymmetrisches Dimethylarginin (ADMA) zustande kommen könnte.

Es ist also ein Circulus vitiosus aus oxidativer Inaktivierung von Tetrahydrobiopterin, folgendem eNOS-uncoupling, vermehrter Generation von  $O_2^-$ -Radikalen und dadurch wieder weiterer oxidativer Inaktivierung von Tetrahydrobiopterin vorstellbar. Die Frage, die sich allerdings bislang nicht beantworten lässt, ist, an welcher Stelle oxidierte Low Density Lipoproteine diesen Vorgang initial anstoßen.



**(Abbildung 19) Vermutete Mechanismen der HG- und oxLDL-Wirkung auf BH4-Spiegel und eNOS-Funktion: HG führt primär zu einer Hemmung der GTP-CH und damit zu vermindertem BH4, oxLDL bewirkt hingegen eine Oxidation von BH4 über  $O_2^-$ , beides hat schließlich ein uncoupling mit verminderter NO- und vermehrter  $O_2^-$ -Produktion sowie Ausbildung eines Circulus vitiosus zur Folge (HG: hohe Glucosekonzentration, oxLDL: oxidierte Low Density Lipoproteine, BH4: Tetrahydrobiopterin, GTP-CH: Guanosintriphosphat-Cyclohydrolase,  $O_2^-$ : Superoxidradikal, FMN: Flavinmononukleotid; FAD: Flavinadeninindinukleotik; Zn: Zinc im Zink-Thiolatkomplex).**

Die Reversibilität durch Zufuhr exogener Tetrahydrobiopterinvorstufen beweist auch, dass eine gesteigerte Oxidation und weniger ein gestörtes reduktives Recycling vorliegen muss. Wie in der Einleitung beschrieben werden alle exogenen Pteridine, selbst wenn es sich um Tetrahydrobiopterin selber handelt, in teiloxidierte Form in die Zelle und den salvage pathway eingeschleust. Intrazellulär müssen sie dann wieder reduziert werden, was von unseren Ergebnissen ausgehend ungestört

möglich war. Zum einen war ja die verminderte NO-Synthese durch Zufuhr von Sepiapterin und Tetrahydrobiopterin (10  $\mu$ M) reversibel, zum anderen lag auch nach Sepiapterinzufuhr fast 1000-fach mehr Tetrahydrobiopterin in seiner voll reduzierten Form vor. Eine Erschöpfung der Kapazität der reduzierenden Enzyme (Sepiapterinreduktase und Dihydrofolatreduktase) oder ihrer Kofaktoren (NADPH und Tetrahydrofolsäure) kann also nicht vorgelegen haben.

Die ausführlichste Arbeit, die sich bisher mit dem Zusammenhang von endothelialer Dysfunktion und Tetrahydrobiopterinmetabolismus vor dem Hintergrund der Hypercholesterinämie beschäftigt hatte, hatte an einem Tiermodell mit Hasen (New Zealand White Rabbits) stattgefunden [152]. Hier konnten verminderte Tetrahydrobiopterinspiegel in Aortenpräparaten und eine verminderte NO-Produktion nachgewiesen werden. Mit der aktuellen Arbeit konnten wir diesen Zusammenhang erstmals in einer humanen Zelllinie bestätigen und außerdem ausgehend von der Analyse des Verhältnisses von nichtoxidierten zu oxidierten Formen, dem Verhalten von Tetrahydrobiopterinspiegel und NO-Produktion nach exogener Pteridinzufuhr und den Phänomenen nach Tirongabe noch weitere Aussagen zu möglichen beteiligten Mechanismen machen. Eine Verminderung des intrazellulären Tetrahydrobiopterinspiegels hatte sich auch in der erst kürzlich erschienenen, oben zitierten Arbeit von Cosentino et al. unter einem Einfluss von nativen Low Density Lipoproteinen (100 mg/dl) gefunden [24]. Dies war ebenfalls mit einer verminderten NO-Produktion, gemessen mit einem NO-Microsensor, und einer vermehrten  $O_2^-$ -Produktion, gemessen durch oxidative Verminderung von Cytochrom C, einhergegangen.

### **4.2.2 Auswirkungen exogener Pteridinzufuhr**

Das eigentlich Widersprüchliche an der Literatur über Substitution von Tetrahydrobiopterin oder Sepiapterin unter dem Einfluss atherogener Risikofaktoren war, dass in einzelnen Arbeiten nicht positive, sondern negative Effekte dadurch erzielt werden konnten. Dies betraf sowohl Phänomene auf molekularer und zellulärer Ebene wie verminderte NO- und vermehrte  $O_2^-$ -Produktion [151, 153] als auch funktionelle Parameter wie verminderte agonistvermittelte Vasodilatation [91, 151, 152].

Auch am Beginn dieser Arbeit waren wir sehr überrascht trotz Verminderung von Tetrahydrobiopterin unter oxLDL- und HG-Behandlung und erfolgreichem Anheben nach Sepiapterinzufuhr festzustellen, dass geradezu gegenteilige Effekte auf die NO-Produktion eintraten. So kam es bei der anfänglich verwendeten Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  Sepiapterin bei den proatherogen behandelten Zellen zu keiner signifikanten Verbesserung der NO-Produktion, bei den Zellen ohne proatherogene Behandlung sogar zu einer hoch signifikanten Abnahme.

Wir haben in dieser Arbeit darüberhinaus erstmals eine eindeutige Dosis-Wirkungsbeziehung von Sepiapterinzufuhr und endothelialer NO-Produktion mit einer sehr geringen therapeutischen Breite nachweisen können.

Dabei ist die optimale Menge an Zufuhr unter proatherogenen und nicht proatherogenen Bedingungen nicht gleich. Bei nativen Zellen führten sehr geringe Konzentrationen von Sepiapterin zu einer leichten Zunahme, höhere zu einer Abnahme des endothelialen NO-Outputs. Die Konzentration 10  $\mu\text{M}$  bewirkte bei nativen Zellen keine signifikante Veränderung, bei den mit oxLDL und HG behandelten Zellen eine Zunahme sogar über das Maß der nativen Zellen hinaus. Unter einer Supplementation von 100  $\mu\text{M}$  Sepiapterin bestand bei den proatherogen behandelten Zellen eine NO-Produktion wie ganz ohne Sepiapterin und bei den nativen Zellen wurde sie hoch signifikant supprimiert.

Dies erweckt den Eindruck, als gäbe es so etwas wie eine optimale intrazelluläre Konzentration. Ist diese vermindert, so hilft eine Substitution bis der Mangel ausgeglichen ist. Wird stark übersubstituiert, kommt es zu einem nachteiligen Effekt.

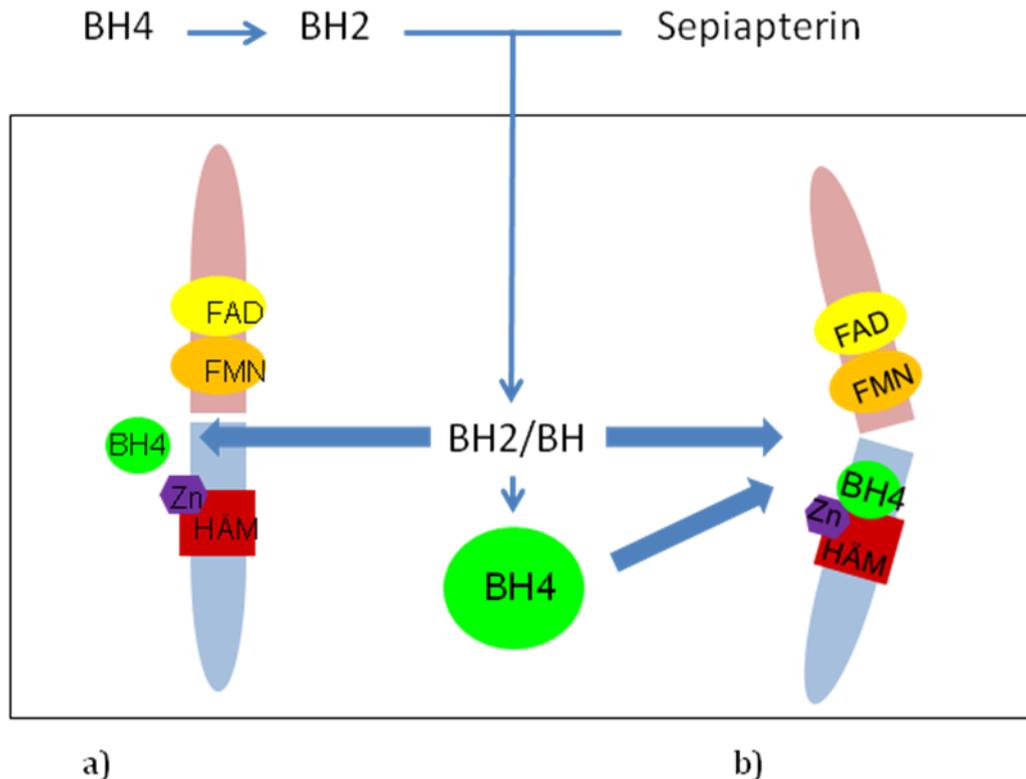
Aufschlussreich in diesem Zusammenhang ist eine Arbeit von Vasquez-Vivar et al. [153]. Am isolierten Enzym hatte diese Arbeitsgruppe eine vermehrte NO- und verminderte  $\text{O}_2^-$ -Produktion nach Zugabe von Tetrahydrobiopterin mittels EPR Spin Trapping festgestellt. Unter Zugabe von Dihydrobiopterin und Sepiapterin kam es auch in Anwesenheit von ausreichend Tetrahydrobiopterin zu einer Zunahme an  $\text{O}_2^-$  und Abnahme von NO. Ausgehend von der Erkenntnis, dass Tetrahydrobiopterin für den stabilen Zustand des Häm-Dioxy-Komplexes der NO-Synthetase und dessen regelrechter Teilnahme am Elektronenfluss wichtig ist, schlossen die Autoren, dass nur die voll reduzierte Form und nicht Dihydrobiopterin oder Sepiapterin diese Aufgabe erfüllen könnten. Sie schlossen weiter, dass deshalb das Verhältnis aus

Tetrahydrobiopterin zu den oxidierten Formen die entscheidende Größe für eine physiologische eNOS-Funktion darstelle.

Dieser letzten Schlussfolgerung widersprechen allerdings die Ergebnisse der aktuellen Arbeit. Auch hier ist wieder die genaue Analyse des Verhältnisses aus Tetrahydrobiopterin zu Dihydrobiopterin und Biopterin aus den HPLC-Messungen wichtig. Wir konnten beobachten, dass nach Sepiapterininkubation der Gesamtbiopterinspiegel, aber unter allen Behandlungsbedingungen auch die Ratio aus Tetrahydrobiopterin zu den oxidierten Formen, signifikant zunahm und die NO-Synthese zumindest bei den nicht proatherogen behandelten Zellen trotzdem abnahm. Das reine Verhältnis kann also nicht entscheidend sein.

Eine Erklärung könnte darin bestehen, dass nicht das Verhältnis, sondern die absolute Konzentration von oxidierten oder teiloxidierten Pteridinen in unmittelbarer Nähe des Enzyms entscheidend ist. Dies wäre vor allem dann entscheidend, wenn die oxidierten Formen eine stärkere Affinität zu der Tetrahydrobiopterinbindungsstelle des Enzyms oder zu einer seiner Bindungsstellen besäßen. Dies ließe sich gut mit unseren Ergebnissen und denen von Vasquez-Vivar et al. vereinbaren. Die Hypothese unterschiedlich starker Affinitäten war auch dort schon diskutiert worden. Dihydrobiopterin könnte dann Tetrahydrobiopterin entweder aus seiner Bindung verdrängen oder es könnte Effekte des Tetrahydrobiopterin an der NO-Synthetase behindern ohne direkt an den Tetrahydrobiopterinliganden zu binden (Abb.20). Es war spekuliert worden, ob es z.B. NADPH von der L-Argininoxidation entkoppeln könnte [152].

Für Sepiapterin ist bekannt, dass es bei neuronaler NO-Synthetase mit einer Effizienz von 80% Tetrahydrobiopterin aus seiner Bindungsstelle verdrängen kann [64]. In Bezugnahme auf diese Erkenntnis wird bereits in einem „Letter to the Editor“ in der Zeitschrift *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 2003 die Überlegung diskutiert, dass, wenn dies auch für die endotheliale NO-Synthetase zuträfe, der langsamer arbeitende salvage pathway schlichtweg zu viele toxische Metabolite erzeugen, bzw. es zu einer Akkumulation an unreduziertem Sepiapterin kommen könnte, das über eine Tetrahydrobiopterinverdrängung ein eNOS-uncoupling bewirken würde [8].



(Abbildung 20) Mögliche Mechanismen einer eNOS-hemmenden Wirkung höher dosierter exogener BH4- oder Sepiapterinzufuhr: über eine Erhöhung der intrazellulären Menge oxidierter Pteridine (Dihydrobiopterin/Biopterin) könnte es zu einer kompetitiven BH4-Verdrängung (a) von seiner Bindungsstelle oder einer sterischen Konformationsänderung des Enzyms (b) kommen. Letzteres könnte auch durch BH4 selber bewirkt werden (BH4: Tetrahydrobiopterin, BH2: Dihydrobiopterin, BH: Biopterin, FMN: Flavinmononukleotid; FAD: Flavinadenindinukleotik; Zn: Zink im Zinc-Thiolatkomplex).

In diesen Zusammenhang könnten auch die Beobachtungen passen, die wir in der aktuellen Arbeit an den mit dem synthetischen GTP-Cyclohydrolaseinhibitor DAHP behandelten Zellen gemacht haben. Nach Sepiapterin- und Tetrahydrobiopterinbehandlung stiegen die Messwerte für die NO-Produktion in dieser Gruppe zwar am stärksten an, erreichten aber trotz Anheben des intrazellulären Tetrahydrobiopterinspiegels um das 1000-fache nie das Ausmaß der NO-Produktion der anderweitig behandelten oder nativen Zellen. Dies steht in Einklang mit der in der Einleitung zitierten Arbeit, in der gezeigt werden konnte, dass exogene Zufuhr von Pteridinen trotz Korrektur des intrazellulären Tetrahydrobiopterinspiegels einen durch BH4-Synthesehemmung zustande gekommenen Mangel an NO-Produktion nicht vollständig kompensieren kann [42].

Eine Erklärung hierfür könnte die erwähnte Akkumulation von gleichzeitig eNOS-inhibierenden Metaboliten bei der BH4-Generierung über den salvage pathway sein.

Eine weitere wäre, dass der intrazelluläre Tetrahydrobiopterinspiegel zwar angehoben wird, das Tetrahydrobiopterin jedoch, wenn es aus dem salvage pathway stammt, nicht ausreichend im richtigen Zellkompartiment vorhanden ist. eNOS ist intrazellulär vor allem im Golgi Apparat und in den plasmalemmlen Caveolae lokalisiert [38, 130]. Es wäre durchaus vorstellbar, dass auch der Transport des gebildeten Tetrahydrobiopterins unter proatherogenem Einfluss gestört ist, auch wenn der intrazelluläre Spiegel ausreichend angehoben ist. Ähnlich hatte man bei L-Arginin festgestellt, dass es unter bestimmten Bedingungen trotz ausreichender Gesamtkonzentration durchaus zu intrazellulären Fehlverteilungen kommen kann [67].

Eine weitere Erklärung für den inhibierenden Effekt einer höher dosierten Sepiapterininkubation auf die NO-Synthese könnte natürlich auch in einem direkten toxischen Effekt des entstehenden Tetrahydrobiopterin selber liegen, der ab einer bestimmten Konzentration einträte. Belege hierfür oder eine allgemein akzeptierte These für einen entsprechenden Pathomechanismus liegen aber nicht vor.

Ein Denkansatz in diese Richtung ergibt sich höchstens aus einer schon etwas länger zurückliegende Arbeit von Mayer et al. [89]. Hier hatten sich bei Versuchen an isolierter neuronaler NO-Synthetase Hinweise ergeben, dass bestimmte Tetrahydrobiopterinkonzentrationen nicht nur als Redox-Kofaktor notwendig sind, sondern auch ganz spezifische allosterische Funktionen für das Enzym erfüllen. Davon ausgehend wäre es natürlich vorstellbar, dass sehr hohe Konzentrationen auf diesem Wege einfach eine Konformationsänderung des Enzyms bewirken, z.B. im Sinne eines uncoupling, welche die Abnahme der NO-Produktion bewirkt.

Eine weitere Auffälligkeit an den Ergebnissen unserer Arbeit ist, dass die NO-Produktion nach Zufuhr geringer Pteridinmengen in der oxLDL- und Glucosegruppe nicht nur stärker anstieg als bei den nativen Zellen, sondern sogar das Niveau der nativen Zellen mit und ohne Sepiapterin übertraf. Außerdem fiel unter höheren Dosierungen die NO-Produktion nicht so stark ab, wie bei nativen Zellen. Man gewinnt den Eindruck, die oxLDL- und HG behandelten Zellen könnten trotz vorheriger Verminderung das Angebot, bzw. Überangebot an Tetrahydrobiopterin besser in NO-Produktion umsetzen als die nativen Zellen. Dies könnte dann auftreten, wenn die Enzymmenge bei den behandelten Zellen verändert wäre. Tatsächlich war mehrfach gezeigt worden, dass es unter dem Einfluss von

verschiedenen proatherogenen Stimuli wie oxLDL, LDL, ApoE-Defizienz [55, 80, 83] und Diabetes mellitus [15, 29, 154] zu einer vermehrten Expression von eNOS in Endothelzellen kommt, wobei es auch hier widersprechende Ergebnisse gibt [10]. Dennoch könnte sich hieraus bei den Zellen mit oxLDL und HG-Behandlung ein günstigeres Verhältnis von Tetrahydrobiopterin zu der zur Verfügung stehenden Menge an eNOS Protein ergeben, das die im Vergleich zu den nativen Zellen gesteigerte NO-Produktion nach Sepiapterinzufuhr erklären könnte.

Interessanterweise hatten auch Mitchell et al. schon festgestellt, dass Sepiapterin die Vasorelaxation von Aortenringen hypertensiver Ratten verstärkt hemmt und eine vermehrte Superoxidentstehung verursachen kann, wenn vorher die eNOS-Aktivität durch den synthetischen Inhibitor L-NAME vermindert worden war [91]. Das Verhältnis von funktionsfähigem Enzym zu Tetrahydrobiopterinangebot scheint also eine weitere Einflussgröße für das Ausmaß an NO-Produktion und die Auswirkungen einer exogenen Pteridinzufuhr zu sein.

Weiterhin war in der aktuellen Arbeit auffällig, dass bei den Zellen der oxLDL- und HG-Gruppe der vorherig reduzierte intrazelluläre Tetrahydrobiopterinspiegel angehoben und unter geringen Konzentrationen auch die verminderte NO-Produktion angeglichen, bzw. sogar über das Maß der nativen Zellen hinaus gesteigert werden konnte. Trotzdem war der Anstieg des Tetrahydrobiopterinspiegels nach Sepiapterininkubation in der oxLDL- und HG-Glucosegruppe signifikant niedriger. Dieser konnte zwar, wie oben beschrieben, sogar besser in NO-Produktion umgesetzt werden als bei den nativen Zellen, der Unterschied zeigt aber doch, dass ein Anheben unter proatherogenen Bedingungen schwieriger ist, bzw. höherer Dosen bedarf. Eine Begründung hierfür könnte in einer beschleunigten oxidativen Inaktivierung des im salvage pathway gebildeten Tetrahydrobiopterins liegen, einer Inhibition der beteiligten Enzyme, Sepiapterinreduktase und Tetrahydrofolatreduktase oder in einer Erschöpfung der entsprechenden Kofaktoren NADPH und Tetrahydrofolsäure.

Am Ende unserer Versuche kann man zusammenfassen, dass die bisherige Auffassung ein Mehr an Tetrahydrobiopterin würde sich stets auch in ein Mehr an NO-Synthese übersetzen, wohl eine zu mechanistische Vorstellung ist.

Es besteht wahrscheinlich vielmehr eine sehr viel komplexere Regulation des intrazellulären Tetrahydrobiopterinmetabolismus als bisher angenommen, bei der es

auf die Aufrechterhaltung einer optimalen intrazellulären Tetrahydrobiopterin-konzentration mit einem optimalen Verhältnis von reduzierten zu oxidierten Formen, einem optimalen Verhältnis von Enzymmenge zu Kofaktor und dem ausreichenden Vorhandensein des Kofaktors im richtigen Zellkompartiment ankommt (Tabelle 12).

### **Mögliche Einflussgrößen des BH4-Metabolismus auf die NO-Produktion**

Absolute intrazelluläre BH4-Konzentration in schmalen optimalen Bereich

Richtiges Verhältnis vollreduzierter zu teiloxidiertes/oxidiertes Pteridine

Geringe absolute Konzentration teiloxidiertes/oxidiertes Pteridine

Ausreichende Aktivität beteiligter Enzyme (eNOS, SR, THFR)

Ausreichend verfügbare Menge an Kofaktoren (THF, NADPH)

BH4-Verteilung im richtigen Zellkompartiment

---

#### **(Tabelle 12) Mögliche Einflussgrößen des BH4-Metabolismus auf die NO-Produktion**

(BH4: Tetrahydrobiopterin, eNOS: endotheliale NO-Synthetase, SR: Sepiapterinreduktase, THFR: Tetrahydrofolatreduktase, THF: Tetrahydrofolsäure, NADPH: reduziertes Nicotinamiddinukleotidphosphat)

### **4.2.3 Konsequenzen für die Interpretation vorheriger Studien und Planung zukünftiger Untersuchungen**

Wie kann es aber sein, dass doch so eine große Zahl an in-vivo Untersuchungen mit Zufuhr exogener Pteridine in zumeist hohen Dosierungen positive Effekte auf klinische Parameter wie Vasorelaxation feststellten? In Kenntnis unserer Ergebnisse und der zitierten Studien, die negative Effekte beschrieben haben, muss ernsthaft die Frage gestellt werden, ob es sich in diesen in-vivo-Untersuchungen nicht in einer großen Zahl der Fälle um ganz unspezifische vaskuläre Effekte gehandelt hat, die überhaupt nichts mit einer Anhebung des intrazellulären Tetrahydrobiopterinspiegels zu tun hatten.

Bei den Studien, die Tetrahydrobiopterin verwendet haben [48, 49, 87, 140], könnte ein einfacher antioxidativer Effekt ursächlich gewesen sein. So ist z.B. bekannt, dass Tetrahydrobiopterin eine Reaktionsgeschwindigkeit mit Superoxidanionen von  $10^5$  mol/L\*sec besitzt, was in etwa der von Vitamin C entspricht [152], welches ja eine verminderte Vasorelaxation unter proatherogenen Bedingungen ebenfalls verbessern kann [3, 112, 114].

Aber auch bei Verwendung von Sepiapterin sind unspezifische, z.B. vasodilatatorische Effekte denkbar. Die Einwirkzeit betrug zudem oft nur wenige Minuten, so dass kaum von einer Wirkung auf den intrazellulären Tetrahydrobiopterinspiegel ausgegangen werden kann [146, 147].

Die von uns belegte Konzentrationsabhängigkeit kann sicherlich auch einen Teil der widersprüchlichen Ergebnisse vorheriger Versuche mit Tetrahydrobiopterin- und Sepiapterinsupplementation erklären. So ist gerade in den Arbeiten, in denen negative Effekte beobachtet wurden, häufig eine hohe Konzentration verwendet worden, wie in der in der Einleitung erwähnten Arbeit von Tsutsui et al. [151]. Hier war an isolierten caninen Zerebralarterien nach Sepiapterininkubation (100  $\mu$ M) der intrazelluläre Tetrahydrobiopterinspiegel 300-fach angestiegen, die agoniststimulierte Vasorelaxation und der intrazelluläre cGMP-Spiegel als sekundäres Maß für die NO-Produktion waren darunter aber deutlich abgefallen. Der Widerspruch zu anderen Arbeiten wurde hier aber nicht länger diskutiert.

Das gleiche trifft für eine weitere Arbeit von Vasques-Vivar et al. zu [152]. Auch hier wurden Aorten von hypercholesterinämischen Hasen mit Sepiapterin 100  $\mu$ M inkubiert und es fand sich trotz Anstieg des intrazellulären Tetrahydrobiopterinspiegels eine verminderte agoniststimulierte Vasorelaxation und eine verminderte NO-Produktion. In der Diskussion der Ergebnisse war dann bereits die These einer optimalen intrazellulären Tetrahydrobiopterinkonzentration aufgestellt worden, wie sie auch mit unseren Ergebnissen gut in Einklang zu bringen ist.

Neben der Höhe der Sepiapterinsupplementation schien noch die Dauer der Einwirkung eine wesentliche Rolle zu spielen. Wir hatten einen Inkubationszeitraum von 24 Stunden gewählt, in dem es zu einer Zunahme des intrazellulären Tetrahydrobiopterinspiegels um das 1000-fache kam. In der zuletzt zitierten Arbeit von Vasques-Vivar et al. hatte, allerdings in einer Gewebekultur nicht in einer Zellkultur, eine Inkubation von sechs Stunden eine Steigerung um das 21-fache

bewirkt. In den allermeisten Studien liegt die Einwirkzeit bei 60 Minuten oder deutlich darunter [26, 48, 80, 87, 140], so dass möglicherweise nur eine sehr geringe oder gar keine Steigerung des intrazellulären Spiegels erreicht wurde. Wie schon zuvor kritisch bemerkt, war der vermeintliche Anstieg in diesen Studien nie kontrolliert worden (Tabelle 13).

---

**Einflussgrößen, die in vorrangegangenen Studien mit Sepiapterin/BH4-Supplementation zu widersprüchlichen Ergebnissen geführt haben können**

---

Unterschiedliche verwendete Konzentrationen

Verschieden lange (zu kurze) Einwirkzeiten

Unspezifische (antioxidative) Effekte

---

**(Tabelle 13) Einflussgrößen, die in vorrangegangenen Studien mit Sepiapterin/BH4-Supplementation zu widersprüchlichen Ergebnissen geführt haben können.**

Dennoch war Tetrahydrobiopterin als therapeutischer Angriffspunkt bei Patienten mit endothelialer Dysfunktion, Atherosklerose oder entsprechenden Risikofaktoren bis zuletzt immer wieder propagiert worden [126]. Unsere Beobachtungen zeigen jedoch, dass der Tetrahydrobiopterinmetabolismus unter proatherogenen Bedingungen und seine Zusammenhänge mit der endothelialen Funktion noch lange nicht gut genug verstanden sind, als dass die Auswirkungen einer längerdauernden systemischen Anwendung abgeschätzt werden könnten. Wie wir gesehen haben, ist der Konzentrationsbereich von Eintreten einer NO-Zunahme bis zu einer deutlichen Abnahme sehr gering. Sepiapterin als Pharmakon besäße also möglicherweise eine sehr geringe therapeutische Breite. Noch dazu unterschied sich die Auswirkung einer bestimmten Konzentration auf die NO-Produktion deutlich, je nachdem welche Behandlungsgruppe man betrachtete. Es dürfte sich also klinisch als schwierig erweisen, einen individuellen Bedarf oder eine individuell noch verträgliche Dosis zu ermitteln.

Dennoch hatte die Arbeitsgruppe von Consentino et al. zeitgleich mit unseren Experimenten eine Studie veröffentlicht, in der Tetrahydrobiopterin in einer Dosis von 400 mg zweimal täglich Patienten mit Hypercholesterinämie über einen Zeitraum von vier Wochen verabreicht worden war [24]. Sie konnten darunter eine Reversibilität der zuvor deutlich eingeschränkten Vasodilatation nach Acetylcholin als Parameter der endothelialen Dysfunktion feststellen. Auch hier könnte es sich natürlich um einen unspezifischen, z.B. antioxidativen Effekt gehandelt haben. In einem Parallelversuch wurde der Anstieg des intrazellulären Tetrahydrobiopterin nach Tetrahydrobiopterininkubation in einer Zellkultur nachgewiesen, nicht aber bei den Patienten. Bei ihnen wurden Plasmaspiegel bestimmt, die allenfalls sehr bedingt eine Aussage über die intrazelluläre Konzentration zulassen. Aus anderen Arbeiten ist zwar belegt, dass der intrazelluläre Spiegel auf die Weise, wie Consentino et al. es durchgeführt hatten, sehr wohl angehoben werden kann [45, 122], ein kausaler Zusammenhang mit der verbesserten Vasodilatation ist damit jedoch immer noch nicht erwiesen.

Es muss jedoch festgehalten werden, dass von keinerlei negativen Auswirkungen der Tetrahydrobiopterinbehandlung bei den Patienten berichtet wurde, auch wenn solche in Tierexperimenten im Sinne einer verschlechterten Gefäßfunktion beschrieben sind [151, 152]. Eine sichere klinische Anwendung kann also auch nicht ausgeschlossen werden.

Zu fordern wäre am besten eine erneute, ausgedehntere in-vivo-Arbeit, die untersuchen sollte, ob sich die Beobachtungen, die wir in der aktuellen Arbeit an Zellkulturversuchen gemacht haben, sich bei systemischer Anwendung im Organismus reproduzieren lassen. So sollte Sepiapterin und Tetrahydrobiopterin im unmittelbaren Vergleich zueinander in einem Tierexperiment unter verschiedenen proatherogenen Bedingungen angewendet werden. Dabei sollte die Anwendung über einen längeren Zeitraum und in verschiedenen hohen Dosierungen stattfinden. Ein unspezifisches Antioxidans könnte als Kontrolle verwendet werden. Bei einer Gruppe von Tieren ohne und einer mit Pteridinzufuhr sollte der intraendotheliale Tetrahydrobiopterinspiegel gemessen werden, um einen tatsächlichen Anstieg zu dokumentieren. Funktionelle Parameter wie agoniststimulierte Vasodilatation und chemische Parameter wie Marker des oxidativen Stresses könnten zusätzlich dokumentiert werden.

Darüberhinaus wäre interessant zu untersuchen, ob Sepiapterin an einem isolierten Gefäß mit vorher entferntem Endothel eine Vasodilatation bewirken kann. So könnte festgestellt werden, ob es wirklich über eine Anhebung des intraendothelialen Tetrahydrobiopterinspiegels und konsekutiver Steigerung der NO-Produktion wirkt, oder einen unspezifischen Effekt auf die glatte Muskulatur besitzt, der einen Teil der Ergebnisse vorheriger tierexperimenteller Arbeiten erklären könnte (Tabelle 14).

### **Anforderungen und Ideen für eine zukünftige Studie über Sepiapterin/BH4-Supplementation**

In-vivo-Arbeit

Tetrahydrobiopterin und Sepiapterin im Vergleich

Unspezifisches Antioxidans und Placebo als Kontrollen

Messung von tatsächlicher Veränderung des intrazellulären BH4-Spiegels

Agoniststimulierte Vasodilatation als funktioneller Parameter

Erfassung von oxidativem Stress

Evtl. Untersuchung von Sepiapterinwirkung auf Gefäß ohne Endothel

---

**(Tabelle 14) Anforderungen und Ideen für eine zukünftige Studie über Sepiapterin/BH4-Supplementation**

Um Effekte einer Pteridinsupplementation oder des Einwirkens atherosklerotischer Risikofaktoren auf den Tetrahydrobiopterinspiegel von direkten Effekten auf die Aktivität oder Menge der beteiligten Enzyme, insbesondere eNOS und GTP-Cyclohydrolase, abgrenzen zu können, sollten zukünftig auch diese Enzyme, z.B. auf mRNA-Ebene, gemessen werden. Hierauf wird unter 4.3. noch weiter eingegangen werden.

Erst wenn das Verständnis des Tetrahydrobiopterinstoffwechsels und der Effekte einer Supplementation in der oben beschriebenen Weise ergänzt worden sind, sollten weitere Erfahrungen beim Menschen gesammelt werden.

#### 4.2.4 Mögliche Rolle von Phosphokinase C und Superoxidanionen

Die Wiederholung der Versuche nach zusätzlicher Inkubation mit dem PKC-Stimulans PMA waren zunächst mehr aus methodischen als aus pathophysiologischen Gründen durchgeführt worden, mit dem Ziel Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen besser detektieren zu können. Vorarbeiten hatten im DAF-2-Assay gezeigt, dass durch PMA die NO-Produktion gesteigert werden konnte [81]. Im Direktvergleich hatten wir dies bestätigen können, der Mittelwert der NO-Produktion nach Inkubation mit PMA lag 30% über dem der nativen Zellen ohne PMA.

Der ursächliche Mechanismus hingegen ist schlecht untersucht. Früher war angenommen worden, dass eine Aktivierung der PKC durch eine Phosphorylierung einzelner Aminosäurereste der endothelialen NO-Synthetase einen inhibierenden Effekt auf die NO-Produktion ausüben würde [54]. Es war sogar diskutiert worden, ob atherogene Risikofaktoren nicht über einen solchen Mechanismus wirken könnten. Es hatten sich dahingehende Ergebnisse z.B. an Gewebsschnitten von Mäusenieren unter dem Einfluss erhöhter Glucosekonzentrationen ergeben [19].

In den letzten Jahren hatten nun jedoch mehrere Untersuchungen zeigen können, dass insbesondere PMA zu einer PKC-vermittelten Expressionsteigerung von eNOS führt [7, 116], die auch mit einer vermehrten NO-Produktion einherging. Wir nehmen deshalb ebenfalls diesen Mechanismus als Erklärung für die vermehrte NO-Produktion unter PMA bei unserem Direktvergleich mit Zellen ohne PMA an.

Die weiteren Effekte unter Einfluss der proatherogenen Substanzen und unter der Tetrahydrobiopterin- oder Sepiapterinsupplementation zeigten sich nach PMA-Inkubation im Wesentlichen in gleicher Weise wie zuvor ohne PMA, allerdings mit einzelnen Besonderheiten.

Bei den mit oxLDL behandelten Zellen fand sich nun im Vergleich zu den nativen Zellen ein doppelt so großer Unterschied wie ohne vorherige PMA-Inkubation. Gehen wir davon aus, dass mehr NO-Synthetase vorhanden war, so schien die Anwesenheit von oxLDL unter diesen Bedingungen einen noch stärkeren Einfluss zu haben als zuvor. Dies erscheint schlüssig, wenn wir wieder von der oben hergeleiteten Hypothese ausgehen, dass es durch oxLDL zu einem eNOS-uncoupling kommt, mit

der Folge vermehrter  $O_2^-$ -Produktion und oxidativer Inaktivierung von Tetrahydrobiopterin, die dann im Sinne eines Circulus vitiosus wieder zu vermehrtem uncoupling führt. In dieser Situation würde eine vermehrte Expression von eNOS tatsächlich zu einem Anheizen dieses Prozesses und zu einer weiteren Verminderung der NO-Produktion führen, wie wir sie in unseren Versuchen beobachtet haben.

Ein Beleg für die besondere Rolle von Superoxidanionen unter dem Einfluss von oxLDL ergibt sich auch wieder daraus, dass keine Gruppe so sehr von der Zugabe von Tiron profitierte wie die oxLDL-behandelten Zellen nach PKC-Stimulation.

In Gegenteil dazu hatten wir für die mit hoher Glucosekonzentration behandelten Zellen festgestellt, dass primär ein Tetrahydrobiopterinmangel durch gehemmte Synthese wahrscheinlicher ist, weniger ein primärer  $O_2^-$ -Exzess (s.o.). Entsprechend beobachteten wir nach vermehrter eNOS-Expression nach PKC-Stimulation hier keine wesentliche Änderung des Unterschiedes an NO-Produktion im Vergleich zu den nativen Zellen. Ebenfalls entsprechend konnte deshalb nach Tirongabe auch keine NO-Zunahme gemessen werden. Die mit hoher Glucosekonzentration behandelten Zellen profitierten außerdem stärker von der Pteridinzufuhr als die der oxLDL-Gruppe, möglicherweise ebenfalls weil hier der Kofaktormangel entscheidender war als das oxidative uncoupling.

Ein weiterer Unterschied nach PMA-Behandlung bestand darin, dass nach Inkubation mit Sepiapterin oder Tetrahydrobiopterin in niedriger Konzentration diesmal auch die NO-Produktion der nativen Zellen anstieg. Dies passt gut zu der weiter oben wiedergegebenen Überlegung, dass das Verhältnis von Enzymmenge zu Kofaktor einen erheblichen Einfluss auf die NO-Produktion ausübt, so dass nun nach PKC-vermittelter vermehrter eNOS-Expression ein gesteigertes Tetrahydrobiopterinangebot besser in NO-Produktion umgesetzt werden konnte.

Zuvor war schon aufgefallen, dass unter Einfluss von oxLDL und hoher Glucosekonzentration geringe Tetrahydrobiopterinkonzentrationen besser in NO-Produktion umgesetzt werden konnten und hemmende Effekte durch höhere Tetrahydrobiopterinkonzentrationen später auftraten als bei den nativen Zellen. Wir hatten dies auch auf eine vermehrte eNOS-Expression unter diesen Bedingungen zurückgeführt (s.o.). Nach zusätzlicher weiterer Stimulation der eNOS-Expression durch PMA lagen die NO-Messwerte der oxLDL- und high-glucose-Gruppe nach

Zufuhr geringer Pteridinmengen nun wieder deutlich höher, als die der nativen Zellen, was die These einer gesteigerten eNOS-Expression unter proatherogenen Bedingungen weiter zu unterstützen scheint.

Ebenso blieben nach PMA-Stimulation die NO-Werte in der oxLDL- und high-glucose-Gruppe diesmal auch nach Zugabe der hohen Tetrahydrobiopterin- und Sepiapterinkonzentrationen deutlich über dem Ausgangsniveau. Das Auftreten der toxischen Effekte wird also durch eine Steigerung der eNOS-Expression abgemildert. Das Optimum an NO-Steigerung durch Pteridinzufuhr lag aber in allen Behandlungsgruppen weiterhin bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  sowohl für Tetrahydrobiopterin als auch für Sepiapterin.

Zu guter Letzt fiel noch eine weitere Besonderheit nach PMA-Behandlung auf. Im Vergleich zu vorher war die NO-Produktion bei den mit DAHP-behandelten Zellen wieder durch Tetrahydrobiopterinzufuhr anzuheben, allerdings jetzt in keiner Weise mehr durch Sepiapterin. Dieses Phänomen war ohne Ausnahme reproduzierbar und betraf nur die mit DAHP behandelten Zellen, so dass ein methodischer Fehler ausgesprochen unwahrscheinlich erscheint. Dabei unterscheidet sich die Einschleusung von Tetrahydrobiopterin über Dihydrobiopterin in den salvage pathway von der von Sepiapterin nur in einem einzigen Schritt, nämlich in der vorherigen Umwandlung von Sepiapterin in Dihydrobiopterin durch die Sepiapterinreduktase. Sucht man also nach einer pathophysiologischen Besonderheit, die dieses Phänomen erklären kann, so kommt eigentlich nur eine unter Einfluss von PMA und DAHP entstehende Hemmung oder Blockierung der Sepiapterinreduktase in Frage. Diese Fragestellung ist jedoch bislang in keinsten Weise untersucht, so dass jegliche Erklärungsversuche bis zum Vorliegen weiterer Erkenntnisse als rein spekulativ gelten müssen.

Ein Teil der Ergebnisse der NO-Messungen nach zusätzlicher Behandlung der Zellen mit dem Superoxidanionenfänger Tiron hatten wir bereits zuvor bei den jeweiligen anderen Behandlungsformen, nativ versus oxLDL und HG bzw. Pteridinzufuhr versus keine Pteridinzufuhr diskutiert. Eine Gesamtbewertung fehlt jedoch noch. Überall dort, wo nach Tironinkubation eine Zunahme der NO-Produktion gemessen werden konnte, finden wir unseren vorherigen Verdacht bestätigt, dass hier oxidative Mechanismen eine wesentliche Rolle spielen. Dies betrifft zum einen alle Zellen, die mit oxidierten Low Density Lipoproteinen behandelt worden waren, unabhängig ob

oder in welcher Konzentration Tetrahydrobiopterin oder Sepiapterin zugeführt worden waren. Dabei neutralisiert Tiron ja ausschließlich Superoxidanionen, nicht oxLDL selber oder andere radikale Sauerstoffspezies, so dass es sich wirklich um einen  $O_2^-$ -Exzesses handeln muss. Daten nach denen die Produktion von Superoxidradikalen durch den eNOS-Inhibitor L-NAME vermindert werden konnten, belegen außerdem, dass diese tatsächlich von eNOS selber stammen [155].

Obwohl der intrazelluläre Tetrahydrobiopterinspiegel unter Einwirkung der hohen Glucosekonzentration in gleicher Weise vermindert war wie unter oxLDL, finden wir hier keine Zunahme der NO-Produktion nach Tirongabe. Dies zeigt, dass eine Verminderung des Tetrahydrobiopterins alleine ein eNOS-uncoupling mit  $O_2^-$ -Exzess, wie wir es unter oxLDL beobachtet haben, nicht erklärt. Hier muss davon ausgegangen werden, dass durch oxLDL selber oder auf einem tetrahydrobiopterinunabhängigen Weg zusätzlich ein solches uncoupling entsteht.

Als zweites fand sich eine Zunahme der NO-Produktion nach Tiron in allen Gruppen nach Zufuhr der hohen Konzentrationen von Tetrahydrobiopterin oder Sepiapterin, mit Ausnahme der HG-behandelten Zellen, wenn eine Darstellung als NO-Konzentration bezogen auf Protein gewählt wurde. Nicht alle dieser Zunahmen erreichten jedoch ein signifikantes Niveau. Am eindrücklichsten war der Effekt bei den oxLDL-behandelten Zellen, sowie bei den nativen Zellen unter Sepiapterin 100  $\mu$ M. Ob dies jedoch als Hinweis auf einen prooxidativen Effekt der hohen Pteridinkonzentrationen gewertet werden kann, oder ob hier eine Verdrängung des Tetrahydrobiopterins aus seiner eNOS-Bindungsstelle erfolgt, wie oben vermutet, und dann nur ein Teil der durch das konsekutive eNOS-uncoupling entstehenden  $O_2^-$ -Radikale durch Tiron abgefangen wird, kann nicht mit Sicherheit unterschieden werden. Eine geringe Zunahme der NO-Produktion durch Elimination der Superoxidanionen ist in beiden Fällen denkbar.

Schwieriger als die Interpretation der Zunahme der NO-Produktion unter den geschilderten Bedingungen ist die der Beobachtung, dass unter manchen Bedingungen auch eine Abnahme nach Tirongabe zu beobachten war. Diese waren allerdings bis auf die Ausnahme der nativen Zellen nach Inkubation mit Sepiapterin 10  $\mu$ M nicht signifikant und unterschieden sich noch dazu deutlich, je nachdem ob die Darstellung als Fluoreszenzintensität, NO-Konzentration oder NO-Konzentration

bezogen auf Protein gewählt wurde (siehe Tabellenanhang). Eine Überbewertung sollte deshalb nicht stattfinden.

Stellt man dennoch die Frage, ob und wie durch Tironinkubation unter bestimmten Bedingungen eine Verminderung der NO-Produktion zustande kommen könnte, so fällt auf, dass eine Verminderung überall dort auftrat, wo zuvor die NO-Produktion normal gewesen oder durch Zufuhr von Pteridinen in geringen Konzentrationen verstärkt worden war. Wo sie zuvor vermindert war und wo wir einen Exzess von Superoxidanionen vermuten, stieg sie an. Unter Bedingungen einer fehlenden oder geringen  $O_2^-$ -Produktion scheint Tiron also keinen Effekt zu haben oder eher zu schaden. Für Tiron selber ist dabei kein direkter eNOS inhibierender Effekt beschrieben.

Vor diesem Hintergrund erscheint die Überlegung interessant, ob nicht ein geringes Maß an  $O_2^-$ -Produktion physiologisch ist oder sogar bestimmte Funktionen erfüllt, z.B. im Sinne eines biologischen signaling. Tatsächlich konnte eine Reihe von Arbeiten kürzlich in diese Richtung gehende Ergebnisse liefern. So konnte unter vermehrtem oxidativen Stress in Mausendothelzellen eine vermehrte Expression von eNOS gezeigt werden [28]. Wasserstoffperoxid war in einer Arbeit sogar in der Lage den intrazellulären Tetrahydrobiopterinspiegel über eine vermehrte Expression von GTP-Cyclohydrolase anzuheben [134]. Dies konnte von einer anderen Arbeitsgruppe bestätigt und gleichzeitig auch eine vermehrte Expression des GTP-Cyclohydrolase feedback regulatory protein unter diesen Bedingungen gezeigt werden [65]. Sollte Ähnliches auch für Superoxidanionen zutreffen, erscheint es durchaus möglich, dass Tiron im Falle eines  $O_2^-$ -Exzesses eine steigernde, im Falle einer nur geringen  $O_2^-$ -Produktion aber eine vermindernde Wirkung auf die NO-Produktion haben könnte.

Die Abnahmen an NO-Produktion nach Tirongabe unter manchen Bedingungen in der aktuellen Arbeit sind jedoch sicherlich zu gering, um hier einen solchen Mechanismus als ursächlich postulieren zu können.

Zusammenfassend kann man feststellen, dass eine Steigerung der eNOS-Transkription durch Behandlung mit PMA zu einer Zunahme der pathologischen Effekte, vor allem der oxLDL-Behandlung führte. Hingegen kam es unter PMA bei allen, außer der DAHP-behandelten zu einem vermehrten Benefit durch die Pteridinsupplementation gemessen an NO-Produktion, welches beides den Stellenwert der Enzymausstattung der Zellen unter Einfluss atherogener

Risikofaktoren unterstreicht. Tiron hatte positive Effekte überall dort, wo wir  $O_2^-$ -Radikale im Rahmen des pathophysiologischen Geschehens als ursächlich vermutet hatten, ansonsten hatte es keine oder eher negative Auswirkungen. Wir werten dies als Beleg für eine ursächliche Rolle von oxidativem Stress bei der Entstehung der endothelialen Dysfunktion vor allem unter Einfluss oxidierter Low Density Lipoproteine.

### **4.3. Limitationen der aktuellen Arbeit**

Neben der bereits in der Bewertung der Methodik besprochenen Schwierigkeit biologische Phänomene in den extrem niedrigen Messbereichen zu erfassen, ist die aktuelle Arbeit im Wesentlichen von zwei Seiten her in ihrer Aussagekraft limitiert.

Die eine betrifft das Fehlen von Messungen von Enzymaktivitäten und –mengen. Hier ist vor allem der Einfluss der proatherogenen Kulturbedingungen auf die Menge und Aktivität an endothelialer NO-Synthetase und GTP-Cyclohydrolase zu nennen, ferner an Sepiapterinreduktase. Zur Erklärung mancher der beobachteten Phänomene werden deshalb in der Diskussion bekannte Daten aus anderen Arbeiten zitiert. Um diese Variablen jedoch noch besser einschätzen und Lücken in der Argumentation schließen zu können, ist als Folgeprojekt eine Messung der Expression der genannten Enzyme zunächst auf mRNA-Ebene geplant.

Als zweites wird in der aktuellen Arbeit vor allem zur Erklärung der Wirkung der oxidierten Low Density Lipoproteine auf den Begriff des oxidativen Stresses oder reaktiver Sauerstoffspezies Bezug genommen, ohne dass diese selbst direkt gemessen worden wären. Als indirekte Hinweise auf die Rolle von Superoxidradikalen dienten uns lediglich die Beobachtungen nach Inkubation mit dem Superoxidanionenfänger Tiron. Um unsere Thesen jedoch besser untermauern und die Rolle des oxidativen Stresses in diesem Zusammenhang besser verstehen zu können, planen wir auch hier weiterführende Untersuchungen, bei denen eine Quantifizierung mittels DCF-Assay erfolgen soll. Bei diesem bedient man sich der fluorometrischen Erfassung des Oxidationsproduktes von Dihydrodichlorofluorescein.

## Zusammenfassung der Arbeit

---

Die endotheliale Produktion von Stickstoffmonoxid (NO) spielt eine Schlüsselrolle in der Aufrechterhaltung der physiologischen Gefäßfunktion. Sie wirkt insbesondere einer Reihe von proatherogenen Mechanismen entgegen. Unter Einfluss von atherogenen Risikofaktoren kommt es zu einer verminderten NO-Freisetzung und zu einer gestörten Funktion des Blutgefäßes, die man deshalb als endotheliale Dysfunktion bezeichnet. Das für die NO-Produktion verantwortliche Enzym ist die endotheliale NO-Synthetase. Ihr wichtigster Kofaktor ist Tetrahydrobiopterin. In einer Reihe von Untersuchungen hatten sich Hinweise darauf ergeben, dass es durch atherogene Risikofaktoren zu einer Verminderung des intraendothelialen Tetrahydrobiopterinspiegels und dadurch zur einer endothelialen Dysfunktion kommen kann. Durch Supplementation von Tetrahydrobiopterin oder seiner Vorläufersubstanzen, konnten widersprüchliche Ergebnisse im Bezug eine Wiederherstellung der normalen Gefäßfunktion gewonnen werden. Wir untersuchten deshalb in der aktuellen Arbeit den Einfluss zweier wichtiger kardiovaskulärer Risikofaktoren, oxidiertes Low Density Lipoproteine und supranormaler Glucosekonzentrationen auf den intrazellulären Tetrahydrobiopterinspiegel und die endotheliale NO-Produktion.

Wir konnten dabei erstmals an einer humanen endothelialen Zelllinie zeigen, dass es unter dem Einfluss dieser Risikofaktoren tatsächlich zu einer signifikanten Abnahme des zellulären Tetrahydrobiopterinspiegels kommt. Aus der Analyse des Verhältnisses der oxidierten Pteridinformen Dihydrobiopterin und Biopterin zu Tetrahydrobiopterin ergaben sich zudem Hinweise auf unterschiedliche Mechanismen der Tetrahydrobiopterinverringerng. So schien unter

supraphysiologischen Glucosekonzentrationen eine Verringerung der de novo-Synthese im Vordergrund zu stehen, unter Einfluss von oxLDL eher eine oxidative Inaktivierung durch vermehrten Anfall von Superoxidanionen, welches am wahrscheinlichsten durch ein uncoupling der dimeren NO-Synthetase zu erklären ist.

Dieser unterschiedliche Mechanismus unter den zwei Behandlungsbedingungen wurde auch durch die Ergebnisse der NO-Produktion nach Inkubation mit dem Superoxidanionenfänger Tiron deutlich, in denen sich eine Reversibilität bei den mit oxLDL, nicht aber bei den mit hoher Glucosekonzentration behandelten Zellen zeigte.

Es gelang außerdem der Nachweis einer eindeutigen Korrelation der unter den proatherogenen Substanzen verminderten intrazellulären Tetrahydrobiopterinspiegel mit einer verminderten Produktion an NO.

Wir wiesen weiter nach, dass der intrazelluläre Tetrahydrobiopterinspiegel durch Supplementation mit der Vorläufersubstanz Sepiapterin um ein Vielfaches gesteigert werden kann. Dabei wirken sich jedoch überraschenderweise nur sehr niedrige Konzentrationen von sowohl Sepiapterin als auch Tetrahydrobiopterin positiv auf die endotheliale NO-Produktion aus, höhere hemmen diese. Es besteht eine eindeutige Dosis-Wirkungsbeziehung. Die Auswirkung von bestimmten Konzentrationen ist jedoch bei den unterschiedlichen Behandlungsbedingungen nicht identisch. Die Möglichkeit einer unterschiedlich starken Expression der endothelialen NO-Synthetase als Ursache wurde diskutiert.

Wir können deshalb beantworten, dass die widersprüchlichen Ergebnisse der vorherigen Arbeiten zum einen zu einem Großteil durch die unterschiedlichen verwendeten Konzentrationen zustande gekommen sind, zum anderen wahrscheinlich zusätzlich durch eine Reihe an unspezifischen vaskulären Effekten der Pteridine, die nicht Ausdruck einer entsprechenden Anhebung der intrazellulären Tetrahydrobiopterinspiegels waren.

In unserer Arbeit konnte insgesamt aufgezeigt werden, dass der intrazelluläre Tetrahydrobiopterinmetabolismus und sein Zusammenhang mit der endothelialen Funktion, insbesondere unter atherogenen Bedingungen viel komplexer geregelt ist,

als dass er sich durch ein einfaches lineares Verhältnis von Pteridinzufuhr und NO-Produktion beschreiben ließe.

Als Konsequenz ergibt sich die dringliche Forderung nach mehr grundlagenwissenschaftlichen Untersuchungen, bevor ein Einsatz von Tetrahydrobiopterin oder Sepiapterin als Therapie der endothelialen Dysfunktion bei Menschen bedenkenlos empfohlen werden kann.

## Literaturverzeichnis

---

1. Abu-Soud, H. M., R. Gachhui, F. M. Raushel, et al., *The ferrous-dioxy complex of neuronal nitric oxide synthase. Divergent effects of L-arginine and tetrahydrobiopterin on its stability.* J Biol Chem, 1997. **272**(28): p. 17349-53.
2. Anderson, T. J., M. D. Gerhard, I. T. Meredith, et al., *Systemic nature of endothelial dysfunction in atherosclerosis.* Am J Cardiol, 1995. **75**(6): p. 71B-74B.
3. Antoniades, C., D. Tousoulis, C. Tountas, et al., *Vascular endothelium and inflammatory process, in patients with combined Type 2 diabetes mellitus and coronary atherosclerosis: the effects of vitamin C.* Diabet Med, 2004. **21**(6): p. 552-8.
4. Archer, S., *Measurement of nitric oxide in biological models.* Faseb J, 1993. **7**(2): p. 349-60.
5. Bagi, Z. and A. Koller, *Lack of nitric oxide mediation of flow-dependent arteriolar dilation in type I diabetes is restored by sepiapterin.* J Vasc Res, 2003. **40**(1): p. 47-57.
6. Bagi, Z., E. Toth, A. Koller, et al., *Microvascular dysfunction after transient high glucose is caused by superoxide-dependent reduction in the bioavailability of NO and BH(4).* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004. **287**(2): p. H626-33.
7. Blanco-Rivero, J., A. Sagredo, G. Balfagon, et al., *Protein kinase C activation increases endothelial nitric oxide release in mesenteric arteries from orchidectomized rats.* J Endocrinol, 2007. **192**(1): p. 189-97.

8. Blau, N. and B. Thony, *Possible impact of tetrahydrobiopterin and sepiapterin on endothelial dysfunction*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003. **23**(5): p. 913-4; author reply 914-5.
9. Boger, R. H., S. M. Bode-Boger, A. Szuba, et al., *Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a novel risk factor for endothelial dysfunction: its role in hypercholesterolemia*. *Circulation*, 1998. **98**(18): p. 1842-7.
10. Bolego, C., C. Buccellati, T. Radaelli, et al., *eNOS, COX-2, and prostacyclin production are impaired in endothelial cells from diabetics*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006. **339**(1): p. 188-90.
11. Boulden, B. M., J. D. Widder, J. C. Allen, et al., *Early determinants of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced endothelial dysfunction*. *Free Radic Biol Med*, 2006. **41**(5): p. 810-7.
12. Bubolz, A. H., H. Li, Q. Wu, et al., *Enhanced oxidative stress impairs cAMP-mediated dilation by reducing Kv channel function in small coronary arteries of diabetic rats*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005. **289**(5): p. H1873-80.
13. Bundesamt, Statistisches, *Todesursachenstatistik 2006*. 2007.
14. Cai, S., N. J. Alp, D. McDonald, et al., *GTP cyclohydrolase I gene transfer augments intracellular tetrahydrobiopterin in human endothelial cells: effects on nitric oxide synthase activity, protein levels and dimerisation*. *Cardiovasc Res*, 2002. **55**(4): p. 838-49.
15. Cai, S., J. Khoo, S. Mussa, et al., *Endothelial nitric oxide synthase dysfunction in diabetic mice: importance of tetrahydrobiopterin in eNOS dimerisation*. *Diabetologia*, 2005. **48**(9): p. 1933-40.
16. Carmena, R., P. Duriez, and J. C. Fruchart, *Atherogenic lipoprotein particles in atherosclerosis*. *Circulation*, 2004. **109**(23 Suppl 1): p. III2-7.
17. Celermajer, D. S., K. E. Sorensen, C. Bull, et al., *Endothelium-dependent dilation in the systemic arteries of asymptomatic subjects relates to coronary risk factors and their interaction*. *J Am Coll Cardiol*, 1994. **24**(6): p. 1468-74.
18. Chalupsky, K. and H. Cai, *Endothelial dihydrofolate reductase: critical for nitric oxide bioavailability and role in angiotensin II uncoupling of endothelial nitric oxide synthase*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(25): p. 9056-61.
19. Chu, S. and H. G. Bohlen, *High concentration of glucose inhibits glomerular endothelial eNOS through a PKC mechanism*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2004. **287**(3): p. F384-92.

20. Cooke, J. P., *Does ADMA cause endothelial dysfunction?* *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000. **20**(9): p. 2032-7.
21. Cooke, J. P., *Asymmetrical dimethylarginine: the Uber marker?* *Circulation*, 2004. **109**(15): p. 1813-8.
22. Corretti, M. C., T. J. Anderson, E. J. Benjamin, et al., *Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery: a report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force.* *J Am Coll Cardiol*, 2002. **39**(2): p. 257-65.
23. Cosentino, F., J. E. Barker, M. P. Brand, et al., *Reactive oxygen species mediate endothelium-dependent relaxations in tetrahydrobiopterin-deficient mice.* *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001. **21**(4): p. 496-502.
24. Cosentino, F., D. Hurlimann, C. Delli Gatti, et al., *Chronic Treatment with Tetrahydrobiopterin Reverses Endothelial Dysfunction and Oxidative Stress in Hypercholesterolemia.* *Heart*, 2007.
25. Cosentino, F. and Z. S. Katusic, *Tetrahydrobiopterin and dysfunction of endothelial nitric oxide synthase in coronary arteries.* *Circulation*, 1995. **91**(1): p. 139-44.
26. Cosentino, F., S. Patton, L. V. d'Uscio, et al., *Tetrahydrobiopterin alters superoxide and nitric oxide release in prehypertensive rats.* *J Clin Invest*, 1998. **101**(7): p. 1530-7.
27. Davignon, J. and P. Ganz, *Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis.* *Circulation*, 2004. **109**(23 Suppl 1): p. III27-32.
28. Ding, H., M. Aljofan, and C. R. Triggle, *Oxidative stress and increased eNOS and NADPH oxidase expression in mouse microvessel endothelial cells.* *J Cell Physiol*, 2007. **212**(3): p. 682-9.
29. Ding, H., M. Hashem, and C. Triggle, *Increased oxidative stress in the streptozotocin-induced diabetic apoE-deficient mouse: changes in expression of NADPH oxidase subunits and eNOS.* *Eur J Pharmacol*, 2007. **561**(1-3): p. 121-8.
30. Ding, Q. F., T. Hayashi, A. R. Packiasamy, et al., *The effect of high glucose on NO and O<sub>2</sub>- through endothelial GTPCH1 and NADPH oxidase.* *Life Sci*, 2004. **75**(26): p. 3185-94.

31. Duch, D. S., C. L. Lee, M. P. Edelstein, et al., *Biosynthesis of tetrahydrobiopterin in the presence of dihydrofolate reductase inhibitors*. Mol Pharmacol, 1983. **24**(1): p. 103-8.
32. Edgell, C. J., C. C. McDonald, and J. B. Graham, *Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1983. **80**(12): p. 3734-7.
33. Forstermann, U., E. I. Closs, J. S. Pollock, et al., *Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions*. Hypertension, 1994. **23**(6 Pt 2): p. 1121-31.
34. Forstermann, U. and T. Munzel, *Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace*. Circulation, 2006. **113**(13): p. 1708-14.
35. Fukuda, Y., H. Teragawa, K. Matsuda, et al., *Tetrahydrobiopterin restores endothelial function of coronary arteries in patients with hypercholesterolaemia*. Heart, 2002. **87**(3): p. 264-9.
36. Fukushima, T. and J. C. Nixon, *Analysis of reduced forms of biopterin in biological tissues and fluids*. Anal Biochem, 1980. **102**(1): p. 176-88.
37. Furchgott, R. F., *Endothelium-derived relaxing factor: discovery, early studies, and identification as nitric oxide*. Biosci Rep, 1999. **19**(4): p. 235-51.
38. Garcia-Cardena, G., P. Oh, J. Liu, et al., *Targeting of nitric oxide synthase to endothelial cell caveolae via palmitoylation: implications for nitric oxide signaling*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(13): p. 6448-53.
39. Gesierich, A., F. Niroomand, and C. P. Tiefenbacher, *Role of human GTP cyclohydrolase I and its regulatory protein in tetrahydrobiopterin metabolism*. Basic Res Cardiol, 2003. **98**(2): p. 69-75.
40. Gorren, A. C., N. Bec, A. Schrammel, et al., *Low-temperature optical absorption spectra suggest a redox role for tetrahydrobiopterin in both steps of nitric oxide synthase catalysis*. Biochemistry, 2000. **39**(38): p. 11763-70.
41. Gotto, A. M., Jr., *Role of C-reactive protein in coronary risk reduction: focus on primary prevention*. Am J Cardiol, 2007. **99**(5): p. 718-25.
42. Gross, S. S. and R. Levi, *Tetrahydrobiopterin synthesis. An absolute requirement for cytokine-induced nitric oxide generation by vascular smooth muscle*. J Biol Chem, 1992. **267**(36): p. 25722-9.

43. Guzik, T. J., S. Mussa, D. Gastaldi, et al., *Mechanisms of increased vascular superoxide production in human diabetes mellitus: role of NAD(P)H oxidase and endothelial nitric oxide synthase*. *Circulation*, 2002. **105**(14): p. 1656-62.
44. Halcox, J. P., W. H. Schenke, G. Zalos, et al., *Prognostic value of coronary vascular endothelial dysfunction*. *Circulation*, 2002. **106**(6): p. 653-8.
45. Hasegawa, H., K. Sawabe, N. Nakanishi, et al., *Delivery of exogenous tetrahydrobiopterin (BH4) to cells of target organs: role of salvage pathway and uptake of its precursor in effective elevation of tissue BH4*. *Mol Genet Metab*, 2005. **86 Suppl 1**: p. S2-10.
46. Hattori, Y., S. Hattori, X. Wang, et al., *Oral administration of tetrahydrobiopterin slows the progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007. **27**(4): p. 865-70.
47. Havel, R. J., H. A. Eder, and J. H. Bragdon, *The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum*. *J Clin Invest*, 1955. **34**(9): p. 1345-53.
48. Heitzer, T., C. Brockhoff, B. Mayer, et al., *Tetrahydrobiopterin improves endothelium-dependent vasodilation in chronic smokers : evidence for a dysfunctional nitric oxide synthase*. *Circ Res*, 2000. **86**(2): p. E36-41.
49. Heitzer, T., K. Krohn, S. Albers, et al., *Tetrahydrobiopterin improves endothelium-dependent vasodilation by increasing nitric oxide activity in patients with Type II diabetes mellitus*. *Diabetologia*, 2000. **43**(11): p. 1435-8.
50. Heller, R., A. Unbehauen, B. Schellenberg, et al., *L-ascorbic acid potentiates endothelial nitric oxide synthesis via a chemical stabilization of tetrahydrobiopterin*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(1): p. 40-7.
51. Henry, Y., C. Ducrocq, J. C. Drapier, et al., *Nitric oxide, a biological effector. Electron paramagnetic resonance detection of nitrosyl-iron-protein complexes in whole cells*. *Eur Biophys J*, 1991. **20**(1): p. 1-15.
52. Higman, D. J., A. M. Strachan, L. Buttery, et al., *Smoking impairs the activity of endothelial nitric oxide synthase in saphenous vein*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1996. **16**(4): p. 546-52.
53. Hink, U., H. Li, H. Mollnau, et al., *Mechanisms underlying endothelial dysfunction in diabetes mellitus*. *Circ Res*, 2001. **88**(2): p. E14-22.

54. Hirata, K., R. Kuroda, T. Sakoda, et al., *Inhibition of endothelial nitric oxide synthase activity by protein kinase C*. Hypertension, 1995. **25**(2): p. 180-5.
55. Hirata, K., N. Miki, Y. Kuroda, et al., *Low concentration of oxidized low-density lipoprotein and lysophosphatidylcholine upregulate constitutive nitric oxide synthase mRNA expression in bovine aortic endothelial cells*. Circ Res, 1995. **76**(6): p. 958-62.
56. Hong, H. J., G. Hsiao, T. H. Cheng, et al., *Supplementation with tetrahydrobiopterin suppresses the development of hypertension in spontaneously hypertensive rats*. Hypertension, 2001. **38**(5): p. 1044-8.
57. Huang, A., Y. Y. Zhang, K. Chen, et al., *Cytokine-stimulated GTP cyclohydrolase I expression in endothelial cells requires coordinated activation of nuclear factor-kappaB and Stat1/Stat3*. Circ Res, 2005. **96**(2): p. 164-71.
58. Huraux, C., T. Makita, S. Kurz, et al., *Superoxide production, risk factors, and endothelium-dependent relaxations in human internal mammary arteries*. Circulation, 1999. **99**(1): p. 53-9.
59. Ichimori, K., H. Ishida, M. Fukahori, et al., *Practical nitric oxide measurement employing a nitric oxide-selective electrode*. Review of Scientific Instruments 1994. **65** (8): p. 2714-2718
60. Ito, A., P. S. Tsao, S. Adimoolam, et al., *Novel mechanism for endothelial dysfunction: dysregulation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase*. Circulation, 1999. **99**(24): p. 3092-5.
61. Jeong, H. Y., H. Y. Jeong, and C. D. Kim, *p22phox-derived superoxide mediates enhanced proliferative capacity of diabetic vascular smooth muscle cells*. Diabetes Res Clin Pract, 2004. **64**(1): p. 1-10.
62. Ji, Y., Y. Han, J. Diao, et al., *Inhibition of endothelial nitric oxide generation by low-density lipoprotein is partially prevented by L-arginine and L-ascorbate*. Atherosclerosis, 2004. **176**(2): p. 345-53.
63. Johns, D. G., A. M. Dorrance, N. L. Tramontini, et al., *Glucocorticoids inhibit tetrahydrobiopterin-dependent endothelial function*. Exp Biol Med (Maywood), 2001. **226**(1): p. 27-31.
64. Jones, C.L., J. Vasquez-Vivar, B. Kalyanaraman, et al., *Tetrahydropterins but not dihydropterins attenuate the reduction of superoxide from eNOS: a novel role for tetrahydrobiopterin*. Pteridines, 2001. **12**: p. 52-53.

65. Kalivendi, S., K. Hatakeyama, J. Whitsett, et al., *Changes in tetrahydrobiopterin levels in endothelial cells and adult cardiomyocytes induced by LPS and hydrogen peroxide--a role for GFRP?* Free Radic Biol Med, 2005. **38**(4): p. 481-91.
66. Kaufman, S., *The Structure of the Phenylalanine-Hydroxylation Cofactor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1963. **50**: p. 1085-93.
67. Kaye, D. M., B. A. Ahlers, D. J. Autelitano, et al., *In vivo and in vitro evidence for impaired arginine transport in human heart failure*. Circulation, 2000. **102**(22): p. 2707-12.
68. Keefer, L. K., *Nitric oxide-releasing compounds: From basic research to promising drugs*. Chemtech, 1998. **28**(8): p. 30-35.
69. Keefer, L. K., R. W. Nims, K. M. Davies, et al., *"NONOates" (1-substituted diazen-1-ium-1,2-diolates) as nitric oxide donors: convenient nitric oxide dosage forms*. Methods Enzymol, 1996. **268**: p. 281-93.
70. Kikugawa, K., T. Kojima, S. Yamaki, et al., *Interpretation of the thiobarbituric acid reactivity of rat liver and brain homogenates in the presence of ferric ion and ethylenediaminetetraacetic acid*. Anal Biochem, 1992. **202**(2): p. 249-55.
71. Kinoshita, H., S. Milstien, C. Wambi, et al., *Inhibition of tetrahydrobiopterin biosynthesis impairs endothelium-dependent relaxations in canine basilar artery*. Am J Physiol, 1997. **273**(2 Pt 2): p. H718-24.
72. Kinoshita, H., M. Tsutsui, S. Milstien, et al., *Tetrahydrobiopterin, nitric oxide and regulation of cerebral arterial tone*. Prog Neurobiol, 1997. **52**(4): p. 295-302.
73. Kirsch, M., H. G. Korth, V. Stenert, et al., *The autoxidation of tetrahydrobiopterin revisited. Proof of superoxide formation from reaction of tetrahydrobiopterin with molecular oxygen*. J Biol Chem, 2003. **278**(27): p. 24481-90.
74. Klatt, P., M. Schmid, E. Leopold, et al., *The pteridine binding site of brain nitric oxide synthase. Tetrahydrobiopterin binding kinetics, specificity, and allosteric interaction with the substrate domain*. J Biol Chem, 1994. **269**(19): p. 13861-6.
75. Knowles, R. G. and S. Moncada, *Nitric oxide as a signal in blood vessels*. Trends Biochem Sci, 1992. **17**(10): p. 399-402.

76. Kojima, H., N. Nakatsubo, K. Kikuchi, et al., *Detection and imaging of nitric oxide with novel fluorescent indicators: diaminofluoresceins*. Anal Chem, 1998. **70**(13): p. 2446-53.
77. Kolinsky, M. A. and S. S. Gross, *The mechanism of potent GTP cyclohydrolase I inhibition by 2,4-diamino-6-hydroxypyrimidine: requirement of the GTP cyclohydrolase I feedback regulatory protein*. J Biol Chem, 2004. **279**(39): p. 40677-82.
78. Kosugi, K., D. W. Morel, P. E. DiCorleto, et al., *Toxicity of oxidized low-density lipoprotein to cultured fibroblasts is selective for S phase of the cell cycle*. J Cell Physiol, 1987. **130**(3): p. 311-20.
79. Kotsonis, P., L. G. Frohlich, Z. V. Shutenko, et al., *Allosteric regulation of neuronal nitric oxide synthase by tetrahydrobiopterin and suppression of auto-damaging superoxide*. Biochem J, 2000. **346 Pt 3**: p. 767-76.
80. Laursen, J. B., M. Somers, S. Kurz, et al., *Endothelial regulation of vasomotion in apoE-deficient mice: implications for interactions between peroxynitrite and tetrahydrobiopterin*. Circulation, 2001. **103**(9): p. 1282-8.
81. Leikert, J. F., T. R. Rathel, C. Muller, et al., *Reliable in vitro measurement of nitric oxide released from endothelial cells using low concentrations of the fluorescent probe 4,5-diaminofluorescein*. FEBS Lett, 2001. **506**(2): p. 131-4.
82. Leopold, J. A., A. Cap, A. W. Scribner, et al., *Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency promotes endothelial oxidant stress and decreases endothelial nitric oxide bioavailability*. Faseb J, 2001. **15**(10): p. 1771-3.
83. Li, H., T. Wallerath, T. Munzel, et al., *Regulation of endothelial-type NO synthase expression in pathophysiology and in response to drugs*. Nitric Oxide, 2002. **7**(3): p. 149-64.
84. Liu, W. S. and C. A. Heckman, *The sevenfold way of PKC regulation*. Cell Signal, 1998. **10**(8): p. 529-42.
85. Lowenstein, C. J. and S. H. Snyder, *Nitric oxide, a novel biologic messenger*. Cell, 1992. **70**(5): p. 705-7.
86. Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, et al., *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. J Biol Chem, 1951. **193**(1): p. 265-75.

87. Maier, W., F. Cosentino, R. B. Lutolf, et al., *Tetrahydrobiopterin improves endothelial function in patients with coronary artery disease*. J Cardiovasc Pharmacol, 2000. **35**(2): p. 173-8.
88. Maita, N., K. Hatakeyama, K. Okada, et al., *Structural basis of biopterin-induced inhibition of GTP cyclohydrolase I by GFRP, its feedback regulatory protein*. J Biol Chem, 2004. **279**(49): p. 51534-40.
89. Mayer, B. and E. R. Werner, *In search of a function for tetrahydrobiopterin in the biosynthesis of nitric oxide*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 1995. **351**(5): p. 453-63.
90. Meininger, C. J., R. S. Marinos, K. Hatakeyama, et al., *Impaired nitric oxide production in coronary endothelial cells of the spontaneously diabetic BB rat is due to tetrahydrobiopterin deficiency*. Biochem J, 2000. **349**(Pt 1): p. 353-6.
91. Mitchell, B. M., A. M. Dorrance, A. Ergul, et al., *Sepiapterin decreases vasorelaxation in nitric oxide synthase inhibition-induced hypertension*. J Cardiovasc Pharmacol, 2004. **43**(1): p. 93-8.
92. Mitchell, B. M. and R. C. Webb, *Impaired vasodilation and nitric oxide synthase activity in glucocorticoid-induced hypertension*. Biol Res Nurs, 2002. **4**(1): p. 16-21.
93. Mitchell, D. J., J. Yu, and K. Tyml, *Local L-NAME decreases blood flow and increases leukocyte adhesion via CD18*. Am J Physiol, 1998. **274**(4 Pt 2): p. H1264-8.
94. Miura, S., J. Watanabe, T. Tomita, et al., *The inhibitory effects of tea polyphenols (flavan-3-ol derivatives) on Cu<sup>2+</sup> mediated oxidative modification of low density lipoprotein*. Biol Pharm Bull, 1994. **17**(12): p. 1567-72.
95. Miyazaki-Akita, A., T. Hayashi, Q. F. Ding, et al., *17beta-estradiol antagonizes the down-regulation of endothelial nitric-oxide synthase and GTP cyclohydrolase I by high glucose: relevance to postmenopausal diabetic cardiovascular disease*. J Pharmacol Exp Ther, 2007. **320**(2): p. 591-8.
96. Moat, S. J., Z. L. Clarke, A. K. Madhavan, et al., *Folic acid reverses endothelial dysfunction induced by inhibition of tetrahydrobiopterin biosynthesis*. Eur J Pharmacol, 2006. **530**(3): p. 250-8.
97. Moens, A. L. and D. A. Kass, *Tetrahydrobiopterin and cardiovascular disease*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006. **26**(11): p. 2439-44.

98. Murad, F., *Regulation of cytosolic guanylyl cyclase by nitric oxide: the NO-cyclic GMP signal transduction system*. Adv Pharmacol, 1994. **26**: p. 19-33.
99. Myerburg, R. J., K. M. Kessler, and A. Castellanos, *Sudden cardiac death: epidemiology, transient risk, and intervention assessment*. Ann Intern Med, 1993. **119**(12): p. 1187-97.
100. Myers, P. R., T. F. Wright, M. A. Tanner, et al., *The effects of native LDL and oxidized LDL on EDRF bioactivity and nitric oxide production in vascular endothelium*. J Lab Clin Med, 1994. **124**(5): p. 672-83.
101. Nichol, C. A., C. L. Lee, M. P. Edelstein, et al., *Biosynthesis of tetrahydrobiopterin by de novo and salvage pathways in adrenal medulla extracts, mammalian cell cultures, and rat brain in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1983. **80**(6): p. 1546-50.
102. Nie, H., J. L. Wu, M. Zhang, et al., *Endothelial nitric oxide synthase-dependent tyrosine nitration of prostacyclin synthase in diabetes in vivo*. Diabetes, 2006. **55**(11): p. 3133-41.
103. Niederwieser, A., W. Staudenmann, and E. Wetzel, *High-performance liquid chromatography with column switching for the analysis of biogenic amine metabolites and pterins*. J Chromatogr, 1984. **290**: p. 237-46.
104. Niehaus, W. G., Jr. and B. Samuelsson, *Formation of malonaldehyde from phospholipid arachidonate during microsomal lipid peroxidation*. Eur J Biochem, 1968. **6**(1): p. 126-30.
105. Nuzkowski, A., R. Grabner, G. Marsche, et al., *Hypochlorite-modified low density lipoprotein inhibits nitric oxide synthesis in endothelial cells via an intracellular dislocalization of endothelial nitric-oxide synthase*. J Biol Chem, 2001. **276**(17): p. 14212-21.
106. Ohkawa, H., N. Ohishi, and K. Yagi, *Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction*. Anal Biochem, 1979. **95**(2): p. 351-8.
107. Panda, K., R. J. Rosenfeld, S. Ghosh, et al., *Distinct dimer interaction and regulation in nitric-oxide synthase types I, II, and III*. J Biol Chem, 2002. **277**(34): p. 31020-30.
108. Pannirselvam, M., V. Simon, S. Verma, et al., *Chronic oral supplementation with sepiapterin prevents endothelial dysfunction and oxidative stress in small*

- mesenteric arteries from diabetic (db/db) mice.* Br J Pharmacol, 2003. **140**(4): p. 701-6.
109. Pannirselvam, M., S. Verma, T. J. Anderson, et al., *Cellular basis of endothelial dysfunction in small mesenteric arteries from spontaneously diabetic (db/db -/-) mice: role of decreased tetrahydrobiopterin bioavailability.* Br J Pharmacol, 2002. **136**(2): p. 255-63.
110. Pennathur, S. and J. W. Heinecke, *Oxidative stress and endothelial dysfunction in vascular disease.* Curr Diab Rep, 2007. **7**(4): p. 257-64.
111. Pieper, G. M., *Acute amelioration of diabetic endothelial dysfunction with a derivative of the nitric oxide synthase cofactor, tetrahydrobiopterin.* J Cardiovasc Pharmacol, 1997. **29**(1): p. 8-15.
112. Plantinga, Y., L. Ghiadoni, A. Magagna, et al., *Supplementation with vitamins C and E improves arterial stiffness and endothelial function in essential hypertensive patients.* Am J Hypertens, 2007. **20**(4): p. 392-7.
113. Pressman, B. C., *Biological applications of ionophores.* Annu Rev Biochem, 1976. **45**: p. 501-30.
114. Protogerou, A. D., J. P. Lekakis, D. D. Kontoyanni, et al., *Effect of ascorbic acid on forearm reactive hyperaemia in patients with hypercholesterolaemia.* Eur J Cardiovasc Prev Rehabil, 2004. **11**(2): p. 149-54.
115. Qian, H., V. Neplioueva, G. A. Shetty, et al., *Nitric oxide synthase gene therapy rapidly reduces adhesion molecule expression and inflammatory cell infiltration in carotid arteries of cholesterol-fed rabbits.* Circulation, 1999. **99**(23): p. 2979-82.
116. Ramzy, D., V. Rao, L. C. Tumati, et al., *Elevated endothelin-1 levels impair nitric oxide homeostasis through a PKC-dependent pathway.* Circulation, 2006. **114**(1 Suppl): p. I319-26.
117. Reddy, K. G., R. N. Nair, H. M. Sheehan, et al., *Evidence that selective endothelial dysfunction may occur in the absence of angiographic or ultrasound atherosclerosis in patients with risk factors for atherosclerosis.* J Am Coll Cardiol, 1994. **23**(4): p. 833-43.
118. Rees, D. D., R. M. Palmer, R. Schulz, et al., *Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo.* Br J Pharmacol, 1990. **101**(3): p. 746-52.

119. Reif, A., L. G. Frohlich, P. Kotsonis, et al., *Tetrahydrobiopterin inhibits monomerization and is consumed during catalysis in neuronal NO synthase*. J Biol Chem, 1999. **274**(35): p. 24921-9.
120. Robbins, R. A., F. G. Hamel, A. A. Floreani, et al., *Bovine bronchial epithelial cells metabolize L-arginine to L-citrulline: possible role of nitric oxide synthase*. Life Sci, 1993. **52**(8): p. 709-16.
121. Rubbo, H., A. Trostchansky, H. Botti, et al., *Interactions of nitric oxide and peroxynitrite with low-density lipoprotein*. Biol Chem, 2002. **383**(3-4): p. 547-52.
122. Sawabe, K., K. O. Wakasugi, and H. Hasegawa, *Tetrahydrobiopterin uptake in supplemental administration: elevation of tissue tetrahydrobiopterin in mice following uptake of the exogenously oxidized product 7,8-dihydrobiopterin and subsequent reduction by an anti-folate-sensitive process*. J Pharmacol Sci, 2004. **96**(2): p. 124-33.
123. Schachinger, V., M. B. Britten, and A. M. Zeiher, *Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of coronary heart disease*. Circulation, 2000. **101**(16): p. 1899-906.
124. Schmidt, K., P. Klatt, and B. Mayer, *Reaction of peroxynitrite with oxyhaemoglobin: interference with photometrical determination of nitric oxide*. Biochem J, 1994. **301 ( Pt 3)**: p. 645-7.
125. Schmidt, K., E. R. Werner, B. Mayer, et al., *Tetrahydrobiopterin-dependent formation of endothelium-derived relaxing factor (nitric oxide) in aortic endothelial cells*. Biochem J, 1992. **281 ( Pt 2)**: p. 297-300.
126. Schmidt, T. S. and N. J. Alp, *Mechanisms for the role of tetrahydrobiopterin in endothelial function and vascular disease*. Clin Sci (Lond), 2007. **113**(2): p. 47-63.
127. Schuh, J., G. F. Fairclough, Jr., and R. H. Haschemeyer, *Oxygen-mediated heterogeneity of apo-low-density lipoprotein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1978. **75**(7): p. 3173-7.
128. Scott-Burden, T., *Regulation of nitric oxide production by tetrahydrobiopterin*. Circulation, 1995. **91**(1): p. 248-50.
129. Segawa, M., A. Hosaka, F. Miyagawa, et al., *Hereditary progressive dystonia with marked diurnal fluctuation*. Adv Neurol, 1976. **14**: p. 215-33.

130. Sessa, W. C., G. Garcia-Cardena, J. Liu, et al., *The Golgi association of endothelial nitric oxide synthase is necessary for the efficient synthesis of nitric oxide*. J Biol Chem, 1995. **270**(30): p. 17641-4.
131. Setoguchi, S., Y. Hirooka, K. Eshima, et al., *Tetrahydrobiopterin improves impaired endothelium-dependent forearm vasodilation in patients with heart failure*. J Cardiovasc Pharmacol, 2002. **39**(3): p. 363-8.
132. Setoguchi, S., M. Mohri, H. Shimokawa, et al., *Tetrahydrobiopterin improves endothelial dysfunction in coronary microcirculation in patients without epicardial coronary artery disease*. J Am Coll Cardiol, 2001. **38**(2): p. 493-8.
133. Sheng, J. Z., D. Wang, and A. P. Braun, *DAF-FM (4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein) diacetate detects impairment of agonist-stimulated nitric oxide synthesis by elevated glucose in human vascular endothelial cells: reversal by vitamin C and L-sepiapterin*. J Pharmacol Exp Ther, 2005. **315**(2): p. 931-40.
134. Shimizu, S., K. Shiota, S. Yamamoto, et al., *Hydrogen peroxide stimulates tetrahydrobiopterin synthesis through the induction of GTP-cyclohydrolase I and increases nitric oxide synthase activity in vascular endothelial cells*. Free Radic Biol Med, 2003. **34**(10): p. 1343-52.
135. Shinozaki, K., A. Kashiwagi, Y. Nishio, et al., *Abnormal biopterin metabolism is a major cause of impaired endothelium-dependent relaxation through nitric oxide/O<sub>2</sub>- imbalance in insulin-resistant rat aorta*. Diabetes, 1999. **48**(12): p. 2437-45.
136. Sidwell, A. P. and R. F. Cain, *New Method of Presentation of Food Samples to the Hunter Color and Color Difference Meter*. Science, 1954. **120**(3121): p. 666-667.
137. Smith, I., B. E. Clayton, and O. H. Wolff, *New variant of phenylketonuria with progressive neurological illness unresponsive to phenylalanine restriction*. Lancet, 1975. **1**(7916): p. 1108-11.
138. Sorrenti, V., F. Mazza, A. Campisi, et al., *High glucose-mediated imbalance of nitric oxide synthase and dimethylarginine dimethylaminohydrolase expression in endothelial cells*. Curr Neurovasc Res, 2006. **3**(1): p. 49-54.

139. Stepp, D. W., J. Ou, A. W. Ackerman, et al., *Native LDL and minimally oxidized LDL differentially regulate superoxide anion in vascular endothelium in situ*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2002. **283**(2): p. H750-9.
140. Stroes, E., J. Kastelein, F. Cosentino, et al., *Tetrahydrobiopterin restores endothelial function in hypercholesterolemia*. J Clin Invest, 1997. **99**(1): p. 41-6.
141. Suwaidi, J. A., S. Hamasaki, S. T. Higano, et al., *Long-term follow-up of patients with mild coronary artery disease and endothelial dysfunction*. Circulation, 2000. **101**(9): p. 948-54.
142. Takahashi, Y., H. Chiba, K. Matsuno, et al., *Native lipoproteins inhibit platelet activation induced by oxidized lipoproteins*. Biochem Biophys Res Commun, 1996. **222**(2): p. 453-9.
143. Tanner, F. C., G. Noll, C. M. Boulanger, et al., *Oxidized low density lipoproteins inhibit relaxations of porcine coronary arteries. Role of scavenger receptor and endothelium-derived nitric oxide*. Circulation, 1991. **83**(6): p. 2012-20.
144. Tanner, F. C., B. van der Loo, S. Shaw, et al., *Inactivity of nitric oxide synthase gene in the atherosclerotic human carotid artery*. Basic Res Cardiol, 2007. **102**(4): p. 308-17.
145. Thom, T., N. Haase, W. Rosamond, et al., *Heart disease and stroke statistics--2006 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee*. Circulation, 2006. **113**(6): p. e85-151.
146. Tiefenbacher, C. P., *Tetrahydrobiopterin: a critical cofactor for eNOS and a strategy in the treatment of endothelial dysfunction?* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2001. **280**(6): p. H2484-8.
147. Tiefenbacher, C. P., T. Bleeke, C. Vahl, et al., *Endothelial dysfunction of coronary resistance arteries is improved by tetrahydrobiopterin in atherosclerosis*. Circulation, 2000. **102**(18): p. 2172-9.
148. Topal, G., A. Brunet, E. Millanvoeye, et al., *Homocysteine induces oxidative stress by uncoupling of NO synthase activity through reduction of tetrahydrobiopterin*. Free Radic Biol Med, 2004. **36**(12): p. 1532-41.

149. Tsao, P. S., R. Buitrago, J. R. Chan, et al., *Fluid flow inhibits endothelial adhesiveness. Nitric oxide and transcriptional regulation of VCAM-1.* Circulation, 1996. **94**(7): p. 1682-9.
150. Tsikas, D., F. M. Gutzki, S. Rossa, et al., *Measurement of nitrite and nitrate in biological fluids by gas chromatography-mass spectrometry and by the Griess assay: problems with the Griess assay--solutions by gas chromatography-mass spectrometry.* Anal Biochem, 1997. **244**(2): p. 208-20.
151. Tsutsui, M., S. Milstien, and Z. S. Katusic, *Effect of tetrahydrobiopterin on endothelial function in canine middle cerebral arteries.* Circ Res, 1996. **79**(2): p. 336-42.
152. Vasquez-Vivar, J., D. Duquaine, J. Whitsett, et al., *Altered tetrahydrobiopterin metabolism in atherosclerosis: implications for use of oxidized tetrahydrobiopterin analogues and thiol antioxidants.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2002. **22**(10): p. 1655-61.
153. Vasquez-Vivar, J., P. Martasek, J. Whitsett, et al., *The ratio between tetrahydrobiopterin and oxidized tetrahydrobiopterin analogues controls superoxide release from endothelial nitric oxide synthase: an EPR spin trapping study.* Biochem J, 2002. **362**(Pt 3): p. 733-9.
154. Vasquez, R., M. Farias, J. L. Vega, et al., *D-glucose stimulation of L-arginine transport and nitric oxide synthesis results from activation of mitogen-activated protein kinases p42/44 and Smad2 requiring functional type II TGF-beta receptors in human umbilical vein endothelium.* J Cell Physiol, 2007. **212**(3): p. 626-32.
155. Vergnani, L., S. Hatik, F. Ricci, et al., *Effect of native and oxidized low-density lipoprotein on endothelial nitric oxide and superoxide production : key role of L-arginine availability.* Circulation, 2000. **101**(11): p. 1261-6.
156. Wang, J., D. J. Stuehr, and D. L. Rousseau, *Interactions between substrate analogues and heme ligands in nitric oxide synthase.* Biochemistry, 1997. **36**(15): p. 4595-606.
157. Weis, J. R., R. E. Pitas, B. D. Wilson, et al., *Oxidized low-density lipoprotein increases cultured human endothelial cell tissue factor activity and reduces protein C activation.* Faseb J, 1991. **5**(10): p. 2459-65.

158. Werner-Felmayer, G., E. R. Werner, D. Fuchs, et al., *Pteridine biosynthesis in human endothelial cells. Impact on nitric oxide-mediated formation of cyclic GMP*. J Biol Chem, 1993. **268**(3): p. 1842-6.
159. Werner, E. R., H. Wachter, and G. Werner-Felmayer, *Determination of tetrahydrobiopterin biosynthetic activities by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection*. Methods Enzymol, 1997. **281**: p. 53-61.
160. Wever, R. M., T. F. Luscher, F. Cosentino, et al., *Atherosclerosis and the two faces of endothelial nitric oxide synthase*. Circulation, 1998. **97**(1): p. 108-12.
161. Yagi, K., *A simple fluorometric assay for lipoperoxide in blood plasma*. Biochem Med, 1976. **15**(2): p. 212-6.
162. Yang, D., N. Levens, J. N. Zhang, et al., *Specific potentiation of endothelium-dependent contractions in SHR by tetrahydrobiopterin*. Hypertension, 2003. **41**(1): p. 136-42.
163. Young, I. S. and J. McEneny, *Lipoprotein oxidation and atherosclerosis*. Biochem Soc Trans, 2001. **29**(Pt 2): p. 358-62.
164. Zheng, J. S., X. Q. Yang, K. J. Lookingland, et al., *Gene transfer of human guanosine 5'-triphosphate cyclohydrolase I restores vascular tetrahydrobiopterin level and endothelial function in low renin hypertension*. Circulation, 2003. **108**(10): p. 1238-45.
165. Zipes, D. P. and H. J. Wellens, *Sudden cardiac death*. Circulation, 1998. **98**(21): p. 2334-51.
166. Zou, M. H., C. Shi, and R. A. Cohen, *Oxidation of the zinc-thiolate complex and uncoupling of endothelial nitric oxide synthase by peroxynitrite*. J Clin Invest, 2002. **109**(6): p. 817-26.

## Tabellenanhang

	nativ	oxLDL	HG	DAHP
<b>BH4</b> (nM)	15,2 (4,5)	5,2 (3,2)*	4,2 (1,0)	1,8 (0,6)*
<b>BH-gesamt</b> (nM)	21,4 (3,7)	18,2 (9,1)	11,4 (1,7)	6,5 (0,8)
<b>BH<sup>4</sup>/BH<sub>ox</sub></b>	3,2 (1,4)	0,4 (0,12)*	0,7 (0,23)	0,54 (0,19)*
<b>BH4</b> (pmol/mg)	2,55 (0,76)	0,32 (0,11)*	0,54 (0,24)	0,23 (0,1)
<b>BH-gesamt</b> (pmol/mg)	3,73 (0,67)	3,28 (1,67)	1,99 (0,31)	1,20 (0,15)
<b>BH<sup>4</sup>/BH<sub>ox</sub></b>	2,62 (1,1)	0,25 (0,13)*	0,53 (0,28)	0,40 (0,20)*

je n=5

### (Tabelle 2) Intrazellulärer Tetrahydrobiopterinspiegel ohne Behandlung mit Sepsiapterin

(Angabe als Mittelwerte mit Standardfehlern in Klammern, BH4 = Tetrahydrobiopterin, BH-gesamt = Gesamtbiopterin,  $\text{BH}^4/\text{BH}_{\text{ox}}$  = Verhältnis des vollreduzierten Tetrahydrobiopterins zu den oxidierten Formen Dihydrobiopterin und Biopterin, oxLDL = oxidierte Low Density Lipoproteine, HG = hohe Glukosekonzentration, high glucose, DAHP = Diaminohydroxypyrimidin, \* = signifikant versus nativ)

	nativ	oxLDL	HG	DAHP
<b>BH4</b> (nM)	17898 (2629)	6259 (1475) *	10363 (1305)	4882 (1174) **
<b>BH-gesamt</b> (nM)	19004 (2492)	7541 (1426) **	11654 (1030)	5957 (876) **
$\text{BH4}/\text{BHox}$	31,4 (13,0)	5,9 (1,4)	13,1 (5,8)	17,1 (12,2)
<hr/>				
<b>BH4</b> (pmol/mg)	2933 (527)	1040 (263) *	1850 (325)	812 (250) *
<b>BH-gesamt</b> (pmol/mg)	3119 (489)	1268 (252) *	2092 (269)	1001 (201) **
$\text{BH4}/\text{BHox}$	31,6 (14,4)	5,6 (1,4)	14,8 (8,0)	16,50 (12,0)

je n=5

**(Tabelle 3) Intrazellulärer Tetrahydrobiopterinspiegel nach Behandlung mit Sepsiapterin 100 µM**

(Angabe als Mittelwerte mit Standardfehlern in Klammern, BH4 = Tetrahydrobiopterin, BH-gesamt = Gesamtbiopterin,  $\text{BH4}/\text{BHox}$  = Verhältnis des vollreduzierten Tetrahydrobiopterins zu den oxidierten Formen Dihydrobiopterin und Biopterin, oxLDL = oxidierte Low Density Lipoproteine, HG = hohe Glukosekonzentration, DAHP = Diaminohydroxypyrimidin, \* = signifikant versus nativ nach Kruskal-Wallis-H-Test und Adjustierung für multiple Vergleiche mit Dunn´s multiple comparison test, \*\* = hoch signifikant versus nativ)

	nativ	oxLDL	HG	DAHP	L-NAME
<b>Intensität (A.U.)<sup>°</sup></b>	7,24 (0,46)	4,76 (0,11)	4,21 (0,24)**	0,69 (0,05)**	0,38 (0,06)
<b>NO (nM)</b>	41 (2,4)	29 (0,5)	26 (1,4)**	8 (0,5)	6 (0,5)
<b>NO/Prot.(pmol/mg)</b>	53 (2,9)	41 (1,8)	33 (2,0)**	10 (0,8)**	7 (1,0)
<b>je n=5</b>			<sup>°</sup> abzüglich DAF-2-Eigenfluoreszenz		

**(Tabelle 4) Ergebnisse der NO-Messung der unterschiedlichen Behandlungsgruppen im DAF-Assay ohne Sepiapterinsupplementation** (angegeben als Intensität abzüglich DAF-Eigenfluoreszenz, NO-Konzentration und NO-Konzentration bezogen auf Proteinmenge, Angabe als Mittelwerte mit Standardfehlern in Klammern, oxLDL = oxidierte Low Density Lipoproteine, HG = hohe Glukosekonzentration, high glucose, DAHP = Diaminohydroxypyrimidin, L-NAME = Nitro-L-Argininmethylester, Prot. = Korrektur bezogen auf Proteinkonzentration, \* = signifikant versus nativ nach Kruskal-Wallis-H-Test und Adjustierung für multiple Vergleiche mit Dunn´s multiple comparison test, \*\* = hoch signifikant versus nativ)

	DAHP	L-NAME	unstimuliert	PMA
<b>Intensität (A.U.)<sup>°</sup></b>	0,69 (0,05)	0,38 (0,06)	0,23 (0,02)	10,30 (0,13)
<b>NO (nM)</b>	8 (0,5)	6 (0,5)	[1]	58 (1,7)
<b>NO/Prot. (pmol/mg)</b>	10 (0,8)	7 (1,0)	[1]	66 (7,6)
<b>je n=5</b>			<sup>°</sup> abzüglich DAF-2-Eigenfluoreszenz	

**(Tabelle 5) Ergebnisse der NO-Messung der Negativkontrollen, unstimulierter und PMA-behandelter Zellen im DAF-Assay ohne Sepiapterinsupplementation** (angegeben als Intensität abzüglich DAF-Eigenfluoreszenz, NO-Konzentration und NO-Konzentration bezogen auf Proteinmenge, Angabe als Mittelwerte mit Standardfehlern in Klammern, DAHP = Diaminohydroxypyrimidin, L-NAME = Nitro-L-Argininmethylester, unstim. = unstimuliert, PMA = Phorbol-12-myristat-13-acetat, Prot.= Korrektur bezogen auf Proteinkonzentration, [ ] = Ergebnis ist zu klein um sinnvoll auf der Standardkurve abgelesen werden zu können)

	nativ	oxLDL	HG	DAHP
<b>Intensität (A.U.)<sup>°</sup></b>	3,82 (0,11)	4,45 (0,16)	4,43 (0,17)*	2,97 (0,18)*
<b>Δ mit Sep./ohne</b>	-3,42*	-0,31	+0,22	+2,28**
<b>NO (nM)</b>	24 (0,6)	27 (0,9)*	27 (0,8)*	20 (1,0)**
<b>Δ mit Sep./ohne</b>	-17**	-2	+1	+12*
<b>NO/Prot.(pmol/mg)</b>	30 (1,6)	38 (1,5)	34 (2,1)	24 (1,6)**
<b>Δ mit Sep./ohne</b>	-23**	-4	+1	+14**
<b>je n=5</b>				<sup>°</sup> abzüglich DAF-2-Eigenfluoreszenz

**(Tabelle 6) Ergebnisse der NO-Messung der unterschiedlichen Behandlungsgruppen im DAF-Assay nach Sepiapterininkubation 100 μM** (angegeben als Intensität abzüglich DAF-Eigenfluoreszenz, NO-Konzentration und NO-Konzentration bezogen auf Proteinmenge, Angabe als Mittelwerte mit Standardfehlern in Klammern, oxLDL = oxidierte Low Density Lipoproteine, HG = hohe Glukosekonzentration, high glucose, DAHP = Diaminohydroxypyrimidin, Prot. = Korrektur bezogen auf Proteinkonzentration, Δ mit Sep./ohne Sep = Differenz im Vergleich zu den Zellen ohne Sepiapterininkubation, \* = signifikant versus nativ nach Kruskal-Wallis-H-Test und Adjustierung für multiple Vergleiche mit Dunn´s multiple comparison test oder signifikante Zu- oder Abnahme im Mann-Whitney-U-Test innerhalb der Behandlungsgruppe, \*\* = hoch signifikant)

	nativ	HG	oxLDL	DAHP
<b>Intensität (A.U.)<sup>°</sup></b>	7,68 (0,34)	11,86 (0,87)*	8,46 (0,94)	5,05 (0,06)
<b>Δ mit Sep./ohne</b>	+0,44	+7,65*	+3,71*	+4,37**
<b>NO (nM)</b>	43 (1,7)	64 (4,6)*	47 (4,7)	31 (0,4)
<b>Δ mit Sep./ohne</b>	+2	+37*	+19*	+23*
<b>NO/Prot. (pmol/mg)</b>	56 (2,6)	85 (7,1)	62 (8,0)	36 (1,1)
<b>Δ mit Sep./ohne</b>	+3	+52*	+21*	+26*
<b>je n=5</b>				<sup>°</sup> abzüglich DAF-2-Eigenfluoreszenz

**(Tabelle 7) Ergebnisse der NO-Messung der unterschiedlichen Behandlungsgruppen im DAF-Assay nach Sepiapterininkubation 10 μM** (angegeben als Intensität abzüglich DAF-Eigenfluoreszenz, NO-Konzentration und NO-Konzentration bezogen auf Proteinmenge, Angabe als Mittelwerte mit Standardfehlern in Klammern, oxLDL = oxidierte Low Density Lipoproteine, HG = hohe Glukosekonzentration, high glucose, DAHP = Diaminohydroxypyrimidin, Δ mit Sep./ohne Sep = Differenz im Vergleich zu den Zellen ohne Sepiapterininkubation, \* = signifikant versus nativ nach Kruskal-Wallis-H-Test und Adjustierung für multiple Vergleiche mit Dunn´s multiple comparison test oder signifikante Zu- oder Abnahme mit versus ohne Sepiapterin im Mann-Whitney-U-Test innerhalb einer Behandlungsgruppe, \*\* = hoch signifikant)

<b>Sep.</b> ( $\mu\text{M}$ )	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>5</b>	<b>10</b>	<b>20</b>	<b>40</b>	<b>60</b>	<b>80</b>	<b>100</b>	<b>150</b>
<b>Intensität</b> (A.U.) <sup>°</sup>	3,37	5,42	3,69	3,15	1,61	1,37	1,26	0,94	0,71	0,64
<b>SE (M)</b>	0,06	0,08	0,04	0,05	0,07	0,04	0,08	0,04	0,06	0,05
<b>NO</b> (nM)	22	32	23	20	12	12	11	9	8	8
<b>SE (M)</b>	0,4	0,2	0,1	0,2	0,2	0,2	0,3	0,2	0,4	0,5
<b>NO/Prot.</b> (pmol/mg)	26	38	27	24	15	14	13	11	9	9
<b>SE (M)</b>	1,0	0,9	0,4	0,5	0,2	0,6	0,5	0,2	0,7	0,7

je n=5

<sup>°</sup> abzüglich DAF-2-Eigenfluoreszenz

**(Tabelle 8) Ergebnisse der NO-Messung unter verschiedenen Sepiapterinkonzentrationen** (angegeben als Emissionsintensität in arbitrary units A.U., NO-Konzentration in nM und NO-Konzentration bezogen auf Proteinmenge in pmol/mg, SE (M) = Standardfehler des Mittelwertes)

	oxLDL	HG	nativ	DAHP
	<b><u>Intensität</u> (A.U.)°</b>			
<b>BH4 10 µM</b>	10,14 (1,06)	10,40 (1,04)	7,92 (0,13)	4,35 (0,07)*
<b>BH4 100 µM</b>	5,03 (0,24)	4,89 (0,30)	4,59 (0,24)	1,66 (0,47)
	<b><u>Δ mit BH4/ohne BH4</u></b>			
<b>BH4 10 µM</b>	+5,38*	+6,19*	+0,68	+3,66**
<b>BH4 100 µM</b>	+0,27	+0,68	-2,65*	+0,97*
	<b><u>NO</u> (nM)</b>			
<b>BH4 10 µM</b>	55 (5,3)	56 (5,2)	45 (0,9)	27 (0,2)
<b>BH4 100 µM</b>	30 (1,2)	30 (1,6)	28 (1,3)	13 (2,5)
	<b><u>Δ mit BH4/ohne BH4</u></b>			
<b>BH4 10 µM</b>	+26*	+30*	+3	+19*
<b>BH4 100 µM</b>	+2	+3	-13*	5*

	<u>NO/Prot.</u> (pmol/mg)			
<b>BH4 10 µM</b>	69 (9,0)	72 (4,5)	54 (2,6)	34 (1,0)
<b>BH4 100 µM</b>	38 (1,9)	40 (4,1)	36 (3,0)	16 (2,9)
	<u>Δ mit BH4/ohne BH4</u>			
<b>BH4 10 µM</b>	+28*	+39*	+/- 0	+24*
<b>BH4 100 µM</b>	-3	6	-18*	6*

je n = 5 °abzüglich DAF-2-

**(Tabelle 9) Ergebnisse der NO-Messung der unterschiedlichen Behandlungsgruppen im DAF-Assay nach Inkubation mit 10 und 100 µM Tetrahydrobiopterin** (angegeben als Intensität abzüglich DAF-Eigenfluoreszenz, NO-Konzentration und NO-Konzentration bezogen auf Proteinmenge, Angabe als Mittelwerte mit Standardfehlern in Klammern, BH4 = Tetrahydrobiopterin, oxLDL = oxidierte Low Density Lipoproteine, HG = hohe Glukosekonzentration, high glucose, DAHP = Diaminohydroxypyrimidin, Prot. = Korrektur bezogen auf Proteinkonzentration, Δ mit BH4./ohne BH4 = Differenz im Vergleich zu den Zellen ohne Tetrahydrobiopterininkubation, \* = signifikant versus nativ nach Kruskal-Wallis-H-Test und Adjustierung für multiple Vergleiche mit Dunn's multiple comparison test oder signifikante Zu- oder Abnahme mit versus ohne Tetrahydrobiopterininkubation im Mann-Whitney-U-Test innerhalb einer Behandlungsgruppe, \*\* = hoch signifikant)

	nativ	oxLDL	HG	DAHP
	<b><u>Intensität</u> (A.U.)°</b>			
<b>ohne</b>	5,04 (0,06)	0,44 (0,03)**	3,35 (0,05)	0,57 (0,05)*
<b>BH4 10 µM</b>	6,17 (0,06)	7,24 (0,09)	9,57 (0,31)**	4,10 (0,06)
<b>BH4 100 µM</b>	4,58 (0,04)	5,68 (0,08)	8,46 (0,07)**	3,81 (0,11)
<b>Sep 10 µM</b>	8,43 (0,03)	4,46 (0,05)	10,71 (0,05)	1,01 (0,04)*
<b>Sep 100 µM</b>	2,92 (0,04)	2,35 (0,05)	8,03 (0,08)	1,56 (0,08)*
<b><u>NO</u> (nM)</b>				
<b>ohne</b>	31 (0,6)	6 (0,2)**	21 (0,4)	7 (0,3)*
<b>BH4 10 µM</b>	36 (0,4)	41 (0,3)	53 (1,6)**	26 (0,2)
<b>BH4 100 µM</b>	28 (0,2)	33 (0,4)	48 (0,2)**	24 (0,7)
<b>Sep 10 µM</b>	48 (0,2)	28 (0,2)	58 (0,2)	10 (0,2)*
<b>Sep 100 µM</b>	19 (0,2)	18 (0,9)	45 (0,6)	12 (0,2)

---

	<u>NO/Prot.</u> (pmol/mg)			
<b>ohne</b>	37 (3,0)	7 (0,5) **	23 (1,0)	8 (0,6) *
<b>BH4 10 µM</b>	39 (1,5)	47 (3,5)	56 (2,6) *	28 (1,2)
<b>BH4 100 µM</b>	33 (0,7)	39 (1,0)	52 (2,1) **	27 (1,0)
<b>Sep 10 µM</b>	51 (1,7)	32 (1,2)	61 (1,5)	10 (0,7) *
<b>Sep 100 µM</b>	21 (0,7)	19 (0,8)	51 (2,5)	14 (0,9)

---

je n = 5 ° abzüglich DAF-2-

**(Tabelle 10) Ergebnisse der NO-Messung der unterschiedlichen Behandlungsgruppen im DAF-Assay nach Stimulation der Phosphokinase C mit Phorbol-12-myristate-13-acetate und unter verschiedenen Konzentrationen Tetrahydrobiopterin und Sepiapterin** (angegeben als Intensität abzüglich DAF-Eigenfluoreszenz, NO-Konzentration und NO-Konzentration bezogen auf Proteinmenge, Angabe als Mittelwerte mit Standardfehlern in Klammern, BH4 = Tetrahydrobiopterin, Sep = Sepiapterin, oxLDL = oxidierte Low Density Lipoproteine, HG = hohe Glukosekonzentration, high glucose, DAHP = Diaminohydroxypyrimidin, Prot. = Korrektur bezogen auf Proteinkonzentration, \* = signifikant versus nativ nach Kruskal-Wallis-H-Test und Adjustierung für multiple Vergleiche mit Dunn´s multiple comparison test)

	nativ	oxLDL	HG	DAHP
<b><u>Δ Intensität mit vs. ohne Tiron</u> (A.U.)°</b>				
<b>ohne BH4/Sep.</b>	-0,65 (0,13)*	+2,86 (0,06)*	-0,66 (0,10)*	+1,18 (0,16)**
<b>BH4 10 μM</b>	-1,05 (1,06)	+0,57 (0,13)*	-1,97 (0,25)*	+0,36 (0,07)*
<b>BH4 100 μM</b>	+0,81 (0,04)*	+1,09 (0,54)	+0,04 (0,12)	+1,03 (0,14)*
<b>Sep 10 μM</b>	-3,43 (0,07)*	+3,39 (0,11)*	-0,42 (0,09)*	-0,66 (0,04)*
<b>Sep 100 μM</b>	+2,14 (0,07)*	+2,39 (0,12)*	+0,41 (0,18)*	-0,83 (0,06)*

<b><u>Δ NO mit vs. ohne Tiron</u> (nM)</b>				
<b>ohne BH4/Sep.</b>	-3 (0,8)*	+15 (0,4)*	-3 (0,5)*	+6 (0,8)*
<b>BH4 10 μM</b>	-5 (5,3)	+2 (0,7)*	-11 (1,3)*	+2 (0,5)*
<b>BH4 100 μM</b>	+4 (0,1)*	+8 (0,4)*	0 (0,4)	+5 (0,1)*
<b>Sep 10 μM</b>	-17 (0,4)*	+16 (1,1)*	-2 (0,2)*	-5 (0,3)*
<b>Sep 100 μM</b>	+11 (0,4)*	+11 (1,3)*	+2 (1,2)	-4 (0,4)*

	<b><u>Δ NO/Prot. mit vs. ohne Tiron</u></b> (pmol/mg)			
<b>ohne BH4/Sep.</b>	-7 (3,7)	+18 (1,3)*	-3 (1,4)	+6 (0,5)*
<b>BH4 10 μM</b>	-5 (6,0)	+1 (2,3)	-20 (9,1)*	+2 (1,3)
<b>BH4 100 μM</b>	+2 (1,7)	+7 (0,7)*	0 (3,1)	+6 (2,5)*
<b>Sep 10 μM</b>	-15 (2,1)*	+14 (2,6)*	+2 (2,5)	-4 (1,3)*
<b>Sep 100 μM</b>	+14 (1,4)*	+13 (2,0)*	+1 (3,6)	-4 (1,7)*

je n = 5

° abzüglich DAF-2-Eigenfluoreszenz

**(Tabelle 11) Zu- und Abnahmen der PKC-stimulierten NO-Produktion nach Tironbehandlung und unter verschiedenen Konzentrationen Tetrahydrobiopterin und Sepiapterin** (angegeben als Unterschiede in Intensität abzüglich DAF-Eigenfluoreszenz, NO-Konzentration und NO-Konzentration bezogen auf Proteinmenge, Angabe als Mittelwerte mit Standardfehlern in Klammern, Signifikanzniveaus der Zu- und Abnahmen nach Zweigruppenvergleich nach Mann-Whitney-U-Test, BH4 = Tetrahydrobiopterin, Sep = Sepiapterin, oxLDL = oxidierte Low Density Lipoproteine, HG = hohe Glukosekonzentration, high glucose, DAHP = Diaminohydroxypyrimidin, Prot. =Korrektur bezogen auf Proteinkonzentration, \* = signifikante Zu- oder Abnahme nach Mann-Whitney-U-Test)

## Erklärung häufig verwendeter Abkürzungen

---

A.U.	Arbitrary Units
ApoE	Apolipoprotein E
BH4	(6R-)5,6,7,8-Tetrahydrobiopterin
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
DAF-2	4,5-Diaminofluorescein
DAHP	2,4-Diamino-6-hydroxypyrimidin
D-MEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulphoxid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eNOS	endotheliale NO-Synthetase
FAD	Flavinadenindinukleotid
FMN	Flavinmononukleotid
GFRP	GTP-Cyclohydrolase feedback regulatory protein
GTP	Guanosintriphosphat
GTPCH	GTP-Cyclohydrolase
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HDL	High Density Lipoprotein
HG	„high Glucose“, hohe Glucosekonzentration
HPLC	High Performans Liquid Chromatography
LDL	Low Density Lipoproteine
L-NAME	N <sub>ω</sub> -Nitro-L-Argininmethylester-hydrochlorid
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid

mRNA	<i>Messenger</i> Ribonukleinsäure
NADPH	Nicotinamiddinukleotidphosphat
NO	Stickstoffmonoxid
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Superoxidradikal
OONO <sup>-</sup>	Peroxynitrit
PBS	Phosphate buffered Saline
PKC	Phosphokinase C
PMA	Phorbol 12-myristat 13-acetat
TBARS	thiobarbituric acid reactive substances, thiobarbitursäurereaktive Substanzen
UZ	Ultrazentrifugation
VLDL	Very Low Density Lipoproteine

## Danksagung

---

Mein Dank gilt Herrn PD Dr. N. Weiss für die Überlassung des Themas, die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe zu arbeiten, die engagierte und enge Betreuung und Motivation, sowie die Einführung in das wissenschaftliche Arbeiten und Denken.

Darüberhinaus in besonderem Maße dem Team unserer Arbeitsgruppe, hier vor allem Frau P. Koelle für die unverzichtbare Hilfe bei der Durchführung der HPLC-Messungen, Frau I. Fialla für die Unterstützung bei der LDL-Gewinnung und Frau R. Stirner für die Einweisung in die Arbeit mit Zellkulturen und die TBARS-Messungen.

Allen genannten danke ich auch für die ausgezeichnete und humorvolle Atmosphäre während der Durchführung der Experimente.

Danken möchte ich auch allen Kolleginnen und Kollegen, die sich zu den vielen Blutspenden für die LDL-Gewinnung bereit erklärt haben.

Herrn Prof. Dr. M. Schleicher und seiner Arbeitsgruppe möchte ich für die Zurverfügung-Stellung des Fluoreszenzspektrometers danken.

Nicht zuletzt danke ich meiner Familie, meinen Freunden und meiner Freundin Bettina für die Motivation und Unterstützung während der Erstellung der Arbeit.

## **Persönliche Daten**

Geburtsdatum/ -ort: 07.08.1972, Berlin (West)  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Anschrift: Am Forstanger 46  
82041 Oberhaching  
[Robert.Hilge@med.uni-muenchen.de](mailto:Robert.Hilge@med.uni-muenchen.de)

## **Schulbildung und Zivildienst**

1979 bis 1983: Grundschule Oberhaching/Grundschule Berlin-Zehlendorf  
1983 bis 1992: Gymnasium Oberhaching, Abitur August 1992  
1992 bis 1993: Zivildienst Johanniter Unfallhilfe, Ottobrunn

## **Studium der Medizin:**

1993 bis 2000: Ludwig-Maximilians-Universität München  
Ärztliche Vorprüfung: 17.08.95  
Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung: 29.08.1996  
Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung: 24.03.1999  
Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung: 10.05.2000  
Approbation: 01.03.2002

## **Berufliche Ausbildung:**

2000 bis 2001: Arzt im Praktikum, Glasgow Royal Infirmary, UK  
2001 bis 2002: Arzt im Praktikum, Städtisches Krankenhaus Mü.-Harlaching  
seit 2002: Assistenzarzt an der Medizinischen Poliklinik, Universität München  
29.08.2007: Facharztprüfung Innere Medizin