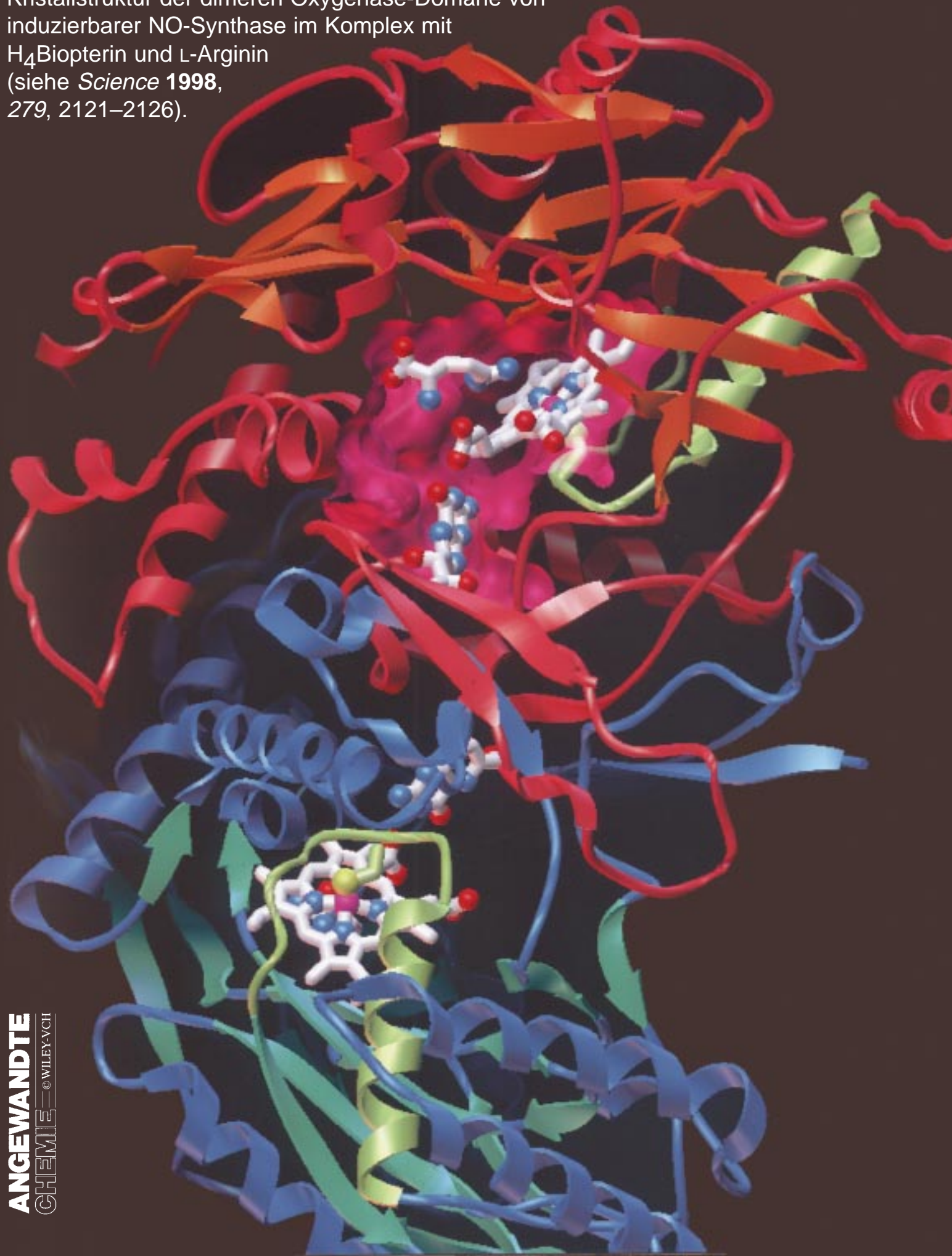


Kristallstruktur der dimeren Oxygenase-Domäne von induzierbarer NO-Synthase im Komplex mit H_4 Biopterin und L-Arginin (siehe *Science* **1998**, 279, 2121–2126).



Stickstoffmonoxid: die rätselhafte Chemie eines biologischen Botenstoffes

Silvia Pfeiffer, Bernd Mayer* und Benjamin Hemmens

Vor ungefähr zehn Jahren entdeckte man, daß das anorganische Gas Stickstoffmonoxid (NO) eine biologische Funktion als Signalmolekül im kardiovaskulären System hat. Stickstoffmonoxid wird von der innersten Zellschicht von Blutgefäßen, dem Gefäßendothel, gebildet und übt eine relaxierende Wirkung auf die darunterliegenden Gefäßmuskelzellen aus, wodurch der Blutdruck gesenkt wird. Seither wurden zahlreiche weitere Signalfunktionen dieses kleinen Moleküls entdeckt: Im peripheren Nervensystem regulieren NO-bildende (nitrerge) Neuronen die Funktion nahezu aller glattmuskulären Organe

(z. B. Blutgefäße, Magen, Darm, Harnblase, Gallenblase, Uterus, Corpus cavernosum [Schwellkörper]). NO wird auch im Gehirn produziert, wo es unter anderem an der synaptischen Plastizität und an Lern- und Gedächtnisprozessen beteiligt zu sein scheint. Im Immunsystem bilden Cytokin-aktivierte Makrophagen bei Infektionen und entzündlichen Erkrankungen über längere Zeiträume große Mengen an NO, das als Cytotoxin an der nicht-spezifischen Immunabwehr von Pathogenen (Bakterien, Viren, Tumorzellen) beteiligt ist. Die Forschung über NO hat viele fesselnde chemische Probleme und Fragen aufgeworfen: Wie kann

NO als spezifisches Signalmolekül wirken? Wie kann es lange genug im biologischen Milieu überleben, um seine Wirkung auszuüben? Welche der vielen Reaktionen von NO sind für den Organismus nützlich und welche schädlich? Wie wird es synthetisiert, und wie wird seine Synthese reguliert? In diesem Artikel behandeln wir einige der zur Zeit am meisten diskutierten Themen rund um dieses Signalmolekül.

Stichwörter: Signaltransduktion • Häm-Proteine • Peroxynitrit • Radikale • Stickstoffmonoxid

1. Einleitung

Stickstoffmonoxid (NO) ist eines der zur Zeit am intensivsten untersuchten Moleküle in der Biomedizin. Dies beruht auf den vielseitigen Funktionen von NO bei verschiedenen chemischen und biochemischen Prozessen, wobei das Ziel im Vordergrund steht, neue Pharmaka zur Therapie kardiovaskulärer, neuronaler und entzündlich-infektiöser Erkrankungen zu entwickeln. Die Substitutionstherapie mit NO-Donoren nimmt bereits eine zentrale Stellung innerhalb der pharmakotherapeutischen Strategien zur Behandlung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen ein.^[1] Nitroglycerin und andere organische Nitrate, die im Körper NO freisetzen, sind unverzichtbare Standardtherapeutika für die Langzeitbehandlung der Angina pectoris (myokardiale Ischämie) und der Herzinsuffizienz, aber auch für die oft lebensrettende Intensivtherapie des akuten Herzinfarktes. NO wirkt aber auch als peripherer Neurotransmitter, z. B. als Mediator der Erektion des Penis.^[2] Diese Wirkung von NO wird von der Anti-Impotenz-Pille Viagra der Firma Pfizer verstärkt.

NO hat aber auch schädliche und sogar letale Wirkungen. Bei Infektionen und Entzündungen (z. B. septischer Schock, rheumatoide Arthritis) werden im Organismus durch die Induktion einer unter physiologischen Bedingungen nicht exprimierten NO-Synthase große Mengen an NO gebildet, das höchst unterschiedliche, zum Teil lebensbedrohliche Wirkungen auf den Organismus hat. Es ist daher ein wesentliches Ziel zahlreicher Pharmafirmen, einen selektiven Hemmstoff für die durch Cytokine induzierbare NO-Synthase (NOS) zu entwickeln.^[3, 4]

Im ersten Teil dieses Aufsatzes zeigen wir, daß die physiologischen Wirkungen von NO nur durch die genaue Untersuchung der erstaunlicherweise sehr komplexen Chemie dieses Botenstoffes verstanden werden kann. Das freie Radikal NO ist ein reaktives Molekül. Einige Reaktionsprodukte sind biologisch inaktiv, einige weisen eine NO-ähnliche Aktivität auf, und andere sind sogar toxisch. Die Beteiligung von NO bei zellulären Reaktionen ist sehr komplex, da die entscheidenden Schritte auch über hochaktive Intermediate ablaufen können, die schwierig zu detektieren sind.

Im zweiten Teil berichten wir über NO-Synthasen, die Enzyme, die für die Biosynthese von NO verantwortlich sind. Die Aufklärung des Mechanismus der NO-Biosynthese, z. B. die Aufklärung der katalytischen Funktion der prosthetischen Hämgruppe und des Cofaktors H₄Biopterin, ist nach wie vor

[*] Prof. Dr. B. Mayer, Dr. S. Pfeiffer, Dr. B. Hemmens
Institut für Pharmakologie und Toxikologie
Universitätsplatz 2, A-8010 Graz (Österreich)
Fax: (+43) 316-380-9890
E-mail: mayer@kfunigraz.ac.at

eine große Herausforderung für die biochemische Forschung. Von der pharmazeutischen Industrie werden große Erwartungen in die Entwicklung von Isoform-spezifischen NOS-Inhibitoren gesetzt. Einige Substratanaloga weisen eine gewisse Selektivität auf, deren grundlegende Wirkungsmechanismen aber noch nicht vollständig geklärt sind.

Obwohl viele der von uns behandelten Themen eine direkte physiologische Relevanz haben, haben wir versucht, einen Schwerpunkt auf die chemischen Reaktionen von NO zu legen. Jene Leser, die sich für Details der physiologischen Aspekte von NO interessieren, werden auf hervorragende Übersichtsartikel zur Rolle von NO im peripheren Nervensystem,^[2] im Gehirn^[5] und im kardiovaskulären System^[1] verwiesen. Ebenso wird ein Besuch der NO-Homepage im Internet empfohlen (<http://www.apnet.com/no>).

2. Biochemie von NO

2.1. Reaktionen von NO

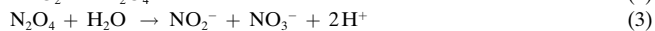
2.1.1. Reaktion mit Sauerstoff

NO reagiert mit O₂ sowohl in der Gasphase als auch in wässrigem Milieu zu NO₂. Die Reaktion ist zweiter Ordnung bezüglich NO und erster Ordnung bezüglich O₂ [Gl. (1)].^[6]

Daher reagiert NO in niedrigen Konzentrationen nur sehr langsam mit O₂; in der Luft hat NO in einer Konzentration von 10000 ppm eine Halbwertszeit von 24 Sekunden, wohingegen es in einer Konzentration von 10 ppm eine Halbwertszeit von etwa 7 Stunden hat. In wässrigem Milieu ist die Stöchiometrie der Reaktion von NO und O₂ verschieden von der in der Gasphase, das Geschwindigkeitsgesetz ist jedoch das gleiche.^[7, 8] Die Geschwindigkeitskonstante beträgt $6.3 \times 10^6 \text{ M}^{-2} \text{ s}^{-1}$.^[8, 9]



In der Gasphase ist das stabile Endprodukt der NO-Autoxidation NO₂, aus dem in wässrigem Milieu stöchiometrische Mengen an NO₂⁻ und NO₃⁻ gebildet werden [Gl. (2) und (3)]. Interessanterweise wird aber aus NO in O₂-haltigen wässrigen Lösungen ausschließlich NO₂⁻ gebildet.^[10] Dieser Unterschied weist darauf hin, daß NO₂ nicht in genügend großen Mengen akkumuliert, um zu N₂O₄ zu dimerisieren, sondern mit einem Molekül NO zu N₂O₃ weiterreagiert. Aus N₂O₃ wird in wässriger Lösung ausschließlich NO₂⁻ gebildet [Gl. (4)–(6)]. Die Gesamtgleichung der Reaktion [Gl. (7)]



Bernd Mayer, geboren in Graz (Österreich), studierte an der Karl-Franzens-Universität in Graz Chemie und beschäftigte sich während seiner Doktorarbeit unter der Leitung von Prof. Hermann Esterbauer mit der Physiologie und Pathophysiologie von Eicosanoiden. Von 1983 bis 1989 arbeitete er als Universitätsassistent am Institut für Pharmakologie und Toxikologie bei Professor Walter Kukovetz, wo er sich mit verschiedenen Aspekten



B. Mayer



S. Pfeiffer

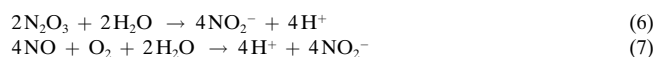


B. Hemmens

der cGMP-vermittelten Signaltransduktion beschäftigte. Als Humboldt-Stipendiat ging er 1989 an die Freie Universität Berlin zu Prof. Eycke Böhme und Prof. Günther Schultz und begann dort mit Arbeiten zur Isolierung und Charakterisierung von NO-Synthasen. Seit seiner Rückkehr nach Graz im Jahr 1991 leitet er dort am Institut für Pharmakologie und Toxikologie eine Arbeitsgruppe, die sich mit verschiedenen Aspekten der Biochemie und Pharmakologie beschäftigt. Seit Januar 1998 ist Prof. Mayer provisorischer Institutsvorstand.

Silvia Pfeiffer, geboren in Waidhofen an der Thaya (Österreich), studierte Biotechnologie an der Universität für Bodenkultur in Wien. Nach dessen Abschluß begann sie dort mit ihrer Dissertation zum Thema „Einfluß von Stickstoffmonoxid auf die cGMP-Bildung in Pflanzen“. Seit 1995 arbeitet sie in der Arbeitsgruppe von Prof. Bernd Mayer, wo sie sich hauptsächlich mit chemischen Reaktionen von NO und Peroxynitrit beschäftigt.

Benjamin Hemmens, geboren in Dublin (Irland), studierte am Trinity College in Dublin Biochemie und promovierte an der Universität Dundee (Schottland) zum Ph.D. mit einer Arbeit über Enzyme der Pyrimidin-Biosynthese. Danach verbrachte er zwei Jahre am GSF-Forschungszentrum in München, wo er in der Arbeitsgruppe von Dr. Irmgard Ziegler über die Biosynthese von Pteridinen arbeitete. Seit 1995 ist er Postdoktorand in der Arbeitsgruppe von Bernd Mayer und beschäftigt sich dort mit der Enzymologie von NO-Synthasen.



stimmt gut mit der Gesamtstöchiometrie der NO-Autoxidation in wässrigem Milieu überein.^[10, 11] Die Bildung von N_2O_3 als Intermediat der NO-Autoxidation in wässrigem Milieu wurde zwar angezweifelt,^[12] würde aber nicht nur die fehlende Bildung von NO_3^- , sondern auch das Potential von NO zur Nitrosierung erklären (siehe Abschnitt 2.1.3).^[12, 13]

2.1.2. Reaktion mit Superoxid

Als Radikal reagiert NO rasch mit anderen Radikalen. In biologischer Umgebung hat die direkte bimolekulare Reaktion von NO mit $\text{O}_2^{\cdot-}$ zu Peroxynitrit [Oxoperoxonitrat(1-)] besondere Bedeutung.^[14] Peroxynitrit ist kein freies Radikal, da die ungepaarten Elektronen von NO und $\text{O}_2^{\cdot-}$ eine neue N-O-Bindung eingehen. Die Bildung von Peroxynitrit aus NO und $\text{O}_2^{\cdot-}$ geschieht mit nahezu diffusionskontrollierter Geschwindigkeit ($4.3 - 6.7 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$).^[15, 16] Die Geschwindigkeitskonstante ist ungefähr dreimal größer als die Geschwindigkeitskonstante für die Dismutation von $\text{O}_2^{\cdot-}$ durch das Enzym Superoxid-Dismutase ($2.4 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$).^[17] Daher ist die Reaktion von NO mit $\text{O}_2^{\cdot-}$ wahrscheinlich in vivo auch in Gegenwart physiologischer Konzentrationen an Superoxid-Dismutase relevant.^[18]

Peroxynitrit ist ein starkes Oxidationsmittel ($E^\circ(\text{ONOO}^-, 2\text{H}^+/\text{NO}_2, \text{H}_2\text{O}) = 1.6 \text{ V}$ bei pH 7.0) und reagiert mit nahezu allen Klassen von Biomolekülen in vitro.^[19] In Tabelle 1 sind die Geschwindigkeitskonstanten der wichtigsten Reaktionen von Peroxynitrit mit Enzymen, Antioxidantien und einigen anderen biologisch relevanten Molekülen zusammengefaßt.

2.1.3. Nitrosierungsreaktionen

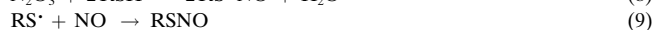
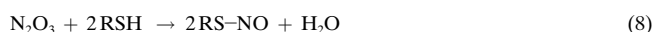
Unter physiologischen Bedingungen wird die Reaktion zwischen NO und $\text{O}_2^{\cdot-}$ in Gegenwart anderer potentieller Reaktanten sehr kompliziert. Insbesondere reduzierte Thiole kommen nahezu überall vor. Bei physiologischem pH-Wert

Tabelle 1. Geschwindigkeitskonstanten für die Reaktionen von Peroxynitrit mit Enzymen, Biomolekülen und einigen Antioxidantien.^[a]

Reaktant	$k [\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}]$	Lit.
Myeloperoxidase	6.2×10^6 ^[e]	[229]
Meerrettich-Peroxidase	3.2×10^6 ^[e]	[229]
Lactoperoxidase	3.3×10^5 ^[e]	[229]
Glutathion-Peroxidase	4.5×10^4 ^[b]	[230]
Alkohol-Dehydrogenase	2.6×10^5 ^[d]	[231]
Aconitase	1.4×10^5 ^[e]	[232]
OxyHb	2.0×10^4 ^[b]	[76]
Cytochrom c	1.4×10^4 ^[b]	[76]
CO ₂	3.0×10^4 ^[b]	[74]
Ebselen	2.0×10^6 ^[e]	[86]
Cystein	5.0×10^3 ^[b]	[80]
Glutathion	1.5×10^6 ^[b]	[233]
Methionin	1.8×10^2 ^[e]	[234]
Ascorbat	2.3×10^2 ^[e]	[235, 236]
NO	9.1×10^4 ^[b]	[72]

[b] Die Geschwindigkeitskonstanten sind der Literatur entnommen und geben die apparenten Werte bei pH 7.2–7.6 wieder. [b] $T = 37^\circ \text{C}$. [c] $T = 25^\circ \text{C}$. [d] $T = 23^\circ \text{C}$. [e] $T = 12^\circ \text{C}$.

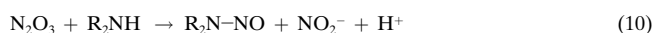
werden Thiole in Anwesenheit von O_2 durch NO zu S-Nitrosothiolen nitrosiert.^[12] Für diese Reaktion wurden zwei alternative Reaktionsmechanismen beschrieben.^[20] Beim ersten Mechanismus handelt es sich um nucleophile, assoziativ verlaufende Substitutionsprozesse am elektrophilen Stickstoffatom (Transfer einer Nitrosoniumgruppe). Besonders wirksame Nitrosierungsmittel sind z. B. die protonierte Salpetrige Säure, Alkylnitrite, Nitrosylhalogenide, N_2O_3 und N_2O_4 . In Gegenwart von Sauerstoff könnte aus NO in wässriger Lösung N_2O_3 gebildet werden, welches dann entsprechend Gleichung (8) reagieren würde.^[21, 22] Beim zweiten postulierten Mechanismus handelt es sich um eine Radikalreaktion, welche die Bildung von Thiyl-Radikalen (RS^\cdot) voraussetzt [Gl. (9)]. In vivo werden verschiedene Thiole,



beispielsweise Glutathion, zur Erhaltung des Redoxstatus der Zelle benötigt. Daher scheint es durchaus möglich, daß Thiyl-Radikale in niedrigen Gleichgewichtskonzentrationen vorhanden sind und unter physiologischen Bedingungen zur Bildung von S-Nitrosothiolen führen.

S-Nitrosothiole wurden endogen in verschiedenen Geweben nachgewiesen, wie im menschlichen Plasma,^[23] in der Luftröhre,^[24] in weißen Blutkörperchen^[25] und im Kleinhirn von Ratten.^[26] S-Nitrosothiole sind hochwirksame NO-Donoren und weisen ein ähnliches Wirkprofil auf wie NO.^[27] Die NO-Freisetzung aus S-Nitrosothiolen ist ein langsamer Prozeß, kann aber in vitro durch die Zugabe von Cu^+ -Ionen beschleunigt werden.^[28] S-Nitrosothiole haben im Blut eine größere Halbwertszeit als NO, da sie weder durch O_2 noch durch $\text{O}_2^{\cdot-}$ oder Oxyhämoglobin (OxyHb) inaktiviert werden. Im Prinzip könnten solche Verbindungen im Kreislaufsystem als systemische NO-Signale wirken, besonders wenn in den Zielzellen wirksame Katalysatoren der NO-Freisetzung vorhanden sind. Stamler und Mitarbeiter haben ein wichtiges S-Nitrosothiol-vermitteltes Signal entdeckt.^[29] Ein Cysteinrest (Cys93) der β -Untereinheit von Hämoglobin wird sehr schnell nitrosiert, wenn das Protein im R-Zustand (Oxy-Form), nicht aber wenn es im T-Zustand (Desoxy-Form) vorliegt. Dementsprechend wurde S-Nitrosohämoglobin im O_2 -reichen arteriellen, nicht aber im venösen Blut nachgewiesen. S-Nitrosohämoglobin wäre somit am Nettotransport von NO aus der Lunge ins Gewebe beteiligt. Darüber hinaus wurde gezeigt, daß S-Nitrosohämoglobin in Gegenwart von Glutathion vasodilatierende Wirkung auf perfundierte Blutgefäße hat.

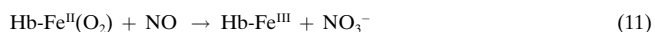
Im Unterschied zu S-Nitrosierungen, welche häufig physiologisch positive Auswirkungen haben, führen N-Nitrosierungen fast immer zu schädlichen Wirkungen. Ein Intermediat der NO-Autoxidation, wahrscheinlich N_2O_3 , kann in einer direkten Reaktion primäre Amine in DNA-Basen nitrosieren. Weiterhin bewirkt NO in Gegenwart von O_2 DNA-Schädigungen durch N-Nitrosierung verschiedener sekundärer Amine [Gl. (10)]. Die dabei entstehenden N-Nitrosamine können zu stark alkylierenden, elektrophilen Verbin-



dungen metabolisiert werden, die ebenfalls mit DNA reagieren können.^[30, 31] Synthetische Nitrosaminderivate, die als NONOate bezeichnet werden, sind nützliche Werkzeuge in der NO-Forschung, da die Geschwindigkeiten, mit denen diese Derivate NO freisetzen, maßgeschneidert werden können.^[32, 33]

2.1.4. Reaktionen mit Hämoglobin

NO reagiert mit OxyHb in einer Reaktion zweiter Ordnung mit einer Geschwindigkeitskonstante von ca. $3 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ zu Methämoglobin und NO_3^- [Gl. (11)].^[34] Da die NO-Abhän-



gigkeit bei dieser Reaktion strikt erster Ordnung und die Reaktion auch bei hohen NO-Konzentrationen nicht limitiert ist, nimmt man an, daß NO direkt mit dem Häm-gebundenen O_2 reagiert.^[35] Kürzlich wurde anhand von spektroskopischen Untersuchungen mit der Stopped-flow-Technik gezeigt, daß diese Reaktion über die intermediäre Bildung von Peroxynitrit verläuft.^[36] NO bindet aber auch an die Desoxy-Form von Hämoglobin und an Methämoglobin. Allerdings wird die Bindung an Methämoglobin durch ein Wassermolekül an der sechsten Koordinationsstelle des Häm-Eisens behindert. Daher ist die Assoziationsgeschwindigkeit ungefähr hundertfach geringer als die Geschwindigkeit der Assoziation an das Eisen(II)-Häm der Desoxy-Form.^[35, 37]

Durch die schnelle Reaktion mit OxyHb hat freies NO, welches endogen produziert oder von Therapeutika freigesetzt wird, keine systemischen Wirkungen. Die Reaktion mit OxyHb ist wahrscheinlich ein wesentlicher Weg der NO-Inaktivierung im Organismus, z.B. bei der Desaktivierung NO-stimulierter sGC in vaskulären glatten Muskelzellen (siehe Abschnitt 2.1.6). Der Einfluß von OxyHb auf die Diffusion von NO aus vaskulären Endothelzellen wurde kürzlich mit mathematischen Modellen simuliert.^[38, 39] Für die neuronale Signalwirkung von NO hat diese Reaktion wahrscheinlich keine Bedeutung, da die Entfernungen zu den nächstgelegenen Blutgefäßen um ein Vielfaches größer sind.

2.1.5. Reaktionen mit anderen Metallzentren

Zellen enthalten mehrere Arten von Metalloproteinen, die NO binden oder mit NO reagieren, beispielsweise Cytochrom-P-450-Enzyme oder Cytochrom-c-Oxidase.^[40] Die bezüglich O_2 kompetitive Bindung von NO an die Cytochrom-c-Oxidase resultiert in einer Hemmung der mitochondrialen Atmungskette; dies ist eine zentrale toxische Wirkung von NO im Rahmen inflammatorischer und ischämischer Prozesse.^[41, 42] Die Entdeckung einer mitochondrialen NOS^[43] weist aber darauf hin, daß die O_2 -kompetitive Bindung von NO an die Cytochrom-c-Oxidase auch unter physiologischen Bedingungen einen Regulationsmechanismus der zellulären Atmung darstellen könnte. Darüber hinaus wurden auch Reaktionen von NO mit zink- und kupferhaltigen Proteinen beschrieben.^[44–46]

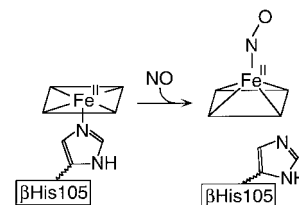
Die Bindung von NO an Proteine, die Eisen-Schwefel-Cluster enthalten, führt zur Bildung von Eisen-Nitrosylkomplexen.^[47, 48] So haben neuere Untersuchungen gezeigt, daß

NO die cytosolische Aconitase durch die Bildung eines reversiblen Eisen-Nitrosylkomplexes inaktiviert und in ein RNA-bindendes Eisenregulationsprotein (IRP) überführt.

IRP moduliert die Translation von Genprodukten, die an der Regulation der Speicherung oder Freisetzung von Eisen beteiligt sind.^[49] Somit hat NO wahrscheinlich eine zentrale Rolle bei der Regulation des zellulären Eisenstoffwechsels (Gegenregulation bei Eisendefizienz).

2.1.6. Aktivierung der löslichen Guanylyl-Cyclase

Die meisten physiologischen Wirkungen von NO beruhen auf einer bis zu 200fachen Aktivierung der sGC.^[50–52] In Gegenwart von Mg^{2+} - oder Mn^{2+} -Ionen katalysiert die sGC die Cyclisierung von Guanosin-5'-triphosphat (GTP) zu cyclischem Guanosin-3',5'-monophosphat (cGMP), das als intrazelluläres Signalmolekül die Aktivität verschiedener Proteinkinasen und Phosphodiesterasen sowie die Öffnung von Ionenkanälen beeinflusst und so eine Zellantwort auslöst. Die sGC ist ein Heterodimer aus einer α - und einer β -Untereinheit. Die N-terminalen Hälften beider Untereinheiten sind nicht an der katalytischen Grundaktivität beteiligt, werden aber für die NO-Aktivierung benötigt. NO bindet an die Hämgruppe in der N-terminalen Hälfte der β -Untereinheit. Spektralphotometrische Untersuchungen zeigten, daß in Abwesenheit von exogenen Häm-liganden das Häm-Eisen als fünffach koordinierter Fe^{II} -High-spin-Komplex vorliegt. Das Spektrum dieses Komplexes enthält eine Soret-Bande bei 431 nm und einen breiten α/β -Peak bei 555 nm,^[53] der charakteristisch für Histidin als proximalen Liganden ist. Durch Punktmutation wurde gezeigt, daß der Austausch von His105 in der β -Untereinheit gegen Serin zu einem vollständigen Verlust der Aktivierbarkeit des Enzyms durch NO führt.^[54, 55] Durch die Bindung von NO an das Häm-Eisen wird die Eisen-Histidin-Bindung gelöst, so daß wiederum ein fünffach koordinierter Komplex gebildet wird (Schema 1).^[56, 57] Man nimmt an, daß die Dissoziation des proximalen Liganden zur Aktivierung des Enzyms führt. Diese Hypothese



Schema 1. Bindung von NO an die lösliche Guanylyl-Cyclase. βHis105 = His105 der β -Untereinheit.

wird durch zahlreiche experimentelle Befunde unterstützt. So kann sGC durch PPIX und durch $\text{Fe}^{\text{II}}\text{PPIX}(\text{NO})$ aktiviert werden,^[58] wohingegen das Enzym durch CO nur in einem sehr geringen Ausmaß aktiviert wird. CO bindet zwar an das Häm-Eisen, bewirkt aber keine Dissoziation des proximalen Histidin-Liganden.^[59] $\text{Mn}^{\text{II}}\text{PPIX}$ -substituierte sGC, in der die Bindung zum proximalen Liganden intakt bleibt, wird durch NO nicht aktiviert,^[60] während $\text{Co}^{\text{II}}\text{PPIX}$ -substituierte sGC, in der das Metallzentrum fünffach koordiniert vorliegt, durch NO stimuliert wird.^[60] Diese Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit Daten, die mit Metalloporphyrinen erhalten wurden: $\text{Mn}^{\text{II}}\text{PPIX}(\text{NO})$ ist isoelektronisch mit $\text{Fe}^{\text{II}}\text{PPIX}(\text{CO})$ und kann – im Gegensatz zu $\text{Co}^{\text{II}}\text{PPIX}(\text{NO})$ – einen sechsten Liganden binden.^[60]

Überraschenderweise bindet sGC im Unterschied zu Hämoglobin O_2 sehr schlecht; außerdem erfolgt die Dissoziation von NO im Vergleich mit Hämoglobin und Myoglobin ungewöhnlich schnell: NO dissoziiert mit einer Geschwindigkeitskonstante k_{obs} von $6-8 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ (Myoglobin: $k_{\text{obs}} = 10^{-4} \text{ s}^{-1}$; jeweils bei 20°C).^[61] Eine noch höhere Dissoziationsgeschwindigkeit wurde in Gegenwart des Substrates Mg·GTP gemessen ($k_{\text{obs}} = 0.04 \text{ s}^{-1}$). Dies entspricht einer Halbwertszeit für die NO-Dissoziation von ca. 5 s bei 37°C .^[62] An dieser äußerst schnellen Dissoziation könnte der negative *trans*-Effekt des proximalen Histidins beteiligt sein. In fünffach koordinierten Eisen-Nitrosylkomplexen ist das Eisenzentrum um 0.14 \AA aus der Porphyrinebene verschoben, wohingegen in sechsfach koordinierten Komplexen diese Verschiebung etwa halb so groß und das NO-Molekül gegenüber der Porphyrinebene herausgehoben ist.^[61] Der Häm-Ligand Imidazol erhöht die NO-Dissoziation ungefähr 1000fach, allerdings ohne Bildung nennenswerter Mengen des sechsfach koordinierten Komplexes. Möglicherweise bewirken bereits geringe Gleichgewichtskonzentrationen eines sechsfach koordinierten Intermediates eine Beschleunigung der NO-Dissoziation.^[61] Zusammenfassend weisen diese Daten auf eine außergewöhnliche Protein-Umgebung der Hämgruppe in der sGC hin, die wahrscheinlich erst nach Aufklärung der Kristallstruktur des Proteins genau bestimmt werden kann.

Abschließend muß aber auch erwähnt werden, daß die Dissoziationsgeschwindigkeiten in Gegenwart von hohen Konzentrationen an NO-Radikalfängern (OxyHb oder Dithionit) gemessen wurden und somit die maximal erreichbaren Geschwindigkeiten darstellen.^[61, 62] Die Geschwindigkeit der Abnahme der Konzentration an freiem NO ist daher für die Beendigung des NO-Signals unter physiologischen Bedingungen von entscheidender Bedeutung. Eine schnelle Dissoziation von NO könnte aber auch die Folge einer Oxidation des Häm-Eisens sein.^[63] Auf diesem Mechanismus beruht die Wirkung des selektiven sGC-Inhibitors 1*H*-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-*a*]chinoxalin-1-on (ODQ).^[64] Bisher gibt es aber noch keinen Hinweis darauf, daß die Häm-Oxidation als gezielter Mechanismus der sGC-Desaktivierung unter physiologischen Bedingungen genutzt wird.

2.2. Peroxynitrit, Nitrierung und Krankheiten

Unter pathophysiologischen Bedingungen findet man oft nitrierte Tyrosinreste in den betroffenen Geweben. Durch In-vitro-Studien zur Tyrosin-Nitrierung verschiedener Proteine wurde gezeigt, daß die Nitrierung einen beträchtlichen Einfluß auf die Funktion von Enzymen und anderen Proteinen haben kann. Es wird daher angenommen, daß die Nitrierung eine kausale Rolle bei pathophysiologischen Gewebe-Dysfunktionen spielt. Die Nitrierung wird der Reaktion von freiem oder proteingebundenem Tyrosin mit Peroxynitrit zugeschrieben. Die folgenden Abschnitte werden aber zeigen, daß die Chemie von Peroxynitrit außergewöhnlich komplex ist und dementsprechend die kausalen Verknüpfungen von Peroxynitrit mit pathophysiologischen Prozessen Gegenstand zahlloser lebhafter Diskussionen sind. Es sei nochmals auf Tabelle 1 (Abschnitt 2.1.2) verwiesen, in der die Reaktions-

konstanten ausgewählter Reaktionen von Peroxynitrit aufgelistet sind.

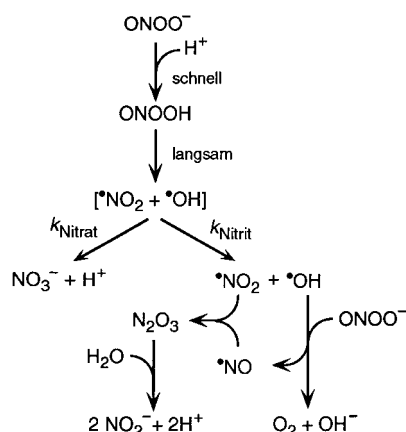
2.2.1. Zerfall von Peroxynitrit in wäßrigem Milieu

In alkalischem Milieu ist Peroxynitrit stabil; bei pH 13 und 4°C kann es wochenlang gelagert werden. Diese Stabilität wird der *cis*-Konfiguration zugeschrieben.^[65] Basierend auf Ab-initio-Rechnungen wurde postuliert, daß eine Energiebarriere von $21-24 \text{ kcal mol}^{-1}$ die Isomerisierung vom *cis*-Anion zum *trans*-Anion verhindert.^[66] Wegen einer viel niedrigeren Energiebarriere von $10-12 \text{ kcal mol}^{-1}$ ist hingegen die Isomerisierung der protonierten Form (Peroxosalpetrige Säure) in die *trans*-Konfiguration sehr wohl möglich.^[65]

Spektroskopische Untersuchungen mit der Stopped-flow-Technik und Pulsradiolyse-Studien haben gezeigt, daß der Zerfall von Peroxynitrit erster (oder niedrigerer) Ordnung ist (pH 1–11) und daß Peroxynitrit bei 37°C einen pK_a -Wert von 6.8 hat.^[19] Der Zerfall wurde auch in Gegenwart des $\cdot\text{OH}$ -Radikalfängers 2,2'-Azinobis-(3-ethyl-1,2-dihydroxybenzothiazolin-6-sulfonat) (ABTS) untersucht. Aus der durch Peroxynitrit vermittelten pH-abhängigen Bildung von ABTS \cdot^+ -Radikalen wurde ein pK_a -Wert von 8.0 errechnet.^[67] Die beiden unterschiedlichen pK_a -Werte wurden den beiden Konfigurationsisomeren, der *cis*- und der *trans*-Form von Peroxynitrit, zugeschrieben.

Der genaue Zerfallsmechanismus von Peroxynitrit ist aber noch immer unklar.^[68] In saurem Milieu isomerisiert die Peroxosalpetrige Säure zu NO_3^- .^[19, 69] Der Mechanismus dieser Isomerisierung war und ist Gegenstand vieler Untersuchungen. Es wurden unterschiedliche Intermediate postuliert, zum Beispiel ein energetisch angeregter Übergangszustand der Peroxosalpetrigen Säure (ONOOH^*) oder ein Biradikal, das aus $\cdot\text{NO}_2^-$ und $\cdot\text{OH}$ -Radikalen in einem Lösungsmittelkäfig besteht. Es ist aber völlig unklar, ob tatsächlich ein aktiviertes Intermediat gebildet wird oder die Isomerisierung auf der homolytischen Spaltung Peroxosalpetriger Säure zu $\cdot\text{NO}_2^-$ und $\cdot\text{OH}$ -Radikalen und der Rekombination dieser Radikale beruht.^[70, 71]

Außer NO_3^- werden aber bei neutralem oder alkalischem pH-Wert auch O_2 und NO_2^- im Verhältnis von 2:1 gebildet.^[72] Die beiden Reaktionswege, die zur Bildung von NO_2^- und NO_3^- führen, weisen unterschiedliche Temperaturabhängigkeiten auf, wobei die Differenz der freien Aktivierungsenergien ca. 26 kJ mol^{-1} beträgt. Der Mechanismus der Bildung von O_2 und NO_2^- ist unklar. Eine direkte bimolekulare Reaktion zwischen dem Peroxynitrit-Anion und der Peroxosalpetrigen Säure kann aber als geschwindigkeitsbestimmender Schritt ausgeschlossen werden, da die Zerfallskinetik nicht zweiter Ordnung in bezug auf Peroxynitrit ist^[73] und das Verhältnis an gebildetem NO_2^- und NO_3^- unabhängig von der initialen Peroxynitrit-Konzentration ist.^[72] Schema 2 zeigt hypothetische Reaktionen, die zur Bildung von NO_2^- und NO_3^- aus Peroxynitrit führen könnten. Diesem Schema entsprechend rekombinieren in einem Lösungsmittelkäfig festgehaltene $\cdot\text{NO}_2^-$ und $\cdot\text{OH}$ -Radikale zu NO_3^- . Bei alkalischem pH-Wert würden $\cdot\text{OH}$ -Radikale aber bevorzugt mit Peroxynitrit-Anionen reagieren, wobei O_2 , NO und OH^- entstehen. In weiterer Folge könnte NO mit $\cdot\text{NO}_2^-$ -Radikalen



Schema 2. Zerfall von Peroxynitrit.

zu N_2O_3 und letztendlich zu NO_2^- reagieren. Die dabei gebildeten Intermediate könnten ebenso wie Peroxynitrit selbst wichtige biologische Wirkungen haben.

2.2.2. Reaktion mit CO_2

Das Peroxynitrit-Anion reagiert mit CO_2 zum Addukt Nitrosoperoxy碳酸 (ONO₂CO₂⁻; $k = 3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ bei pH 7.4 und 37 °C), das in Abwesenheit anderer Reaktanten zu NO₃⁻ und CO₂ zerfällt [Gl. (12) und (13)].^[74, 75] Wegen der

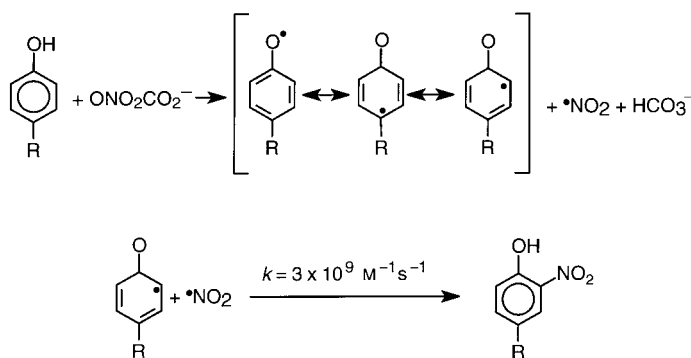


relativ hohen Reaktionsgeschwindigkeit und der hohen CO₂-Konzentration in biologischen Systemen (1–25 mM) könnte diese Reaktion der wesentliche Zerfallsweg von Peroxynitrit in vivo sein. Peroxynitrit und ONO₂CO₂⁻ haben unterschiedliche chemische Eigenschaften.^[75] So sind zum Beispiel in Anwesenheit von CO₂ die Ausbeuten an 3-Nitrotyrosin zwei- bis vierfach höher,^[76–78] wohingegen die Thiol-Oxidation sehr stark vermindert ist.^[76]

Der Mechanismus des Zerfalls von ONO₂CO₂⁻ wurde bisher noch nicht ausführlich untersucht. Es wird aber angenommen, daß die Homolyse der schwachen O-O-Bindung eine zentrale Rolle spielt und zur Bildung von •CO₃⁻- und •NO₂-Radikalen führt. Die Rekombination dieser beiden Radikale würde dann zur Bildung der stabilen Endprodukte NO₃⁻ und CO₂ führen [Gl. (14) und (15)].^[79] Dieser Reak-



tionsmechanismus würde auch die katalytische Wirkung von CO₂ auf die Peroxynitrit-vermittelte Tyrosin-Nitrierung gemäß folgender hypothetischer Reaktionsschritte erklären: Das •CO₃⁻-Radikal könnte durch eine Einelektronen-Oxidation des Phenolrings Phenylradikale liefern, die in einer Radikal-Radikal-Reaktion mit den intermediär gebildeten •NO₂-Radikalen zu stabilen Nitrophenolen reagieren könnten (Schema 3).^[79]



Schema 3. Tyrosin-Nitrierung durch Peroxynitrit/CO₂.

2.2.3. Reaktion mit Thiolen

Eine physiologisch sehr wichtige Reaktion von Peroxynitrit ist sicherlich die Oxidation von proteingebundenen und freien niedermolekularen Thiolen, vor allem Glutathion und Cystein.^[80] Obwohl diese Reaktion bei 37 °C und physiologischem pH-Wert nicht besonders schnell verläuft, ist sie wegen der hohen intrazellulären Konzentrationen an Thiolen (1–10 mM) von großer Bedeutung. Peroxynitrit kann in Ein- oder Zweielektronen-Oxidationen mit Thiolen reagieren, wobei als stabile Endprodukte hauptsächlich die entsprechenden Disulfide gebildet werden (> 90 %).^[19, 80] Zu einem sehr geringen Anteil (1 %) entstehen auch S-Nitrosothiole.^[81, 82] vermutlich über einen direkten nucleophilen Angriff.^[83] Da S-Nitrosothiole in einer Cu⁺-katalysierten Reaktion NO freisetzen,^[28] ist die S-Nitrosierung von Thiolen für die NO-ähnlichen Wirkungen von Peroxynitrit verantwortlich, zum Beispiel für die Aktivierung der sGC,^[81] die vasorelaxierende Wirkung^[84] sowie die Inhibition der Plättchenaggregation und der Leukocytenadhäsion.^[82]

Eine ähnliche Reaktion ist die Oxidation selenhaltiger Verbindungen wie die Oxidation der Glutathion-Peroxidase und der synthetischen Selenoverbindung Ebselen.^[85, 86] Es wurde gezeigt, daß sowohl die Glutathion-Peroxidase als auch Ebselen Peroxynitrit zu NO₂⁻ reduzieren, wobei Selenoxid entsteht, das durch Thiole wieder reduziert werden kann. Daher wird selenhaltigen Verbindungen eine wichtige Rolle bei der zellulären Detoxikation von Peroxynitrit zugeschrieben.

2.2.4. Tyrosin-Nitrierung und Krankheiten

Bei zahlreichen Erkrankungen wie neurodegenerativen Erkrankungen,^[87, 88] akutem Lungenversagen,^[89] Atherosklerose,^[90, 91] bakteriellen und viralen Infektionen^[92, 93] sowie chronischen Entzündungen^[94] wurden stark erhöhte Gewebespiegel an 3-Nitrotyrosin nachgewiesen. Die Nitrierung von Tyrosinresten scheint demnach eine wesentliche pathophysiologische Proteinmodifikation bei inflammatorischen Prozessen mit erhöhter Expression und/oder Aktivität von NOS zu sein.^[69, 95] Bei diesen Krankheiten ist oft der Plasmaspiegel an Cytokinen und Endotoxin erhöht, wodurch in zahlreichen Geweben die Expression induzierbarer NOS ausgelöst wird. Somit ist die Zelle über einen relativ langen Zeitraum erhöhten NO-Konzentrationen ausgesetzt.^[96]

Da die Funktion verschiedener Proteine durch die Tyrosin-Nitrierung verändert wird, könnte diese Modifikation eine wichtige Rolle bei der Pathogenese von bestimmten Krankheiten spielen.^[69, 97] Die Nitrierung von kardialen Aktin führt zu einer Veränderung der Kontraktilität des Herzens bei der Myokarditis,^[98] die Nitrierung des Neurofilamentes L interferiert mit dessen Polymerisierung bei der amyotrophischen Lateralsklerose,^[69] und nitriertes Oberflächenprotein A kann weder Lipide aggregieren noch Mannose binden, zwei Funktionen, die für die Bildung einer intakten Monoschicht der Luft-Wasser-Grenzfläche in der Lunge unerlässlich sind.^[89, 99] Durch die Nitrierung von Tyrosinresten kann aber auch die Funktion von Enzymen beeinträchtigt werden, z.B. die der Mn-haltigen Superoxid-Dismutase^[100, 101] oder der Glutaminsynthetase.^[102, 103] Signaltransduktionswege, die auf einer reversiblen Tyrosin-Phosphorylierung beruhen, werden ebenfalls gestört.^[104–106] In Säugetieren sind etwa 140 Proteine bekannt, deren Aktivität von Tyrosinresten abhängig ist.^[107] Man nimmt an, daß Peroxynitrit, das Produkt der Reaktion von NO mit Superoxid, für diese Phänomene ursächlich ist. Um für die Diskussion dieser Annahme eine Grundlage zu haben, müssen zunächst die chemischen Reaktionen von Peroxynitrit betrachtet werden.

2.2.5. Wie entsteht Nitrotyrosin?

In vitro entsteht 3-Nitrotyrosin bei der Reaktion von Tyrosin mit verschiedenen höheren Stickstoffoxiden (NO_x) wie Peroxynitrit, NO_2 , Salpetriger Säure (HNO_2), Nitronium-Ionen (NO_2^+) und Nitrylchlorid (NO_2Cl).^[97] NO selbst kann Tyrosin nicht direkt^[69, 97] sondern nur in Gegenwart von Oxidantien nitrieren, die Tyrosyl-Radikale bilden. NO reagiert mit Tyrosyl-Radikalen (Tyr^\bullet) in einer Reaktion zweiter Ordnung ($k > 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$),^[108] wobei C-Nitroso- und/oder O-Nitrosotyrosin-Additionsprodukte gebildet werden, die durch Zweielektronen-Oxidationen zu Nitrotyrosin umgewandelt werden können.^[109, 110] Das Autoxidationsprodukt von NO, NO_2 , kann in vitro ebenfalls Tyrosin nitrieren.^[111] Da die Autoxidation aber eine Reaktion dritter Ordnung ist,^[7] wird bei mikromolaren Konzentrationen von NO wahrscheinlich nicht genügend NO_2 gebildet, um die beobachtete Tyrosin-Nitrierung in Zellen erklären zu können. Die NO_2 -vermittelte Nitrierung wird außerdem durch zelluläre Bestandteile wie Ascorbat oder Glutathion gehemmt.^[111] Kürzlich wurde aber gezeigt, daß die Reaktion zwischen NO und O_2 in der hydrophoben Umgebung biologischer Membranen ca. 300fach schneller ist als in wäßrigem Milieu, so daß Membranen wichtige zelluläre Kompartimente für die Bildung höherer Stickoxide sein könnten.^[112] Im sauren pH-Bereich ($\text{pH} < 2$) entsteht durch Protonierung des stabilen Endproduktes der NO-Autoxidation (NO_2^-) Salpetrige Säure, die im sauren Milieu des Magens an der Tyrosin-Nitrierung beteiligt sein könnte.^[113] In allen anderen Geweben sinkt der pH-Wert allerdings nicht stark genug ab, so daß dort die NO_2^- -vermittelte Nitrierung wahrscheinlich vernachlässigbar ist.

Peroxynitrit wird weitgehend als das reaktivste höhere Stickoxid angesehen, das bei inflammatorischen und infektiösen Prozessen eine wichtige pathophysiologische Rolle spielt.^[97] Die durch synthetisches Peroxynitrit ausgelöste

Tyrosin-Nitrierung wurde in den letzten Jahren in vitro ausführlich untersucht.^[97, 114, 115] Die physiologische Relevanz dieser Versuche wurde allerdings immer wieder in Frage gestellt.^[116, 117] Kürzlich wurden Systeme entwickelt, die eine kontinuierliche Bildung von Peroxynitrit aus NO und O_2^- und damit eine bessere Annäherung an die physiologischen Bedingungen ermöglichen. Überraschenderweise stellte sich heraus, daß NO/O_2^- -bildende Systeme im Gegensatz zu authentischem Peroxynitrit keine nennenswerte Nitrierung von Tyrosin bewirken.^[117] Diese Ergebnisse werfen natürlich die Frage nach dem tatsächlichen Mechanismus der Tyrosin-Nitrierung in vivo auf.

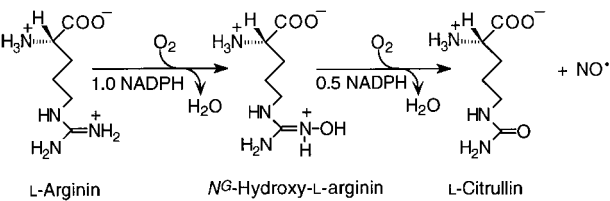
Als alternative Mechanismen wurden von Myeloperoxidase katalysierte Nitrierungsreaktionen beschrieben. Myeloperoxidase, die von Monocyten und neutrophilen Granulocyten im Rahmen inflammatorischer Prozesse sezerniert wird, kann Tyrosyl-Radikale generieren,^[118] die mit NO reagieren und in Gegenwart von Oxidantien (z.B. H_2O_2) Nitrotyrosin bilden.^[110] Dieser Mechanismus könnte für die Tyrosin-Nitrierung in atherosklerotischen Blutgefäßen verantwortlich sein.^[91, 119] In Gegenwart von H_2O_2 kann Myeloperoxidase die Nitrierung auch über einen alternativen Reaktionsweg katalysieren. So wurde gezeigt, daß NO_2^- auch als Substrat der Myeloperoxidase fungieren kann, wobei intermediär NO_2 als nitrierende Spezies gebildet wird.^[120] Schließlich kann das Reaktionsprodukt der Myeloperoxidase, Hypochlorige Säure (HOCl), auch direkt mit NO_2^- reagieren, wobei ebenfalls eine stark nitrierende Verbindung, wahrscheinlich Nitrylchlorid entsteht.^[121, 122] Diese Befunde weisen darauf hin, daß Myeloperoxidase in vivo eine wesentliche Rolle bei der Tyrosin-Nitrierung spielt, schließen aber zusätzliche Reaktionswege der Nitrierung bei inflammatorischen Prozessen mit erhöhter NO-Produktion nicht aus. Auf jeden Fall wird die Aufklärung des Mechanismus und der pathophysiologischen Bedeutung der Tyrosin-Nitrierung die Wissenschaftler noch einige Zeit beschäftigen.

2.2.6. Andere schädliche Wirkungen von Peroxynitrit

Neben der Tyrosin-Nitrierung werden Peroxynitrit noch andere schädliche Wirkungen zugeschrieben. Wegen seines hohen Oxidationspotentials kann Peroxynitrit Strangbrüche in DNA-Molekülen verursachen, wodurch das im Zellkern befindliche Enzym Poly(ADP-Ribose)-Synthetase (PARS) (EC 2.4.2.30) aktiviert werden kann.^[123] Dadurch kommt es zur Depletion des intrazellulären Pools an reduziertem Nicotinamidadenindinucleotid (NADH) und in weiterer Folge zur Depletion von ATP und damit zu einem Zusammenbruch des Energiehaushaltes, der letztendlich zum Zelltod führt. Kürzlich wurde postuliert, daß die durch Peroxynitrit vermittelte Aktivierung von PARS bei der Pathogenese des septischen Schocks, bei der Zerstörung der Inselzellen des Pankreas durch Infektionen sowie bei ischämischen Prozessen im zentralen Nervensystem eine wichtige Rolle spielt. Ein weiterer möglicher Mechanismus der Cytotoxizität von Peroxynitrit beruht auf der Oxidation von Hämoproteinen.^[48]

3. Enzymologie von NO-Synthasen

Die Reaktion, die zur Biosynthese von NO in Säugetieren führt, ist in Schema 4 dargestellt. Diese Reaktion wird von drei NOS-Isoformen katalysiert, die in Tabelle 2 aufgeführt



Schema 4. Die NO-Synthase-Reaktion.

sind. Die drei Isoenzyme haben ähnliche Strukturen und Funktionen, unterscheiden sich aber in ihren Regulationsmechanismen.

Neuronale NOS wird in postsynaptischen Endigungen zentraler Neuronen exprimiert und durch einströmendes Ca^{2+} aktiviert. Die Erhöhung der intraneuronalen Ca^{2+} -Konzentration wird durch die Bindung des Neurotransmitters Glutamat an spezifische Membranrezeptoren ausgelöst. Das so gebildete NO ist wahrscheinlich maßgeblich an der Langzeitpotenzierung (LTP) synaptischer Verbindungen beteiligt, einem Phänomen, das eine wesentliche Rolle bei Gedächtnisleistung und Lernprozessen spielt. In peripheren Nervenendigungen wird nNOS präsynaptisch exprimiert und wie im Gehirn durch in die Zelle einströmendes Ca^{2+} aktiviert. Der Ca^{2+} -Einstrom beruht hier aber auf der Aktivierung spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle durch Depolarisation der Nervenzelle. Das in solchen nitrergen Neuronen gebildete NO diffundiert als Neurotransmitter in postsynaptische Zielzellen des angrenzenden Erfolgsorgans (z.B. Blutgefäße, Magen-Darm-Trakt, Corpus cavernosum des Penis) und bewirkt dort über die Aktivierung der sGC eine cGMP-vermittelte Relaxation der glatten Muskulatur.

Die endotheliale NOS wird vor allem in Endothelzellen exprimiert. Das dort gebildete NO diffundiert in die angrenzende Gefäßmuskulatur und bewirkt als „endothelium-derived relaxing factor“ (EDRF) eine cGMP-vermittelte Relaxation. Dies war übrigens die erste Signalfunktion von NO, die entdeckt wurde.^[124–126]

Die induzierbare NOS wird von Makrophagen exprimiert, die durch inflammatorische Cytokine oder andere Stimuli aktiviert wurden. Hier leistet das gebildete NO einen wesentlichen Beitrag zur Inaktivierung von Pathogenen.

Diese kurze Zusammenfassung des Vorkommens und der Funktionen der verschiedenen NO-Synthasen soll nur eine grobe Orientierungshilfe sein. Abschließend wird aber auch noch darauf hingewiesen, daß eNOS auch in Endothelzellen cerebraler Blutgefäße exprimiert wird und angrenzende Neuronen beeinflussen kann. eNOS wurde auch innerhalb von Neuronen^[127] und in Kardiomyocyten^[128] nachgewiesen. Die Expression von iNOS kann auch in glatten Muskeln,^[129, 130] im Herzmuskel,^[131, 132] in der Leber^[133], in Gliazellen^[134] und wahrscheinlich auch in allen anderen kernhaltigen Säugetierzellen induziert werden.

3.1. Domänenstruktur

Katalytisch aktive NO-Synthasen liegen als homodimere Proteine vor. Jede Untereinheit besteht aus einer C-terminalen Reduktase-Domäne und einer N-terminalen Oxygenase-Domäne (Abbildung 1). Diese Domänen sind auch unabhängig voneinander richtig gefaltet. Es wurde gezeigt, daß die

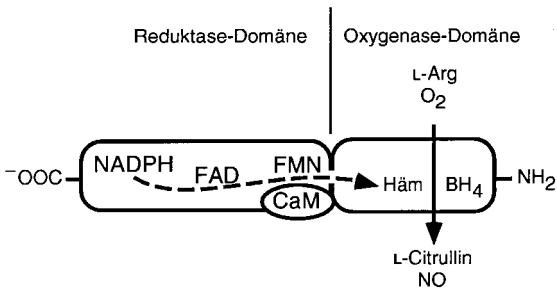


Abbildung 1. Domänen und Cofaktoren der NO-Synthase. Die gestrichelten Pfeile kennzeichnen die Richtung des Elektronenflusses. BH_4 = H_4 Biopterin.

isolierte Oxygenase-Domäne in einer homodimeren Form, die isolierte Reduktase-Domäne aber in einer monomeren Form vorliegt. Dieser Befund läßt darauf schließen, daß die Kontaktfläche für die Dimerisierung des Gesamtproteins von

Tabelle 2. Die Isoenzyme von NO-Synthase.

NOS-Isoenzyme	alternative Bezeichnung	M_r [kDa]	Eigenschaften	subzelluläre Lokalisation	Gewebe-spezifische Expression
neuronale	Typ-I, nNOS, ncNOS, bNOS	160	Ca^{2+} -abhängig, konstitutiv exprimiert	bindet über eine N-terminale PDZ-Domäne ^[237] an spezifische Membranproteine	neuronale Zellen, Skelettmuskel, Niere (Macula densa)
endotheliale	Typ-III, eNOS, ecNOS	134	Ca^{2+} -abhängig, konstitutiv exprimiert	bindet über N-terminale Myristoyl- und Palmitoylgruppen an den Golgi-Apparat und an Caveoli	Endothelzellen, Epithelzellen, Kardiomyocyten, einige Neuronen
induzierbare	Typ-II, iNOS, macNOS	130	Ca^{2+} -unabhängig, induziert durch inflammatorische Stimuli (Cytokine, LPS)	löslich?	Makrophagen, Hepatocyten, Astrocyten, glatte Muskelzellen (u.v.a.)

LPS = Lipopolysaccharide.

der Oxygenase-Domäne gebildet wird.^[135, 136] Die Reduktase-Domäne enthält je ein Molekül FAD und FMN sowie eine Bindungsstelle für NADPH.^[137] Die Oxygenase-Domäne enthält eine Hämgruppe und je eine Bindungsstelle für den Pteridin-Cofaktor H₄Biopterin und das Substrat L-Arginin. Zwischen der Reduktase- und der Oxygenase-Domäne liegt die Bindungsstelle für Calmodulin.^[137, 138] Am N-Terminus der Oxygenase-Domäne findet man in allen Isoformen ein aus mehreren Aminosäuren bestehendes Segment, das für die katalytische Aktivität der Enzyme nicht erforderlich ist, aber deren zelluläre Lokalisation bestimmt.

3.1.1. Die Reduktase-Domäne

Ebenso wie ein homologes Protein, die Cytochrom-P-450-Reduktase, hat die Reduktase-Domäne der NOS je eine Bindungsstelle für NADPH, FAD und FMN.^[137, 139] Im Unterschied zur Cytochrom-P-450-Reduktase enthalten nNOS und eNOS, nicht aber iNOS eine Insertion von ca. 45 Aminosäuren in der FMN-Bindungsregion.^[140] Die Reduktase-Domäne ist für den Transport von Elektronen von NADPH zum Häm-Eisen in der Oxygenase-Domäne verantwortlich. Dieser Elektronentransport erfordert die Bindung von Calmodulin an einer zwischen der Reduktase- und der Oxygenase-Domäne gelegenen Bindungsstelle.

3.1.2. Die Reduktase-Oxygenase-Kontaktfläche

NO-Synthasen sind die einzigen eukaryotischen Cytochrom-P-450-Enzyme, die eine Reduktase-Domäne als integralen Bestandteil des Gesamtproteins enthalten (ein NOS-ähnliches Cytochrom P-450 (BM-3) kommt allerdings in Bakterien vor).^[141, 142] Versuche, katalytisch aktive NOS aus isolierten Reduktase- und Oxygenase-Domänen zu rekonstituieren, lieferten nur unbefriedigende Ergebnisse.^[143] Untersuchungen mit EPR-^[144] und zeitaufgelöster Fluoreszenz-Spektroskopie weisen auf eine strukturelle Wechselwirkung der Häm-Gruppe mit den Flavinen der Reduktase-Domäne hin.^[145] Es liegt aber noch keine Kristallstruktur eines homodimeren NOS-Gesamtproteins vor, so daß die dreidimensionale Orientierung der beiden Domänen noch unklar ist. Viele Arbeiten zeigen aber, daß die dimere Proteinstruktur für die Reduktase-Oxygenase-Wechselwirkung entscheidend ist.^[146, 147] Interessanterweise betrug die Enzymaktivität von iNOS-Heterodimeren, in denen eine Untereinheit beide Domänen, die andere aber nur eine Oxygenase-Domäne enthielt, genau die Hälfte der Aktivität des nativen, homodimeren Enzyms.^[146] Diese Ergebnisse zeigen, daß die Reduktase-Domäne nur eine der beiden Hämgruppen des Heterodimers reduzieren konnte. Um herauszufinden, welche der beiden Hämgruppen reduziert wird, wurden zwei Konstrukte^[147] mit jeweils einer nativen und einer mutierten (Glu 371 → Ala),^[148] inaktiven Oxygenase-Domäne hergestellt (Abbildung 2). Es zeigte sich, daß nur jenes Konstrukt enzymatische Aktivität aufwies, in dem die Reduktase-Domäne an die mutierte, d. h. inaktive Oxygenase-Domäne gekoppelt war. Diese Ergebnisse legen die interessante Schlußfolgerung nahe, daß die beiden Reduktase-Domänen

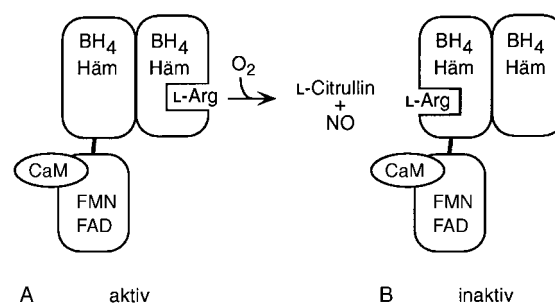


Abbildung 2. Domänen austausch („domain swapping“) in der NO-Synthase. Die heterodimere NO-Synthase ist nur dann katalytisch aktiv, wenn die aktive L-Arginin-bindende Oxygenase-Domäne und die Reduktase-Domäne auf verschiedenen Untereinheiten lokalisiert sind (A). Wenn L-Arginin nur an die Untereinheit binden kann, die die Reduktase-Domäne enthält, wird keine NOS-Aktivität festgestellt (B).

dimerer NOS jeweils das Häm der anderen Untereinheit reduzieren.

3.1.3. Die Oxygenase-Domäne

Das UV/Vis-Spektrum des CO-Komplexes von reduzierter NOS weist eine Absorptionsbande bei 446 nm auf, die charakteristisch für Cytochrom-P-450-Enzyme mit einem Thiolat-Liganden ist.^[149–151] Ähnlich wie in der Chlorperoxidase findet man auch bei der NOS noch zusätzliche Wasserstoffbrückenbindungen zum proximalen Liganden. Das ist sowohl aus Resonanz-Raman-spektroskopischen Untersuchungen^[152] als auch aus der kürzlich publizierten Kristallstruktur ersichtlich.^[153, 154] Eine gute Darstellung der Kristallstruktur des iNOS-Oxygenase-Dimers zeigt das Vortitelbild auf Seite 1824 (weitere Bilder findet man auf folgender Internet-Seite: <http://www.scripps.edu/~jat/nos.html>). Die prosthetische Hämgruppe sitzt in einer Tasche, die ähnlich wie ein linkshändiger Baseball-Handschuh geformt ist. Eine α -Helix und die Schleife, die den proximalen Cystein-Liganden enthält, bilden dabei den Daumen (gelb-grün). Die distale Seite des Häms wird von einem β -Faltblatt abgeschirmt, das die Handfläche und die Finger des Handschuhs darstellt (in den Farben Cyan in der unteren Untereinheit und in Orange in der oberen Untereinheit gezeichnet).

Der große Anteil an β -Faltblättern ist für ein Hämoprotein sehr ungewöhnlich und zeigt, daß die Möglichkeiten für Bewegungen durch das Gleiten von Sekundärstrukturelementen, das von α -helicalen Proteinen zur Substratbindung genutzt wird (z. B. bei P-450-Enzymen), stark eingeschränkt sind.^[155] Während der Arbeit an diesem Manuskript wurde die Kristallstruktur der eNOS-Oxygenase-Domäne veröffentlicht.^[156] Die Ähnlichkeiten der iNOS- und eNOS-Strukturen weisen darauf hin, daß alle drei NOS-Isoenzyme ähnlich gefaltet sind.

3.1.4. Die Rolle der Hämgruppe bei der Dimerisierung

Native NOS liegt als Homodimer vor, unter Häm-defizienten Bedingungen findet man jedoch vorwiegend NOS-Monomere.^[157, 158] Die Monomere enthalten kein Häm und können weder H₄Biopterin (siehe Abschnitt 3.2.3) noch L-Arginin

binden.^[158] Der Flavingehalt und die Cytochrom-c-Reduktase-Aktivität sind aber normal (siehe Abschnitt 3.1.1). Die Inkubation von iNOS mit Häm, H₄Bioppterin und L-Arginin führt zur Dimerisierung der Monomere,^[157] wohingegen für die Dimerisierung von nNOS eine Inkubation mit Häm ausreichend ist.^[158] In beiden Fällen konnte auch die Enzymaktivität wiederhergestellt werden.^[157, 159] Durch die Bindung von Häm wird das CD-Spektrum des Proteins (zur Bestimmung des Gehalts an Sekundärstrukturelementen)^[158] nur minimal verändert, die intrinsische Tryptophan-Fluoreszenz aber stark verringert.^[159] Ein ähnliches Phänomen wurde auch bei der Inkubation Häm-defizienter nNOS mit PPIX, Mn-PPIX und Co-PPIX beobachtet. Eine Dimerisierung wurde aber nur nach Inkubation mit Mn-PPIX festgestellt. Die Veränderung des Absorptionsspektrums nach Rekonstitution mit Mn-PPIX weist auf die essentielle Bedeutung der Bildung eines intakten Thiolat-Liganden bei der Dimerisierung hin.^[159]

3.2. Ligandenbindung und allosterische Effekte

3.2.1. Calcium und Calmodulin

nNOS und eNOS werden nur durch Ca²⁺-gebundenes Calmodulin aktiviert.^[160, 161] Im Unterschied dazu bindet iNOS auch Ca²⁺-freies Calmodulin und ist dementsprechend auch unter Ca²⁺-freien Bedingungen vollständig aktiv. Die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration ist daher kein limitierender Faktor für die iNOS-Aktivierung in vivo.^[162] Dieser Unterschied zwischen iNOS und den konstitutiv exprimierten Isoformen ist auf eine Insertion von 40 Aminosäuren, die in den FMN-Bindungsdomänen von eNOS und nNOS lokalisiert ist, und auf unterschiedliche Strukturen der Calmodulin-Bindungsstellen zurückzuführen. Synthetische Peptide, die der Insertion in der FMN-Domäne entsprechen, inhibieren NOS und verdrängen Calmodulin aus seiner Bindungsstelle.^[140] Einige andere Calmodulin-abhängige Enzyme enthalten eine flexible Schleife, die die Calmodulin-Bindungsstelle in Abwesenheit von Ca²⁺/Calmodulin besetzt und durch Calmodulin verdrängt wird. Man nimmt an, daß die Insertion in den konstitutiven NOS-Isoformen eine ähnliche Funktion hat.

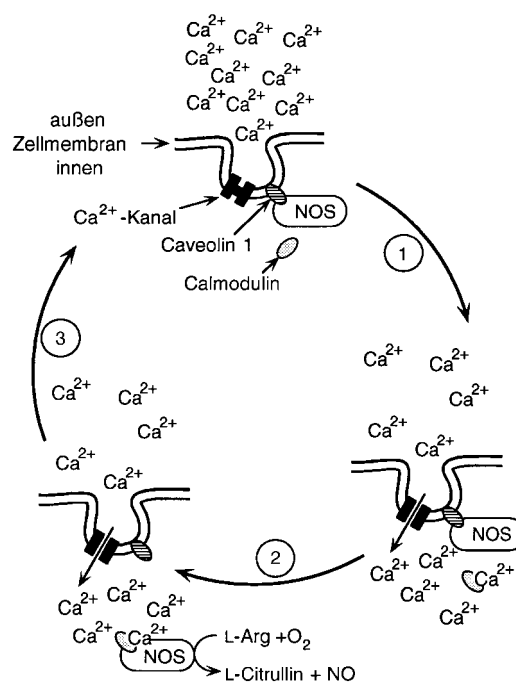
Allerdings wurde in einer anderen Studie gezeigt, daß die Ca²⁺-unabhängige Bindung von Calmodulin nicht durch das Fehlen dieser Schleife allein erklärt werden kann.^[163] Die Calmodulinbindung wurde dabei mit einer Serie von chimären Enzymen untersucht, in denen die Calmodulin-Bindungsstellen der verschiedenen Isoformen untereinander ausgetauscht wurden. Im Falle einer eNOS-Mutante, die die Calmodulin-Bindungsstelle der iNOS enthielt, war Ca²⁺ zwar nicht für die Calmodulinbindung, aber für die Aktivierung des Enzyms erforderlich. Diese Ergebnisse zeigen, daß die Sequenz der Calmodulin-Bindungsstelle die Ca²⁺-Abhängigkeit der Calmodulinbindung reguliert, wohingegen die inhibitorisch wirkende Insertion die Ca²⁺-abhängige Aktivierung reguliert.

Durch die Bindung von Calmodulin wird nicht nur der Transport von Elektronen von NADPH zu den Flavinen ermöglicht,^[164] sondern auch der weitere Transport der

Elektronen von den Flavinen zum Häm erleichtert,^[165] obwohl dieser Schritt im nativen Enzym nicht limitierend zu sein scheint.^[166] Die Reduktase-Domäne kann aber auch die Reduktion von externen Elektronenacceptoren katalysieren, z. B. von oxidiertem Cytochrom c.^[167] Auch für diese Reduktionen ist gebundenes Calmodulin erforderlich. Der genaue Mechanismus des Calmodulin-induzierten Elektronentransfers ist aber noch unbekannt.

3.2.2. Caveolin

In den letzten Jahren wurde ein weiterer wichtiger Mechanismus der NOS-Regulation entdeckt. Caveoli sind spezielle Einstülpungen der Plasmamembran, die in zahlreichen Zelltypen vorkommen.^[168] Diese Membrankompartimente werden vom Protein Caveolin organisiert, das in drei Isoformen vorkommt (Caveolin 1–3).^[169] Man nimmt an, daß Caveolin generell ein negativer Regulator der Signaltransduktion ist. Signalproteine werden in den Caveoli der Zellmembran in einer inaktiven Form gespeichert und können durch ein externes Signal aktiviert werden. In Endothelzellen ist ein Teil der eNOS in solchen Caveoli lokalisiert.^[170] Wenn man diese Zellen mit Pharmaka behandelt, die einen Ca²⁺-Einstrom bewirken, kommt es zu einer Freisetzung von eNOS aus den Caveoli ins Cytosol und gleichzeitig zu einer Aktivierung des Enzyms (Schema 5). Für die Assoziation von eNOS an die



Schema 5. Regulation von NO-Synthase durch Caveolin und Calmodulin. 1) Öffnung von Ca²⁺-Kanälen in der Membran. 2) Durch Erhöhung der Anfangskonzentration von Ca²⁺ verdrängt der Ca²⁺-Calmodulin-Komplex Caveolin aus der Bindungsstelle in NOS; eNOS dissoziiert von den Caveoli ab und wird aktiviert. 3) Nach Abklingen des Ca²⁺-Signals bindet der inaktive eNOS-Caveolin-Komplex wieder an die Caveoli.

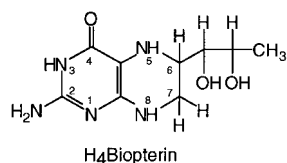
Caveoli ist eine kovalente Modifikation mit Fettsäuren am N-Terminus des Enzyms entscheidend.^[171]

Untersuchungen mit gereinigter eNOS zeigten, daß Caveolin bereits im geringen mikromolaren Konzentrationen ein

starker Inhibitor des Enzyms ist, wobei der Effekt von Caveolin durch Zugabe von Ca^{2+} /Calmodulin wieder aufgehoben werden kann.^[172] In einer weiteren Studie wurde gezeigt, daß ein synthetisches Peptid, das den Aminosäureresten 82–101 von Caveolin 1 entspricht, eNOS genauso stark hemmt wie das gesamte Protein. Das Peptid inhibierte die Cytochrom-c-Reduktase-Aktivität mit der gleichen IC_{50} ($3\text{ }\mu\text{M}$) wie die Citrullin-Bildung.^[173] Die H_2O_2 -abhängige Konversion von NOHLA zu L-Citrullin, eine Reaktion, die durch die Oxygenase-Domäne allein katalysiert werden kann, wurde aber nicht gehemmt.^[174] Darüber hinaus wurde gezeigt, daß sowohl die Reduktase- als auch die Oxygenase-Domäne an immobilisiertes Caveolin 1 binden, wobei aber die Bindung der Oxygenase-Domäne etwas schwächer ausgeprägt war. Man vermutet daher, daß die Caveolin-induzierte Hemmung der NOS auf einer Beeinträchtigung des Elektronentransfers in der Reduktase-Domäne beruht. Es ist allerdings noch unklar, ob die Bindung an die Oxygenase-Domäne, bei der anscheinend keine Inhibition eintritt, ebenfalls von funktioneller Bedeutung ist.

3.2.3. Negative Kooperativität der $\text{H}_4\text{Biopterin}$ -Bindung

Gereinigte NOS enthält gewöhnlich ein fest gebundenes Molekül $\text{H}_4\text{Biopterin}$ pro Dimer. In Gegenwart von exogenem $\text{H}_4\text{Biopterin}$ kommt es zu einer weiteren, ungefähr zweifachen Aktivierung des Enzyms, was darauf hinweist, daß es eine zweite $\text{H}_4\text{Biopterin}$ -Bindungsstelle gibt.^[175] Diese



Annahme wurde durch Untersuchungen mit $\text{H}_4\text{Biopterin}$ -freier nNOS bestätigt, die unter Pterin-defizienten Bedingungen exprimiert wurde.^[176] Bindungsstudien mit radioaktiv

markiertem $\text{H}_4\text{Biopterin}$ und L-NNA (einem L-Arginin-Analogon) zeigten deutlich, daß die $\text{H}_4\text{Biopterin}$ -Bindung in zwei Stufen erfolgt, die einen ungefähr tausendfachen Affinitätsunterschied aufweisen. Das erste Pteridinmolekül bindet mit einer Affinität im subnanomolaren Bereich, wohingegen die Bindung des zweiten Moleküls mit einer Affinität von ca. $1\text{ }\mu\text{M}$ erfolgt.

Diese negative Kooperativität der Bindung von $\text{H}_4\text{Biopterin}$ ist anscheinend das Resultat einer strukturellen Wechselwirkung der beiden Bindungsstellen. Dies wurde auch in Studien mit dem Häm-bindenden Thiol 1,4-Dithiothreitol (DTT) bestätigt.^[177] Die DTT-vermittelte Inhibierung von nNOS, die ein Äquivalent $\text{H}_4\text{Biopterin}$ pro Dimer enthält, war monophasisch und bezüglich L-Arginin kompetitiv; der K_i -Wert betrug ca. 10 mM . Im Unterschied dazu hatte die DTT-Bindung (gemessen über die Absorption des Bisthiolat-Komplexes bei 456 nm) an $\text{H}_4\text{Biopterin}$ -freie nNOS eine zusätzliche Komponente mit wesentlich höherer Affinität, die bezüglich L-Arginin nicht kompetitiv war. In Übereinstimmung mit spektroskopischen Daten wurde die NO-Bildung aus nNOS durch die $\text{H}_4\text{Biopterin}$ -enthaltende Untereinheit durch die Bindung von DTT an die zweite Untereinheit nicht beeinflusst. Demnach scheinen die beiden Hämgruppen unabhängig voneinander zu funktionieren.

3.2.4. $\text{H}_4\text{Biopterin}$, L-Arginin und der Spinzustand der Hämgruppe

Wie in anderen P-450-Enzymen kann auch das Häm-Eisenzentrum von NOS entweder in einem High-spin-Zustand (pentakoordiniert) oder in einem Low-spin-Zustand (hexakoordiniert) vorliegen.^[151, 176, 178] Im Unterschied zu den meisten anderen P-450-Enzymen, bei denen der High-spin-Zustand erst nach der Substratbindung eintritt,^[155] liegt das Häm der NOS gewöhnlich immer im High-spin-Zustand vor. Dieser Unterschied beruht vermutlich darauf, daß im Falle von NOS nicht nur das Substrat L-Arginin, sondern auch der Cofaktor $\text{H}_4\text{Biopterin}$, der fest gebunden vorliegt, an der Bildung des High-spin-Zustandes beteiligt ist.^[176] In Versuchen mit Pteridin-freier nNOS wurde gezeigt, daß der $\text{H}_4\text{Biopterin}$ -abhängige Übergang vom Low-spin- zum High-spin-Zustand nur sehr langsam erfolgt (ca. 0.1 min^{-1} bei 25°C) und mit einer Aktivierung des Enzyms korreliert. Interessanterweise wurde auch beobachtet, daß die Übergangsgeschwindigkeit vom Low-spin- in den High-spin-Zustand unabhängig von der exogenen Konzentration an L-Arginin und $\text{H}_4\text{Biopterin}$ ist. Man nimmt daher an, daß das Spin-Gleichgewicht nur sehr langsam erreicht wird und Voraussetzung für die Substrat- und Cofaktorbinding ist. Wahrscheinlich ist die Dissoziation des distalen Häm-Liganden (in Analogie zu den P-450-Enzymen vermutlich ein Wassermolekül)^[179] Voraussetzung für die Bindung von L-Arginin und $\text{H}_4\text{Biopterin}$. Ähnliche Ergebnisse erhielt man auch mit $\text{H}_4\text{Biopterin}$ -freier eNOS^[180] und iNOS.^[181]

Unerwarteterweise bleibt aber das Häm-Eisenzentrum mit gebundenem Imidazol auch in Gegenwart von $\text{H}_4\text{Biopterin}$ im Low-spin-Zustand, obwohl die Bindung des Häm-Liganden kompetitiv bezüglich L-Arginin ist.^[182] Dieses außergewöhnliche Verhalten kann aber anhand der Kristallstruktur der Oxygenase-Domäne erklärt werden, die zeigt, daß $\text{H}_4\text{Biopterin}$ an der proximalen Seite der Porphyrinebene und L-Arginin an der distalen Seite bindet (siehe Vortitelbild auf Seite 1824).^[154] Daher scheint der Verlust des distalen Liganden die L-Arginin-Bindung stärker zu beeinflussen als die $\text{H}_4\text{Biopterin}$ -Bindung. In diesem Zusammenhang sei zu erwähnen, daß auch in der Kristallstruktur der eNOS-Oxygenase-Domäne keine durch Bindung von $\text{H}_4\text{Biopterin}$ ausgelösten Konformationsunterschiede zu erkennen sind.^[156] Man nimmt daher an, daß der Einfluß von $\text{H}_4\text{Biopterin}$ auf den Spinzustand des Häm-Eisenzentrums eher auf elektrostatische als auf sterische Wechselwirkungen zurückzuführen ist.

Beide Kristallstrukturen zeigen auch, daß Wasserstoffbrückenbindungen von $\text{H}_4\text{Biopterin}$ (vom Atom N3 direkt, von O4 über ein Wassermolekül) zur Propionatgruppe am Pyrrolring A der prosthetischen Hämgruppe existieren. Die Propionatgruppe ist auch durch eine H-Brücke mit der α -Aminogruppe des Substrates L-Arginin verbunden.^[154, 156] $\text{H}_4\text{Biopterin}$ ist durch H-Brücken von O4 und N5 mit der α -Helix verbunden, die den Substratbindungskanal formt.^[154] Man nimmt daher an, daß $\text{H}_4\text{Biopterin}$ sowohl am Koordinationsverhalten der prosthetischen Hämgruppe als auch an der Bindung von L-Arginin beteiligt ist, ohne aber dabei die Konformation des Proteins entscheidend zu verändern.

3.2.5. Stabilisierung der dimeren NOS-Struktur

Eine weitere wichtige Strukturänderung, die durch die Bindung von H₄Biopterin und L-Arginin ausgelöst wird, ist die Stabilisierung der dimeren Proteinstruktur. Auf Natrium-dodecylsulfat(SDS)-Polyacrylamidgelen wandert unbehandelte nNOS entsprechend der Masse eines Monomers, während eine vorherige Inkubation mit L-Arginin und/oder H₄Biopterin zu einer Dimerisierung führt, die gegen eine Dissoziation durch SDS weitgehend beständig ist.^[180–183] Diese ungewöhnlich stark ausgeprägte Stabilisierung der Dimerkonformation beruht möglicherweise auf der großen Kontaktfläche zwischen den beiden Untereinheiten (2800 Å²)^[154] sowie auf der Wechselwirkung der H₄Biopterin-Moleküle mit der jeweils gegenüberliegenden Untereinheit. Ein weiterer Faktor, der die Stabilität des Dimers beeinflussen könnte, wurde in der eNOS-Oxygenase-Struktur entdeckt: ein Zn²⁺-Ion, das von zwei Cystein-Resten der beiden Untereinheiten koordiniert wird.^[156]

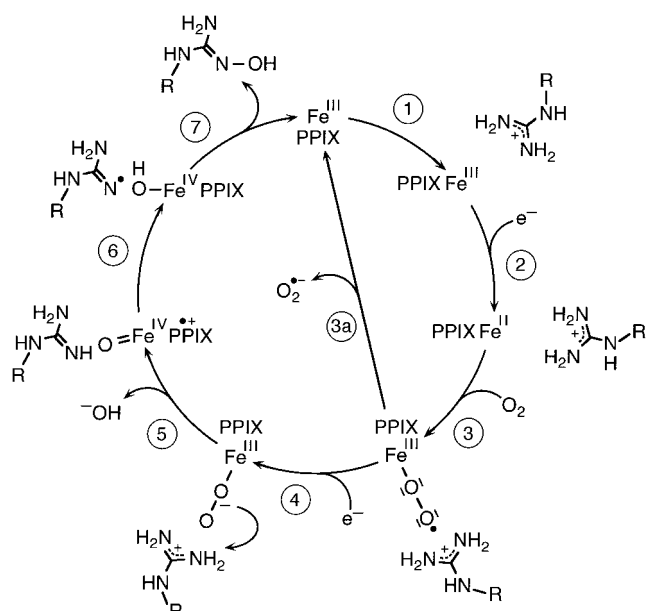
3.3. NOS-Katalyse

NO-Synthasen sind die einzigen bisher bekannten H₄Biopterin-abhängigen Häm-Eisen-Enzyme; es sind nur vier weitere Enzyme bekannt, die H₄Biopterin als Cofaktor benötigen: Phenylalanin-Monooxygenase, Tyrosin-3-Monooxygenase, Tryptophan-5-Monooxygenase und Glycerylether-Monooxygenase. H₄Biopterin ist bei diesen Enzymen an der Hydroxylierung des Substrates beteiligt und wird während der Reaktion durch die Dihydropteridin-Reduktase in die Tetrahydro-Form überführt.^[184, 185] Im Zuge der NO-Bildung findet aber keine Netto-Oxidation des Pteridin-Cofaktors statt.^[186] Außerdem bindet H₄Biopterin an der proximalen Seite des Porphyrinrings und kann daher nicht als hydroxylierender Cofaktor an der distalen Seite mitwirken.^[154]

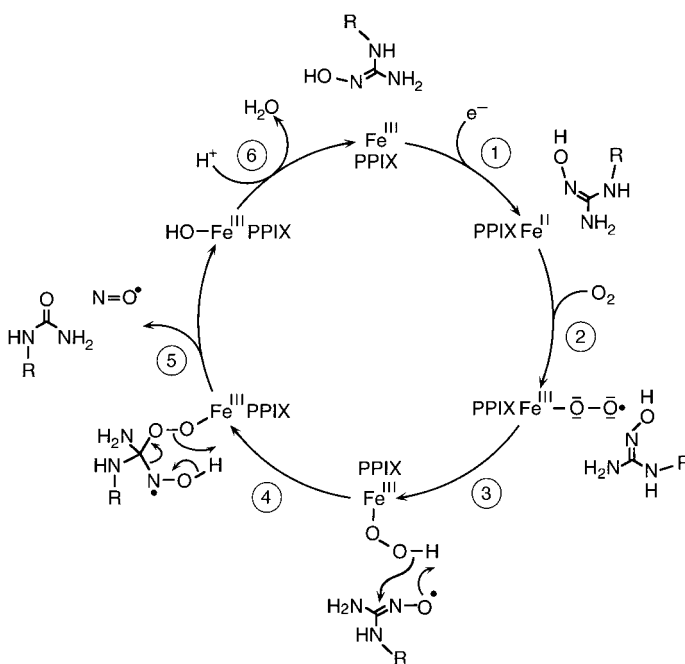
Vielfach dienen die bekannten Reaktionsmechanismen der P-450-Enzyme als Orientierungshilfe,^[187–189] da auch bei der NOS-Reaktion die Thiolat-gebundene Hämgruppe beide Reaktionsschritte katalysiert^[149, 190] und bei analogen Reaktionen der klassischen P-450-Enzyme mit Guanidinen und N-Hydroxyguanidinen ähnliche Ergebnisse erhalten wurden. Die in Schema 6 und 7 dargestellten Reaktionsmechanismen sollten aber dennoch mit Vorbehalt betrachtet werden, da auch nach jahrelangem, sorgfältigem Studium P-450-katalysierter Reaktionen entscheidende Schritte noch immer unklar sind.^[155] Obwohl bei der Untersuchung der NOS-Reaktion in den letzten Jahren große Fortschritte gemacht wurden, sind noch viele Details des Reaktionsmechanismus unklar. Dabei sollte besonders die offensichtlich einzigartige Rolle des Pteridin-Cofaktors näher betrachtet werden.

3.3.1. Welche Rolle spielt H₄Biopterin?

H₄Biopterin fungiert mit hoher Wahrscheinlichkeit als allosterischer Aktivator, der an allen drei NOS-Isoformen die Bindung von L-Arginin, die Umwandlung des Spinzustands der Hämgruppe und eine Stabilisierung der dimeren



Schema 6. Hydroxylierung von L-Arginin. Einzelheiten sind im Text erläutert.



Schema 7. Oxidation von NOHLA zu L-Citrullin und NO. Einzelheiten sind im Text erläutert.

Struktur bewirkt (siehe Abschnitte 3.2.3 und 3.2.4). Funktionell betrachtet koppelt H₄Biopterin die NADPH-Oxidation mit der NO-Synthese: H₄Biopterin-freie nNOS katalysiert auch in Anwesenheit des Substrates L-Arginin die Oxidation von NADPH und damit einhergehend die Bildung von O₂⁻ und H₂O₂. Wird das Enzym mit H₄Biopterin titriert, kommt es zu einer Abnahme der H₂O₂-Bildung, die mit einer Zunahme der Bildung von L-Citrullin einhergeht (Abbildung 3).^[176, 191] Diese Daten zeigen deutlich, daß für den korrekten Ablauf der Reaktion die Anwesenheit von H₄Bio-

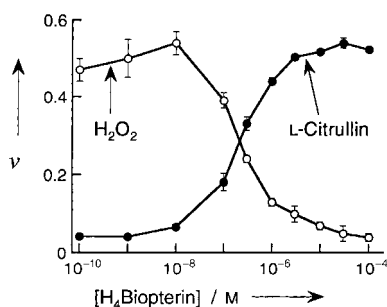
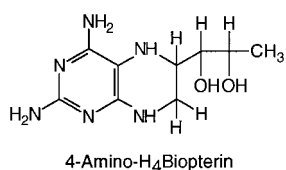


Abbildung 3. Einfluß der H_4 Biopterin-Konzentration auf gekoppelte und entkoppelte Reaktionen neuronaler NO-Synthase (mit Veränderungen aus Lit. [176] übernommen). Pteridin-freie Ratten-nNOS wurde mit H_4 Biopterin in Gegenwart von $100\ \mu\text{M}$ L-Arginin, Ca^{2+} , CaM und NADPH titriert. Die H_2O_2 -Bildung wurde photometrisch gemessen und bezüglich der CaM-unabhängigen Bildung korrigiert. Die gekoppelte NOS-Reaktion wurde anhand der Umwandlung von $[^3\text{H}]$ L-Arginin zu $[^3\text{H}]$ L-Citrullin bestimmt. Die Geschwindigkeit v der Bildung von H_2O_2 oder L-Citrullin ist in der Einheit $\mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$ angegeben.

pterin erforderlich ist. Entsprechend dem in Schema 6 dargestellten hypothetischen Mechanismus wird H_4 Biopterin für den vierten Schritt benötigt und verhindert damit die Reaktion 3a. Das derzeit vielleicht wichtigste ungeklärte Problem der NOS-Reaktion ist, ob an diesem Effekt von H_4 Biopterin eine chemische Funktion des Pteridins, z.B. als transients Elektronendonator, oder ein zusätzlicher, noch unbekannter allosterischer Effekt beteiligt ist. So könnte H_4 Biopterin die entscheidende Feinjustierung der räumlichen Positionen von L-Arginin, Häm und der Proteinkette bewirken.

Als nützliche Werkzeuge für das Studium der Funktion von H_4 Biopterin erwiesen sich synthetische Pteridine. Das oxidierte Derivat H_2 Biopterin bindet beispielsweise mit viel niedrigerer Affinität und führt auch unter Sättigungsbedingungen nicht zu einer Enzymaktivierung.^[192, 193] Daher scheint das Vorliegen der Tetrahydro-Form für die Cofaktor-Rolle



des Pteridins entscheidend zu sein. Ein anderes Analogon, das 4-Amino- H_4 Biopterin (für die Numerierung der Atome in H_4 Biopterin siehe Abschnitt 3.2.3), bindet sogar mit höherer Affinität als H_4 Biopterin und induziert die gleichen allosterischen Änderungen,^[181, 194, 195] fungiert aber auch in der Tetrahydro-Form nicht als aktiver NOS-Cofaktor, sondern inhibiert sowohl die Hydroxylierung von L-Arginin als auch den zweiten Reaktionsschritt, die Umwandlung von NOHLA zu L-Citrullin und NO. Als Erklärung für diese Befunde sind folgende Möglichkeiten in Betracht zu ziehen: 1) geringfügige Strukturänderungen; 2) die Redoxeigenschaften von 4-Amino- H_4 Biopterin sind mit der NOS-Reaktion inkompatibel; 3) die Bildung von H-Brücken zwischen dem Atom O4 des H_4 Biopterins und dem Häm-Propionat oder dem Substrat sind für die Katalyse entscheidend; 4) unterschiedliche Ladungsverteilungen am Pteridinring sind an der Feinregulation des Redoxpotentials des Häm-Eisenzentrums beteiligt.^[154]

3.3.2. Regulation der Häm-Reduktion

Die Reduktion des Häm-Eisenzentrums (der zweite Schritt in Schema 6) wird durch die Bereitstellung von Elektronen durch die Flavine (siehe Abschnitt 3.2.1) und über die Feinabstimmung des Reduktionspotentials des Häm-Eisenzentrums reguliert. Bei P-450-Enzymen ist die Bindung des Substrates der Auslöser für die Anhebung des Mittelpunktspotentials in jenen Bereich, in dem eine Reduktion möglich wird.^[196] Dadurch wird verhindert, daß zelluläre Vorräte von Reduktionsäquivalenten für die Produktion toxischer reduzierter Sauerstoff-Spezies vergeudet werden. In ähnlicher Weise erfolgt auch die Häm-Reduktion bei iNOS nach Bindung von L-Arginin und H_4 Biopterin,^[197] wohingegen das Mittelpunktspotential von nNOS auch ohne L-Arginin oder H_4 Biopterin für die Reduktion des Häm-Eisenzentrums ausreichend hoch ist und nicht mehr verändert wird.^[197] Diese Befunde könnten erklären, warum nNOS im Unterschied zu den beiden anderen Isoformen auch in Abwesenheit von L-Arginin und H_4 Biopterin eine hohe NADPH-Oxidase-Aktivität hat.

3.3.3. Sauerstoffaktivierung und Hydroxylierung von L-Arginin

Zwei Arbeitsgruppen haben unabhängig voneinander festgestellt, daß sich durch die Zugabe von Sauerstoff spektral erfaßbare Intermediate der nNOS bilden, in denen das Häm-Eisenzentrum im zweiwertigen Zustand vorliegt (Schritte 3–5 in Schema 6). Abu-Soud et al.^[198] beobachteten im Rahmen von spektroskopischen Untersuchungen mit der Stopped-flow-Technik bei 10°C die Bildung eines Komplexes mit einem Absorptionsmaximum bei 427 nm , wohingegen Bec et al.^[199] bei -30°C ein Intermediat mit einem Soret-Maximum bei 416 nm beschrieben haben. Der Grund für diese unterschiedlichen Ergebnisse ist unklar. Die meisten Eisen-(II)-Sauerstoffkomplexe von P-450-Enzymen absorbieren mit einem Maximum bei $418\text{--}420\text{ nm}$. In Stopped-flow-Experimenten wurde auch gezeigt, daß der Zerfall des 427-nm -Komplexes durch L-Arginin inhibiert, durch H_4 Biopterin aber etwa 70fach beschleunigt wird. In der Tieftemperatur-Studie wurde ein weiterer Komplex nachgewiesen, der bei 405 nm absorbierte und nur mit Dithionit-reduziertem Häm in Anwesenheit von L-Arginin und H_4 Biopterin auftrat. Nur unter genau diesen Bedingungen wurde auch eine Hydroxylierung von L-Arginin festgestellt, was die Schlußfolgerung nahelegte, daß dieser Komplex ein Intermediat des NOS-Reaktionszyklus sein könnte. Bei diesem Intermediat könnte es sich um einen Oxo-Ferrylkomplex handeln (das Produkt von Schritt 5 in Schema 6), aber es sind sicherlich noch weitere biophysikalische Untersuchungen erforderlich, um diese Hypothese zu bestätigen. Die Zufuhr von Protonen ins aktive Zentrum könnte auch für die Spaltung der Bindung zwischen den beiden Sauerstoffatomen des Oxo-Ferrylkomplexes entscheidend sein (Schritt 5 in Schema 6): Die Kristallstruktur mit gebundenem L-Arginin zeigt deutlich, daß die Guanidino-gruppe vom umgebenden Lösungsmittel stark abgeschirmt ist. Daher könnte eines der benötigten Protonen auch aus dem Substrat selbst stammen.^[154] Obwohl die Hydroxylierung

von L-Arginin ähnlich wie P-450-katalysierte Hydroxylierungsreaktionen abläuft (es wird ein Äquivalent NADPH benötigt, um ein Sauerstoffatom von molekularem Sauerstoff in das Produkt einzubauen), konnte nie gezeigt werden, daß diese Reaktion auch von klassischen P-450-Enzymen katalysiert wird.^[200, 201] Interessanterweise wurde aber die Hydroxylierung einer synthetischen Guanidinoverbindung durch P-450-Enzyme nachgewiesen (allerdings war die Reaktionsgeschwindigkeit niedrig).^[202] Zusammenfassend läßt sich sagen, daß H₄Biopterin wahrscheinlich an der Erhaltung eines für die L-Arginin-Oxidation optimalen Redoxpotentials des Häm-Sauerstoff-Intermediates beteiligt ist, wobei allerdings eine weitgehende Abweichung vom klassischen P-450-Reaktionsmechanismus nicht ausgeschlossen werden kann.

3.3.4. Von N^G-Hydroxy-L-arginin zu L-Citrullin und NO

Es sei hier nochmals darauf hingewiesen, daß auch der zweite Reaktionsschritt der NOS-Reaktion, von NOHLA zu L-Citrullin und NO (siehe Schema 7), nur in Gegenwart des Cofaktors H₄Biopterin abläuft.^[195] Die Tatsache, daß ähnliche Reaktionen aber auch nichtenzymatisch^[203, 204] oder von H₄Biopterin-unabhängigen Enzymen (jedoch nur sehr ineffizient) katalysiert werden können,^[200, 201] sollte von der Bedeutung der H₄Biopterin-katalysierten NOS-Reaktion aber nicht ablenken.

Für diesen zweiten Schritt der NOS-Reaktion werden 0.5 Reduktionsäquivalente benötigt, die wiederum von NADPH bereitgestellt werden.^[189, 205] Dies steht im Gegensatz zur Hydroxylierung von L-Arginin und P-450-katalysierten Hydroxylierungen, bei denen das Häm-Eisenzentrum mit insgesamt zwei Elektronen reduziert werden muß, damit O₂ gespalten werden kann (Schritte 4 und 5 in Schema 6). Es wurde aber auch gezeigt, daß O₂^{•−} einige N-Hydroxyguanidin-Modellverbindungen zu Harnstoff und NO oxidieren kann und daß die Bildung des Fe^{III}-O-O[•]-Komplexes durch Einelektronen-Reduktion des Häm-Eisenzentrums dem Redoxgleichgewicht zwischen O₂ und O₂^{•−} entsprechen würde.

NOHLA selbst kann das dreiwertige Eisenzentrum der NOS nicht reduzieren,^[206] so daß diese Reaktion durch eine NADPH-abhängige Reduktion des Eisens ausgelöst wird (Schritt 1 in Schema 7), gefolgt von der O₂-Bindung (Schritt 2 in Schema 7). So wurde unter anderem vorgeschlagen, daß ein Elektronentransfer von NOHLA zum Fe^{III}-O-O[•]-Komplex stattfindet, der zur Bildung von Fe^{III}-O-O[•] und dem Radikalkation NOHLA^{•+} führt.^[187, 207] Elektrochemische Experimente mit NOHLA, die eher auf die Abstraktion eines Wasserstoffatoms hindeuten (Schritt 3 in Schema 7), zeigen, daß die Bildung eines solchen Radikalkations aber sehr unwahrscheinlich ist.^[188]

3.3.5. Erkennung von L-Arginin-Analoga

Anhand der Kristallstruktur von iNOS kann man gut erkennen, daß durch die Bindung von L-Arginin spezifische Wasserstoffbrückenbindungen zwischen diesem und der Car-

boxygruppe von Glu371 gebildet werden.^[154] Diese Befunde erklären Ergebnisse einer früheren Studie, die zeigte, daß eine Mutation der Glutaminsäure 371 zu Alanin zum Verlust der L-Argininbindung führt. Modifikationen an der Guanidino-Gruppe von L-Arginin werden von der Substratbindungsstelle des Enzyms weitgehend toleriert. Für manche Derivate wurde sogar eine erhöhte Bindungsaffinität gemessen, und somit steht auch eine Reihe von inhibitorischen L-Arginin-Analoga zur Verfügung (Abbildung 4).

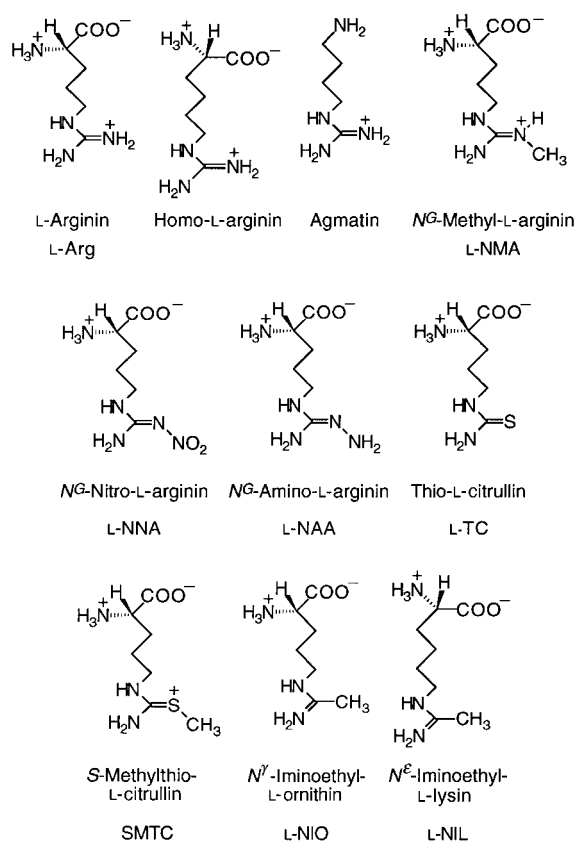


Abbildung 4. L-Arginin und einige Analoga, die bezüglich der Bindung an NOS kompetitiv zu L-Arginin sind.

Eine intakte α -Aminopentansäureeinheit scheint aber für die Bindung und Substratfunktion von L-Arginin-Analoga entscheidend zu sein. So sind neben L-Arginin auch Homo-L-arginin und Agmatin aktive NOS-Substrate, wohingegen weder Guanidin noch Hydroxyguanidin zu den entsprechenden Harnstoffderivaten umgesetzt werden.^[208–210] In ähnlicher Weise führte die Entfernung des α -Aminopentansäureteils der inhibitorischen Analoga L-NMA, L-NAA oder L-NNA zu einem vollständigen Verlust der NOS-Bindungs-kapazität der entsprechenden Guanidinverbindungen.^[208, 209] Im Gegensatz dazu führte die Umwandlung von Analoga von inhibitorischem L-Thiocitrullin (L-TC) in die entsprechenden Isothioharnstoffderivate nicht nur zu keinem Verlust, sondern sogar zu einer Erhöhung der Bindungsaffinitäten.^[211, 212] Obwohl bereits eine iNOS-Kristallstruktur mit gebundenem L-TC bestimmt wurde,^[154] wäre die Kenntnis von Strukturen im Komplex mit den entsprechenden Isothioharnstoffen erforderlich, um diese Befunde zu erklären.

Die Wirkung vieler der bisher beschriebenen NOS-Inhibitoren beruht nicht ausschließlich auf deren Konkurrenz mit dem Substrat L-Arginin. So werden zum Beispiel L-NMA,^[213, 214] L-NIL^[215] und L-NIO^[216] in Anwesenheit von NADPH und O₂ durch NOS langsam zu toxischen Metaboliten (z.B. Formaldehyd) umgesetzt und bewirken so, als sogenannte Suizidsubstrate, eine irreversible Enzymhemmung.^[210] Darüber hinaus gibt es Hemmstoffe, deren bezüglich L-Arginin kompetitive Bindung zwar die NO-Bildung, nicht aber die NADPH-abhängige reduktive O₂-Aktivierung blockiert. Zu dieser Klasse von Inhibitoren gehören L-NMA,^[213, 214, 217] L-NIL,^[213] L-NIO^[214] und Guanidin-Analoga, denen die α -Aminopentansäureeinheit fehlt.^[209, 211] Die Hemmung der NADPH-Oxidation ist wahrscheinlich in den meisten Fällen auf eine Erniedrigung des Reduktionspotentials des Häm-Eisenzen-trums durch elektrostatische Effekte der elektronenreichen N^G-Substituenten dieser Verbindungen zurückzuführen. Da aber die Bindung von L-Arginin zu einer verlangsamten Assoziation von CO an das Häm-Eisenzentrum führt,^[218] könnten die Effekte inhibitorischer L-Arginin-derivate in analoger Weise auch auf einer Behinderung der O₂-Bindung beruhen.

3.3.6. Isoenzym-spezifische Inhibitoren

Ein großes Problem bei der Entwicklung von NOS-Inhibitoren als Arzneimittel sind die vielseitigen physiologischen Funktionen von NO. Man hofft, dieses Problem durch Entwicklung von Isoform-spezifischen Inhibitoren weitgehend lösen zu können. Selektive nNOS-Inhibitoren könnten zur Begrenzung ischämischer Schäden im Gehirn eingesetzt werden: Transgene Mäuse, die keine nNOS exprimieren, sind resistenter gegenüber experimentell induzierten Schlaganfällen.^[219] Selektive iNOS-Inhibitoren würden ein sehr breites Anwendungsspektrum haben: zur Anhebung des oft letalen Blutdruckabfalls beim septischen Schock, zur Unterdrückung chronischer Entzündungskrankheiten, z.B. bei rheumatoider Arthritis, aber auch zur Unterdrückung unerwünschter Immunreaktionen nach Organtransplantationen. Im allgemeinen sollte die entsprechende Verbindung eine ca. hundertfache Isoform-Selektivität und einen IC₅₀-Wert im submikromolaren Bereich aufweisen.

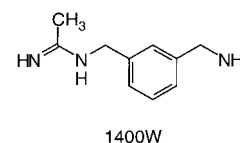
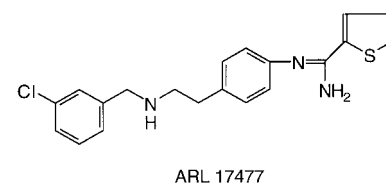
Die meisten bisher erwähnten L-Arginin-Analoga (siehe Abschnitt 2.3.5) haben nur eine relativ geringe Isoform-Selektivität. Eine Ausnahme ist L-NIL, das eine ungefähr 30fache Selektivität für iNOS aufweist^[215] und bei Mäusen bereits erfolgreich zur Behandlung von Adjuvans-induzierter Arthritis und *Leishmania*-Infektionen eingesetzt wurde.^[220, 221] Die substituierten Isothioharnstoffderivate sind ebenfalls größtenteils nichtselektiv,^[211] mit Ausnahme von S-Methylisothioharnstoff, der ca. 20fach selektiv für iNOS ist,^[222] und 1-Amino-S-methylisothioharnstoff, der in vitro nNOS-selektiv wirkt (8fach und 34fach im Vergleich zu iNOS bzw. eNOS).^[223]

7-Nitroindazol ist in vivo selektiv für nNOS, wirkt protektiv beim experimentell induzierten Schlaganfall und hat antinozizeptive Aktivität (Unterdrückung der Schmerzwahrnehmung).^[224] Trotzdem inhibiert 7-Nitroindazol die gereinigten

NOS-Isoenzyme mit ähnlicher Wirksamkeit. Die beobachtete In-vivo-Selektivität scheint daher eher auf unterschiedlichen Aufnahmegeschwindigkeiten und/oder einer unterschiedlichen Metabolisierung des Inhibitors in verschiedenen Geweben zu beruhen,^[225] könnte aber auch eine Folge des ungewöhnlichen Wirkungsmechanismus dieser Verbindung sein: Da die Bindung von 7-Nitroindazol an NOS sowohl bezüglich L-Arginin als auch bezüglich H₄Biopterin kompetitiv ist, könnte die ausgeprägte neuronale Wirkung des Inhibitors auf relativ niedrigen L-Arginin- und H₄Biopterin-Konzentrationen in Nervenzellen beruhen.

4-Amino-H₄Biopterin wirkt nicht Isoform-spezifisch (siehe Abschnitt 3.3.1).^[181, 194, 195] weist aber in einigen kultivierten Zelllinien eine Selektivität für iNOS auf.^[226] Es wurde gezeigt, daß exogen zugesetztes 4-Amino-H₄Biopterin endogen gebundenes H₄Biopterin nicht verdrängen kann.^[194] Demnach könnte 4-Amino-H₄Biopterin während der Neusynthese des iNOS-Proteins besonders wirksam sein.^[3, 195]

Der bisher selektivste nNOS-Inhibitor (ca. 100fach) ist die Verbindung ARL 17477 der Firma Astra Arcus, mit der in einem Rattenmodell der cerebralen Ischämie (Schlaganfall)



eine ausgeprägte Verringerung des Infarkt Volumens erzielt wurde.^[227] Die verwendete Dosis bewirkte eine nahezu vollständige Hemmung der kortikalen NOS-Aktivität, ohne dabei den arteriellen Blutdruck zu beeinflussen.

Der bisher selektivste iNOS-Inhibitor ist die Verbindung 1400W (N-(3-Aminomethyl)benzylacetamidin) der Firma Glaxo Wellcome.^[228] Diese Verbindung bewirkt eine schnelle, reversible Inhibierung aller drei Isoformen ($K_i \approx 2-50 \mu\text{M}$), weist aber eine zusätzliche, langsame Phase der Bindung an iNOS auf, die mit einer Bindungskonstante von nur 7 nM erfolgt. Diese langsame Phase der iNOS-Hemmung ist NADPH-abhängig und beruht daher wahrscheinlich auf einer enzymatischen Umsetzung. 1400W hat eine ca. 1000fache Selektivität für iNOS und verhindert die Endotoxin-vermittelte Erhöhung der Kapillarpermeabilität in Ratten. Eine kontinuierliche Infusion von 120 mg kg⁻¹ pro Tag wurde von den Versuchstieren zwar toleriert, eine intravenöse Bolus-injektion von 50 mg kg⁻¹ war aber letal. Wegen dieser hohen Toxizität von 1400W wurde von einer Weiterentwicklung dieser und strukturell verwandter Verbindungen abgesehen. 1400W ist jedoch ein nützliches experimentelles Werkzeug, mit dem das therapeutische Potential von iNOS-Inhibitoren in tierexperimentellen Studien besser erfaßt werden kann.

4. Zusammenfassung und Ausblick

Die wichtigsten Signalfunktionen von NO werden sicherlich durch Aktivierung der sGC und die damit einhergehende zelluläre Akkumulation von cGMP vermittelt. Die reversible Bindung von NO an die prosthetische Hämgruppe von sGC unterscheidet sich grundlegend von der irreversiblen Reaktion mit OxyHb, die zur Bildung von Methämoglobin und dem biologisch inaktiven NO-Metaboliten NO₃⁻ führt und somit als wesentlicher physiologischer Mechanismus der NO-Inaktivierung zu werten ist. Die diesen Unterschieden zugrundeliegenden molekularen Mechanismen scheinen auf Strukturunterschieden in der Umgebung der Hämgruppe zu beruhen, die aber erst nach Aufklärung der Kristallstruktur von sGC präzise erfaßt werden können.

In biologischer Umgebung wird die Reaktivität von NO durch Reaktionen mit O₂, O₂^{•-} und Thiolen entscheidend verändert. Die Reaktion mit O₂ führt zur Bildung reaktiver Intermediate, die im Unterschied zu freiem NO die Nitrosierung von Aminen und Thiolen auslösen können. Manche der entstehenden Nitrosoverbindungen, besonders S-Nitrosothiole, haben wahrscheinlich wichtige biologische Funktionen als relativ stabile Transport- oder Speicherformen von NO. Durch Reaktion von NO mit O₂^{•-} entsteht Peroxynitrit, dessen oxidative Eigenschaften wesentlich zu pathologischen Gewebeschädigungen beitragen, wie sie im Rahmen von entzündlichen und infektiösen Erkrankungen gehäuft auftreten. Die Aufklärung der pathophysiologisch relevanten Reaktionen von Peroxynitrit wird sicherlich maßgeblich zu einem besseren Verständnis der pathobiochemischen Mechanismen beitragen, die diesen Erkrankungen zugrundeliegen.

Die Biosynthese von NO wird von NO-Synthasen katalysiert, sehr komplexen, homodimeren Proteinen, die pro Untereinheit eine Thiolat-gebundene, eisenhaltige Hämgruppe als prosthetische Gruppe enthalten und nach Bindung von molekularem O₂ unter Mitwirkung des Cofaktors H₄Biopterin die Oxidation von L-Arginin zu L-Citrullin und NO katalysieren. Die benötigten Reduktionsäquivalente werden vom Cofaktor NADPH bereitgestellt und durch die FAD- und FMN-haltige Reduktase-Domäne zur prosthetischen Hämgruppe transportiert. Dieser Elektronentransport wird durch die Bindung von Calmodulin ausgelöst. Die beiden konstitutiv exprimierten neuronalen und endothelialen Isoformen binden Calmodulin nur in Gegenwart von 0.1–1 µM Ca²⁺, wohingegen die induzierbare NOS weitgehend Ca²⁺-unabhängig ist. Entscheidend für die Aufklärung des Reaktionsmechanismus der NO-Bildung scheint die Aufklärung der Funktion des Pteridin-Cofaktors H₄Biopterin zu sein, der wahrscheinlich – abgesehen von gut untersuchten allosterischen Effekten – auch eine bisher noch unbekannte Redoxfunktion hat. Es ist zu erwarten, daß diese zusätzliche Funktion von H₄Biopterin durch weitere biophysikalische und funktionelle Untersuchungen, vor allem aber auch durch Kristallstrukturanalysen spezifischer NOS-Mutanten und verschiedener NOS-Pteridin-Komplexe in naher Zukunft aufgeklärt werden wird. Schließlich sollte die Entwicklung Isoform-selektiver NOS-Inhibitoren neue Strategien in der Therapie entzündlicher und infektiöser Erkrankungen und ischämischer Prozesse ermöglichen.

5. Abkürzungen

4-Amino-H ₄ Biopterin	2,4-Diamino-5,6,7,8-tetrahydro-6-(L-erythro-1,2-dihydroxypropyl)pteridin
H ₄ Biopterin	(6R)-5,6,7,8-Tetrahydro-L-biopterin = (6R)-5,6,7,8-Tetrahydro-6-(L-erythro-1,2-dihydroxypropyl)pteridin
H ₂ Biopterin	(6R)-7,8-Dihydro-L-biopterin
CaM	Calmodulin
CD	Circulardichroismus
EPR	Elektronenspinresonanz
FAD	Flavinadeninucleotid
FMN	Flavinmononucleotid
Hb	Hämoglobin
IC ₅₀	Konzentration, die eine 50%ige Hemmung bewirkt
IRP	Eisenregulationsprotein
L-NAA	N ^G -Amino-L-arginin
L-NNA	N ^G -Nitro-L-arginin
L-NMA	N ^G -Methyl-L-arginin
L-NIL	N ^E -Iminoethyl-L-lysin
L-NIO	N ^γ -Iminoethyl-L-ornithin
L-TC	Thio-L-citrullin
SMTc	S-Methylthio-L-citrullin
NADPH	Nicotinamidadeninucleotidphosphat (reduzierte Form)
NMDA	N-Methyl-D-aspartat
NOHLA	N ^G -Hydroxy-L-arginin
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase (EC 1.14.13.39)
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
nNOS	neuronal Stickstoffmonoxid-Synthase
OxyHb	Oxyhämoglobin
PARS	Poly(ADP-Ribose)-Synthetase (EC 2.4.2.30)
PPIX	Protoporphyrin IX
sGC	lösliche Guanylyl-Cyclase (GTP-Pyrophosphat-Lyase (cyclisierend), EC 4.6.1.2)

Die Arbeiten in unserem Labor wurden vom Fonds zur Förderung der Wissenschaftlichen Forschung in Österreich unterstützt. Wir bedanken uns bei Dr. Elizabeth D. Getzoff, Prof. John A. Tainer und Michael E. Pique für die Erlaubnis, die Kristallstruktur der iNOS-Oxygenase-Domäne als Vortitelbild zu verwenden.

Eingegangen am 28. Dezember 1998 [A 318]

International Edition: *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 1714–1731

- [1] Übersichtsartikel: J. Loscalzo, G. Welch, *Prog. Cardiovasc. Dis.* **1995**, 38, 87–104.
- [2] Übersichtsartikel: M. J. Rand, C. G. Li, *Annu. Rev. Physiol.* **1995**, 57, 659–682.
- [3] Übersichtsartikel: B. Mayer, P. Andrew, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **1998**, 358, 127–133.
- [4] Übersichtsartikel: P. K. Moore, R. L. C. Handy, *Trends Pharmacol. Sci.* **1997**, 18, 204–211.
- [5] J. Garthwaite, C. L. Boulton, *Annu. Rev. Physiol.* **1995**, 57, 683–706.
- [6] J. Olbregts, *Int. J. Chem. Kinet.* **1985**, 17, 835–848.
- [7] P. C. Ford, D. A. Wink, D. M. Stanbury, *FEBS Lett.* **1993**, 326, 1–3.
- [8] V. G. Kharitonov, A. R. Sundquist, V. S. Sharma, *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 5881–5883.

- [9] R. S. Lewis, W. M. Deen, *Chem. Res. Toxicol.* **1994**, 7, 568–574.
- [10] L. J. Ignarro, J. M. Fukuto, J. M. Griscavage, N. E. Rogers, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, 90, 8103–8107.
- [11] V. L. Pogrebnyaya, A. P. Usov, A. V. Baranov, A. I. Nesterenko, P. I. Bez'yazychnyi, *J. Appl. Chem. USSR* **1975**, 48, 1004–1007.
- [12] D. A. Wink, R. W. Nims, J. F. Darbyshire, D. Christodoulou, I. Hanbauer, G. W. Cox, F. Laval, J. Laval, J. A. Cook, M. C. Krishna, W. G. Degraff, J. B. Mitchell, *Chem. Res. Toxicol.* **1994**, 7, 519–525.
- [13] S. Goldstein, G. Czapski, *Free Radical Biol. Med.* **1995**, 17, 12078–12084.
- [14] J. S. Beckman, T. W. Beckman, J. Chen, P. A. Marshall, B. A. Freeman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, 87, 1620–1624.
- [15] R. E. Huie, S. Padmaja, *Free Radical Res. Commun.* **1993**, 18, 195–199.
- [16] S. Goldstein, G. Czapski, *Free Radical Biol. Med.* **1995**, 19, 505–510.
- [17] I. Fridovich, *Annu. Rev. Biochem.* **1995**, 64, 97–112.
- [18] T. Malinski, F. Bailey, Z. G. Zhang, M. Chopp, *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **1993**, 13, 355–358.
- [19] W. A. Pryor, G. L. Squadrito, *Am. J. Physiol. L* **1995**, 12, L699–L722.
- [20] D. L. H. Williams, *Nitric Oxide* **1997**, 1, 522–527.
- [21] V. G. Kharitonov, A. R. Sundquist, V. S. Sharma, *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 28158–28164.
- [22] M. Keshive, S. Singh, J. S. Wishnok, S. R. Tannenbaum, W. M. Deen, *Chem. Res. Toxicol.* **1996**, 9, 988–993.
- [23] J. S. Stamler, O. Jaraki, J. Osborne, D. I. Simon, J. Keaney, J. Vita, D. Singel, C. R. Valeri, J. Loscalzo, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, 89, 7674–7677.
- [24] B. Gaston, J. Reilly, J. M. Drazen, J. Fackler, P. Ramdev, D. Arnette, M. E. Mullins, D. J. Sugarbaker, C. Chee, D. J. Singel, J. Loscalzo, J. S. Stamler, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, 90, 10957–10961.
- [25] R. M. Clancy, D. Levartovsky, J. Leszczynskapiziak, J. Yegudin, S. B. Abramson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, 91, 3680–3684.
- [26] K. Q. Do, B. Benz, G. Grima, U. Gutteckamsler, I. Kluge, T. E. Salt, *Neurochem. Int.* **1996**, 29, 213–224.
- [27] M. W. Radomski, D. D. Rees, A. Dutra, S. Moncada, *Br. J. Pharmacol.* **1992**, 107, 745–749.
- [28] A. C. F. Gorren, A. Schrammel, K. Schmidt, B. Mayer, *Arch. Biochem. Biophys.* **1996**, 330, 219–228.
- [29] L. Jia, C. Bonaventura, J. Bonaventura, J. S. Stamler, *Nature* **1996**, 380, 221–226.
- [30] S. Tamir, S. Burney, S. R. Tannenbaum, *Chem. Res. Toxicol.* **1996**, 9, 821–827.
- [31] R. S. Lewis, S. R. Tannenbaum, W. M. Deen, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 3933–3939.
- [32] R. S. Drago, F. E. Paulik, *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, 82, 96–98.
- [33] C. M. Maragos, D. Morley, D. A. Wink, T. M. Dunams, J. E. Saavedra, A. Hoffman, A. A. Bove, L. Isaac, J. A. Hrabie, L. K. Keefer, *J. Med. Chem.* **1991**, 34, 3242–3247.
- [34] M. P. Doyle, J. W. Hoeksta, *J. Inorg. Biochem.* **1981**, 14, 351–358.
- [35] R. F. Eich, T. Li, D. D. Lemon, D. H. Doherty, S. R. Curry, J. F. Aitken, A. J. Mathews, K. A. Johnson, R. D. Smith, G. N. J. Phillips, J. S. Olson, *Biochemistry* **1996**, 35, 6976–6983.
- [36] S. Herold, *FEBS Lett.* **1998**, 439, 85–88.
- [37] V. S. Sharma, T. G. Traylor, R. Gardiner, H. Mizukami, *Biochemistry* **1987**, 26, 33837–33843.
- [38] J. R. Lancaster, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, 91, 8137–8141.
- [39] A. R. Butler, I. L. Megson, P. G. Wright, *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, 1425, 168–176.
- [40] D. A. Wink, Y. Osawa, J. F. Darbyshire, C. R. Jones, S. C. Eshenaur, R. W. Nims, *Arch. Biochem. Biophys.* **1993**, 300, 115–123.
- [41] M. W. J. Cleeter, J. M. Cooper, V. M. Darley-Usmar, S. Moncada, A. H. V. Scapira, *FEBS Lett.* **1994**, 345, 50–54.
- [42] G. C. Brown, C. E. Cooper, *FEBS Lett.* **1994**, 356, 295–298.
- [43] A. Tatoyan, C. Giulivi, *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 11044–11048.
- [44] K. D. Kröncke, K. Fehsel, T. Schmidt, I. Dasting, J. R. Wesener, H. Bettermann, K. D. Breunig, V. Kolb-Bachofen, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1994**, 200, 1105–1110.
- [45] A. C. F. Gorren, A. de Boer, R. Wever, *Biochim. Biophys. Acta* **1987**, 916, 38–47.
- [46] C. E. Cooper, J. Torres, M. A. Sharpe, M. T. Wilson, *FEBS Lett.* **1997**, 414, 281–284.
- [47] Y. Henry, C. Ducrocq, J. C. Drapier, D. Servent, C. Pellat, A. Guissani, *Eur. Biophys. J.* **1991**, 20, 1–15.
- [48] R. Radi, *Chem. Res. Toxicol.* **1996**, 9, 828–835.
- [49] M. W. Hentze, L. C. Kuhn, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, 93, 8175–8182.
- [50] L. J. Ignarro, *Pharmacol. Toxicol.* **1990**, 67, 1–7.
- [51] A. J. Hobbs, *Trends Pharmacol. Sci.* **1997**, 18, 484–491.
- [52] D. Koesling, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **1998**, 358, 123–126.
- [53] R. Gerzer, E. Böhme, F. Hofmann, G. Schultz, *FEBS Lett.* **1981**, 132, 71–74.
- [54] B. Wedel, P. Humbert, C. Harteneck, J. Foerster, J. Malkewitz, E. Böhme, G. Schultz, D. Koesling, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, 91, 2592–2596.
- [55] Y. Zhao, J. P. Schelvis, G. T. Babcock, M. A. Marletta, *Biochemistry* **1998**, 37, 4502–4509.
- [56] J. R. Stone, R. H. Sands, W. R. Dunham, M. A. Marletta, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1995**, 207, 572–577.
- [57] A. E. Yu, S. Z. Hu, T. G. Spiro, J. N. Burstyn, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 4117–4118.
- [58] L. J. Ignarro, K. S. Wood, M. S. Wolin, *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* **1984**, 17, 267–274.
- [59] J. N. Burstyn, A. E. Yu, E. A. Dierks, B. K. Hawkins, J. H. Dawson, *Biochemistry* **1995**, 34, 5896–5903.
- [60] E. A. Dierks, S. Z. Hu, K. M. Vogel, A. E. Yu, T. G. Spiro, J. N. Burstyn, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 7316–7323.
- [61] V. G. Kharitonov, V. S. Sharma, D. Magde, D. Koesling, *Biochemistry* **1997**, 36, 6814–6818, zit. Lit.
- [62] V. G. Kharitonov, M. Russwurm, D. Magde, V. S. Sharma, D. Koesling, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1997**, 239, 284–286.
- [63] E. A. Dierks, J. N. Burstyn, *Arch. Biochem. Biophys.* **1998**, 351, 1–7.
- [64] A. Schrammel, S. Behrends, K. Schmidt, D. Koesling, B. Mayer, *Mol. Pharmacol.* **1996**, 50, 1–5.
- [65] J. H. M. Tsai, J. G. Harrison, J. C. Martin, T. P. Hamilton, M. van der Woerd, M. J. Jablonsky, J. S. Beckman, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 4115–4116.
- [66] W. H. Koppenol, J. J. Moreno, W. A. Pryor, H. Ischiropoulos, J. S. Beckman, *Chem. Res. Toxicol.* **1992**, 5, 834–842.
- [67] J. P. Crow, C. Spruell, J. Chen, C. Gunn, H. Ischiropoulos, M. Tsai, C. D. Smith, R. Radi, W. H. Koppenol, J. S. Beckman, *Free Radical Biol. Med.* **1994**, 16, 331–338.
- [68] C. E. Richeson, P. Mulder, V. W. Bowry, K. U. Ingold, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 7211–7219.
- [69] J. S. Beckman, W. H. Koppenol, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **1996**, 40, C1424–C1437.
- [70] G. Merenyi, J. Lind, *Chem. Res. Toxicol.* **1998**, 11, 243–246.
- [71] G. Merenyi, J. Lind, S. Goldstein, G. Czapski, *Chem. Res. Toxicol.* **1998**, 11, 712–713.
- [72] S. Pfeiffer, A. C. F. Gorren, K. Schmidt, E. R. Werner, B. Hansert, D. S. Bohle, B. Mayer, *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 3465–3470.
- [73] R. Kissner, T. Nauser, P. Bugnon, P. G. Lye, W. H. Koppenol, *Chem. Res. Toxicol.* **1997**, 19, 1285–1292.
- [74] S. V. Lymar, J. K. Hurst, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 8867–8868.
- [75] S. V. Lymar, J. K. Hurst, *Chem. Res. Toxicol.* **1996**, 9, 845–850.
- [76] A. Denicola, B. A. Freeman, M. Trujillo, R. Radi, *Arch. Biochem. Biophys.* **1996**, 333, 49–58.
- [77] A. Gow, D. Duran, S. R. Thom, H. Ischiropoulos, *Arch. Biochem. Biophys.* **1996**, 333, 42–48.
- [78] S. V. Lymar, Q. Jiang, J. K. Hurst, *Biochemistry* **1996**, 35, 7855–7861.
- [79] S. V. Lymar, J. K. Hurst, *Inorg. Chem.* **1998**, 37, 294–301.
- [80] R. Radi, J. S. Beckman, K. M. Bush, B. A. Freeman, *J. Biol. Chem.* **1991**, 266, 4244–4250.
- [81] B. Mayer, A. Schrammel, P. Klatt, D. Koesling, K. Schmidt, *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 17355–17360.
- [82] M. A. Moro, V. M. Darley-Usmar, D. A. Goodwin, N. G. Read, R. Zamorapino, M. Feelisch, M. W. Radomski, S. Moncada, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, 91, 6702–6706.
- [83] A. van der Vliet, P. A. C. 't Hoen, P. S. Y. Wong, A. Bast, C. E. Cross, *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 30255–30262.
- [84] S. Liu, J. S. Beckman, D. D. Ku, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1994**, 268, 1114–1121.

- [85] H. Sies, V. S. Sharov, L.-O. Klotz, K. Briviba, *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 27812–27817.
- [86] K. Masumoto, R. Kissner, W. H. Koppenol, H. Sies, *FEBS Lett.* **1996**, 398, 179–182.
- [87] J. T. Coyle, P. Puttfarcken, *Science* **1993**, 262, 689–695.
- [88] O. Bagasra, F. H. Michaels, Y. M. Zheng, L. E. Bobroski, S. V. Spitsin, Z. F. Fu, R. Tawadros, H. Koprowski, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, 92, 12041–12045.
- [89] I. Y. Haddad, H. Ischiropoulos, B. A. Holm, J. S. Beckman, J. R. Baker, S. Matalon, *Am. J. Physiol. L* **1993**, 265, L555–L564.
- [90] J. S. Beckman, M. Carson, C. D. Smith, W. H. Koppenol, *Nature* **1993**, 364, 584.
- [91] J. S. Beckman, Y. Z. Ye, P. G. Anderson, J. Chen, M. A. Accavitti, M. M. Tarpey, C. R. White, *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **1994**, 375, 81–88.
- [92] E. E. Mannick, L. E. Bravo, G. Zarama, J. L. Realpe, X. J. Zhang, B. Ruiz, E. T. Fonham, R. Mera, M. J. Miller, P. Correa, *Cancer Res.* **1995**, 56, 3238–3243.
- [93] T. Akaike, Y. Noguchi, S. Ijiri, K. Setoguchi, M. Suga, Y. Zheng, B. Dietzschold, H. Maeda, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, 93, 2448–2453.
- [94] H. Kaur, B. Halliwell, *FEBS Lett.* **1994**, 350, 9–12.
- [95] H. Ischiropoulos, *Arch. Biochem. Biophys.* **1998**, 356, 1–11.
- [96] Q. W. Xie, C. Nathan, *J. Leukocyte Biol.* **1994**, 56, 576–582.
- [97] J. S. Beckman, *Chem. Res. Toxicol.* **1996**, 9, 836–844.
- [98] D. Ungureanu-Longrois, J.-L. Balligand, R. A. Kelly, T. W. Smith, *J. Mol. Cell. Cardiol.* **1995**, 27, 155–167.
- [99] S. Zhu, I. Y. Haddad, S. Matalon, *Arch. Biochem. Biophys.* **1996**, 333, 282–290.
- [100] L. A. MacMillan-Crow, J. P. Crow, J. D. Kerby, J. S. Beckman, J. A. Thompson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, 93, 11853–11858.
- [101] L. A. MacMillan-Crow, J. P. Crow, J. A. Thompson, *Biochemistry* **1998**, 37, 1613–1622.
- [102] B. S. Berlett, B. Friguet, M. B. Yim, P. B. Chock, E. R. Stadtman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, 93, 1776–1780.
- [103] B. S. Berlett, R. L. Levine, E. R. Stadtman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, 95, 2784–2789.
- [104] S.-K. Kong, M. B. Yim, E. R. Stadtman, P. B. Chock, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, 93, 3377–3382.
- [105] A. J. Gow, D. Duran, S. Malcolm, H. Ischiropoulos, *FEBS Lett.* **1996**, 385, 63–66.
- [106] X. H. Li, P. DeSarno, L. Song, J. S. Beckman, R. S. Jope, *Biochem. J.* **1998**, 331, 599–606.
- [107] A. T. Nielsen, *Nitrocarbons*, VCH, New York, **1995**.
- [108] J. P. Eiserich, J. Butler, A. van der Vliet, C. E. Cross, B. Halliwell, *Biochem. J.* **1995**, 310, 745–749.
- [109] M. R. Gunther, L. C. Hsi, J. F. Curtis, J. K. Gierse, L. J. Marnett, T. E. Eling, R. P. Mason, *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 17086–17090.
- [110] D. C. Goodwin, M. R. Gunther, L. C. Hsi, B. C. Crews, T. E. Eling, R. P. Mason, L. J. Marnett, *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 8903–8909.
- [111] W. A. Prütz, H. Mönig, J. Butler, E. J. Land, *Arch. Biochem. Biophys.* **1985**, 243, 125–134.
- [112] X. P. Liu, M. J. S. Miller, M. S. Joshi, D. D. Thomas, J. R. Lancaster, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, 95, 2175–2179.
- [113] F. Farinati, G. Della-Libera, R. Cardin, A. Molari, M. Plebani, M. Rugge, F. Di-Mario, R. Naccarato, *J. Clin. Gastroenterol.* **1996**, 22, 275–281.
- [114] A. van der Vliet, C. A. O'Neill, B. Halliwell, C. E. Cross, H. Kaur, *FEBS Lett.* **1994**, 339, 89–92.
- [115] A. van der Vliet, J. P. Eiserich, C. A. O'Neill, B. Halliwell, C. E. Cross, *Arch. Biochem. Biophys.* **1995**, 319, 341–349.
- [116] B. Halliwell, *FEBS Lett.* **1997**, 411, 157–160.
- [117] S. Pfeiffer, B. Mayer, *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 27280–27285.
- [118] J. W. Heinecke, W. Li, H. L. Daehnke III, J. A. Goldstein, *J. Biol. Chem.* **1993**, 268, 4069–4077.
- [119] C. Leeuwenburgh, M. M. Hardy, S. L. Hazen, P. Wagner, S. Ohishi, U. P. Steinbrecher, J. W. Heinecke, *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 1433–1436.
- [120] A. van der Vliet, J. P. Eiserich, B. Halliwell, C. E. Cross, *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 7617–7625.
- [121] J. P. Eiserich, C. E. Cross, A. D. Jones, B. Halliwell, A. van der Vliet, *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 19199–19208.
- [122] J. P. Eiserich, M. Hristova, C. E. Cross, A. D. Jones, B. A. Freeman, B. Halliwell, A. van der Vliet, *Nature* **1998**, 391, 393–397.
- [123] C. Szabo, V. L. Dawson, *Trends Pharmacol. Sci.* **1998**, 19, 287–298.
- [124] D. D. Rees, R. M. Palmer, S. Moncada, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, 86, 3375–3378.
- [125] R. F. Furchgott, P. M. Vanhoutte, *FASEB J.* **1989**, 3, 2007–18.
- [126] L. J. Ignarro, *FASEB J.* **1989**, 3, 31–36.
- [127] R. I. Wilson, J. Yanovsky, A. Godecke, D. R. Stevens, J. Schrader, H. L. Haas, *Nature* **1997**, 386, 338–338.
- [128] J. L. Balligand, L. Kobzik, X. Q. Han, D. M. Kaye, L. Belhassen, D. S. Ohara, R. A. Kelly, T. W. Smith, T. Michel, *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 14582–14586.
- [129] R. Busse, A. Lückhoff, A. Mülsch, *Basic Res. Cardiol.* **1991**, 86, 7–16.
- [130] R. Busse, A. Mülsch, *FEBS Lett.* **1990**, 275, 87–90.
- [131] J. L. Balligand, D. Ungureanu-Longrois, W. W. Simmons, L. Kobzik, C. J. Lowenstein, S. Lamas, R. A. Kelly, T. W. Smith, T. Michel, *Am. J. Physiol.* **1995**, 268, H1293–H1303.
- [132] J. L. Balligand, R. A. Kelly, P. A. Marsden, T. W. Smith, T. Michel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, 90, 347–351.
- [133] T. R. Billiar, R. D. Curran, D. J. Stuehr, J. Stadler, R. L. Simmons, S. A. Murray, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1990**, 168, 1034–1040.
- [134] S. Murphy, M. L. Simmons, L. Agullo, A. Garcia, D. L. Feinstein, E. Galea, D. J. Reis, D. Mincgolomb, J. P. Schwartz, *Trends Neurosci.* **1993**, 16, 323–328.
- [135] E. A. Sheta, K. McMillan, B. S. S. Masters, *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 15147–15153.
- [136] D. K. Ghosh, D. J. Stuehr, *Biochemistry* **1995**, 34, 801–807.
- [137] D. S. Bredt, P. M. Hwang, C. E. Glatt, C. Lowenstein, R. R. Reed, S. H. Snyder, *Nature* **1991**, 351, 714–718.
- [138] M. J. Zhang, H. J. Vogel, *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 981–985.
- [139] M. Wang, D. L. Roberts, R. Paschke, T. M. Shea, B. S. Masters, J. J. Kim, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, 94, 8411–8416.
- [140] J. C. Salerno, D. E. Harris, K. Irizarry, B. Patel, A. J. Morales, S. M. Smith, P. Martasek, L. J. Roman, B. S. Masters, C. L. Jones, B. A. Weissman, P. Lane, Q. Liu, S. S. Gross, *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 29769–29777.
- [141] S. N. Daff, S. K. Chapman, K. L. Turner, R. A. Holt, S. Govindaraj, T. L. Poulos, A. W. Munro, *Biochemistry* **1997**, 36, 13816–13823.
- [142] S. Govindaraj, T. L. Poulos, *Biochemistry* **1995**, 34, 11221–11226.
- [143] D. K. Ghosh, H. M. Abu-Soud, D. J. Stuehr, *Biochemistry* **1995**, 34, 11316–11320.
- [144] C. Galli, R. MacArthur, H. M. Abu-Soud, P. Clark, D. J. Stuehr, G. W. Brudvig, *Biochemistry* **1996**, 35, 2804–2810.
- [145] K. Brunner, A. Tortschanoff, B. Hemmens, P. J. Andrew, B. Mayer, A. J. Kungl, *Biochemistry* **1998**, 37, 17545–17553.
- [146] U. Siddhanta, C. Q. Wu, H. M. Abu-Soud, J. L. Zhang, D. K. Ghosh, D. J. Stuehr, *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 7309–7312.
- [147] U. Siddhanta, A. Presta, B. Fan, D. Wolan, D. L. Rousseau, D. J. Stuehr, *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 18950–18958.
- [148] R. Gachhui, D. K. Ghosh, C. Wu, J. Parkinson, B. R. Crane, D. J. Stuehr, *Biochemistry* **1997**, 36, 5097–5103.
- [149] K. A. White, M. A. Marletta, *Biochemistry* **1992**, 31, 6627–6631.
- [150] K. McMillan, D. S. Bredt, D. J. Hirsch, S. H. Snyder, J. E. Clark, B. S. S. Masters, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, 89, 11141–11145.
- [151] M. Sono, D. J. Stuehr, M. Ikeda-Saito, J. H. Dawson, *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 19943–19948.
- [152] J. Wang, D. J. Stuehr, D. L. Rousseau, *Biochemistry* **1997**, 36, 4595–4606.
- [153] B. R. Crane, A. S. Arvai, R. Gachhui, C. Wu, D. K. Ghosh, E. D. Getzoff, D. J. Stuehr, J. A. Tainer, *Science* **1997**, 278, 425–431.
- [154] B. R. Crane, A. S. Arvai, D. K. Ghosh, C. Wu, E. D. Getzoff, D. J. Stuehr, J. A. Tainer, *Science* **1998**, 279, 2121–2126.
- [155] „Twenty-five Years of P450cam Research: Mechanistic Insights into Oxygenase Catalysis“: E. J. Mueller, P. J. Loida, S. G. Sligar in *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry* (Hrsg.: P. M. Ortiz de Montellano), Plenum, New York, **1995**, S. 83–124.
- [156] C. S. Raman, H. Li, P. Martásek, V. Král, B. S. S. Masters, T. L. Poulos, *Cell* **1998**, 95, 939–950.
- [157] K. J. Baek, B. A. Thiel, S. Lucas, D. J. Stuehr, *J. Biol. Chem.* **1993**, 268, 21120–21129.

- [158] P. Klatt, S. Pfeiffer, B. M. List, D. Lehner, O. Glatter, H. P. Bächinger, E. R. Werner, K. Schmidt, B. Mayer, *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 7336–7342.
- [159] B. Hemmens, A. C. F. Gorren, K. Schmidt, E. R. Werner, B. Mayer, *Biochem. J.* **1998**, 332, 337–342.
- [160] B. Mayer, M. John, E. Böhme, *FEBS Lett.* **1990**, 277, 215–219.
- [161] S. Lamas, P. A. Marsden, G. K. Li, P. Tempst, T. Michel, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, 89, 6348–6352.
- [162] H. J. Cho, Q. W. Xie, J. Calaycay, R. A. Mumford, K. M. Swiderek, T. D. Lee, C. Nathan, *J. Exp. Med.* **1992**, 176, 599–604.
- [163] R. C. Venema, H. S. Sayegh, J. D. Kent, D. G. Harrison, *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 6435–6440.
- [164] H. M. Abu-Soud, L. L. Yoho, D. J. Stuehr, *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 32047–32050.
- [165] R. Gachhui, H. M. Abu-Soud, D. K. Ghosh, A. Presta, M. A. Blazing, B. Mayer, S. E. George, D. J. Stuehr, *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 5451–5454.
- [166] C. R. Nishida, P. R. Ortiz de Montellano, *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 5566–5571.
- [167] P. Klatt, B. Heinzel, M. John, M. Kastner, E. Böhme, B. Mayer, *J. Biol. Chem.* **1992**, 267, 11374–11378.
- [168] R. G. W. Anderson, *Annu. Rev. Biochem.* **1998**, 67, 199–225.
- [169] T. Okamoto, A. Schlegel, P. E. Scherer, M. P. Lisanti, *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 5419–5422.
- [170] O. Feron, F. Saldana, J. B. Michel, T. Michel, *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 3125–3128.
- [171] G. Garcia-Cardena, P. Oh, J. Liu, J. S. Schnitzer, W. C. Sessa, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, 93, 6448–6453.
- [172] H. Ju, R. Zou, V. J. Venema, R. C. Venema, *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 18522–18525.
- [173] S. Ghosh, R. Gachhui, C. Crooks, C. Wu, M. P. Lisanti, D. J. Stuehr, *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 22267–22271.
- [174] M. J. Clague, J. S. Wishnok, M. A. Marletta, *Biochemistry* **1997**, 36, 14465–14473.
- [175] B. M. List, P. Klatt, E. R. Werner, K. Schmidt, B. Mayer, *Biochem. J.* **1996**, 315, 57–63.
- [176] A. C. F. Gorren, B. M. List, A. Schrammel, E. Pitters, B. Hemmens, E. R. Werner, K. Schmidt, B. Mayer, *Biochemistry* **1996**, 35, 16735–16745.
- [177] A. C. F. Gorren, A. Schrammel, K. Schmidt, B. Mayer, *Biochemistry* **1997**, 36, 4360–4366.
- [178] K. McMillan, B. S. S. Masters, *Biochemistry* **1993**, 32, 9875–9880.
- [179] T. L. Poulos, B. C. Finzel, A. J. Howard, *Biochemistry* **1986**, 25, 5314–5322.
- [180] I. Rodriguez-Crespo, N. C. Gerber, P. R. Ortiz de Montellano, *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 11462–11467.
- [181] B. Mayer, C. Wu, A. C. F. Gorren, S. Pfeiffer, K. Schmidt, P. Clark, D. J. Stuehr, E. R. Werner, *Biochemistry* **1997**, 36, 8422–8427.
- [182] B. Mayer, P. Klatt, E. R. Werner, K. Schmidt, *FEBS Lett.* **1994**, 350, 199–202.
- [183] P. Klatt, K. Schmidt, D. Lehner, O. Glatter, H. P. Bächinger, B. Mayer, *EMBO J.* **1995**, 14, 3687–3695.
- [184] T. A. Dix, S. Benkovic, *Acc. Chem. Res.* **1988**, 21, 101–107.
- [185] S. Kaufman, *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **1993**, 67, 77–264.
- [186] B. Mayer, M. John, B. Heinzel, E. R. Werner, H. Wachter, G. Schultz, E. Böhme, *FEBS Lett.* **1991**, 288, 187–191.
- [187] M. A. Marletta, *J. Biol. Chem.* **1993**, 268, 12231–12234.
- [188] H. G. Korth, R. Sustmann, C. Thater, A. R. Butler, K. U. Ingold, *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 17776–17779.
- [189] O. W. Griffith, D. J. Stuehr, *Annu. Rev. Physiol.* **1995**, 57, 707–736.
- [190] D. J. Stuehr, M. Ikeda-Saito, *J. Biol. Chem.* **1992**, 267, 20547–20550.
- [191] B. Heinzel, M. John, P. Klatt, E. Böhme, B. Mayer, *Biochem. J.* **1992**, 281, 627–630.
- [192] P. Klatt, B. Heinzel, B. Mayer, E. Ambach, G. Werner-Felmayer, H. Wachter, E. R. Werner, *FEBS Lett.* **1992**, 305, 160–162.
- [193] P. Klatt, M. Schmid, E. Leopold, K. Schmidt, E. R. Werner, B. Mayer, *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 13861–13866.
- [194] E. R. Werner, E. Pitters, K. Schmidt, H. Wachter, G. Werner-Felmayer, B. Mayer, *Biochem. J.* **1996**, 320, 193–196.
- [195] S. Pfeiffer, A. C. Gorren, E. Pitters, K. Schmidt, E. R. Werner, B. Mayer, *Biochem. J.* **1997**, 328, 349–352.
- [196] S. G. Sligar, I. C. Gunsalus, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1976**, 73, 1078–1082.
- [197] A. Presta, A. M. Weber-Main, M. T. Stankovich, D. J. Stuehr, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 9460–9465.
- [198] H. M. Abu-Soud, R. Gachhui, F. M. Raushel, D. J. Stuehr, *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 17349–17353.
- [199] N. Bec, A. C. F. Gorren, C. Voelker, B. Mayer, R. Lange, *J. Biol. Chem.* **1998**, 273, 13502–13508.
- [200] D. Mansuy, J. L. Boucher, B. Clement, *Biochimie* **1995**, 77, 661–667.
- [201] A. Jousserandot, J.-L. Boucher, Y. Henry, B. Niklaus, B. Clement, D. Mansuy, *Biochemistry* **1998**, 37, 17179–17191.
- [202] B. Clement, M. H. Schultze-Mosgau, H. Wohlers, *Biochem. Pharmacol.* **1993**, 46, 2249–2267.
- [203] J. M. Fukuto, G. C. Wallace, R. Hsieh, G. Chaudhuri, *Biochem. Pharmacol.* **1992**, 43, 607–613.
- [204] J. M. Fukuto, D. J. Stuehr, P. L. Feldman, M. P. Bova, P. Wong, *J. Med. Chem.* **1993**, 36, 2666–2670.
- [205] H. M. Abu-Soud, A. Presta, B. Mayer, D. J. Stuehr, *Biochemistry* **1997**, 36, 10811–10816.
- [206] R. A. Pufahl, M. A. Marletta, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1993**, 193, 963–970.
- [207] P. L. Feldman, O. W. Griffith, D. J. Stuehr, *Chem. Eng. News* **1993**, 71(51), 26–38.
- [208] C. Moali, J. L. Boucher, M. A. Sari, D. J. Stuehr, D. Mansuy, *Biochemistry* **1998**, 37, 10453–10460.
- [209] N. Sennequier, D. J. Stuehr, *Biochemistry* **1996**, 35, 5883–5892.
- [210] S. K. Grant, B. G. Green, J. Stiffey-Wilusz, P. L. Durette, S. K. Shah, J. W. Kozarich, *Biochemistry* **1998**, 37, 4174–4180.
- [211] E. P. Garvey, J. A. Oplinger, G. J. Tanoury, P. A. Sherman, M. Fowler, S. Marshall, M. F. Harmon, J. E. Paith, E. S. Furfine, *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 26669–26676.
- [212] E. S. Furfine, M. F. Harmon, J. E. Paith, R. G. Knowles, M. Salter, R. J. Kiff, C. Duffy, R. Hazelwood, J. A. Oplinger, E. P. Garvey, *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 26677–26683.
- [213] P. Klatt, K. Schmidt, F. Brunner, B. Mayer, *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 1674–1680.
- [214] N. M. Olken, Y. Osawa, M. A. Marletta, *Biochemistry* **1994**, 33, 14784–14791.
- [215] W. M. Moore, R. K. Webber, G. M. Jerome, F. S. Tjoeng, T. P. Misko, M. G. Currie, *J. Med. Chem.* **1994**, 37, 3886–3888.
- [216] T. B. McCall, M. Feelisch, R. M. Palmer, S. Moncada, *Br. J. Pharmacol.* **1991**, 102, 234–238.
- [217] P. L. Feldman, O. W. Griffith, H. Hong, D. J. Stuehr, *J. Med. Chem.* **1993**, 36, 491–496.
- [218] H. M. Abu-Soud, C. Wu, D. K. Ghosh, D. J. Stuehr, *Biochemistry* **1998**, 37, 3777–3786.
- [219] Z. H. Huang, P. L. Huang, N. Panahian, T. Dalkara, M. C. Fishman, M. A. Moskowitz, *Science* **1994**, 265, 1883–1885.
- [220] S. Stenger, H. Thuring, M. Rollinghoff, P. Manning, C. Bogdan, *Eur. J. Pharmacol.* **1995**, 294, 703–712.
- [221] J. R. Connor, P. T. Manning, S. L. Settle, W. M. Moore, G. M. Jerome, R. K. Webber, F. S. Tjoeng, M. G. Currie, *Eur. J. Pharmacol.* **1995**, 273, 15–24.
- [222] M. Nakane, V. Klinghofer, J. E. Kuk, J. L. Donnelly, G. P. Budzik, J. S. Pollock, F. Basha, G. W. Carter, *Mol. Pharmacol.* **1995**, 47, 831–834.
- [223] D. J. Wolff, D. S. Gauld, M. J. Neulander, G. Southan, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1997**, 283, 265–273.
- [224] T. Yoshida, V. Limmroth, K. Irikura, M. A. Moskowitz, *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **1994**, 14, 924–929.
- [225] B. Mayer, P. Klatt, E. R. Werner, K. Schmidt, *Neuropharmacology* **1994**, 33, 1253–1259.
- [226] K. Schmidt, G. Werner-Felmayer, B. Mayer, E. R. Werner, *Eur. J. Biochem.* **1999**, 259, 25–31.
- [227] Z. G. Zhang, D. Reif, J. Macdonald, W. X. Tang, D. K. Kamp, R. J. Gentile, W. C. Shakespeare, R. J. Murray, M. Chopp, *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **1996**, 16, 599–604.
- [228] E. P. Garvey, J. A. Oplinger, E. S. Furfine, R. J. Kiff, F. Laszlo, B. J. Whittle, R. G. Knowles, *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 4959–4963.
- [229] R. Floris, S. R. Piersma, G. Yang, P. Jones, R. Wever, *Eur. J. Biochem.* **1993**, 215, 767–775.

-
- [230] S. Padmaja, G. L. Squadrito, W. A. Pryor, *Arch. Biochem. Biophys.* **1998**, *349*, 1–6.
- [231] J. P. Crow, J. S. Beckman, J. M. McCord, *Biochemistry* **1995**, *34*, 3544–3552.
- [232] L. Castro, M. Rodriguez, R. Radi, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 29409–29415.
- [233] H. Zhang, G. L. Squadrito, R. M. Uppu, J.-N. Lemerrier, R. Cueto, W. A. Pryor, *Arch. Biochem. Biophys.* **1997**, *339*, 183–189.
- [234] W. A. Pryor, X. Jin, G. L. Squadrito, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 11173–11177.
- [235] D. Bartlett, D. F. Church, P. L. Bounds, W. H. Koppenol, *Free Radical Biol. Med.* **1995**, *18*, 85–92.
- [236] G. L. Squadrito, X. Jin, W. A. Pryor, *Arch. Biochem. Biophys.* **1995**, *322*, 53–59.
- [237] J. Saras, C.-H. Heldin, *Trends Biochem. Sci.* **1996**, *21*, 455–458.
-