

Nitroglycerin-Bioaktivierung

Bioaktivierung von Nitroglycerin – ein neues Stück im Puzzle

Bernd Mayer*

Stichwörter:

Aldehyd-Dehydrogenase · Gefäßerweiterung · Nitrat-Metabolismus · Stickstoffmonoxid

Einleitung

Nitroglycerin (Glyceryltrinitrat, GTN), ein explosiver Bestandteil in Alfred Nobels Dynamit, wird seit der zweiten Hälfte des 19. Jahrhunderts zur Behandlung von Angina pectoris (koronare Herzkrankheit) eingesetzt, dem primären Symptom einer ischämischen Erkrankung des Herzens, die durch mangelnde Sauerstoffversorgung des Myokards ausgelöst wird (zur Geschichte von GTN siehe Lit. [1]). Neben genetischer Disposition zählen Bluthochdruck, Diabetes mellitus, Hyperlipidämie, Bewegungsmangel und Rauschen zu den wesentlichen Risikofaktoren bei der koronaren Herzkrankheit. GTN erweitert die meisten Blutgefäße, einschließlich Arteriolen und Venen. Bei niedriger Dosierung dilatiert es bevorzugt venöse Gefäße und bewirkt somit eine Senkung der Vorlast und des kardialen Sauerstoffverbrauchs. Bei höherer Dosierung führt es durch Reduktion des arteriellen Widerstands und der Auswurfleistung des Herzens außerdem zu einer Senkung des diastolischen und systolischen Blutdrucks.

Die molekularen Grundlagen der kardiovaskulären Wirkung von GTN und anderen organischen Nitraten (z.B. Isosorbidmono- und -dinitraten) blieben lange Zeit unbekannt. In der Mitte der siebziger Jahre des 20. Jahrhunderts entdeckten Ferid Murad und Mitarbeiter, dass die vasodilatierende Wirkung der organischen Nitraten auf

der enzymatischen Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO) beruht, das durch Stimulierung der löslichen Guanylat-Cyclase (soluble guanylate cyclase, sGC) in der glatten Muskulatur der Blutgefäße eine vermehrte Synthese von cyclischem GMP (cGMP) bewirkt.^[2] Dieser Mechanismus, damals als einzigartig für die Wirkung der sogenannten Nitrovasodilatatoren (GTN und andere NO-freisetzende Wirkstoffe) betrachtet, erwies sich in der Zwischenzeit als wichtiger endogener Signaltransduktionsweg in zahlreichen Säugetiergebenen, z.B. in Blutgefäßen, in Thrombozyten und im Gehirn (Übersicht in Lit. [3]). Die Entdeckung von NO als Signalmolekül im kardiovaskulären System wurde 1998 mit dem Nobel-Preis für Physiologie oder Medizin ausgezeichnet.^[4] Die wesentlichen Wege der NO/cGMP-vermittelten Relaxation von Blutgefäßen sind in Abbildung 1 schematisch dargestellt.

GTN-Metabolismus durch mitochondriale Aldehyd-Dehydrogenase

Die biologische Wirkung von GTN erfordert die enzymatische Bioakti-

vierung des Nitrats in der glatten Gefäßmuskulatur, was vermutlich sowohl die therapeutisch erwünschte Venenselektivität von GTN als auch den uner-

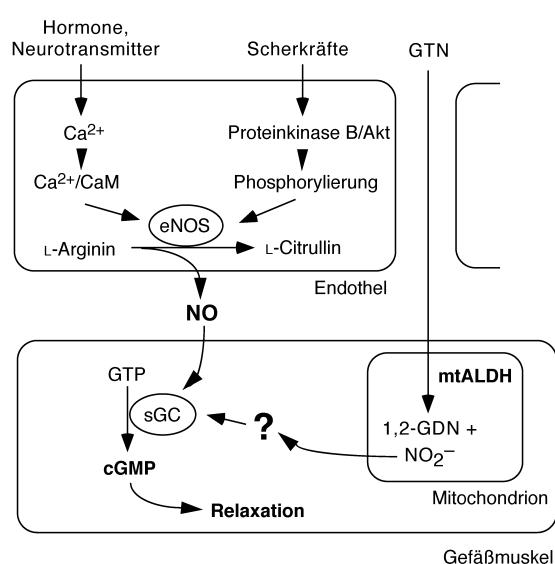


Abbildung 1. Schematische Darstellung der wesentlichen Wege der Erweiterung von Blutgefäßen durch endotheliales NO und GTN. Zirkulierende Hormone und Neurotransmitter, die aus Gefäß-innervierenden Neuronen freigesetzt werden, bewirken die Ca²⁺/Calmodulin(CaM)-abhängige Aktivierung endothelialer NO-Synthase (eNOS), eines Enzyms, das die Aminosäure L-Arginin in L-Citrullin und NO umwandelt. Scherkräfte des Blutkreislaufes aktivieren den Proteinkinase B/Akt-Weg, der durch Serin-Phosphorylierung eine Ca²⁺-unabhängige Aktivierung der eNOS auslöst und die basale NO-Freisetzung moduliert, die für die Aufrechterhaltung einer kontinuierlichen, aktiven Vasodilatation des Organismus erforderlich ist. Endotheliales NO bindet an die regulatorische Häm-Gruppe der sGC in der benachbarten glattmuskulären Zellschicht und führt so zur Bildung von cGMP, einem intrazellulären Botenstoff, der durch Erniedrigung der intrazellulären Konzentration an freien Ca²⁺-Ionen Gefäßerweiterung auslöst. GTN stimuliert die cGMP-Bildung in der glatten Muskulatur endothelunabhängig. Die Studie von Chen et al.^[5] weist darauf hin, dass der Metabolismus zu 1,2-GDN und Nitrit durch mtALDH entscheidend an der Bioaktivierung von GTN beteiligt ist, wobei allerdings das Bindeglied zwischen enzymatischer Nitritbildung und Aktivierung der sGC noch unklar ist.

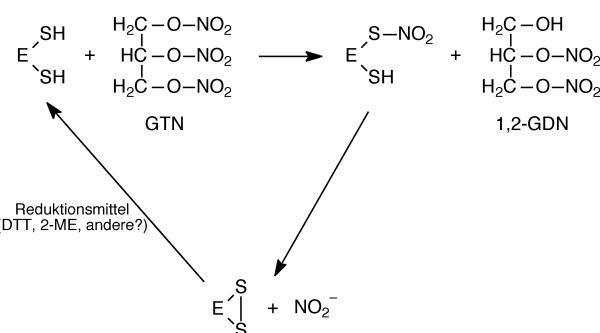
[*] Prof. Dr. B. Mayer

Institut für Pharmakologie und Toxikologie
Universitätsplatz 2, 8010 Graz (Österreich)
Fax: (+43) 316-380-9890
E-mail: mayer@kfunigraz.ac.at

wünschten Wirkungsverlust nach Langzeitapplikation („Nitrattoleranz“) erklärt. Trotz erheblicher klinischer Relevanz ist der Mechanismus der Bioaktivierung, d.h. des Metabolismus von GTN zu einem Aktivator der vaskulären sGC, weitgehend unklar. In einer kürzlich veröffentlichten Studie berichten Chen et al.^[5] über den Metabolismus von GTN zu 1,2-Glyceryldinitrat (1,2-GDN) und stöchiometrischen Mengen Nitrit durch mitochondriale Aldehyd-Dehydrogenase (mtALDH). Dieses Enzym ist vermutlich wichtig für die Detoxifizierung von Acetaldehyd, der bei der Acetyl-CoA-Synthese durch die nichtoxidative Aktivität der Pyruvat-Dehydrogenase als Nebenprodukt gebildet wird.

Veranlasst durch die Beobachtung, dass der GTN-Metabolismus in RAW-264.7-Mäusemakrophagen ähnlich verläuft wie in der glatten Gefäßmuskulatur, verwendeten Chen et al. eine ungewöhnlich große Menge an Makrophagen (ca. 10^{10} Zellen, entsprechend einem Feuchtgewicht von 50 g) für die Isolierung des GTN-metabolisierenden Enzyms. Die Forscher konnten 3.6 mg eines 53 kDa großen Proteins reinigen, das sie als mtALDH identifizierten. Das Enzym bildete 1,2-GDN und Nitrit mit einer spezifischen Aktivität von $30 \text{ nmol h}^{-1} \text{ mg}^{-1}$. Ähnliche Ergebnisse wurden mit aus Rinderleber isolierter mtALDH erhalten, sodass dieser Weg des GTN-Metabolismus anscheinend gewebe- und speziesunabhängig ist. Die spezifische Aktivität des Enzyms aus Rinderleber war $3 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$; Zugabe von NAD⁺ steigerte sie um den Faktor 10. Die Reaktion folgt klassischer Michaelis-Menten-Kinetik mit einem K_m -Wert von $12 \mu\text{M}$ und wird durch das natürliche Substrat der mtALDH, Acetaldehyd ($\text{IC}_{50}=0.1 \text{ mM}$), sowie durch den klassischen mtALDH-Inhibitor Chloralhydrat ($\text{IC}_{50}=0.8 \text{ mM}$) inhibiert.

Zahlreiche frühe Untersuchungen wiesen darauf hin, dass zelluläre Thiole entscheidend an der GTN-Bioaktivierung beteiligt sind, die molekularen Details dieser Thiol-Abhängigkeit sind aber nach wie vor unklar. Die Studie von Chen et al. könnte eine Erklärung für diese früheren Beobachtungen liefern, da für den GTN-Metabolismus durch mtALDH eine reduzierende Ver-



Schema 1. Metabolismus von GTN durch mtALDH nach Chen et al.^[5] Für Einzelheiten siehe den Text. Die unphysiologischen Thiole DTT und 2-ME eigneten sich als Reduktionsmittel, die physiologisch in hohen Konzentrationen vorkommende Thiolverbindung GSH dagegen nicht, was nahelegt, dass die Reduktase-Aktivität der mtALDH *in vivo* durch ein noch unbekanntes Reduktionsmittel unterstützt wird.

bindung erforderlich ist. (Die Autoren verwendeten die unphysiologischen Thiole Dithiothreitol (DTT) und Sulfanyl-ethanol (2-ME), sodass die Identität des natürlichen Cofaktors weiterhin unbekannt ist.) Basierend auf ihren Ergebnissen schlügen Chen et al. vor, dass mtALDH in Gegenwart eines geeigneten Reduktionsmittels als GTN-Reduktase fungiert. Wie in Schema 1 (adaptiert von Schema 1 in Lit. [5]) illustriert, reagiert GTN mit einem der beiden Cystein-Reste in der Nähe des aktiven Zentrums der mtALDH zu einem Thionitrat-Intermediat ($\text{E}-\text{S}-\text{NO}_2$) und 1,2-GDN, woran sich eine Disulfidbildung und die Freisetzung von Nitrit anschließt. Das inaktive oxidierte Enzym wird durch Thiole oder andere Reduktionsmittel wieder in die native Dithiol-Form überführt. Dieses Modell sagt vorher, dass GTN beim Ausbleiben des Reduktionsschrittes eine mtALDH-Inaktivierung bewirkt. Interessanterweise wurde bereits früher über eine Mechanismus-basierende mtALDH-Inaktivierung sowohl durch klassische Enzym-Inhibitoren als auch durch NO-Donoren berichtet (siehe Zitate in Lit. [5]).

Beteiligung der mtALDH an der GTN-induzierten Gefäßrelaxation und Blutdrucksenkung

Für die Untersuchungen zur Rolle der mtALDH bei der GTN-vermittelten Gefäßerweiterung und cGMP-Bildung verwendeten Chen et al. Ringe isolierter

Kaninchen-Aorta. Nachdem sie gezeigt hatten, dass die mtALDH-Inhibitoren Chloralhydrat, Cyanamid und Acetaldehyd die Bildung von 1,2-GDN in den isolierten Blutgefäßen hemmen, testeten sie die Effekte dieser Substanzen in Organbad-Versuchen. Alle drei Inhibitoren bewirkten eine Rechtsverschiebung der GTN-Konzentrations-Wirkungs-Kurven, was auf eine essentielle

Beteiligung der mtALDH an der Bioaktivierung von GTN in der glatten Gefäßmuskulatur hinweist. Allerdings scheinen auch andere Mechanismen involviert zu sein, da die Inhibitor-behandelten Gefäße bei höheren GTN-Konzentrationen vollständige Relaxation zeigten.

Anschließend untersuchten Chen et al. die physiologische Bedeutung der mtALDH-katalysierten Bioaktivierung von GTN an Cyanamid- und Chloralhydrat-behandelten, anästhesierten Kaninchen. Infusion steigender GTN-Mengen führte zu einem Abfall des arteriellen Blutdrucks, und dieser hypotensive Effekt von GTN wurde durch Vorbehandlung der Tiere mit mtALDH-Inhibitoren (20 min vor der Applikation von GTN) signifikant abgeschwächt, allerdings nicht aufgehoben. In Kontrollversuchen zeigten Chen et al., dass Cyanamid die Blutdrucksenkung durch den direkten sGC-Aktivator Natriumnitroprussit nicht beeinflusst.

Ähnliche Ergebnisse wurden mit Ratten erhalten, sodass die durch mtALDH katalysierte Reaktion ein genereller Mechanismus des GTN-Metabolismus in Säugetieren zu sein scheint. Wie in Abbildung 1 gezeigt, führt diese Reaktion zur Bildung eines Aktivators der sGC (NO oder eine verwandte Verbindung), der die positiven kardiovaskulären Wirkungen von GTN vermittelt.

Erklärt die mtALDH-katalysierte Bioaktivierung von GTN die Nitrattoleranz?

Die essentielle Rolle eines Thiols oder anderen Reduktionsmittels zur Verhinderung der GTN-induzierten mtALDH-Inaktivierung impliziert eine interessante Erklärung der Nitrattoleranz, also des Verlusts der vasodilatierenden Wirkung nach Langzeitbehandlung mit GTN oder anderen organischen Nitraten. Chen et al. stellten fest, dass eine 30-minütige Inkubation isolierter Blutgefäße mit einer relativ hohen GTN-Konzentration von 0.3 mM zu einer Beeinträchtigung der Gefäßrelaxation (ersichtlich als Rechtsverschiebung der GTN-Konzentrations-Wirkungs-Kurve), zur vollständigen Aufhebung der GTN-induzierten Akkumulation von cGMP und zu einer verminderen Bildung von 1,2-GDN führt. (Die Gefäßrelaxation bei fehlendem Anstieg der cGMP-Konzentration bestätigt frühere Befunde über eine cGMP-unabhängige Komponente der GTN-Wirkung.^[7]) Daher schlugen sie vor, dass GTN durch Depletierung des für die mtALDH-Reaktivierung essentiellen Reduktionsmittels seine eigene Bioaktivierung hemmt. Durch dieses Modell werden frühere Vorschläge wiederbelebt, wonach die Nitrattoleranz durch Depletierung zellulärer Thiole^[6] und/oder beeinträchtigte GTN-Bioaktivierung^[8] ausgelöst wird.

Thiol-Depletierung der Gefäßmuskulenzellen als mögliche Ursache der Nitrattoleranz wurde auch noch Jahre später kontrovers diskutiert.^[9] Die Studie von Chen et al. könnte diese Kontroverse auflösen, da sie die Beteiligung eines noch unbekannten Thiols impliziert, wohingegen in früheren Untersuchungen nur die Beteiligung der physiologisch häufig vorkommenden Thiole GSH und Cystein berücksichtigt wurde. Die weit verbreitete Ansicht einer beeinträchtigten Bioaktivierung als wesentliche Ursache der Nitrattoleranz blieb allerdings auch nicht unwidersprochen.^[10] Die offensichtlichen Unterschiede zwischen dem klinisch bedeutsamen Phänomen der Nitrattoleranz und der verminderten GTN-Sensitivität isolierter Blutgefäße, die mit relativ hohen, vermutlich unphysiologischen Konzentrationen des Wirkstoffs inklu-

bieren wurden, führten zur Vermutung, dass in GTN-behandelten Patienten gegenregulatorische Kräfte aktiviert werden (z.B. erhöhte Catecholamin-Plasmaspiegel oder verstärkte Aktivität des Reninsystems).^[11] Die reflektorische Aktivierung des Reninsystems (ausgelöst durch Senkung des mittleren arteriellen Blutdrucks und des Herzzeitvolumens) bewirkt eine Erhöhung des Plasmaspiegels von Angiotensin II, einem Hormon, das durch Aktivierung der vaskulären NADPH-Oxidase die Bildung von Superoxid-Radikalen auslösen könnte, die wiederum sehr effizient freies NO abfangen – eine Reaktion, die zur Bildung des hochreaktiven Cytoxins Peroxynitrit (ONOO^-) führt. Tatsächlich scheint die Nitrattoleranz in Tierversuchen durch selektive Angiotensin-II-Rezeptor-Antagonisten ebenso wie durch das Antioxidans Vitamin C weitgehend verhindert zu werden (Übersicht in Lit. [12]). Da die Aktivierung des Reninsystems aber eine allgemeine Reaktion des Organismus auf Gefäßerweiterung ist, scheint dieser Prozess die einzigartige Charakteristik der GTN-Toleranz nicht ausreichend zu erklären.

Langzeitbehandlung mit GTN geht mit einer endothelialen Dysfunktion einher, die sich als verstärkte Bildung von Superoxid, verminderte NO-Bioverfügbarkeit und erniedrigte Sensitivität von Blutgefäßen auf endothelabhängige Vasodilatantien manifestiert.^[13–16] Die Bildung von Superoxid durch entkoppelte endotheliale NO-Synthase wurde als eine mögliche Ursache dieses Phänomens vorgeschlagen.^[14] Die Ergebnisse von Chen et al.^[5] bieten keine Erklärung für eine Beeinflussung der endothelialen NO-Biosynthese durch GTN. Sollte allerdings die NO-Freisetzung aus GTN tatsächlich in den Mitochondrien stattfinden, könnte anhaltender Nitrat-Metabolismus zu einer NO-vermittelten Hemmung der Cytochrome-c-Oxidase und durch Entkopplung der Atmungskette zu einer verstärkten Superoxid-Bildung in der glatten Gefäßmuskulatur führen.^[17] Zurzeit scheint es wahrscheinlich, dass die GTN-Toleranz in vivo durch eine Kombination mehrerer Faktoren ausgelöst wird. Die endgültige Beurteilung der möglichen Beteiligung der mtALDH erfordert eine genauere Kenntnis über

die GTN-induzierte Inaktivierung dieses Enzyms und die Entwicklung neuer Strategien zur Beeinflussung dieses Prozesses in vivo.

Perspektiven

Die Studie von Chen et al. liefert wichtige Erkenntnisse über den Mechanismus der Bioaktivierung von GTN, wirft aber auch eine Vielzahl interessanter Fragen für die künftige Forschung auf. Besonders rätselhaft ist die Verbindung zwischen GTN-Metabolismus und sGC-Aktivierung. Die Hemmung der cGMP-Bildung durch drei unterschiedliche Inhibitoren legt nahe, dass mtALDH essentiell für die GTN-induzierte sGC-Aktivierung in der glatten Muskulatur ist. Entsprechend dem Modell von Chen et al. (Schema 1) entsteht als initiales Produkt des mtALDH-katalysierten GTN-Metabolismus allerdings Nitrit, das bei den zu erwartenden niedrigen Konzentrationen keine nennenswerte Bildung von cGMP bewirkt. Auf der Suche nach einem Weg von Nitrit zu einem sGC-Aktivator schlagen die Autoren vor, dass Nitrit entweder enzymatisch – durch Bestandteile der Atmungskette – oder nichtenzymatisch – durch den niedrigen pH-Wert im mitochondrialen Intermembranraum – in freies NO umgewandelt wird. Die experimentellen Befunde zur Stützung dieser beiden Möglichkeiten sind aber wenig überzeugend. Als alternative Erklärung käme eine NO-unabhängige sGC-Aktivierung in Betracht. In diesem Zusammenhang ist es faszinierend, dass sGC ein NO-unabhängiges Regulationszentrum enthält,^[18] das anscheinend an der (vermutlich artifiziellen) Aktivierung des Enzyms durch hohe Konzentrationen an GTN in Gegenwart von Cystein beteiligt ist.^[19]

Wie in der Einleitung erwähnt, dilatiert GTN vorwiegend Venen und wirkt wesentlich geringer auf arterielle Widerstandsgefäße. Diese therapeutisch erwünschte Venenselektivität wäre in Einklang mit einer entscheidenden Rolle der mtALDH als GTN-metabolisierendes Enzym, wenn sie in Venen vermehrt vorkäme. Alternativ könnte die Venenselektivität auf Unterschieden in der endogenen NO-Biosynthese in Arterien und Venen beruhen. Da NO die vasku-

läre GTN-Bioaktivierung hemmt und Venen wesentlich weniger NO produzieren als Arterien, schlugen Kojda et al. vor,^[20] dass die GTN-Bioaktivierung in Arterien, nicht aber in Venen, durch endogenes NO inhibiert wird. Die Studie von Chen et al. passt in dieses Modell, sofern endogenes NO, ähnlich wie bereits für NO-Donoren gezeigt (siehe Zitate in Lit. [5]), eine Inaktivierung der mtALDH bewirkt.

Weitere Untersuchungen sollten die mögliche Beteiligung der mtALDH an der Bioaktivierung von GTN und der Nitrattoleranz in vivo definitiv klären. Bisher wurde mtALDH von Pharmakologen kaum beachtet, der Bericht von Chen et al. sollte aber die Entwicklung neuer experimenteller Werkzeuge zur Erforschung der biologischen und klinischen Relevanz dieses Stoffwechselweges fördern. Dem Puzzle der GTN-Bioaktivierung wurde eine großes Stück hinzugefügt. Es bleibt zu hoffen, dass die vollständige Lösung nicht weitere 130 Jahre auf sich warten lässt.

-
- [1] N. Marsh, A. Marsh, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **2000**, *27*, 313–319.
 - [2] S. Katsuki, W. P. Arnold, C. K. Mittal, F. Murad, *J. Cyclic Nucleotide Res.* **1977**, *3*, 23–35.
 - [3] B. Mayer, B. Hemmens, *Trends Biochem. Sci.* **1997**, *22*, 477–481.
 - [4] W. W. Gibbs, S. Nemecek, G. Stix, *Sci. Am.* **1999**, *280*(1), 16–19; siehe auch die Nobel-Vorträge von F. Murad, R. F. Furchtgott und L. J. Ignarro: *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 1976–2013; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 1856–1892.
 - [5] Z. Q. Chen, J. Zhang, J. S. Stamler, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 8306–8311.
 - [6] P. Needleman, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **1976**, *16*, 81–93.
 - [7] F. Brunner, K. Schmidt, E. B. Nielsen, B. Mayer, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1996**, *277*, 48–53.
 - [8] S. Forster, I. Woditsch, H. Schröder, K. Schröder, *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **1991**, *17*, 867–872.
 - [9] S. Boesgaard, J. Aldershvile, H. E. Poulsen, S. Loft, M. E. Anderson, A. Meister, *Circ. Res.* **1994**, *74*, 115–120.
 - [10] J. B. Laursen, A. Mülsch, S. Boesgaard, P. Mordvintcev, S. Trautner, N. Gruhn, J. E. Nielsen-Kudsk, R. Busse, J. Aldershvile, *Circulation* **1996**, *94*, 2241–2247.
 - [11] J. O. Parker, J. D. Parker, *Am. J. Cardiol.* **1992**, *70*, 93B–97B.
 - [12] T. Münzel, S. Kurz, T. Heitzer, D. G. Harrison, *Am. J. Cardiol.* **1996**, *77*, 24C–30C.
 - [13] P. R. Caramori, A. G. Adelman, E. R. Azevedo, G. E. Newton, A. B. Parker, J. D. Parker, *J. Am. Coll. Cardiol.* **1998**, *32*, 1969–1974.
 - [14] T. Münzel, H. Li, H. Mollnau, U. Hink, E. Matheis, M. Hartmann, M. Oelze, M. Skatchkov, A. Warnholtz, L. Duncker, T. Meinertz, U. Förstermann, *Circ. Res.* **2000**, *86*, E7–E12.
 - [15] T. Gori, J. M. Burstein, S. Ahmed, S. E. S. Miner, A. AlHesayen, S. Kelly, J. D. Parker, *Circulation* **2001**, *104*, 1119–1123.
 - [16] T. Gori, S. S. Mak, S. Kelly, J. D. Parker, *J. Am. Coll. Cardiol.* **2001**, *38*, 1096–1101.
 - [17] G. C. Brown, *Biochim. Biophys. Acta* **2001**, *1504*, 46–57.
 - [18] J. P. Stasch, E. M. Becker, C. Alonso Aljia, H. Apeler, K. Dembowsky, A. Feurer, R. Gerzer, T. Minuth, E. Perzborn, U. Pleiß, H. Schröder, W. Schröder, E. Stahl, W. Steinke, A. Straub, M. Schramm, *Nature* **2001**, *410*, 212–215.
 - [19] J. D. Artz, V. Toader, S. I. Zavorin, B. M. Bennett, G. R. J. Thatcher, *Biochemistry* **2001**, *40*, 9256–9264.
 - [20] G. Kojda, M. Patzner, A. Hacker, E. Noack, *Mol. Pharmacol.* **1998**, *53*, 547–554.