

Prostacyclin- und Thromboxan-Synthase, neue Aspekte der Katalyse durch Hämthiolat-Enzyme

Volker Ullrich* und Roland Brugger

Die beiden Arachidonsäuremetaboliten Thromboxan A₂ und Prostacyclin sind hochwirksame Regulatoren in der Zellphysiologie. Sie entstehen bei der enzymatischen Umlagerung von 9,11-Epidoxyprostaglandin H₂ durch die beiden Isomerasen Thromboxan- bzw. Prostacyclin-Synthase, die isoliert, sequenziert und als Hämthiolat(„P450“)-Enzyme charakterisiert wurden. Bei gleichem ka-

talytischem Prinzip lassen sich die verschiedenen Isomerisierungsprodukte durch unterschiedliche Bindung der Häm-Zentren an die beiden Epidoxy-Sauerstoffatome erklären. Die dazu notwendigen unterschiedlichen Konformationen am aktiven Zentrum während der Substratbindung können anhand der für beide Enzyme verschiedenen Inhibitoren und Aminosäuresequenzen erklärt

werden. Auf der Suche nach mechanistischen Gemeinsamkeiten mit den P450-Monoxygenasen und den Allenoxid-Synthasen ergibt sich als Hypothese die initiale Bildung von O-Radikalen, die anschließende Umwandlung dieser Radikale in C-Radikale und deren Oxidation zu Carbokationen durch die intermediäre Ferrylthiolat- bzw. Eisen(III)-thiyl-Struktur.

1. Einführung

Die Prostaglandine sind eine Familie von Signalmolekülen, die wesentlich an der Kommunikation zwischen den Zellen eines Organs beteiligt sind (Autacoide). Sie spielen eine Rolle als Mediatoren von Schlüsselereignissen bei der Entzündung, bei Autoimmunerkrankungen oder Schocksyndromen, aber auch bei physiologischen Regulationsmechanismen, die mit Wachstum, Differenzierung, Geburt oder Schlaf verknüpft sind (Übersichten^[1-7]). Entsprechend dieser Bedeutung hat sich die pharmakologische und pharmazeutische Forschung auf die Biosynthese und deren Hemmung sowie auf die molekularen Wirkungsmechanismen konzentriert. Ähnlich wie Steroidhormone werden Prostaglandine nicht in der Zelle gespeichert und auf ein Signal hin sezerniert, sondern nach Bedarf synthetisiert und abgegeben. Ihre Bildung und ihr Abbau ist aber viel schneller als die der Steroide, und da sie nur innerhalb eines Organs wirksam sind, findet man in der Zirkulation keine aktiven Prostaglandine, sondern vor allem ihre Abbauprodukte. Aus diesem Grund und wegen der geringen Gewebekonzentrationen bedeutete die Analytik, die Strukturaufklärung und die chemische Synthese der Prostaglandine eine Herausforderung (Übersichten^[8, 9]).

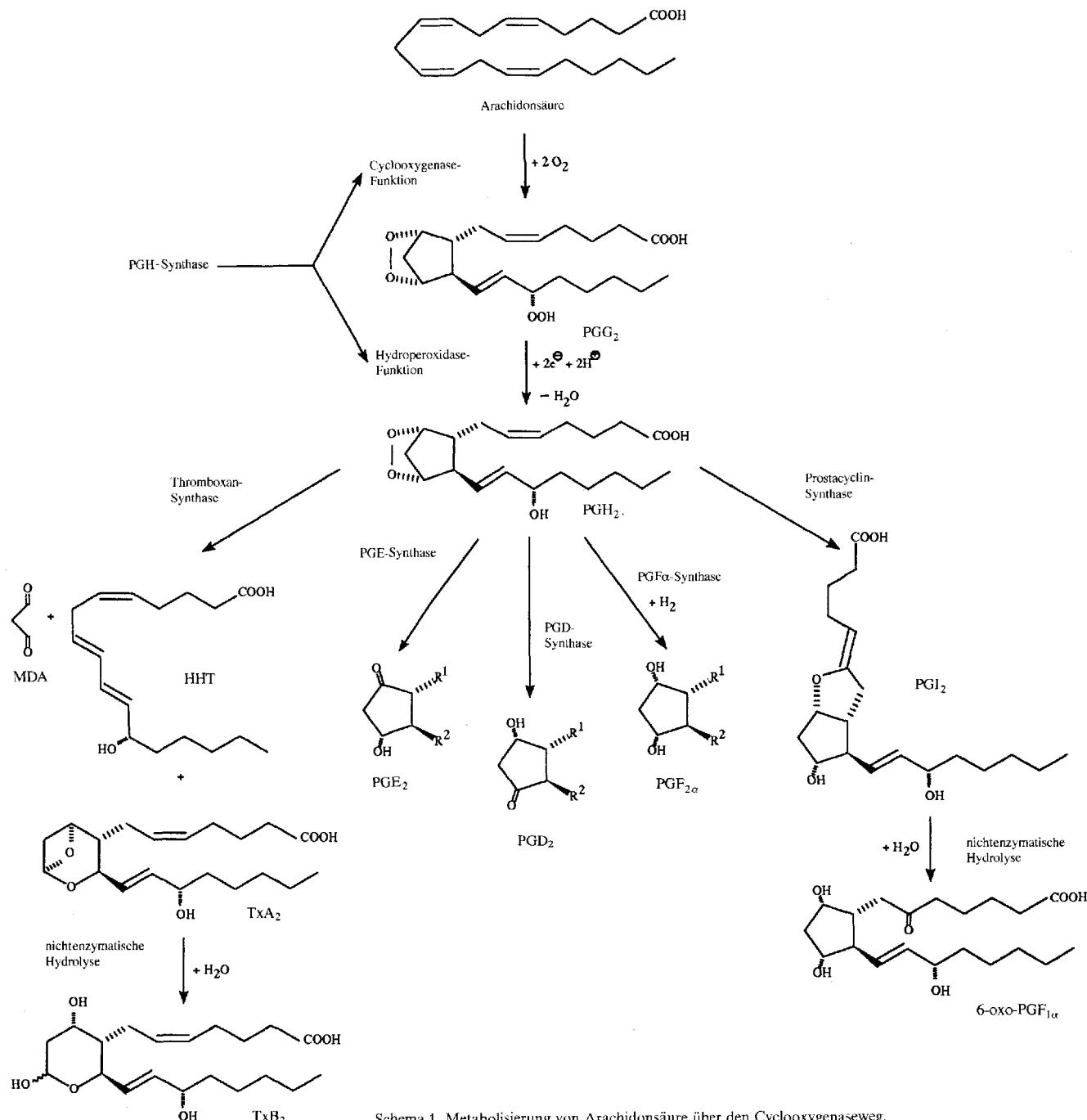
Die Biosynthese in höheren Organismen geht aus von der Arachidonsäure ((5Z,8Z,11Z,14Z)-Icosatetraensäure), die we-

gen ihrer vier Doppelbindungen und entsprechend vieler allylständiger Wasserstoffatome ein großes biosynthetisches Potential hat^[10]. Nach einer Aktivierung von Phospholipasen steht Arachidonsäure aus den Phospholipiden biologischer Membranen ausreichend zur Verfügung. Der nächste Schritt in der Biosynthesekette ist geschwindigkeitsbestimmend und besteht in der Umwandlung von Arachidonsäure in 15-Hydroxy-9 α ,11 α -epidoxyprosta-5,13-diensäure (PGH₂)^[11]. Dazu werden zwei Enzymaktivitäten benötigt, die der Cyclooxygenase und die einer Hydroperoxidase, die auf dem Gesamtkomplex der PGH-Synthase colokalisiert sind (Schema 1).

Der detaillierte Mechanismus dieser Enzymreaktion ist noch unbekannt, jedoch muß der erste Schritt der Cyclooxygenase-Reaktion die Abstraktion eines Wasserstoffatoms vom C-Atom 13 der Arachidonsäure sein, denn eine Isomerisierung unter Umlagerung in ein C-11-Radikal folgt. Das durch Dioxygenierung, Cyclisierung und eine zweite Dioxygenierung an C-15^[11] entstehende 15-Hydroperoxy-Radikal wird dann durch das primär abgespaltene Wasserstoffatom zum Hydroperoxid (PGG₂) reduziert. Es handelt sich somit um eine Radikalreaktion, die vom aktiven Zentrum der Cyclooxygenase initiiert, propagiert und terminiert wird. Dieses elegante Prinzip einer abgeschirmten radikalischen Katalyse im aktiven Zentrum von Enzymen ist, wie noch gezeigt werden soll, auch bei der Thromboxan- und der Prostacyclin-Synthase verwirklicht.

Das aus PGG₂ gebildete PGH₂-Molekül enthält die relativ schwache Epidoxybindung, die über eine Ringöffnung und anschließende Isomerisierungen die Bildung von fünf verschiedenen Prostaglandinen ermöglicht (Schema 1). Dabei ist offen-

[*] Prof. Dr. V. Ullrich, R. Brugger
Fakultät für Biologie der Universität
Postfach 5560, D-78434 Konstanz
Telefax: Int. + 7531/88-3099



Volker Ullrich, geboren am 5. September 1939 in Wetzlar/Lahn, studierte von 1958 bis 1962 Chemie an der Universität Gießen (Diplomarbeit bei P. Ehrlich über Nitridhalogenide des Bariums) und promovierte 1964 bei H. J. Staudinger über „Modelluntersuchungen zum Mechanismus mischfunktioneller Oxygenasen“. Nach Forschungsaufenthalten an der University of Philadelphia (R. W. Estabrook) und an der in Dallas habilitierte er sich 1969 an der Medizinischen Fakultät der Universität Gießen mit „Untersuchungen zum Mechanismus mischfunktioneller Oxygenasen“. 1971 folgte er einem Ruf auf den Lehrstuhl „Physiologische Chemie“ der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes und 1983 dem an die Universität Konstanz, deren Prorektor er von 1991 bis 1993 war. Er ist in der Deutschen Forschungsgemeinschaft aktiv und unter anderem Mitglied der Gesellschaft Deutscher Chemiker und der European Society of Biochemical Pharmacology. Seine Forschungsschwerpunkte sind die Chemie und Biochemie des Sauerstoffs und ihre Anwendung auf pharmakologische Fragestellungen.

sichtlich, daß die Prostaglandine D_2 und E_2 nach einem nucleophilen Mechanismus über eine heterolytische Spaltung der O-O-Bindung entstehen. Dagegen scheint die Biosynthese des Prostacyclins PGI_2 und des Thromboxans TxA_2 , die Sauerstoff-haltige Heterocyclen enthalten, komplizierter. Nachdem durch ^{18}O -Experimente der Charakter einer Isomerisierung für beide Reaktionen nachgewiesen war^[12, 13], wurden heterolytische Spaltungen für das Epidioxid postuliert und die daraus folgenden Umlagerungen in TxA_2 ^[14] und PGI_2 diskutiert^[15]. Eine derartige Chemie erfordert jedoch einen Katalysator, der wirksam die Bildung einer Carbonylgruppe aus dem positiv geladenen Sauerstoffatom verhindert. Wir vermuteten daher die Beteiligung eines Hämproteins, da die einen Thiolatliganden enthaltenden Cytochrom-P450-Monoxygenasen Sauerstoffatome aus Hydroperoxiden auf organische Substrate übertragen können^[16, 17]. Diese Arbeitshypothese konnte verifiziert werden, und unter Nutzung der charakteristischen P450-Spektren gelang uns die Isolierung der zwei Isomerasen, die PGH_2 in TxA_2 bzw. PGI_2 überführen^[18].

In dieser Übersicht fassen wir unsere eigenen Ergebnisse und die anderer Gruppen zusammen und konzentrieren uns auf einen Vergleich der beiden Enzyme, die unter Verwendung des gleichen Substrats und des gleichen katalytischen Zentrums zwei unterschiedliche Produkte mit völlig verschiedenen pharmakologischen und sogar antagonistischen Eigenschaften synthetisieren. So ist PGI_2 ein potenter Vasodilatator und eine antiaggregatorisch wirkende Substanz, während sich TxA_2 vasokonstriktorisch und stark Plättchen-aggregierend verhält^[12]. Aus unseren Ergebnissen konnten Biosynthesemechanismen für beide Verbindungen abgeleitet werden, die zu neuen Einsichten in die Prinzipien der Hämthiolat-Katalyse auch bei anderen Enzymen dieser Superfamilie geführt haben.

2. Isolierung und spektroskopische Charakterisierung der Enzyme

PGI_2 wird hauptsächlich vom Endothel der Blutgefäße^[19] produziert, das daher als Ausgangsmaterial für die Reinigung der entsprechenden Isomerase diente^[20]. In Übereinstimmung mit Literaturdaten konnte die mit der PGI_2 -Synthese verbundene Enzymaktivität im endoplasmatischen Reticulum, dem Hauptteil der mikrosomalen Zellfraktion^[21], lokalisiert werden. Optische Differenzspektroskopie zeigte die Anwesenheit eines P450 (= Hämthiolat)-Proteins mit dem charakteristischen Kohlenmonoxid-Differenzspektrum bei 450 nm nach Reduktion mit Natriumdithionit^[22]. Eine enzymatische Reduktion durch $NADPH_2$ konnte nicht beobachtet werden, was mit der Annahme, daß dieses P450-Protein eine Monoxygenase ist, nicht in Einklang zu bringen war. Nach der Solubilisierung von Aortenmikrosomen mit Detergentien erhielt man eine immer noch aktive Präparation, die durch Affinitätschromatographie mit U46619, dem stabilen CH_2 -O-Analogon von PGH_2 ^[23], durch Immunoaffinitätschromatographie^[24] oder auch mit klassischen Methoden (R. Brugger, unveröffentlicht), weiter gereinigt werden konnte. Die auf diese Weise erhaltene Fraktion aus Aorten war nach der Elektrophorese auf einem SDS-Polyacrylamidgel (SDS = Natriumdodecylsulfat) ein homogenes Protein mit einem Molekulargewicht von etwa 52 kDa und

einer PGI_2 -Synthaseaktivität von etwa 3 s^{-1} ^[25]. Weitere Enzymparameter sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1. Eigenschaften der PGI - und der TxA -Synthase.

	PGI-Synthase [23–25]	TxA -Synthase [25–28]
Molekulargewicht, SDS-Gel [Da]	52 000 (Rind), 49 200 (Schwein)	58 800 (Mensch), 53 000 (Schwein)
Molekulargewicht aus den Sequenzen	56 600 (Rind) [a]	60 500 (Mensch), 58 220 (Maus)
$\lambda_{A_{\text{abs}}}$ [nm] (ox.)	417, 532, 568	418, 537, 570
$\lambda_{A_{\text{abs}}}$ [nm] (red. + CO)	424, 451, 545	424, 450, 545
g -Tensoren (EPR-Spektrum)	2.42, 2.25, 1.90	2.41, 2.25, 1.92
K_M [μM]	9 [b]	10–24
molekulare Aktivität [s^{-1}]	3.5–4.3	27 \times 2 [c]
spez. Aktivität [$\mu\text{mol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$]	2–5	24.1

[a] T. Tanabe, S. Hara, A. Miyata, R. Brugger, V. Ullrich, unveröffentlichte Ergebnisse. [b] R. Brugger, V. Ullrich, unveröffentlichte Ergebnisse. [c] $TxA_2 + HHT$.

Thromboxan A_2 wird aus Blutplättchen freigesetzt, die als geeignetes Ausgangsmaterial für die Isolierung der zugehörigen Isomerase bereits von Hammarström und Falardeau^[28] eingesetzt wurden. Diese Autoren fanden die Syntheseaktivität in der mikrosomalen Fraktion. In der gleichen Fraktion konnten wir ein P450-Protein nachweisen, es mit Detergenten solubilisieren und weiter bis zur Homogenität reinigen^[29]. Die Enzympräparation lieferte auf SDS-Gelen eine einheitliche Bande bei 59 kDa und synthetisierte aus PGH_2 das TxB_2 als stabiles Hydrolyseprodukt von TxA_2 mit einer molekularen Aktivität von etwa 27 s^{-1} . Da hierbei, wie später noch ausgeführt wird, ein zweites enzymatisch erzeugtes Produkt entsteht, erhöht sich die molekulare Aktivität mindestens um den Faktor 2.

Es ist erwiesen, daß die Hämgruppe in Cytochrom-P450-abhängigen Monoxygenasen mit der Thiolatgruppe eines Cysteinrests verknüpft ist, auf den die ungewöhnlichen Charakteristika im optischen und im EPR-Spektrum zurückzuführen sind^[30–34]. Diese in Abbildung 1 dargestellten Charakteristika wurden aus publizierten Daten über das am besten untersuchte

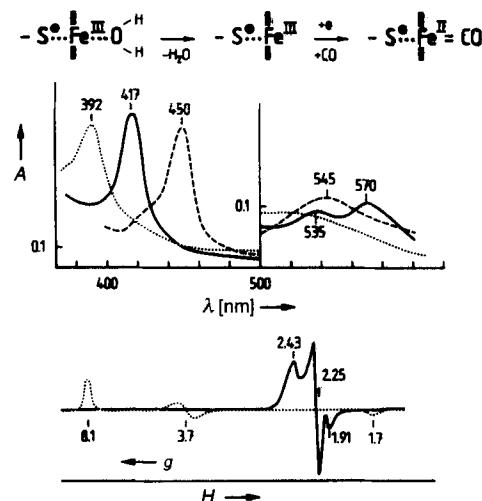


Abb. 1. Reaktionen und zugehörige spektroskopische Charakterisierung von Cytochrom P450_{CAM}. VIS-Spektrum: — $Fe^{III}\text{-H}_2\text{O}$ -Komplex, ····· fünf-fach koordiniertes High-spin- Fe^{II} , - - - $Fe^{II}\text{-CO}$ -Komplex.

Campher-5-Monooxygenase-System aus *Pseudomonas putida* zusammengestellt^[35, 36]. Oxidiertes, Eisen(III) enthaltendes Cytochrom P450 liegt mit einer ungewöhnlich engen Aufspaltung des g-Tensors^[37] in der Low-spin-Form vor. Die Soret-Bande in diesem Redoxzustand, bei dem Wasser die sechste Koordinationsstelle besetzt, was sich sowohl durch einen Vergleich mit Häm-Modellen^[38] als auch aus den Daten der Röntgenstrukturanalyse von Cytochrom P450_{CAM} ergab^[39, 40], liegt bei 417 nm. Nach Zugabe der in den meisten Fällen lipophilen Substrate ändern sich die Spektren der P450-Monooxygenasen drastisch unter Blauverschiebung der Soret-Bande um etwa 26 nm, weil ein Komplex mit fünffach koordiniertem High-spin-Eisenzentrum entsteht^[41]. Nach Reduktion mit Natriumdithionit in Gegenwart von Kohlenmonoxid verschiebt sich die Soret-Bande nach 450 nm. Denaturierung des Proteins oder Protonierung des Thiolatoliganden führen zu einem inaktiven „P420“-Enzym mit einer Soret-Bande bei 420 nm, wie sie bei den meisten Hämproteinen auftritt^[42].

Sowohl die PGI- als auch die TxA-Synthase enthalten je ein Hämprotein pro Polypeptidkette und zeigen die gleichen optischen und EPR-Eigenschaften wie die P450-Monooxygenasen, abgesehen von der Tatsache, daß eine Zugabe des Substrats PGH₂ keine Umwandlung in einen High-spin-Komplex hervorruft, wahrscheinlich wegen des gleichzeitigen Ersatzes des koordinierten Wassers durch den Epidioxyliganden. In Übereinstimmung mit dieser Annahme werden nur sehr geringe spektroskopische Veränderungen unter diesen Bedingungen beobachtet^[22]. Wie noch gezeigt werden wird, können andere Substratanaloga einen Hämkomplex mit fünffach koordiniertem Eisenzentrum bilden. Damit finden sich alle Eigenschaften eines Hämthiolat-Zentrums in den beiden Isomerasen. Übereinstimmend mit der geforderten Rolle des Häms in der Katalyse verbleibt es im Fe^{III}-Zustand und wird nicht enzymatisch reduziert, da eine Elektronenübertragung auf O₂ anders als bei den P450-Monooxygenasen nicht erforderlich ist. Sogar die chemische Reduktion durch Dithionit in Gegenwart von Kohlenmonoxid verläuft langsam und unvollständig.

3. Aminosäuresequenzen der Enzyme

Die spektroskopischen Daten weisen die Prostacyclin- und die Thromboxan-Synthase als Mitglieder der Hämthiolat-Enzymsuperfamilie aus, die inzwischen auf mehr als hundert Monooxygenasen angewachsen ist^[43]. Entsprechend der vorgeschlagenen Nomenklatur^[43] weisen die einzelnen Familien der Hämthiolat-Proteine untereinander eine Aminosäuresequenzhomologie von weniger als 40 % auf. Dabei handelt es sich jedoch um einen willkürlich festgelegten Wert. Die Sequenzen beider Synthasen wurden vor wenigen Jahren in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von T. Tanabe in Osaka ermittelt^[44]. Die menschliche TxA-Synthase besteht aus 533 Aminosäuren und zeigt Homologien zu mehreren P450-Enzymen. Zur humanen Nifedipin-Monooxygenase (P450IIIA4) fanden wir eine maximale Homologie von 36 %, was unabhängig davon auch von Ohashi et al.^[45] bestätigt wurde. Die kürzlich publizierte Sequenz des murinen Enzyms zeigt 78 % Homologie zu der des menschlichen Proteins^[26].

Durch Sequenzzuordnung konnte das Cystein 479 als wahrscheinlicher Hämligand identifiziert werden, und die zehn Aminosäuren in Richtung N-Terminus erwiesen sich als identisch mit denen der humanen C-17-Monooxygenase aus der Nebenniere. Die P450- oder Hämthiolatstruktur der TxA-Synthase konnte somit unabhängig durch die Sequenzdaten bestätigt werden und weist diese Synthase als erstes und bis jetzt einziges Mitglied einer neuen P450-Familie aus.

Die Sequenz der PGI-Synthase wurde mit großem Interesse erwartet, da wegen des gleichen Substrats wie für die TxA-Synthase eine enge Sequenzverwandtschaft vermutet werden konnte. Die insgesamt 500 Aminosäuren zeigten eine Homologie von 31 % zur humanen Cholesterin-7 α -Monooxygenase. Da nur ein einziger Cysteinrest vorhanden und dieser nahe dem C-Terminus lokalisiert ist, mußte dort die Bindungsstelle für das Häm liegen. Die Sequenz der Aminosäuren um diese Häm-Bindungsstelle weist eine deutliche Homologie zu der mehrerer anderer P450-Monooxygenasen und auch zu der der TxA-Synthase auf. Die gesamte Homologie zwischen der PGI- und der TxA-Synthase beträgt jedoch nur 16 %, was in der Nähe des statistischen Wertes liegt. Danach bildet die PGI-Synthase ebenfalls eine neue Familie innerhalb der Hämthiolat-Proteine ohne phylogenetische Beziehung zu der funktionell so nahe verwandten TxA-Synthase. Diese Erkenntnis war zunächst überraschend, jedoch könnte eine Erklärung in den völlig unterschiedlichen Produkten beider Enzyme liegen, die eine unterschiedliche Faltung am aktiven Zentrum voraussetzen.

4. Substrate und Inhibitoren

Da es für beide Enzyme zur Zeit weder die Möglichkeit einer Röntgenstrukturanalyse noch die einer Untersuchung mit zweidimensionaler NMR-Spektroskopie gibt, müssen Aussagen hinsichtlich Substratbindung und Katalysemechanismen durch indirekte Beweisführung abgesichert werden. Chemische Veränderungen am Substratmolekül PGH₂, um so die Wechselwirkungen mit dem Häm-Chromophor über die Analyse von UV/VIS-Spektren zu studieren, führten ebenso wie Untersuchungen mit Inhibitoren zu ausreichenden Informationen über das aktive Zentrum und die beteiligten Mechanismen.

In Tabelle 2 werden Substrate und Produkte für beide Enzyme verglichen. Das wichtigste physiologische Substrat ist

Tabelle 2. Substratspezifität und Metaboliten der PGI- und der TxA-Synthase.

Substrat	PGI-Synthase-Metaboliten	TxA-Synthase-Metaboliten
PGH ₁	—	HHD
PGH ₂	PGI ₂	—
PGH ₃	PGI ₃	—
PGG ₂	15-OOH-PGI ₂	—
8- <i>iso</i> -PGH ₂	—	8- <i>cis</i> -HHT
(13S)-PGH ₂	—	—
15-oxo-PGH ₂	15-oxo-PGI ₂	KHT

PGH₂, das vollständig in PGI₂ umgewandelt wird und als Hydrolyseprodukt 6-oxo-PGF_{1 α} gemessen werden kann^[46]. Schon länger ist bekannt, daß die Thromboxan-Synthase nur zum Teil

TxA_2 und in gleichem oder sogar höherem Ausmaß (12S)-Hydroxy-(5Z,8E,10E)-heptadecatriensäure (HHT) plus äquimolare Mengen an Malondialdehyd (MDA) bildet (siehe Schema 1)^[47]. Da die letztgenannten Produkte auch durch eine chemische Fragmentierung des PGH_2 -Moleküls unter Beteiligung von Übergangsmetallen entstehen, wurden sie anfangs nicht der Katalyse durch das Enzym zugeordnet. Es stellte sich jedoch heraus, daß sowohl das isolierte Enzym als auch das im Baculovirus-System exprimierte ebenfalls 50–70% der Fragmentierungsprodukte synthetisiert^[48]. Daher kann HHT als ein echt enzymatisch erzeugtes Produkt angesehen werden, und jeder vorgeschlagene Mechanismus muß eine Vorstellung über seine Bildung enthalten. Ein pharmakologisch interessantes Substrat ist PGH_3 ($\cong \text{PGH}_2$ mit einer zusätzlichen Doppelbindung zwischen C-17 und C-18), das aus der entsprechenden Icosapentaensäure durch die Cyclooxygenase entsteht. Beide Isoformen verwenden PGH_3 und isomerisieren es zu PGI_3 bzw. TxA_3 . Letzteres ist ein schwächerer Agonist für den TxA_2 -Rezeptor und bedingt dadurch eine geringere Glattmuskelkontraktion und Plättchenaggregation^[49]. Im Gegensatz dazu ist die Wirksamkeit von PGI_3 der von PGI_2 vergleichbar. Daher werden einer Ernährung, die reich an Fischöl ist und einen hohen Anteil an Icosapentaensäure aufweist, positive Wirkungen bei Patienten mit Herzinfarkt-Risiko zugesprochen^[50].

Chemisch interessante Ergebnisse erhält man mit dem entsprechenden PGH_1 ($\cong \text{PGH}$, ohne Doppelbindung zwischen C-5 und C-6) als Substrat. Aus dieser Verbindung kann kein Prostacyclin PGI_1 gebildet werden, da die dafür essentielle Δ^5 -Doppelbindung fehlt. Die PGI -Synthase wandelt dieses Substrat ausschließlich in die Fragmentierungsprodukte (12S)-Hydroxy-(8E,10E)-heptadecadiensäure (HHD) und MDA um. Dies geschieht mit einer molekularen Aktivität von etwa 30 s^{-1} und ist damit etwa zehnmal schneller als die Bildung von PGI_2 aus PGH_2 . Überraschend war allerdings, daß, wie schon in der Literatur berichtet^[14, 51], die Thromboxan-Synthase PGH_1 nicht in TxA_1 , sondern ebenfalls nur in HHD und MDA umwandeln kann. Ein chemischer Grund für die Notwendigkeit der Δ^5 -Doppelbindung ist in diesem Fall nicht ersichtlich. Somit bleibt nur die Annahme, daß die räumliche Anordnung der Carbonsäureseitenkette eine wichtige Determinante für die Ausrichtung des Substrats im aktiven Zentrum ist. Daß die molekulare Aktivität der Thromboxan-Synthase für die PGH_1 -Spaltung etwa gleich groß ist wie für die TxA_2 -Bildung einschließlich der HHT-Bildung, stützt die Vermutung, daß HHT aus einem gemeinsamen Zwischenprodukt entsteht. Außerdem spricht dieser Befund dafür, daß bei der Katalyse durch die Thromboxan-Synthase die Spaltung der O-O-Bindung geschwindigkeitsbestimmend ist, während bei der langsameren Reaktion im Falle der PGI -Synthase die kinetische Limitierung in einem späteren Reaktionsschritt erfolgt. Eine weitere wichtige Information bezüglich des Mechanismus kann mit dem Stellungsisomer 8-*iso*- PGH_2 als Substrat erhalten werden, das lediglich zu den Fragmentierungsprodukten führt und damit ebenfalls dokumentiert, daß die räumliche Anordnung der α -Seitenkette für die Ringschlußreaktion zu PGI_2 von entscheidender Bedeutung ist.

Durch Inhibitorstudien erhielten wir ergänzende Informationen zur räumlichen Anordnung der Substrate. Die Bemühungen der pharmazeutischen Industrie um die Synthese von Thrombo-

xan-Synthase-Inhibitoren als antiaggregatorischen Pharmazeutika haben zu einer Vielfalt an wirksamen (und meist stöchiometrisch bindenden) Substanzen geführt. Über Struktur-Aktivitäts-Beziehungen konnte daraus auf die Orientierung des PGH_2 -Substrats im aktiven Zentrum der Thromboxan-Synthase geschlossen werden^[52, 53]. Es stellte sich heraus, daß alle fest bindenden Inhibitoren über ein basisches Stickstoffatom verfügen, das an der sechsten Koordinationsstelle des Häm-Eisen-Zentrums angreifen kann. Zusätzlich enthalten sie eine lipophile Seitenkette mit Carboxylatgruppe, die sich über eine Länge von etwa 10 Å mit einem Winkel von etwa 60° bezüglich der Häm-Ebene erstreckt (Abb. 2).

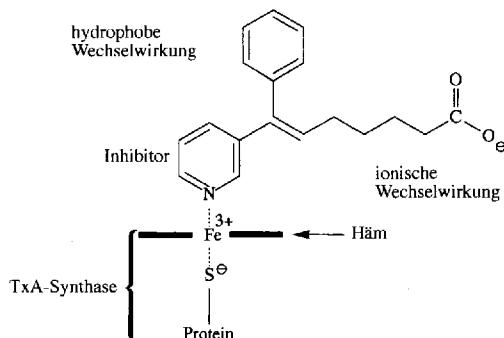


Abb. 2. Inhibitorbindung an die sechste Koordinationsstelle der TxA-Synthase.

Aus diesen Untersuchungen entstand die Vorstellung, daß das PGH_2 -Molekül mit der Epidioxybrücke an das Hämeisenatom bindet und die PGH_2 -Seitenkette die gleiche Position einnimmt wie die Carboxylatseitenkette der Inhibitoren. Unter einer Vielzahl von getesteten Verbindungen zeigte der Komplex aus dem Hämprotein und einem Pyridinderivat mit einer Carboxylatseitenkette in der *ortho*-Position nicht das typische Stickstoffliganden-Spektrum, sondern eine Soret-Bande bei 390 nm, die auf ein fünfzehnmal koordiniertes High-spin-Eisenzentrum hinweist. Aus der sterischen Unzulänglichkeit des N-Atoms resultierte eine offensichtlich nur geringe Bindungsaffinität, die jedoch ausreichend war, um den vorhandenen endogenen sechsten Liganden zu verdrängen. Bei diesem dürfte es sich nach den mit anderen P450-Monooxygenasen identischen spektroskopischen Eigenschaften um ein Wassermolekül handeln, wie es bei der Camphor-Monooxygenase nachgewiesen wurde.

Keiner der Inhibitoren der TxA-Synthase, weder Imidazol noch einfache Pyridinderivate, reagierte laut Spektren mit der PGI -Synthase oder konnte diese hemmen^[25, 53]. Dies ist eine Grundvoraussetzung für die therapeutische Anwendung als Thromboxan-Synthase-Inhibitoren, da andernfalls die positiven Effekte der PGI -Synthase ebenfalls beeinträchtigt werden könnten. Schließt man zurück auf die räumliche Anordnung am aktiven Zentrum der PGI -Synthase, so läßt sich aus dem Fehlen einer Hemmwirkung von Imidazol- und Pyridinliganden auf eine sehr eingeschränkte Zugänglichkeit des Raumes über der sechsten Eisen-Koordinationsstelle schließen. Als Inhibitor der PGI -Synthase wurde ein Cyclopropylaminlderivat (*trans*-2-Phenylcyclopropylamin) beschrieben, das nach seinen Differenzspektren mit dem Aminostickstoffatom an das Hämeisenzentrum binden muß. Eine andere Stickstoffverbindung, Minoxidil (6-(1-Piperidyl)-2,4-diaminopyrimidin-3-oxid), zeigt ähnliche

Veränderungen der Spektren bei hoher Bindungsaffinität ($K_s = 2.4 \mu\text{M}$), aber nur schwacher Hemmung der Enzymaktivität ($\text{IC}_{50} = 90 \mu\text{M}$)^[54]. Aus diesen beiden Beispielen von N-Ligan- den für die PGI-Synthase kann geschlossen werden, daß deren sechste Eisenkoordinationsstelle nur für Stickstoffverbindungen zugänglich ist, in denen die Seitenketten fast senkrecht zur Eisen-Stickstoff-Achse liegen. Übertragen auf die Bindung von PGH_2 an das aktive Zentrum würde dies eine horizontale und entgegengesetzte Anordnung von Carboxylat- und Alkylkette bedeuten und damit völlig unterschiedliche Substratkonformationen für die TxA - und die PGI-Synthase (Abb. 3). Dies würde auch die völlig unterschiedlichen Sequenzen beider Enzyme erklären.

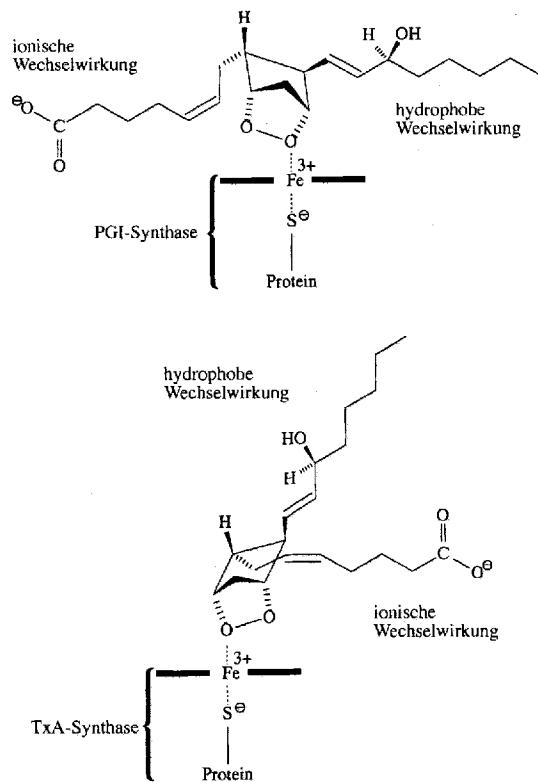


Abb. 3. Substratbindung an die aktiven Zentren der PGI- und der Tx-A-Synthase.

5. Mechanistische Studien und Hypothesen

Alle Bemühungen zur Aufklärung der Mechanismen der Umlagerung von PGH_2 in PGI_2 und TxA_2 müssen die Spaltung der Sauerstoff-Sauerstoff-Bindung als ersten Schritt berücksichtigen. Erfolgt diese heterolytisch, könnte entweder an C-9 ein positiv geladenes Sauerstoffatom entstehen, das dann in einfacher Weise zu PGI_2 führen würde^[151], oder es könnte an C-11 ein positiv geladenes Sauerstoffatom gebildet und damit der Weg zu TxA_2 eröffnet werden^[14]. Der experimentelle Nachweis für einen ionischen Mechanismus konnte jedoch nicht geführt werden^[55], und in der Tat würde die Erzeugung eines positiv oder negativ geladenen Sauerstoffatoms im aktiven Zentrum beider Enzyme ohne sofortige Isomerisierung von PGH_2 zu PGD_2 oder PGE_2 einen ungewöhnlichen Mechanismus darstellen.

Der damit verbleibende Mechanismus einer homolytischen Spaltung der O-O-Bindung wurde erstmals von Turner und

Herz^[56] mit Fe^{II} als dem spaltenden Agens postuliert. Das dabei entstehende Fe^{III} -Ion könnte als oxidierendes Agens für das intermedial auftretende C-5-Radikal dienen. Die Annahme von Eisen-Ionen als Katalysatoren für die Epidioxidspaltung ist in Einklang mit unserem späteren Nachweis einer Hämthiolat-Gruppe am aktiven Zentrum, jedoch kann eine Reduktion des dreiwertigen Eisens zum zweiwertigen ausgeschlossen werden. Entweder ermöglichen die Elektronendonator-Eigenschaften der Hämthiolat-Gruppe eine hydrolytische Spaltung unter Stabilisierung eines positiv geladenen Sauerstoffatoms^[57], oder es müßte eine homolytische Spaltung durch die Fe^{III} -Form erfolgen. Daß der letztere Mechanismus wahrscheinlicher ist, konnte indirekt durch die spektroskopischen Studien mit stabilen PGH_2 -Analoga gezeigt werden^[25].

Das Konzept, stabile Substratanaloga als Inhibitoren der PGH_2 -Isomerase zu verwenden, lag nahe, und bereits zu einem frühen Zeitpunkt wurden in der pharmazeutischen Industrie einige Analoga von PGH_2 , darunter U46619 und U44069, synthetisiert, in denen die O-O- durch eine CH_2O -Brücke ersetzt ist^[58]. Beide Isomere hemmten sowohl die PGI- als auch die TxA -Synthase, unterschieden sich aber im Einfluß auf die Spektren (Abb. 4)^[25]. Während U46619 ein charakteristisches

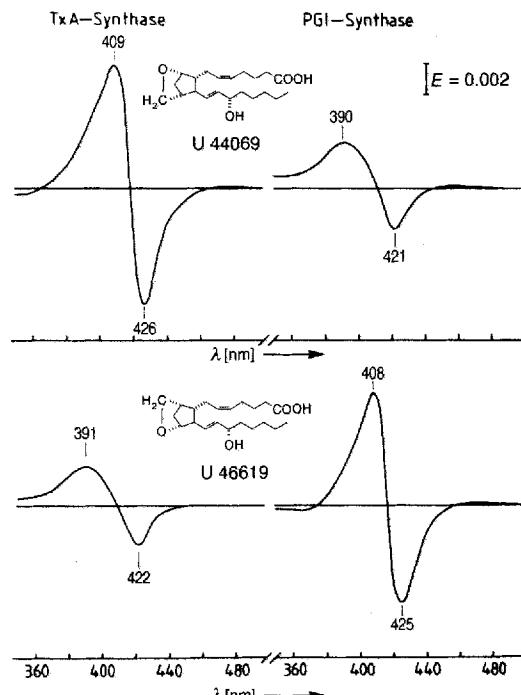


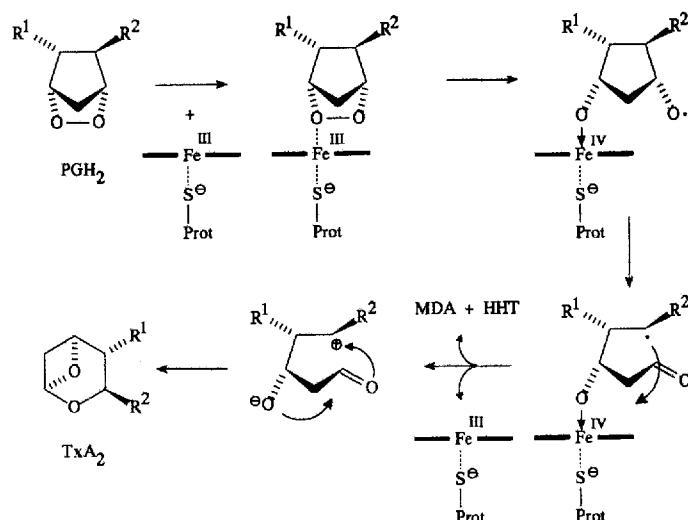
Abb. 4. Optische Differenzspektren der Komplexe aus solubilisierter Tx-A- und PGI-Synthase und den PGH_2 -Analoga U44069 und U46619.

Ligandendifferenzspektrum mit der Tx-A-Synthase ergab, resultierte mit U44069 ein typisches „High-spin“-Spektrum mit einer Bande bei 390 nm. Bei der PGI-Synthase war die Situation umgekehrt, woraus geschlossen wurde, daß das Fe^{III} -Ion der Tx-A-Synthase an die 9-Position, das der PGI-Synthase dagegen an die 11-Position des PGH_2 -Moleküls bindet^[25]. Aus Abbildung 4 läßt sich folgern, daß der Ersatz eines Epidioxysauerstoffatoms durch eine Methylengruppe eine Bindung an dieser Position verhindert, woraus dann, wie in den Enzym-Substrat-

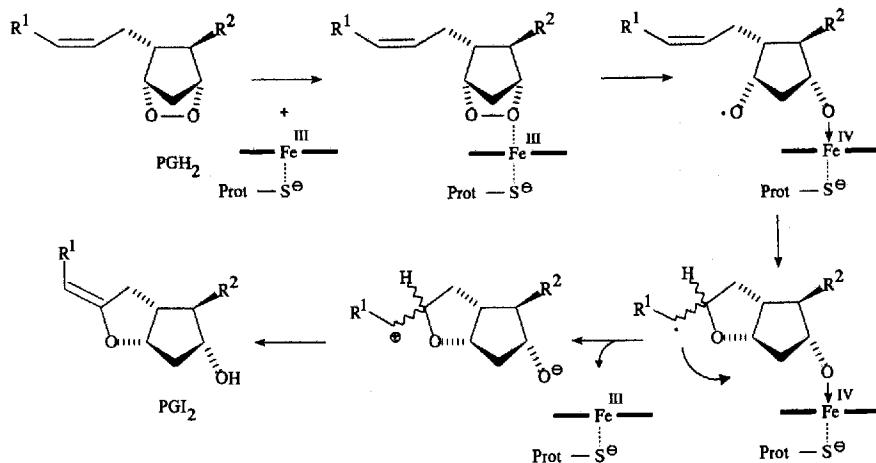
Komplexen der P450-Monooxygenasen^[32], ein Zustand mit fünffach koordiniertem Eisenzentrum resultiert.

Diese unerwartete Unterscheidung der beiden Epidioxy-sauerstoffatome durch die katalytischen Zentren beider Enzyme erlaubte es, eine Wechselwirkung zwischen dem Fe^{III}-Zentrum und dem Sauerstoffatom an C-11 für den PGH₂-PGI-Synthase-Komplex zu postulieren. Damit war auch eine heterolytische Spaltung mit einer Komplexierung des Sauerstoff-Kations durch das Fe^{III}-Ion ausgeschlossen. Die anschließende homolytische Spaltung könnte dann durch eine Spin-Spin-Kopplung zwischen dem Fe^{III}-Ion und dem 11-O-Radikal erleichtert werden (Fe^{IV}-O⁻). Damit verbliebe ein freies Sauerstoffradikal an C-9 als aktives Reagens für den Angriff auf die Δ^5 -Doppelbindung^[25, 51] (Schema 2). Das dabei entstehende C-4-Radikal wird durch das nun formal vierwertige Hämeisenzentrum oxidiert, und durch Wanderung eines Protons von C-5 zu 11-O entsteht PGI₂.

Dieser Mechanismus stimmt mit der beobachteten Substratspezifität überein, nach der ein Ringschluß nur möglich ist, wenn in der α -Seitenkette eine (E)- oder (Z)-konfigurierte Doppelbindung zwischen C-5 und C-6 mit der gleichen räumlichen Orientierung wie die Epidioxygruppe am Cyclopentanring^[25, 51] vorhanden ist. Veränderungen in der Alkylseitenkette blieben ohne Einfluß. Dieser Mechanismus ist in Einklang mit der Beobachtung, daß sowohl PGH₁ (Fehlen der Δ^5 -Dop-



Schema 3. Mechanismus der TxA₂-Biosynthese.



Schema 2. Mechanismus der PGI₂-Biosynthese. R¹ = (CH₂)₅-CO₂H, R² = CH=CH-CHOH-(CH₂)₄-CH₃.

pelbindung) als auch 8-*iso*-PGH₂ in die entsprechenden Fragmentierungsprodukte HHD bzw. 8-*cis*-HHT und Malondialdehyd (Tabelle 2) umgewandelt werden. Damit ergibt sich die Spaltung der Epidioxybrücke als Initialschritt, der ohne geeignete räumliche Orientierung der α -Seitenkette zur Fragmentierung führt.

Im Falle der Thromboxan-Synthase bindet das Hämeisenzentrum an das Sauerstoffatom 9-O von PGH₂, und nach homolytischer Spaltung entsteht ein freies Sauerstoffradikal an C-11 (Schema 3). Dieses Zwischenprodukt unterliegt einer Ringspaltung unter Bildung eines Radikalzentrums an C-12, wie bereits von Turner und Herz^[56] postuliert wurde. Analog wie bei der PGI₂-Synthese kann dieses Radikal vom Fe^{IV}-Zentrum zu ei-

nem Carbokation oxidiert werden, das dann eine elektrophile Umlagerung eingeht.

Die Tatsache, daß 13,14-Dihydro-PGH₂ ausschließlich in HHD und Malondialdehyd fragmentiert, stützt diesen Mechanismus, da die Δ^{13} -Doppelbindung für eine allylische Stabilisierung des C-12-Radikals erforderlich ist. Fragmentierungen treten auch bei PGH₁, 8-*iso*-PGH₂ und $\Delta^4(E)$ -PGH₁^[51] auf. Dies unterstreicht die Bedeutung einer passenden räumlichen Anordnung der α -Seitenkette im aktiven Zentrum. Ein noch zu diskutierendes charakteristisches Merkmal der TxA-Synthase und ihres physiologischen Substrats PGH₂ ist die Bildung von HHT und Malondialdehyd neben der von TxA₂. Mindestens 50–70 % des PGH₂ werden enzymatisch in diese Produkte umgewandelt, für die noch keine physiologische Rolle gefunden wurde. Ihre Bildung ist jedoch eindeutig enzymatisch, und sie müssen aus einem Intermediat entstehen, bei dem es sich wahrscheinlich um das C-12-Radikal handelt. Eine Fragmentierung ist immer dann unvermeidlich, wenn der Elektronentransfer (oder eine bindende Wechselwirkung zwischen dem Eisenzentrum und dem C-Radikal) nicht als schnelle Folgereaktion einsetzt. Es bleibt abzuklären, ob die Fragmentierungsprodukte bei der PGH₂-Isomerisierung durch die TxA-Synthase nur Nebenprodukte eines nicht perfekten Enzyms sind oder ob sie eine noch unbekannte Funktion im Signaltransduktionsweg erfüllen^[59].

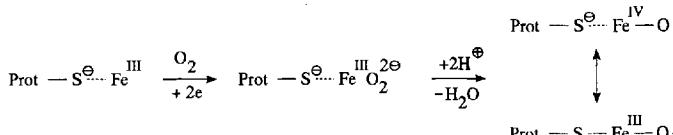
Im Vergleich der postulierten Mechanismen erkennt man für die PGI- und die TxA-Synthase als gemeinsames mechanistisches Grundprinzip die homolytische Epidioxydsspaltung durch Fe^{III}, die Umlagerung in ein Kohlenstoffradikal und dessen Oxidation durch das [S-Fe-OR]³⁺-System. Strikte sterische Kontrolle dieses Schrittes scheint essentiell, da, wie in Abbildung 3 skizziert, für beide Enzyme zwei sehr verschiedene Orientierun-

gen des PGH₂-Moleküls in bezug auf die katalytisch aktive Hämgruppe erforderlich sind.

Angesichts der sehr geringen Homologien in den Sequenzen beider Enzyme würde man voraussagen, daß die Faltung der Polypeptidkette zum aktiven Zentrum bei beiden Enzymen sehr unterschiedlich sein muß. Eine Erklärung hierfür könnte in dem Konzept von evolutionär mobilen Modulen und Motiven in Proteinen gefunden werden^[60].

6. Gemeinsame Prinzipien der Katalyse durch Hämthiolat-Enzyme

Obwohl ihre enzymatischen Funktionen völlig verschieden sind, haben spektroskopische Gemeinsamkeiten und die Analyse der Reaktionssequenzen die enge Verwandtschaft von TxA- und PGI-Synthase mit den Hämthiolat-Monoxygenasen gezeigt. Eine genauere mechanistische Betrachtung ergibt, daß Monoxygenasen als einzige zusätzliche Funktion den Zweielektronen-Transfer auf O₂ durchführen, der zur Bildung eines Peroxokomplexes als Intermediat führt, das nach Eliminierung von Wasser den oxenoiden Komplex als „aktive Sauerstoffspezies“ generiert^[61-63] (Schema 4).

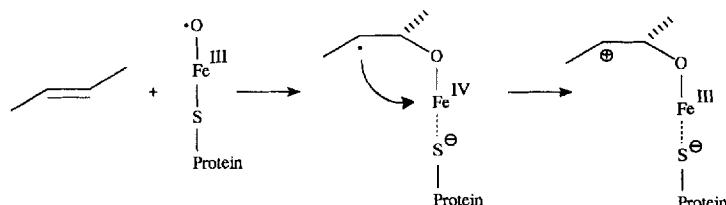


Schema 4. Sauerstoffaktivierung durch Bildung eines oxenoiden Komplexes zwischen Cytochrom P450 und Sauerstoff.

Mit dem Sauerstoffatomdonor Iodosobenzol konnten bei vielen Monoxygenasen die aktiven Sauerstoffintermediate chemisch erzeugt werden^[64], was zur Entwicklung mehrerer Monoxygenierungskatalysatoren auf der Basis von Übergangsmetallkomplexen geführt hat^[65, 66]. Da der Sauerstofftransfer bei P450-Monoxygenasen aus dem Fe^{III}-Zustand heraus erfolgt, sollte dieser Transfer auch an den Hämthiolat-Zentren der beiden Synthasen ablaufen, wenn ein geeignetes PGH₂-Analogon als Substrat gebunden ist. Dies ist mit U46619 (siehe Abb. 4) und der TxA-Synthase der Fall, und in Gegenwart von Iodosobenzol konnten in Übereinstimmung mit dieser Hypothese zwei hydroxylierte Produkte durch GC/MS identifiziert werden, die neben anderen Produkten auch in einem Hydroxylierungssystem aus mikrosomalen Leber-Cytochrom-P450-Formen, NADPH₂ und Sauerstoff gebildet wurden^[67]. Offensichtlich zeigt das Hämthiolat-Zentrum der TxA-Synthase die gleichen Sauerstofftransfereigenschaften wie die der Monoxygenasen.

Aufgrund dieser engen Analogie zu den Monoxygenasen konnten weitere Vermutungen über zusätzliche Funktionen der Hämthiolat-Gruppe bei den Monoxygenasen angeschlossen werden. Aus der Formulierung eines radikalischen Angriffs des aktiven Sauerstoffs auf die Substrate der Monoxygenasen muß man ein Radikal als Zwischenprodukt erwarten, das im Falle der Epoxidierung an der Doppelbindung entweder zu einem Radikalkation oder zu einem Intermediat mit Eisen-Kohlenstoff-Bindung oxidiert wird (Schema 5).

Im Gegensatz etwa zu Hydroxylierungen mit OH-Radikalen konnten bei der enzymatischen Reaktion keine freien Radikale als Zwischenprodukte nachgewiesen werden, so daß entweder der Elektronentransfer oder die Radikalkopplung extrem schnell verlaufen muß. Nur dies würde die Stereospezifität der enzymatischen Reaktionen erklären. Bei einem Vergleich dieser Reaktionsabfolge mit der Umlagerung von PGH₂ in PGI₂ oder TxA₂ (Schema 2 bzw. 3) findet man dort die gleiche Notwendigkeit für einen rasch verlaufenden Elektronentransfer (Schema 5). Entsprechend läßt sich postulieren, daß die ungewöhnli-

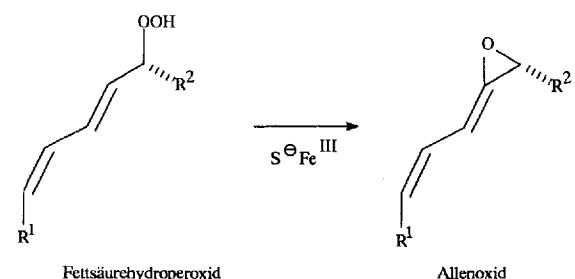


Schema 5. Mechanismus der Epoxidierung mit Häm-aktiviertem Sauerstoff.

chen Redoxeigenschaften der Hämthiolat-Gruppe die sehr schnelle Aufnahme eines Elektrons von einem Kohlenstoffradikal-Zwischenprodukt ermöglichen. Daß dies in einem konzentrierten Mechanismus über die Bildung einer Eisen-Kohlenstoff-Bindung erfolgt, scheint aus den sterischen Gegebenheiten am Häm und aus der Fragmentierungsreaktion, die bei der TxA-Synthase eintritt, weniger wahrscheinlich. Diese Fragmentierung kann als typische Konsequenz eines freien Radikals als Zwischenprodukt gedeutet werden. Es sind darüber hinaus Ergebnisse bekannt, die für Monoxygenasen eine teilweise Racemisierung am asymmetrischen Kohlenstoffatom während der Hydroxylierung nachweisen, wodurch ebenfalls ein freies, aber extrem kurzelebiges Kohlenstoffradikal wahrscheinlich wird^[68].

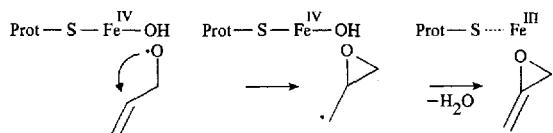
7. Weitere Implikationen der Katalyse durch Hämthiolat-Enzyme

Ein zentraler Schritt der Hämthiolat-katalysierten Monoxygenierungen und der beiden Umlagerungen durch die Isomerasen ist die Bildung eines reaktiven Sauerstoffradikals, das dann ein organisches Substrat über einen Radikalmechanismus angreift. In einem dritten Schritt wird das C-Radikal oxidiert, entweder durch Elektronentransfer auf das formale Häm-Fe^{IV}-Zentrum oder über eine intermediäre Eisen-Kohlenstoff-Bindung.



Schema 6. Allenoxid-Synthase-katalysierte Reaktion; R¹ = C₇H₁₄-COOH, R² = C₈H₁₁, Lit. [69].

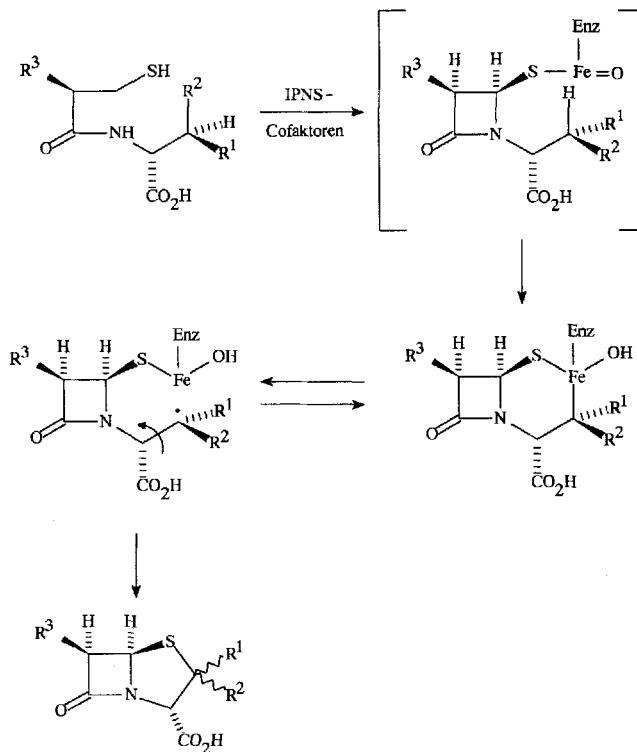
Kürzlich wurde ein dritter Typ von P450-katalysierten Reaktionen beschrieben, in denen Fettsäurehydroperoxide durch ein Hämthiolat-Enzym aus Pflanzen-, Korallen- oder Seestern-Oozyten in Allenoxide umgelagert werden^[69] (Schema 6). Nach dem hier postulierten allgemeinen Mechanismus einer Hämthiolat-Katalyse sollte die Umlagerung über eine homolytische O-O-Bindungsspaltung verlaufen, gefolgt von einem Angriff des O-Radikals auf die benachbarte Doppelbindung und der Oxidation des C-Radikals (Schema 7).



Schema 7. Postulierter Mechanismus der Hämthiolat-katalysierten Fettsäurehydroperoxid-Allenoxid-Umlagerung.

Die Analogien zu den Epoxidierungen durch Hämthiolat-Monoxygenasen und zu den Epidioxidumlagerungen sind offensichtlich. Aus den postulierten Abfolgen bei den Hämthiolat-abhängigen Mechanismen geht keine Abhängigkeit des Eisenzentrums von Porphyrin als Ligand hervor. Andere Eisenthiolat-Strukturen könnten ähnliche Eigenschaften haben. Ein gutes Beispiel mag die Penicillin-Biosynthese sein, die ausführlich untersucht^[70] und für die der in Schema 8 gezeigte Mechanismus vorgeschlagen wurde.

In diesem Fall bindet das Nicht-Häm-Fe^{II}-Zentrum der Iso-penicillin-N-Synthase (IPNS) an die Thiolgruppe des Substrats und bildet zunächst einen oxenoiden Komplex, in dem das



Schema 8. Mechanismus der Penicillin-N-Biosynthese aus Lit. [71]; R¹ = R² = CH₃, R³ = NH-CO-(CH₂)₃-CH(NH₂)-COOH.

Sauerstoffatom genügend Radikalcharakter aufweist, um das tertiäre Wasserstoffatom aus dem Valinrest zu abstrahieren. Der resultierende Fe^{IV}-Komplex könnte mit dem C-Radikal eine Spin-Spin-Kopplung eingehen, aber da die einheitliche Konfiguration an diesem Zentrum verloren ging^[71], könnte die Reaktion ebenso ohne die postulierte Eisen-Kohlenstoff-Bindung ablaufen. Der Ringschluß am Ende der Reaktion könnte wieder die Konsequenz einer Radikalalkopplung sein oder als Elektronentransfer auf den Fe^{IV}-Komplex mit nachfolgender elektrophiler Umlagerung erklärt werden. Damit werden die Grundprinzipien der Eisenthiolat-Katalyse auch bei dieser dehydrierenden Cyclisierung offensichtlich.

Noch keine detaillierteren Studien gibt es zum Mechanismus der durch die Chlorperoxidase, ein anderes Hämthiolat-Enzym, katalysierten Chlorierung von organischen Verbindungen mit aktivierten C-H-Bindungen^[72, 73]. Da jedoch H₂O₂ als Cosubstrat verwendet wird und das Chlorid-Ion am aktiven Zentrum gebunden ist, könnte die Chlorierungsreaktion ebenfalls eine H-Atom-Abstraktion vom Substrat beinhalten^[74]. Daran könnte sich wiederum ein Elektronentransfer vom C-Radikal zum -S-Fe-OH-Komplex mit anschließender Addition des Chlorid-Ions anschließen.

Es hat den Anschein, daß sich immer dann -S-Fe-O-Strukturen bilden können, wenn ein Eisenthiolat-Zentrum mit Sauerstoffverbindungen, die ein erhöhtes Oxidationspotential haben, kombiniert wird. Daraus resultieren Radikalreaktionen, denen schnelle Elektronentransfers folgen, so daß Radikalketten vermieden werden können. Dies ist eine ausgezeichnete Basis für die enzymatische Katalyse. Einer Anwendung in der homogenen chemischen Katalyse steht entgegen, daß Thiolatliganden selbst Kandidaten für einen Transfer von Sauerstoff oder Elektronen sind, jedoch könnten sie durch geeignetes Abschirmen möglicherweise für die heterogene Katalyse interessant werden.

Unsere eigenen Beiträge wurden über viele Jahre durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft und den Fonds der Chemischen Industrie unterstützt. Den früheren Mitarbeitern M. Haurand, M. Hecker und R. Nüsing sowie der Arbeitsgruppe von T. Tanabe (Osaka) sei an dieser Stelle für ihre Beiträge gedankt.

Eingegangen am 12. November 1993 [A 35]

- [1] K. I. Williams, G. A. Higgs, *J. Pathol.* **1988**, *156*, 101–110.
- [2] S. Moncada, J. R. Vane, *Pharmacol. Rev.* **1978**, *30*, 293–331.
- [3] S. Bergström, L. A. Carlson, J. R. Weeks, *Pharmacol. Rev.* **1968**, *20*, 1–48.
- [4] W. L. Smith, *Biochem. J.* **1989**, *259*, 315–324.
- [5] O. Hayashi, *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 14593–14596.
- [6] *Prostaglandins in Clinical Practice* (Hrsg.: W. D. Watkins, M. D. Peterson, J. R. Fleischer), Raven, New York, **1989**.
- [7] K. Schröder, *Prostaglandine und verwandte Verbindungen*, Thieme, Stuttgart, **1984**.
- [8] B. Samuelsson, *Angew. Chem.* **1983**, *95*, 854–864; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1983**, *22*, 805–815.
- [9] R. A. Johnson, *Adv. Prostaglandin Thromboxane Leukotriene Res.* **1985**, *14*, 131–154.
- [10] P. Needleman, J. Turk, B. A. Jakschik, A. R. Morrison, J. B. Lefkowitz, *Annu. Rev. Biochem.* **1986**, *55*, 69–102.
- [11] W. L. Smith, L. J. Marrett, D. L. DeWitt, *Pharmacol. Ther.* **1991**, *49*, 153–179.
- [12] M. Hamberg, J. Svensson, B. Samuelsson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1975**, *72*, 2994–2998.
- [13] R. A. Johnson, D. R. Morton, J. H. Kinner, R. R. Gorman, J. C. McGuire, F. F. Sun, N. Whittaker, S. Bunting, J. Salmon, S. Moncada, J. R. Vane, *Prostaglandins* **1976**, *12*, 915–928.
- [14] U. Diczfalusy, P. Falardeau, S. Hammarström, *FEBS Lett.* **1977**, *84*, 271–274.
- [15] J. Fried, J. Barton, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1977**, *74*, 2199–2203.

- [16] A. D. Rahimtula, P. J. O'Brien, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1974**, *60*, 440–447.
- [17] F. Lichtenberger, W. Nastainczyk, V. Ullrich, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1976**, *70*, 939–946.
- [18] V. Ullrich, H. Graf, *Trends Pharmacol. Sci.* **1984**, *5*, 352–355.
- [19] S. Moncada, R. Gryglewski, S. Bunting, J. R. Vane, *Nature* **1976**, *263*, 663–665.
- [20] P. Wlodawer, S. Hammarström, *FEBS Lett.* **1979**, *97*, 32–36.
- [21] S. Bunting, R. Gryglewski, S. Moncada, J. R. Vane, *Prostaglandins* **1976**, *12*, 685–713.
- [22] V. Ullrich, L. Castle, P. Weber, *Biochem. Pharmacol.* **1981**, *30*, 2033–2036.
- [23] H. Graf, V. Ullrich in *Cytochrome P450, Biochemistry, Biophysics and Environmental Implications* (Hrsg.: E. Hietanen, M. Laitinen, O. Hanninen), Elsevier, New York, **1982**, S. 103–106.
- [24] D. L. DeWitt, W. L. Smith, *J. Biol. Chem.* **1983**, *258*, 3285–3293.
- [25] M. Hecker, V. Ullrich, *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 141–150.
- [26] L. Zhang, M. B. Chase, R.-F. Shen, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1993**, *194*, 741–748.
- [27] R. F. Shen, H. H. Tai, *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 11592–11599.
- [28] S. Hammarström, P. Falardeau, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1977**, *74*, 3691–3695.
- [29] M. Haurand, V. Ullrich, *J. Biol. Chem.* **1985**, *260*, 15059–15067.
- [30] H. S. Mason, J. C. North, M. Vanneste, *Fed. Proc.* **1965**, *24*, 1172–1180.
- [31] A. Röder, E. Bayer, *Eur. J. Biochem.* **1969**, *11*, 89–92.
- [32] H. A. O. Hill, A. Röder, R. J. P. Williams, *Struct. Bonding (Berlin)* **1970**, *8*, 123.
- [33] S. C. Tang, S. Koch, G. C. Papaefthymiou, S. Foner, R. B. Frankel, J. A. Ibers, R. H. Holm, *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, *98*, 2424–2434.
- [34] P. M. Champion, B. R. Stallard, G. C. Wagner, I. C. Gunsalus, *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 5469–5472.
- [35] R. Tsai, C.-A. Yu, I. C. Gunsalus, J. Peisach, W. Blumberg, W. H. Orme-Johnson, H. Beinert, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1970**, *66*, 1157–1163.
- [36] J. A. Peterson, *Arch. Biochem. Biophys.* **1971**, *144*, 678–693.
- [37] Y. Hashimoto, T. Yamano, H. S. Mason, *J. Biol. Chem.* **1962**, *237*, 3843–3844.
- [38] V. Ullrich, H. H. Ruf, P. Wende, *Croat. Chem. Acta* **1977**, *49*, 213–222.
- [39] T. L. Poulos, B. C. Finzel, A. J. Howard, *J. Mol. Biol.* **1987**, *195*, 687–700.
- [40] T. L. Poulos, B. C. Finzel, I. C. Gunsalus, G. C. Wagner, J. Kraut, *J. Biol. Chem.* **1985**, *260*, 16122–16130.
- [41] J. P. Collman, T. N. Sorrell, B. M. Hoffmann, *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 913–914.
- [42] T. Omura, R. Sato, *J. Biol. Chem.* **1964**, *239*, 2370–2378.
- [43] D. R. Nelson, T. Kamataki, D. J. Waxman, F. P. Guengerich, R. W. Estabrook, R. Feyereisen, F. J. Gonzalez, M. J. Coon, I. C. Gunsalus, O. Gotoh, K. Okuda, D. W. Nebert, *DNA Cell Biol.* **1993**, *12*, 1–51.
- [44] C. Yokoyama, A. Miyata, H. Ihara, V. Ullrich, T. Tanabe, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1991**, *178*, 1479–1484.
- [45] K. Ohashi, K.-H. Ruan, R. J. Kulmacz, K. K. Wu, L.-H. Wang, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 789–793.
- [46] J. A. Salmon, R. J. Flower, *Methods Enzymol.* **1982**, *86*, 93–99.
- [47] M. Hecker, M. Haurand, V. Ullrich, U. Diczfalusi, S. Hammarström, *Arch. Biochem. Biophys.* **1987**, *254*, 124–135.
- [48] C. Yokoyama, A. Miyata, K. Suzuki, Y. Nishikawa, T. Yoshimoto, S. Yamamoto, R. Nüssing, V. Ullrich, T. Tanabe, *FEBS Lett.* **1993**, *318*, 91–94.
- [49] P. Needelman, A. Raz, M. S. Minkes, J. A. Ferrendelli, H. Sprecher, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1979**, *76*, 944–948.
- [50] S. Fischer, P. C. Weber, *Nature* **1984**, *307*, 165–158.
- [51] S. Hammarström, U. Diczfalusi, *Adv. Prostaglandin Thromboxane Res.* **1980**, *6*, 267–274.
- [52] K. Kato, S. Ohkawa, S. Terao, Z. Terashita, K. Nishikawa, *J. Med. Chem.* **1985**, *28*, 287–294.
- [53] M. Hecker, M. Haurand, V. Ullrich, S. Terao, *Eur. J. Biochem.* **1986**, *157*, 217–223.
- [54] M. Hecker, V. Ullrich, *Biochem. Pharmacol.* **1988**, *37*, 3363–3365.
- [55] W. A. Pryor, J. P. Stanley, *J. Org. Chem.* **1975**, *40*, 3614–3615.
- [56] J. A. Turner, W. Herz, *Experientia* **1977**, *33*, 1133–1134.
- [57] H. Graf, H. H. Ruf, V. Ullrich, *Angew. Chem.* **1983**, *95*, 497–498; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1983**, *22*, 487–488.
- [58] G. L. Bundy, *Tetrahedron Lett.* **1975**, 1957–1960.
- [59] M. Hecker, V. Ullrich, *Eicosanoids* **1988**, *1*, 19–25.
- [60] R. F. Doolittle, P. Bork, *Sci. Am.* **1993**, *269*(4), 34–40; *Spektrum der Wissenschaften* **1994** (12), 40–47.
- [61] V. Ullrich, *J. Mol. Catal.* **1980**, *7*, 159–167.
- [62] V. Ullrich, *Angew. Chem.* **1972**, *84*, 689–710; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1972**, *11*, 701–712.
- [63] R. E. White, M. J. Coon, *Annu. Rev. Biochem.* **1980**, *49*, 315–356.
- [64] J.-A. Gustafsson, L. Rondahl, J. Bergman, *Biochemistry* **1979**, *18*, 865–870.
- [65] J. T. Groves, W. J. Kruper, Jr., *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 7613–7615.
- [66] J. T. Groves, W. J. Kruper, Jr., R. C. Haushalter, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 6375–6377.
- [67] M. Hecker, W. J. Baader, P. Weber, V. Ullrich, *Eur. J. Biochem.* **1987**, *169*, 563–569.
- [68] J. T. Groves, G. A. McGlusky, R. E. White, M. J. Coon, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1978**, *81*, 154–160.
- [69] W.-C. Song, A. R. Brash, *Science* **1991**, *253*, 781–783.
- [70] J. E. Baldwin, *J. Heterocycl. Chem.* **1990**, *27*, 71–78.
- [71] J. E. Baldwin, R. M. Adlington, D. G. Marquess, A. R. Pitt, A. T. Russell, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1991**, 856–858.
- [72] J. H. Dawson, M. Sono, *Chem. Rev.* **1987**, *87*, 1255–1276.
- [73] J. H. Dawson, *Science* **1988**, *240*, 433–439.
- [74] R. D. Libby, J. A. Thomas, L. W. Kaiser, L. P. Hager, *J. Biol. Chem.* **1982**, *257*, 5030–5037.