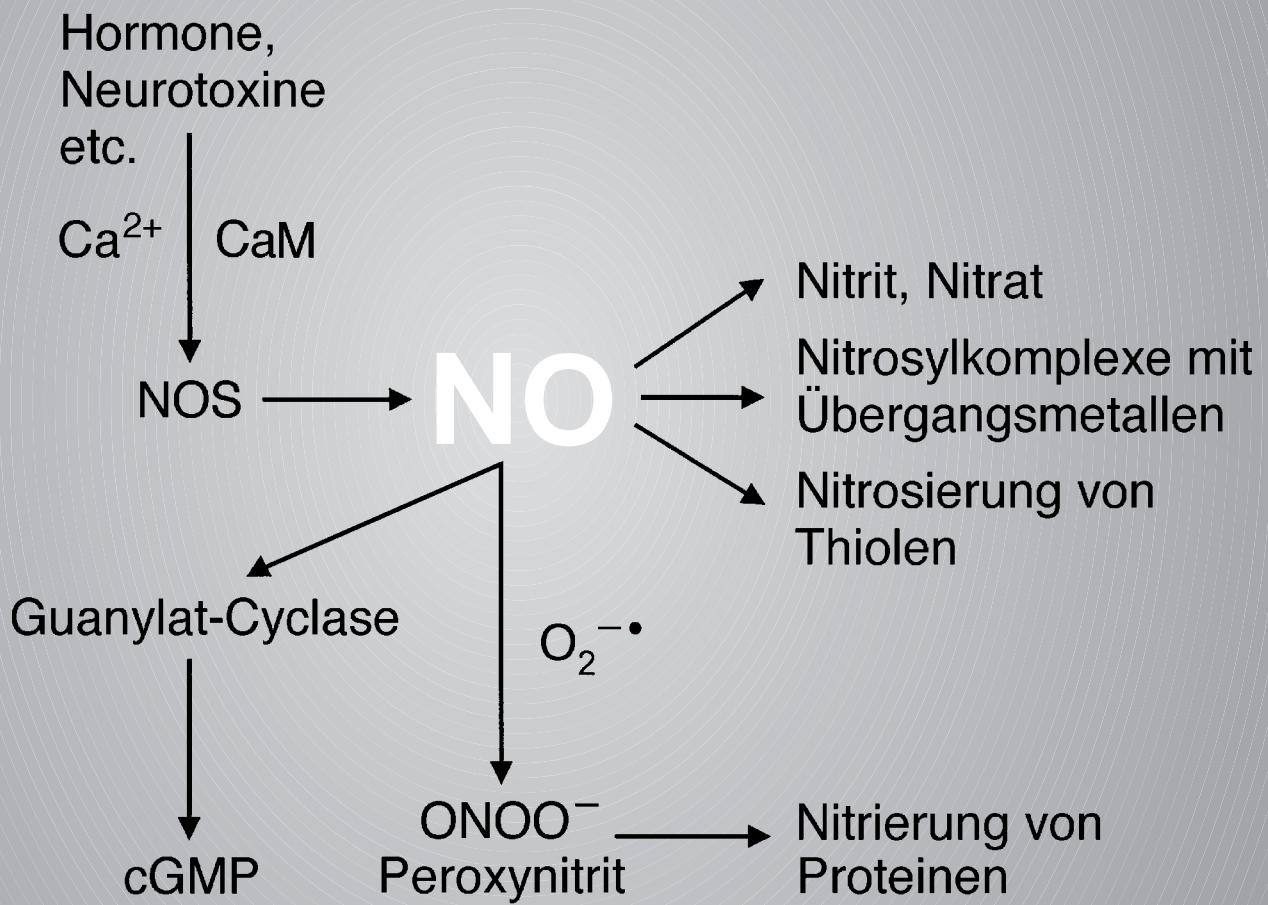


## Bildung und Reaktionen von Stickstoffmonoxid



# Die Entdeckung einiger biologischer Wirkungen von Stickstoffmonoxid und seiner Rolle für die Zellkommunikation (Nobel-Vortrag)\*\*

Ferid Murad\*

In den letzten 22 Jahren hat sich die Erforschung der Rolle von Stickstoffmonoxid bei der Zellkommunikation zu einem der am schnellsten wachsenden Gebiete in der Biologie entwickelt, mit bislang über 20000 Publikationen. Stickstoffmonoxid ist ein Gas, und sein Molekül ist ein freies Radikal mit einem ungepaarten Elektron, das eine Vielzahl von biologischen Prozessen regulieren kann, von denen ständig neue entdeckt werden. In vielen Fällen übt es seine Wirkung über die Aktivierung der Guanylat-Cyclase und die verstärkte Synthese von cyclischem GMP aus GTP aus. Aber auch die Zahl der bekannten Wirkungen von Stickstoffmonoxid, die nicht von cyclischem GMP abhängig sind, wächst rapide. So kann Stickstoffmonoxid mit Übergangsmetallen wie Eisen, Thiolgruppen, anderen freien Radikalen, Sauerstoff, Superoxid-Anionen, ungesättigten Fettsäuren und anderen Mo-

lekülen wechselwirken. Einige dieser Reaktionen führen zur Oxidation von Stickstoffmonoxid zu Nitrit und Nitrat, was seine Wirkung aufhebt, während andere Reaktionen zu einer Änderung der Struktur, Funktion und/oder katalytischen Aktivität von Proteinen führen. Diese unterschiedlichen Wirkungen von Stickstoffmonoxid sind entweder abhängig oder unabhängig von cyclischem GMP und können wichtige physiologische und biochemische Vorgänge bei der Zellregulation und -funktion beeinflussen. Stickstoffmonoxid kann als intrazellulärer Botenstoff, Autocoid (autopharmakologische Substanz), parakrine Substanz, Neurotransmitter oder als Hormon fungieren, das erst an entfernte Wirkorte transportiert werden muß. Es ist also ein einzigartiges, einfaches Molekül mit einer Vielzahl von Signalfunktionen. Aber, wie bei jedem Botenstoff, kann eine zu große oder zu kleine

Menge der Substanz zu pathologischen Reaktionen führen. Einige Methoden, mit denen die Bildung, der Metabolismus oder die Funktion von Stickstoffmonoxid reguliert werden können, werden in der Medizin schon seit über 100 Jahren angewendet, so z.B. die Verwendung organischer Nitrat und Nitroglycerin bei Angina pectoris seit den siebziger Jahren des letzten Jahrhunderts. Die gegenwärtige und zukünftige Forschung über Stickstoffmonoxid und cyclisches GMP wird das therapeutische Arsenal der Ärzte zweifellos erweitern. Derartige Versprechungen und Erwartungen haben natürlich das Interesse an diesen Signalmolekülen für eine wachsende Zahl therapeutischer Anwendungen gesteigert.

**Stichwörter:** Enzyme • Nobel-Aufsätze • Nucleotide • Signaltransduktion • Stickstoffmonoxid

## Einleitung

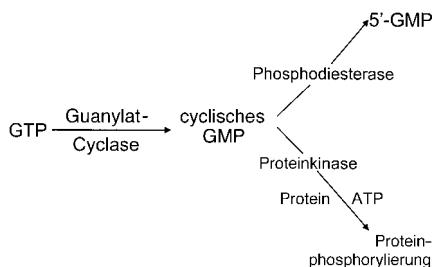
Als ich kurz nach der Entdeckung von cyclischem AMP (cAMP) als Student in den Laboratorien von Earl Sutherland und Theodore Rall arbeitete, die mir den Spaß an der Wissenschaft vermittelten, war ich schnell von der wichtigen Rolle der Second messengers im hormonellen Signalsystem

überzeugt. Nach einer zusätzlichen klinischen Ausbildung ging ich im Jahr 1967 an die National Institutes of Health (NIH) zu Martha Vaughan; cyclisches GMP (cGMP) wurde damals gerade als neuer potentieller Second messenger diskutiert. Die Arbeitsgruppen von Sutherland und Aurbach charakterisierten unabhängig voneinander das Enzym Guanylat-Cyclase, das die Bildung von cGMP aus GTP katalysierte.<sup>[1, 2]</sup> Außerdem wurden eine neue Isoform der für cyclische Nucleotide spezifischen Phosphodiesterase, die bevorzugt cGMP hydrolysierte und inaktivierte,<sup>[3]</sup> sowie eine neue cGMP-abhängige Proteinkinase, die vermutlich das Zielmolekül von cGMP war,<sup>[4]</sup> beschrieben (Schema 1).

Das Gebiet der cAMP-Forschung wurde sehr populär, als neue und einfachere Testsysteme entwickelt und immer mehr Hormone gefunden wurden, die ihre Wirkung über diesen intrazellulären Botenstoff ausübten. Als ich im Jahr 1970 an

[\*] Prof. Dr. med. F. Murad  
Department of Integrative Biology, Pharmacology and Physiology  
University of Texas Medical School at Houston  
P.O. Box 20708, Houston, TX 77225 (USA)  
Fax: (+1) 713-500-7444  
E-mail: fmurad@girch1.med.uth.tmc.edu

[\*\*] Copyright© The Nobel Foundation 1999. – Wir danken der Nobel-Stiftung, Stockholm, für die Genehmigung zum Druck einer deutschen Fassung des Vortrags.



Schema 1. Enzyme, die an Synthese, Metabolismus und Funktion von cyclischem GMP beteiligt sind.

die Universität von Virginia ging, um meine eigene akademische Laufbahn einzuschlagen, schien mir daher cGMP als Forschungsobjekt eher geeignet. Bei unseren ersten Untersuchungen machten wir viele Experimente, in denen wir die eine oder andere Substanz zu Gewebsproben oder Zellen gaben, um die cGMP-Konzentration mit der Funktion der Präparate zu korrelieren. Auch wenn diese Untersuchungen damals notwendig zu sein schienen und auch produktiv waren, so erhielten wir doch wenige Einsichten in die wahre Regulation der Synthese von cGMP und dessen Funktion. Wir wollten zwei einfache und offensichtlich naive Fragen klären: 1) Wie regulieren Hormone, Neurotransmitter und verschiedene andere Liganden die Aktivität der Guanylat-Cyclase und die Synthese von cGMP (d.h., wie sind die Hormonbindung an den entsprechenden Rezeptor und die Aktivierung der Guanylat-Cyclase auf molekularer Ebene miteinander verknüpft?); 2) welche biologischen Funktionen ergeben sich aus erhöhten Konzentrationen von cGMP?

### Mögliche Isoformen der Guanylat-Cyclase

Nach 2–3 Jahren der, wie meine Studenten sagten, „Dumping-Experimente“, in denen wir verschiedene Hormone und Substanzen an Präparaten testeten und den Anstieg der cGMP-Konzentration maßen, beschlossen wir, einen besseren, fundamentaleren Ansatz zur Beantwortung unserer Fragen zu wählen. Etwa 1973 beschlossen mein Mitarbeiter Hiroshi Kimura und ich, die Guanylat-Cyclase in

zellfreien Systemen zu untersuchen. Wir fanden schnell heraus, daß bei den meisten Gewebehomogenaten die Enzymaktivität bei der Ultrazentrifugation sowohl im Überstand als auch im Niederschlag zu finden war. Die Enzyme unterschieden sich jedoch deutlich voneinander (Tabelle 1).<sup>[5–7]</sup> Auch wenn beide Enzyme durch ATP gehemmt

Tabelle 1. Die unterschiedlichen Eigenschaften von cytosolischer und partikelgebundener Guanylat-Cyclase.

	löslich	partikelgebunden
Ca <sup>2+</sup>	Stimulation	Inhibition
ATP, IC <sub>50</sub>	0.4 mM	> 1 mM
GTP, h <sup>[a]</sup>	1.0	1.74
Detergents	50–100% Stimulation	> 300% Stimulation

[a]  $h = \text{Hill-Koeffizient}$ .

wurden, so war das lösliche Enzym jedoch empfindlicher gegenüber der Hemmung durch ATP. Calcium-Ionen konnten in Abhängigkeit von ihrer Konzentration die Enzyme entweder hemmen oder aktivieren, aber die Enzyme im Überstand und im Niederschlag wiesen unterschiedliche Empfindlichkeiten hierfür auf. Der größte Unterschied aber war, daß das lösliche Enzym ein lineares kinetisches Verhalten (doppelt reziproke Auftragungen) bezüglich des Substrates GTP aufwies, während das partikelgebundene Enzym kurvilineare doppelt reziproke Auftragungen ergab, was auf eine Kooperativität bezüglich der Bindung von GTP deutete, wobei wahrscheinlich mehrere GTP-Bindungsstellen vorhanden waren. Der Hill-Koeffizient für das lösliche Enzym betrug 1.0, während das partikelgebundene Enzym einen Hill-Koeffizienten von 1.7 aufwies.<sup>[5–7]</sup>

Später arbeiteten wir an der Charakterisierung und Reinigung des Enzyms, klonierten die cDNA für die Guanylat-Cyclase und konnten definitiv nachweisen, daß mehrere Isoformen als Produkte unterschiedlicher Gene in den Geweben vorkamen.<sup>[8–11]</sup> Ähnliche Arbeiten wurden von anderen Labors durchgeführt, wobei besonders die Arbeiten von David Garbers erwähnt werden sollen.<sup>[12, 13]</sup> Heute wissen wir, daß es viele lösliche und partikelgebundene Isoformen gibt. Aber dieser Punkt geht über den Rahmen dieser Übersicht hinaus, und der interessierte Leser sei hierfür auf andere Übersichtsartikel verwiesen.<sup>[8–13]</sup>



*Ferid Murad, geboren 1936 in Whiting, Indiana, machte 1958 seinen B.A.-Abschluß an der DePauw University (Green Castle, Indiana) und promovierte 1965 zum M.D. und Ph.D. an der Western Reserve University (Cleveland, Ohio). Nach zwei Jahren der klinischen Ausbildung am Massachusetts General Hospital und drei Jahren an den National Institutes of Health wurde er 1970 Associate Professor in den Abteilungen für Medizin und Pharmakologie der University of Virginia, wo er mit den Forschungsarbeiten zu cyclischem GMP und Stickstoffmonoxid begann. 1981 wurde er auf eine Professur in der Abteilung für Medizin und Pharmakologie an der Stanford University berufen und zum Leiter der medizinischen Abteilung des Palo Alto Veterans Medical Center ernannt. 1988 wurde er Vizepräsident der Abbott Laboratories. Er ging 1997 an die University of Texas in Houston als Professor und Leiter der Abteilung für integrative Biologie und Pharmakologie. Er hat viele Preise erhalten, darunter den Ciba Award (1988), den Lasker Award in Basic Medical Research (1996) und den Nobel-Preis für Medizin oder Physiologie (1998). Er ist Mitglied vieler wissenschaftlichen Gesellschaften wie der National Academy of Sciences und des Institute of Medicine.*

## Die Wirkungen von Azid, Hydroxylamin und Nitrit

Aufgrund dieser frühen Daten glaubten wir, es mit zwei verschiedenen Isoformen der Guanylat-Cyclase zu tun zu haben, einer im Cytosol und einer zweiten in der Zellmembran oder in einer Zellorganelle. Wir konnten jedoch nicht ausschließen, daß die Aktivitätsunterschiede ein Artefakt waren und auf falschen Ergebnissen mit ungereinigten Überständen und Niederschlägen beruhten, die bei der Ultrazentrifugation erhalten worden waren. Wir dachten, daß Kontaminationen mit Phosphatasen, Nucleasen und möglicherweise Phosphodiesterasen, die für cyclische Nucleotide spezifisch sind, unsere Beobachtungen erklären könnten. Zu dieser Zeit war es nicht unsere Absicht, das Protein (oder die Proteine) zu reinigen. Es war einfacher, Azid, Pyrophosphat, Hydroxylamin, Phosphodiesterase-Inhibitoren, Fluorid usw. einzeln oder kombiniert hinzuzufügen, um das Substrat oder Produkt vor Abbau bzw. Umsetzung zu schützen und die lösliche und partikelgebundene Guanylat-Cyclase erneut zu charakterisieren. Zu unserer Überraschung fanden wir, daß Azid, Hydroxylamin und Nitrit viele, aber nicht alle Präparationen der Guanylat-Cyclase aktivierte.<sup>[14-17]</sup> Das war eine aufregende und glückliche Entdeckung für uns, da alle Hormone oder Liganden, die einen Anstieg der cGMP-Konzentration in intakten Zellen verursachten, dies nicht in zellfreien Systemen taten. Wir dachten daher, daß der Kopplung von Hormon-Rezeptor-Wechselwirkung und Guanylat-Cyclase-Aktivierung ein komplizierter molekularer Mechanismus zugrundeliegt, der in zellfreien Präparationen zerstört ist.

Um die molekularen Ereignisse zwischen Hormonbindung und Guanylat-Cyclase-Aktivierung zu untersuchen, benötigte man ein auf Hormone ansprechendes zellfreies System sowie die hochreinen und rekonstituierten Komponenten der Signalkaskade. Wir dachten, daß das Verständnis der Aktivierung der Guanylat-Cyclase durch Azid, Hydroxylamin und Nitrit uns bei der Aufklärung der komplexen Signalkaskade helfen würde, vielleicht analog zur stimulierenden Wirkung von Fluorid, die zur Charakterisierung des Adenylyl-Cyclase-Systems beitrugen. Diese Intuition war richtig und führte uns letztlich zum Mechanismus der hormonellen Aktivierung der Guanylat-Cyclase, wie weiter unten beschrieben wird. So richteten wir unsere Aufmerksamkeit verstärkt auf das Verständnis der Guanylat-Cyclase-Aktivierung durch diese Verbindungen.

## Die Entdeckung der Proteine, die für die Aktivierung oder Hemmung durch Azid nötig sind

Die Aktivierung durch Azid war gewebespezifisch und nahm erst nach einer kurzen Anlaufphase von wenigen Minuten einen linearen Verlauf.<sup>[14-17]</sup> Außerdem fand unter anaeroben Bedingungen keine Aktivierung statt, dazu war Luft oder Sauerstoff nötig. Die Aktivierung konnte durch Zugabe von Thiolen verstärkt werden.<sup>[14-17]</sup> Wir vermuteten daher, daß Azid zu einer anderen Verbindung umgewandelt würde, die als aktivierende Spezies wirkte. Wir führten dann ein einfaches und klassisches biochemisches Experiment

durch, bei dem wir ungereinigte lösliche Zellextrakte, die durch Azid aktiviert wurden, mit ungereinigten löslichen Extraktten mischten, die nicht aktiviert wurden.

In unserem ersten Experiment (Tabelle 2) mischten wir ungereinigte Überstände aus Rattenleber-Homogenisaten, die mit Azid aktiviert werden konnten, mit Präparationen aus Rattenhirn und Rattenherz, in denen die Guanylat-

Tabelle 2. Die Wirkungen von Natriumazid ( $\text{NaN}_3$ ) auf die lösliche Guanylat-Cyclase aus Leber, Herz und Großhirnrinde der Ratte. (Mit freundlicher Genehmigung übernommen aus Lit. [14, 15]).

Enzym	cGMP-Bildung <sup>[a]</sup>		mit $\text{NaN}_3$ / ohne $\text{NaN}_3$
	mit $\text{NaN}_3$	ohne $\text{NaN}_3$	
Leber	38.8	595.4	15.3
Herz	23.0	23.2	1.0
Großhirnrinde	46.0	42.0	0.9
Leber + Herz	27.3	23.1	0.8
Leber + Großhirnrinde	23.0	899.0	39.1

[a] Angegeben in pmol cGMP pro mg Protein pro min.

Cyclase nicht durch Azid aktiviert werden konnte.<sup>[14-17]</sup> Eine Mischung von Extraktten aus Leber und Großhirnrinde wies eine verstärkte Aktivierbarkeit durch Azid auf, während das Mischen von Leberextrakten und Herzextrakten zum Verschwinden der Aktivierbarkeit durch Azid führte. Wir glaubten, daß für die Aktivierung durch Azid zusätzliche Faktoren erforderlich waren, die in Leberextrakten vorhanden waren, so daß beim Zusatz zum Extrakt aus Großhirnrinde eine Azid-vermittelte Aktivierung des Enzyms in beiden Extraktten stattfand. Außerdem enthielten Herzextrakte einen Faktor oder mehrere Faktoren, die die Azid-vermittelte Aktivierung in den Herzextrakten sowie bei den Mischexperimenten auch in den Leberextrakten blockierten. Spätere Experimente bewiesen diese Hypothesen. Der scheinbar aktivierende Faktor (oder die Faktoren) im Leberextrakt und der Inhibitor (oder die Inhibitoren) im Herzextrakt waren hitzelabil und nicht durch Dialyse abzutrennen. Wir begannen damit, diese Aktivatoren und Inhibitoren zu reinigen und zu charakterisieren.<sup>[14-21]</sup>

Wir dachten, wenn wir nur den Mechanismus der Guanylat-Cyclase-Aktivierung durch Azid verstehen würden, dann könnten wir eines Tages die richtigen Komponenten und Faktoren rekonstituieren, um eine hormonelle Aktivierung der Guanylat-Cyclase in zellfreien Systemen zu beobachten, was eines der Hauptziele des Labors war. Dieser Forschungsansatz war zwar riskant, stellte sich aber als richtig heraus und ermöglichte uns die Entdeckung der ersten biologischen Wirkungen von Stickstoffmonoxid. Unsere Kollegen an der University of Virginia und andere hielten uns für verrückt, weil wir die Wirkungen von Azid aufzuklären wollten, das ein bekanntes Stoffwechselgift war und häufig Pufferlösungen und Chromatographiesäulen vor der Lagerung zugesetzt wurde, um Bakterienwachstum zu verhindern.

## Die Charakterisierung von Azid-Aktivatoren und -Inhibitoren

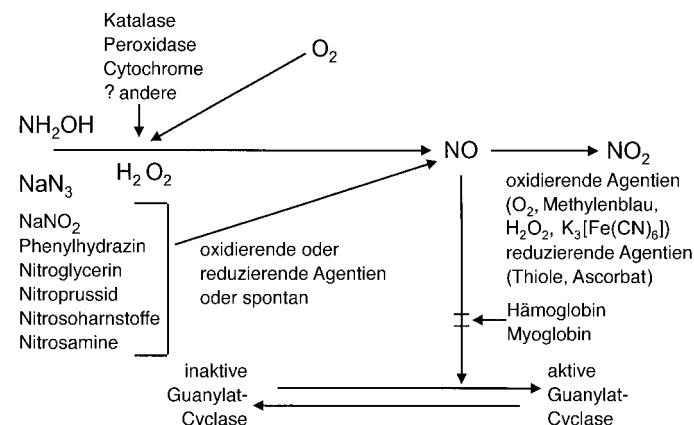
Hiroshi Kimura, Chandra Mittal und ich reinigten Extrakte aus Rattenleber und fanden, daß der für die Azid-vermittelte

Aktivierung erforderliche makromolekulare Faktor das Enzym Katalase war.<sup>[14-21]</sup> Jedoch konnten andere Häm-haltige Proteine wie Meerrettich-Peroxidase und einige Cytochrome die Katalase ersetzen.<sup>[18-21]</sup> Auch die hemmenden Faktoren in Herzextrakten wurden gereinigt und als Hämoglobin und Myoglobin identifiziert.<sup>[14-21]</sup> Es wurde sehr schnell deutlich, daß Häm-haltige Proteine die Aktivierung der Guanylat-Cyclase durch Azid entweder förderten oder blockierten. Diese stimulierenden und inhibierenden Wirkungen verschiedener Häm-haltiger Proteine waren wichtige Ergebnisse, weil sie uns auf viel ältere Veröffentlichungen aufmerksam machten, in denen die Wechselwirkung von Azid mit Katalase unter Bildung von Stickstoffmonoxid beschrieben wurde.

# Die Wirkungen von Azid und Nitrovasodilatatoren auf die Aktivierung der Guanylat-Cyclase, die Akkumulation von cyclischem GMP in intakten Zellen und die Relaxation von glatten Muskelzellen

Azid, Hydroxylamin und Nitrit aktivierten nicht nur die Guanylat-Cyclase in zellfreien Extrakten, sondern erhöhten auch die cGMP-Konzentration in vielen intakten Geweben und Zelltypen einschließlich Hirn, Leber und einigen Zellkulturmodellen.<sup>[14-21]</sup> Shoji Katsuki, ein neuer Mitarbeiter in meinem Labor, arbeitete mit Präparaten glatter Muskulatur aus der Luftröhre von Rindern, die wir entwickelt hatten, um die Wirkung von cAMP und cGMP auf die Motilität glatter Muskulatur zu untersuchen. Wir entwickelten eine ziemlich homogene Präparation glatter Muskulatur (etwa 90% glatte Muskelzellen) mit genügend Gewebe, mit der wir in einem Organbad die Motilität nach Zugabe verschiedener Substanzen verfolgen konnten. Nach dem schnellen Einfrieren der Gewebesegmente in flüssigem Stickstoff konnten wir auch die Konzentration der cyclischen Nucleotide messen und die Adenyлат- oder Guanylat-Cyclase-Aktivitäten bestimmen.<sup>[22-25]</sup> Es war uns klar, daß wir die neuen Guanylat-Cyclase-Aktivatoren auch zu den glatten Muskelzellen der Rinderluftröhre geben sollten, um die Motilität sowie den Anstieg der cGMP-Konzentration zu messen. Wir fanden erwartungsgemäß, daß diese Substanzen – ähnlich wie bei den Gewebeproben – die cGMP-Konzentration erhöhten und gleichzeitig eine Relaxation von zuvor kontrahierten Muskeln auslösten.<sup>[22-25]</sup> Wir erhielten ähnliche Ergebnisse, wenn wir saubere Segmente aus glatter Muskulatur des Gastrointestinaltraktes untersuchten.<sup>[22-25]</sup> Wir experimentierten absichtlich nicht mit Blutgefäßsegmenten, weil diese Präparate heterogen waren und Endothelzellen, Blutzellen, Fibroblasten usw. enthielten. Wir glaubten, daß wir wegen der ausgeprägten zellulären Heterogenität nicht feststellen konnten, in welchen Zelltypen die cGMP-Konzentration anstieg. Bei meinen früheren Untersuchungen mit Ratten-Fettzellen im Labor von Martha Vaughan hatten wir große Probleme damit, die Wirkungen einiger lipolytischer Agentien mit einem Anstieg der cAMP-Konzentration zu korrelieren, da unsere Präparate sehr heterogen waren. Diese Untersuchungen ergaben nur dann einen Sinn, wenn wir den Anstieg der cAMP-Konzentration in homogenen isolierten Fettzellen untersuchten.<sup>[26-28]</sup>

Nachdem wir gefunden hatten, daß diese Substanzen die glatte Muskulatur aus Luftröhre und Magen-Darm-Trakt relaxierten und daß der Anstieg der cGMP-Konzentration mit dieser Relaxation zusammenfiel oder ihr voranging, begannen wir, andere Relaxantien glatter Muskulatur wie Nitroglycerin, Nitroprussid, Hydrazine usw. zu untersuchen (Schema 2).<sup>[19-25]</sup> Alle diese Verbindungen erhöhten die Konzentration von cGMP in unterschiedlichen Präparaten glatter



Schema 2. Wirkungen einiger Nitrovasodilatatoren auf die Synthese von cyclischem GMP. (Mit freundlicher Genehmigung übernommen aus Lit. [19–21]).

Muskulatur und auch in anderen Geweben, bewirkten die Relaxation glatter Muskulatur und aktivierten die Guanylat-Cyclase in den meisten zellfreien Gewebeextrakten. Wir begannen damit, diese neuen Guanylat-Cyclase-Aktivatoren als „Nitrovasodilatatoren“ zu bezeichnen, ein vereinfachter „Labor-Jargon“, durch den wir besser miteinander kommunizieren konnten. Auch wenn diese neuen Nitrovasodilatatoren zur Aktivierung der Guanylat-Cyclase keine Katalase benötigten, so wurden diese Effekte doch von Hämoglobin und Myoglobin inhibiert. Die Auswirkungen von veränderten Redoxbedingungen, Thiolen und Häm-haltigen Proteinen auf diese Nitrovasodilatatoren sollten später für uns sehr wichtig werden, als wir – nach der Entdeckung des relaxierenden Faktors aus Endothelzellen (endothelial-derived relaxing factor, EDRF) durch Furchtgott im Jahr 1980 – die Auswirkungen des EDRF auf den Anstieg der cGMP-Konzentration in Blutgefäßpräparaten untersuchten.<sup>[29]</sup>

## Die Entdeckung der biologischen Wirkungen von Stickstoffmonoxid

Die Wirkungen der ständig zunehmenden Zahl von „Nitrovasodilatatoren“ mit funktionellen Nitro- oder Nitroso-gruppen und die Wirkungen der Häm-haltigen Makromole-küle entweder als Aktivatoren oder Inhibitoren dieser Agentien veranlaßten uns zu der Vermutung, daß das aktive Intermediat oder der proximale Aktivator der Guanylat-Cyclase möglicherweise Stickstoffmonoxid war oder eines seiner Oxidations- oder Reduktionsprodukte. Das war tat-sächlich der Fall.<sup>[20-25, 30]</sup> Die Bildung von Stickstoffmonoxid aus unterschiedlichen Nitrovasodilatator-Vorstufen oder

„prodrugs“ konnte durch eine Reihe von Bedingungen, die in Schema 2 aufgeführt sind, beeinflußt werden. Auch konnte die Aktivität von Stickstoffmonoxid durch verschiedene Oxidationsmittel wie Methylenblau,  $K_3[Fe(CN)_6]$ , Sauerstoff im Überschuß usw. sowie durch Verbindungen, die Stickstoffmonoxid abfangen wie Hämoglobin und Myoglobin, verringert werden (Schema 2). Glücklicherweise funktionierte unser erster chemischer Stickstoffmonoxid-Generator, mit dem wir das Gas in Lösungen mit Guanylat-Cyclase einleiten konnten (Abbildung 1).<sup>[22-25, 30]</sup> Das Experiment wurde von

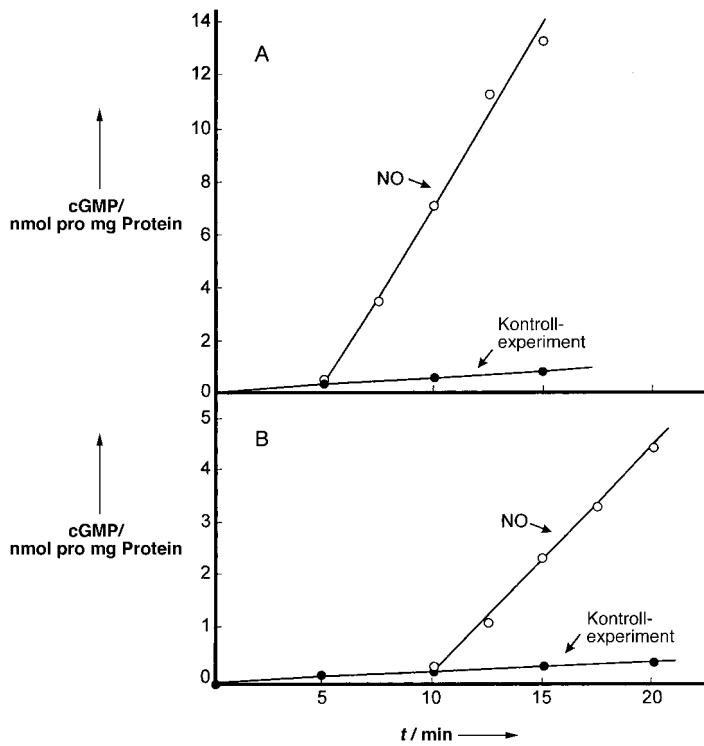


Abbildung 1. Der erste Beweis für eine biologische Wirkung von Stickstoffmonoxid, die Aktivierung von Guanylat-Cyclase-Präparaten aus Rattenlunge (A) und aus glatter Luftröhrenmuskulatur von Rindern (B). (Mit freundlicher Genehmigung übernommen aus Lit. [22]).

Shoji Katsuki und William Arnold, zwei Postdoktoranden in meinem Labor Ende 1976 durchgeführt, eine Nacht bevor Katsuki seine Arbeit beenden und mit seiner Familie nach Japan zurückkehren sollte. Ich habe oft gedacht, daß unsere Entdeckung der ersten biologischen Wirkungen von Stickstoffmonoxid stark verzögert worden wäre, wenn Katsuki seine Arbeit früher beendet hätte. Im Unterschied zu anderen Aktivatoren und Nitrovasodilatatoren erhöhte Stickstoffmonoxid die Aktivität der meisten Guanylat-Cyclase-Präparate und verursachte einen Anstieg der cGMP-Konzentration in nahezu allen untersuchten Geweben bis auf wenige Ausnahmen (Tabelle 3). Außerdem war die stimulierende Wirkung, die Stickstoffmonoxid und unterschiedliche Nitrovasodilatatoren auf die Synthese von cyclischem GMP ausübten, nicht additiv. Wir vermuteten daher, daß sie alle über einen ähnlichen Mechanismus die Aktivierung der Guanylat-Cyclase auslösten.<sup>[30]</sup>

Dies war das erste und einzige Beispiel für ein freies Radikal, das ein Enzym aktiviert. Daher begannen wir damit,

Tabelle 3. Die Wirkungen von Stickstoffmonoxid (NO) auf die Aktivität der Guanylat-Cyclase aus verschiedenen Geweben.

Gewebe	Fraktion <sup>[a]</sup>	cGMP-Bildung <sup>[b]</sup> ohne NO	mit NO	mit NO/ ohne NO
Leber (Ratte)	S	22.1	674.2	30.5
	P	12.4	37.3	3.9
Lunge (Rind)	S	111.7	3625.5	32.5
	P	8.9	297.1	33.4
Herz (Ratte)	S	10.5	242.8	23.1
	P	14.2	209.1	14.7
Niere (Ratte)	S	51.6	975.9	18.9
	P	55.7	1122.6	20.2
Kleinhirn (Ratte)	S	23.7	784.4	33.1
	P	20.6	201.2	9.8
Skelettmuskel (Ratte)	S	6.1	84.0	13.8
Milz (Ratte)	S	73.5	381.7	5.2
Dünndarmmuskel (Ratte)	S	42.9	250.6	5.8
Nebeniere (Ratte)	S	37.5	394.2	10.5
Nebenhodenfettgewebe (Ratte)	S	9.4	108.5	11.5
Leber (Ratte)	D	296.2	1406.3	4.7
Großhirnrinde (Ratte)	D	57.2	174.3	3.0
Lunge (Rind)	G	61.4	1672.1	27.2
Herz (Ratte)	G	30.2	171.9	5.7

[a] S = lösliche Fraktion; P = partikelgebundene Fraktion; D = nach Chromatographie an DEAE-Cellulose; G = nach Chromatographie an Sephadex G-100. [b] Angegeben in pmol cGMP pro mg Protein pro min.

die Isoformen der Guanylat-Cyclase bis zur Homogenität zu reinigen, um die Wirkungen von Stickstoffmonoxid erneut zu untersuchen. Wir konnten die Möglichkeit nicht ausschließen, daß Stickstoffmonoxid zu einer anderen, aktivierenden Spezies umgewandelt wurde oder daß es einen Inhibitor des Enzyms in unseren ungereinigten Präparaten hemmte. Die Hemmung eines Guanylat-Cyclase-Inhibitors konnte in unseren Versuchen wie eine mögliche Aktivierung erscheinen.

Nach der Reinigung der löslichen Guanylat-Cyclase bis zur Homogenität wurde immer noch eine Aktivierung durch Stickstoffmonoxid festgestellt.<sup>[21, 31]</sup> Tatsächlich sank der scheinbare Wert von  $K_{act}$  für Stickstoffmonoxid mit dem Fortschreiten der Reinigung des Enzyms. Gereinigte lösliche Guanylat-Cyclase hat  $K_{act}$ - oder  $EC_{50}$ -Werte für Stickstoffmonoxid im Bereich von 1 bis 10 nm, in Abhängigkeit von den Versuchsbedingungen und der Anwesenheit von Thiolen, Proteinen, Zuckern, Lipiden usw. Diese Verbindungen können Komplexe mit Stickstoffmonoxid bilden und seine effektive Konzentration für die Aktivierung der Guanylat-Cyclase ändern.<sup>[31]</sup> Sie wirken wie Fallen oder Abfänger („scavenger“), so daß Nitro- oder Nitroso-Addukte und -Komplexe gebildet werden und die Werte von  $K_{act}$  oder  $EC_{50}$  steigen. In einigen Fällen können diese Komplexe selbst Nitrovasodilatatoren oder Stickstoffmonoxid-„Prodrugs“ werden, die unter günstigen Bedingungen wieder Stickstoffmonoxid freisetzen.

### Ist Stickstoffmonoxid ein natürlich vorkommender, endogener Aktivator der Guanylat-Cyclase?

Im Jahr 1978 schlugen wir vor, daß die Wirkungen von Hormonen, Autocoiden und Neurotransmittern auf die Syn-

these von cyclischem GMP in intakten Zellen und Geweben möglicherweise mit der Bildung von Stickstoffmonoxid aus einem endogenen Vorläufermolekül erklärt werden könnte.<sup>[19, 20]</sup> Wir dachten, daß eine geeignete Hormonbehandlung den Redoxzustand der Zellen, die Bildung von Stickstoffmonoxid aus einer endogenen Vorstufe oder den Metabolismus von Stickstoffmonoxid beeinflussen könnte. Außerdem glaubten wir, daß Stickstoffmonoxid ein intrazellulärer Second messenger sein könnte, der die Hormonwirkung vermittelt. Es wäre dann in die kurze, aber schnell wachsende Liste der Second-messenger-Moleküle eingereiht worden, zu denen cyclisches AMP, cyclisches GMP,  $\text{Ca}^{2+}$ , Eicosanoide, Lipide, Proteine usw. gehören. Wiederum hielten unsere Kollegen uns für verrückt, weil wir glaubten, daß ein freies Radikal ein Enzym aktivieren und als Second messenger fungieren könnte. Zudem war Stickstoffmonoxid als Nebenprodukt der Verbrennung zahlreicher Substanzen bekannt, das unterschiedliche Makromoleküle inaktivierte oder zerstörte und die Ozonschicht abbaut. Es könnte sicherlich kein Second-messenger-Signalmolekül sein, so sagten uns die Skeptiker.

Um unsere Hypothese zu beweisen, war ein großer technischer Fortschritt nötig. Wenn Stickstoffmonoxid wirklich ein endogener Second messenger und ein Regulator der Guanylat-Cyclase war, könnte man mit physiologisch relevanten Gewebekonzentrationen von etwa 1 bis 10 nm rechnen (also Konzentrationen nahe den  $K_{\text{act}}$ - oder  $\text{EC}_{50}$ -Werten), die Schwankungen der Stickstoffmonoxid-Konzentrationen zur Kontrolle der Enzymaktivität zuließen. Wenn die Gewebekonzentrationen viel höher lagen, würde man erwarten, daß das Enzym immer aktiviert wäre, und die physiologische Bedeutung von Stickstoffmonoxid als Regulator wäre weniger überzeugend und bedeutungsvoll. Unglücklicherweise waren die Methoden zur Bestimmung von Stickstoffmonoxid und seinen Oxidationsprodukten (Nitrit und Nitrat) sehr unempfindliche kolorimetrische und spektrophotometrische Assays, deren Empfindlichkeit um mehrere Größenordnungen zu gering war (sie lag etwa im millimolaren bis mikromolaren Bereich). So blieb unsere Hypothese über mehrere Jahre hinweg nicht überprüfbar, bis wir und andere spezifischere und empfindlichere Assays für das freie Radikal entwickelt hatten.

## Die Entdeckung des EDRF

Im Jahr 1980, als ich an der University of Virginia war, hielt Furchtgott ein Seminar in unserer Abteilung für Pharmakologie. Er berichtete begeistert über seine kurz zuvor gemachte Entdeckung des EDRF und die Fähigkeit von Endothelzellen, eine labile Substanz zu synthetisieren und freizusetzen, die zur Relaxation von glatter Muskulatur in Blutgefäßsegmenten führte.<sup>[29]</sup> Die Wirkungen des EDRF waren den Eigenschaften der Vasodilatatoren in vieler Hinsicht ähnlich, und so schlug ich ihm vor, daß möglicherweise erhöhte

Konzentrationen von cyclischem GMP seine Ergebnisse bei der lichtinduzierten und der Endothel-induzierten Relaxation erklären könnten. Wir planten sogar eine Zusammenarbeit zur Überprüfung dieser Hypothese, die nie zustande kam, weil wir 1981 mit unserer Arbeitsgruppe an die Stanford University umzogen.

Zu dieser Zeit war Robert Rapoport, einer der neuen Mitarbeiter in meinem Labor, mit Präparationen glatter Muskulatur aus Luftröhre und Blutgefäßen beschäftigt und wartete ungeduldig auf den Beginn der Zusammenarbeit. Nach einem kurzen Besuch von Michael Peach in unserem Labor im Jahr 1982, der sich nach unserem Interesse für den EDRF erkundigte, wiesen wir unabhängig nach, daß EDRF tatsächlich die Synthese von cyclischem GMP im glatten Muskel aus Rattenaorta-Segmenten erhöhte (Abbildung 2).<sup>[32-38]</sup> Wir stellten ähnliche Wirkungen des EDRF auf die Bildung von cGMP mit einer Reihe Endothel-abhängiger Vasodilatatoren wie Acetylcholin, A23187, Thrombin, ATP, Bradykinin usw. fest.<sup>[32-38]</sup> Wir zeigten weiter-

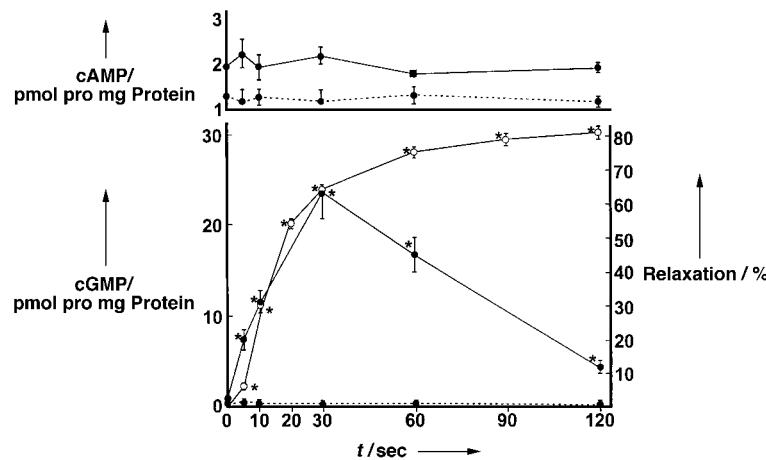


Abbildung 2. Wirkungen von Acetylcholin auf die Akkumulation von cGMP und cAMP (●) und auf die Relaxation von Rattenaorta-Segmenten (○) mit (—) und ohne Endothel (---). (Mit freundlicher Genehmigung übernommen aus Lit. [32, 33]).

hin, daß sowohl die EDRF-Bildung als auch Nitrovasodilatatoren die Aktivität der cGMP-abhängigen Proteinkinase erhöhte und das Phosphorylierungsmuster vieler endogener Proteine aus glatter Muskulatur änderte, wozu auch die Dephosphorylierung der leichten Kette von Myosin gehörte.<sup>[32-38]</sup>

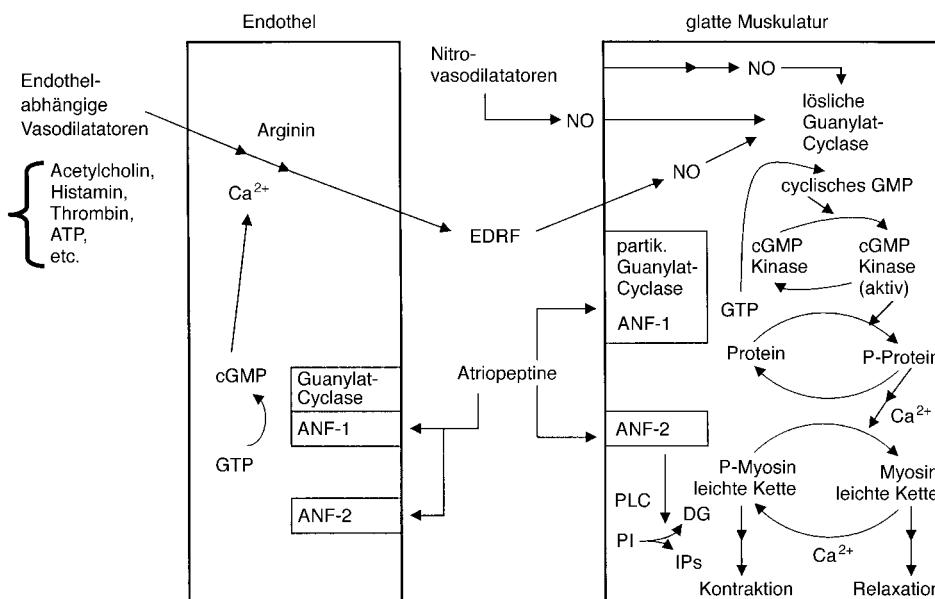
Nitrovasodilatatoren oder Endothel-abhängige Vasodilatatoren hatten ähnliche Wirkungen auf die Erhöhung der cGMP-Konzentration, die Aktivierung der cGMP-abhängigen Proteinkinase und den Einbau von  $^{32}\text{PO}_4$  in dieselbe Proteinfamilie, was mit zweidimensionaler Polyacrylamidgel-Elektrophorese nachgewiesen wurde.<sup>[32-38]</sup> Danach fanden wir und andere Arbeitsgruppen, daß cyclisches GMP den Phosphoinosid-Metabolismus und die Bildung von Inositphosphaten, einschließlich von Inositoltriphosphat, verlangsamte, indem die Aktivität der Phospholipase C verringert wurde.<sup>[39]</sup> Man konnte erwarten, daß diese und andere Wirkungen von cGMP die Konzentration von freiem Calcium im Cytosol und die Aktivität der Myosin-light-chain-Kinase, eines Calcium/Calmodulin-abhängigen Enzyms, verringern würde. Später

wurde von vielen Laboratorien gezeigt, daß Substanzen, die eine erhöhte cGMP-Konzentration bewirken, zu einer verringerten Konzentration an freiem cytosolischem Calcium in glatter Muskulatur und anderen Geweben führen.

Wegen der biochemischen Ähnlichkeiten der Wirkungen von Nitrovasodilatatoren und EDRFproduzierenden Substanzen bezeichneten wir den EDRF in einem Übersichtsartikel als „endogenes Nitrat oder endogenen Vasodilatator“.<sup>[40]</sup> Sechs Monate nach dieser Veröffentlichung<sup>[40]</sup> schlugten Furchgott und Ignarro bei einer Tagung in der Mayo-Klinik im Sommer 1986 unabhängig voneinander vor, daß der EDRF Stickstoffmonoxid ist. Ich meinte damals und auch heute noch, daß EDRF wahrscheinlich

eine Familie aus Stickstoffmonoxid-Addukten oder -Komplexen und eben auch Stickstoffmonoxid ist. Diese Kontroverse ist auch heute noch nicht beendet, da viele Nitro- und Nitrosokomplexe unter die ursprüngliche Definition des EDRF durch Furchgott fallen.<sup>[29]</sup> Diese Komplexe werden sehr leicht durch Reaktion von freiem Stickstoffmonoxid in den Zellen und im interstitiellen Raum mit unterschiedlichen zellulären Bestandteilen wie Thiolen, Lipiden, Proteinen usw. gebildet. Vermutlich können viele dieser Substanzen in der passenden Umgebung leicht Stickstoffmonoxid abgeben, was das Vorhandensein von freiem Stickstoffmonoxid in einigen Gefäßpräparationen erklären würde. Leider wird dieses Problem wegen der zu erwartenden niedrigen Konzentrationen des EDRF in naher Zukunft nicht gelöst werden. Wie bereits erwähnt kann Stickstoffmonoxid schon in Konzentrationen zwischen 1 und 10  $\mu\text{M}$  die Guanylat-Cyclase aktivieren und ein Signal auslösen. Die verbleibende Frage ist: Wie sehen die intermediately auftretenden Moleküle aus, die vermutlich mit Stickstoffmonoxid komplexiert sind und die Furchgott als EDRF bezeichnete?

Wir und einige andere Laboratorien wiesen nach, daß die Wirkungen des EDRF mit Methylenblau, Hämoglobin und anderen Inhibitoren der Nitrovasodilatator-vermittelten Aktivierung der Guanylat-Cyclase gehemmt werden können (Schema 2). Die Wirkungen von Stickstoffmonoxid oder des EDRF können auch von Atriopeptinen nachgeahmt werden, die selektiv die partikelgebundene Guanylat-Cyclase aktivieren (Schema 3).<sup>[41, 42]</sup> Wir konnten zeigen, daß die Atriopeptin-Rezeptoren eine heterogene Gruppe sind, die sich in zwei Rezeptor-Subklassen (ANF-R1 und ANF-R2) einteilen lassen.<sup>[43, 44]</sup> Einer der Atriopeptin-Rezeptoren (ANF-R1) ist die extrazelluläre Domäne der partikelgebundenen, membranständigen Guanylat-Cyclase.<sup>[45]</sup> Diese Befunde wurden in eleganter Weise durch die cDNA-Klonierungen in Garbers Labor bestätigt.<sup>[46]</sup>



Schema 3. Wirkungen von Endothel-abhängigen Vasodilatatoren, Nitrovasodilatatoren und Atriopeptinen in Rattenaorta-Segmenten. PLC = Phospholipase C; PI = Phosphoinositide; DG = Diacylglycerin; IP<sub>3</sub> = Inositoltriphosphat; partik. = partikelgebunden. (Mit freundlicher Genehmigung übernommen aus Lit. [40, 50]).

### Die Wirkungen von L-Arginin auf die Aktivierung der Guanylat-Cyclase und die Bildung von Nitrit und Nitrat

Das Labor von Degucci war eines der wenigen, die schon früh an der Guanylat-Cyclase interessiert waren. 1982 berichtete diese Arbeitsgruppe, daß Hirn- und/oder Neuroblastom-Extrakte eine endogene Substanz enthielten, die unzureinigte oder teilweise gereinigte Präparate der löslichen Guanylat-Cyclase aktivierte.<sup>[47]</sup> Diese Verbindung wurde als L-Arginin identifiziert. Die Aktivierung durch L-Arginin wurde durch Hämoglobin und Methylhydroxylamin gehemmt, die die Wirkung der Nitrovasodilatatoren blockierten. Wir bestätigten ihre Befunde mit ungereinigten oder teilweise gereinigten Präparaten der Guanylat-Cyclase, stellten aber fest, daß L-Arginin unsere hochreinen Guanylat-Cyclase-Präparate nicht blockierte.<sup>[68]</sup> Dieses waren die ersten Nachweise einer Aktivierung der Guanylat-Cyclase durch Arginin, wobei ähnliche Wirkungen wie bei der Aktivierung durch Stickstoffmonoxid und Nitrovasodilatatoren auftraten. Leider verfolgten damals weder Deguccis Arbeitsgruppe noch unsere diese Wirkungen von Arginin weiter, was möglicherweise zu einer früheren Entdeckung der Stickstoffmonoxid-Synthase geführt hätte.

Im Jahr 1987 berichtete das Labor von Hibbs, daß die cytotoxischen Wirkungen von Makrophagen auf Tumorzellen in Kultur mit der Akkumulation von Nitrit und Nitrat im umgebenden Medium korrelierte.<sup>[48]</sup> Die cytotoxischen Wirkungen und die Anhäufung von Nitrit und Nitrat wurden durch L-Arginin verstärkt und durch Analoga von L-Arginin wie N-Methyl-L-arginin blockiert, das sich später als effektiver kompetitiver Inhibitor der Stickstoffmonoxid-Synthase erwies.

Die Befunde der Arbeitsgruppen von Degucci und Hibbs waren wichtige, zeitgemäße und kritische Beobachtungen, mit

deren Hilfe unsere Arbeitsgruppe und andere Laboratorien die Bedeutung von Stickstoffmonoxid für die Zellkommunikation schneller aufklären konnten.<sup>[49–52]</sup> Leider haben diese beiden Arbeitsgruppen nicht genügend Anerkennung für diese wichtigen Beobachtungen erfahren.

## Die Charakterisierung der Stickstoffmonoxid-Synthase und ihrer Isoformen

Innerhalb von wenigen Jahren begannen viele Laboratorien, darunter auch unser eigenes, diesen neuen Biosyntheseweg, bei dem L-Arginin zu Stickstoffmonoxid und Citrullin umgewandelt wird, zu charakterisieren, die beteiligten Enzyme zu reinigen und die entsprechenden Gene zu klonieren. Am Anfang gehörten zu den aktivsten und produktivsten Arbeitsgruppen die von Marletta und Stuehr, Palmer und Moncada, Bredt und Snyder, Stuehr und Nathans und unsere eigene (siehe Lit. [9–11] und dort zitierte Literatur).

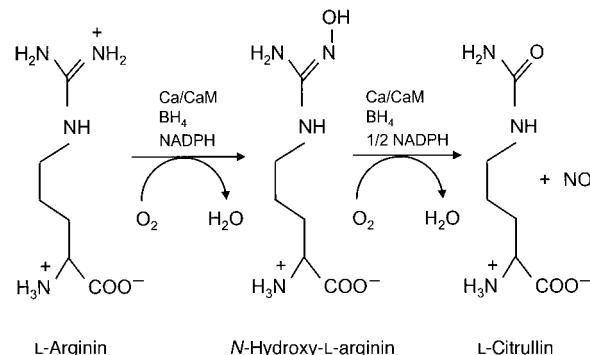
Die erste Isoform der Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS), die gereinigt wurde, war die neuronale oder Hirn-NOS oder NOS-1, auch als Typ-1-NOS oder konstitutive NOS bezeichnet. Die ersten Forscher, die NOS-1 reinigten und charakterisierten, waren Bredt und Snyder<sup>[53]</sup> sowie Mitarbeiter aus unserem eigenen Labor.<sup>[54–57]</sup> Kurz darauf folgte die Charakterisierung der NOS-2 oder induzierbaren NOS, auch als Typ-II-NOS bezeichnet, durch Stuehr und Nathans;<sup>[58]</sup> dann kam die von NOS-3 oder endothelialer NOS, auch als Typ-III-NOS bezeichnet, durch unser Labor.<sup>[59–62]</sup> Es wurden monoklonale und polyklonale Antikörper gegen die gereinigten Isoformen und synthetische Peptidfragmente hergestellt sowie cDNA-Klone dieser drei Genprodukte (siehe Lit. [9–11] und dort zitierte Literatur). Die chromosomale Lage des Gens jeder Isoform wurde identifiziert und die zahlreichen Cosubstrate, Cofaktoren und prosthetischen Gruppen ( $O_2$ , NADPH, Flavinmononucleotid (FMN), Flavinadenindinucleotid (FAD), Tetrahydrobiopterin und Häm; siehe Lit. [11] und dort zitierte Literatur). Alle drei Isoformen werden durch Calmodulin reguliert, aber nur NOS-1 und NOS-3 werden offensichtlich durch Änderungen der Konzentration von freiem cytosolischen Calcium reguliert. NOS-2 enthält nach der Translation und Zusammenlagerung Calmodulin als fest gebundene Komponente oder Untereinheit, so daß keine Abhängigkeit von der Konzentration an freiem Calcium im Cytosol festgestellt werden kann. Die katalytisch aktiven Isoformen liegen als Homodimere mit Häm als prosthetischer Gruppe vor, die die Bildung von Dimeren erleichtert. Die carboxyterminale Domäne weist eine beträchtliche Homologie zwischen den einzelnen Isoformen auf und ist auch zu Cytochrom P450 homolog. Die aminotermrale Domäne hat eine geringere Homologie und könnte der Bindung an regulatorische Proteine und/oder Chaperone dienen, um die subzelluläre Lokalisation des Enzyms zu bewirken. Die Homologie der drei Isoformen beträgt nur 50–60 %, während die Homologie einer Isoform zwischen verschiedenen Organismen 85–92 % betragen kann. Einige Eigenschaften der NOS-Isoformen sind in Tabelle 4 zusammengefaßt.

In Schema 4 ist zusammenfassend dargestellt, wie L-Arginin von NOS über L-Hydroxyarginin zu Stickstoffmonoxid

Tabelle 4. Isoformen der Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS).

NOS-1 (155 kDa)	neuronal, Hirn, Typ-I-NOS; zentrale und periphere Neuronen, NANC-Neuronen, Inselzellen, Endometrium, Skelettmuskel, usw.
NOS-2 (125 kDa)	induzierbar, Typ-II-NOS; Makrophagen, Leber, glatte Muskulatur, Endothel, Herz, usw.; LPS, Cytokine und Glucocorticoide sind Effektoren
NOS-3 (135 kDa)	endothelial, Typ-III-NOS; Endothel, Hirn, Herz, usw.; Acylierung, Phosphorylierung

[a] LPS = Lipopolysaccharide; NANC = nichtadrenerg-nichtcholinerg.

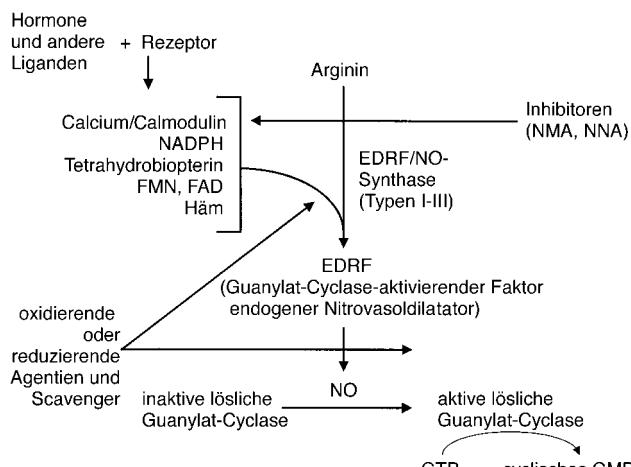


Schema 4. Der Syntheseweg für Stickstoffmonoxid. BH<sub>4</sub> = Tetrahydrobiopterin, Ca/CaM = Calcium/Calmodulin.

und Citrullin umgewandelt wird. Der Elektronentransfer für die Oxidation des Guanidino-Stickstoffatoms von L-Arginin und die genaue Bedeutung jedes Cofaktors ist ein Rätsel und wird derzeit von vielen Arbeitsgruppen intensiv untersucht. Auch werden gegenwärtig in einigen Laboratorien Röntgenstrukturanalysen mit Kristallen von NOS-Isoform-Fragmenten durchgeführt. Diese Arbeiten sollten die genaue Rolle der Cofaktoren und der prosthetischen Gruppen erhellen und die Entwicklung hochselektiver und effektiver Inhibitoren für jede NOS-Isoform ermöglichen, um andere wichtige biologische Rollen von Stickstoffmonoxid aufzuklären und neue und wichtige Therapeutika entwickeln zu können (siehe unten).

Wahrscheinlich kann die In-situ-Aktivität der NOS über die Verfügbarkeit von Substraten, Cosubstraten und prosthetischen Gruppen reguliert werden. Bis heute hat man sich jedoch nur auf die Regulation von NOS-1 und NOS-3 durch Änderungen der Konzentration an freiem cytosolischem Calcium konzentriert, die von unzähligen Hormonen, Autocoiden, Neurotransmittern usw. verursacht werden (Schema 5).

Unter normalen Bedingungen scheint NOS-2 in den meisten Zellen nicht vorzukommen. Nach der Einwirkung von Endotoxin (LPS), Interferon  $\gamma$ , Interleukin-1 (IL-1), Tumor-Nekrose-Faktor  $\alpha$  (TNF  $\alpha$ ) oder anderen proinflammatorischen Cytokinen steigen die Konzentration der mRNA und des Proteins sowie die katalytische Aktivität innerhalb einer Stunde an und erreichen ihr Maximum in 6 bis 18 Stunden. Verschiedene antiinflammatorische Cytokine und Glucocorticoide können die Induktion von NOS-2 abschwächen. Man glaubt, daß einige der pharmakologischen und biologischen Wirkungen dieser Faktoren mit einer erhöhten oder erniedrigten Stickstoffmonoxid-Synthese erklärt werden



Schema 5. Hormonelle Regulation der Bildung von Stickstoffmonoxid und cGMP. NMA = *N*-Methyl-L-arginin; NNA = *N*-Nitro-L-arginin.

können. So könnte z.B. der Blutdruckabfall beim septischen Schock und auch das nachfolgende Multiorganversagen (multiple organ failure syndrom, MOF) auf einer exzessiven Synthese von Stickstoffmonoxid durch NOS-2 beruhen.

### Translationale und posttranskriptionale Modifikationen der NOS

Alle Isoformen können wahrscheinlich von mehreren Proteinkinasen einschließlich der cAMP-abhängigen Proteinkinase, der cGMP-abhängigen Proteinkinase, der Proteinkinase C und der  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-abhängigen Proteinkinase phosphoryliert werden.<sup>[63]</sup> Durch die Phosphorylierung kann die Enzymaktivität erhöht oder erniedrigt werden. Die physiologische Relevanz der Phosphorylierung zur Regulation der Aktivität des Enzyms oder seiner Translokation von einem zellulären Kompartiment in ein anderes ist jedoch unbekannt (siehe Lit. [9–11] und dort zitierte Literatur). In einigen zellfreien Systemen, die gereinigte NOS-1 enthalten, können 6–7 mol Phosphat in ein Mol des Proteinmonomers eingebaut werden.<sup>[63]</sup> Um die physiologische Bedeutung der NOS-Phosphorylierung im Hinblick auf die katalytische Aktivität, die zelluläre Lokalisation, die Regulation und die Beteiligung des Enzyms an verschiedenen biologischen Vorgängen aufzuklären, müssen Untersuchungen mit intakten Zellen und Geweben und mit membrangängigen und spezifischen Proteinkinase-Inhibitoren durchgeführt werden. Leider sind selektive und membrangängige Kinase-Inhibitoren nicht leicht verfügbar.

NOS-3 wird auch myristoyliert und palmitoyliert, und die Acylierung ist wahrscheinlich an der Lokalisation dieser Isoform in der Plasmamembran und/oder anderen Organellen beteiligt.<sup>[61, 64–66]</sup> Vor kurzem hat die Arbeitsgruppe von Michel die Assoziation von NOS-3 mit den Caveolae der Plasmamembran beschrieben.<sup>[65, 66]</sup> Diese Strukturen enthalten zusätzlich viele andere Proteine, die an der Zellkommunikation beteiligt sind. Die Mechanismen für die Regulation und den Transport von NOS-3 vom Golgi-Apparat zu den

Caveolae und die Rückführung von NOS-3 ins Cytosol und möglicherweise zur Plasmamembran werden derzeit aktiv untersucht. Diese Vorgänge sind vielleicht wichtige Angriffs punkte für eine Regulation und den gezielten Einsatz von Wirkstoffen.

Die drei bis heute beschriebenen NOS-Genprodukte, die Möglichkeit des alternativen Spleißens der mRNA aufgrund von multiplen Promotoren (z.B. bei NOS-1)<sup>[67]</sup> und unterschiedliche posttranskriptionale Modifikationen führen zu einer Vielzahl von NOS-Isoformen und -Aktivitäten. Im Hinblick auf die Funktion, die Regulation und die selektive Hemmung von NOS wird dies ein komplexes Problem darstellen (siehe unten). Einige Zelle haben nur eine Isoform, während andere Zellen über mehrere Isoformen mit unterschiedlichen subzellulären Lokalisationen und vielleicht unterschiedlichen Funktionen verfügen. Die genaue Lokalisation von Stickstoffmonoxid-Pools in Zellen und ihre Nähe zu Guanylat-Cyclase, Thiolen, Fettsäuren, Häm-haltigen Scavenger-Molekülen, anderen freien Radikalen wie Superoxid-Anionen usw. sollten bedeutende Auswirkungen auf die biologischen und/oder cytotoxischen Eigenschaften von Stickstoffmonoxid haben. Es müssen also noch viele Fragen nach der Bildung, Lokalisation und Funktion von Stickstoffmonoxid beantwortet werden.

### NOS-Inhibitoren

Verschiedene Inhibitoren der NOS sind bereits beschrieben worden. Neuartige Antagonisten auf Arginin- und Guanidin-Basis werden derzeit sowohl in Universitäts- als auch in Industrielaboratorien entwickelt (siehe Lit. [9–11] und dort zitierte Literatur). Die meisten der heute bekannten Inhibitoren sind kompetitive Antagonisten und teilweise für die eine oder andere Isoform selektiv. Käufliche Verbindungen können eine 100–200fache Selektivität für die eine oder andere Isoform aufweisen. Leider gibt es bislang keine hochspezifischen Inhibitoren für eine Isoform. Solche Verbindungen könnten sich als äußerst wertvoll erweisen, um die NOS-Isoformen in verschiedenen Zelltypen zu bestimmen und die biologischen Vorgänge, die sie regulieren, zu untersuchen. Weitere Forschungen auf diesem Gebiet könnten hochselektive, vielleicht spezifische und effiziente Therapeutika ohne viele Nebenwirkungen hervorbringen, da eine oder mehrere Isoformen der NOS in fast allen Zellen mit nur wenigen Ausnahmen gefunden werden. Derzeit befinden sich einige NOS-Inhibitoren in der klinischen Prüfung an Patienten mit septischem Schock. Weitere klinische Studien sind geplant.

Leider waren die ersten klinischen Studien mit NOS-Inhibitoren nicht so selektiv, wie aus vorhergegangenen *in vitro*-Untersuchungen der Inhibition von NOS-Isoformen zu erwarten war. Der anfängliche Enthusiasmus über den klinischen Nutzen von NOS-Inhibitoren weicht jetzt einer gewissen Skepsis, da unerwünschte Nebenwirkungen offensichtlich werden, von denen einige aus früheren, grundlegenden biologischen Untersuchungen vorhersagbar waren. Vielleicht ist dies eine Lektion im Hinblick auf die vorschnelle Auswahl unspezifischer Verbindungen für die klinische Ent

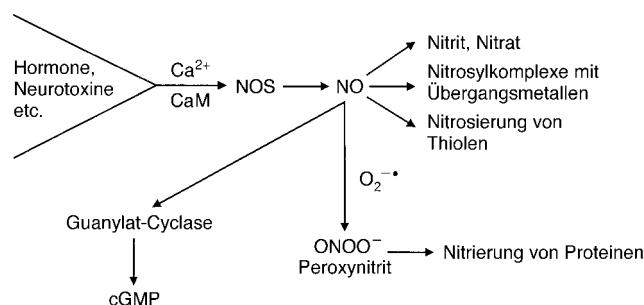
wicklung. Trotzdem glauben viele, daß diese Zielmoleküle wertvoll für den Kampf gegen einige Krankheiten sein werden, bei denen zu viel Stickstoffmonoxid produziert wird. Wir brauchen aber selektivere Substanzen wegen der weiten Verbreitung vieler NOS-Isoformen und ihrer wichtigen und diversen Bedeutung für die biologische Regulation.

### Stickstoffmonoxid-Donoren oder -Prodrugs in der klinischen Medizin

Für die Behandlung von Angina pectoris wurden schon einige NO-Prodrugs eingesetzt, nachdem Nitroglycerin und andere organische Nitrate seit über einem Jahrhundert als Therapeutika verwendet werden. Nitroglycerin wurde 1847 entdeckt und zusammen mit anderen organischen Nitraten in den siebziger Jahren des 19. Jahrhunderts erstmals klinisch eingesetzt. Ironischerweise bekam Alfred Nobel, der entdeckte, wie man auf sichere Weise Dynamit aus Nitroglycerin herstellen kann, im Alter Nitroglycerin gegen Angina pectoris verschrieben, aber er lehnte die Einnahme ab, weil er von den Kopfschmerzen seiner Fabrikarbeiter gehört hatte. Zu den Therapeutika der „Nitrovasodilatator-Klasse“ gehören auch Nitroprussid, organische und anorganische Nitrite und Nitrato, Nitrosamine, Hydrazine, Nitrosoharnstoffe usw. Viele akademische und industrielle Laboratorien synthetisieren zusätzliche „NO-Donoren“, die NO mit vorhersagbarer Geschwindigkeit in bestimmten Geweben oder Umgebungen abgeben oder die an verschiedene Transplantate und Implantate bei gefäßchirurgischen Eingriffen befestigt werden können (siehe Lit. [11] und dort zitierte Literatur). Die kontrollierte Freisetzung von Stickstoffmonoxid durch ein Prodrug oder ein Hilfsmittel an einem spezifischen Zielort oder in einem Gefäßbett ohne das Auftreten einer Toleranz, wie sie sich gegen Nitroglycerin entwickelt, wäre ein äußerst wichtiger Beitrag zur Therapie vieler Durchblutungsstörungen und anderer Krankheiten. Man hat die berechtigte Hoffnung, daß solche Substanzen und Freisetzungsmethoden entwickelt werden, so daß man definierte Zielstrukturen hat und die verbleibenden Aufgaben mit den Methoden der medizinischen Chemie angegangen werden können. Eine wichtige klinische Indikation ist ein Reperfusionsschaden nach einer Operation oder einem gefäßchirurgischen Eingriff. Es gibt offensichtlich noch viele andere Indikationen wie Gefäßneuaufbau, Gewebetransplantation, Vaskularisation von Tumorgewebe usw., bei denen die bekannten Wirkungen von Stickstoffmonoxid auf Thrombocytenaggregation, Proliferation der glatten Gefäßmuskulatur, Atherogenese, Angiogenese, Cytotoxizität usw. nutzbringend eingesetzt werden können.

Eines der am schnellsten wachsenden Gebiete der klinischen Applikation ist die Inhalation von NO-Gas in niedriger Konzentration (siehe Lit. [11] und dort zitierte Literatur). Interessanterweise ist Stickstoffmonoxid in niedrigen Konzentrationen ziemlich stabil und nur geringfügig reaktiv. Seine Reaktivität und Toxizität folgt einem Prozeß zweiter Ordnung, der von der Konzentration von Stickstoffmonoxid und dessen Wechselwirkung mit anderen freien Radikalen und reaktiven Sauerstoffspezies wie Superoxid abhängt. In höhe-

ren Konzentrationen kann NO mit vielen Übergangsmetallen, Häm-haltigen Proteinen und Thiolgruppen reagieren und funktionelle Gruppen von Polynukleotiden (RNA und DNA) und Proteinen oxidieren und auch Strangbrüche in Polynukleotiden verursachen (Schema 6). Stickstoffmonoxid reagiert mit Superoxid sehr schnell und nur diffusionslimitiert unter Bildung von sehr reaktivem Peroxynitrit. Dies weitet sich zweifellos zu einem sehr interessanten Forschungsgebiet aus, das sich mit den toxischen Eigenschaften dieser freien Radikale befaßt.



Schema 6. Bildung und Reaktionen von Stickstoffmonoxid.

Wenn Stickstoffmonoxid in niedriger Konzentration über einen Nasenkatheter an frühgeborene Babys mit niedrigem Geburtsgewicht verabreicht wird, dann hat Stickstoffmonoxid einen positiven Effekt auf die Säuglingssterblichkeit. Die pulmonale Hypertension verbessert sich genauso wie die pulmonale und systemische Sauerstoffaufnahme und die systemische Hypertension, die von einem Rechts-links-Shunt durch den offenen Ductus arteriosus Botalli verursacht wird. Auch auf Kinder, die einen angeborenen Herzfehler mit Rechts-links-Shunt und Hypoxie haben, sind die Auswirkungen möglicherweise günstig. Die Erfolge bei Erwachsenen mit verschiedenen Lungenerkrankungen einschließlich der pulmonaren Hypertension und/oder akutem Lungenversagen (acute respiratory distress syndrome, ARDS) sind nicht so überzeugend und umstritten. Die unterschiedlichen Wirkungen nach der Inhalation von Stickstoffmonoxid bei Erwachsenen stehen in einem engen Zusammenhang mit der Ätiologie ihrer Erkrankung und der An- oder Abwesenheit pathologischer „reversibler Komponenten“. Einige der von NO und/oder cGMP regulierten Zielmoleküle und Prozesse sind in den Tabellen 5 und 6 zusammengefaßt. Diese Wirkorte lassen weitere therapeutische Anwendungen von NOS-Inhibitoren und NO-Prodrugs erwarten.

Tabelle 5. Wirkorte und Zielmoleküle von Stickstoffmonoxid und/oder cGMP.

Guanylat-Cyclase
durch cyclische Nucleotide regulierte Proteinkinasen
durch cyclische Nucleotide regulierte Phosphodiesterasen
Cyclooxygenase (COX II)
Häm-Proteine, Eisenzentren und Thiolgruppen
DNA-Modifikationen
Regulation der von N-Methyl-D-aspartat (NMDA) abhängigen
Glutamatrezeptoren
Phospholipase C

Tabelle 6. Einige der durch Stickstoffmonoxid und/oder cGMP regulierten Prozesse.

Relaxation von glatter, Herz- und Skelettmuskulatur
Phototransduktion über Retinal
intestinale Sekretion und Ionentransport
renale tubulär-glomeruläre Rückkopplung
endotheliale Permeabilität
Proliferation glatter Muskulatur
Adhäsion und Aggregation von Thrombocyten
Insulinsekretion
Hormonproduktion und -sekretion
Neurotransmission
Langzeitpotenzierung und -gedächtnis
Regulation der Transkription
Gewebeverletzung und Entzündung
Pathogen-Cytotoxizität
Tumor-Cytotoxizität
Calciumtransport und -redistribution

## Zusammenfassung

Seit wir vor mehr als zwei Jahrzehnten die ersten biologischen Wirkungen von Stickstoffmonoxid entdeckten, sind über 20000 Publikationen auf diesem Gebiet erschienen. In den letzten Jahren gab es hierzu jeweils ca. 4500 bis 5000 Veröffentlichungen, und ihre Zahl wächst exponentiell weiter. Die Forscher können unmöglich alle Zusammenfassungen dieser Publikationen lesen, ganz zu schweigen von den Artikeln selbst. Manchmal kann es sogar schwierig sein, nur bei den Überschriften, Autoren und Laboratorien auf dem Laufenden zu bleiben. Diese Situation wird zweifellos ein Prüfstein für uns als Mentoren sein, die wir Studenten und Doktoranden ausbilden, die aufregende neue Publikationen brauchen, um in unserer kompetitiven Forschergemeinde eine Anstellung zu finden und Fördermittel zu erhalten. Trotzdem scheint keine Sättigung mit talentierten Forschern in diesem aufregenden und wachsenden Forschungsgebiet erreicht zu sein. Viele wichtige Fragen müssen gestellt und beantwortet werden. Ich habe versucht, einige davon hier anzusprechen. Für diejenigen von uns, die früh auf diesem Gebiet forschten und die großen Fortschritte in den letzten Jahren beobachten konnten, war die Arbeit sehr aufregend. Es gibt noch viele Goldklumpen in der riesigen Goldmine der Stickstoffmonoxid-Biologie zu finden; das Feld ist noch lange nicht ausgebeutet worden.

In den letzten Jahren haben einige Laboratorien bedeutende Fortschritte in der Stickstoffmonoxid-Forschung gemacht. Eine Aufstellung aktiver Forschungsgebiete ist in Tabelle 7 wiedergegeben. Zweifellos werden sich weitere

Tabelle 7. Einige aktuelle Gebiete der Stickstoffmonoxid-Forschung.

Regulation der Transkription
Überexpression und Gentherapie
gezieltes Ausschalten von Genen („knockouts“)
Histochemie, Hybridisierung
Acylierung, Phosphorylierung usw.
Vorkommen und Funktion von NOS-Isoformen in verschiedenen Zelltypen
cGMP-vermittelte Wirkungen
Wirkungen, die nicht von cGMP vermittelt werden
selektive/spezifische NOS-Inhibitoren
neue NO-Donoren

interessante Gebiete ergeben, die dann intensiver Aufmerksamkeit und Erforschung bedürfen.

*Ich möchte den 82 Mitarbeitern danken, die mit mir zusammen gearbeitet haben. Die wichtigsten Beiträge, in chronologischer Reihenfolge aufgezählt, kamen von Hiroshi Kimura, Shoji Katsuki, William Arnold, Mark Braughler, John Lewicki, Scott Waldman, Robert Rapoport, Yoshinari Kamisaki, Takayasi Kuno, Masaki Nakane, Kunio Ishii, Dale Leitman, Ulrich Förstermann, Harold Schmidt, Jennifer Pollock und vielen anderen, die an verschiedensten Aspekten dieser Arbeit beteiligt waren. Ihre Zusammenarbeit, Neugierde, harte Arbeit, Humor und Erfolge haben meine akademische Karriere noch aufregender gemacht. Ich möchte auch der John S. Dunn Foundation, der University of Texas und verschiedenen anderen Institutionen, vor allem den National Institutes of Health, für ihre finanzielle Unterstützung danken.*

Eingegangen am 15. Februar 1999 [A325]  
Übersetzt von Dr. Christiane Koszka, Wien  
International Edition: *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 1856–1868

- [1] „The formation and metabolism of cyclic GMP“: J. G. Hardman, J. A. Beavo, J. P. Gray, T. D. Chrisman, W. D. Patterson, E. W. Sutherland, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1971**, 185, 27–35.
- [2] Siehe: „Guanylate cyclase activity in heart and lung“: A. A. White, *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* **1975**, 5, 353–373.
- [3] „Regulation of cyclic nucleotide phosphodiesterase“: M. Appleman, W. Terasaki, *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* **1975**, 5, 153–162.
- [4] „Cyclic nucleotides, protein phosphorylation and neuronal function“: P. Greengard, *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* **1975**, 5, 585–602.
- [5] „Evidence for two different forms of guanylate cyclase in rat heart“: H. Kimura, F. Murad, *J. Biol. Chem.* **1974**, 249, 6910–6919.
- [6] „Two forms of guanylate cyclase in mammalian tissues and possible mechanisms for their regulation“: H. Kimura, F. Murad, *Metabolism* **1975**, 24, 439–445.
- [7] „Increased particulate and decreased soluble guanylate cyclase activity in regenerating liver, fetal liver, and hepatoma“: H. Kimura, F. Murad, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1975**, 72, 1965–1969.
- [8] „Cyclic GMP synthesis and function“: S. A. Waldman, F. Murad, *Pharm. Rev.* **1987**, 39, 163–96.
- [9] „Cyclic GMP Synthesis, Metabolism and Function“: *Advances in Pharmacology*, Vol. 26 (Hrsg.: F. Murad), Academic Press, New York, **1994**, S. 1–335.
- [10] „The role of nitric oxide in modulating guanylyl cyclase“: F. Murad, *Proc. Int. Congr. Pharmacol.* **1994**, 10, 1–4 (Neurotransmission).
- [11] „Nitric Oxide: Biochemistry, Molecular Biology, and Therapeutic Implications“: *Advances in Pharmacology*, Vol. 34 (Hrsg.: L. Ignarro, F. Murad), Academic Press, New York, **1995**, S. 1–516.
- [12] „Signal transduction by guanylyl cyclase“: M. Chinkers, D. Garbers, *Annu. Rev. Biochem.* **1991**, 60, 553–575.
- [13] „The membrane form of guanylate cyclase“: D. L. Garbers, D. G. Lowe, L. J. Dangott, M. Chinkers, D. S. Thorpe, J. K. Bentley, C. S. Ramarao, D. V. Goeddel, S. Singh, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **1988**, 53, 993–1003.
- [14] „Activation of guanylate cyclase from rat liver and other tissues with sodium azide“: H. Kimura, C. K. Mittal, F. Murad, *J. Biol. Chem.* **1975**, 250, 8016–8022.
- [15] „Requirement for a macromolecular factor for sodium azide activation of guanylate cyclase“: C. K. Mittal, H. Kimura, F. Murad, *J. Cyclic Nucleotide Res.* **1975**, 1, 261–269.
- [16] „Increases in cyclic GMP levels in brain and liver with sodium azide, an activator of guanylate cyclase“: H. Kimura, C. K. Mittal, F. Murad, *Nature* **1975**, 257, 700–702.
- [17] „Appearance of magnesium guanylate cyclase activity in rat liver with sodium-azide activation“: H. Kimura, C. K. Mittal, F. Murad, *J. Biol. Chem.* **1976**, 251, 7769–7773.

- [18] „Purification and properties of a protein required for sodium azide activation of guanylate cyclase“: C. K. Mittal, H. Kimura, F. Murad, *J. Biol. Chem.* **1977**, *252*, 4348–4390.
- [19] „Guanylate cyclase: Activation by azide, nitro compounds, nitric oxide, and hydroxyl radical and inhibition by hemoglobin and myoglobin“: F. Murad, C. K. Mittal, W. P. Arnold, S. Katsuki, H. Kimura, *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* **1978**, *9*, 145–158.
- [20] „Properties and regulation of guanylate cyclase: Activation by azide, nitro compounds and hydroxyl radical and effects of heme containing proteins“: F. Murad, C. K. Mittal, W. P. Arnold, K. Ichihara, E. Braughler, M. El-Zayat in *Molecular Biology and Pharmacology of Cyclic Nucleotides* (Hrsg.: G. Folca, R. Paoletti), Elsevier, Amsterdam, **1978**, S. 33–42, (Proc. NATO Adv. Study Inst. Cyclic Nucleotides, Mailand, Italien, **1977**).
- [21] „Effect of nitro-compound smooth muscle relaxants and other materials on cyclic GMP metabolism“: F. Murad, C. K. Mittal, W. P. Arnold, J. M. Braughler in *Advances in Pharmacology and Therapeutics, Vol. 3, Ions, Cyclic Nucleotides, Cholinergy* (Hrsg.: J. C. Stocklet), Pergamon, New York, **1978**, S. 123–132, (Proc. 7th Int. Congr. Pharmacol., Paris, Frankreich, Juli **1978**).
- [22] „Stimulation of guanylate cyclase by sodium nitroprusside, nitroglycerin and nitric oxide in various tissue preparations and comparison to the effects of sodium azide and hydroxylamine“: S. Katsuki, W. P. Arnold, C. K. Mittal, F. Murad, *J. Cyclic Nucleotide Res.* **1977**, *3*, 23–35.
- [23] „Stimulation of formation and accumulation of cyclic GMP by smooth muscle relaxing agents“: S. Katsuki, W. P. Arnold, C. K. Mittal, F. Murad, *Proc. of the 2nd Japanese Cyclic Nucleotide Conference*, Osaka, Japan, **1977**, S. 44–50.
- [24] „Regulation of cyclic 3',5'-adenosine monophosphate and cyclic 3',5'-guanosine monophosphate levels and contractility in bovine tracheal smooth muscle“: S. Katsuki, F. Murad, *Mol. Pharmacol.* **1977**, *13*, 330–41.
- [25] „Effect of sodium nitroprusside, nitroglycerin and sodium azide on levels of cyclic nucleotides and mechanical activity of various tissues“: S. Katsuki, W. P. Arnold, F. Murad, *J. Cyclic Nucleotide Res.* **1977**, *3*, 239–247.
- [26] „Effects of guanosine 3',5'-monophosphate on glycerol production and accumulation of adenosine 3',5'-monophosphate during incubation of fat cells“: F. Murad, V. Manganiello, M. Vaughan, *J. Biol. Chem.* **1970**, *245*, 3352–3360.
- [27] „Effects of lipolytic and antilipolytic agents on cyclic 3', 5'-adenosine monophosphate in fat cells“: V. Manganiello, F. Murad, M. Vaughan, *J. Biol. Chem.* **1971**, *246*, 2195–2102.
- [28] „Adenyl cyclase activity in particles from fat cells“: M. Vaughan, F. Murad, *Biochemistry* **1969**, *8*, 3092–3099.
- [29] „The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle to acetylcholine“: R. Furchtgott, J. Zarwodski, *Nature* **1980**, *288*, 373–376.
- [30] „Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3',5'-monophosphate levels in various tissue preparations“: W. P. Arnold, C. K. Mittal, S. Katsuki, F. Murad, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1977**, *74*, 3203–3207.
- [31] „Purification of soluble guanylate cyclase from rat liver“: J. M. Braughler, C. K. Mittal, F. Murad, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1979**, *76*, 219–222.
- [32] „Agonist-induced endothelial-dependent relaxation in rat thoracic aorta may be mediated through cyclic GMP“: R. M. Rapoport, F. Murad, *Circ. Res.* **1983**, *52*, 352–57.
- [33] „Endothelium-dependent and nitrovasodilator-induced relaxation of vascular smooth muscle: Role for cyclic GMP“: R. M. Rapoport, F. Murad, *J. Cyclic Nucleotide Protein Phosphorylation Res.* **1983**, *9*, 281–296.
- [34] „Endothelium-dependent vasodilator- and nitrovasodilator-induced relaxation may be mediated through cyclic GMP formation and cyclic GMP-dependent protein phosphorylation“: R. M. Rapoport, M. B. Draznin, F. Murad, *Trans. Assoc. Am. Physicians* **1983**, *96*, 19–30.
- [35] „Endothelium dependent relaxation in rat aorta may be mediated through cyclic GMP-dependent protein phosphorylation“: R. M. Rapoport, M. B. Draznin, F. Murad, *Nature* **1983**, *306*, 274–276.
- [36] „Endothelium-dependent and nitrovasodilator-induced activation of cyclic GMP-dependent protein kinase in rat aorta“: R. R. Fiscus, R. M. Rapoport, F. Murad, *J. Cyclic Nucleotide Protein Phosphorylation Res.* **1983**, *9*, 415–425.
- [37] „Effect of cyanide on nitrovasodilator-induced relaxation, cyclic GMP accumulation and guanylate cyclase activation in rat aorta“: R. M. Rapoport, F. Murad, *Eur. J. Pharmacol.* **1984**, *104*, 61–70.
- [38] „Sodium nitroprusside-induced protein phosphorylation in intact rat aorta is mimicked by 8-bromo-cyclic GMP“: R. M. Rapoport, M. Draznin, F. Murad, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1982**, *79*, 6470–6474.
- [39] „Mechanism of cyclic GMP inhibition of inositol phosphate formation in rat aorta segments and cultured bovine aortic smooth muscle cells“: M. Hirata, K. Kohse, C. H. Chang, T. Ikebe, F. Murad, *J. Biol. Chem.* **1990**, *265*, 1268–1273.
- [40] „Cyclic guanosine monophosphate as a mediator of vasodilation“: F. Murad, *J. Clin. Invest.* **1986**, *78*, 1–5.
- [41] „Atrial natriuretic factor elicits an endothelium independent relaxation and activates particulate guanylate cyclase in vascular smooth muscle“: R. M. Winquist, E. P. Faison, S. A. Waldman, K. Schwartz, F. Murad, R. M. Rapoport, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1984**, *81*, 7661–7664.
- [42] „Atrial natriuretic factor selectively activates particulate guanylate cyclase and elevates cyclic GMP in rat tissues“: S. A. Waldman, R. M. Rapoport, F. Murad, *J. Biol. Chem.* **1984**, *259*, 14332–14334.
- [43] „Atrial natriuretic peptide receptors and the guanylate cyclase-cyclic GMP system“: D. C. Leitman, C. R. Molina, S. A. Waldman, F. Murad, *UCLA Symp. Mol. Cell. Biol.* **1988**, *81*, 39–56 (Proc. of the UCLA Symposium on Atrial Natriuretic Factor in Biological and Molecular Aspects of Atrial Factors).
- [44] „Cyclic GMP synthesis and function“: S. A. Waldman, F. Murad, *Pharm. Rev.* **1987**, *39*, 163–96.
- [45] „Co-purification of an atrial natriuretic factor receptor and particulate guanylate cyclase from rat lung“: T. Kuno, J. W. Andresen, Y. Kamisaki, S. A. Waldman, L. Y. Chang, S. Saheki, D. C. Leitman, M. Nakane, F. Murad, *J. Biol. Chem.* **1986**, *261*, 5817–5823.
- [46] „Guanyl cyclase linked receptors“: D. L. Garbers, *Pharmacol. Ther.* **1991**, *50*, 337–345.
- [47] „L-arginine identified as an endogenous activator for soluble guanylate cyclase from neuroblastoma cells“: T. Degucci, M. Yoshiako, *J. Biol. Chem.* **1982**, *257*, 10147.
- [48] „Macrophage cytotoxicity. Role for L-arginine deaminase and imino nitrogen activation to nitrate“: J. Hibbs, R. Traintor, Z. Vanin, *Science* **1987**, *235*, 473.
- [49] „The role of cyclic GMP in the mechanism of action of nitrovasodilators, endothelium-dependent agents and atrial natriuretic peptide“: F. Murad, *Biochem. Soc. Trans.* **1988**, *16*, 490–492.
- [50] „Effects of nitrovasodilators, endothelium-dependent vasodilators and atrial peptides on cGMP“: F. Murad, D. Leitman, S. Waldman, C. H. Chang, M. Hirata, K. Kohse, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **1988**, *53*, 1005–1009.
- [51] „Modulation of the guanylate cyclase-cGMP system by vasodilators and the role of free radicals as second messengers“: F. Murad in *Vascular Endothelium* (Hrsg.: J. D. Catravas, C. N. Gillis, U. S. Ryan), Plenum, New York, **1989**, S. 157–164 (Proc. of the NATO Advanced Studies Institute on Vascular Endothelium: Receptors and Transduction Mechanisms, Porto Carras, Greece, Juni **1988**).
- [52] „Mechanisms for hormonal regulation of the different isoforms of guanylate cyclase“: F. Murad in *Proceedings of the 40th Mosbach Colloquium on Molecular Mechanisms of Hormone Action* (Hrsg.: Y. Gehring, E. Helmreich, G. Schultz), Springer, Heidelberg, **1989**, S. 186–194.
- [53] „Isolation of nitric oxide synthase, a calmodulin-requiring enzyme“: D. Bredt, S. Snyder, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, *87*, 682–685.
- [54] „Production of an EDRF-like activity in the cytosol of N1E-115 neuroblastoma cells“: L. Gorsky, U. Förstermann, K. Ishii, F. Murad, *FASEB J.* **1990**, *4*, 1494–1500.
- [55] „The cytosol of N1E-115 neuroblastoma cells synthesizes and EDRF-like substance that relaxes rabbit aorta“: U. Förstermann, K. Ishii, L. D. Gorsky, F. Murad, *Naunyn-Schmiedberg's Arch. Pharmacol.* **1989**, *340*, 771–774.
- [56] „Hormone induced biosynthesis of endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide-like material in N1E-115 neuroblastoma cells requires calcium and calmodulin“: U. Förstermann, L. Gorsky, J.

- Pollock, K. Ishii, H. H. H. W. Schmidt, M. Heller, F. Murad, *Mol. Pharmacol.* **1990**, *38*, 7–13.
- [57] „Purification of a soluble isoform of guanylyl cyclase-activating-factor synthase“: H. H. H. W. Schmidt, J. Pollock, M. Nakane, L. Gorsky, U. Förstermann, M. Heller, F. Murad, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 365–369.
- [58] „Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase“: D. Stuehr, H. Cho, N. Kwon, M. Weise, C. Nathans, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 7773–7777.
- [59] „Enzymes synthesizing guanylyl cyclase activating factor (GAF) in endothelial cells, neuroblastoma cells and rat brain“: U. Förstermann, H. H. H. W. Schmidt, J. S. Pollock, M. Heller, F. Murad, *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **1991**, *17* (Supplement 3), 557–564.
- [60] „Subcellular localization and regulation of the enzymes responsible for EDRF synthesis in endothelial cells and N1E-155 neuroblastoma cells“: U. Förstermann, L. Gorsky, J. S. Pollock, H. H. H. W. Schmidt, K. Ishii, M. Heller, F. Murad, *Eur. J. Pharmacol.* **1990**, *183*, 1625–1626.
- [61] „Purification and characterization of particulate EDRF synthase from cultured and native bovine aortic endothelial cells“: J. S. Pollock, U. Förstermann, J. A. Mitchell, T. D. Warner, H. H. H. W. Schmidt, M. Nakane, F. Murad, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 10480–10484.
- [62] „Isoforms of EDRF/NO synthase: Characterization and purification from different cell types“: U. Förstermann, H. H. H. W. Schmidt, J. S. Pollock, H. Sheng, J. A. Mitchell, T. D. Warner, M. Nakane, F. Murad, *Biochem. Pharmacol.* **1991**, *42*, 1849–1857.
- [63] „Phosphorylation by calcium/calmodulin-dependent protein kinase II and protein kinase C modulates the activity of nitric oxide synthase“: M. Nakane, J. A. Mitchell, U. Förstermann, F. Murad, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1991**, *180*, 1396–1402.
- [64] „Endothelial nitric oxide synthase is myristylated“: J. Pollock, V. Klinghofer, U. Förstermann, F. Murad, *FEBS Lett.* **1992**, *309*, 402–404.
- [65] „Agonist-modulated palmitoylation of endothelial nitric oxide synthase“: L. J. Robinson, L. Busconi, T. Michel, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 995–998.
- [66] „Acylation targets endothelial nitric-oxide synthase to plasmalemmal caveolae“: P. W. Shaul, E. J. Smart, L. J. Robinson, Z. German, I. S. Yuhan, Y. Ying, R. Anderson, T. Michel, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 6518–6522.
- [67] „Two closely linked but separate promoters for human neuronal nitric oxide synthase gene transcription“: J. Xie, P. Roddy, T. Rife, F. Murad, A. Young, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 1242–1246.
- [68] F. Murad, J. Lewicki, unveröffentlichte Ergebnisse.