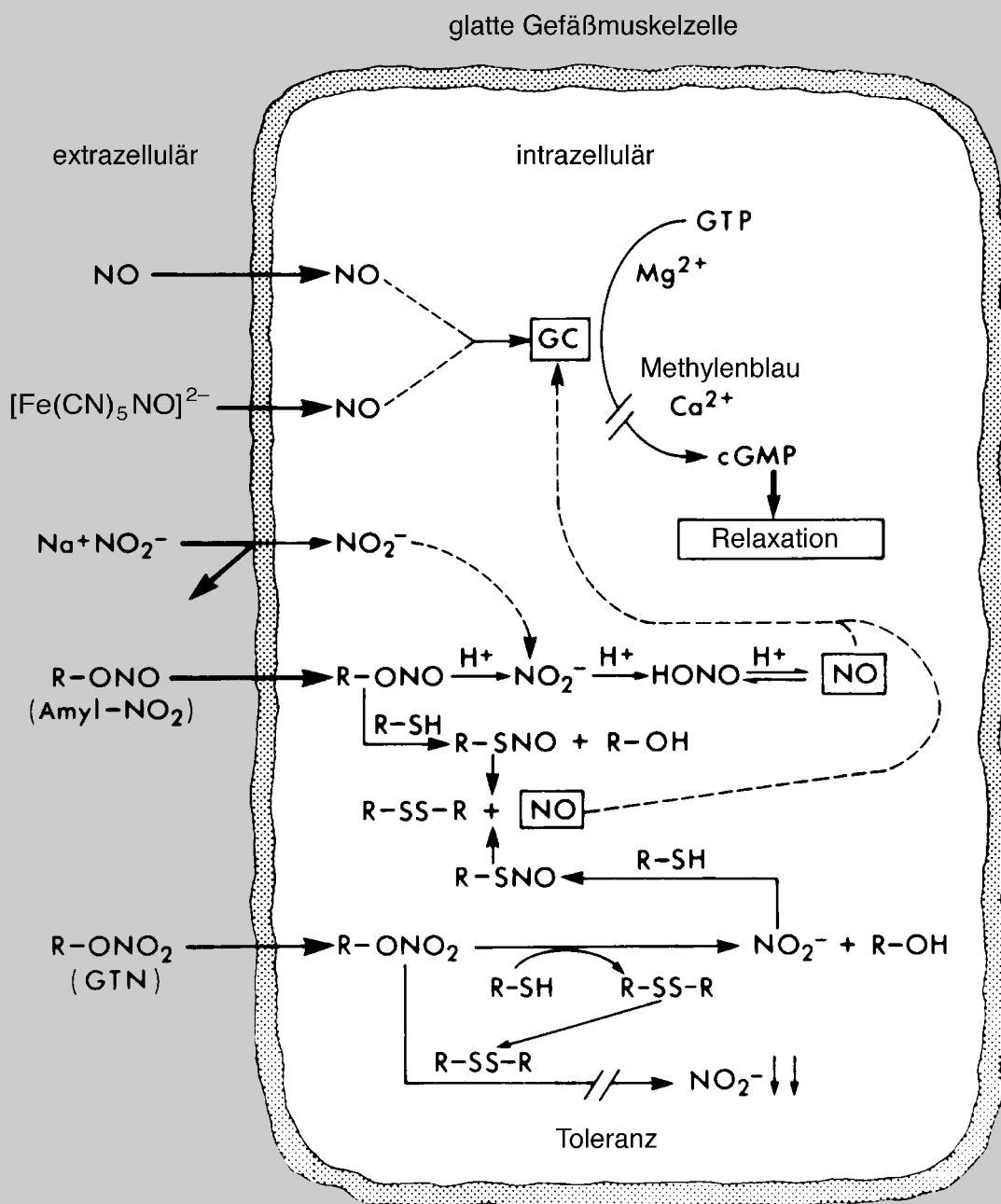


Vorgeschlagener Mechanismus für die Relaxation glatter Gefäßmuskulatur durch organische Nitrate und Nitrite, anorganische Nitrite sowie Nitrosoverbindungen



Nitroprussid kann in Lösung direkt NO freisetzen, organische Nitrite und Nitrate reagieren mit Thiolen erst zu S-Nitrosothiolen, die dann unter NO-Abgabe zerfallen. Stickstoffmonoxid aktiviert die Guanylat-Cyclase, und das von diesem Enzym synthetisierte cGMP bewirkt die Muskelrelaxation.

Stickstoffmonoxid: ein einzigartiges endogenes Signalmolekül in der Gefäßbiologie (Nobel-Vortrag)**

Louis J. Ignarro*

Einleitung

Meine ersten Forschungsarbeiten an der Universität im Rahmen meiner Doktorarbeit konzentrierten sich auf das Verständnis des Wirkungsmechanismus der Catecholamine während der embryonalen Entwicklung des sympathischen Nervensystems. Diese Forschung erforderte ein gutes Hintergrundwissen nicht nur in Pharmakologie, sondern auch in Physiologie und Biochemie. Ich erinnere mich, einige interessante Veröffentlichungen über cyclisches AMP (cAMP) gelesen zu haben, aber ich habe mich bei meinen ersten Forschungen nicht mit diesem Thema beschäftigt. Zu dieser Zeit war das cyclische GMP (cGMP) noch nicht bekannt, und Stickstoffmonoxid hielt man nur für einen Schadstoff in der Atmosphäre. Nachdem meine Zeit als Postdoktorand an den National Institutes of Health in Bethesda beendet war, nahm ich eine Forschungsstelle in der Industrie an, um mehr über die biochemischen Aspekte des Entzündungsprozesses zu lernen und neue antiinflammatorische Wirkstoffe zu entwickeln. Obwohl ich mich immer noch nicht mit cAMP beschäftigte, las ich weiterhin die Veröffentlichungen darüber und erfuhr von der Entdeckung von cGMP. Ich beschloß daraufhin zu untersuchen, ob cAMP und cGMP irgendeine modulatorische Funktion im Entzündungsprozeß haben. Wir fanden, daß cAMP lysosomale Membranen stabilisierte, wohingegen cGMP die Instabilität von lysosomalen Membranen förderte. Des weiteren stand die cAMP-Bildung mit der Hemmung der Funktion menschlicher neutrophiler Leukocyten wie der Phagocytose und der Sekretion lysosomaler Enzyme in Zusammenhang, während cGMP eine gesteigerte Funktion neutrophiler Leukocyten bewirkte. Bei einem anderen Forschungsprojekt schien es, als ob dieses neue cyclische Nucleotid, cGMP, an den negativen Wirkungen von Acetylcholin am Herz beteiligt war, von cAMP dagegen

wußte man bereits, daß es die gegenteiligen Wirkungen am Herz verursacht. So schien man eindeutig zur Auffassung zu gelangen, daß cAMP und cGMP entgegengesetzte Einflüsse auf die Zellfunktionen ausübten.

Während unserer Arbeiten zu cAMP und cGMP las ich zwei interessante Publikationen über cGMP, die von Ferid Murad et al. veröffentlicht worden waren.^[1, 2] Diese Arbeiten zeigten, daß Stickstoffmonoxid und Nitroverbindungen, die möglicherweise Stickstoffmonoxid freisetzen konnten, die cytosolische Guanylat-Cyclase aktivierten. Eine der untersuchten Nitroverbindungen war Nitroglycerin. Stickstoffmonoxid und Nitroverbindungen stimulierten auch die Bildung von cGMP in isolierten Gewebeproben in vitro.^[3] Man schloß daraus, daß Nitroglycerin durch Mechanismen, an denen Stickstoffmonoxid beteiligt ist, die Guanylat-Cyclase aktivieren und die cGMP-Bildung stimulieren könnte. Weitere Untersuchungen zeigten, daß Stickstoffmonoxid an den relaxierenden Wirkungen von Nitroglycerin und anderen Verbindungen auf nichtvaskuläre glatte Muskulatur beteiligt sein könnte.^[4] Diese Befunde veranlaßten mich, einige Experimente durchzuführen, um zu überprüfen, ob Nitroglycerin und verwandte organische Nitrate und Nitrite tatsächlich Stickstoffmonoxid in wäßriger Lösung freisetzen können. Nachdem wir die Freisetzung von Stickstoffmonoxid aus einigen Nitroverbindungen nachgewiesen hatten, die als Relaxantien glatter Muskulatur bekannt waren, glaubten wir, daß Stickstoffmonoxid auch für die vasorelaxierenden Wirkungen von Nitroglycerin verantwortlich war und daß cGMP der intrazelluläre Second messenger war, der die Wirkung von Nitroglycerin vermittelte. Eine Reihe von Experimenten wurde durchgeführt, um die von Ferid Murad aufgestellte Hypothese zu überprüfen, daß Nitroglycerin, Nitroprussid und Nitrosoverbindungen eine Relaxation von glatter Muskulatur einschließlich der vaskulären glatten Muskulatur bewirken, indem sie Stickstoffmonoxid freisetzen, welches seine Wirkung über die Stimulation der cGMP-Bildung ausübt.

Der Mechanismus der Freisetzung von Stickstoffmonoxid aus Nitroglycerin und anderen Nitroverbindungen

Das wichtigste Experiment, das wir zur Überprüfung der Hypothese durchführten, daß Stickstoffmonoxid für die

[*] Prof. Dr. L. J. Ignarro
Department of Molecular and Medical Pharmacology
UCLA School of Medicine
Center for the Health Sciences
Los Angeles, CA 90095 (USA)
Fax: (+1) 310-825-6267
E-mail: lignarro@mednet.ucla.edu

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

vasorelaxierende Wirkung von Nitroglycerin verantwortlich ist, sollte klären, ob Stickstoffmonoxid selbst zu einer Relaxation glatter Gefäßmuskulatur führte. 1979 berichteten wir, daß gasförmiges Stickstoffmonoxid ein starkes Relaxans der Koronararterien von Rindern ist und die Guanylat-Cyclase aus diesem Gewebe aktiviert (Abbildung 1).^[5] Dieser Befund bestätigte die Ergebnisse von Ferid Murad und weitete die Hypothese auch auf glatte Gefäßmuskulatur aus. Es schien, daß Nitroprussid, Nitroglycerin und verwandte Nitroverbindungen die glatte Gefäßmuskulatur über eine Freisetzung von Stickstoffmonoxid relaxierten, welches dann die Bildung von cGMP stimulierte und zu einer Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur führte (Abbildung 2). Die Hypothese, daß cGMP an der Relaxation glatter Muskulatur beteiligt sei, wurde in den späten siebziger Jahren kontrovers aufgenommen, da die vorherrschende Meinung war, daß cGMP und cAMP für gegensätzliche biologische Wirkungen verantwortlich sind. Man wußte, daß cAMP die relaxierende Wirkung bestimmter Catecholamine und Prostaglandine auf glatte Muskulatur vermittelte, und von cGMP vermutete man, daß es an der Kontraktion von glatter Muskulatur beteiligt war. Die Arbeiten mehrerer Arbeitsgruppen, einschließlich der von Ferid Murad und meiner eigenen, zeigten jedoch, daß cGMP und cAMP gemeinsame biologische Funktionen wie die Relaxation vermittelten.

Der nächste Schritt zur Aufklärung des genauen Wirkungsmechanismus von Nitroglycerin bestand darin herauszufinden, wie Stickstoffmonoxid aus den Vorläufermolekülen im glatten Muskelgewebe freigesetzt wurde. Die spontane Freisetzung von Stickstoffmonoxid aus Nitrosoverbindungen wie Nitroprussid wurde zwar verstanden, aber Nitroglycerin und andere organische Nitate und Nitrite sind chemisch stabile Verbindungen, die enzymatisch oder chemisch gespalten werden müssen, um Stickstoffmonoxid freizusetzen. Bei ersten Experimenten fanden wir, daß Thiole wie Dithiothreitol die Aktivierung der Guanylat-Cyclase durch Nitroprussid und N-Nitrosoverbindungen verstärkten, ohne die Enzymaktivierung durch Stickstoffmonoxid selbst zu beeinflussen.^[6–8] Diese Verstärkung wurde einer Reaktion zwischen dem Thiol und der Nitrosoverbindungen unter Bildung eines S-Nitrosothiols zugeschrieben, das unter Abgabe von Stickstoffmonoxid zerfiel. Eine Reihe von S-Nitrosothiolen wurde synthetisiert, die sich als labile Stickstoffmonoxid-Donoren erwiesen. Bei Experimenten mit Nitroglycerin fanden wir, daß Nitroglycerin allein die Guanylat-Cyclase nicht aktivierte

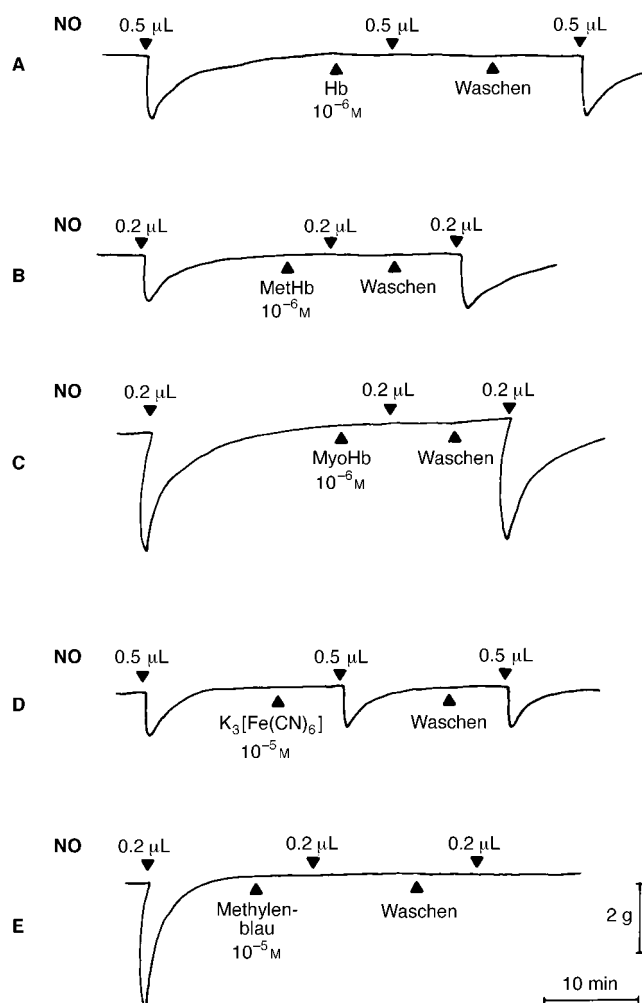
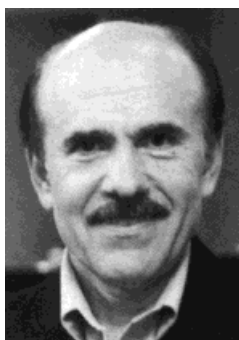


Abbildung 1. Relaxation von Streifen aus der Koronararterie des Rindes durch Stickstoffmonoxid. Die Streifen wurden eingespannt und äquilibriert, und Änderungen der isometrischen Kraft wurden wie beschrieben aufgezeichnet.^[5] Die Streifen wurden durch Inkubation in 30 mM KCl submaximal vorkontrahiert. Die Konzentrationen von NO wurden auf 0.01 bis 0.05 μM geschätzt. A: Hämoglobin (Hb), B: Methämoglobin (MetHb), C: Myoglobin (MyoHb), D: Kaliumhexacyanoferrat(III) ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) und E: Methylblau wurden in den angegebenen Konzentrationen zugesetzt. (Mit freundlicher Genehmigung leicht verändert übernommen aus Lit. [5].)

und daß daran auch der Zusatz von Dithiothreitol oder Glutathion nichts änderte. In der Gegenwart von Cystein verursachte Nitroglycerin jedoch eine bemerkenswerte Akti-



Louis J. Ignarro, geboren 1941 in Brooklyn, New York, USA, machte 1962 seinen B.A.-Abschluß in Pharmazie an der Columbia University und promovierte 1966 zum Ph.D. in Pharmakologie an der University of Minnesota. Von 1979 bis 1985 war er Professor in der Abteilung für Pharmakologie der medizinischen Fakultät der Tulane University in New Orleans, 1985 ging er als Professor in die Abteilung für Pharmakologie der medizinischen Fakultät der University of California in Los Angeles (UCLA). Er hat von den Universitäten Madrid, Lund, Gent und North Carolina die Ehrendoktorwürde verliehen bekommen. Zu seinen weiteren Auszeichnungen gehören zehn Golden Apple Awards der UCLA, der Edward G. Schlierer Foundation Award (1973–1976), der Merck Research Award (1974), der USPHS Research Career Development Award (1975–1980), der Lilly Research Award (1978) sowie der Nobel-Preis für Physiologie oder Medizin (1998).

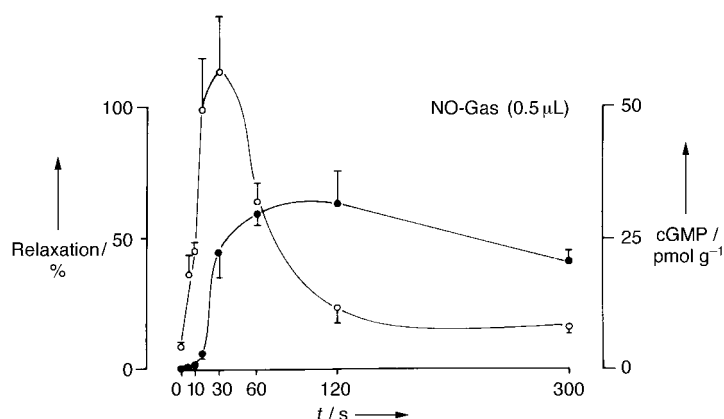


Abbildung 2. Zeitlicher Verlauf der cGMP-Akkumulation (○) und der Relaxation von Rinder-Koronararterien (●) durch Stickstoffmonoxid-Gas. Die Streifen wurden eingespannt und äquilibriert, und Änderungen der isometrischen Spannung wurden wie beschrieben aufgezeichnet.^[5,36] Die Streifen wurden durch Inkubation in 30 mM KCl submaximal vorkontrahiert. Die Relaxation und die cGMP-Spiegel wurden an bzw. in denselben arteriellen Streifen gemessen.^[10,36] Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM (Standardabweichung des Mittelwerts) ausgedrückt und stammen von 16 arteriellen Streifen aus vier verschiedenen Experimenten. (Mit freundlicher Genehmigung leicht verändert übernommen aus Lit. [36].)

vierung der Guanylat-Cyclase.^[9] Auch Natriumnitrit aktivierte die Guanylat-Cyclase in Abwesenheit von Thiolen nicht, der Zusatz verschiedener Thiole führte jedoch, im Gegensatz zu den Versuchen mit Nitroglycerin, zu einer Enzymaktivierung. Zusätzliche Experimente ergaben, daß Cystein mit Nitroglycerin reagierte, während Natriumnitrit mit jedem der untersuchten Thiole zu den entsprechenden S-Nitrosothiolen reagierte.^[10] S-Nitrosothiole zerfallen schnell unter Freisetzung von Stickstoffmonoxid, das die Guanylat-Cyclase aktiviert. Diese Befunde sind in Abbildung 3 schematisch dargestellt. Beispiele für solche S-Nitrosothiole sind S-Nitroso-N-acetylpenicillamin (SNAP), S-Nitrosglutathion (GSNO) und S-Nitrosocystein (CYSNO), die wir synthetisierten und deren biologische Wirkungen wir an Säugetiersystemen untersuchten.^[7–10] Diese S-Nitrosothiole erwiesen sich als nützliche Stickstoffmonoxid-Donoren, die jetzt häufig eingesetzt werden, um die Wirkungen von Stickstoffmonoxid in vitro und in vivo zu untersuchen.

Die Hemmung der Blutplättchen-Aggregation durch Stickstoffmonoxid

Beim Lesen der Veröffentlichungen über Nitroglycerin und Nitroprussid stieß ich auf eine Publikation, in der gezeigt wurde, daß Nitroprussid die Aggregation von menschlichen Blutplättchen inhibierte.^[11] Es stellte sich die Frage, ob Nitroprussid die Blutplättchen-Aggregation durch Mechanismen hemmte, an denen Stickstoffmonoxid und cGMP in der Weise beteiligt waren, wie sie für die relaxierende Wirkung von Nitroprussid auf die glatte Muskulatur nachgewiesen worden war. Mit einer Blutplättchen-reichen Plasmafraktion aus freiwilligen Blutspendern zeigten wir, daß Stickstoffmonoxid ein starker Inhibitor der Plättchen-Aggregation war, die von ADP, Thrombin, Kollagen und anderen aggregations-

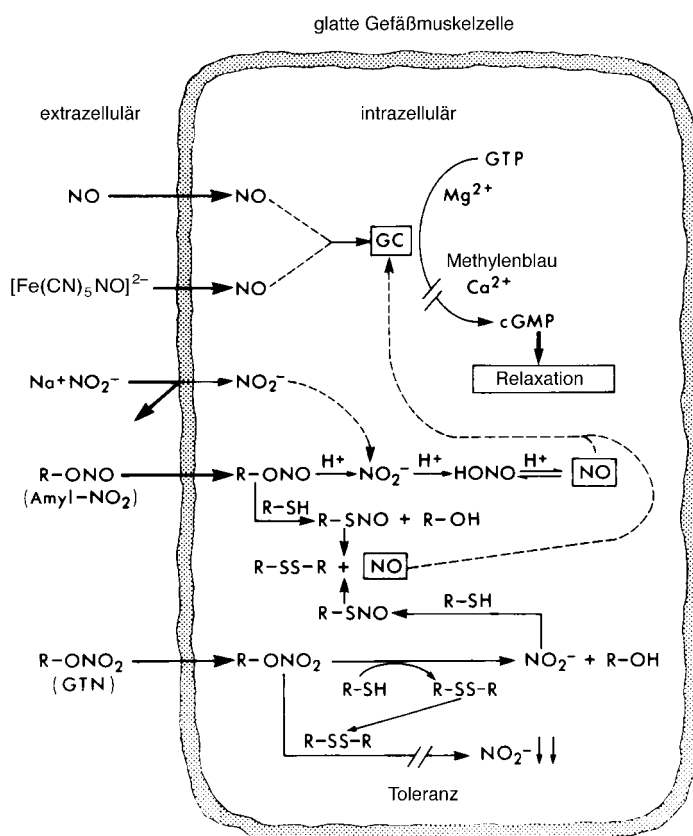


Abbildung 3. Schematisches Diagramm des vorgeschlagenen Mechanismus, nach dem organische Nitrate und Nitrite, anorganische Nitrite sowie Nitrosoverbindungen die glatte Gefäßmuskulatur relaxieren (anhand der Daten von Ignarro et al.^[10]). Nitroprussid setzt in Lösung NO frei, während organische Nitrite und Nitrate mit Thiolen zu S-Nitrosothiolen reagieren müssen, die dann unter Freisetzung von NO zerfallen. NO aktiviert die Guanylat-Cyclase, und das entstandene cGMP verursacht die Relaxation glatter Gefäßmuskulatur. Eine Toleranz gegen Nitroglycerin entsteht, wenn die Thiole und somit auch die S-Nitrosothiole und NO verbraucht sind. – NO = Stickstoffmonoxid; $[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]^{2-}$ = Nitroprussid; R-ONO = organische Nitrite; Amyl-NO₂ = Amylnitrit; R-ONO₂ = organische Nitrate; GTN = Nitroglycerin; GC = cytosolische Guanylat-Cyclase; cGMP = cyclisches GMP; R-SH = Thiole; R-SNO = S-Nitrosothiole.

fördernden Verbindungen induziert wurde, und daß dieser Anti-Plättchen-Effekt von Stickstoffmonoxid durch cGMP vermittelt wurde.^[12] Am Anti-Plättchen-Effekt von Nitroprussid schienen S-Nitrosothiole beteiligt zu sein, die als wirksame Inhibitoren der Plättchen-Aggregation bekannt waren.^[13] Menschliche Blutplättchen enthalten große Mengen an cytoplasmatischer Guanylat-Cyclase, und Stickstoffmonoxid aktivierte teilweise gereinigte Guanylat-Cyclase aus Blutplättchen über Häm-abhängige Mechanismen.

Stickstoffmonoxid verursacht also nicht nur die Relaxation glatter Gefäßmuskulatur, sondern inhibiert auch die Plättchen-Aggregation, und beide biologische Reaktionen wurden von cGMP vermittelt. Es ist interessant, daß diese beiden biologischen Wirkungen von Stickstoffmonoxid vor oder zur Zeit der Entdeckung der endothelabhängigen Relaxation von glatter Gefäßmuskulatur durch Robert Furchgott im Jahr 1980 entdeckt wurden.^[14] Um die Mechanismen der Signaltransduktion bei der Stimulation der cGMP-Synthese durch Stickstoffmonoxid besser zu verste-

hen, wurden Experimente gemacht, mit denen die biochemischen Mechanismen aufgeklärt werden sollten, über die Stickstoffmonoxid die Guanylat-Cyclase aktiviert.

Die Mechanismen der Aktivierung der Guanylat-Cyclase durch Stickstoffmonoxid

Einige der frühen Experimente zum Mechanismus der Guanylat-Cyclase befaßten sich mit der möglichen Beteiligung von enzymgebundenen Thiolgruppen an der Regulation der Katalyse.^[15–18] Wir bauten auf diesen Untersuchungen auf und fanden heraus, daß die Guanylat-Cyclase sehr empfindlich gegenüber Sauerstoff war, indem sie mit steigendem Sauerstoffpartialdruck reversibel inaktiviert wurde.^[19] Verbindungen, die Sulfhydrylgruppen oxidieren, riefen identische Wirkungen hervor, die durch Verbindungen verhindert und rückgängig gemacht werden konnten, die Sulfhydrylgruppen reduzieren. Die basale Enzymaktivität und die Aktivierung des Enzyms durch Stickstoffmonoxid waren davon gleichermaßen betroffen. Einen Schutz gegen die Enzymaktivierung boten entweder ein Überschuß an Substrat ($\text{Mg} \cdot \text{GTP}$) oder Antioxidantien mit Thiolgruppen. Das Thiol Dimercaprol (2,3-Dimercapto-1-propanol), das zwei vicinale Thiolgruppen enthält, inhibierte die Guanylat-Cyclase deutlich, nicht aber Dithiothreitol, was darauf hinwies, daß zwei dicht benachbarte SH-Gruppen im aktiven Zentrum lokalisiert waren. Weitere Untersuchungen gaben Anlaß zu der Vermutung, daß ein Schritt beim Prozeß der Enzymaktivierung in der Bindung von SH-Gruppen des Enzyms an Stickstoffmonoxid bestehen könnte. Diese Untersuchungen konnten den Aktivierungsmechanismus der Guanylat-Cyclase durch Stickstoffmonoxid jedoch nicht endgültig aufklären. Nach der Lektüre zweier Publikationen von Craven und DeRubertis,^[20, 21] in denen sie vorschlugen, daß Häm für die Aktivierung der Guanylat-Cyclase durch Stickstoffmonoxid erforderlich sei, beschlossen wir, cytosolische Guanylat-Cyclase zu reinigen und nach enzymgebundenem Häm zu suchen. Häm-gebundenes Eisen im reduzierten Zustand (Fe^{II}) hat eine hohe Bindungsaffinität für Stickstoffmonoxid, was erklären könnte, warum Stickstoffmonoxid ein solch wirkungsvoller Aktivator der Guanylat-Cyclase ist. Wir fanden, daß gereinigte Guanylat-Cyclase aus Rinderlunge ein Mol Häm pro Mol Enzym-Dimer enthielt.^[22, 23] Ähnliche Ergebnisse wurden von einer anderen Arbeitsgruppe berichtet.^[24]

Wir wollten herausfinden, ob das an die Guanylat-Cyclase gebundene Häm wirklich für die Aktivierung durch Stickstoffmonoxid erforderlich war und ob das Häm eine Rolle für den katalytischen Mechanismus des Enzyms spielte. Wir versuchten mit unterschiedlichen Methoden, das Häm aus der Guanylat-Cyclase zu entfernen, ohne das Enzym dabei zu zerstören, aber dieser Ansatz war zunächst erfolglos. Zufällig fanden wir heraus, daß das Häm vom Enzym abgelöst wurde, wenn man weitgehend ungereinigte cytosolische Fraktionen, die Guanylat-Cyclase enthielten, über Ionenaustauscherharze wie Diethylaminoethyl-Cellulose bei 9 °C statt bei 2 °C laufen ließ (der Kühlraumthermostat funktionierte nicht richtig). Diese Prozedur verursachte keine Inaktivierung des Enzyms;^[23] die basale katalytische Aktivität blieb unverändert,

aber die Guanylat-Cyclase wurde nicht mehr durch Stickstoffmonoxid aktiviert. Jedoch aktivierte zuvor gebildetes Nitrosyl-Häm das Häm-freie Enzym deutlich. Der Zusatz von Häm zur Reaktionsmischung stellte die Aktivierung der Häm-freien Guanylat-Cyclase durch Stickstoffmonoxid wieder vollständig her. Wir lernten schließlich, wie man Häm-haltige, Häm-freie und häm-rekonstituierte Formen der Guanylat-Cyclase aus Rattenleber und Rinderlunge relativ einfach herstellen konnte.^[25] Die Interpretation der Daten war eindeutig (Abbildung 4). Die cytosolische Guanylat-

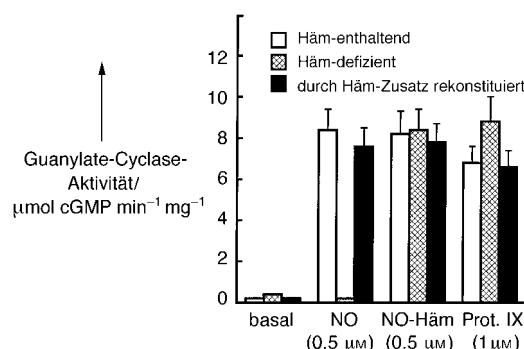


Abbildung 4. Die Häm-abhängige Aktivierung der cytosolischen Guanylat-Cyclase durch Stickstoffmonoxid. Die Guanylat-Cyclase wurde aus Rinderlunge gereinigt und wie beschrieben nachgewiesen.^[22] Das gereinigte Enzym enthielt Häm in stöchiometrischen Mengen. Das Häm wurde aus einem Teil des nativen Enzyms entfernt, um Häm-freie Guanylat-Cyclase zu erhalten; das Häm-freie Enzym wurde mit stöchiometrischen Mengen Häm zum nativen Enzym rekonstituiert wie beschrieben.^[23, 25] Enzymreaktionen wurden 5 min lang unter initialen Bedingungen durchgeführt. Die Daten stellen den Mittelwert \pm SEM von zwölf Bestimmungen aus drei verschiedenen Experimenten dar. – NO-Häm = vorgebildetes Nitrosyl-Häm; Prot. IX = Protoporphyrin IX.

Cyclase war ein Häm-Protein, und die Funktion der prosthetischen Häm-Gruppe bestand darin, Stickstoffmonoxid zu binden und mit diesem zu einem Nitrosyl-Häm-Komplex zu reagieren, was zur Aktivierung des Enzyms führte. Zusätzlich enthielt die Guanylat-Cyclase mindestens zwei reaktive SH-Gruppen am oder in der Nähe des katalytischen Zentrums, die für die volle katalytische Aktivität und die Aktivierung durch Stickstoffmonoxid im reduzierten Zustand vorliegen mußten.^[19]

Der nächste Schritt war die Aufklärung des Mechanismus, durch den das Nitrosyl-Häm die Guanylat-Cyclase aktivierte. Diese Frage war schwer zu beantworten, weil die Struktur der Guanylat-Cyclase unbekannt war. Nachdem wir uns über die schon bekannten Wechselwirkungen zwischen Hämoglobin oder Myoglobin und Stickstoffmonoxid informiert hatten, stellten wir eine Hypothese auf, die erklärte, wie Nitrosyl-Häm die Guanylat-Cyclase aktiviert. Wir glaubten, daß Häm (Eisen-Protoporphyrin IX) an einer Stelle an die Guanylat-Cyclase gebunden war, die sich neben dem katalytischen Zentrum befand, das das Substrat $\text{Mg} \cdot \text{GTP}$ bindet. Wir vermuteten, daß – wie bei anderen Häm-Proteinen – der axiale Ligand (Bindung zwischen dem Häm-Eisen und dem Protein) ein Histidinrest der Guanylat-Cyclase war, so daß ein Komplex mit fünffacher Koordination gebildet würde (wobei das Histidin und jedes der vier Pyrrol-Stickstoffatome Liganden für das Eisenzentrum sind). Die basale katalytische

Aktivität wird durch die Entfernung der Häm-Gruppe nicht beeinflusst, aber die Enzymaktivierung durch Stickstoffmonoxid wird aufgehoben. Wir schlugen vor, daß Stickstoffmonoxid eine kovalente Bindung mit dem reduzierten Häm-Eisenzentrum (Fe^{II}) eingeht und dabei ein Komplex mit fünffacher (und nicht sechsfacher) Koordination entsteht. Das bedeutet, daß die Bindung zum axialen Liganden brechen und der resultierende Nitrosyl-Häm-Komplex eine Konformationsänderung vollziehen müßte, während er an das Enzym bindet. Diese Konformationsänderung nahe dem katalytischen Zentrum könnte die Affinität der Guanylat-Cyclase für $\text{Mg} \cdot \text{GTP}$ erhöhen und damit auch die maximale Katalysegeschwindigkeit (Abbildung 5). Um diese Hypothese zu überprüfen, verwendeten wir Protoporphyrin IX (Häm ohne Eisenzentrum), um zu untersuchen, ob es die Häm-freie Guanylat-Cyclase aktivieren konnte. Wir wollten mit diesem Experiment herausfinden, ob der axiale Ligand zwischen dem Häm-Eisen und der Guanylat-Cyclase eine sterische Hin-

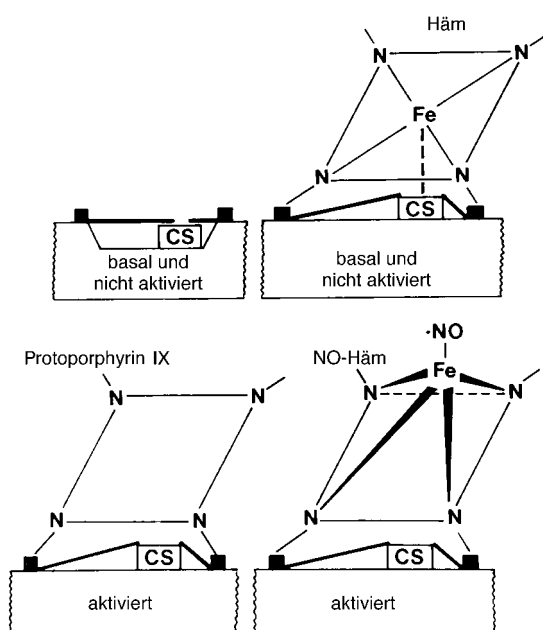


Abbildung 5. Schematische Darstellung des Mechanismus der Häm-abhängigen Aktivierung der cytosolischen Guanylat-Cyclase durch Stickstoffmonoxid. Dieses Schema basiert auf der Erkenntnis, daß Häm für die Aktivierung der Guanylat-Cyclase durch NO erforderlich ist. Im basalen oder nichtaktivierten Zustand und in Abwesenheit der prosthetischen Hämgruppe ist das katalytische Zentrum (CS) der Guanylat-Cyclase nur teilweise zugänglich, so daß die Verfügbarkeit des Substrates ($\text{Mg} \cdot \text{GTP}$) und somit auch die cGMP-Bildung begrenzt ist. In Anwesenheit der prosthetischen Hämgruppe (natives Enzym), aber in Abwesenheit von NO (basaler oder nichtaktivierter Zustand) ist die Katalyseaktivität wegen der sterischen Hinderung am katalytischen Zentrum immer noch minimal. Durch die Bindung von Häm an das Enzym wird das katalytische Zentrum freigelegt, aber der axiale Ligand (Bindung zwischen dem Häm-Eisenzentrum und dem Enzym dicht am CS) limitiert den Zugang des Substrates zum CS und somit die cGMP-Synthese. NO bindet an das Häm-Eisenzentrum unter Bildung des abgebildeten Nitroso-Häm-Adduktes. Dieser NO-Häm-Komplex bleibt fünffach koordiniert; als Folge davon wird die Bindung zum axialen Liganden gelöst, und das CS ist für das Enzymsubstrat frei zugänglich. Das aktivierte Enzym weist einen bis zu 400fachen Anstieg in V_{max} und eine dreifache Verringerung des K_m -Wertes für $\text{Mg} \cdot \text{GTP}$ auf. Der Zusatz von Protoporphyrin IX zur Häm-freien Guanylat-Cyclase imitiert die Wirkung des NO-Häm-Komplexes, weil die Bindung von Protoporphyrin IX wegen der fehlenden sterischen Hinderung durch das Häm-Eisenzentrum die Freilegung des CS ermöglicht.

derung für die Bindung von $\text{Mg} \cdot \text{GTP}$ an das katalytische Zentrum bedeutete, wohingegen Protoporphyrin IX an die Häm-Bindungsstelle binden, wegen des fehlenden Eisenzentrums aber keine sterische Hinderung verursachen sollte; das Ergebnis wäre eine Enzymaktivierung durch Protoporphyrin IX. Genau das konnten wir beobachten. Protoporphyrin IX war ein wirksamer Aktivator der Guanylat-Cyclase^[22] und imitierte den aktivierenden Effekt von Nitrosyl-Häm insofern, als die Enzymaktivierung durch Protoporphyrin IX Häm-unabhängig war, ähnlich wie es für vorher gebildetes Nitrosyl-Häm der Fall war.^[26] Eine Analyse der Reaktionskinetik zeigte, daß Protoporphyrin IX und Nitrosyl-Häm die Guanylat-Cyclase durch kinetisch nicht unterscheidbare Mechanismen aktivierte.^[26]

Diese Befunde zeigten, daß die Guanylat-Cyclase eine Porphyrin-Bindungsstelle enthielt, die für die Enzymaktivierung durch Stickstoffmonoxid verantwortlich war. Ausführlichere Untersuchungen wurden später von anderen durchgeführt,^[27–31] die unsere ursprüngliche Hypothese bestätigten.^[32] Die Aufklärung der Kristallstruktur der cytosolischen Guanylat-Cyclase wird zweifelsfrei dazu führen, daß man den präzisen Mechanismus erklären kann, durch den Stickstoffmonoxid die Guanylat-Cyclase aktiviert.

Identifizierung des relaxierenden Faktors aus Endothelzellen als Stickstoffmonoxid

Die meisten der oben erwähnten Forschungsarbeiten wurden vor oder kurz nach der Entdeckung der endothelabhängigen Vasorelaxation durch Robert Furchgott 1980 durchgeführt.^[14] Die Erkenntnis, daß Nitroglycerin ein solch starkes Vasorelaxans war, und die neueren Befunde, daß Stickstoffmonoxid ein starkes Vasorelaxans und Inhibitor der Plättchen-Aggregation war, führten zur Frage, warum Säugetiere eigentlich Rezeptoren für solche wirkungsvollen pharmakologischen Verbindungen haben. Man vermutete, daß in Säugetieren entweder Stickstoffmonoxid selbst oder eine endogene Nitroverbindung vorkommt, die Stickstoffmonoxid freisetzt. Die frühen Arbeiten über den relaxierenden Faktor aus Endothelzellen (endothelium-derived relaxing factor, EDRF) wurden ohne Kenntnis seiner chemischen Struktur durchgeführt. Wir begannen 1983 mit der Untersuchung der endothelabhängigen Vasorelaxation, weil wir wissen wollten, ob cGMP daran beteiligt war, und nicht deshalb, weil wir dachten, daß es sich bei EDRF um Stickstoffmonoxid handelte. Tatsächlich beschäftigte sich ein weiteres Projekt damit, das endogene Stickstoffmonoxid zu finden. Gerade als wir unsere Experimente mit EDRF und cGMP abgeschlossen hatten, publizierte Ferid Murads Arbeitsgruppe einen Artikel, in dem beschrieben wurde, daß die endothelabhängige Vasorelaxation durch Acetylcholin und andere Verbindungen mit der Bildung von cGMP in glatter Gefäßmuskulatur einherging.^[33] Wir hatten ähnliche Ergebnisse erhalten und herausgefunden, daß Methylenblau, ein Inhibitor der Guanylat-Cyclase, sowohl die Akkumulation von cGMP als auch den vasorelaxierenden Effekt von Acetylcholin verhinderte.^[34] Zuerst dachten wir, daß Acetylcholin die Bildung eines Metaboliten von Arachidonsäure stimulierte, der dann die

Guanylat-Cyclase aktivierte und die cGMP-Konzentration anhub. Diese Vermutung wurde durch Untersuchungen in diesem und anderen Laboratorien unterstützt. Diese ergaben, daß Verbindungen, welche die Bildung von Arachidonsäure und bestimmten Arachidonsäuremetaboliten beeinflussen, auch die Acetylcholin-vermittelte Vasorelaxation beeinflussen.^[33–35] Aber ich war mit dieser Ansicht nicht zufrieden, weil Experimente in meinem Labor ergaben, daß keine andere Substanz außer Stickstoffmonoxid die Guanylat-Cyclase aktivieren konnte. Nachdem wir unsere Daten noch einmal überprüft hatten, erkannten wir plötzlich, daß unser Befund, daß Methylenblau sowohl die Erhöhung der cGMP-Konzentration als auch die Vasorelaxation durch Acetylcholin verhinderte, unseren früheren Befunden zur Hemmung der cGMP-Bildung und der Stickstoffmonoxid-vermittelten Vasorelaxation durch Methylenblau ähnelte.^[36] Dies deutete darauf hin, daß die vasorelaxierende Wirkung von Acetylcholin der Wirkung von Stickstoffmonoxid aus pharmakologischer Sicht ähnlich war. Dieses Konzept wird in Abbildung 6 veranschaulicht, die im Jahr 1984 publiziert wurde.^[34] Wir waren trotzdem vorsichtig und schrieben in der Veröffentlichung nicht, daß es sich bei EDRF um Stickstoffmon-

Stickstoffmonoxid war. Mit dem ersten Experiment sollte überprüft werden, ob EDRF aus Arterien und Venen die Guanylat-Cyclase aktivieren konnte und dadurch für die erhöhten Gewebekonzentrationen von cGMP als Reaktion auf den Zusatz von Acetylcholin oder Bradykinin verantwortlich war; diese Arbeit wurde 1986 veröffentlicht.^[39] Isolierte arterielle und venöse Ringe aus intrapulmonalen Gefäßen von Rindern wurden mit Mischungen inkubiert, die cytosolische Guanylat-Cyclase aus Rinderlunge enthielten. Der Zusatz von Acetylcholin zu den Reaktionsmischungen mit Arterienringen führte zur Aktivierung der Guanylat-Cyclase, und Bradykinin hatte den gleichen Effekt in Reaktionsmischungen mit arteriellen oder venösen Ringen. Die Aktivierung der Guanylat-Cyclase durch Acetylcholin und Bradykinin in arteriellen und venösen Ringen hing von der Anwesenheit einer intakten Endothelschicht ab, und die Reaktion wurde durch Methylenblau blockiert und durch Antioxidantien verstärkt. Diese Experimente zeigten, daß EDRF aus Arterien und Venen die Guanylat-Cyclase über solche Mechanismen aktivierte, die durch Methylenblau inhibiert und durch Antioxidantien verstärkt wurden. Diese Daten wiesen deutlich auf die Möglichkeit hin, daß EDRF

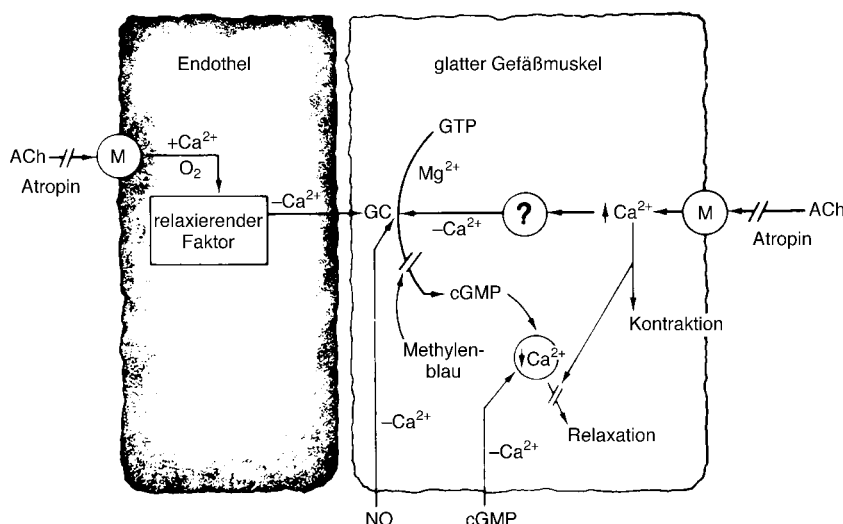


Abbildung 6. Schematische Darstellung der Ähnlichkeiten der Mechanismen von Acetylcholin-vermittelter und Stickstoffmonoxid-vermittelter Relaxation glatter Muskulatur. Acetylcholin und NO verursachen eine Vasorelaxation über Mechanismen, die die Bildung von cGMP beinhalten. Die Hemmung der cGMP-Synthese durch Methylenblau inhibiert die Vasorelaxation sowohl durch Acetylcholin als auch durch NO. – ACh = Acetylcholin; M = muscarinerge Rezeptor; GC = cytosolische Guanylat-Cyclase; – Ca²⁺ = Calcium-unabhängiger Mechanismus; + Ca²⁺ = Calcium-abhängiger Mechanismus. (Mit freundlicher Genehmigung leicht verändert übernommen aus Lit. [34].)

oxid handeln könnte. Später dann, als in anderen Laboratorien gezeigt worden war, daß EDRF ein sehr instabiles Molekül ist,^[37, 38] erkannten wir, daß die Daten aus mehreren Laboratorien mit unserer Ansicht übereinstimmten, daß EDRF und Stickstoffmonoxid sehr ähnlich waren. Die beiden Projekte meines Labors über EDRF/cGMP und endogenes Stickstoffmonoxid gingen ineinander über, aber wir wollten immer noch nicht vorschlagen, daß es sich bei EDRF um Stickstoffmonoxid handelte.

Eine Reihe von Experimenten wurde geplant, um unsere noch nicht publizierte Hypothese zu beweisen, daß EDRF

Stickstoffmonoxid oder eine chemisch verwandte Substanz war, z. B. eine labile Nitrosoverbindung. Mit dem nächsten Experiment wollten wir bestimmen, ob die Aktivierung der Guanylat-Cyclase durch EDRF ebenso wie die Enzymaktivierung durch Stickstoffmonoxid Häm-abhängig war. Ähnliche Experimente wie oben beschrieben wurden mit Guanylat-Cyclase durchgeführt, die in Häm-haltiger und Häm-freier Form gereinigt worden war. Natürlich war die Guanylat-Cyclase-Aktivierung durch EDRF ebenso wie die Aktivierung durch Stickstoffmonoxid Häm-abhängig (Abbildung 7). Nach Beendigung des ersten Experimentes dieser Serie wußten wir, daß wir erfolgreich waren. EDRF mußte Stickstoffmonoxid sein. Aber ich wollte noch eindeutigere Experimente durchführen, bevor ich öffentlich vertreten wollte, daß EDRF Stickstoffmonoxid ist. Wir bauten einen Bioassay-Kaskaden-Apparat, um die chemischen und pharmakologischen Eigenschaften des EDRF aus Arterien und Venen zu untersuchen und diese mit den Eigenschaften von Stickstoffmonoxid zu vergleichen.

Die Ergebnisse dieser Experimente bewiesen die sehr große Ähnlichkeit von EDRF und Stickstoffmonoxid und wurden 1986 und Anfang 1987 auf einigen Tagungen vorgestellt,^[40–42] bevor sie 1987 publiziert wurden.^[43, 44]

Insbesondere ein Experiment überzeugte mich ohne jeden Zweifel davon, daß EDRF Stickstoffmonoxid war. Wir knüpften an ein früheres, in meinem Labor durchgeführtes Experiment mit der Guanylat-Cyclase an, bei dem wir anhand der Verschiebung des Absorptionsmaximums in der Soret-Region zeigten, daß die Guanylat-Cyclase – wie auch Hämoglobin – ein Häm-Protein war, das mit Stickstoff-

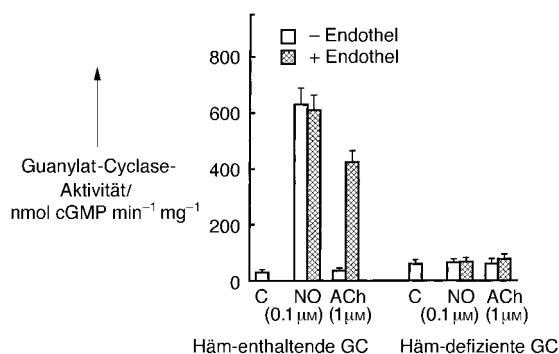


Abbildung 7. Die endothelabhängige und Häm-abhängige Aktivierung der cytosolischen Guanylat-Cyclase durch den relaxierenden Faktor aus Endothelzellen (EDRF), der aus arteriellen Ringen freigesetzt wurde. Diese Experimente basieren auf bereits beschriebenen Methoden.^[39] Intrapulmonale arterielle Ringe aus Rindern wurden mit oder ohne intaktes Endothel präpariert und in Gewebebädern inkubiert, um die Vasorelaxation zu bestimmen. Acetylcholin (ACh) und Stickstoffmonoxid wurden den Gewebebädern zugesetzt, um die Relaxationsantwort zu messen. ACh verursachte eine endothelabhängige Relaxation, während NO eine endothelunabhängige Relaxation hervorrief. Nach der ersten Versuchsreihe wurden die Ringe schnell entnommen und in Reaktionsgefäße überführt, die entweder Häm-haltige oder Häm-freie Guanylat-Cyclase enthielten; dann wurden Acetylcholin oder NO zugegeben. Acetylcholin und NO verursachten eine Häm-abhängige Aktivierung der Guanylat-Cyclase, aber nur NO bewirkte deren endothelunabhängige Aktivierung. Die Schlußfolgerung war, daß Acetylcholin die Bildung von NO im Gefäßendothel verursacht und daß NO die Häm-abhängige Aktivierung der Guanylat-Cyclase bewirkt. Die Daten stellen den Mittelwert \pm SEM von zwölf Messungen aus sechs verschiedenen Experimenten dar. – C = Kontrolle (d. h. kein Zusatz).

monoxid zu einem Nitrosyl-Häm-Addukt reagierte.^[23] Diese klassische chemische Analyse bewies die Anwesenheit eines Häm-Eisenzentrums und charakterisierte die Guanylat-Cyclase als Häm-Protein. Wir führten entsprechende Experimente mit EDRF aus kultivierten Aortenendothelzellen von Rindern durch und zeigten, daß EDRF eine Absorptionsverschiebung in Hämoglobin verursachte, die identisch mit der für authentisches Stickstoffmonoxid war (Abbildung 8).^[43] Plötzlich ergaben alle Daten aus unserem und anderen Laboratorien Sinn und bestätigten die Ansicht, daß EDRF Stickstoffmonoxid war. EDRF ist ein kleines, labiles und lipophiles Molekül, das durch Sauerstoff und von Sauerstoff abgeleitete Radikale inaktiviert wird; es aktiviert die cytosolische Guanylat-Cyclase über einen Häm-abhängigen Mechanismus, bewirkt die Relaxation glatter Muskulatur und inhibiert die Plättchen-Aggregation und -Adhäsion über einen cGMP-abhängigen Mechanismus; seine Wirkungen werden von Häm-Proteinen oder Methylenblau blockiert, aber von Antioxidantien oder Sauerstoffradikal-Fängern verstärkt.

Während wir einige der oben erwähnten Experimente durchführten, bestätigten andere Laboratorien durch ihre Experimente, daß EDRF Stickstoffmonoxid ist. So wurde berichtet, daß Hämoglobin die durch Acetylcholin herbeigeführte, endothelabhängige Vasorelaxation beeinträchtigte;^[45, 46] es wurde gezeigt, daß das Superoxid-Anion die chemische Stabilität des EDRF verringerte, während Superoxid-Dismutase diese erhöhte,^[37, 38] und daß EDRF die Plättchen-Aggregation inhibierte.^[47] Alle Wirkungen des EDRF waren identisch mit denen von Stickstoffmonoxid.

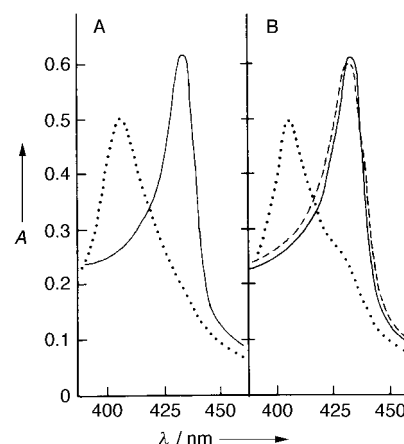


Abbildung 8. Die Identifizierung des relaxierenden Faktors aus Endothelzellen (EDRF) als Stickstoffmonoxid durch spektrophotometrische Analyse der Reaktion zwischen Desoxyhämoglobin und NO oder EDRF. Der EDRF wurde von frisch präparierten Aorten-Endothelzellen aus Rindern gebildet, die durch das Calcium-Ionophor A23187 stimuliert wurden. Die Experimente wurden in Quarzküvetten wie beschrieben durchgeführt.^[43] A: Die durchgezogene Linie bezieht sich auf eine Lösung von 5 µM Desoxyhämoglobin; die gepunktete Linie bezieht sich auf Desoxyhämoglobin, dem NO-Gas zugesetzt wurde. B: Die durchgezogene Linie bezieht sich auf eine Lösung von 5 µM Desoxyhämoglobin; die gestrichelte Linie bezieht sich auf Desoxyhämoglobin nach Inkubation mit 10^6 Endothelzellen; die gepunktete Linie bezieht sich auf Desoxyhämoglobin nach Inkubation mit Endothelzellen in Gegenwart von 1 µM A23187. Die gezeigten Daten stammen aus einem Experiment, das für drei separate Experimente repräsentativ ist. (Mit freundlicher Genehmigung leicht verändert übernommen aus Lit. [43].)

Trotz dieser offensichtlichen Analogie wollte sich keiner soweit hervorwagen und behaupten, daß EDRF Stickstoffmonoxid ist, außer Robert Furchgott und mir. Im Juni 1986 schlugen wir unabhängig voneinander diese Hypothese auf einer internationalen Konferenz in Rochester, Minnesota, vor.^[40]

Die physiologische Bedeutung von Stickstoffmonoxid für die Gefäßbiologie

Kurz nach der Entdeckung, daß EDRF Stickstoffmonoxid ist, wurde bewiesen, daß Gefäßendothelzellen Stickstoffmonoxid und Citrullin aus Arginin bilden können.^[48] Dieser Befund ähnelte der Beobachtung, daß Nitrit (NO_2^-) und Nitrat (NO_3^-) in Cytokin-aktivierten Makrophagen aus Arginin gebildet werden.^[49–51] Tatsächlich zeigten diese Untersuchungen, daß ein Strukturanalogen von Arginin, N^G -Methylarginin, die Synthese von NO_2^- und NO_3^- aus Arginin in Makrophagen hemmte, ebenso wie die Bildung von Stickstoffmonoxid aus Arginin in Endothelzellen. Bredt und Snyder^[52] bestätigten diese ursprünglichen Befunde und wiesen eindeutig nach, daß ein Enzym die Umwandlung von Arginin zu Stickstoffmonoxid und Citrullin katalysierte. Das Enzym wurde Stickstoffmonoxid-Synthase genannt, und diese Untersuchung war der Beginn einer Forschungswelle, die zur Charakterisierung und Reinigung der Isoformen, zur Aufklärung des Katalysemechanismus und zur Aufstellung von Struktur-Funktions-Beziehungen der Stickstoffmonoxid-Synthase führte.

Während dieser Zeit wurden auch unglaubliche Fortschritte bei der Charakterisierung der physiologischen und pathophysiologischen Eigenschaften von endogenem Stickstoffmonoxid gemacht. Vaskuläre Endothelzellen synthetisieren Stickstoffmonoxid kontinuierlich, um eine Vasodilatation zu bewirken, die eine Steigerung des systemischen Blutdrucks verhindern soll.^[62, 63] Diesen Schluß zog man aus Experimenten, bei denen N^G -Methylarginin, ein kompetitiver Inhibitor der Stickstoffmonoxid-Synthase, in Versuchstieren einen anhaltenden systemischen Blutdruckanstieg nach intravenöser Injektion hervorrief. Die hypertensive Reaktion wurde durch intravenöse Injektion von L-Arginin im Überschuß, einem Substrat der Stickstoffmonoxid-Synthase, vollständig aufgehoben. Die kontinuierliche Bildung von Stickstoffmonoxid in Endothelzellen scheint eine Folge des kontinuierlichen Blutflusses oder Scherstress^[64] zu sein, der die Calcium-abhängige Aktivierung der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase auslösen kann.^[65] Aus dem Endothel stammendes Stickstoffmonoxid kann auch die Plättchen-Aggregation und -Adhäsion inhibieren^[66] und die Proliferation der darunterliegenden glatten Gefäßmuskulatur verlangsamen oder verhindern.^[67] Es wird weiterhin über die Aufklärung der protektiven Rolle von Stickstoffmonoxid bei der Reperfusion oder bei Reoxygenierungsschaden, Restenose und Atherosklerose geforscht. Die schützenden Wirkungen von Stickstoffmonoxid beruhen vermutlich auf seiner Fähigkeit, den lokalen Blutfluß zu verbessern, Thrombose oder Zelladhäsion zu hemmen, in die Zellproliferation einzugreifen und die Schlüsselenzyme bei der Modifizierung oder Zerstörung von Zellen zu inhibieren.

Die Neurotransmitter-Funktion von Stickstoffmonoxid wurde zuerst im Hirn nachgewiesen.^[68] Diese Beobachtungen basierten auf den Befunden, daß Glutamat und Stickstoffmonoxid die Synthese von cGMP im Hirn stimulierten und daß auch Arginin den cGMP-Spiegel unter bestimmten Umständen heben konnte. Die Funktion von Stickstoffmonoxid als Neurotransmitter im Zentralnervensystem blieb unbekannt, aber eine mögliche Hypothese war, daß Stickstoffmonoxid die Langzeit-Verstärkung bei der Kontrolle des Lernens und des Gedächtnisses moduliert.^[66] Die schlechte Eigenschaft von Stickstoffmonoxid war, daß seine exzessive, durch Glutamat stimulierte Synthese im Hirn zu schweren Gewebeschäden in spezialisierten Hirnregionen führen kann.^[69] Weiterhin kann die exzessive Stickstoffmonoxidsynthese in der Nähe von Oligodendrocyten zu einer Hemmung der Myelinbildung und möglicherweise zu Multipler Sklerose führen.^[70] Es häufen sich Beweise dafür, daß Stickstoffmonoxid ein wichtiger Transmitter der nicht-adrenergen-nichtcholinergen (NANC) Neuronen ist, die zahlreiche glatte Muskelgewebe innervieren, darunter die der Luftwege, des Gastrointestinaltraktes und des Urogenitaltraktes.^[66]

Wir untersuchten die Möglichkeit, daß Stickstoffmonoxid der wichtigste Neurotransmitter für die Peniserektion war. Wir verfolgten dieses Projekt, da vor 1990 der physiologische Mechanismus, durch den eine Nervenstimulation die erektile Funktion fördert, unbekannt war. Man glaubte allgemein, daß eine Erregung des parasympathischen Nervensystems zu einer Acetylcholin-vermittelten erektile Reaktion führte.

Die erektile Reaktion besteht aus neuronal vermittelter Relaxation der vaskulären und nichtvaskulären glatten Muskulatur, die ein Teil des kavernenösen oder trabekulären oder sinusoiden Arteriolenetzes im Corpus cavernosum ist. Das Problem für Pharmakologen und Physiologen war, daß der cholinerge Neurotransmitter Acetylcholin nichtvaskuläre glatte Muskulatur nicht relaxieren kann und vaskuläre glatte Muskulatur nur über endothelabhängige Mechanismen. Man hielt es für höchst unwahrscheinlich, daß Acetylcholin, eine quartäre Ammoniumverbindung (hochgeladen), das vaskuläre Endothel von den neuronalen Synapsen an den glatten Gefäßmuskelzellen her erreichen kann. Man sollte jedoch erwarten, daß eine Erregung Stickstoffmonoxid-haltiger NANC-Nerven, die die nichtvaskuläre und vaskuläre glatte Muskulatur im Corpus cavernosum innervieren, zu einer starken Relaxation der glatten Muskulatur und somit zu einer Peniserektion führen würde. Zur Zeit unserer ersten Experimente war nicht bekannt, ob erektiles Gewebe in Säugetieren durch NANC-Nerven innerviert war, und wir waren für solche histochemischen Experimente nicht ausgerüstet. Wir benutzten statt dessen das klassische Gewebepreparat, bei dem Streifen aus dem Corpus cavernosum, die aus dem Penis von Kaninchen und Mensch isoliert worden waren, in flüssigkeitsgefüllten Kammern inkubiert, vorkontrahiert und dann elektrisch stimuliert wurden, um eine Relaxation der glatten Muskulatur zu bewirken.

Unser erstes Experiment zeigte, daß die Stimulation von NANC-Nerven isolierter Streifen aus dem Corpus cavernosum des Kaninchens zu einer Relaxation der glatten Muskulatur führte, die von Inhibitoren der Stickstoffmonoxid-Synthase, Hämoglobin und Methylenblau blockiert wurde.^[71] Auch Stickstoffmonoxid in Form von S-Nitrosothiolen relaxierte die glatte Muskulatur, und die elektrische Stimulation des Gewebes resultierte in erhöhten Konzentrationen von Nitrit (NO_2^-) und cGMP.^[71] Die Schlußfolgerung war eindeutig, Stickstoffmonoxid ist der Neurotransmitter in NANC-Nerven, die das Corpus cavernosum innervieren, und die Nervenstimulation resultiert in einer Stickstoffmonoxid-vermittelten Relaxation der vaskulären und nichtvaskulären glatten Muskulatur. Die Wirkung von Stickstoffmonoxid als Neurotransmitter wird wiederum von cGMP vermittelt. Der Signaltransduktionsweg mit Stickstoffmonoxid als Neurotransmitter scheint daher der gleiche zu sein wie der für Stickstoffmonoxid aus Endothelzellen. Zusätzliche Experimente mit menschlichem Corpus cavernosum lieferten die gleichen Ergebnisse wie die Experimente, bei denen Kaninchen-Gewebe benutzt wurde.^[72, 73] Abbildung 9 illustriert die typische ausgeprägte, aber transiente Relaxation glatter Muskulatur, die durch elektrische Stimulation des Corpus cavernosum aus Mensch und Kaninchen hervorgerufen wurde. Wir staunten über diese ausgesprochen transiente Reaktion sowie darüber, daß diese elektrisch induzierten Reaktionen durch die Gabe von authentischem Stickstoffmonoxid-Gas imitiert werden konnten. Der vielleicht überzeugendste Beweis dafür, daß die elektrische Stimulation über Mechanismen, an denen Stickstoffmonoxid beteiligt ist, eine erektile Funktion auslöst, bestand in dem Befund, daß N^G -Nitroarginin, ein kompetitiver Inhibitor der Stickstoffmonoxid-Synthase, die elektrischen Antworten unterband,

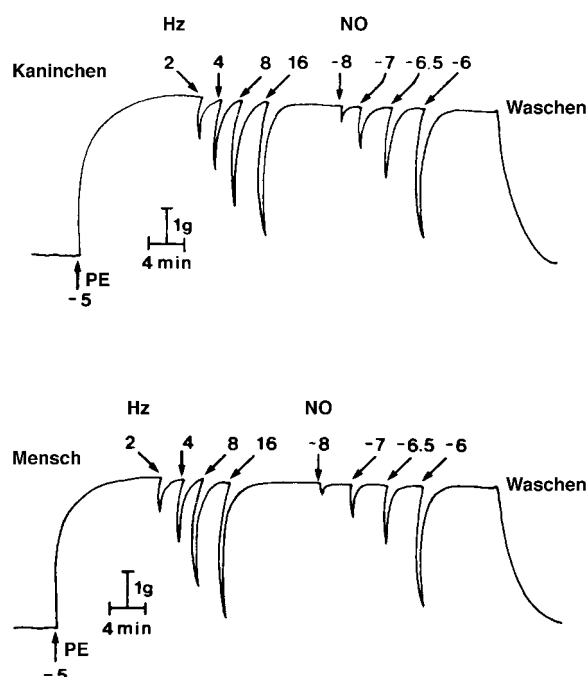


Abbildung 9. Die Relaxation der glatten Muskulatur des Corpus cavernosum durch Stickstoffmonoxid ähnelt stark der Relaxation, die durch elektrische Stimulation von NANC-Nerven hervorgerufen wird. Streifen des Corpus cavernosum aus dem Penis von Kaninchen und Menschen wurden präpariert und in Gewebepäthern inkubiert, dann wurde die isometrische Spannung gemessen.^[71, 73] Die glatte Muskulatur wurde durch Phenylephrin (PE) vorkontrahiert. Die Stimulation durch ein elektrisches Feld wurde bei 2, 4, 8 und 16 Hz durchgeführt. Die Konzentrationen von NO und PE sind als Logarithmus der molaren Konzentration angegeben. Die Diagramme sind repräsentativ für 12–18 Streifen aus vier Kaninchen- oder vier menschlichen Präparaten.

wohingegen das Vorliegen des Enzymsubstrats L-Arginin im Überschuss diesen inhibitorischen Effekt von N^G -Nitroarginin aufhob (Abbildung 10). Unsere frühen Untersuchungen zeigten auch, daß die Hemmung des Abbaus von cGMP durch die

Verwendung von Phosphodiesterase-Inhibitoren sowohl die elektrisch induzierte als auch die Stickstoffmonoxid-induzierte Relaxation der glatten Muskulatur verstärkte.^[72–74] Die Daten zur Verstärkung der Stickstoffmonoxid-vermittelten Relaxation des Corpus cavernosum durch M&B 22,948 (Zaprinast), einen Inhibitor der cGMP-hydrolysierenden Phosphodiesterase, sind in Abbildung 11 gezeigt. Diese Befunde machten deutlich, daß die Relaxation der glatten Muskulatur des Corpus cavernosum durch Erregung von NANC-Nerven oder durch Zugabe von Stickstoffmonoxid von cGMP vermittelt wird.

Diese Ergebnisse erhielten den physiologischen Mechanismus der Peniserektion, indem sie einen kritischen Signaltransduktionsweg aufklärten, der durch Wirkstoffe manipuliert werden könnte. Beispielsweise könnten Wirkstoffe, die die Bildung oder die Wirkung von Stickstoffmonoxid oder cGMP beeinträchtigen, auch die erektile Reaktion verändern und zur Therapie des Priapismus eingesetzt werden. Noch viel wichtiger ist jedoch, daß Wirkstoffe, die die Bildung oder Wirkung von Stickstoffmonoxid oder cGMP verstärken, auch die erektile Reaktion verstärken und zur Therapie der Impotenz, der häufigsten medizinischen Funktionsstörung bei Männern, verwendet werden können. 1998 wurde der Wirkstoff Sildenafil (Viagra) zur wirkungsvollen Behandlung der Impotenz auf den Markt gebracht. Sildenafil ist ein relativ selektiver Inhibitor von einer der Phosphodiesterase-Isoformen, die cGMP abbaut und in relativ hoher Konzentration im Corpus cavernosum vorkommt. Durch Sildenafil können hohe cGMP-Spiegel in der glatten Muskulatur des Corpus cavernosum erzielt werden, sobald ein Stickstoffmonoxid-Signal von den NANC-Nerven kommt. Sildenafil verstärkt die Peniserektion, die durch jede Form der Erregung – mental oder physisch – der NANC-Nerven verursacht wird, die das Corpus cavernosum innervieren, aber der Wirkstoff allein kann keine erektile Antwort ohne die vorhergehende NANC-Nerven-Erregung auslösen. Sildenafil scheint für die effektive

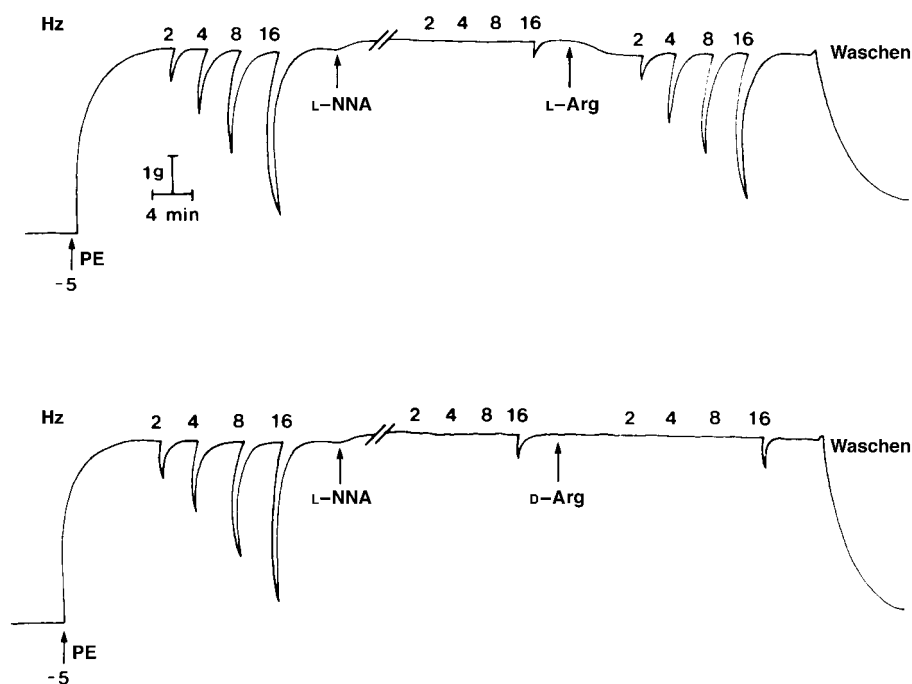


Abbildung 10. Die Relaxation der glatten Muskulatur aus menschlichem Corpus cavernosum durch elektrische Stimulation wird durch Stickstoffmonoxid-Synthase-Inhibitoren blockiert. Streifen aus dem Corpus cavernosum des menschlichen Penis wurden präpariert und in Gewebepäthern inkubiert, dann wurde die isometrische Spannung gemessen.^[71, 73] Die glatten Muskeln wurden durch Phenylephrin vorkontrahiert. Die Stimulation durch ein elektrisches Feld wurde bei 2, 4, 8 und 16 Hz durchgeführt. N^G -Nitroarginin (L-NNA) und Arginin (L-Arg oder D-Arg) wurden in Konzentrationen von 30 bzw. 300 μ M eingesetzt. Die Diagramme sind repräsentativ für 12–18 Streifen aus vier menschlichen Präparaten.

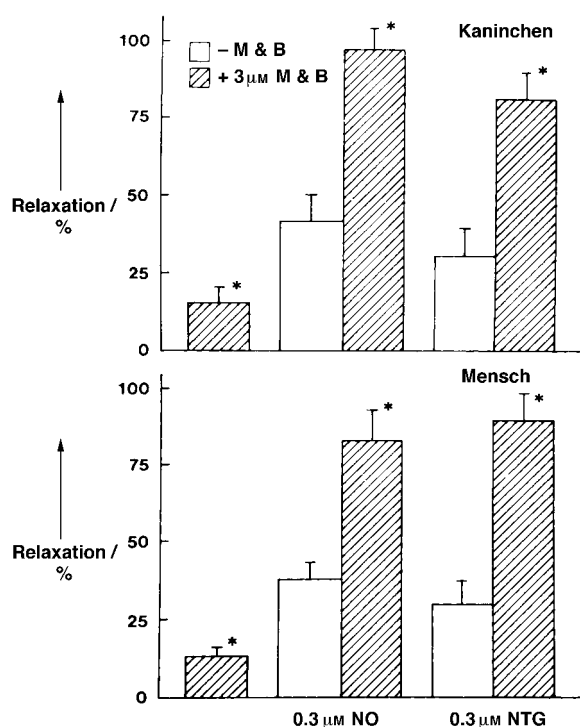


Abbildung 11. Die Verstärkung der von Stickstoffmonoxid oder Nitroglycerin (NTG) ausgelösten Relaxation von glatter Muskulatur des Corpus cavernosum aus Mensch und Kaninchen durch M&B 22,948 (M&B). Die Streifen aus dem Corpus cavernosum von Mensch und Kaninchen wurden präpariert und in Gewebepässern inkubiert, dann wurde die isometrische Spannung gemessen.^[71, 73] Die glatte Muskulatur wurde durch 10 µM Phenylephrin vorkontrahiert. Jeder Meßwert stellt den Mittelwert \pm SEM von 9–12 Streifen aus vier Kaninchen- und vier menschlichen Präparaten dar. Das Sternsymbol zeigt an, daß alle in Gegenwart von M&B 22,948 gemessenen Werte sich signifikant von den entsprechenden Meßwerten ohne Zusatz von M&B 22,948 unterscheiden ($p < 0.001$).

Behandlung verschiedener Formen und Grade der Impotenz geeignet zu sein. Durch unser verbessertes Verständnis der Physiologie der erektilen Funktion werden Pathophysiologie und Ursachen der Impotenz aufgeklärt werden können und weitere Türen für die Entwicklung von Wirkstoffen zur Therapie der Impotenz geöffnet werden.

Zukünftige Entwicklungen der Stickstoffmonoxid-Forschung in der Gefäßbiologie

Das Wissen darüber, daß vaskuläres Stickstoffmonoxid aus Endothelzellen und neuronal gebildetes Stickstoffmonoxid die Relaxation von glatter vaskulärer und nichtvaskulärer, mit dem Gefäßsystem assoziierter Muskulatur bewirken kann, wird Forschern und Klinikern bei der Diagnose, Behandlung und Prävention von lebensbedrohlichen kardiovaskulären Krankheiten wie Koronararterienerkrankungen, essentielle Hypertonie, Schlaganfall, von Diabetes verursachten vaskulären Komplikationen sowie verwandten Krankheiten von Nutzen sein. Schon jetzt zeichnet sich ab, daß Stickstoffmonoxid viele wichtige physiologische Rollen bei der Regulation und Protektion zahlreicher Gewebe- und Organfunktionen spielt. Unterbrechungen des Stickstoffmonoxid-cGMP-Weges sind wahrscheinlich die Ursache für die Pathophysiologie

vieler kardiovaskulärer Krankheiten. Ein besseres Verständnis der grundlegenden physiologischen Mechanismen des Stickstoffmonoxid-cGMP-Weges sollte zur Entwicklung neuer therapeutischer Strategien führen, um Morbidität und Mortalität bei kardiovaskulären Erkrankungen zu senken.

Für meine Entwicklung als Wissenschaftler waren viele Menschen verantwortlich, denen ich sehr dankbar bin. Meine Mentoren Fred Shideman und Elwood Titus lehrten mich die Bedeutung von Konzepten, wie dem experimentellen Ansatz, dem Aufstellen und Überprüfen einer Hypothese, der kritischen Bewertung von Experimenten, die manchmal wie erwartet ausgehen, manchmal aber auch nicht, und die Bedeutung des Denkens. Bei meiner ersten Anstellung nach meiner Postdoktorandenzeit lehrte mich Barbara Petrack die Bedeutung von Respekt und harter Arbeit in der Wissenschaft. In der Anfangszeit meiner akademischen Karriere ermutigten und motivierten mich meine Kollegen Bill George und Phil Kadowitz. Jim Fisher war mir durch sein ständiges Vorbild eine Motivation, ein guter Lehrer für meine Medizinstudenten und Doktoranden zu sein. Den meisten Dank schulde ich vermutlich Gautam Chaudhuri, der mich am meisten ermutigte und motivierte, meine Arbeit fortzusetzen und neue Höhen zu erklimmen. Alle meine Doktoranden, Postdoktoranden und medizinischen Mitarbeiter sowie Gastwissenschaftler haben wichtige Beiträge geleistet. Zu ihnen gehören (in alphabetischer Reihenfolge): John Adams, Ernesto Aeberhard, Nicole Arabolos, William Aronson, Bryan Ballot, Barbara Barry, Georgette Buga, Theresa Burke, Peggy Bush, Russell Byrns, Stella Cech, Gordon Cohen, Ronald Day, Jonathan Degnan, James Edwards, Richard Fitch, Michele Gold, Jeanette Griscavage, Rosemarie Gross, Carl Gruetter, Darlene Gruetter, Richard Harbison, Toshio Hayashi, Adrian Hobbs, Philip Horwitz, Howard Lippton, Dennis McNamara, B. Theo Mellion, Steve Napoli, Eliot Ohlstein, Richard Paddock, Waldemar Radziszewski, Norma Rogers, Robert Smith, Hugo Vargas, Liu Hua Wei, Michael Wolin und Keith Wood.

Die Zusammenarbeit mit Kollegen unseres Fachbereichs und anderer Institute waren für unsere Erfolge unerlässlich. Besonders wichtig waren dabei William Baricos, Gerald Buckberg, Steven Cederbaum, Gautam Chaudhuri, Jon Fukuto, William George, Scott Henderson, Albert Hyman, Philip Kadowitz, Jack Lancaster, Jean Merrill, William Pearce, Jacob Rajfer, Michael Sherman, Dennis Stuehr und Sherwin Wilk.

Unsere Forschungsarbeiten werden seit 1973 kontinuierlich vom National Heart, Lung and Blood Institute der National Institutes of Health gefördert. Weitere unschätzbare Unterstützung kam von der American Heart Association, der American Cancer Society, dem Laubisch Fund for Cardiovascular Research, dem Tobacco-Related Disease Research Program, dem Council for Tobacco Research, USA, der Pharmaceutical Manufacturers Association und der Schlieder Educational Foundation.

Eingegangen am 22. Februar 1999 [A328]

Übersetzt von Dr. Christiane Koszka, Wien

International Edition: *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 1882–1892

Stichwörter: Enzyme • Neurotransmitter • Nobel-Aufsätze • Signaltransduktion • Stickstoffmonoxid

- [1] S. Katsuki, W. Arnold, C. Mittal, F. Murad, *J. Cyclic Nucleotide Res.* **1977**, 3, 23–35.
- [2] W. Arnold, C. Mittal, S. Katsuki, F. Murad, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1977**, 74, 3203–3207.
- [3] F. Murad, C. Mittal, W. Arnold, S. Katsuki, H. Kimura, *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* **1978**, 9, 145–158.
- [4] S. Katsuki, F. Murad, *Mol. Pharmacol.* **1977**, 13, 330–341.
- [5] C. A. Gruetter, B. K. Barry, D. B. McNamara, D. Y. Gruetter, P. J. Kadowitz, L. J. Ignarro, *J. Cyclic Nucleotide Res.* **1979**, 5, 211–224.
- [6] E. H. Ohlstein, B. K. Barry, D. Y. Gruetter, L. J. Ignarro, *FEBS Lett.* **1979**, 102, 316–320.
- [7] L. J. Ignarro, J. C. Edwards, D. Y. Gruetter, B. K. Barry, C. A. Gruetter, *FEBS Lett.* **1980**, 110, 275–278.
- [8] L. J. Ignarro, B. K. Barry, D. Y. Gruetter, J. C. Edwards, E. H. Ohlstein, C. A. Gruetter, W. H. Baricos, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1980**, 94, 93–100.
- [9] L. J. Ignarro, C. A. Gruetter, *Biochim. Biophys. Acta* **1980**, 631, 221–231.
- [10] L. J. Ignarro, H. Lippton, J. C. Edwards, W. H. Baricos, A. L. Hyman, P. J. Kadowitz, C. A. Gruetter, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1981**, 218, 739–749.
- [11] A. Saxon, H. E. Kattlove, *Blood* **1976**, 47, 957–961.
- [12] B. T. Mellion, L. J. Ignarro, E. H. Ohlstein, E. G. Pontecorvo, A. L. Hyman, P. J. Kadowitz, *Blood* **1981**, 57, 946–955.
- [13] B. T. Mellion, L. J. Ignarro, C. B. Myers, E. H. Ohlstein, B. A. Ballot, A. L. Hyman, P. J. Kadowitz, *Mol. Pharmacol.* **1983**, 23, 653–664.
- [14] R. F. Furchgott, J. V. Zawadzki, *Nature* **1980**, 288, 373–376.
- [15] A. A. White, K. M. Crawford, C. S. Patt, P. J. Lad, *J. Biol. Chem.* **1976**, 251, 7304–7312.
- [16] N. D. Goldberg, M. K. Haddox, *Annu. Rev. Biochem.* **1977**, 46, 823–896.
- [17] F. R. DeRubertis, P. A. Craven, *Biochim. Biophys. Acta* **1977**, 499, 337–351.
- [18] P. A. Craven, F. R. DeRubertis, *Biochim. Biophys. Acta* **1978**, 524, 231–244.
- [19] L. J. Ignarro, P. J. Kadowitz, W. H. Baricos, *Arch. Biochem. Biophys.* **1981**, 208, 75–86.
- [20] P. A. Craven, F. R. DeRubertis, *J. Biol. Chem.* **1978**, 253, 8433–8443.
- [21] P. A. Craven, F. R. DeRubertis, D. W. Pratt, *J. Biol. Chem.* **1979**, 254, 8213–8222.
- [22] L. J. Ignarro, K. S. Wood, M. S. Wolin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1982**, 79, 2870–2873.
- [23] L. J. Ignarro, J. N. Degnan, W. H. Baricos, P. J. Kadowitz, M. S. Wolin, *Biochim. Biophys. Acta* **1982**, 718, 49–59.
- [24] R. Gerzer, E. Bohme, F. Hofmann, G. Schultz, *FEBS Lett.* **1981**, 132, 71–74.
- [25] L. J. Ignarro, K. S. Wood, B. Ballot, M. S. Wolin, *J. Biol. Chem.* **1984**, 259, 5923–5931.
- [26] M. S. Wolin, K. S. Wood, L. J. Ignarro, *J. Biol. Chem.* **1982**, 257, 13312–13320.
- [27] J. R. Stone, M. A. Marletta, *Biochemistry* **1995**, 34, 1468–1474.
- [28] J. N. Burstyn, A. E. Yu, E. A. Dierks, B. K. Hawkins, J. H. Dawson, *Biochemistry* **1995**, 34, 5896–5903.
- [29] E. A. Dierks, J. N. Burstyn, *Biochem. Pharmacol.* **1996**, 51, 1593–1600.
- [30] J. R. Stone, M. A. Marletta, *Biochemistry* **1996**, 35, 1093–1099.
- [31] Y. Zhao, J. P. Schelvis, G. T. Babcock, M. A. Marletta, *Biochemistry* **1998**, 37, 4502–4509.
- [32] L. J. Ignarro, K. S. Wood, M. S. Wolin, *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* **1984**, 17, 267–274.
- [33] R. M. Rapoport, F. Murad, *Circ. Res.* **1983**, 52, 352–357.
- [34] L. J. Ignarro, T. M. Burke, K. S. Wood, M. S. Wolin, P. J. Kadowitz, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1984**, 228, 682–690.
- [35] R. F. Furchgott, J. V. Zawadzki, P. D. Cherry in *Vasodilatation* (Hrsg.: P. M. Vanhoutte, I. Leusen), Raven Press, New York, **1981**, S. 49–66.
- [36] C. A. Gruetter, D. Y. Gruetter, J. E. Lyon, P. J. Kadowitz, L. J. Ignarro, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1981**, 219, 181–186.
- [37] R. J. Gryglewski, S. Moncada, R. M. J. Palmer, *Br. J. Pharmacol.* **1986**, 87, 685–694.
- [38] G. M. Rubanyi, P. M. Vanhoutte, *Am. J. Physiol.* **1986**, 250, H822–H827.
- [39] L. J. Ignarro, R. G. Harbison, K. S. Wood, P. J. Kadowitz, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1986**, 237, 893–900.
- [40] L. J. Ignarro, vorgetragen auf dem IV International Symposium on Mechanisms of Vasodilatation, Rochester, MN, USA, **1986**.
- [41] L. J. Ignarro, R. E. Byrns, K. S. Wood, *Circulation* **1986**, 74, II-287 (abstract).
- [42] L. J. Ignarro, R. E. Byrns, G. M. Buga, K. S. Wood, *Fed. Proc.* **1987**, 46, 640 (abstract).
- [43] L. J. Ignarro, G. M. Buga, K. S. Wood, R. E. Byrns, G. Chaudhuri, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**, 84, 9265–9269.
- [44] L. J. Ignarro, R. E. Byrns, G. M. Buga, K. S. Wood, *Circ. Res.* **1987**, 61, 866–879.
- [45] W. Martin, G. M. Villani, D. Jothianandan, R. F. Furchgott, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1985**, 232, 708–716.
- [46] W. Martin, G. M. Villani, D. Jothianandan, R. F. Furchgott, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1985**, 233, 679–685.
- [47] H. Azuma, M. Ishikawa, S. Sekizaki, *Br. J. Pharmacol.* **1986**, 88, 411–415.
- [48] R. M. J. Palmer, D. S. Ashton, S. Moncada, *Nature* **1988**, 333, 664–666.
- [49] R. Iyengar, D. J. Stuehr, M. A. Marletta, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**, 84, 6369–6373.
- [50] J. B. Hibbs, Z. Vavrin, R. R. Taintor, *J. Immunol.* **1987**, 138, 550–565.
- [51] J. B. Hibbs, R. R. Taintor, Z. Vavrin, *Science* **1987**, 235, 473–476.
- [52] D. S. Bredt, S. H. Snyder, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, 87, 682–685.
- [53] D. J. Stuehr, O. W. Griffith, *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **1992**, 65, 287–346.
- [54] D. S. Bredt, S. H. Snyder, *Annu. Rev. Biochem.* **1994**, 63, 175–195.
- [55] U. Förstermann, E. I. Closs, J. S. Pollock, M. Nakane, P. Schwarz, I. Gath, H. Kleinert, *Hypertension* **1994**, 23, 1121–1131.
- [56] O. W. Griffith, D. J. Stuehr, *Annu. Rev. Physiol.* **1995**, 57, 707–736.
- [57] A. Presta, U. Siddhanta, C. Wu, N. Sennequier, L. Huang, H. M. Abu-Soud, S. Erzurum, D. J. Stuehr, *Biochemistry* **1998**, 37, 298–310.
- [58] B. R. Crane, A. S. Arvai, R. Gachhui, C. Wu, D. K. Ghosh, E. D. Getzoff, D. J. Stuehr, J. A. Tainer, *Science* **1997**, 278, 425–431.
- [59] J. C. Salerno, K. McMillan, B. S. S. Masters, *Biochemistry* **1996**, 35, 11839–11845.
- [60] O. Feron, J. B. Michel, K. Sase, T. Michel, *Biochemistry* **1998**, 37, 193–200.
- [61] G. Garcia-Cardena, P. Martasek, B. S. S. Masters, P. M. Skidd, J. Couet, S. Li, M. P. Lisanti, W. C. Sessa, *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 25437–25440.
- [62] K. Aisaka, S. S. Gross, O. W. Griffith, R. Levi, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1989**, 160, 881–886.
- [63] D. D. Rees, R. M. J. Palmer, S. Moncada, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, 86, 3375–3378.
- [64] J. Holz, M. Giesler, E. Bassenge, *Z. Kardiol.* **1983**, 72, 98–106.
- [65] G. M. Buga, M. E. Gold, J. M. Fukuto, L. J. Ignarro, *Hypertension* **1991**, 17, 187–193.
- [66] S. Moncada, R. M. J. Palmer, E. A. Higgs, *Pharmacol. Rev.* **1991**, 43, 109–142.
- [67] G. M. Buga, L. H. Wei, P. M. Bauer, J. M. Fukuto, L. J. Ignarro, *Am. J. Physiol.* **1998**, 44, R1256–R1264.
- [68] J. Garthwaite, G. Garthwaite, *J. Neurochem.* **1987**, 48, 29–39.
- [69] J. Garthwaite in *The NMDA Receptor* (Hrsg.: J. C. Watkins, G. L. Collingridge), Oxford University Press, Oxford, UK, **1989**, S. 187–205.
- [70] J. E. Merrill, L. J. Ignarro, M. P. Sherman, J. Melinek, T. E. Lane, *J. Immunol.* **1993**, 151, 2132–2141.
- [71] L. J. Ignarro, P. A. Bush, G. M. Buga, K. S. Wood, J. M. Fukuto, J. Rajfer, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1990**, 170, 843–850.
- [72] P. A. Bush, W. J. Aronson, G. M. Buga, J. Rajfer, L. J. Ignarro, *J. Urol.* **1992**, 147, 1650–1655.
- [73] J. Rajfer, W. J. Aronson, P. A. Bush, F. J. Dorey, L. J. Ignarro, *N. Engl. J. Med.* **1992**, 326, 90–94.
- [74] P. A. Bush, W. J. Aronson, J. Rajfer, G. M. Buga, L. J. Ignarro, *Int. J. Impotence Res.* **1992**, 4, 85–93.