

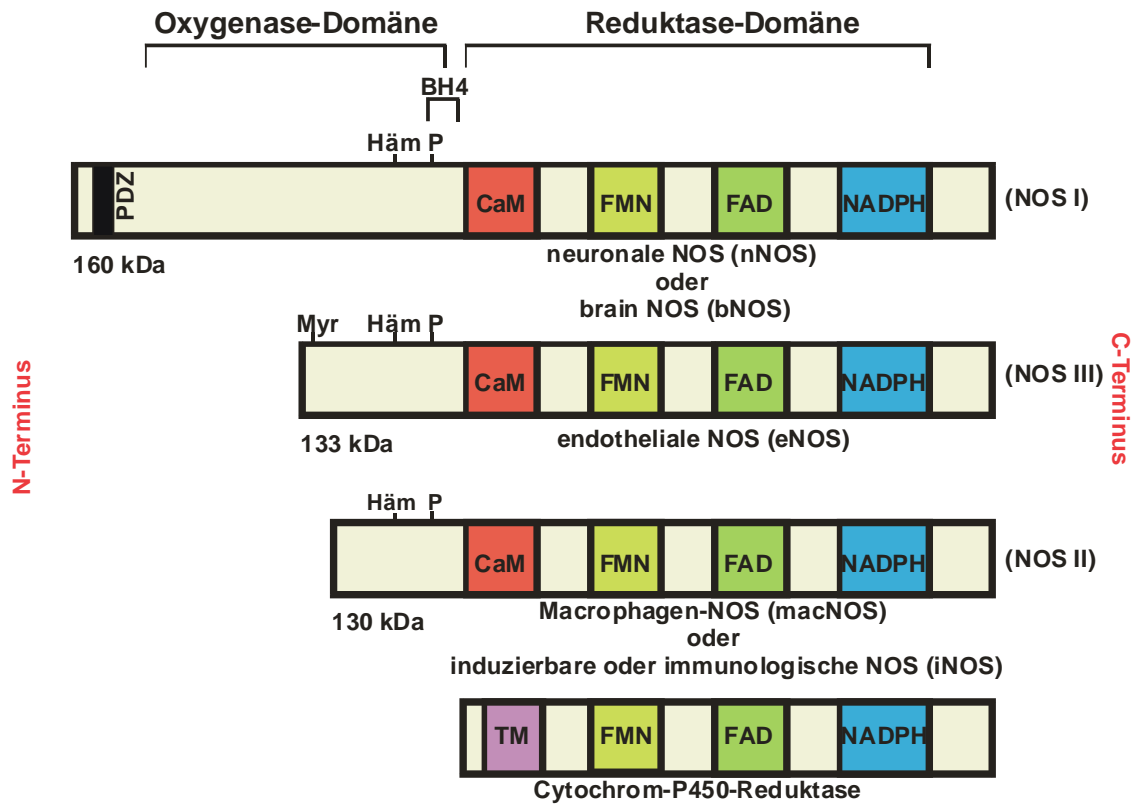
1.1.1 Stickstoffmonoxid

Stickoxid ist ein farbloses Gas, das unter Arginin-, Sauerstoff- und NADPH-Verbrauch von der Stickoxid-Synthase (NOS) synthetisiert wird, wobei schlußendlich als stabiles Endprodukt Nitrit und/oder Nitrat entsteht. Stickoxid besitzt ein ungepaartes Elektron, ist (elektrisch) neutral und diffundiert durch cytosolische und membranöse Kompartimente. Trotz seiner radikalischen Eigenschaften hat Stickoxid eine ungewöhnlich lange Halbwertszeit von 2 – 3 s in biologischen Systemen und von etwa 400 s (bei einer Konzentration von 1 μM) in reinem Wasser (Hakim, Sugimori et al. 1996). Mathematische Modelle erlauben dabei den Schluß, daß Stickoxid - von einer punktförmigen Quelle für einige Sekunden freigesetzt - in biologischen Systemen etwa 200 μm diffundieren kann (Wood & Garthwaite 1994). Es wurde vorgeschlagen, daß Stickoxid das einzig bisher bekannte Radikal ist, welches unter biologischen Bedingungen eine ausreichende Stabilität besitzt, um als extrazellulärer ‚Messenger‘ zu fungieren (Saran & Bors 1994). Zu den physiologischen Wirkungen des Stickoxids zählen Vasodilatation, Redoxregulierung am NMDA-Rezeptor, Hemmung der Thrombocytenaggregation, Verstärkung synaptischer Lernprozesse sowie zahlreiche immunmodulatorische Effekte (Snyder 1992; Singh & Evans 1997).

1.1.1.1 NOS-Isoformen: Lokalisation und Funktion

Es sind heute drei Klassen von NOS-Isoformen identifiziert (Übersicht 1), von denen die endotheliale NOS (eNOS) und die neuronale NOS (nNOS) konstitutiv exprimiert werden, während die induzierbare NOS-Isoform (iNOS) auf transkriptioneller Ebene induzierbar ist.

Die Funktion der eNOS liegt vor allem in der Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur und darüber in der bedarfsabhängigen Regulation der Mikrozirkulation sowohl im Gehirn als auch in allen anderen Organen. Acetylcholin, Histamin, Bradykinin aber auch Scherstreß aktivieren Calcium-vermittelt die eNOS. Das produzierte Stickoxid diffundiert in die benachbarte glatte Muskulatur, wo es durch Bindung an die lösliche Guanylatcylase zu einem erhöhten cGMP-Spiegel führt, der letztlich eine Vasodilatation bewirkt.



Übersicht 1: Schematische Darstellung der NOS-Isoformen

Das von der nNOS in den Nervenzellen des ZNS und peripheren Nervensystems (PNS) produzierte Stickoxid wirkt unter anderem als Neurotransmitter und Neuromodulator. Eine Anzahl von Publikationen belegt die Rolle des Stickoxids im ZNS bei dem zellulären Korrelat des Gedächtnisses (Bohme, Bon et al. 1991; Schuman & Madison 1994; Faber Zuschratter, Seidenbecher et al. 1996) und im PNS als Neurotransmitter (Hoyle & Burnstock 1995). Zu beachten dabei ist die heterogene neuronale Verteilung der nNOS in unterschiedlichen Arealen (Rothe, Canzler et al. 1998). Während die nNOS in den Körnerzellen des Cerebellums ubiquitär vertreten ist, beschränkt sich ihr Vorkommen im Neocortex sowie in den Basalganglien, bis auf wenige Ausnahmen, auf 1 – 2 % der Neurone. Ebenso schwankt die Zahl der NOS-positiven Neurone in den zum PNS zählenden Ganglien des autonomen Nervensystems beträchtlich (Anderson, Edwards et al. 1993).

	nNOS	eNOS	iNOS
Typ	konstitutiv	konstitutiv	induzierbar
Vorwiegende Lokalisation	Neurone des ZNS + PNS	Endothelzellen	Immunzellen
Dauer der Aktivität	Sekunden	Sekunden	Stunden bis Tage
Synthesemenge	Picomol	Picomol	Nanomol
Subzelluläre Verteilung	90 – 100 % im Cytosol	95 % membranständig	80 – 90 % im Cytosol

Übersicht 2: Gegenüberstellung der drei NOS-Isoformen (modifiziert nach Berdeaux, 1993)

Die induzierbare und die konstitutiven NOS-Isoformen unterscheiden sich funktionell (Übersicht 2) durch ihre Abhängigkeit von intrazellulärem Calcium. Calmodulin bindet reversibel an die konstitutiven NOS-Isoformen (Schmidt, Pollock et al. 1992; Vincent 1994) bei intrazellulären Calciumkonzentrationen ab 200 - 400 nM, je nach Spezies und Isoform (Griffith & Stuehr 1995). Da diese durch Calmodulin vermittelte Dimerisierung zum Homodimer für die Aktivität der NOS entscheidend ist, kann die Aktivität durch Calmodulin-Antagonisten oder Calcium-Chelatoren kontrolliert werden. Diese auch pharmakologisch interessante Regulation besteht bei der iNOS nicht, da Calmodulin als prosthetische Gruppe irreversibel gebunden ist und so die iNOS konstitutiv aktiv hält (Nathan 1992).

Die iNOS wurde zuerst aus Makrophagen der Maus nach Stimulation mit bakteriellem Lipopolysaccharid (LPS) isoliert (Stuehr, Cho et al. 1991). Etliche weitere Zelltypen des Immunsystems, wie Kupferzellen, Mesangiumzellen, Mikrogliazellen und natürliche Killerzellen exprimieren die iNOS nach Induktion (Calka, Wolf et al. 1996; Lincoln, Hoyle et al. 1997; Kröncke, Fehsel et al. 1998). Überraschend war die Entdeckung, daß auch Zellen, die nicht zum Immunsystem zu rechnen sind, die iNOS exprimieren können. Dazu zählen Astrocyten, Endothelzellen, Hepatocyten, Fibroblasten, beta-Zellen des Pankreas sowie Tumorzellen (Lincoln, Hoyle et al. 1997; Vincent, Tilders et al. 1998). Die iNOS wird höchstwahrscheinlich sowohl in Zellkultur als auch In-vivo nur nach Stimulation exprimiert (Gebicke-Haerter, Van Calker et al. 1996). Zu den Induktoren gehören neben LPS vor allem Cytokine (Interferon-gamma (IFN), Tumornekrosisfaktor, Interleukine), aber auch bestimmte Pathogene, wie HIV-Proteine oder das beta-Amyloidprotein, sowie Hitzeschock und Hypoxie (Lincoln, Hoyle et al. 1997). Viele Autoren haben synergistische Effekte bei der Kombination mehrerer Induktoren belegt (z. B. LPS + Interferon-gamma und zusätzlich Interleukin 1-beta oder Tumornekrosisfaktor alpha), wobei der genaue Mechanismus noch Gegenstand der Forschung ist (Weisz, Oguchi et al. 1994). Sicher scheint nur zu sein, daß der, sowohl durch Cytokine als auch durch oxidativen Stress, aktivierbare Transkriptionsfaktor NF- κ B eine wesentliche Rolle spielt (Akama, Albanese et al. 1998).

Die Bedeutung von Stickoxid in der Immunabwehr konnte eindrucksvoll an iNOS-„Knockout“-Mäusen gezeigt werden, die nicht mehr, oder nur in geringem Ausmaß, in der Lage waren, parasitären und bakteriellen Infektionen zu widerstehen (MacMicking, Nathan et

al. 1995; Wei, Charles et al. 1995). Die immunrelevanten Wirkungen des Stickoxids beruhen entweder auf einem cytostatischen Effekt durch Inhibition von Schlüsselenzymen der DNA-Synthese (Henry, Lepoivre et al. 1993), oder aber einem toxischen Effekt, der über Nekrose bzw. Apoptose zum Zelltod führt (Brüne, Messmer et al. 1996). Toxisch wirkt Stickoxid einerseits über eine Energiedepletion, Freisetzung von Zink aus DNA-Reperaturenzymen (Wink & Laval 1994; Kröncke & Kolb Bachofen 1999), Proteinmodifikation durch Nitrosylierung von SH-Gruppen (Stamler, Simon et al. 1992) und andererseits durch die Kombination mit Superoxid zu Peroxynitrit (Akaike, Suga et al. 1998). Die Energiedepletion wird über eine direkte Inhibition der Mitochondrien (Richter, Gogvadze et al. 1994; Brorson, Schumacker et al. 1999) oder über die Aktivierung der PolyADP-Ribose-Polymerase (PARP oder auch PolyADP-Ribose-Synthetase (PARS)) bewirkt. Diese Enzym verbraucht große Mengen an NAD^+ und kann darüber einen Energiemangel erzeugen, der schließlich zum Zelltod führt (Brüne, Dimmeler et al. 1994; Szabo, Zingarelli et al. 1996).

1.1.1.2 Katalytische Eigenschaften der NOS

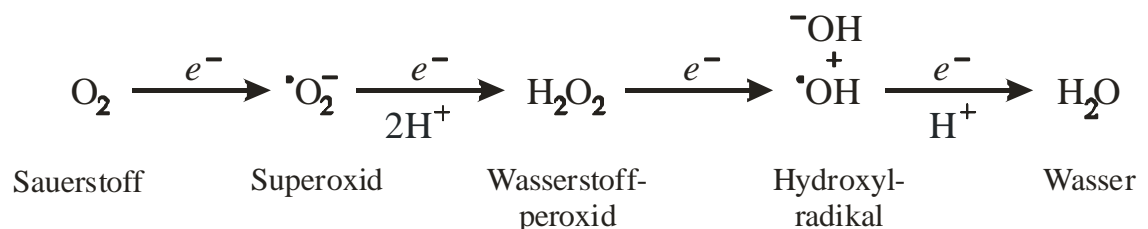
Alle NOS-Isoformen produzieren Stickoxid durch eine NADPH- und Sauerstoff-abhängige 5-Elektronen-Oxidation der terminalen Guanidinogruppe des Arginins, wobei Citrullin und zwei Wassermoleküle als Koprodukte entstehen. Durch Hydroxylierung entsteht zunächst das kurzlebige Zwischenprodukt N^0 -Hydroxy-L-Arginin. Die hierfür benötigten Elektronen werden von der Reduktasedomäne der NOS durch Oxidation von NADPH bereitgestellt und über die Flavinnucleotide zum Häm-Eisen in der Oxygenasedomäne transportiert (Stuehr, Kwon et al. 1991). Durch die Reduktion von Fe^{3+} zu Fe^{2+} kann molekularer Sauerstoff bei der anschließenden Oxidierung von Fe^{2+} reduziert werden, indem ein Sauerstoffatom auf das Arginin übertragen und das zweite zu Wasser reduziert wird. Der hier beschriebene Reaktionsschritt ähnelt der typischen Monooxygenasereaktion der P450-Cytochrome. Die Aminosäure-Sequenz der C-Terminale Reduktasedomäne der NOS besitzt eine 58%ige Homologie zur Cytochrom-P450-Reduktase (Masters, McMillan et al. 1996). Nicht verwunderlich ist daher, daß die NOS als erstes ‚self-sufficient‘ P450-Enzym bezeichnet wurde, da hier im Gegensatz zu den P450-Cytochromen die Reduktasedomäne in das Protein integriert ist (Marletta 1994).

Die folgende NADPH-abhängige Oxidation von N^o-Hydroxy-L-Arginin zu Stickoxid und Citrullin benötigt Tetrahydrobiopterin (BH₄) und molekularen Sauerstoff. Die Rolle des Tetrahydrobiopterin ist noch Gegenstand der Forschung (Wever, van Dam et al. 1997), da die benötigten Reduktionsäquivalente bereits vom NADPH zur Verfügung gestellt werden. Für das Tetrahydrobiopterin wird vor allem eine Funktion entweder als allosterischer Faktor (Mayer, John et al. 1990) oder aber als Stabilisator des Homodimers diskutiert (Baek, Thiel et al. 1993).

Für die toxischen Effekte der NOS ist von besonderer Bedeutung, daß bei Substratverarmung (Argininkonzentrationen < 100 µM) die NADPH-Oxidation teilweise entkoppelt wird (Heinzel, John et al. 1992). Dabei kann dann simultan Superoxid und Stickoxid - mit der zumindest theoretischen Möglichkeit einer sofortigen Reaktion zu Peroxynitrit - produziert werden (Wever, van Dam et al. 1997; Xia, Roman et al. 1998).

1.1.2 Superoxid

Der durch die Entwicklung der oxigenen Photosynthese bewirkte Umschwung von einer reduktiven zu einer oxidativen Atmosphäre hat komplexe Mechanismen zur effektiven Nutzung von Sauerstoff hervorgebracht. Die wohl bedeutendste Erweiterung ist die Verwendung des Sauerstoffs im Energiestoffwechsel als terminaler Akzeptor in der Atmungskette gewesen. Der Umgang mit Sauerstoff führte aber auch zu einer erhöhten Produktion sogenannter aktivierter Sauerstoffformen, die potentiell toxisch sind. Bereits vor Jahrzehnten wurde darauf hingewiesen, daß die Toxizität eines erhöhten Sauerstoff-Partialdrucks auf der Bildung von Sauerstoff-Radikalen beruht (McCord & Fridovich 1969).



Übersicht 3: Aktivierung des Sauerstoffs durch univalente Reduktion

Molekularer Sauerstoff (O₂) ist ein Biradikal mit zwei ungepaarten Elektronen und bildet sich im Magnetfeld als paramagnetisches ‚Triplet‘ ab. Allerdings ist die Reaktivität des

Sauerstoffs herabgesetzt, da die beiden ungepaarten Elektronen in verschiedenen Orbitalen vorkommen und denselben parallelen Spin haben. Dies beschränkt mögliche Reaktionspartner auf solche mit zwei ungepaarten Elektronen und antiparallelem Spin. Die Aktivierung des Sauerstoffs beruht auf der Tatsache, daß eine Reaktion des Triplett-Sauerstoff mit Radikalen oder einzelnen Elektronen keiner Spinrestriktion unterliegt. Aus molekularem Sauerstoff entsteht so Superoxid durch reduktive Aufnahme eines Elektrons in eines der antibindenden π -Orbitale. Durch weitere nachfolgende 1-Elektronenübergänge entstehen Wasserstoffperoxid, das Hydroxylradikal und schließlich Wasser (Übersicht 3).

Vermutlich entsteht Superoxid unter physiologischen Bedingungen vorwiegend in den Mitochondrien. Zu beachten ist jedoch, daß reaktive Sauerstoffspezies nicht bei der 4-Elektronen-Reduktion von Sauerstoff zu Wasser durch die Cytochromoxidase (Komplex IV) freigesetzt werden. Die hierbei entstehenden Sauerstoffintermediate sind so fest gebunden, daß weder Sauerstoffradikale noch Wasserstoffperoxid freigesetzt werden (Antonini, Brunori et al. 1970). Allerdings wird durch die Elektronentransportkette (Komplex I und III) molekularer Sauerstoff (etwa 2 – 3 % des Sauerstoffverbrauchs (Boveris, Oshino et al. 1972)) schrittweise durch sogenannte 'leak'-Elektronen reduziert, und das so entstehende Superoxid wird in das umgebende Medium freigesetzt (Reilly & Bulkley 1990).

Superoxid entsteht zum anderem durch die Aldehyd-Oxidase, die mitochondriale NADH-Dehydrogenase, die Cytochrom-P450-Reduktase als auch durch die Autoxidation von Hämoglobin, Glyceraldehyd, reduzierten Riboflavinen (wie FMN und FAD), Catecholen, Tetrahydropterinen und Thiolverbindungen. Eine weitere Quelle des Superoxids sind Xenobiotica, die durch das sogenannte 'Redoxcycling', bei dem zelluläre Reduktionssysteme diese Verbindungen reduzieren und ein Elektron auf Sauerstoff übertragen. Dieser Mechanismus kann nicht nur relevante Mengen an Superoxid produzieren, sondern auch zu einer Depletion der zellulären Reduktionsequivalente (NADPH, GSH) führen (Kappus & Sies 1981).

Unter pathologischen Zuständen kann Superoxid zudem von der in vielen Zelltypen vorkommenden Xanthin-Oxidase und der NADPH-Oxidase der Immunzellen produziert werden. Die cytosolische Xanthin-Oxidase entsteht, insbesondere im Verlauf der Ischämie, durch Proteolyse (irreversibel) oder durch die Oxidation von Thiolgruppen (reversibel) aus der Xanthin-Dehydrogenase, einem Enzym des Harnsäurestoffwechsels, das nach Konversion

nicht mehr NAD^+ , sondern Sauerstoff als Elektronenakzeptor verwendet (Nishino, Nakanishi et al. 1997). Die NADPH-Oxidase ist ein in Neutrophilen, Makrophagen und Mikrogliazellen lokalisiertes Enzym, das im aktiven Zustand membranständig ist und durch eine sehr effektive Superoxidproduktion (teilweise zusammen mit dem cytosolisch produzierten Stickoxid) zum ‚oxidative burst‘ als Teil der Immunantwort beiträgt.

Wasserstoffperoxid entsteht durch die Dismutation von Superoxid, d. h. durch eine Reaktion zweier gleicher Moleküle mittlerer Oxidationsstufe, bei denen das eine oxidiert und das andere reduziert wird. Die Dismutation verläuft entweder spontan oder wird durch die Superoxiddismutase (SOD) enzymatisch katalysiert. Wasserstoffperoxid ist um Größenordnungen weniger reaktiv und damit stabiler als Superoxid und, da es im Gegensatz zu diesem keine Ladung trägt, für biologische Membranen hochpermeabel.

Das Hydroxylradikal, als das stärkste in biologischen Systemen auftretende Oxidans, entsteht hier durch die metallkatalysierte Disproportionierung (Fentonreaktion) von Wasserstoffperoxid (Übersicht 4).



Übersicht 4: Mechanismus der Fentonreaktion

Infolge seiner hohen Reaktivität diffundiert das Hydroxylradikal im Mittel nur wenige Moleküldurchmesser, bevor es reagiert und wirkt somit ‚ortsspezifisch‘ in der nächsten Umgebung seiner Entstehung (Pryor 1986). Superoxid besitzt hier eine wichtige Funktion, da es in der Lage ist, komplexiertes Fe^{3+} zu Fe^{2+} zu reduzieren und somit erneut für die Fentonreaktion zu Verfügung zu stellen. Daneben kann Superoxid auch durch eine direkte Reaktion mit Wasserstoffperoxid das Hydroxylradikal erzeugen (Haber-Weiss-Reaktion), jedoch ist diese Reaktion sehr langsam und spielt in biologischen System kaum eine Rolle (Buettner 1993).

1.1.3 Peroxynitrit

Peroxynitrit entsteht durch die diffusions-kontrollierte Reaktion (Geschwindigkeitskonstante: $6,7 \times 10^9 \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$) zwischen Stickoxid und Superoxid (Huie & Padmaja 1993). Diese Reaktion ist dreimal schneller als die enzymatische Disproportionierung des Superoxids durch

die Superoxiddismutase (SOD) bei neutralem pH (Rubbo, Darley Usmar et al. 1996). Peroxynitrit ist als deprotoniertes Anion (ONNO^-) bei stark alkalischem pH stabil, wird jedoch bei neutralem pH protoniert, und die Säure (ONOOH) zerfällt mit einer Halbwertszeit von etwa 1,3 s bei 25 °C (Koppenol, Moreno et al. 1992). Die Zerfallswege sind zur Zeit Gegenstand einiger Kontroversen, ebenso wie die Frage, ob Peroxynitrit selbst oder ein Intermediat für die Reaktivität verantwortlich ist (Murphy, Packer et al. 1998; Richeson, Mulder et al. 1998). Hinreichend geklärt ist allerdings, daß zum einen Nitrat als Endprodukt und zum anderen das hochreaktive Hydroxylradikal entstehen können. Da Peroxynitrit aus zwei relativ schwachen Oxidantien entsteht und hinreichend stabil ist, um einige Zelldurchmesser weit zu diffundieren, multipliziert sich darüber die Toxizität seiner Ausgangsmoleküle (Crow & Beckman 1995). Wie andere Oxidantien kann auch Peroxynitrit Lipide, Proteine und DNA oxidieren, allerdings aufgrund seines hohen Redoxpotentials sehr effektiv. Eine spezifische Reaktion ist dagegen die elektrophile Nitrierung am aromatischen Ring des Tyrosins (Beckman, Ischiropoulos et al. 1992), die in Anwesenheit von Kohlendioxid verstärkt abläuft (Gow, Duran et al. 1996). Die Konzentration des Kohlendioxids im Gewebe liegt typischerweise bei 1 mM (Arteel, Briviba et al. 1999), jedoch kann unter pathologischen Zuständen dieser Wert erheblich überschritten und dadurch die Entstehung von Nitrotyrosin drastisch gefördert werden (Radi 1998). In jüngster Zeit wurde für die Glutathionperoxidase eine Funktion als Peroxynitrit-Reduktase nachgewiesen (Sies, Sharov et al. 1997). Dies stellt möglicherweise einen entscheidenden protektiven Mechanismus dar, zumal die Glutathionperoxidase in aktivierten Mikrogliazellen verstärkt exprimiert wird (Lindenau, Noack et al. 1998).