

1 Einleitung

1.1 Bedeutung von Stickstoffmonoxid in Physiologie und Biochemie

NO^\bullet , ist ein farbloses, giftiges, nicht brennbares Gas, das in Wasser schlecht besser in organischen Lösungsmitteln löslich ist. Es enthält ein ungepaartes Elektron. Das einzelne, den Radikalcharakter ausmachende Elektron befindet sich in einem π^* - (antibindenden) Orbital. Es resultiert daraus formal eine $2^{1/2}$ fach- Bindung mit einer Bindungslänge von 1,150 Å. Bei Blitzentladungen in der Atmosphäre, im Lichtbogen und in Verbrennungsmotoren wird Stickstoff mit Sauerstoff umgesetzt, und es entsteht das thermodynamisch instabile NO^\bullet -Radikal. Ist diese Verbindung erst einmal gebildet, ist sie kinetisch in Abwesenheit von Sauerstoff hinreichend stabil, dass sie sogar in Druckgasflaschen abgefüllt und im Labor genutzt werden kann. Die Dimerisierungstendenz ist gering und nimmt bei tiefen Temperaturen zu, so dass es bevorzugt als Distickstoffdioxid vorliegt.

Da das Ionisierungspotential von NO^\bullet sehr gering ist (9,25eV), kann durch Abspaltung des π^* -Elektrons das Nitrosyl-Kation NO^+ (Nitrosonium-Ion) entstehen. NO^+ ist mit seiner Dreifachbindung dem molekularen Stickstoff und Kohlenmonoxid (CO) isoelektronisch und durch seine freien Elektronenpaare wie CO ein guter Komplexligand, wie zum Beispiel im Nitroprussidnatrium (s. Abb. 7).

Wenn NO^\bullet ein Elektron aufnimmt, entsteht das Nitroxylat-Anion NO^- als korrespondierende Base der hyposalpetrigen Säure. Dieses Teilchen ist dem molekularen Sauerstoff isoelektronisch und kann wie dieser in verschiedenen Spinzuständen vorliegen, dem Triplettzustand und dem angeregten Singulettzustand (mit gepaarten Elektronen). NO^- ist aber im Verhältnis zum Sauerstoff ein sehr instabiles Molekül und zerfällt sehr leicht nach Protonierung und Dimerisierung zu N_2O . Diese Reaktion ist für die Analytik von NO^- von grosser Bedeutung¹.

¹ Rehse, K., Schleifer, K.J., Martens, a., Kämpfe, M. *Arch. Pharm. (Weinheim)* **1994**, 327, 393 - 397

Stickstoffmonoxid (NO[•]) ist eines der zurzeit am intensivsten untersuchten Moleküle in der Biomedizin. Dies beruht auf den vielseitigen Funktionen von NO[•] bei verschiedenen chemischen und biochemischen Prozessen, wobei das Ziel im Vordergrund steht, neue Pharmaka zur Therapie kardiovaskulärer, neuronaler und entzündlich-infektiöser Erkrankungen zu entwickeln. Die Substitutionstherapie mit NO[•]-Donoren nimmt bereits eine zentrale Stellung innerhalb der pharmakotherapeutischen Strategien zur Behandlung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen ein². Die physiologischen Wirkungen von NO[•] können nur durch eine genaue Kenntnis der sehr komplexen Chemie dieses Botenstoffes verstanden werden. Das freie Radikal NO[•] ist ein reaktives Molekül. Einige Reaktionsprodukte sind biologisch inaktiv, einige weisen eine NO[•]-ähnliche Aktivität auf, und andere sind sogar toxisch. Die Beteiligung von NO[•] bei zellulären Reaktionen ist sehr komplex, da die entscheidenden Schritte auch über hochaktive Intermediate ablaufen können, die schwierig zu detektieren sind.

1.1.1 Entdeckung des Endothelium derived relaxing factor (EDRF)

1980 berichteten Robert F. Furchgott und J.V.Zawadzki, dass funktionstüchtige Endothelzellen für die Relaxation von Arterien mittels Acetylcholin oder verwandter muskarinerge Agonisten eine wesentliche Rolle spielen. Sie wiesen darauf hin, dass die Relaxation das Ergebnis einer endothelialen Antwort auf eine Stimulation durch muskarinerge Agonisten darstellt. Diese Antwort erfolgt in Form eines leicht diffundierenden Faktors, der so auf die benachbarten glatten Muskelzellen einwirken kann und deren Relaxation auslöst. Diesen Faktor nannten Furchgott und Zawadzki „Endothelium derived relaxing factor“ (EDRF). Es wurde gezeigt, dass EDRF die lösliche Guanylylcyclase in glattmuskulären Zellen aktiviert und dadurch den Spiegel an cyclischem Guanosinmonophosphat (cGMP) anhebt. Es schien ein kausaler

² Loscalzo, J., Welch, G. *Prog. Cardiovasc. Dis.* **1995**, 38, 87 - 104

Zusammenhang zwischen der angehobenen Konzentration von cGMP und der Relaxation der glatten Muskelzellen zu bestehen. Obwohl potente Abfangmoleküle für EDRF existieren, wie zum Beispiel Hämoglobin oder Superoxidanionradikale, konnte die chemische Natur von EDRF 1987 von Palmer, Ferrige und Moncada³ aufgeklärt und gezeigt werden, dass es sich bei EDRF um NO[•] handelt. Zwei Jahre danach wurde nachgewiesen, dass das in den Endothelzellen synthetisierte NO[•] das Produkt einer Calcium/Calmodulin-abhängigen Oxigenase darstellt. Diese NO[•]-Synthase (NOS) katalysiert die Oxidation eines Guanidinostickstoffs von L-Arginin, wobei NO[•] und Citrullin resultieren. Seit der Entdeckung von NO[•] wird die Bedeutung als Regulator von verschiedenen physiologischen Prozessen immer deutlicher^{4,5}. Zu diesen Prozessen zählen neben der Blutdruckregulation und der Thrombozyten-Aggregationshemmung vor allem die Funktion als Effektor in der Immunabwehr⁶ sowie die Übertragung von Signalen im Nervensystem^{7,8}. Als kleines, unpolares Molekül ist NO[•] in der Lage, auch durch Membranen zu diffundieren und somit seine biologischen Targetstrukturen zu erreichen. Die biologische Halbwertszeit für dieses instabile Teilchen beträgt dabei, je nach den Bedingungen 1 – 10 Sekunden.

³ Palmer, R.M.J., Ferrige, A.G., Moncada, S. *Nature* **1987**, 327, 524 - 526

⁴ Müller, S., Gewaltig, M.T., Kojda, G. *Med. Monatss. Pharmazeuten* **2002**, 2, 45 - 51

⁵ Loscalzo, J., Welch, G. *Progg. Cardiovasc. Disc.* **1995**, 38, 87 - 104

⁶ Lancaster, J.R., Hibbs, J.B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, 87, 1223 - 1328

⁷ Bredt, D.S., Hwang, P.H., Snyder, S.H. *Nature* **1991**, 351, 714 - 718

⁸ Garthwaite, J., Charles, S.L., Chess-Williams, R. *Nature* **1988**, 336, 385 - 388

1.1.2 Reaktion mit Sauerstoff

NO[•] reagiert an der Luft in einer Reaktion 3. Ordnung zu braunrotem Stickstoffdioxid (NO₂[•]) (s. Abb. 1). Sowohl bei niedriger NO[•]-Konzentration, als auch bei Sauerstoffmangel läuft die NO₂[•]-Bildung extrem langsam. Während eine **gesättigte NO[•]-Lösung** an der Luft spontan zu NO₂[•] oxidiert, dauert dieser Vorgang bei einer nanomolaren NO[•]-Konzentration, die den physiologischen Bedingungen ähnelt, mindestens 15 – 30 min⁹. Da NO[•] in dieser Zeit andere biologische Zielstrukturen erreicht, spielt diese Reaktion im physiologischen Geschehen normalerweise kaum eine Rolle.

Die Reaktion von NO[•] mit O₂ wird in der Atmosphäre beim sog. „Los Angeles Smog“ beobachtet. Das NO₂[•] ist ein braunes Gas mit Radikalcharakter, welches eine relativ große Dimerisierungstendenz aufweist.



Abb. 1: Reaktion von NO[•] mit Sauerstoff

1.1.3 Reaktion mit Superoxid

Als Radikal reagiert NO[•] rasch mit anderen Radikalen. In biologischer Umgebung hat die direkte bimolekulare Reaktion mit Superoxid O₂^{•-} zu Peroxynitrit [Oxoperoxonitrat

⁹ Feelisch, M., Stamler, J.S. *Methods in Nitric Oxide Research*, John Wiley & Sons, Chichester 1996

(-1)] besondere Bedeutung¹⁰. Die Bildung von Peroxynitrit aus NO^\bullet und Superoxid geschieht mit nahezu diffusionskontrollierter Geschwindigkeit ($4,3 - 6,7 \times 10^9 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)¹¹. Peroxynitrit ist ein starkes Oxidationsmittel ($E(\text{ONOO}^-, 2\text{H}^+/\text{NO}_2^\bullet, \text{H}_2\text{O}) = 1,6\text{V}$ bei pH 7,0) und reagiert mit nahezu allen Klassen von Biomolekülen *in vitro*¹².

1.1.4 Nitrosierungsreaktionen

Unter physiologischen Bedingungen wird die Reaktion zwischen NO^\bullet und $\text{O}_2^{\bullet-}$ in Gegenwart anderer potentieller Reaktanden sehr kompliziert. Insbesondere reduzierte Thiole kommen nahezu überall vor. Bei physiologischem pH-Wert werden Thiole in Anwesenheit von Sauerstoff durch NO^\bullet zu S-Nitrosothiolen nitrosiert¹³. *In vivo* werden verschiedene Thiole, beispielsweise Glutathion, zur Erhaltung des Redoxstatus der Zelle benötigt. S-Nitrosothiole sind hochwirksame NO^\bullet -Donoren und weisen ein ähnliches Wirkprofil auf wie NO^\bullet .

Im Unterschied zu S-Nitrosierungen, welche häufig physiologisch positive Auswirkungen haben, führen N-Nitrosierungen fast immer zu schädlichen Wirkungen. Ein Intermediat der NO^\bullet -Autoxidation, wahrscheinlich Distickstofftrioxid, kann in einer direkten Reaktion primäre Amine in DNA-Basen nitrosieren¹⁴.

¹⁰ Beckman, J.S., Beckman, T.W., Chen, J., Marshall, P.A., Freeman, B.A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, 87, 1620 - 1624

¹¹ Huie, R.E., Padmaja, S., *Free Radical Res. Commun.* **1993**, 18, 195 - 199

¹² Pryor, W.A., Squadrito, G.L. *Am. J. Physiol. L.* **1995**, 12, L699 - L722

¹³ Wink, D.A., Nims, R.W. et al. *Chem. Res. Toxicol.* **1994**, 7, 519 - 525

¹⁴ Tamir, S., Burney, S., Tannenbaum, S.R. *Chem. Res. Toxicol.* **1996**, 9, 821 - 827

1.1.5 Reaktion mit Hämoglobin

NO[•] reagiert mit Oxyhämoglobin (OxyHb) in einer Reaktion zweiter Ordnung mit einer Geschwindigkeitskonstanten von ca. $3 \times 10^7 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ zu Methämoglobin (MetHb) und Nitrat¹⁵. Da die NO[•]-Abhängigkeit bei dieser Reaktion strikt erster Ordnung und die Reaktion auch bei hohen NO[•]-Konzentrationen nicht limitiert ist, nimmt man an, dass NO[•] direkt mit dem Häm-gebundenen Sauerstoff reagiert. NO[•] bindet auch an die Desoxy-Form von Hämoglobin und an MetHb. Allerdings wird die Bindung an Methämoglobin durch ein Wassermolekül an der sechsten Koordinationsstelle des Häm-Eisens behindert. Daher ist die Assoziationsfähigkeit ungefähr hundertfach geringer als die Geschwindigkeit der Assoziation an das Eisen(II)-Häm der Desoxy-Form¹⁶. Durch die schnelle Reaktion mit OxyHb hat freies NO[•], welches endogen produziert oder von Therapeutika freigesetzt wird, keine systemischen Wirkungen. Für die neuronale Signalwirkung von NO[•] hat diese Reaktion wahrscheinlich keine Bedeutung, da die Entfernungen zu den nächstgelegenen Blutgefässen um ein Vielfaches grösser sind.

¹⁵ Doyle, M.P., Hocksta, J.W. *J. Inorg. Biochem.* **1981**, 14, 351 - 358

¹⁶ Sharma, V.S., Traylor, T.G., Gardiner, R., Mizukami, H. *Biochemistry* **1987**, 26, 33837 - 33843

1.1.6 Reaktion mit anderen Metallzentren

Zellen enthalten mehrere Arten von Metalloproteinen, die NO^\bullet binden oder mit NO^\bullet reagieren, beispielsweise Cytochrom-P-450-Enzyme oder Cytochrom-c-Oxidase¹⁷. Die bezüglich Sauerstoff kompetitive Bindung von NO^\bullet an die Cytochrom-c-Oxidase resultiert in einer Hemmung der mitochondrialen Atmungskette: dies ist eine zentrale toxische Wirkung von NO^\bullet im Rahmen inflammatorischer und ischämischer Prozesse¹⁸. Darüber hinaus wurden auch Reaktionen von NO^\bullet mit zink- und kupferhaltigen Proteinen beschrieben^{19,20}. Die Bindung von NO^\bullet an Proteine, die Eisen-Schwefel-Cluster enthalten, führt zur Bildung von Eisen-Nitrosylkomplexen²¹.

¹⁷ Wink, D.A., Osawa, Y., Darbyshire, J.F., Jones, C.R. *Arch. Biochem. Biophys.* **1993**, 300, 115 - 123

¹⁸ Brown, G.C., Cooper, C.E. *FEBS Lett.* **1994**, 356, 295 - 298

¹⁹ Gorren, A.C.F., de Broer, A., Wever, R. *Biochim. Biophys. Acta* **1987**, 916, 38 - 47

²⁰ Cooper, C.E., Torres, J., Sharpe, M.A., Wilson, M.T. *FEBS Lett.* **1997**, 414, 281 - 284

²¹ Radi, R. *Chem. Res. Toxicol.* **1996**, 9, 828 - 835

1.1.7 Aktivierung der löslichen Guanylyl-Cyclase

Die meisten physiologischen Wirkungen von NO[•] beruhen auf einer bis zu 200fachen Aktivierung der löslichen Guanylylcyclase (sGC), die einen Häm-Anteil aufweist^{22,23}. In Gegenwart von Mg²⁺ oder Mn²⁺-Ionen katalysiert die sGC die Cyclisierung von Guanosin-5'-triphosphat (GTP) zu cyclischem Guanosin-3',5'-monophosphat (cGMP), das als intrazelluläres Signalmolekül die Aktivität verschiedener Proteinkinasen und Phosphodiesterasen sowie die Öffnung von Ionenkanälen beeinflusst und so eine Zellantwort auslöst. Im Unterschied zu Hämoglobin bindet die sGC den Sauerstoff nur sehr schlecht. Außerdem erfolgt die Dissoziation von NO[•] vom Häm der sGC im Vergleich zum Hämoglobin und Myoglobin ungewöhnlich schnell²⁴, was auch die Folge einer Oxidation des Häm-Eisens sein könnte²⁵.

²² Ignarro, L.J. *Pharmacol. Toxicol.* **1990**, 67, 1 - 7

²³ Koesling, D. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **1998**, 358, 123 - 126

²⁴ Kharitonov, V.G., Sharma, V.S., Magde, D., Koesling, D. *Biochemistry* **1997**, 36, 6814 - 6818

²⁵ Dierks, E.A., Burstyn, J.N. *Arch. Biochem. Biophys.* **1998**, 351, 1 - 7