

1. Einleitung

1.1. Zyklisches Guanosin-3',5'-monophosphat, lösliche Guanylylzyklase (sGC)

Zyklisches Guanosin-3',5'-monophosphat (cGMP) wurde 1967 von *Ashman et al.* im Rattenurin entdeckt. Es konnte später gezeigt werden, daß cGMP in allen eukaryoten Zellen und Geweben produziert wird (*Hardmann und Sutherland, 1969; Schultz et al. 1969; White und Aurbach, 1969; Goldberg et al. 1973*). cGMP ist ein wichtiges Signalmolekül, das als second messenger bei der Relaxation glatter Muskelzellen (*Lincoln, 1989*), der Synapsenübertragung (*O'Dell et al., 1991*), der Hemmung der Thrombozytenaggregation und der retinalen und olfaktorischen Signaltransduktion wirkt (*Garthwaite et al. 1988; Walter, 1989; Schmidt und Walter, 1994; Moncada und Higgs, 1995*). cGMP wirkt entweder über cGMP-abhängige Proteinkinasen (PKG) oder in der Retina (*Haynes und Yau, 1985*) und im olfaktorischen System (*Nakamura und Gold, 1987*) über cGMP-gekoppelte Ionen-Kanäle.

Unter physiologischen Bedingungen entsteht cGMP durch Hydrolyse von Guanosin-5'-triphosphat (GTP) zu cGMP und Pyrophosphat. Katalysiert wird diese Reaktion durch Guanylylzyklasen (GC; EC 4.6.1.2). 1974 zeigten *Kimura und Murad*, daß cGMP in der löslichen und partikulären Fraktion von Herzhomogenaten von zwei verschiedenen Enzymen gebildet wird. Es handelt sich hierbei in eukaryotischen Zellen um die lösliche Guanylylzyklase (sGC) und die membran-gebundene und damit partikuläre Guanylylzyklase (pGC). Die pGC gehört zu der Gruppe der Rezeptor-gekoppelten Enzyme. Es konnten bisher sieben Isoformen (A bis G) der pGC isoliert werden (*Tremblay et al., 2002*). Sie bestehen aus einem Monomer, das eine N-terminale Transmembrandomäne und eine intrazelluläre, katalytische Domäne im Bereich des C-terminalen Endes aufweist. Die pGC-A wird vorwiegend durch die natriuretischen Peptide A und B aktiviert (*Chinkers et al., 1989*); die pGC-B durch das natriuretische Peptid C (*Schulz et al., 1989*). Die Liganden der pGC-C sind Guanylin, Uroguanylin und das hitzestabile *Escherichia coli* Enterotoxin STa (*Currie et al., 1992*). Die Liganden der pGC-D-F sind bisher nicht bekannt (*Tremblay et al., 2002*). Die extrazelluläre Domäne der pGC-G ist denen der pGC-A und -B ähnlich, was auf ähnliche Liganden schließen läßt (*Schulz et al., 1998*).

Die sGC wurde von mehreren Arbeitsgruppen aus verschiedenen Geweben isoliert, wobei sich das Enzym am besten aus bovinem Lungengewebe gewinnen läßt. Das isolierte Enzym ist ein Heterodimer, das aus einem 73 kDa Monomer (α_1 -Untereinheit) für die bovine Isoform und einem 70 kDa Monomer (β_1 -Untereinheit) besteht. Während alle Arbeitsgruppen für die

β_1 -Untereinheit ein Mr von 70 kDa erhielten, differierte es für die α_1 -Untereinheit in verschiedenen Geweben zwischen 73 und 80 kDa (*Gerzer et al., 1981; Humbert et al., 1990; Stone und Marletta, 1994; Burstyn et al., 1995; Tomita et al., 1997*).

Über Homologie-Screening mit degenerierten Oligonucleotid-PCR-Primern wurden in der Rattenniere und im humanem fetalen Gehirn weitere Untereinheiten gefunden (*Yuen et al., 1990; Harteneck et al., 1991*). In Analogie zur α_1 - und β_1 -Untereinheit wurde die mit 82 kDa größere Untereinheit α_2 -Untereinheit und die mit 76 kDa kleinere Untereinheit β_2 -Untereinheit genannt. Weiterhin wurden von *Giuli et al. (1992)* aus humanem Gewebe α_3 - und β_3 -Untereinheiten isoliert, die bei 85 %-iger bzw. 99 %-iger Homologie aber eher humanen Varianten der α_1 - und der β_1 -Untereinheit der Ratte entsprechen als unterschiedliche Isoformen darstellen (*Koesling und Friebe, 1999*). Die α_1 - und der β_1 -Untereinheit sind ubiquitär exprimiert. Die ursprünglich aus dem humanen fetalen Gehirn klonierte α_2 -Untereinheit findet sich außerdem noch in der humanen Plazenta, bei Ratten in Niere, Gefäßen, chemosensiblen Zellen sowie Spinalganglien. Die aus der Rattenniere klonierte β_2 -Untereinheit kommt noch in der Leber dieser Spezies vor (*Hobbs, 1997*).

Die Genorte der α_1 - und der β_1 -Untereinheit sind im humanen Genom auf Chromosom 4 lokalisiert (*Giuli et al., 1993; Behrends et al., 2000*); die α_2 -Untereinheit ist auf Chromosom 11 kodiert (*Yu et al., 1996*). Die β_2 -Untereinheit ist in humanem Gewebe bisher nicht nachgewiesen worden. Dementsprechend ist auch kein Genort bekannt. Alle Untereinheiten besitzen zwei katalytische Domänen im Bereich des C-Terminus. Vergleiche der Primärstrukturen der katalytischen Domänen von α_1 - und β_1 -Untereinheit zeigen, daß diese Domänen den C1- und C2-Domänen der Adenylyl-Zyklasten entsprechen (*Koesling, 1999*). Die β_2 -Untereinheit besitzt im Bereich des C-Terminus 86 zusätzliche Aminosäuren, von denen einige Sequenzbereiche Isoprenylierungs- bzw. Carboxymethylierungsstellen entsprechen. Ähnliche posttranslationale Modifikationen in anderen Proteinen, z.B. in ras, sind für die Membranassoziation dieser Proteine verantwortlich, so daß auch für die β_2 -Untereinheit eine Membranassoziation vorstellbar ist, die bisher aber noch nicht gezeigt werden konnte (*Hobbs, 1997*). Die N-terminale Region der verschiedenen Untereinheiten variiert, wobei ein Bereich von ca. 100 Aminosäuren sowohl in den α -Untereinheiten als auch in den β -Untereinheiten hochkonserviert ist. Dieser Bereich variiert jedoch zwischen der α - und β -Untereinheit. Erwähnenswert ist weiterhin, daß sich das Histidin 105 der β_1 -Untereinheit im N-Terminus findet, das den proximalen Liganden der Häm-Gruppe darstellt (s.u.). Mutationsexperimente, bei dem das Histidin 105 durch Phenylalanin ersetzt wurden, zeigten,

daß die sGC weiterhin ihre basale Aktivität besitzt, aber weder durch NO oder Protoporphyrin IX stimuliert wurde noch Häm enthält (Wedel *et al.*, 1994).

Expressionsexperimente konnten zeigen, daß für ein aktives Enzym eine α - und eine β -Untereinheit notwendig sind (Harteneck *et al.*, 1990; Buechler *et al.*, 1991). Die aus der Lunge isolierte sGC ist ein Heterodimer aus α_1 - und β_1 -Untereinheit. Diese Isoform des Holoenzym ist in fast allen Geweben vorhanden. Das isolierte Enzym wird durch NO bis zu 400-fach stimuliert und enthält eine prosthetische Häm-Gruppe (Gerzer *et al.*, 1981). Die spezifische Aktivität liegt bei 25 bis 40 $\mu\text{Mol cGMP} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ (Stone und Marletta, 1995). Als Kofaktor benötigt die sGC Mg^{2+} oder Mn^{2+} .

Russwurm *et al.* (1998) konnten aus der humanen Plazenta ein enzymatisch aktives Heterodimer isolieren, das aus α_2 - und β_1 -Untereinheit besteht. Diese Isoform unterscheidet sich im Häm-Gehalt, in der Sensitivität für NO, den kinetischen Eigenschaften und der Stimulierbarkeit nicht von der $\alpha_1\beta_1$ -Isoform. Eine enzymatisch inaktive splice-Variante der α_2 -Untereinheit wurde von Behrends *et al.* (1995) identifiziert, die in der Lage ist mit der β_1 -Untereinheit zu dimerisieren. Bei dieser enzymatisch inaktiven Isoform könnte es sich um einen dominant negativen Regulator der sGC-Aktivität handeln. PCR-Analysen zeigten ein nahezu ubiquitäres Vorkommen der α_1 -, α_2 - und β_1 -Untereinheiten, wohingegen die mRNA der enzymatisch inaktiven splice-Variante der α_2 -Untereinheit nicht in allen Geweben nachgewiesen werden konnte (Behrends *et al.*, 1995).

Für die β_2 -Untereinheit konnte keine Heterodimerisierung gezeigt werden. Koglin *et al.* (2001) zeigten eine NO- und Protoporphyrin IX-induzierte enzymatische Aktivität dieser Untereinheit in Sf9-Zellen. Über die biologische Bedeutung der β_2 -Untereinheit ist bisher wenig bekannt.

Die Aktivierung der sGC erfolgt außer durch NO (Stone und Marletta, 1994) in geringerem Maße durch CO (Stone und Marletta, 1994), über den eisenfreien Häm-Vorläufer Protoporphyrin IX, indem es die Konformation des NO-Häm-Komplexes nachahmt (Ignarro *et al.*, 1984) und über den synthetischen Aktivator YC-1 (Friebe *et al.*, 1996). Durch NO wird ein fünffach koordinierter Nitrosyl-Häm-Komplex gebildet, wodurch die Bindung des Histidin 105 der β_1 -Untereinheit zum Eisen des Häm-Komplexes unterbrochen wird. Die Bindung von CO an Häm führt nicht zur Unterbrechung der Histidin-Eisen-Verbindung, woraus ein sechsfach koordinierter CO-Häm-Komplex resultiert. In beiden Fällen erfolgt eine Konfor-

mationsänderung, wodurch die sGC aktiviert wird. Die geringe Aktivierung der sGC durch CO ist durch die hohe Diffusionsrate und die geringere Konformationsänderung im Bereich des Häm-Komplexes zu erklären. Mit dem synthetischen sGC-Aktivator YC-1 lässt sich die sGC durch CO ebenso stark wie durch NO stimulieren (Friebe *et al.*, 1996; Stone und Marletta, 1998). In **Abb. 1** ist die Aktivierung der sGC durch NO schematisch dargestellt.

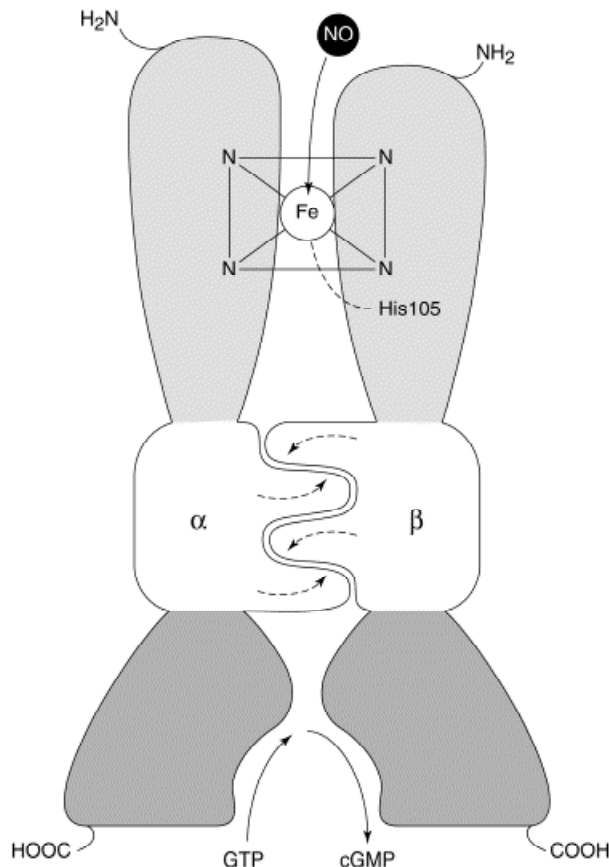


Abb. 1: Schematische Darstellung der Aktivierung der sGC durch NO. Die Häm-Gruppen sind im Heterodimer der sGC im Bereich des N-Terminus lokalisiert. Durch NO kommt es zur Ausbildung eines Nitrosyl-Häm-Komplexes, der zur Konformationsänderung der Monomere führt. Im katalytischen Zentrum im Bereich des C-Terminus wird durch die sGC aus GTP cGMP unter Freisetzung von Pyrophosphat gebildet (aus Hobbs, 1997).

Der cGMP-Abbau erfolgt über Phosphodiesterasen (PDE). Hierbei werden drei Gruppen unterschieden. PDE, die sowohl cAMP als auch cGMP hydrolysieren und damit unspezifisch wirken, sind die PDE 1-3 sowie 10 und 11. Während die PDE 4, 7 und 8 spezifisch cAMP abbauen, wird cGMP spezifisch von den PDE 5, 6 und 9A hydrolysiert, wobei die PDE 9A die höchste Affinität zu cGMP besitzt (Andreeva *et al.*, 2001). Die Aktivität der PDE wird reguliert über die Substrat-Konzentration, über den Anstieg einer oder beider zyklischer

Nukleotide, über Ca^{2+} und Calmodulin sowie über Rückkoppelungs-Phosphorylierung über cAMP- beziehungsweise cGMP-abhängige Proteinkinasen (Murthy, 2001).

Der stärkste Aktivator der sGC ist NO. Von der Stickstoffmonoxidsynthase 1 (NOS-1) ist bekannt, daß sie und damit die NO-Bildung im Sarkolemm-Bereich der Skelettmuskulatur konzentriert sind (s.u.). Die Lokalisation der sGC als wesentliches Rezeptormolekül in der NO-cGMP-Signaltransduktionskette ist in der Skelettmuskulatur bisher kaum untersucht worden. Erste Befunde dazu sind von Feussner et al. (2001) sowie Schoser und Behrends (2001) publiziert worden.

1.2. Stickstoffmonoxid, Stickstoffmonoxid-Synthasen

Stickstoffmonoxid (NO) ist ein farbloses, in Wasser nur wenig lösliches und mäßig reaktionsfreudiges Gasradikal. Bis in die 70er Jahre war NO allgemein nur als Umwelt- und Zellgift bekannt (Förstermann et al., 1995a). Danach begannen verschiedene Arbeitsgruppen die Rolle von NO bei der zellulären Signaltransduktion als Botenstoff aufzuklären. Arnold et al. (1977) konnten zeigen, daß NO durch eine Aktivierung der sGC zur Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur führt. Palmer et al. (1987) identifizierten die schon vorher als endothelium-derived relaxing factor (EDRF) benannte Verbindung (Furchgott und Zawadzki, 1980) als endogen produziertes NO. Die Zeitschrift Science wählte 1992 NO zum Molekül des Jahres; 1998 erhielten R. Furchgott, F. Murad und L. Ignarro für die Erforschung der Schlüsselrolle des NO bei Signaltransduktionsprozessen den Nobelpreis für Physiologie und Medizin.

Inzwischen sind zahlreiche physiologische Prozesse bekannt, an denen NO beteiligt ist. Das Gasmolekül spielt eine wichtige Rolle im Gefäßsystem, z.B. bei der Regulation des Blutdrucks. Im zentralen und peripheren Zentralnervensystem wirkt NO als Neurotransmitter, der die Erregungsverarbeitung moduliert (Garthwaite et al., 1989a, b; Bult et al., 1990; Bredt und Snyder, 1994). Die Beteiligung von NO wurde kürzlich auch in Neuronen des okulomotorischen Systems von Moreno-Lopez et al. (2001) beschrieben.

NO ist außerdem an zahlreichen pathologischen Vorgängen beteiligt: So spielt es eine wichtige Rolle bei Abwehr- und Entzündungsprozessen (Kondo et al., 1993; Moncada, 1993; Norris et al., 1995; Wang und Hakanson, 1995). Beispielsweise ist bei Patienten mit Alveolitis die Konzentration von NO im Respirationstrakt gegenüber Gesunden stark erhöht (Lehtimäki et al., 2001). In der Onkologie kann NO ebenfalls eine Schlüsselrolle spielen (Mordan et al., 1993; Yim et al., 1995; Laudanski et al., 2001), da z.B. bestimmte Mamma-

Tumoren NO-abhängig wachsen (*Jadeski et al., 2000*).

Therapeutisch wurden NO-Donatoren wie das Glyceroltrinitrat seit dem Ende des 19. Jahrhunderts eingesetzt, ohne daß die Wirkmechanismen bekannt waren. Durch den inzwischen erreichten Wissenszuwachs ist das therapeutische Spektrum von NO-Donatoren erweitert worden, etwa bei der Akuttherapie der Schocklunge (*Aardal und Flaatten, 1996*) oder bei erektilen Dysfunktionen (*Padma-Nathan und Giuliano, 2001*).

Unter physiologischen Bedingungen produziert der Organismus enzymatisch und nicht-enzymatisch NO. Die nicht-enzymatische NO-Produktion findet unter sauren und reduzierenden Bedingungen statt, wobei aus anorganischem Nitrit NO freigesetzt wird. Diese Reaktion findet vor allem im Magen und an der Hautoberfläche statt. Unter pathophysiologischen Bedingungen erfolgt die nicht-enzymatische NO-Produktion vor allem im ischämischen Herzen und bei Harnwegsinfekten (*Weizberg und Lundberg, 1998*).

Bei der enzymatischen NO-Produktion dient die Aminosäure L-Arginin als Substrat, die über N-Hydroxyl-L-Arginin als Zwischenstufe zu Citrullin reduziert wird, wobei NO entsteht (*Marletta et al., 1988; Moncada et al., 1989*). An dieser Redoxreaktion, bei der fünf Elektronen übertragen werden, sind mehrere Coenzyme bzw. prosthetische Gruppen beteiligt (Häm, FAD, FMN, NADPH + H⁺ und Tetrahydrobiopterin; *Nakane et al., 1993; Nathan und Xie, 1994a; Nishida und Ortiz de Montellano, 1998; Abb. 2*).

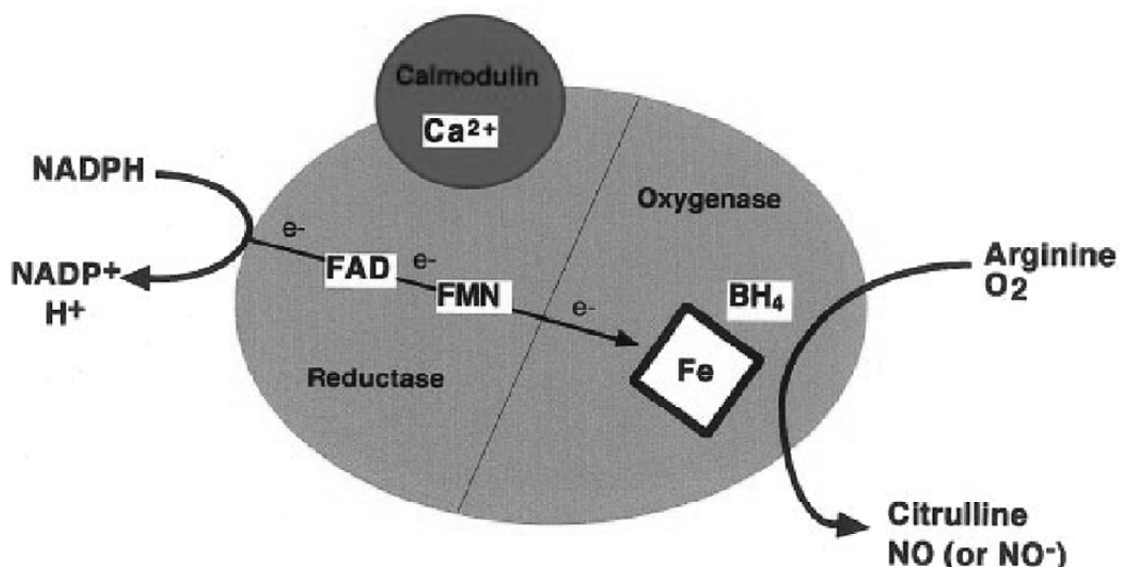


Abb. 2: Darstellung der enzymatischen Produktion von NO durch NOS. Unter Beteiligung

von Häm, FAD, FMN, NADPH und Tetrahydrobiopterin (BH₄) wird NO aus Arginin unter Verbrauch von molekularem Sauerstoff freigesetzt. Als Reaktionsprodukt entsteht weiterhin Citrullin (aus *Alderton et al., 2001*).

Bisher konnten drei Enzyme identifiziert werden, die NO produzieren und deshalb als NO-Synthasen (NOS) bezeichnet werden (EC 1.14.13.39). Trotz des gemeinsamen Reaktionsproduktes NO weisen die verschiedenen NOS-Isoformen Struktur-, Funktions- und Lokalisationsunterschiede auf. Die drei NOS-Formen besitzen eine N-terminale Oxygenase-Domäne und eine C-terminale Reduktionsdomäne. Im C-terminalen Teil zeigen alle NO-Synthasen eine Homologie mit der NADPH-Cytochrom-P450-Reduktase, die bei der Biotransformation von Pharmaka eine wichtige Rolle spielt (*Bredt et al., 1991a; Daff et al., 2001*). Die Aufgabe der Reduktasedomäne besteht darin, Reduktionsäquivalente für das Häm in der Oxygenase-Domäne zu liefern. In der Reduktasedomäne findet man die Bindungsstellen für FAD, FMN und NADPH (*Nakane et al., 1993; Förstermann et al., 1994*). Die drei Isoformen bilden jeweils aus zwei Monomeren ein Dimer, das durch zwei Calmodulin Monomere zu einem Tetramer erweitert wird (*Marletta, 1994*).

Die Einteilung der NOS erfolgte zunächst nach dem Zelltyp, aus dem erstmalig die Isolation der entsprechenden NOS-mRNA für die jeweiligen NOS-Proteine gelang: nNOS (neuronal), eNOS (endothelial) und iNOS (induzierbar). Später wurden die unterschiedlichen NOS-Formen auch in anderen Zelltypen gefunden, weshalb eine neutrale und zelltypunabhängige Nomenklatur eingeführt wurde: NOS-1 (nNOS), NOS-2 (iNOS) und NOS-3 (eNOS) (*Förstermann und Kleinert, 1995b*). Die Zn²⁺-haltige NOS-1, welche ursprünglich im Kleinhirn der Ratte entdeckt wurde (*Mayer et al., 1990; Bredt et al., 1991b; Schmidt und Murad, 1991*) und die NOS-3, die vor allem im Gefäßendothel exprimiert wird (*Hecker et al., 1994; Förstermann und Dun, 1996*), liegen in relativ konstanten Konzentrationen vor. Deshalb werden die NOS-1 und NOS-3 als konstitutive NOS-Formen bezeichnet. Im Gegensatz hierzu tritt die NOS-2 hauptsächlich erst durch Induktion auf, z.B. bei der Immunabwehr. Sie wurde zunächst in Makrophagen gefunden (*Mitchell et al., 1992; MacMicking et al., 1997*). Zur vollen Aktivität benötigen alle drei NOS-Formen Ca²⁺-bindendes Calmodulin (*Bredt und Snyder, 1990; Hayashi et al., 1999*). Die beiden konstitutiven Formen benötigen dafür jedoch eine wesentlich höhere Konzentration an Ca²⁺ als die NOS-2 (*Schmidt et al., 1992; Nathan und Xie, 1994b; Yun et al., 1996*).

Das Gen für die NOS-1 ist auf Chromosom 12 lokalisiert und besitzt von allen NOS-Genen

die meisten Exons. Wie die NOS-3 verfügt auch die NOS-1 über eine Phosphorylierungsstelle, über welche die NOS-Aktivität, z.B. durch cAMP-abhängige Proteinkinase reguliert werden kann (*Zoche et al., 1997*). Diese Aktivitätsänderung durch die Phosphorylierung wird kontrovers diskutiert (*Bredt et al., 1992; Okada, 1996; Cordelier et al., 1999*). Das Gen für die NOS-3 ist im Chromosom 7 lokalisiert. Das Protein ist N-terminal myristyliert und palmitoyliert und damit in der Plasmamembran der Endothelzellen der Gefäße verankert. Es kann seine intrazelluläre Lokalisation als translokatorisches Enzym verändern (*Busconi und Michel, 1993; Venema et al., 1996; Michel und Michel, 1997*). Das Gen für die NOS-2 ist auf Chromosom 17 lokalisiert (*Lowenstein et al., 1992*). Das Enzym wird durch Zytokine (z.B. Interferon) oder Bakterienbestandteile (z.B. Lipopolysaccharide) induziert. Dabei produziert die NOS-2 als "high-output"-Enzym NO in hohen antimikrobiellen Konzentrationen (*Xie und Nathan, 1994*), während NOS-1 und NOS-3 "low-output"-Enzyme sind und NO in Konzentrationen synthetisieren, die vor allem der Signaltransduktion dienen (*Nathan und Xie, 1994a*).

In der Skelettmuskulatur ist die NOS-1 im Sarkolemm-Bereich exprimiert (*Kobzik et al. 1994; Grozdanovic et al. 1995*) und kommt vor allem in FOG- (Iib), weniger in den FG- (IIa) und kaum in den SO-Fasern (I) vor (*Planitzer et al. 2001*). Ihr werden bedeutende Funktionen für die Muskelfasertätigkeit zugeschrieben, die sowohl cGMP-abhängig als auch cGMP-unabhängig sind. Hierunter fallen u.a. die Fusion embryonaler Myoblasten des Huhns (*Lee et al., 1994*), die Reduktion der Muskelkraft (*Kobzik et al., 1994; Abraham et al. 1998*) sowie die Erhöhung der Kontraktionsgeschwindigkeit (*Maréchal und Beckers-Bleukx, 1998*). Weiterhin verweist *Reid (1998)* auf mögliche Wechselwirkungen von NO mit reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), die während der Muskelkontraktion entstehen, um die Funktion von NO in der Skelettmuskulatur zu erklären.

1.3 Kohlenmonoxid, Häm-Oxygenasen

In der Natur ist Kohlenmonoxid (CO) ein mäßig reaktionsfreudiges, farb- und geruchloses Gas, das bei unvollständigen Verbrennungsvorgängen organischer Substanzen entsteht. Es erreicht schnell toxische Konzentrationen, weil es das Häm im Hämoglobin wegen seiner ca. 220-fach höheren Affinität als Sauerstoff nahezu irreversibel blockiert (*Haab, 1990*) und damit zu einer Hypoxämie führt.

Im Körper entsteht CO aus dem Abbau von Häm durch Häm-Oxygenasen (HO; EC 1.14.99.3), die den ersten und gleichzeitig geschwindigkeits-limitierenden Schritt des Häm-

Abbaus darstellen. Häm ist Bestandteil von Hämoglobin aber auch Gewebsproteinen wie Myoglobin, Cytochromen und auch den drei NOS-Formen. Häm ist ein Tetrapyrrol. Die vier Pyrrole sind über Methen-Brücken (α , β , γ , δ) miteinander verbunden. Im Zentrum des Häm-Moleküls befindet sich ein dreiwertiges Eisen-Atom (Fe-III). Der enzymatische Abbau von Häm durch die HO erfolgt, durch Spaltung der α -Methen-Brücke. Als Kofaktoren werden hierfür molekularer Sauerstoff und NADPH benötigt. Durch die Reaktion werden Biliverdin (BV) IX α , Fe³⁺ und CO freigesetzt (**Abb. 3**).

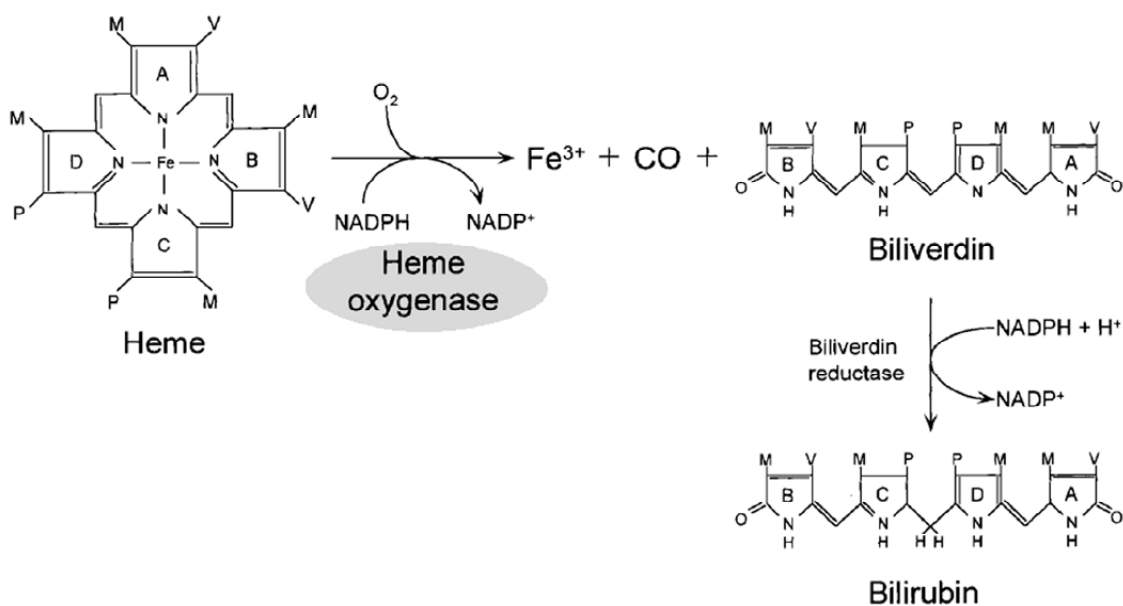


Abb. 3: Darstellung des Häm-Abbaus. Häm-Oxygenasen spalten das Häm-Molekül im Bereich der α -Methen-Brücke unter Verbrauch von molekularem Sauerstoff und NADPH. Freigesetzt werden Biliverdin, Fe³⁺ und CO (aus *Agarwal und Nick, 2000*; M, V, und P repräsentieren Methyl-, Vinyl- bzw. Propionyl-Gruppen).

Alle Produkte des Häm-Abbaus, d.h. Biliverdin (s.u.), Fe³⁺ und CO (s.u.), sollen physiologische Funktionen haben. Freies Fe³⁺ kann z.B. erneut in Häm-Moleküle eingebaut werden (*Maines, 1988*). Bisher sind drei Häm-Oxygenasen (1.14.99.3) bekannt: HO-1, HO-2 und HO-3. Die drei HO gleichen sich im Mechanismus des Häm-Abbaus, der Substrat-Spezifität und der benötigten Kofaktoren (*Maines, 1997*). Die Häm-Oxygenasen sind jedoch Produkte unterschiedlicher Gene (*McCoubrey und Maines, 1994*).

Die HO-1, auch heat-shock-protein 32 (HSP32) genannt, ist in Säugetierspezies ein Protein mit einem Molekulargewicht zwischen 30 und 33 kDa und einer hochkonservierten Aminosäuresequenz. Die Homologie zwischen Ratte, Maus und Mensch ist größer als 80 %. Der

Genort im humanem Genom ist auf Chromosom 22 lokalisiert (*Kuwano et al., 1994*). Die HO-1 ist die induzierbare Isoform der HO und das Protein, das durch die meisten Stimuli induziert wird (*Maines, 1997*). Die Stimuli schließen die der NOS-2, z.B. LPS, ein, sind aber noch umfassender; z.B. induzieren auch UV-A-Strahlung oder Natriumarsenid die HO-1 (*Keyse und Tyrell, 1989*). Unter physiologischen Bedingungen ist das Enzym in der Milz, in der durch die Erythrozytenmauserung am meisten Häm anfällt, die vorherrschende Isoform. Außerdem kommt die HO-1 physiologisch im ZNS vor allem im Hirnstamm (z.B. Nucleus ruber, Colliculus inferior, Lemniscus lateralis), in der Leber hauptsächlich in den Kupferzellen und weniger in Hepatozyten sowie in Sertoli-Zellen des Hodens vor. Nach Induktion ist sie in allen bisher untersuchten Zellen und Geweben nachweisbar (*Maines, 1997*). Die HO-1 ist mit einer V_{\max} von 56,7 nmol BV/mg pro/min (*Maines et al., 1986*) in Rattenorganen die aktivste Isoform und weist damit eine weitere Parallele zur NOS-2 auf.

Die HO-2 ist in Säugetierspezies ein Protein mit einem Mr von 36 kDa und einer hochkonservierten Aminosäuresequenz. Die Homologie zwischen Ratte, Maus und Mensch ist größer als 90 %. Der Genort im humanem Genom ist bisher nicht publiziert. Die Homologie zur HO-1 beträgt lediglich 40 %. In der sogenannten HO-Signatur, die der katalytischen Domäne entspricht, sind die beiden Isoformen jedoch weitgehend identisch (*Rotenberg und Maines, 1991*). Die HO-2 ist ein Hämoprotein, das Häm über sogenannte "heme regulatory motifs" (hrm, *McCoubrey et al., 1997a*) bindet. Die hrm bestehen aus den Aminosäuren Cystein und Prolin, wobei in der HO-2 zwei hrm vorhanden sind. Die HO-2 ist konstitutiv exprimiert und die vorherrschende Isoform der HO unter physiologischen Bedingungen (*Maines, 1997*). Eine Induktion erfolgt lediglich über adrenale Glucokortikoide (*Raju et al., 1997*). Die höchsten Konzentrationen finden sich im Hoden gefolgt von ZNS und Leber. Die V_{\max} beträgt 4,0 nmol BV/mg pro/min.

Da alle Produkte des Häm-Abbaus eine physiologische Bedeutung besitzen, sind die Funktionen der HO-2 entsprechend vielfältig. Im Hoden wird freies Eisen für die Spermatogenese benötigt (*Maines, 1997*). Weiterhin soll die HO-2 durch Aktivierung der sGC mittels CO (s.o.) eine parallele Rolle zu NO als neuronaler Botenstoff besitzen (*Snyder et al., 1998*) sowie die hepatobiliäre Funktion (*Suematsu und Ishimura, 2000*), die organspezifische Perfusion (*Durante und Schafer, 1998*) und den Blutdruck regulieren (*Seki et al., 1997*). Ebenfalls CO-vermittelt ist die Relaxation der glatten Muskulatur von Hohlorganen (*Ny et al., 1996; Werkstrom et al., 1997*) und ein Teil der Aktivität des Glomus caroticum (*Prabhakar et al., 1995*). Das beim Häm-Abbau anfallende Biliverdin wird durch ein nachgeschaltetes

Enzym, die Biliverdinreduktase (BVR), zu Bilirubin (BR) abgebaut (s. **1.4.**).

Die bisherigen immunhistochemischen Untersuchungen zur Lokalisation der HO-2 in der Skelettmuskulatur und ihren verschiedenen Fasertypen sind z.T. widersprüchlich und schwer zu reproduzieren, obwohl *Grozdanovic und Gossrau (1996)* und *Kusner und Kaminsky (1999)* mit den gleichen Antikörpern (OSA-200) und mit Rattenmuskeln gearbeitet haben. Vor allem SO-Fasern enthalten viel Myoglobin, bei dessen Umsatz große Mengen freies Häm anfallen könnten, wozu es bisher aber keine genauen Untersuchungen gibt. Vor allem in den FOG-Fasern aber auch in den FG-fasern ist das Hämprotein NOS-1 im Sarkolemm-Bereich vorhanden. Durch den NOS-1-Umsatz aber auch den anderer Häm-haltiger Enzyme könnte in diesen Fasertypen freies Häm als HO-Substrat anfallen.

Die HO-3 wurde bisher nur von *McCoubrey et al. (1997b)* beschrieben. Über Homologie-Screening mit degenerierten PCR-Primern konnte eine cDNA aus dem Rattenhirn isoliert werden. Bei dem Enzym handelt es sich um ein Hämoprotein mit einem Mr von 34 kDa und 90 %-iger Homologie mit der HO-2. Wie die HO-2 besitzt es zwei hrm. Die katalytische Aktivität ist gering. Das HO-3-Protein ist bisher noch nicht direkt nachgewiesen worden, sondern seine Charakterisierung erfolgte indirekt über das in *E. coli* exprimierte Protein. Die V_{\max} beträgt mit 0,4 nmol BV/mg pro/min ein Zehntel der Aktivität der HO-2 und weniger als eine Hundertstel der HO-1-Aktivität. Die Autoren schreiben der HO-3 eher eine Häm-bindende als eine katalytische Funktion zu. Trotz 90 %-iger Homologie zur HO-2 soll keine Kreuzreaktivität mit polyklonalen anti-HO-2-Antikörpern bestehen. Die HO-3 mRNA konnte mit in-situ-Hybridisierung in allen untersuchten Organsystemen nachgewiesen werden. Die Zell- und Gewebeverteilung des Proteins ist wegen fehlender Antikörper unbekannt.

1.4. Bilirubin, Biliverdinreduktase

Die Biliverdinreduktase IX (BVR; EC 1.3.1.24) ist die einzige bisher charakterisierte Oxidoreduktase, die bei zwei pH Optima (6,7 und 8,7) und mit zwei Kofaktoren (NADH und NADPH) arbeitet (*Maines et al., 1996*). Das Enzym ist Zn^{2+} -haltig. Die Hauptisoform der BVR ist die BVR IX α . Eine weitere Isoform ist die BVR IX β , die eher in fetalen Geweben exprimiert ist und in der adulten Leber lediglich 3-5 % der Gesamt-BVR ausmacht (*Komuro et al., 1996*). Der Genort für die BVR IX α ist im humanem Genom auf Chromosom 7 (*Parkar et al., 1984*) und für die BVR IX β auf Chromosom 19 lokalisiert (*Saito, 1995*). Die vorherrschende Isoform in adulten Geweben ist die BVR IX α , die den letzten Schritt des Häm-Metabolismus katalysiert, indem es Biliverdin IX α zu Bilirubin IX α umwandelt (**Abb. 3**). BV

entsteht durch den von den Häm-Oxygenasen 1-3 katalysierten Abbau von Häm (s.o.). Lange galt BR als neurotoxische Substanz, z.B. beim Neugeborenen-Ikterus. Dann erschienen Publikationen, die dem BR wegen seiner antioxidativen Eigenschaften auch eine zytrotektive Funktion innerhalb und außerhalb des Zentralnervensystems zuschreiben (*Stocker et al., 1989, Panahian et al., 1999*). Die BVR wurde bisher in vielen Organen gefunden, wobei die höchsten Konzentrationen in Milz und Leber vorkommen, wo Häm durch die Erythrozytenmauserung in den höchsten Mengen anfällt.

Über die Expression und Lokalisation der BVR in der Skelettmuskulatur ist bisher nichts bekannt.

1.5. Zielsetzung der Arbeit

Zusammenfassend ist festzuhalten, daß über die sGC, NOS, HO und BVR zahlreiche und vor allem molekularbiologische Befunde vorliegen, die aber kaum auf die aufgezeigten möglichen funktionellen Zusammenhänge zwischen den vier Enzymmolekülen in den gleichen Zellen, Geweben und Organen eingehen, auch weil die meisten der bekannten Daten mit den isolierten Enzymen oder an kultivierten Zellen erhoben wurden. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit 1. systematisch mit proteinbiochemischen Methoden die Koexpression der Enzymmoleküle in den verschiedensten Rattenorganen und 2. die Kolokalisation in repräsentativen Skelettmuskeln von Ratten und weiteren Nagern untersucht, da hier zumindest die Lokalisation der NOS-1 besonders gut bekannt ist (s.o.).

Die Arbeiten erfolgten unter physiologischen, d.h. nicht stimulierten Bedingungen, weswegen die induzierbare NOS-2 und HO-1 im Folgenden nicht berücksichtigt wurden.

Im einzelnen wurden untersucht:

1. Die Koexpression von sGC, NOS-1, NOS-3 und BVR mit Immunblots in Rattenorganen.
2. Die Expression der HO-2 und HO-3 mit neu hergestellten Antikörpern gegen diese beiden konstitutiv exprimierten HO nach deren Etablierung.
3. Neben der Koexpression mit Immunblots die Kolokalisation sGC, NOS-1, NOS-3, HO-2, HO-3 und BVR mit immunhistochemischen und katalytisch-histochemischen Methoden in Skelettmuskeln verschiedener Nager.