

Christiane Jung

Von der Hämkatalyse zum Cytochrom P450¹

Lieber Jubilar Werner Scheler !
Werte Anwesende !



Christiane Jung

Es ist für mich eine besondere Freude und Ehre, heute hier sprechen zu dürfen – insbesondere auch deshalb, weil ich mich in zweifacher Weise mit dem Jubilar verbunden fühle. Werner Scheler war nicht nur für eine Reihe von Jahren mein Chef als Leiter der Abteilung Hämkatalyse am Zentralinstitut für Molekularbiologie der Akademie der Wissenschaften der DDR, sondern legte mit seinen wissenschaftlichen Arbeiten in den fünfziger Jahren auch eine entscheidende Basis für meine eigenen Forschungen.

1. Schelers fundamentelle Entdeckung am Häm im Methämoglobin

Das Wort „Häm“ hörte ich erstmals 1972, als ich bei Prof. Werner Haberditzl an der Sektion Chemie der Humboldt Universität zu Berlin meine Diplomarbeit über „Spektrale Eigenschaften von Porphyrinen“ begann. Ich hatte die Aufgabe, ein Computerprogramm zur quantenchemischen Berechnung von elektronischen Zuständen und deren magnetischen Eigenschaften zu schreiben und auf das Porphyrin und Eisenporphyrin anzuwenden. Hauptaugenmerk sollte darauf gelegt werden, den Einfluss des Eisens auf die Porphyrinzustände quantitativ zu erfassen. Zur damaligen Zeit war mir nicht im geringsten bewusst, dass ich damit in ein so interessantes und wichtiges

¹ Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin, Arbeitsgruppe Proteindynamik, Robert-Rössle-Strasse 10, 13125 Berlin

Forschungsgebiet eintrat, zu dem der Jubilar bereits eine Reihe von Jahren zuvor wesentliche fundamentale Beiträge lieferte. Auch als ich 1973 am Zentralinstitut für Molekularbiologie der Akademie der Wissenschaften der DDR in Berlin-Buch meine Tätigkeit als wissenschaftliche Mitarbeiterin und damit meine Forschungen zu Struktur-Funktions-Beziehungen im Cytochrom P450 aufnahm, wusste ich wenig von dem, was Werner Scheler an Hämoglobinen und Myoglobinen erkannt hatte und dass das von großer Bedeutung für das Enzym Cytochrom P450 sein würde.

SONDERDRUCK AUS
DIE
NATURWISSENSCHAFTEN
SPRINGER-VERLAG / BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG
1956 HEFT 7, S. 159/60 43. JAHRGANG

**Über Zusammenhänge zwischen Lichtabsorption
und paramagnetischer Suszeptibilität bei Methämoglobin-Komplexen**

Die Verbindungen der Ferrihämoproteide wurden von THEORELL¹⁾ bzw. auch von HARTREE²⁾ nach ihrer Lichtabsorption und ihrem magnetischen Verhalten in 2 Gruppen eingeteilt, einmal die Verbindungen mit vorwiegend „kova-
lenter“ Bindung des Fe mit einer geringen paramagnetischen Suszeptibilität (z. B. Methämoglobin-Cyanid, -Azid und -Sulfid) und zum anderen in solche mit einer hohen Suszeptibilität, also vorwiegend „ionisch“ gebundenem Fe. Hierzu gehören

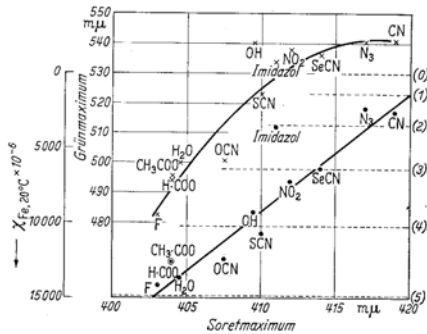


Fig. 1. Korrelation zwischen der Lage des Soretmaximums eines Pferde-Methämoglobin-Komplexes und des Grünmaximums (obere Kurve x) sowie zwischen der Lage des Soretmaximums und der paramagnetischen Suszeptibilität der betreffenden Komplexe (untere Kurve ·). Die Horizontalen sind die theoretischen Komplexe (untere Kurve ·). Ordinate: Paramagnetische Suszeptibilität $\chi_{Fe, 20^\circ C} \cdot 10^{-6}$ bzw. Lage des Grünmaximums (m μ). Abszisse: Lage des Soretmaximums (m μ)

Abb. 1: Die erste Seite der grundlegenden Arbeit von W. Scheler, G. Schoffa und F. Jung über den Zusammenhang von Lichtabsorption und Spinzustand des Hämeisens im Myoglobin [1].

Im Jahre 1956 erschien in der Zeitschrift „Die Naturwissenschaften“ der Artikel von W. Scheler, G. Schoffa und F. Jung mit dem Titel „Über die Zusammenhänge zwischen Lichtabsorption und paramagnetischer Suszeptibilität bei Methämoglobin-Komplexen“ (Abbildung 1) [1]. Darin zeigen die Autoren, dass sich das Maximum der Soretbande (Lichtabsorption) des Porphyrinrings im Methämoglobin zu niedrigen Wellenlängen verschiebt, wenn die Anzahl der ungepaarten Elektronen am Hämeisen (paramagnetische Suszeptibilität) bei verschiedenen axialen Liganden größer wird.

Jedes Elektron besitzt einen Spin, dem eine Quantenzahl $+1/2$ oder $-1/2$ zugeordnet wird. Eisen im dreiwertigen Zustand hat fünf Elektronen in den oberen Energieniveaus. Von diesen fünf Elektronen können z. B. drei Elektronen den Spin von $+1/2$ und zwei Elektronen den Spin $-1/2$ besitzen. Der summarische Spin wäre dann $+1/2$ und man nennt diesen Zustand „Niedriger Spin“ („low-spin state“). Alle fünf Elektronen können aber auch den gleichen Spin besitzen (z.B. $+1/2$), dann ergibt sich ein summarischer Spin von $+5/2$. In diesem Fall spricht man von einem „Hohen Spin“ oder „high-spin state“. Scheler und Mitautoren berichten, dass die Natur des axialen Hämliganden bestimmt, welcher Spinzustand vom Eisen eingenommen wird und dass das sich in der Lichtabsorption niederschlägt. Wie detaillierte Untersuchungen in späteren Jahren dann zeigen [2,3], gibt es Situationen, bei denen ein Gleichgewicht zwischen dem „low-spin state“ und dem „high-spin state“ vorliegt, das durch äußere Bedingungen wie z.B. die Temperatur verschoben werden kann. Dieses am Methämoglobin beobachtete Phänomen des temperaturabhängigen High-Spin/Low-Spin-Gleichgewichtes wurde in den siebziger Jahren mittels optischer Methoden auch am Cytochrom P450 nachgewiesen; etwa zur gleichen Zeit durch eine amerikanische Arbeitsgruppe am bakteriellen Cytochrom P450cam [4] und Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Prof. Klaus Ruckpaul in der Abteilung Biokatalyse des Zentralinstituts für Molekularbiologie der AdW der DDR an mikrosomalem Cytochrom P450 [5,6]. Der prozentuale Anteil der Cytochrom P450 Moleküle, der sich im High-Spin-Zustand befindet, wird High-Spin-Gehalt genannt und stellt einen der wichtigsten physiko-chemischen Parameter dieses Enzyms dar. Ähnlich wie Scheler am Methämoglobin gefunden hat, ist das Maximum der Soretbande im Low-Spin-Zustand (417 nm) zu niedrigen Wellenlängen im High-Spin-Zustand (392 nm) verschoben. Anhand dieses spektralen Effektes in Kombination mit Messungen der Elektronenspinresonanzspektren (ESR) stellte man fest, dass das substratfreie Enzym im Low-Spin-Zustand vorliegt. Bindet sich ein Substrat, dann wird das Gleichgewicht zum High-Spin-Zustand verschoben [7]. Letzteres wurde auch durch Messungen der paramagnetischen Suszepti-

bilität [8] nachgewiesen. Die durch Titration des Enzyms mit dem Substrat induzierten optischen Absorptionsdifferenzspektren bilden die entscheidende Basis für die Bestimmung von Substratbindungskonstanten. Die Aufnahme solcher Spektren ist sehr einfach, mit allen zur Verfügung stehenden UV-VIS-Spektrometern möglich und hat sich somit seit mehr als 20 Jahren als Standardmethode zur Charakterisierung der Cytochrom P450-Substratwechselwirkung etabliert. Neben dieser pragmatischen Anwendung des High-Spin/Low-Spin-Gleichgewichtes gibt es seit dessen Entdeckung aber auch vielfältige experimentelle und theoretische Untersuchungen, die darauf zielen zu verstehen, was sich physikalisch hinter diesem Gleichgewicht verbirgt und ob sich daraus weitere Eigenschaften des Enzyms ableiten, die für die Funktion wichtig sind. Im folgenden wird der aktuelle Erkenntnisstand dargelegt und gezeigt, wie unsere Forschungen am Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin zum tieferen Verständnis von Struktur-Funktions-Beziehungen im Cytochrom P450 beitragen.

2. Der Reaktionszyklus des Häms im Cytochrom P450

Mit dem Namen „Cytochrom P450“ verbindet sich eine Superfamilie von mehr als 2300 Isoenzymen, die in den verschiedensten Organismen durch Hydroxylierung, Epoxidierung, Dealkylierung und Übertragung von Sauerstoffatomen auf Heteroatome wie Stickstoff, Schwefel oder Phosphor eine Vielzahl von chemischen Verbindungen umwandeln. Für den Menschen ist diese Enzymfamilie lebenswichtig. Bei der Biosynthese aller Steroidhormone aus Cholesterin ist Cytochrom P450 für die Einführung von funktionswichtigen Hydroxygruppen in bestimmte Positionen im Steroidgrundkörper zuständig. Dadurch entstehen die Glucocorticoide, wichtig für Kreislauf und Nierenfunktion, und die Sexualhormone. Von den 58 bisher im menschlichen Organismus nachgewiesenen Cytochrom P450-Isoenzymen ist der überwiegende Anteil jedoch in den Abbau von Fremdstoffen, die durch die Nahrung und die Atmung aufgenommen werden, involviert. Zu diesen Fremdstoffen zählen auch die Arzneimittel, die wir zu uns nehmen, um Krankheiten zu heilen oder Symptome zu bekämpfen. Nicht selten gibt es unerwünschte Arzneimittelnebenwirkungen und Unverträglichkeiten bei gleichzeitiger Aufnahme von verschiedenen Medikamenten, die manchmal sogar zum Tod führen können. Die Ursache dafür ist in den meisten Fällen in der Wechselwirkung der Medikamente mit den Cytochromen P450 zu suchen [9,10]. Viele der Medikamente sind nämlich so genannte Substrate für die Cytochrom-P450-Enzyme und gehen als solche direkt in den Reaktionszyklus des Enzyms ein.

Interessanterweise zeigen alle bisherigen Untersuchungen, dass die Cytochrome P450 aus den verschiedensten Organismen einen gleichen grundlegenden Reaktionszyklus aufweisen. Diese Beobachtung ist von großer Bedeutung dafür, dass Erkenntnisse über Cytochrome P450 aus Mikroorganismen auch auf Struktur-Funktionsbeziehungen in menschlichen Cytochromen P450 übertragen werden können. Viele, insbesondere physikalische Untersuchungen sind nur an Cytochromen P450 aus Bakterien möglich, weil diese in großen Mengen und in hohen Konzentrationen aufgereinigt werden können, was mit den menschlichen Enzymen nicht möglich ist. Das wichtigste bakterielle Enzym, an dem die meisten und wichtigsten Erkenntnisse zu Struktur-Funktionsbeziehungen in Cytochromen P450 gewonnen wurden, stellt das bereits oben erwähnte Kampher-hydroxylierende Cytochrom P450cam aus *Pseudomonas putida* dar [11]. Nach der international anerkannten Nomenklatur wird es auch CYP101 genannt. Die Mehrzahl unserer Untersuchungen haben wir an diesem Enzym durchgeführt, dessen Wildtyp-Gen wir freundlicherweise von Prof. I.C. Gunsalus (University of Illinois, Urbana-Champaign), dem Entdecker dieses Cytochrom P450, zur Verfügung gestellt bekommen haben. In meinem Labor am Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin haben wir eine „large-scale“-Expression und Aufreinigung des Cytochrom P450cam etabliert, das uns in die Lage versetzt, ausreichende Mengen des Wildtyp-Proteins und ausgewählter Mutanten für physikalische Untersuchungen herzustellen.

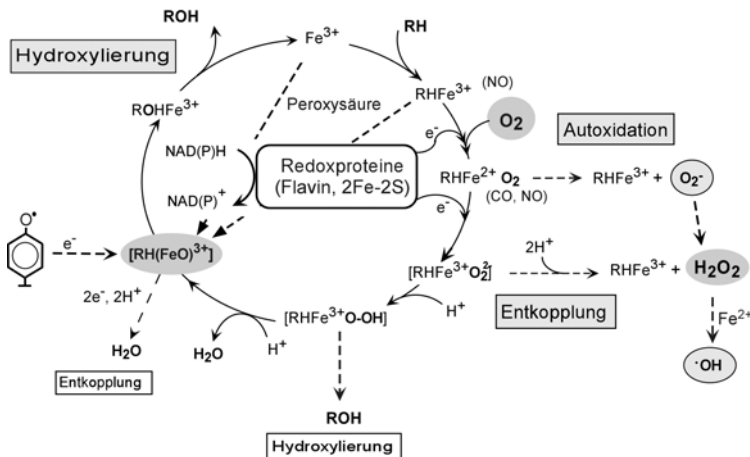


Abb. 2: Reaktionszyklus des Cytochrom P450 (RH, Substrat; ROH, Produkt; Fe, Hämkomplex).

Abbildung 2 zeigt den Reaktionszyklus des Cytochrom P450.

Zu Beginn des katalytischen Zyklus liegt das Hämeisen als dreiwertiges Eisen im Low-Spin-Zustand vor. Im zweiten Schritt bindet sich das Substrat und das Eisen geht in den High-Spin-Zustand über, wie bereits oben erwähnt. Nun kann das Eisen ein Elektron aufnehmen, welches über Redoxproteine (Flavinprotein, Eisen-Schwefel-Protein) vom Elektronendonator NAD(P)H zum Cytochrom P450 transferiert wird. Das zweiwertige Eisen ist nun in der Lage, molekularen Sauerstoff zu binden. In dem nächsten Schritt wird dann bei gleichzeitigem Protonentransfer ein weiteres Elektron zum Häm übertragen. Dadurch werden eine Reihe von Folgereaktionen ausgelöst, deren Intermediate bisher nicht eindeutig charakterisiert werden konnten. Eines der wichtigsten Intermediate ist die vermutete Eisen-Oxo-Spezies, die das Sauerstoffatom direkt auf das Substrat übertragen soll und damit das Hydroxylierungsprodukt bildet. Neuere Untersuchungen legen nahe, dass auch Hydroxylierungen durch die Peroxy- bzw. Hydroperoxy-Spezies möglich sind. In dem letzten Schritt dissoziiert das Produkt dann ab und das Cytochrom P450 steht nun wieder in seinem Ausgangszustand für den nächsten katalytischen Zyklus zur Verfügung. Man erkennt, dass die entscheidenden katalytischen Prozesse am Hämeisen in der so genannten Hämtasche des Cytochrom P450 stattfinden, d.h. dass die Cytochrom P450-Katalyse eigentlich eine Hämkatalyse darstellt. Die Effektivität der Substratumwandlung wird jedoch durch Seitenreaktionen gemindert. Bereits auf der Ebene des Sauerstoffkomplexes beobachten wir eine erste Seitenreaktion; die autoxidative Abgabe des Superoxidationradikals O_2^- unter Rückbildung des dreiwertigen Eisens. Man hat vor vielen Jahren an verschiedenen Cytochromen P450 beobachtet, dass Wasserstoffperoxid (H_2O_2) ebenfalls als Nebenprodukt auftritt [12–14], das entweder durch Dismutation des freigesetzten O_2^- entsteht oder direkt vom Eisen abdissoziiert, und dass das Ausmaß dieser Seitenreaktion mit der Natur des Substrates zusammenhängt. Kürzlich konnten wir erstmals eine weitere Seitenreaktion nachweisen, die durch die intermediäre Eisen-Oxo-Spezies ausgelöst wird; nämlich die Bildung von Proteinradikalen. Ein Aspekt der Forschung in meiner Arbeitsgruppe ist zu verstehen, welche strukturellen Eigenschaften des Proteins und des Substrates zu diesen Seitenreaktionen führen. Das ist von unmittelbarem Interesse für das Verstehen der Funktionsweise von Cytochromen P450 im menschlichen Organismus, denn O_2^- , H_2O_2 als auch Proteinradikale sind der Ursprung weiterer Prozesse, die für die lebende Zelle toxisch sind bzw. als Signalmoleküle in die Zellregulation eingehen.

3. Analyse des strukturellen Verhaltens des Cytochrom P450 mittels physikalischer Methoden

Um diesen Zusammenhang auf molekularer Ebene zu erklären, bedarf es anspruchsvoller physikalischer, insbesondere spektroskopischer Methoden, die es uns erlauben, strukturelle und elektronische Eigenschaften des Proteins und des gebundenen Hämkomplexes zu untersuchen. In der Abbildung 3 sind die wichtigsten Methoden zusammengefasst und schematisch den erfassbaren Bereichen des Proteins zugeordnet.

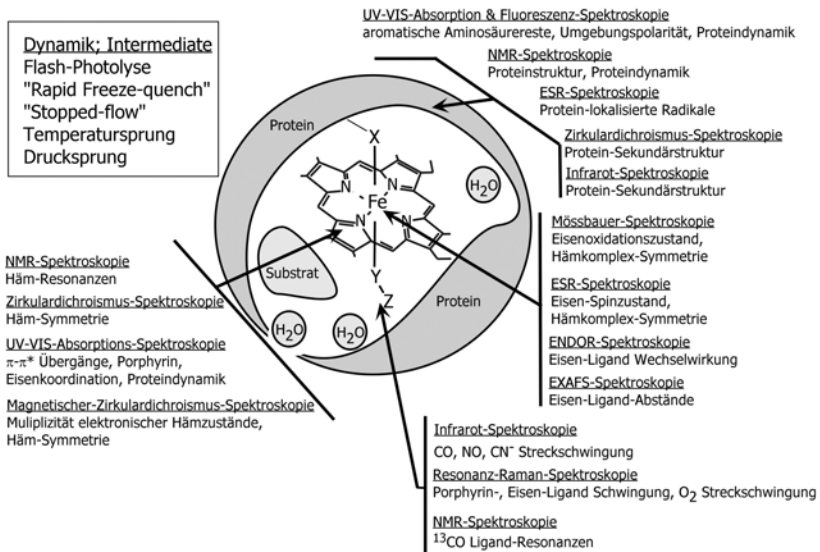


Abb. 3: Physikalische Methoden zur Charakterisierung der Hämproteine, X stellt den proximalen Hämliganden dar, der im Cytochrom P450 durch den negativ geladenen Schwefel eines Cysteins gebildet wird. Y-Z repräsentiert den distalen Hämliganden, der im Laufe des Reaktionszyklus wechseln kann. Für viele Untersuchungen bildet Kohlenmonoxid als Y-Z ein wichtiges Sondenmolekül, das es erlaubt, Struktureigenschaften des Protein-Substrat-Komplexes zu charakterisieren.

Die Daten, die die verschiedenen spektroskopischen Methoden liefern, werden wie ein Puzzle zusammengesetzt und ergeben ein Gesamtbild. In meiner Arbeitsgruppe haben wir insbesondere die Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie (FTIR) mit einer Reihe von zusätzlichen Techniken etabliert [15]. Damit sind wir einer der wenigen Labore in Deutschland, die FTIR-Untersuchungen an Proteinen unter vielfältigen Aspekten der Strukturveränderung

durch Temperatur, Druck und als Funktion der Zeit durchführen können. Mit der FTIR-Spektroskopie erhalten wir Informationen über das Schwingungsverhalten des Proteins und können über die Absorptionsbanden spezifischer Atomgruppen als Sonde in bestimmte Bereiche des Proteins schauen. Durch Variation der Temperatur zwischen Raumtemperatur und 100°C erhalten wir Aussagen über die strukturelle Stabilität des Proteins [16]. Dagegen durch Abkühlen bis zu -253°C können wir kleinere Strukturveränderungen, die für die Dynamik des Proteins wichtig sind, studieren [17]. Durch Veränderung des hydrostatischen Drucks bis in den Bereich von 10 kbar können wir Informationen über die Kompressibilität des Proteins erhalten [18]. Wir haben die FTIR-Spektroskopie mit einem Flashphotolyse-System gekoppelt [19]. Durch einen Laserlichtimpuls der Dauer von nur 5 Nanosekunden wird die Bindung zwischen dem Eisen und dem axialen Liganden (Abbildung 3) aufgebrochen und der Ligand verlässt das Protein. Als Liganden benutzen wir Kohlenmonoxid (CO) als Sondenmolekül, das sich an die gleiche Position bindet wie molekularer Sauerstoff im natürlichen Reaktionszyklus (Abbildung 2). Nach Abklingen des Impulses wandert das CO Molekül wieder zurück zum Eisen und wir können mittels der Step-Scan-Technik des FTIR-Spektrometers die Zeitabhängigkeit der Rückbindung im Nano- bis Millisekundenbereich verfolgen und erhalten dabei vollständige Absorptionsspektren für jeden Zeitpunkt [19]. Dadurch sind wir in der Lage, sowohl die Kinetik als auch die in den Prozess involvierten Strukturveränderungen zu analysieren. Neben der FTIR-Spektroskopie liefert uns die UV-VIS-Elektronenabsorptions-Spektroskopie weitere Informationen insbesondere über den bereits oben beschriebenen High-Spin-Gehalt [20]. Mit diesen beiden Methoden haben wir den Zustand des Cytochrom P450 in den einzelnen Schritten im Reaktionszyklus bis hin zur Sauerstoffbindung analysiert.

Für die Analyse der folgenden Schritte müssen andere Techniken eingesetzt werden, die wir durch enge Kooperation mit verschiedenen Arbeitsgruppen nutzen. Hierbei sind wir insbesondere daran interessiert, die Natur des kurzlebigen Eisen-Oxo-Intermediates aufzuklären, weil der Mechanismus der Einführung des Sauerstoffatoms in das Substrat von der elektronischen Struktur dieser Spezies abhängt. Die Eisen-Oxo-Spezies kann in einem verkürzten Weg (Abbildung 2) durch Reaktion des Cytochrom P450 in der dreiwertigen Form mit einer Peroxysäure erzeugt werden. Da diese Spezies sehr kurzlebig ist, darf die Reaktionszeit nur wenige Millisekunden betragen und das erzeugte Intermediat wird durch die so genannte „Freeze-Quench“-Technik sofort eingefroren. Im eingefrorenen Zustand wird das Intermediat dann

mittels der Mößbauer-Spektroskopie und der ESR-Spektroskopie analysiert. Die Mößbauerspektroskopie gibt uns Informationen über den Oxidationszustand des Hämeisens, während die ESR-Spektroskopie Aussagen über den Spin-Zustand des Eisens und über die Bildung organischer Radikale liefert.

4. Struktur-Funktions-Beziehungen im Cytochrom P450

4.1. Die Bildung von Wasserstoffperoxid im Reaktionszyklus des Häms im Cytochrom P450 ist ein Ausdruck einer verstärkten Wasserzugänglichkeit der Hämtasche infolge einer flexiblen Proteinstruktur.

Die Bestimmung funktioneller Parameter ist in den meisten Fällen einfach und eindeutig. Die Bildung von Wasserstoffperoxid kann durch etablierte colorimetrische Methoden bestimmt werden. Das Hydroxylierungsprodukt des Substrates wird mit Gaschromatographie und Massenspektrometrie nachgewiesen. Die Analyse des Strukturverhaltens des Cytochrom P450 jedoch gestaltet sich als wesentlich schwieriger, da Struktureigenschaften sich nur mittelbar über spektroskopische Sonden offenbaren. Man muss deshalb viele experimentelle und theoretische Untersuchungen auch an anderen Proteinen oder Modellverbindungen durchführen, um beurteilen zu können, welche Eigenschaften sich in der Sonde reflektieren. Uns ist es erstmals gelungen, die FTIR-spektroskopischen Sonden für das Cytochrom P450 interpretierbar zu machen und für Struktur-Funktions-Studien zu nutzen [21,22].

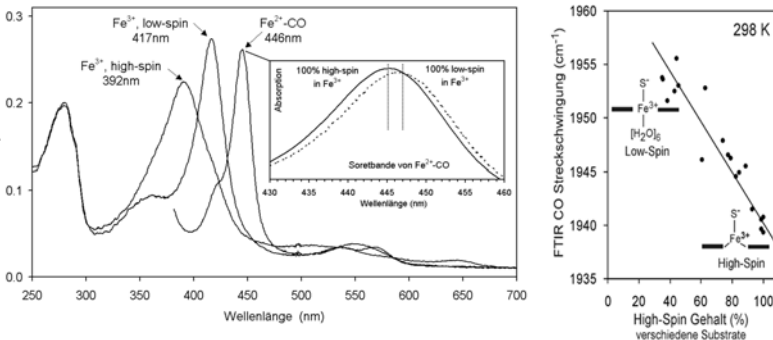


Abb. 4: UV-VIS-Absorptionsspektren für das Cytochrom P450cam im Low-Spin-Zustand (substratfrei) und High-Spin-Zustand (Kampher-gebunden) in der Fe(III)-Form und im CO-Komplex (links) und FTIR-CO-Streckschwingung als Funktion des High-Spin-Gehaltes für verschiedene Substratkomplexe (rechts) von Cytochrom P450cam [21].

Im Jahre 1985 wurde von Poulos und Mitarbeitern [23] die dreidimensionale Kristallstruktur des Cytochrom P450cam als die erste Struktur eines Cytochrom P450 Proteins gelöst. Die kurze Zeit später publizierte Struktur des substratfreien Proteins [24] bestätigte die aus NMR-Experimenten [25] gemachte Vermutung, dass das substratfreie Enzym viele Wassermoleküle in der Hämtasche aufweist und eines davon sich an das Hämeisen bindet. Diese Wassermoleküle sind für den Low-Spin-Zustand des Hämeisens verantwortlich, was an der Soretbande des Häms nachgewiesen wurde (Abbildung 4).

Das Substrat Kampher verdrängt diese Wassermoleküle und das Eisen geht in den High-Spin-Zustand über, was wiederum durch die Verschiebung der Soretbande verifiziert wurde. Große Probleme bereitete jedoch zu verstehen, wie es kommt, dass durch die Bindung von anderen Substraten eine vollständige Überführung in den High-Spin-Zustand nicht möglich ist, d.h. ein High-Spin-Gehalt kleiner als 100 % entsteht. Dieses Puzzle konnten wir nun durch eine Vielzahl von Untersuchungen mit den verschiedenen oben erwähnten Techniken zusammenfügen. Es stellt sich heraus, dass der High-Spin-Gehalt einen dynamischen Zustand der Proteinstruktur beschreibt. Ist die Proteinstruktur sehr flexible und kann nicht ausreichend durch die Bindung eines Substrates verfestigt werden, dann gibt es einen ständigen Austausch von Wassermolekülen zwischen der Hämtasche und dem äußeren Lösungsmittel. Es stellt sich ein dynamisches Gleichgewicht ein und der High-Spin-Gehalt kann als Maß für eine mittlere Aufenthaltsdauer von Wassermolekülen interpretiert werden. Je kleiner der High-Spin-Gehalt ist, um so länger halten sich im zeitlichen Mittel die Wassermoleküle in der Hämtasche auf. Wir konnten nun zeigen, dass dieses Phänomen nicht nur auftritt, wenn das Eisen in der dreiwertigen Form vorliegt, also zu Beginn des Reaktionszyklus, sondern sich durch den ganzen Reaktionszyklus hindurchzieht. Dieser Sachverhalt schlägt sich in Korrelationen vieler physikalischer Parameter wie der Streckschwingungsfrequenz des CO Liganden und der Position der Soretbande des P450-CO-Komplexes (Abbildung 4) [21], der Geschwindigkeitskonstante der CO-Rückbindung nach Flashphotolyse [19] und in Stopped-Flow-Experimenten [26], der Wiedereinlagerung von Wassermolekülen in die Proteinstruktur nach einem Temperatursprung [27], der Kompressibilität der Proteinstruktur [28] und der Beweglichkeit des Substrates im aktiven Zentrum [27] mit dem high-spin-Gehalt nieder. Mit Hilfe der Streckschwingung des CO-Liganden als Sondenmolekül fanden wir heraus, dass durch eine verstärkte Wassereinlagerung spezifische polare Kontakte zwischen dem Sauerstoffliganden und Aminosäuren des Proteins verlorengehen [29],

die für den spezifischen Protonentransport zum Sauerstoff erforderlich sind. Die Konsequenz ist eine unspezifische Protonenanlagerung aus dem Wasser und der Abdissoziation des Sauerstoffs als Wasserstoffperoxid (Abbildung 2). Somit ist das Ausmaß der Wasserstoffperoxidbildung als Seitenreaktion eine Folge der erhöhten strukturellen Dynamik des Cytochrom P450-Substratkomplexes (Abbildung 5) zu verstehen [29,30].

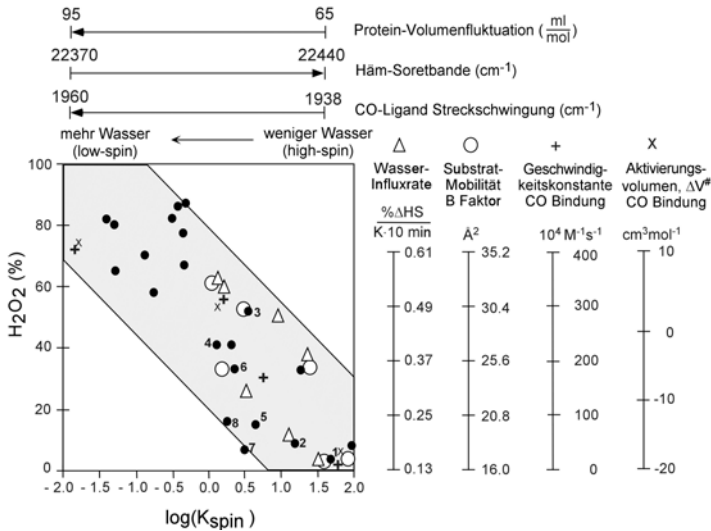


Abb. 5: Kreuzkorrelation der Bildung von Wasserstoffperoxid (H₂O₂) (●) im natürlichen Reaktionszyklus von Cytochrom P450cam für verschiedene Substrat-Komplexe für Wildtyp-P450cam und Mutanten, die im Fe(III)-P450cam unterschiedliche High-Spin-Gehalte (HS) erzeugen, mit physikalischen Parametern für die strukturelle Charakterisierung der Protein-Substrat-Komplexe [29]. Gleichgewichtskonstante für das Spin-Gleichgewicht $K_{spin} = HS / (1 - HS)$, Wasser-Influxrate: prozentualer Verlust von HS bei schneller Abkühlung bezogen auf 1 Grad und einer Zeit von 10 Minuten [27], Substrat-Mobilität angegeben als B-Faktor des Substrates in der Kristallstruktur des P450cam-Substratkomplexes [27]. Geschwindigkeitskonstante der Bindung von CO an das Hämeisen in den P450cam-Substratkomplexen, bestimmt aus Flashphotolyse- und Stopped-Flow-Daten [19,26]. Aktivierungsvolumen $\Delta V^{\#}$ für die CO-Bindung: bestimmt aus der Druckabhängigkeit der Geschwindigkeitskonstante der CO-Bindung [26], Protein-Volumenfluktuation bestimmt aus der Druck-induzierten Verschiebung der Soret-Bande des P450cam-CO-Komplexes [28], Position der Soret-Bande und der CO-Streckschwingungsfrequenz für verschiedene P450cam-Substratkomplexe [21].

4.2. Die räumliche Nähe von Tyrosin zum Häm führt in der Eisen-Oxo-Spezies zum intramolekularen Elektronentransfer und erzeugt ein Proteinradikal.

Die strukturelle Dynamik des Protein-Substratkomplexes hat aber auch eine weitere Konsequenz, die wir bisher nur in Ansätzen verstehen. Man stelle sich vor, es wird ein Handballspiel mit dem einzigen Ziel ausgetragen, dass ein spezifischer Spieler einen Ball von einer bestimmten Stelle aus an sich reißt und das Spielfeld so schnell wie möglich verlässt. Das Spielfeld ist eine Fläche mit zwei dicht beieinander liegenden Löchern. In dem einen Loch befindet sich der Spielball und in dem anderen Loch eine klebrige Flüssigkeit. In verschiedenen Abständen von diesen Löchern stehen Eimer mit kleineren Bällen. Alle anderen Spieler sind Gegner des spezifischen Spielers und müssen versuchen, aus den Eimern einen Ball zu entnehmen und in das Loch mit der klebrigen Flüssigkeit zu werfen. Sobald das erreicht ist, läuft die Flüssigkeit in das andere Loch und klebt den Spielball fest und der spezifische Spieler kann den Ball nicht mehr an sich nehmen. Wovon hängt es nun ab, ob der spezifische Spieler Erfolg hat oder nicht? Sicherlich hängt es davon ab, wie schnell der spezifische Spieler zum Spielball laufen und ihn in die Hand nehmen kann. Andererseits werden die Gegenspieler ihrerseits um so schneller einen Ball aus einem Eimer nehmen und zum Loch mit der Flüssigkeit bringen können, je dichter die Eimer an dem Loch stehen und die Gegenspieler rennen können. Analog verhält es sich mit unserer Eisen-Oxo-Spezies im Cytochrom P450. Das Substrat muss das Sauerstoffatom vom Eisen wegfangen und dann als Hydroxylierungsprodukt schnell die Hämtasche des Proteins verlassen. Es kann das Sauerstoffatom aber nur wegreißen, wenn der Porphyrinring im Häm ein Kationradikal ist. Befindet sich nun in der Nähe des Häms ein Tyrosin, das durch Elektronenabgabe das Porphyrinkationradikal neutralisiert, dann kann das Sauerstoffatom nicht mehr an das Substrat abgegeben werden. Das entstandene Tyrosinradikal ist aber hoch reaktiv und kann eine Reihe anderer Reaktionen auslösen, z.B. die Erzeugung von OH-Radikalen, die wiederum toxisch für die lebende Zelle sind. In der Tat ist es uns als Erste kürzlich gelungen, mittels der Mößbauer-Spektroskopie und der ESR-Spektroskopie bei verschiedenen Frequenzen (9,6, 94, 190 und 285 GHz) in enger Kooperation mit der Universität Lübeck, Institut für Physik (Prof. A.X. Trautwein und PD Dr. V. Schünemann), der Technischen Universität Berlin, Max-Volmer-Institut (Dr. F. Lenzian) und dem Grenoble High Magnetic Field Laboratory, CNRS, Frankreich (Dr. A.-L. Barra) den Oxidationszustand des Eisens (Fe(IV), [31].) und die Bildung eines Tyrosinradikals in der

Eisen-Oxo-Spezies des Cytochrom P450cam nachzuweisen [32]. In Kombination mit Verfahren zur mathematischen Simulation der Spektren und zum Austausch von spezifischen Tyrosinen mittels gentechnischer Methoden ordneten wir das ESR-Signal eindeutig einem spezifischen Tyrosin in der dreidimensionalen Struktur des Proteins zu (Y96 im Wildtyp bzw. Y75 in der Y96F-Mutante des P450cam) [33] (Abbildung 6).

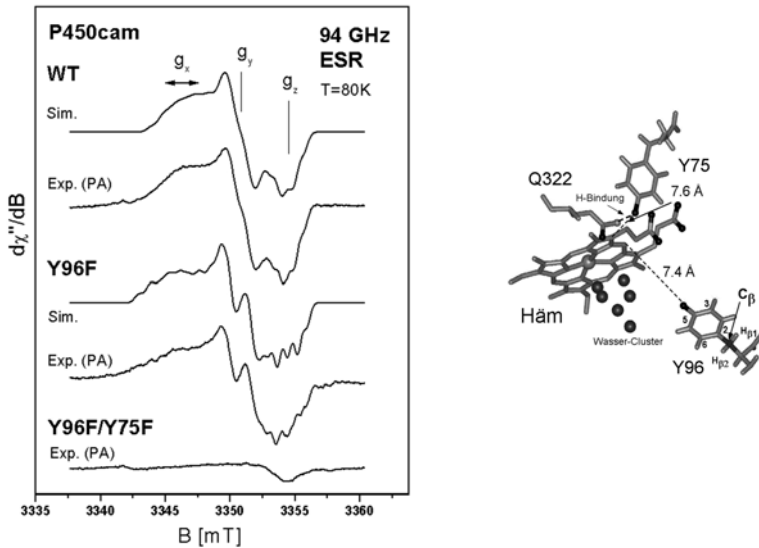


Abb. 6: 94-GHz-ESR-Spektrum des Tyrosinradikals in der Eisen-Oxo-Spezies im Cytochrom P450cam (links), erzeugt durch eine 8ms-Reaktion von Fe(III)-P450cam mit Peroxyessigsäure (PA) und „freeze-quenched“ bei -110°C in Isopentan [33]. Exp., experimentelles Spektrum, Sim., simuliertes Spektrum, WT, Wildtyp P450cam, Y96F, Mutante, bei der das Tyrosin 96 durch Phenylalanin ersetzt ist, Y96F/Y75F, Doppelmutante, bei der die Tyrosine 96 und 75 durch Phenylalanine ersetzt sind. (rechts): Häm und die relevanten Häm-nahen Tyrosine im P450cam.

Nach Entfernen der Häm-nahen Tyrosine beobachten wir auch kein Tyrosinradikalsignal mehr im ESR-Spektrum. Zu unserer großen Überraschung konnten wir aber auch kein Porphyrinkationradikal nachweisen. Offensichtlich gibt es noch weitere Möglichkeiten, das Porphyrinradikal zu neutralisieren, oder – und das wäre sehr bedeutungsvoll – die seit 30 Jahren existierende Theorie eines intermediären Porphyrinradikals in der Eisen-Oxo-Spezies des Cytochrom P450 ist nicht korrekt. Welche der Varianten auch zutrifft, den konkurrierenden Kampf um das Sauerstoffatom kann das Substrat häufig nicht gewinnen, mit der schlimmen Folge, dass andere reaktive Spezies ent-

stehen, die für die lebende Zelle sehr ungünstig sein können. Die konkrete Struktur und Dynamik der Cytochrom P450-Proteine im Komplex mit ihren Substraten kann ihre Aufgabe zum Abbau der Substrate (z.B. Arzneimittel) erfüllen oder dafür sorgen, dass der Reaktionszyklus im Leerlauf arbeitet und nur „Abgase“ erzeugt.

5. Schelers Vision von der Variabilität der Funktion des Häms in den verschiedenen Hämproteinen und die aktuelle Erkenntnis ihrer Rolle in der Regulation von Zellfunktionen

„Eines der interessantesten Probleme der Biochemie ist zweifelsohne die Variabilität der Funktion von Hämoproteiden. In einer relativ eng verwandten Klasse von Stoffen, die sich durch gleiche prosthetische Gruppen auszeichnen, vermögen unterschiedliche Proteinkomponenten einen erheblichen Funktionswandel zu bewirken. So reicht die biologische Funktion der Hämoproteide vom Hämoglobin als Sauerstoffüberträger einerseits hinüber zu katalytischen, peroxydatischen und Redox-Biokatalysatoren andererseits.“

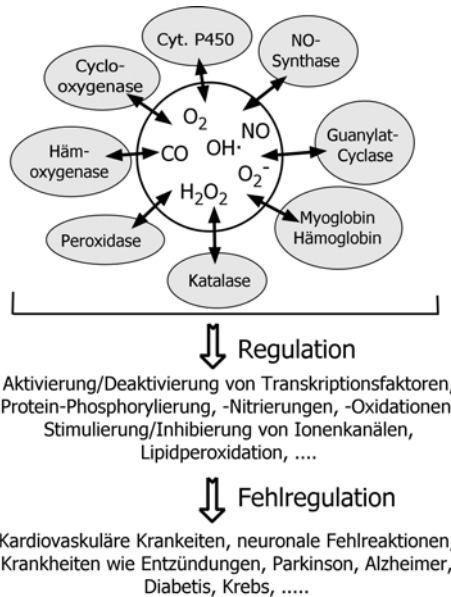


Abb. 7: Auswahl wichtiger Hämproteine, die kleine Signalmoleküle als Liganden binden oder erzeugen, die für die Regulation vieler Zellreaktionen wichtig sind. Fehlregulation durch erhöhte oder erniedrigte Konzentrationen der Signalmoleküle führen zu Krankheiten.

Diese von Scheler vor mehr als 45 Jahren in seiner Schrift [34] niedergelegte Vision ist niemals so aktuell gewesen wie heute. Viele Hämproteine waren zu jener Zeit noch nicht bekannt, so auch das Cytochrom P450. Heute wissen wir, dass die vielen kleinen Moleküle, die als Hämliganden fungieren oder am Hämeisen erzeugt und an die Umgebung abgegeben werden, wichtige Signalmoleküle für die Zellregulation darstellen (Abbildung 7).

Das oben beschriebene Wasserstoffperoxid ist in hohen Konzentrationen zytotoxisch [35] und wird über Katalasen entfernt [36]. Peroxidasen nutzen Wasserstoffperoxid für Substratumwandlungen [37]. In geringen Konzentrationen ist H_2O_2 aber ein essentielles Signalmolekül z.B. für vaskuläre Relaxation durch Stimulierung der Expression der löslichen Guanylat-Cyclase (sGC) oder für die Stimulierung von Proteinphosphorylierungen [38, 39]. Das „giftige“ Kohlenmonoxid, ein hervorragender Hämligand, ist ein Produkt der Hämoxygenase und geht als Signalmolekül in die Regulation von Transkriptionsprozessen ein und stimuliert auch die Aktivität der sGC [40,41,42]. Die mit dem Nobel-Preis gewürdigte Entdeckung, dass das kleine NO-Molekül als ein typischer Ligand für das Hämeisen den „endothelium-derived relaxing factor (EDRF)“ darstellt [43] und auch als Neurotransmitter wirkt [44], hat unser Verständnis für die funktionelle Bedeutung der Hämproteine revolutioniert. Das dieses Signalmolekül erzeugende Enzym ist die NO-Synthase, in der das Häm eine ähnliche Koordinationssphäre hat wie das Cytochrom P450 obwohl die dreidimensionale Struktur verschieden ist [45,46]. Die insbesondere für das Cytochrom P450 bekannte merkliche Freisetzung des Superoxidaniums (O_2^-) kann mit NO zu dem zytotoxischen Peroxynitrit reagieren [47]. Die Folge sind Oxidationen und Nitrierungen von Tyrosinen mit verheerenden Folgen für die Funktion von vielen Proteinen [48]. Die Hämgruppe der sGC fängt mit hoher Affinität NO ab. Dadurch wird die katalytische Kapazität der sGC für die Umwandlung von Guanodin-Triphosphat zu zyklischem Guanodin-Monophosphat um etwa das 200-fache erhöht, was die Regulation von Ionenkanälen und damit die Zellfunktion beeinflusst [49]. Selbst die Myoglobine und Hämoglobine, seit den siebziger Jahren als weitgehend funktionell und strukturell verstanden und als „langweilig“ angesehen, erfreuen sich einer bemerkenswerten Renaissance in der aktuellen Forschung, nach dem ihr Beitrag zur Zellregulation durch ihre spezifische Wechselwirkung mit NO und ihre Radikaltransferfunktion erkannt wurden [50,51]. Die intermediäre Eisen-Oxo-Spezies, die durch Wechselwirkung von Sauerstoffspezies wie O_2 , O_2^- und H_2O_2 mit fast allen Hämproteinen entsteht, ist die Quelle von Proteinradikalen [52], was wiederum funktionelle

Konsequenzen hat. Für das Cytochrom P450 haben wir Proteinradikale erstmals nachgewiesen und eindeutig strukturell zugeordnet [31–33].

Wir müssen uns fragen, ob wir der Vielfältigkeit der Funktion der Cytochrome P450 wirklich voll Rechnung tragen, wenn wir „nur“ die biosynthetische und biotransformatorische Aufgabe für die diversen endogenen und exogenen organischen Stoffe betrachten. Wir stehen erst am Anfang, den Beitrag der Cytochrome P450 zur Häm-basierten Erzeugung und Umwandlung kleiner Signalmoleküle zu verstehen (Abbildung 2).

So treffen sich heute aktuelle Forschungsfelder, die einerseits die biologischen Zellen als komplexe Regulationsmodule betrachten, mit biophysikalischen Untersuchungen zur Struktur und Protein-Ligand-Wechselwirkung unter Einsatz klassischer und moderner anspruchsvoller physikalischer Techniken. Der Jubilar hat mit seinen frühen physikalischen Untersuchungen „Über die Zusammenhänge zwischen Lichtabsorption und paramagnetischer Suszeptibilität bei Methämoglobin-Komplexen“ [1] dazu Bäumchen gepflanzt, die inzwischen zu kräftigen Baumbeständen herangewachsen sind. Ein Blick in die Baumwipfel lässt die Weite des Himmels erkennen, wo neue Erkenntnisse wie Vögel durch die Lüfte gleiten.

Lieber Jubilar,

80 Lebensjahre eines aktiven und kreativen Forschers und Wissenschaftsorganisations verlangen Respekt und Dankbarkeit von der folgenden Wissenschaftlergeneration. Häufig geben erst Jubiläen wie dieses Anlass, solche Erkenntnis zu reflektieren. Ich möchte daher die Gelegenheit nehmen, die frühen wissenschaftlichen Beiträge des Jubilars zur Häm-katalyse und damit zur Cytochrom P450 Forschung nochmals würdigend hervorzuheben.

Für die weiteren Aktivitäten wünsche ich dem Jubilar Gesundheit, viel Kraft und Freude und ich glaube, dass ich damit auch im Namen meiner ehemaligen Kollegen der Abteilung Häm-katalyse gesprochen habe.

Literatur

1. Scheler, W., Schoffa, G., Jung, F. (1956) „Über Zusammenhänge zwischen Lichtabsorption und paramagnetischer Suszeptibilität bei Methämoglobin-Komplexen“, *Die Naturwissenschaften* 43, 159–160.
2. Scheler, W., Blanck, J., Graf, W. (1963) „Thermische Gleichgewichte bei Methämoglobin-Komplexen“, *Die Naturwissenschaften* 50, 500–501.
3. Beetlestone, J.G., George, P. (1964) „A magnetochemical study of equilibria between high and low spin states of metmyoglobin complexes“, *Biochemistry* 3,

- 707–714.
4. Sligar, S.G. (1976) „Coupling of spin, substrate and redox equilibria in cytochrome P450“, *Biochemistry* 15, 5399–5406.
 5. Rein, H., Ristau, O., Friedrich, J., Jänig, G.R., Ruckpaul, K. (1976) „Evidence of the existence of a high spin low spin equilibrium in liver microsomal cytochrome P450 and its role in the enzymatic mechanism“ in: *Proceedings of the Conference „Cytochrome P450 – Structural Aspects“*, Primosten, Yugoslavia.
 6. Rein, H., Ristau, O., Friedrich, J., Jänig, G.R., Ruckpaul, K. (1977) „Evidence of the existence of a high spin low spin equilibrium in liver microsomal cytochrome P450 and its role in the enzymatic mechanism“, *Croatica Chem. Acta* 49, 251–261.
 7. Tsai, R.L., Yu, C.A., Gunsalus, I.C., Peisach, J., Blumberg, W.E., Orme-Johnson, W.H., Beinert, H. (1970) „Spin state changes in cytochrome P450cam on binding of specific substrates“, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 66, 1157–1163.
 8. Peterson, J.A. (1971) „Camphor binding by *Pseudomonas putida* cytochrome P-450“, *Arch. Biochem. Biophys.* 144, 678–693.
 9. Daly, A.K. (2003) „Pharmacogenetics of the major polymorphic metabolizing enzymes“, *Fundamental & Clinical Pharmacology* 17, 27–41.
 10. Lipp, H.-P. (1999) „Klinische Bedeutung der Cytochrom-P450-Isoenzyme bei Arzneimittelinteraktionen“, *Krankenhauspharmazie* 20, 465–475.
 11. Katagiri, M., Ganguli, B.N., Gunsalus, I.C. (1968) „A soluble cytochrome P-450 functional in methylene hydroxylation“, *J. Biol. Chem.* 243, 3543–3546.
 12. Nordblom, G.D., Coon, M.J. (1977) „Hydrogen peroxide formation and stoichiometry of hydroxylation reactions catalyzed by highly purified liver microsomal cytochrome P-450“, *Arch. Biochem. Biophys.* 180, 343–347.
 13. French, K.J., Rock, A.A., Rock, D.A., Manchester, J.I., Goldstein, B.M., Jones, J.P. (2002) „Active site mutations of cytochrome P450cam alter the binding, coupling, and oxidation of the foreign substrates (R)- and (S)-2-ethylhexanol“, *Arch. Biochem. Biophys.* 398, 188–197.
 14. Hanukoglu, I., Rapoport, R., Weiner, L., Sklan, D. (1993) „Electron leakage from the mitochondrial NADPH-adrenodoxin reductase-adrenodoxin-P450_{scc} (cholesterol side chain cleavage) system“, *Arch. Biochem. Biophys.* 305, 489–498.
 15. Jung, C. (2000) „Insight into protein structure and protein-ligand recognition by Fourier transform infrared spectroscopy“, *J. Mol. Recognition* 13, 325–351.
 16. Mouro, C., Jung, C., Bondon, A., Simonneau, G. (1997) „Comparative Fourier transform infrared studies of the secondary structure and the CO heme ligand environment in cytochrome P-450cam and cytochrome P-420cam“, *Biochemistry* 36, 8125–8134.
 17. Jung, C., Marlow, F. (1987) „Dynamic behavior of the active site structure in bacterial cytochrome P-450“, *Studia Biophysica* 120, 241–251.
 18. Jung, C. (2002) „Cytochrome P450-CO: lessons from ligand binding under high pressure“, *Biochim. Biophys. Acta* 1595, 309–328.

19. Contzen, J., Jung, C. (1998) „Step-scan time-resolved FTIR spectroscopy of cytochrome P-450cam carbon monoxide complex: A salt link involved in the ligand rebinding process“, *Biochemistry* 37, 4317–4324.
20. Jung, C., Ristau, O., Rein, H. (1991) „The high-spin/low-spin equilibrium in cytochrome P-450 – a new method for determination of the high-spin content“, *Biochim. Biophys. Acta* 1076, 130–136.
21. Jung, C., Schulze, H., Deprez, E. (1996) „The role of the polarity of the heme environment for the CO stretch modes in cytochrome P-450cam-CO“, *Biochemistry* 35, 15088–15094.
22. Jung, C., Stuehr, D., Ghosh, D.K. (2000) „FT-infrared spectroscopic studies of the iron ligand CO stretch mode of iNOS oxygenase domain: Effect of arginine and tetrahydrobiopterin“, *Biochemistry* 39, 10163–10171.
23. Poulos, T.L., Finzel, B.C., Gunsalus, I.C., Wagner, G.C., Kraut, J. (1985) „The 2.6-Å crystal structure of *Pseudomonas putida* cytochrome P-450“, *J. Biol. Chem.* 260, 16122–16130.
24. Poulos, T.L., Finzel, B.C., Howard, A.J. (1986) „Crystal structure of substrate-free *Pseudomonas putida* cytochrome P-450“, *Biochemistry* 25, 5314–5322.
25. Philson, S.B., Debrunner, P., Schmidt, G., Gunsalus, I.C. (1979) „The effect of cytochrome P-450cam on the NMR relaxation rate of water protons“, *J. Biol. Chem.* 254, 10173–10179.
26. Jung, C., Bec, N., Lange, R. (2002) „Substrates modulate the rate-determining step for CO binding in cytochrome P450cam (CYP101): A high-pressure stopped-flow study“, *Eur. J. Biochem.*, 269: 2989–2996
27. Schulze, H., Hui Bon Hoa, G., Jung, C. (1997) „Mobility of norbornane-type substrates and water accessibility in cytochrome P-450cam“, *Biochim. Biophys. Acta*, 1338,77–92.
28. Jung, C., Hui Bon Hoa, G., Davydov, D., Gill, E., Heremans, K. (1995) „Compressibility of the heme pocket of substrate analogue complexes of cytochrome P450cam-CO: The effect of hydrostatic pressure on the Soret band“, *Eur. J. Biochemistry* 233, 600–606.
29. Jung, C., Kozin, S.A., Canny, B., Chervin, J.-C., Hui Bon Hoa, G. (2003) „Compressibility and uncoupling of cytochrome P450cam: High pressure FTIR and activity studies“, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 312, 197–203.
30. Jung, C. (1999) „Strukturdynamik und Konformationssubzustände in Proteinen – das Enzym Cytochrom P450“, Habilitationsschrift, Universität Potsdam.
31. Schünemann, V., Jung, C., Trautwein, A.X., Mandon, D., Weiss, R. (2000) „Intermediates in the reaction of substrate-free cytochrome P450cam with peroxyacetic acid“, *FEBS Letters* 479, 149–154.
32. Schünemann, V., Jung, C., Terner, J., Trautwein, A.X., Weiss, R. (2002) „Spectroscopic studies of peroxy acetic acid reaction intermediates of cytochrome P450cam and chloroperoxidase“, *J. Inorg. Biochem.* 91, 586–596.

33. Schünemann, V., Lenzian, F., Jung, C., Contzen, J., Barra, A.-L., Sligar, S.G., Trautwein, A.X. (2004) „Tyrosine radical formation in the reaction of wild type and mutant cytochrome P450cam with peroxy acids: A multifrequency EPR study of intermediates on the millisecond time scale“, *J. Biol. Chem.* 279, 10919–10930.
34. Scheler, W. (1957/58) „Über die Komplexaffinität des Eisens in Hämoproteinen (Methämoglobin, Metmyoglobin)“, *Wiss. Z. der Humboldt-Universität zu Berlin* Jg. VII, Nr. 2.
35. Kocha, T., Yamaguchi, M., Ohtaki, H., Fukuda, T., Aoyagi, T. (1997) „Hydrogen peroxide-mediated degradation of protein: different oxidation modes of copper- and iron-dependent hydroxyl radicals on the degradation of albumin“, *Biochim. Biophys. Acta* 1337, 319–326.
36. Deisseroth, A., Dounce, A.L. (1970) „Catalase: Physical and chemical properties, mechanism of catalysis, and physiological role“, *Physiol. Rev.* 50, 319–375.
37. Hiner, A.N.P., Raven, E.L., Thorneley, R.N.F., Garcia-Cánovas, F., Rodríguez-López, J.N. (2002) „Mechanisms of compound I formation in heme peroxidases“, *J. Inorg. Biochem.* 91, 27–34.
38. Wolin, M.S. (2000) „Interactions of oxidants with vascular signaling systems“, *Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.* 20, 1430–1442.
39. Stones, J.R. (2004) „An assessment of proposed mechanisms for sensing hydrogen peroxide in mammalian systems“, *Arch. Biochem. Biophys.* 422, 119–124.
40. Ryter, S.W., Tyrrell, R.M. (2000) „The heme synthesis and degradation pathways: role in oxidant sensitivity“, *Free Radical Biology & Medicine* 28, 289–309.
41. Dulak, J., Józkwicz, A. (2003) „Carbon monoxide – a „new” gaseous modulator of gene expression“, *Acta Biochimica Polonica* 50, 31–47.
42. Clark, J.E., Naughton, P., Shurey, S., Green, C.J., Johnson, T.R., Mann, B.E., Foresti, R., Motterlini, R. (2003) „Cardioprotective Actions by a Water-Soluble Carbon Monoxide-Releasing Molecule“, *Circ. Res.* 93, e2–e8.
43. Palmer, R.M.J., Ferrige, A.G., Moncada, S. (1987) „Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor“, *Nature (London)* 327, 524–526.
44. Alderton, W.K., Cooper, C.E., Knowles, R.G. (2001) „Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition“, *Biochem. J.* 357, 593–615.
45. White, K.A., Marletta, M.A. (1992) „Nitric oxide synthase is a cytochrome P-450 type hemoprotein“, *Biochemistry* 31, 6627–6631.
46. Fischmann, T. O., Hruza, A., Niu, X. D., Fossetta, J. D., Lunn, C. A., Dolphin, E., Prongay, A. J., Reichert, P., Lundell, D. J., Narula, S. K. and Weber, P. C. (1999) „Structural characterization of nitric oxide synthase isoforms reveals striking active-site conservation“, *Nat. Struct. Biol.* 6, 233–242.
47. Davis, K.L., Martin, E., Turko, I.V., Murad, F. (2001) „Novel effects of nitric oxide“, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 41, 203–236.
48. Daiber, A., Schöneich, C., Schmidt, P., Jung, C., Ullrich, V. (2000) „Autocatalytic nitration of P450_{CAM} by peroxynitrite“, *J. Inorg. Biochem.* 81, 213–220.

49. Friebe, A., Koesling, D. (2003) „Regulation of Nitric Oxide–Sensitive Guanylyl Cyclase“, *Circ. Res.* 93:96–105.
50. Brunori, M., (2001) „Nitric oxide moves myoglobin centre stage“, *Trends in Biochem. Sci.* 26, 209–210.
51. Irvin, J.A., Østdal, H., Davies, M.J. (1999) „Myoglobin-induced oxidative damage: evidence for radical transfer from oxidized myoglobin to other proteins and antioxidants“, *Arch. Biochem. Biophys.* 362, 94–104.
52. Østdal, H., Andersen, H.J., Davies, M.J. (1999) „Formation of long-lived radicals on proteins by radical transfer from heme enzymes – a common process“, *Arch. Biochem. Biophys.* 362, 105–112.