

Tomasz Zemojtel

Dr. sc. hum.

Structural and functional properties of enzymes involved in the Nitric Oxide signaling network: mammalian NOS, NO-bound myoglobin and novel NOS systems

Geboren am 26.04.1975 in Gdansk, Polen

Diplom der Fachrichtung Informatik am 30.06.1999 an der Technischen Universität Danzig

Promotionsfach: Biochemie

Doktorvater: Prof. Dr. med. Thomas Dandekar

Der durch Stickstoffmonoxid (NO) vermittelte Signaltransduktionsweg ist einer des grundlegenden Signalwege im eukaryoten Organismus. Schon deshalb ist ein besseres Verständnis der strukturellen und funktionalen Eigenschaften der beteiligten Enzyme von starkem medizinischem Interesse. Diese Arbeit untersucht detailliert strukturelle Eigenschaften des stickstoffmonoxidbildenden Enzyms (Stickstoffmonoxid-Synthase, NOS), welche essentiell zu ihrer Aktivität beitragen. Im speziellen wird die Rolle des Calmodulin-Bindenden Proteins (Zemojtel *et al.*, 2003a) und der Zink-bindenden Cysteine an der Dimer-Schnittstelle untersucht (Scheele *et al.*, 2001) (Kapitel 4.1).

Weiterhin wird in der vorliegenden Arbeit experimentell nachgewiesen, dass Myoglobin eine Rolle als sehr effizienter NO-Fänger spielen kann (Zemojtel *et al.*, 2004b) (Kapitel 4.2). Die strukturellen Eigenschaften von Häm-Eisen, welches eine NO-Erkennungsfunktion in Häm-Proteinen einnimmt, werden mit den Methoden der Kurzzeit-IR-Spektroskopie und der Dichtefunktionaltheorie (DFT) untersucht. Eine große Spannweite des Fe-N-O Bindungswinkels in verschiedenen Häm-Proteinen spiegelt eine bisher nicht beachtete Flexibilität der Verformungsenergie der Fe-N-O Einheit wieder, welche andererseits durch elektrostatische Kräfte der Häm-Tasche [heme pocket] kontrolliert werden. Mit anderen Worten kann NO als lokaler Marker für die elektrostatischen Kräfte in der Häm-Tasche verwendet werden. Diese Arbeit zeigt auf, dass eine Modifikation der Bindeeigenschaften leicht durch Inhibitoren erreicht werden kann, die die elektrostatischen Eigenschaften der Häm-Tasche nur moderat beeinflussen. In vergleichbarer Weise verändern einige regulatorische Häm-Proteine, welche ein Substrat in der Nähe des aktiven Zentrums lokalisiert haben, nicht nur die Geometrie des zwei-Atom-Liganden, sondern auch die Bindungs-Kinetik, was zu einer spezifischen Erkennung von NO führt (Negrerie *et al.*, 1999).

Außerdem wird in dieser Arbeit der bakterielle NO-Signalweg untersucht. Die Identifikation des Sulfatreduktase-Flavoproteins (SiR-FP) als mögliches elektronengebendes System für das bakterielle NO-Synthase-Oxygenase-Domänen-Protein (bNOSoxy) (Zemojtel *et al.*, 2003b) (Kapitel 4.3) hat Konsequenzen für Wirt-Pathogen Interaktionsmechanismen. Weiterhin sollte diese Entdeckung eine detaillierte Untersuchung des implizierten Elektronenflusses zwischen der FMN-domäne des Sulfit-Reduktase-Flavoproteins und der bakteriellen bNOSoxy auslösen.

Die Entdeckung von potentiellen Mitgliedern einer neuen Familie von NO-Synthasen in Säugern (Zemojtel *et al.*, 2004a) (Kapitel 4.4), die nicht homolog zu den bisher beschriebenen Varianten sind, trägt zur Komplexität des NO-Signalwegs und erweitert unser Verständnis der zugrundeliegenden Biochemie. Aktuell wurde eine Zusammenarbeit mit Dr. Pavel Martasek (Prague, Tschechien) initiiert, welche eine genauere experimentelle Untersuchung der aufgezeigten neuen NO-Synthase im Menschen zum Ziel hat. Neben der Tatsache, dass die Mitglieder der neu entdeckten NO-Synthasen-Familie auch in pathogenen Mikroorganismen wirksam sind, erwächst auch die Möglichkeit, diese NO-synthasen als Ziele für neue Medikamente und für neue Behandlungsstrategien zu nutzen.

Scheele, J.S., Bruner, E., Zemojtel, T., Martasek, P., Roman, L.J., Masters, B.S., Sharma, V.S., and Magde, D. (2001) Kinetics of CO and NO ligation with the Cys(331)-->Ala mutant of neuronal nitric-oxide synthase. *J Biol Chem* 276: 4733-4736.

Zemojtel, T., Penzkofer, T., Dandekar, T., and Schultz, J. (2004a) A novel conserved family of Nitric Oxide Synthase? *Trends Biochem Sci* 29.

Zemojtel, T., Rini, M., Heyne, K., Dandekar, T., Nibbering, E.T.J., and Kozlowski, P.M. (2004b) NO-Bound Myoglobin: Structural Diversity and Dynamics of the NO Ligand. *J Am Chem Soc* 126: 1930-1931.

Zemojtel, T., Scheele, J.S., Martasek, P., Masters, B.S., Sharma, V.S., and Magde, D. (2003a) Role of the interdomain linker probed by kinetics of CO ligation to an endothelial nitric oxide synthase mutant lacking the calmodulin binding peptide (residues 503-517 in bovine). *Biochemistry* 42: 6500-6506.

Zemojtel, T., Wade, R.C., and Dandekar, T. (2003b) In search of the prototype of nitric oxide synthase. *FEBS Lett* 554: 1-5.